ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. ХИМИЯ, НАУКИ О МАТЕРИАЛАХ, 2021, том 496, с. 77–82

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 544.032

ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К КАЛЬЦИНОЗУ ЯРЕМНЫХ ВЕН БЫКА С ПОКРЫТИЯМИ, НАНЕСЕННЫМИ ИЗ РАСТВОРОВ В УГОЛЬНОЙ КИСЛОТЕ

© 2021 г. И. С. Чащин[1,*], А. А. Петленко[2], И. Л. Зайцев[3], Н. П. Бакулева[4]

Представлено академиком РАН А.Р. Хохловым 13.08.2020 г.
Поступило 17.08.2020 г.
После доработки 04.12.2020 г.
Принято к публикации 11.01.2021 г.

Впервые было проведено исследование устойчивости к кальцинозу яремных вен быка (ЯВБ) с хитозановым и бисфосфонатным покрытиями, нанесенными из растворов в среде системы вода/субкритический диоксид углерода (угольная кислота). Были исследованы образцы после гибридной децеллюляризации в сверхкритическом CO_2, а также с покрытиями, нанесенными из растворов в угольной кислоте под давлением ($P = 30$ МПа) и комнатной температуре. Было выявлено снижение кальциноза обработанных вен, особенно для вен с бисфосфонатным покрытием, на $\Delta = 90 \pm 5\%$, $p < 0.05$, по сравнению с общепринятым “золотым стандартом” (ЯВБ, сшитые глутаровым альдегидом и децеллюляризованные с помощью додецилсульфата натрия). Установлено, что для значительного подавления кальциноза ЯВБ необходимо сочетание комбинированных свойств покрытия, а именно: способности маскировать свободные альдегидные группы и способности подавлять рост патогенной микрофлоры (антимикробной активности).

Ключевые слова: сверхкритический диоксид углерода, угольная кислота, биопротезы, децеллюляризация, кальциноз, хитозан, бисфосфонаты

DOI: 10.31857/S2686953521010039

В настоящее время в кардиохирургической практике широко применяются девитализованные яремные вены быка (ЯВБ) в качестве альтернативы ксеногенным кондуитам (трубка на основе животного биоматериала с протезом клапана артерии) легочной артерии человека. Общепринятым “золотым стандартом” таких кондуитов является ЯВБ, децеллюляризованная в растворе полярного детергента – 1%-го раствора додецилсульфата натрия с последующей химической стабилизацией в 0.625%-ном растворе глутарового альдегида. Согласно данному протоколу производят широко распространенные кондуиты “Contegra”, получаемые из яремных вен крупного рогатого скота, разработанные компанией “VenPro Corp.” (США) в 1999 г. как альтернатива легочным аллотрансплантатам [1]. Эффект девитализации биоткани, в случае применения ионных детергентов – додецилсульфата натрия (ДСН) или дезоксихолата натрия, основан на разрушении клеточных мембран и денатурации белков [2] при взаимодействии с молекулами детергентов. Однако вследствие денатурации белков может происходить также и разрушение гликозаминогликанов и факторов роста, что нарушает ультраструктуру внеклеточного матрикса [3, 4].

Весьма перспективной выглядит концепция обработки вен в среде суб- и сверхкритического диоксида углерода (ск CO_2), поскольку позволяет быстро и в щадящем режиме децеллюляризовать ткань вен с сохранением структуры внеклеточного матрикса. В литературе представлены некото-

[1] *Институт элементоорганических соединений имени А.Н. Несмеянова Российской академии наук, 119991 Москва, Россия*

[2] *Московский физико-технический институт, 141701, Московская область, Долгопрудный, Россия*

[3] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119991, Москва, Россия*

[4] *Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии имени А.Н. Бакулева Министерства здравоохранения РФ, 119049 Москва, Россия*

**E-mail: chaschin@polly.phys.msu.ru*

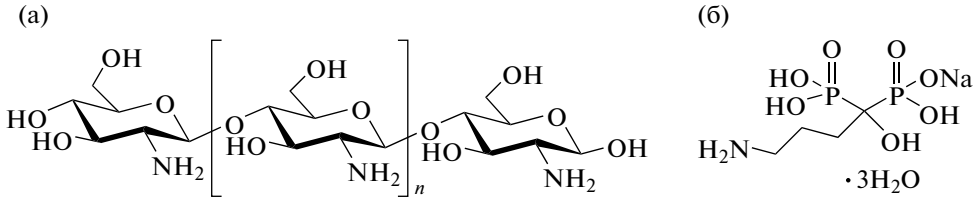

Рис. 1. Антикальциевые модификаторы ЯВБ: хитозан (а), алендронат натрия (бисфосфонат) (б).

рые протоколы с применением сверхкритического диоксида углерода с добавлением этанола и воды в качестве полярных сорастворителей для децеллюляризации некоторых видов биотканей [5, 6].

Ранее нами была разработана методика гибридной децеллюляризации ЯВБ, сочетающая экспресс-отмывку в растворе додецилсульфата натрия с последующей экспозицией в многокомпонентной системе, включающей воду, неполярный детергент (Твин-80, “Sigma-Aldrich”, США) и этанол в растворе ск CO_2, которая подробно описана в работе [7]. Была показана эффективность такого подхода с точки зрения децеллюляризации и сохранения механико-прочностных характеристик ткани вен. Дополнительно был разработан комбинированный способ модификации ЯВБ: гибридная децеллюляризация с последующим нанесением протекторного хитозанового покрытия из растворов в системе вода/субкритический диоксид углерода под давлением (угольная кислота). Было доказано улучшение механико-прочностных характеристик таких ЯВБ [7]. Кроме того, хитозановое покрытие является абсолютно биосовместимым, придает антимикробные [8] и антитромбогенные [9] свойства биоматериалу, что позволяет рассматривать децеллюляризованные ЯВБ с хитозановым покрытием как альтернативу нативному, вышедшему из строя сосуду.

Известно, что кальциноз коллагеновых матриц биопротезов в основном возникает в результате иммунного ответа организма на наличие ксеногенных клеток и клеточных компонентов, а также контакта тока крови со свободными остаточными группами глутарового альдегида на поверхности биоматериала [10]. Поэтому можно предположить, что, применяя комбинированный подход децеллюляризации с последующим нанесением покрытия, экранирующего матрицу от контакта с током крови, удастся устранить два основных фактора развития кальциноза – фосфолипиды, клетки и клеточные элементы, а также закрыть свободные остаточные группы глутарового альдегида [10]. Помимо полимерного протекторного покрытия могут быть использованы покрытия на основе бисфосфонатов, эффективность которых с точки зрения подавления кальциноза перикардиальной ткани биопротезов хорошо известна [11]. Поскольку ранее мы показали эффективность метода нанесения протекторного хитозанового покрытия из растворов в угольной кислоте под давлением на перикард, то ожидается, что и в случае модификации ЯВБ с целью снижения кальциноза данный метод нанесения покрытий будет наиболее предпочтителен.

Целью настоящей работы являлось исследование устойчивости ткани модифицированных ЯВБ к кальцинозу с помощью специальной *in vivo* модели. Согласно данной модели, крысам подкожно имплантировались образцы модифицированных вен, которые находились в организме животных в течение 12 нед. с учетом специальной кальций-промоутирующей диеты. После экспозиции образцы извлекались и исследовались на количество солей кальция спектрофотометрическим методом.

В качестве антикальциевых модификаторов использовали полимер хитозан (# 448869, “Sigma-Aldrich”, США) и низкомолекулярный бисфосфонат – алендронат натрия (# 121268-17-5, “Sigma-Aldrich”, США), структурные формулы которых приведены на рис. 1.

Использовали ЯВБ, прошедшие этап лабораторного отбора и механической очистки. Контрольные и опытные образцы вен группы 1 (“ГА”, табл. 1) проходили цикл предобработки, включающий сшивку в 0.625%-ом водном растворе глутарового альдегида (ГА, “Merck”, Германия) в буфере HEPES (“Sigma-Aldrich”, США) и обработку 1%-м водным раствором додецилсульфата натрия. Затем опытные образцы группы 1 подвергали протоколу гибридной децеллюляризации, подробно описанной в работе [7], согласно которому вены предварительно отмывали в течение 1 ч в 1%-ом водном растворе ДСН и затем проводили экспозицию в растворе многокомпонентной системы: ск CO_2/этанол/вода/Твин-80 в квазидинамическом режиме с закачкой и сбросом CO_2 (“Гибрид”, табл. 1). Экспозицию в растворе ск CO_2 проводили в установке с объемом реактора 300 мл “SFT-150” (“Supercritical Fluid Technologies Inc.”, США). После герметизации в реактор нагнетали CO_2 (чистота >99.997%, АО “Линде Газ Рус”, Россия). В течение экспозиции в реактор

Таблица 1. Результаты анализа способности к подавлению кальциноза вен, обработанных с помощью суб- и сверхкритического диоксида углерода ($M \pm m$, $N = 27$)

№ группы, образец	Описание обработки	Концентрация Ca, мг г$^{-1}$	Нормализованное содержание Ca относительно контроля, %
1. “ГА” (“золотой стандарт”)	Вены, сшитые в 0.625% растворе ГА и отмытые в 1% ДСН в течение суток	31.0 ± 6.0	11.0 ± 3.0
2. “Гибрид”	Вены, отмытые в 1% ДСН (1 ч) + обработка в ск CO_2 с детергентом Твин-80	23.0 ± 3.0	8.0 ± 2.0
3. “Гибрид + Хитозан”	“Гибрид”, сшитые в 0.625% растворе ГА, + нанесение хитозана из 1% раствора полимера в угольной кислоте	24.0 ± 5.0	8.0 ± 2.0
4. “Гибрид + Хитозан/Ag”	“Гибрид”, сшитые в 0.625% растворе ГА, + нанесение хитозана с наночастицами Ag из 1% раствора полимера со стабилизированными наночастицами в угольной кислоте	19.0 ± 3.0	6.0 ± 1.0
5. “Гибрид + Бисфосфонат”	“Гибрид”, сшитые в 0.625% растворе ГА, + экспозиция в 1% растворе алендроната натрия в угольной кислоте	2.5 ± 1.0	1.0 ± 0.5

парциально впрыскивали 95%-й этанол (ООО “Константа-Фарм М”, Россия) через вспомогательный насос со скоростью1 мл мин$^{-1}$. Опытные образцы группы 2 проходили стадию гибридной очистки (аналогично образцам группы 1) с последующим нанесением хитозанового покрытия или хитозанового покрытия с наночастицами серебра (“Гибрид + Хитозан” или “Гибрид + Хитозан/Ag” соответственно) из 1%-го раствора полимера в системе вода/субкритический диоксид углерода (угольная кислота) под давлением 30 МПа при t = = 23–25°C в течение 3 ч (группы 3 и 4, табл. 1). Образцы вен группы 5 проходили стадию экспозиции в 1%-м растворе алендроната натрия (“Sigma-Aldrich”, США) в угольной кислоте под давлением 30 МПа при t = 23–25°C в течение 3 ч после стадии гибридной децеллюляризации (“Гибрид + Бисфосфонат”, табл. 1).

Исследования кальциноза образцов модифицированных ЯВБ проводили на крысах, которые, благодаря быстрому метаболизму их организма, могут служить удобной моделью для экспресс-тестирования *in vivo*. Модифицированные образцы ЯВБ с площадью 2–3 см^2, покрытых хитозаном (наносили из растворов углекислоты), имплантировали подкожно самцам крыс породы “Wistar” (возраст 1 мес, вес 90–115 г) под наркозом. После имплантации животные содержались в нормальных условиях и получали пищу *ad libitum*. Через 4 мес. после имплантации образцы ЯВБ были извлечены из животных и промыты в физиологическом растворе для удаления остатков крови животных. Содержание кальция в образцах определяли атомно-абсорбционным спектрофотометром “AAC-5100/Zeeman” (“Perkin-Elmer”, Германия). Количественные данные анализировали с помощью двухвыборочного независимого t-критерия ($\alpha = 0.05$) с использованием “Origin 8” (“OriginLab Corp.”, США).

С целью доказательства наличия антикальциевых покрытий были проанализированы ИК-спектры нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) поверхностей образцов ЯВБ. Для децеллюляризованных гибридным методом вен [7] удалось детектировать типичные для коллагена пики в области 3292–3305 см$^{-1}$ (OH, NH, амид A), 3078 см$^{-1}$ (амид B), 2928 см$^{-1}$ (CH_2) [10], 1651–1633 см$^{-1}$ (тройной пик C=O) [12] и 1234 см$^{-1}$ (NH, пролин, амид III). Характерные для хитозана пики отчетливо видны на спектрах образцов с полимерным покрытием в области 3440 см$^{-1}$ (OH и NH), 1658 см$^{-1}$ (CO) и 1598 см$^{-1}$ (амид II, NH_2) [13]. Спектр вены с покрытием из алендроната натрия содержал отчетливые пики в области

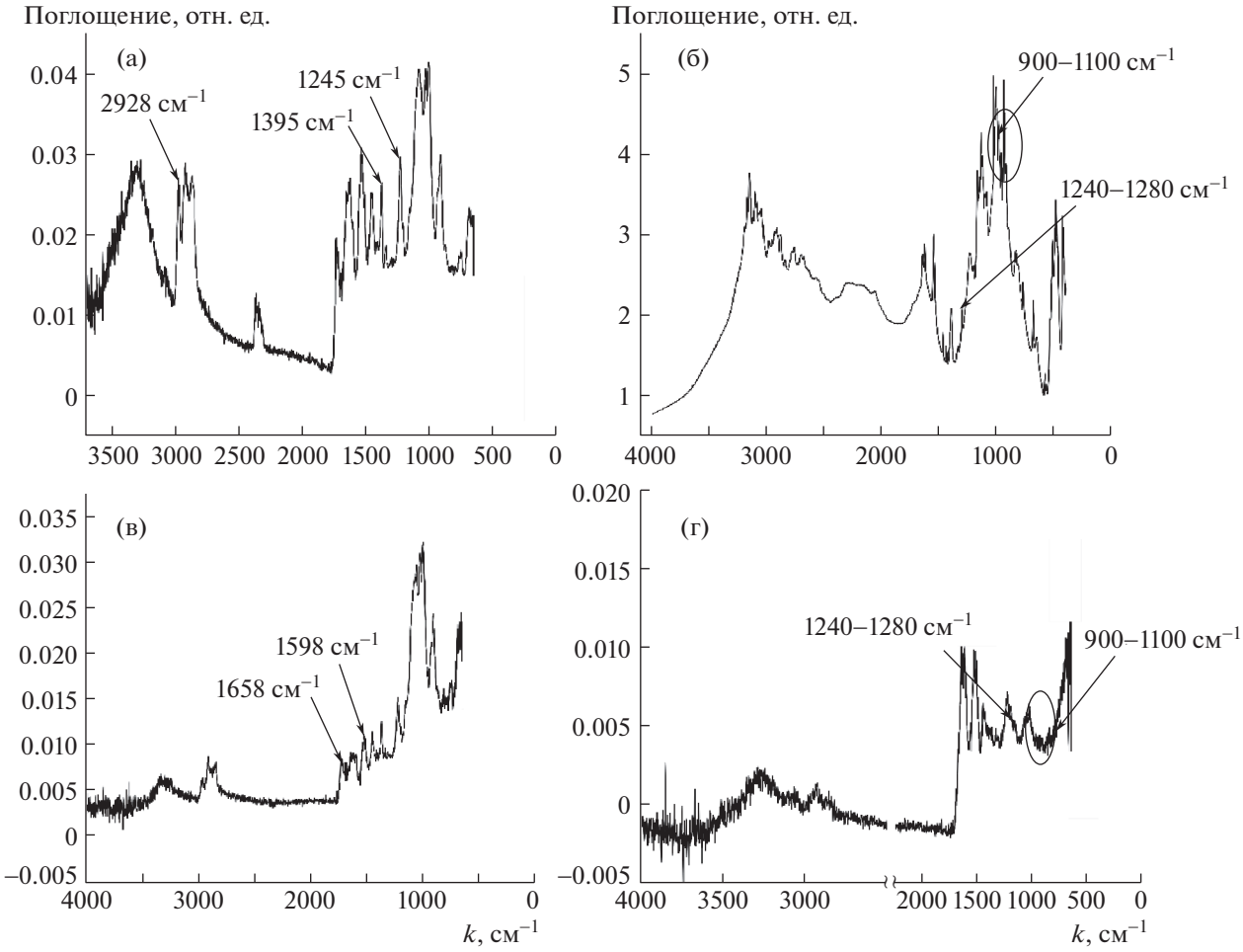

Рис. 2. ИК НПВО спектры алендроната натрия (б) и ЯВБ: после гибридной децеллюляризации (а); после гибридной децеллюляризации с хитозановым покрытием, нанесенным из растворов в угольной кислоте (в); после гибридной децеллюляризации с бисфосфонатным покрытием, нанесенным из растворов в угольной кислоте (г).

1240–1280 см$^{-1}$, а также системы пиков в области 900–1100 см$^{-1}$ (рис. 2г), что характерно для области колебаний PO-группы [14, 15]. Сложность в выделении характерных пиков алендронатного покрытия связана с их перекрыванием с колебательной областью третичного углерода COH [14] (≈1100–1210 см$^{-1}$), однако для вен с покрытием пики в данной области более выражены, чем для обычных очищенных вен (рис. 2а,г), что косвенно подтверждает наличие бисфосфонатного покрытия, адсорбированного на ткань ЯВБ.

Поскольку ранее была доказана эффективность децеллюляризации вен после гибридной обработки [7], то как отсутствие клеток и клеточных компонентов в тканях вен, так и наличие маскирующего полимерного или бисфосфонатного покрытия, экранирующего коллагеновую матрицу от тока крови, позволяют ожидать снижение степени кальциноза вен по сравнению с существующим “золотым стандартом”.

Действительно, было показано существенное понижение степени связывания солей кальция венами, претерпевшими гибридную очистку с помощью ск CO_2, на $\Delta = 30 \pm 10\%$ (сравнение групп 1 и 2, табл. 1 $p < 0.05$, где p – уровень значимости, вероятность того, что сравниваемые группы в табл. 1. статистически неразличимы). Несмотря на наличие хитозанового покрытия в достаточно большом количестве (~1 вес. % хитозана от веса биоткани [7]), способность к подавлению кальциноза у вен с полимерным покрытием не отличается от вен без такового (сравнение групп 2 и 3, табл. 1, $p > 0.05$). Однако для вен с покрытием с внедренными наночастицами серебра и усиленными антимикробными свойствами наблюдалось значительное подавление кальциноза на $\Delta = 45 \pm 10\%$ по сравнению не только с “золотым стандартом” (сравнение групп 1 и 4, табл. 1, $p < 0.05$), но и по сравнению с децеллюляризованными в ск CO_2 венами (на $\Delta = 25 \pm 10\%$, сравнение групп 2 и 4,

табл. 1, $p < 0.05$). Бисфосфонатное покрытие, в отличие от хитозанового, вызывает значительное снижение кальциноза биоткани ЯВБ (на $\Delta = 85 \pm 5\%$) в сравнении с венами после гибридной децеллюляризации (сравнение групп 2 и 5, табл. 1, $p < 0.05$), и на $\Delta = 90 \pm 5\%$ по сравнению с "золотым стандартом" (сравнение групп 1 и 5, табл. 1, $p < 0.05$).

Известно, что наночастицы серебра обладают повышенной антимикробной активностью [16]. Также и алендронат натрия подавляет рост некоторых грамотрицательных патогенов [17]. Следовательно, при использовании в качестве имплантируемых биопротезов ЯВБ с нанесенными для подавления кальциноза защитными покрытиями, экранирующими свободные остаточные альдегидные группы, необходимо обеспечить также и наличие у протезов выраженных антимикробных свойств. Важность данного аспекта, скорее всего, связана с особенностью строения яремных бычьих вен, которые имеют выраженную разрыхленную волокнистую адвентицию. Вероятность адсорбции патогенов на такую ткань значительно повышается, что определяет усиленный иммунный ответ со стороны организма, проявляющийся, в том числе, в кальцификации биоткани протеза, которую предпочтительно было бы предотвратить.

СОБЛЮДЕНИЕ СТАНДАРТОВ РАБОТЫ С ЖИВОТНЫМИ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 17-03-00362 а, № 20-03-00362 а). Доступ к электронным научным ресурсам был предоставлен ИНЭОС РАН при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Сойнов И.А., Журавлева И.Ю., Кулябин Ю.Ю., Ничай Н.Р., Афанасьев А.В., Алешкевич Н.П., Богачев-Прокофьев А.В., Караськов А.М.* // Хирургия. 2018. № 1. С. 75–81. https://doi.org/10.17116/hirurgia2018175-81
2. *Keane T.J., Swinehart I.T., Badylak S.F.* // Methods. 2015. V. 84. P. 25–34. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.03.005
3. *Kundu J., Michaelson A., Talbot K., Baranov P., Young M.J., Carrier R.L.* // Acta Biomater. 2016. V. 31. P. 61–70. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.11.028
4. *Jones G., Herbert A., Berry H., Edwards J.H., Fisher J., Ingham E.* // Tissue Eng., Part A. 2017. V. 23. P. 124–134. https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2016.0114
5. *Sawada K., Terada D., Yamaoka T., Kitamura S., Fujisato T.* // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2008. V. 83. P. 943–949. https://doi.org/10.1002/jctb.1899
6. *Guler S., Aslan B., Hosseinian P., Aydin H.M.* // Tissue Eng. C. 2017. V. 23. P. 540–547. https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2017.0090
7. *Chaschin I.S., Khugaev G.A., Krasheninnikov S.V., Petlenko A.A., Badun G.A., Chernysheva M.G., Dzhidzhikhiya K.M., Bakuleva N.P.* // J. Supercrit. Fluids. 2020. V. 164. 104893. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104893
8. *Gallyamov M.O., Chaschin I.S., Khokhlova M.A., Grigorev T.E., Bakuleva N.P., Lyutova I.G., Kondratenko J.E., Badun G.A., Chernysheva M.G., Khokhlov A.R.* // Mater. Sci. Eng. C. 2014. V. 37. P. 127–140. https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.01.017
9. *Lü X.Y., Huang Y., Ma C.Q.* // Sensors. 2001. V. 1. P. 148–160. https://doi.org/10.3390/s10500148
10. *Schoen F., Tsao J., Levy R.* // Am. J. Pathol. 1986. V. 123. P. 134–145.
11. *Webb C.L., Benedict J.J., Schoen F.J., Linden J.A., Levy R.J.* // Ann. Thorac. Surg. 1988. V. 46. P. 309–316. https://doi.org/10.1016/S0003-4975(10)65932-2
12. *Santos M.H., Suva R.M., Dumont V.C., Neves J.S., Mansur H.S., Heneine L.G.D.* // Mater. Sci. Eng. C. 2013.V. 33. P. 790–800. https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.11.003
13. *Theapsak S., Watthanaphanit A., Rujiravanit R.* // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2012. V. 4. P. 2474–2482. https://doi.org/10.1021/am300168a
14. *Lin-Vien D., Colthup N.B., Fateley W.G., Grasselli J.G.* The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules / London, Academic Press Limited, 1991, p. 503.
15. *Cukrowski I., Popović L., Barnard W., Paul S.O., van Rooyen P.H., Liles D.C.* // Bone. 2007. V. 41. № 4. P. 668–678. https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.05.008
16. *Panáček A., Kvítek L., Prucek R., Kolář M., Večeřová R., Pizúrová N., Sharma V.K., Nevěčná T., Zbořil R.* // J. Phys. Chem. B. 2006. V. 110. P. 16248–16253. https://doi.org/10.1021/jp063826h
17. *Menezes A.M.A., Rocha F.A.C., Chaves H.V., Cibele B.M., Carvalho C.B.M., Ribeiro R.A., Brito G.A.C.* // J. Periodontol. 2005. V. 76. P. 1901–1909. https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.11.1901

A STUDY OF RESISTANCE TO CALCINOSIS OF BOVINE JUGULAR VEINS WITH COATINGS DEPOSITED FROM SOLUTIONS IN CARBONIC ACID

I. S. Chashchin[a,#], A. A. Petlenko[b], I. L. Zaitsev[c], and N. P. Bakuleva[d]

[a] *A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Sciences, 119991, Moscow, Russian Federation*

[b] *The Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russian Federation*

[c] *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Fundamental Medicine, 119991, Moscow, Russian Federation*

[d] *Bakulev National Medical Research Center for Cardiovascular Surgery, Ministry of Health, 119049, Moscow, Russian Federation*

[#] *E-mail: chaschin@polly.phys.msu.ru*

Presented by Academician of the RAS A.R. Khokhlov August 13, 2020

For the first time, a study of the resistance to calcinosis of bull jugular veins (BJVs) with chitosan and bisphosphonate coatings applied from solutions in the medium of the water/subcritical carbon dioxide (carbonic acid) system was conducted. Samples of veins after hybrid decellularization in supercritical CO_2, as well as with chitosan and bisphosphonate coatings applied from solutions in carbonic acid under pressure ($P = 30$ MPa) and at room temperature were studied. There was a decrease in calcification of treated veins, especially for veins with bisphosphonate coating – by $\Delta = 90 \pm 5\%$, $p < 0.05$ compared to the generally accepted "gold standard" (BJVs crosslinked with glutaraldehyde and decellularized with sodium dodecyl sulfate). It was established that for significant suppression of calcification of the surface, a presence of combined properties of the coating is necessary, namely: 1) the ability to mask free aldehyde groups and 2) the ability to suppress the growth of pathogenic microflora (antimicrobial activity).

Keywords: supercritical carbon dioxide, carbonic acid, bioprostheses, decellularization, calcinosis, chitosan, bisphosphonates