

## Особенности накопления липидов в створках эпоксиобработанных ксеногенных биопротезов клапанов сердца

А.Е. Костюнин, Т.В. Глушкова, Л.А. Богданов, М.А. Резцова, Е.А. Овчаренко

ФГБНУ Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия

**Резюме.** *Введение.* Ксенобиопротезы клапанов сердца подвержены развитию структурной дегенерации их биологического компонента. Этот процесс сопровождается отложением липидов крови в биоматериале. Ранее было выдвинуто предположение, что липидная инсудация створчатого аппарата ксенобиопротезов вторична к клеточной инфильтрации, а за удержание липидов в ксеноткани ответственны продуцируемые клетками реципиента гликозаминогликаны. Целями настоящей работы стали изучение закономерностей накопления липидов в створчатом аппарате имплантатов, а также проверка гипотезы об участии клеток и гликозаминогликанов в этом процессе.

*Материалы и методы.* Материалом для исследования послужили 10 ксенобиопротезов (пять ксеноаортальных и пять ксеноперикардиальных), эксплантированных из митральной позиции при репротезировании. Створки полученных образцов отделяли от каркаса и замораживали для подготовки срезов на криотоме. С целью изучения клеточной инфильтрации, а также выявления дегенеративных изменений в протезном биоматериале срезы окрашивали гематоксилином Джилла и эозином. Для анализа компонентного состава створок и визуализации липидных пятен применяли окрашивание пентахромом по Мовату и масляным красным, соответственно. Анализ окрашенных срезов осуществляли методом световой микроскопии.

*Результаты.* В створках всех изученных ксеноаортальных биопротезов присутствовали крупные липидные пятна и скопления пенистых клеток, однако таковые не были обнаружены в створках ксеноперикардиальных имплантатов. Отложения липидов и клеточные инфильтраты, как правило, не локализовались совместно друг с другом. Окрашивание пентахромом по Мовату показало отсутствие гликозаминогликанов в створках ксенобиопротезов обоого типа.

*Заключение.* Интенсивность липидной инсудации в створчатый аппарат ксенобиопротезов зависит от типа биоматериала, из которого он изготовлен. Накоплению липидов крови подвержены створки ксеноаортальных, но не ксеноперикардиальных биопротезов. Присутствие клеточных инфильтратов и гликозаминогликанов в створках не является определяющим фактором, способствующим накоплению липидов.

**Ключевые слова:** биопротезы клапанов сердца, структурная дегенерация клапана, клеточная инфильтрация, липиды крови, гликозаминогликаны

**Для корреспонденции:** Александр Евгеньевич Костюнин. E-mail: rhabdophis\_tigrina@mail.ru

**Для цитирования:** Костюнин А.Е., Глушкова Т.В., Богданов Л.А., Резцова М.А., Овчаренко Е.А. Особенности накопления липидов в створках эпоксиобработанных ксеногенных биопротезов клапанов сердца. Клин. эксп. морфология. 2022;11(2):32–42. DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.32-42.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 21-75-10107.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 25.10.2021. Получена после рецензирования 29.11.2021. Принята в печать 16.12.2021.

## Lipid accumulation features in the heart valve epoxy-treated xenograft

А.Е. Костюнин, Т.В. Глушкова, Л.А. Богданов, М.А. Резцова, Е.А. Овчаренко

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia

**Abstract.** *Introduction.* Xenograft heart valves are prone to structural valve degeneration accompanied by lipid accumulation. Research data suggest that the lipid insudation of bioprosthetic valve is secondary

to cellular infiltration, since glycosaminoglycans produced by the recipient's cells are responsible for the lipid storage in the xenograft tissue. The objective of this research was to study the mechanisms of lipid accumulation in the heart valve xenograft, and to test the hypothesis that cells and glycosaminoglycans play a role in this process.

*Materials and methods.* The study included 10 explanted bioprosthetic mitral valves (5 xenoaortic and 5 xenopericardial). We separated the leaflets of these valves from the stent, then the material was frozen and transferred to the cryotome for section preparation. The sections were stained with Gill's H&E staining in order to study the cellular infiltration and detect any degenerative changes. To analyze the component composition of the leaflets the sections were stained with Movat's pentachrome, whereas Oil Red O was used to visualize the lipids. We used light microscopy to analyze the stained samples.

*Results.* Lipids and clusters of foam cells were present in all xenoaortic heart valves, but they were not found in the xenopericardial heart valves. Most lipid deposits and cellular infiltrates were not colocalized. Movat's pentachrome staining revealed an absence of glycosaminoglycans in the leaflets of both types of bioprostheses.

*Conclusion.* The intensity of lipid insudation in the leaflets of bioprosthetic heart valves depends on the xenograft biomaterial. Xenoaortic bioprosthetic heart valves are revealed to be prone to lipid accumulation, unlike xenopericardial bioprostheses. The presence of cell infiltration and glycosaminoglycans in the leaflets is not a determining factor contributing to the accumulation of lipids.

**Keywords:** bioprosthetic heart valves, structural valve degeneration, cell infiltration, blood lipids, glycosaminoglycans

**Corresponding author:** Alexander E. Kostyunin. E-mail: rhabdophis\_tigrina@mail.ru

**For citation:** Kostyunin A.E., Glushkova T.V., Bogdanov L.A., Rezvova M.A., Ovcharenko E.A. Lipid accumulation features in the heart valve epoxy-treated xenograft. Clin. exp. morphology. 2022;11(2):32–42 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.32-42.

**Funding.** The study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 21-75-10107.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Received** 25.10.2021. **Received in revised form** 29.11.2021. **Accepted** 16.12.2021.

## Введение

В современной хирургии для замены несостоятельных нативных клапанов сердца чаще всего используют механические и ксеногенные биологические протезы, изготавливаемые из искусственных материалов или химически стабилизированных тканей животных, соответственно [1]. Последние выгодно отличаются от своих механических аналогов низкой тромбогенностью, но они менее долговечны [2]. До 30% ксенобиопротезов требует замены из-за развития дисфункций уже через 10 лет после имплантации [3]. Основной причиной несостоятельности имплантатов этого типа является структурная дегенерация ксеноткани, из которой изготовлен створчатый аппарат [4, 5]. Эта особенность существенно ограничивает возможности применения ксенобиопротезов у пациентов моложе 65 лет [6, 7].

Согласно современным представлениям, механизмы, стоящие за структурной дегенерацией ксенобиопротезов, включают хроническое иммунное отторжение, для которого характерны некоторые черты, свойственные атеросклеротическому поражению сосудов и минерализации нативных клапанов аорты [1]. Так, результаты оригинальных исследований демонстрируют, что в створках ксенобиопротезов, удаленных вследствие дисфункций, присутствуют значительные отложения липидов, которые локализуются совместно

с инфильтратами макрофагов и пенистых клеток [8, 9]. При этом липиды стимулируют секрецию иммунными клетками матриксных металлопротеиназ, которые, в свою очередь, способны расщеплять основные склеропротеины ксеноткани и приводить к ухудшению ее прочностных свойств [9]. Также липиды крови переносят ряд ферментов, таких как липопротеин-ассоциированная фосфолипаза А2. Хотя о влиянии данного соединения на протезную ксеноткань пока ничего неизвестно, повышенные уровни этого фермента в крови положительно коррелируют с более быстрыми темпами структурной дегенерации и ухудшением гемодинамических параметров биопротезов [10, 11]. Наконец, липиды крови могут участвовать в окислительно обусловленной дегенерации биоматериала и выступать в качестве ядер кальцификации [8]. В совокупности накопленные к настоящему моменту данные позволяют считать отложение липидов в створках ксенобиопротезов одним из факторов, способных ускорять протеолитическую, окислительную и кальциевую деградацию протезного биоматериала.

Несмотря на потенциально важную роль липидов крови в дегенерации створчатого аппарата ксенобиопротезов, механизмы липидной инсудации в ксеноткань изучены слабо. Основываясь на собственных оригинальных данных, Р. Шетти (R. Shetty) с соавторами высказали предположение, согласно которому

за удержание липидов в протезных створках могут отвечать продуцируемые макрофагами гликозаминогликаны [9]. Впрочем, эта гипотеза не была проверена на примере эпоксиобработанных биопротезов, производимых в России ЗАО «НеоКор» (Кемерово). Последние отличаются от зарубежных аналогов тем, что для стабилизации ксенотканей при их изготовлении вместо глутарового альдегида используют диглицидиловый эфир этиленгликоля [12, 13]. Кроме того, до сих пор оставалось неясным, зависит ли интенсивность липидной инсудации от типа ткани, из которой изготовлен створчатый аппарат ксенобиопротезов: аортального комплекса свиньи или перикарда крупного рогатого скота [14].

Таким образом, целями настоящей работы стали изучение закономерностей накопления липидов в створках эпоксиобработанных биопротезов разного типа – ксеноаортальных и ксеноперикардиальных, а также проверка гипотезы об участии клеток реципиента и гликозаминогликанов в этом процессе.

## Материалы и методы

Материалом для исследования служили 10 ксенобиопротезов, эксплантированных из митральной позиции в ходе репротезирования. Среди изученных образцов были ксеноаортальные протезы моделей «КемКор» ( $n=2$ ) и «ПериКор» ( $n=3$ ), а также ксеноперикардиальные протезы модели «ЮниЛайн» ( $n=5$ ) производства ЗАО «НеоКор» (Кемерово, Россия). Средний возраст реципиентов ксеноаортальных биопротезов на момент репротезирования составил  $61,4 \pm 10,2$  года, ксеноперикардиальных –  $63,0 \pm 14,8$  года. Средний срок функционирования имплантатов первого и второго типа достигал  $158,4 \pm 20,9$  и  $57,0 \pm 23,2$  месяца, соответственно. Только один реципиент ксеноаортального биопротеза страдал дислипидемией.

После иссечения ксенобиопротезы помещали в 0,9% раствор натрия хлорида и доставляли в лабораторию, где проводили макроскопический анализ дегенеративных изменений биологического материала с последующей подготовкой образцов для гистологического исследования. Створки полученных биопротезов отделяли от каркаса, фиксировали в криогеле Neg-50 (Thermo Scientific, Германия) и с помощью криотома Microm HM 525 (Thermo Scientific, Германия) проводили подготовку серийных срезов толщиной  $6 \pm 1$  мкм. Готовые срезы размещали на предметных стеклах по 4–5 штук. Для изготовления срезов брали центральную часть каждой из трех створок ксенобиопротеза от основания до свободного края, а также участки с дегенеративными изменениями – разрывами, утолщением и кальцификацией биоматериала, выявленными макроскопически.

Для изучения локализации клеточных элементов и выявления степени дегенеративных изменений протезного ксенобиоматериала использовали окрашивание гематоксилином Джилла («БиоВитрум», Россия)

и эозином («БиоВитрум», Россия) по протоколу, который был оптимизирован ранее для элементов системы кровообращения [15]. Компонентный состав тканей створок и присутствие липидов определяли с помощью наборов для пентахромного окрашивания по Мовату (Abscam, Великобритания) и окрашивания масляным красным (Abscam, Великобритания), соответственно. Указанные окрашивания выполняли по протоколам производителя. В качестве контроля использовали интактные створки неимплантированных ксеноаортального и ксеноперикардиального биопротезов («НеоКор», Кемерово). Анализ окрашенных образцов осуществляли посредством микроскопа AxioImager.A1 (Zeiss, Германия), обработку изображений проводили с помощью программы AxioVision (Zeiss, Германия). Результаты оценивали два гистолога независимо друг от друга.

Исследование проводили в соответствии с принципами Надлежащей клинической практики и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (протокол № 19 от 06.11.2018). Все пациенты подписали письменное информированное согласие после разъяснения сути исследования.

## Результаты

Макроскопическое изучение эксплантированных ксенобиопротезов показало, что створки всех полученных образцов характеризовались утолщением ксеноткани. Для створок ксеноаортальных биопротезов отмечены перфорации и разрывы, локализованные преимущественно в областях коаптации и комиссур. Также мы наблюдали умеренное разрастание соединительной ткани реципиента (паннуса) на створчатом аппарате всех ксеноаортальных и двух ксеноперикардиальных биопротезов. Паннус присутствовал со стороны выводящего отдела и способствовал фиксации створок к каркасу с ограничением открытия клапана. Крупные кальцификаты были выявлены в створках всех имплантатов, однако тяжелую кальцификацию, выражающуюся в тотальном обызвествлении створчатого аппарата, наблюдали только у трех ксеноперикардиальных биопротезов.

Анализ криосрезов створок, окрашенных гематоксилином Джилла и эозином, показал умеренную клеточную инфильтрацию как ксеноаортальных, так и ксеноперикардиальных биопротезов: клетки реципиента располагались одиночно или небольшими скоплениями на поверхности ксеноткани, а также в разрыхленных предповерхностных слоях, но практически отсутствовали в толще биоматериала (рис. 1). Изучение морфологии клеточных элементов, в частности формы и размера ядер, позволило идентифицировать в составе инфильтратов нейтрофилы, макрофаги и гигантские многоядерные клетки. Наиболее подверженными кле-

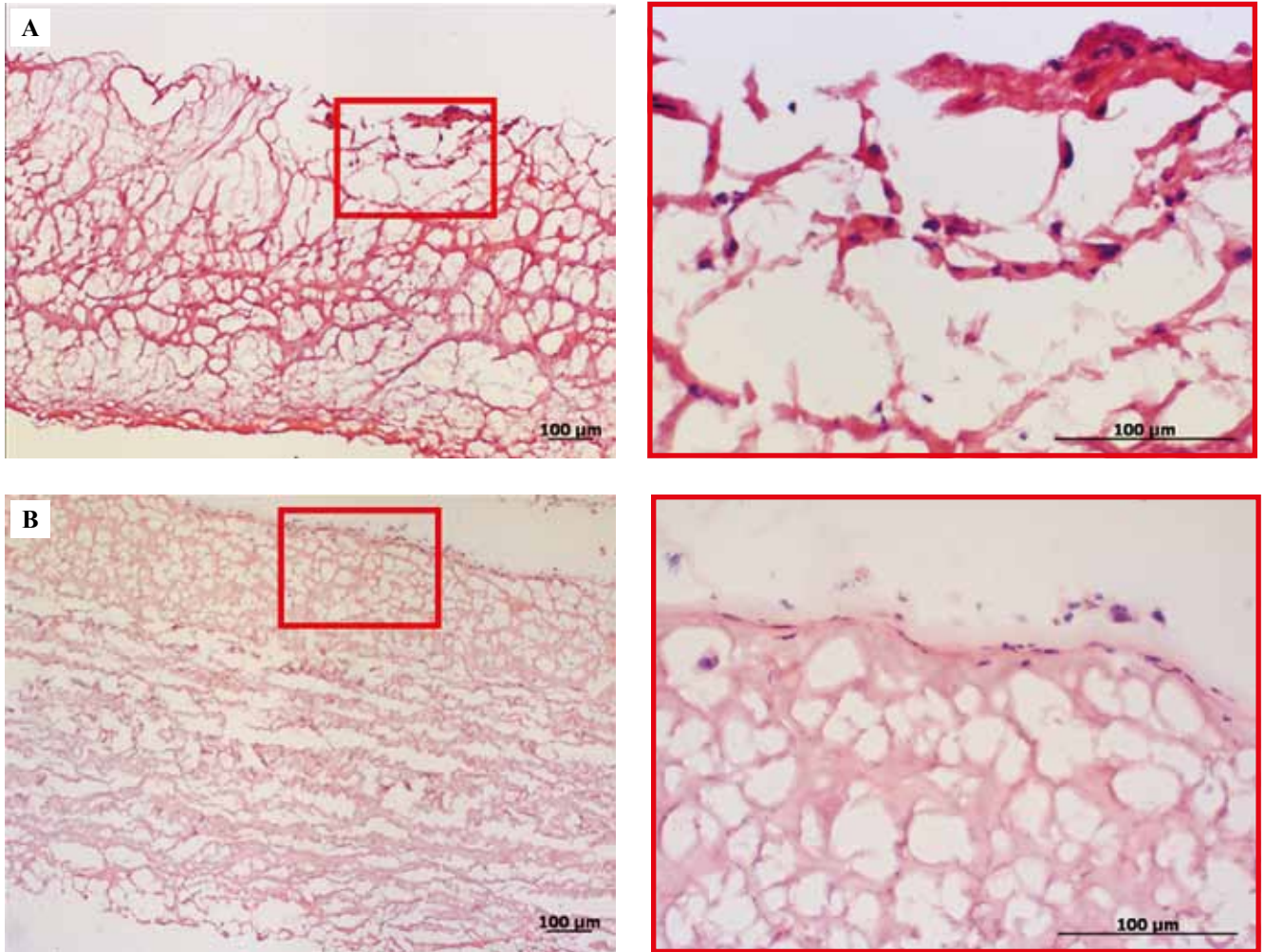


Рис. 1. Примеры клеточной инфильтрации створок ксеногенных биопротезов клапанов сердца.

А – створка ксеноаортального биопротеза, В – створка ксеноперикардального биопротеза. Окраска гематоксилином Джилла и эозином

Fig. 1. Examples of cellular infiltration of xenograft heart valves.

A – the leaflet of the xenoaortic bioprosthetic heart valve, B – the leaflet of the xenopericardial bioprosthetic heart valve. Gill's H&E staining

точной инфильтрации оказались области вблизи основания створок со стороны выводного отдела. В составе паннуса присутствовали удлиненные веретеновидные клетки, идентифицированные как фибробласты или гладкомышечные клетки, однако они не были выявлены в ксеноткани.

Волокнистая основа ксенотканей как ксеноаортальных, так и ксеноперикардальных биопротезов несла признаки набухания, разволокнения и фрагментации, что объясняет макроскопически наблюдаемое утолщение створчатых аппаратов изученных клапанов. При этом структура внеклеточного матрикса створок ксеноаортальных биопротезов отличалась от таковой ксеноперикардальных имплантатов большей рыхлостью и дезорганизацией волокон. Следует подчеркнуть, что эти различия обусловлены структурными особенностями, а не износом используемого биоматериала: створки аортального клапана свиньи ис-

ходно имеют рыхлый спонгиозный слой, тогда как для перикарда характерна плотная упаковка коллагеновых волокон. Кроме того, эффект дезорганизации матрикса ксеноаортальных биопротезов усиливается ввиду потери гликозаминогликанов спонгиозой при химической стабилизации ксеноткани и последующем функционировании имплантатов в организме реципиента [16].

Анализ компонентного состава внеклеточного матрикса створок ксенобиопротезов посредством пентахромного окрашивания по Мовату продемонстрировал, что волокнистый компонент биоматериала имплантатов обоого типа состоял из коллагена (рис. 2). При этом он не содержал следов эластина и гликозаминогликанов. Последние были обнаружены вблизи клеточных инфильтратов и в составе разросшейся поверх створчатого аппарата соединительной ткани (паннуса).

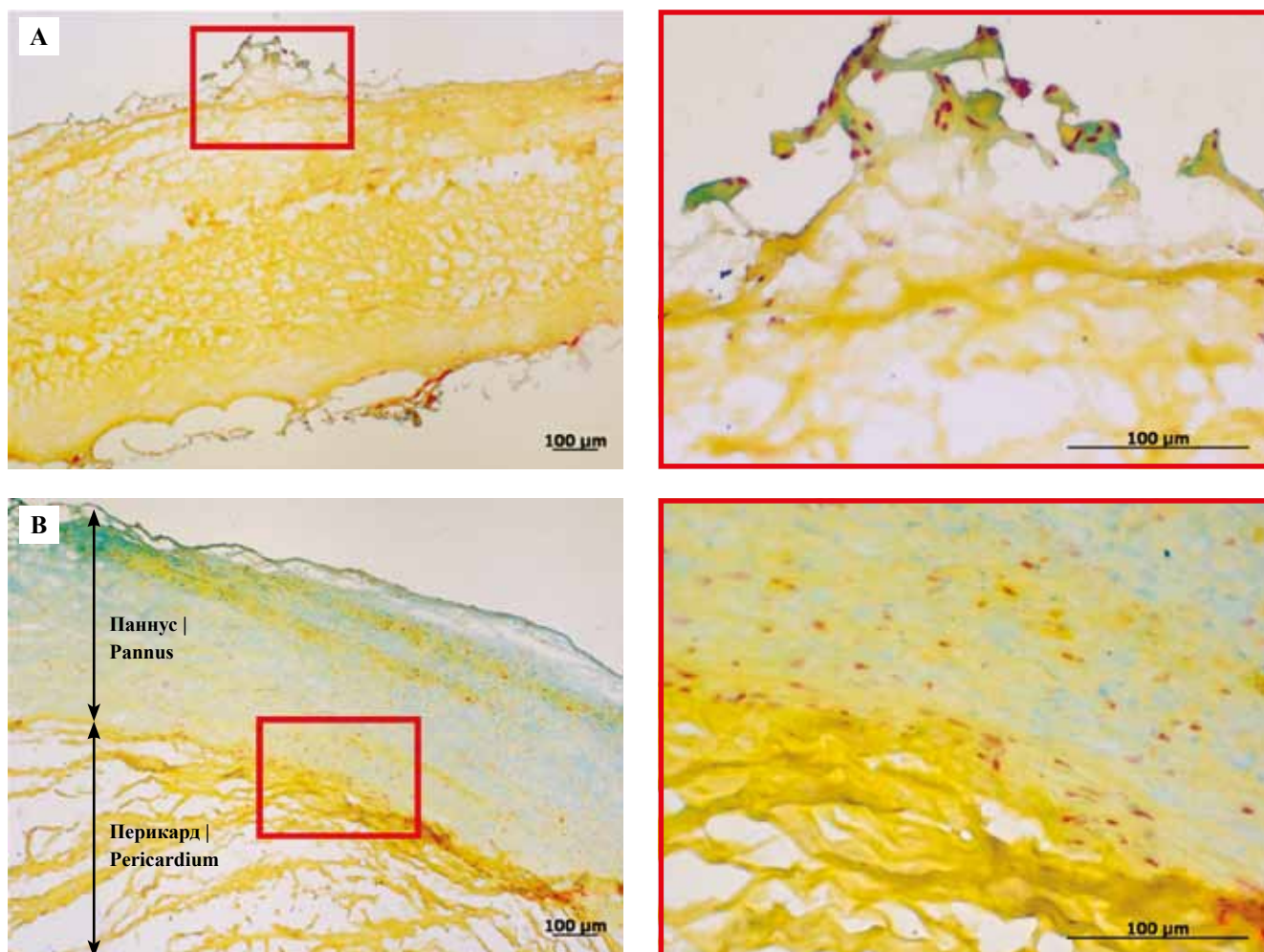


Рис. 2. Компонентный состав створок ксеногенных биопротезов клапанов сердца.

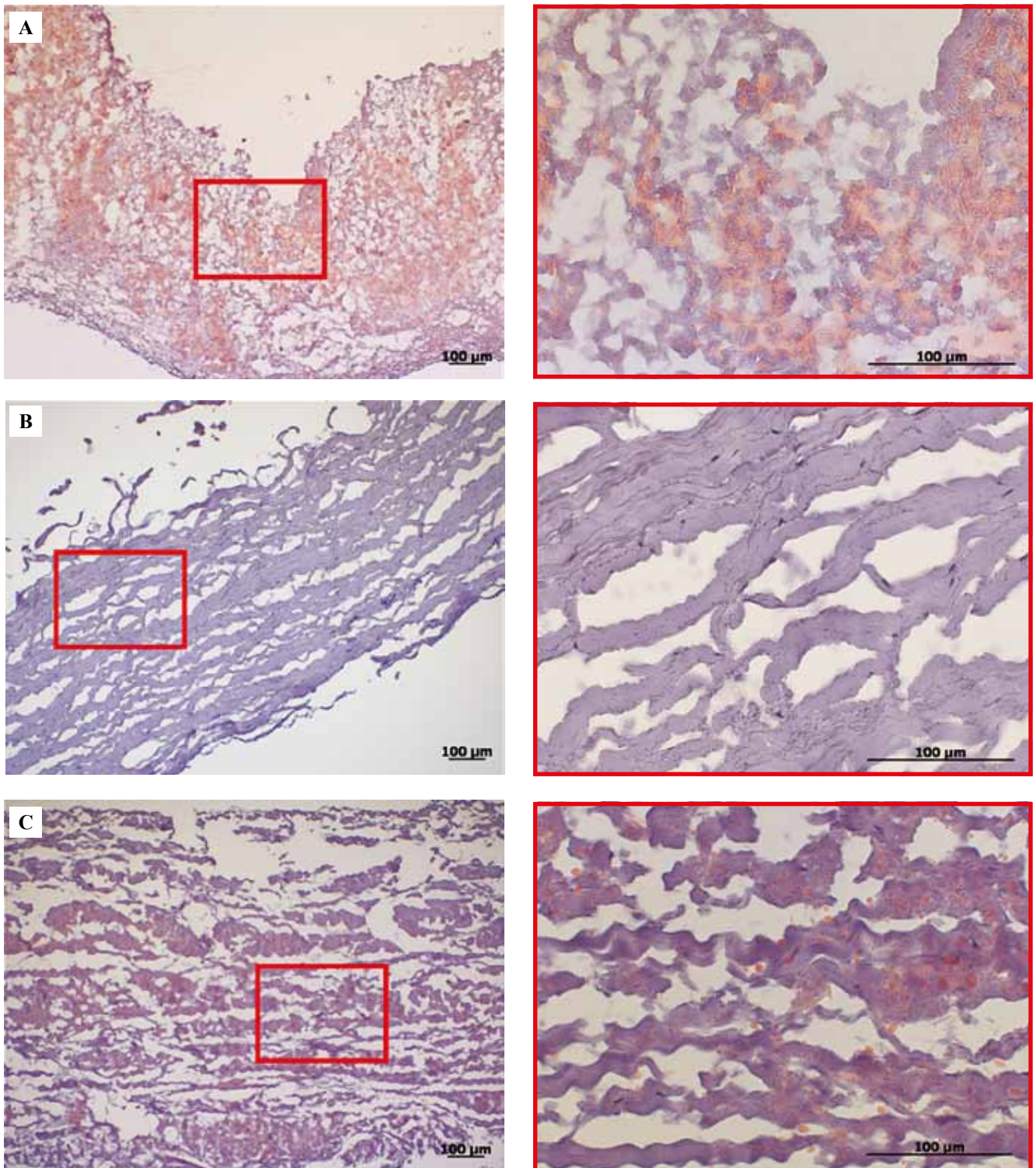
А – створка ксеноаортального биопротеза. Гликозаминогликаны отсутствуют в спонгиозном слое и выявляются вблизи клеточного инфильтрата (голубое окрашивание). В – створка ксеноперикардального биопротеза. Гликозаминогликаны не содержатся в ксеноткани, но присутствуют в паннусе, Окрашка пентахромом по Мовату

Fig. 2. Component composition of xenograft heart valves.

A – the leaflet of the xenoaortic bioprosthesis heart valve. Note the absence of glycosaminoglycans in the sponge layer and their presence near the cell infiltration (blue). B – the leaflet of the xenopericardial bioprosthesis heart valve. Glycosaminoglycans are present in pannus, but not in the xenograft tissue. Movat's pentachrome staining

Окрашивание криосрезов с помощью масляного красного выявило интенсивную липидную инсудацию в створки всех ксеноаортальных биопротезов, тогда как ткани четырех из пяти ксеноперикардальных имплантатов не содержали липидов (рис. 3). Незначительные отложения липидов отмечены в створках

только одного ксеноперикардального биопротеза. Помимо этого, в биоматериале ксеноаортальных, но не ксеноперикардальных биопротезов присутствовали скопления пенистых клеток. Липидные пятна, как правило, не локализовались совместно с клеточными инфильтратами.



*Рис. 3.* Инсудация липидов крови в створки ксеногенных биопротезов клапанов сердца.

А – створка ксеноартериального биопротеза со значительными отложениями липидов в матриксе. В и С – створки ксеноперикардиальных биопротезов с отсутствующей или слабо выраженной липидной инсудацией, соответственно

*Fig. 3.* Lipid insudation in xenograft heart valves.

A – the leaflet of the xenoaortic bioprosthesis with significant lipid deposits in the matrix. B and C – leaflets of the xenopericardial bioprosthesis without or with slightly expressed lipid insudation, respectively

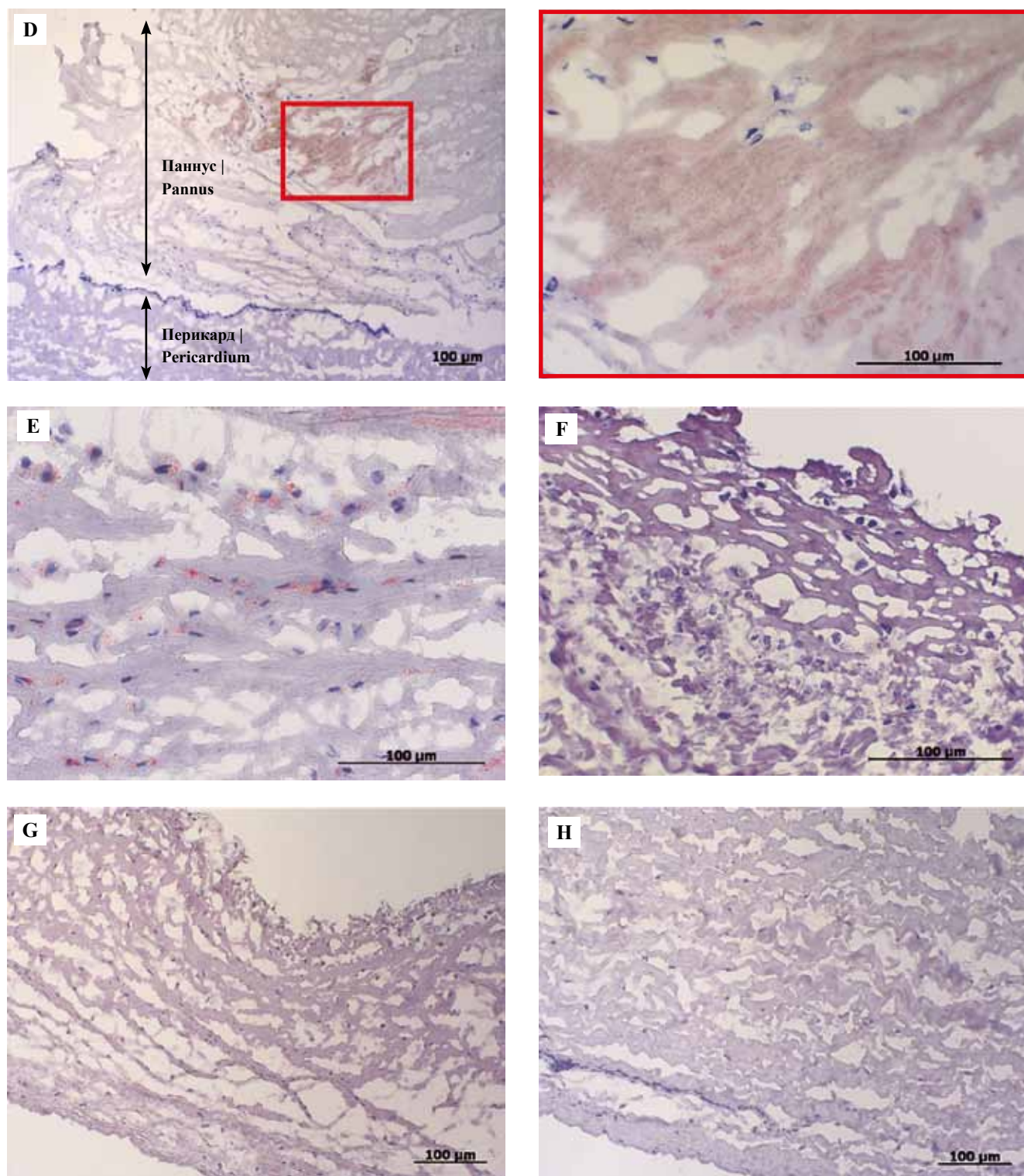


Рис. 3 (окончание). Инсудация липидов крови в створки ксеногенных биопротезов клапанов сердца.

D – липидные пятна, выявленные в паннусе. E – скопления пенистых клеток в тканях ксеноаортального биопротеза.

F – клеточный инфильтрат в створке ксеноперикардального биопротеза. Нагруженные липидами клетки отсутствуют.

G и H – контрольные образцы створок intactного ксеноаортального и ксеноперикардального биопротезов, соответственно. Оба типа ксенотканей не содержали липидов до имплантации. Окраска масляным красным

Fig. 3 (end). Lipid insudation in xenograft heart valves.

D – lipids detected in pannus. E – clusters of foam cells in the xenoaortic bioprosthetic heart valve.

F – cell infiltration in the leaflet of the xenopericardial bioprosthetic heart valve. Note the absence of foam cells.

G and H – control samples of intact xenoaortic and xenopericardial bioprosthetic heart valves, respectively. Both types of bioprostheses do not contain lipids before the implantation. Oil Red O staining

## Обсуждение

Наблюдаемое в настоящем исследовании распределение клеточных инфильтратов на поверхности створок ксенобиопротезов с незначительным их проникновением в толщу биоматериала хорошо согласуется с данными, полученными нашей группой ранее на другой серии образцов посредством электронной микроскопии [17], а также с результатами исследователей, изучавших клеточную инфильтрацию ксенобиопротезов с применением гистологического и иммуногистохимического методов [8, 9, 18, 19]. Основываясь на характере локализации клеток реципиента в створках ксенобиопротезов, можно сделать вывод, что они редко проникают в глубь протезной ксеноткани, если последняя сохраняет свою структурную целостность.

Данные по компонентному составу биоматериала изученных ксенобиопротезов также хорошо объяснимы с позиции современных знаний о структуре нативных и химически фиксированных ксенотканей. В частности, преобладающим типом белков внеклеточного матрикса в аортальных клапанах свиней и перикарде крупного рогатого скота является коллаген, образующий волокнистую основу ксенотканей [20, 21]. Именно коллаген стабилизируется при обработке биоматериала используемыми в производстве ксенобиопротезов консервантами, такими как глутаровый альдегид и диглицидиловый эфир этиленгликоля [22]. Однако упомянутые вещества не фиксируют другие распространенные компоненты матрикса, включая гликозаминогликаны и эластин, вследствие чего они разрушаются в процессе производства и во время функционирования ксенобиопротезов [23, 24].

Ранее группой Р. Шетти было показано, что единственным источником гликозаминогликанов в трансплантированных биопротезах являются клеточные инфильтраты [9], что подтверждают результаты настоящего исследования. Так, окраска на гликозаминогликаны в створках изученных ксенобиопротезов всегда локализовалась совместно с клетками реципиента. Кроме того, гликозаминогликаны избыточно были в составе соединительной ткани, выросшей на поверхность протезных створок. В то же время нам не удалось подтвердить факт значительного накопления гликозаминогликанов в створках ксенобиопротезов, как это было показано Р. Шетти с соавторами [9].

Выявленные закономерности отложения липидов крови в створках изученной серии ксенобиопротезов показывают, что предложенная ранее гипотеза об их удержании в ксеноткани за счет гликозаминогликанов [9] не может объяснить наблюдаемую картину. Липидные пятна присутствовали даже в полностью лишенном гликозаминогликанов матриксе и не были связаны с клеточными инфильтратами, которые служат источником последних. Таким образом, процесс накопления липидов в створках эпоксиобработанных ксеногенных биопротезов клапанов сердца

осуществляется через механизмы, не требующие наличия продуцирующих гликозаминогликаны клеток реципиента.

Связывание липидов крови гликозаминогликанами обусловлено электростатическим притяжением между отрицательно заряженными сахаридными цепочками последних и положительно заряженными аминокислотами, входящими в состав липопротеинов. Этот механизм задействован в процессе накопления липидов в атеросклеротических бляшках, кальцинированных аортальных клапанах и, возможно, паннусах [25, 26]. Удержание липопротеинов в химически стабилизированном матриксе ксенобиопротезов, вероятнее всего, также происходит благодаря электростатическим взаимодействиям, но не с гликозаминогликанами, а с молекулами консервантов. Молекулы глутарового альдегида и диглицидилового эфира этиленгликоля представляют собой линейные углеродные цепочки, на концах которых находятся, соответственно, альдегидные и эпоксидные группы, несущие отрицательный заряд [22]. При стабилизации биоматериала эти молекулы образуют химические мостики между волокнами коллагена, обеспечивая их химическую сшивку [22, 27]. Тем не менее не все молекулы консерванта взаимодействуют с коллагеном обоими концами, вследствие чего в стабилизированном биоматериале имеются свободные альдегидные и эпоксидные группы, которые могут улавливать положительно заряженные частицы, включая липопротеины крови.

Противоречие между данными, полученными в ходе настоящего исследования и Р. Шетти с соавторами [9], могут быть связаны с особенностями химической обработки исследуемых протезов. Так, при производстве стабилизированных глутаровым альдегидом имплантатов, включая изученные Р. Шетти с коллегами ксенобиопротезы модели Freestyle™, используют дополнительную антикальциевую обработку, маскирующую свободные альдегидные группы. Таким образом, липидная инсудация в биоматериал протезов этого типа происходит лишь в присутствии выделяемых макрофагами гликозаминогликанов, поскольку сам по себе матрикс створок, вероятно, не способен связывать липиды. В свою очередь, стабилизированные диглицидиловым эфиром этиленгликоля ксеноткани изначально более устойчивы к кальцификации, и данная модификация не включена в протокол производства эпоксиобработанных биопротезов как обязательная [12]. Благодаря этому в биоматериале имплантатов могут присутствовать свободные эпоксидные группы, способствующие накоплению липидов даже в отсутствие гликозаминогликанов.

Важно отметить, что интенсивность липидной инсудации зависит от типа биоматериала, из которого изготовлен ксенобиопротез. Данные настоящего исследования показывают, что створки ксеноперикардальных биопротезов практически не подвержены накоплению липидов, тогда как створки ксеноор-



тальных имплантатов содержат значительные липидные отложения. Скорее всего, наблюдаемые различия проявляются ввиду структурных особенностей внеклеточного матрикса, свойственных каждому типу ксенотканей. Для перикарда характерен плотный структурированный матрикс, что препятствует его пропитыванию веществами из плазмы крови. В свою очередь, створки свиного аортального клапана обладают рыхлым губкоподобным матриксом, очевидно, более склонным к абсорбции циркулирующих в плазме соединений.

### Заключение

Основываясь на полученных данных, следует констатировать, что наличие продуцируемых клетками гликозаминогликанов в створках биопротезов клапанов сердца не является обязательным условием для накопления липидов. По-видимому, связывание липидов в биоматериале осуществляется благодаря электростатическим взаимодействиям между аминокислотами липопротеинов и молекулами диглицеридилового эфира этиленгликоля, используемого при изготовлении имплантатов. Таким образом, клеточная инфильтрация и инсудация липидами крови створок ксенобиопротезов являются независимыми процессами.

Основным фактором, влияющим на интенсивность инсудации липидов крови в створчатый аппарат эпоксиобработанных ксеногенных биопротезов клапанов сердца, в данном исследовании оказался тип биоматериала, из которого они изготовлены. В частности, ксеноперикард был менее подвержен пропитке липидами по сравнению со створками свиных клапанов, что можно объяснить разницей в плотности внеклеточного матрикса этих ксенотканей. Впрочем, необходимо отметить, что изученные ксеноаортальные биопротезы функционировали втрое дольше ксеноперикардиальных ( $158,4 \pm 20,9$  месяца против  $57,0 \pm 23,2$ ), поэтому более интенсивное пропитывание липидами крови их створок может являться следствием зависящего от времени механического износа волокнистой основы последних. Тем не менее этот факт не противоречит выводу о том, что створки с более рыхлым внеклеточным матриксом эффективнее аккумулируют липиды. Поскольку матрикс створок ксеноаортальных биопротезов изначально менее структурирован, чем таковой ксеноперикардиальных имплантатов, логично предположить, что он быстрее пропитывается липидами и другими веществами из плазмы крови. Таким образом, ксеноперикард оказывается менее подвержен накоплению циркулирующих в крови и переносимых липидами соединений.

Результаты настоящего исследования демонстрируют, что ткани ксенобиопротезов подвержены пропитыванию циркулирующими в крови липидами, которые потенциально способны провоцировать развитие или ускорять дегенерацию биоматериала. При этом ксеноперикард выгодно отличается от створок аортальных

клапанов свиной меньшей склонностью к их аккумуляции. С учетом полученных данных уместно предположить, что использование перикарда при производстве ксенобиопротезов в сочетании с применением технологий, нацеленных на предотвращение накопления в их створчатом аппарате различных соединений, может способствовать торможению дегенерации и увеличению сроков функционирования имплантатов. Одними из таких технологий являются дополнительная обработка эпоксиобработанного биоматериала, устраняющая свободные оксидные группы, а также создание на поверхности створок полимерной пленки, препятствующей поступлению в ксеноткань веществ из омывающей ее крови.

### Ограничения исследования

Изученные ксеноаортальные и ксеноперикардиальные биопротезы значительно различались по срокам функционирования и клиническим причинам дисфункций. Тем не менее биопротезы обоих типов в целом были сопоставимы по степени развития дегенеративных изменений ксеноткани, которые привели к дисфункции и необходимости реоперации. Таким образом, мы считаем, что, несмотря на существенную разницу в сроках функционирования, две группы уместно сравнивать в контексте изучения особенностей липидной инсудации.

В настоящее время нет возможности провести дополнительное исследование на выборках биопротезов, сопоставимых по времени функционирования. Это связано со сменой поколений коммерческих моделей. Производство ксеноаортальных биопротезов, отобранных для настоящего исследования, было прекращено в 2009 году, в силу чего на период проведения настоящего исследования у нас нет образцов с ранними дисфункциями. Обратная ситуация наблюдается с ксеноперикардиальными биопротезами: изделия модели «ЮниЛайн» вошли в клиническую практику только с 2008 года, и сегодня доступны имплантаты лишь с ранними проявлениями дисфункции.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.Е. Костюнин, Е.А. Овчаренко.

Пробоподготовка, выполнение гистологических окрашиваний – Т.В. Глушкова, Л.А. Богданов.

Анализ данных – А.Е. Костюнин, Т.В. Глушкова.

Написание текста – А.Е. Костюнин, Т.В. Глушкова.

Редактирование – М.А. Резвова, Е.А. Овчаренко.

### Author contributions

Conceived and designed the study – А.Е. Kostyunin, Е.А. Ovcharenko.

Sample preparation, histological staining – Т.В. Glushkova, Л.А. Bogdanov.

Collected the data and performed the analysis – А.Е. Kostyunin, Т.В. Glushkova.

Wrote the paper – А.Е. Kostyunin, Т.В. Glushkova.

Edited the manuscript – М.А. Rezvova, Е.А. Ovcharenko.

## Литература/References

1. Cote N, Pibarot P, Clavel MA. Incidence, risk factors, clinical impact, and management of bioprosthesis structural valve degeneration. *Curr Opin Cardiol*. 2017;32(2):123–9. DOI: 10.1097/HCO.0000000000000372.
2. Head SJ, Çelik M, Kappetein AP. Mechanical versus bioprosthetic aortic valve replacement. *Eur Heart J*. 2017;38(28):2183–91. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx141.
3. Pibarot P, Dumesnil JG. Prosthetic heart valves: Selection of the optimal prosthesis and long-term management. *Circulation*. 2009;119(7):1034–48. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.778886.
4. Capodanno D, Petronio AS, Prendergast B, Eltchaninoff H, Vahanian A, Modine T et al. Standardized definitions of structural deterioration and valve failure in assessing long-term durability of transcatheter and surgical aortic bioprosthetic valves: A consensus statement from the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI) endorsed by the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J*. 2017;38(45):3382–90. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx303.
5. Dvir D, Bourguignon T, Otto CM, Hahn RT, Rosenhek R, Webb JG et al. Standardized definition of structural valve degeneration for surgical and transcatheter bioprosthetic aortic valves. *Circulation*. 2018;137(4):388–99. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030729.
6. Otto CM, Nishimura RA, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP 3rd, Gentile F et al. 2020 ACC/AHA Guideline for the management of patients with valvular heart disease: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2021;143(5):e72–e227. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000923.
7. Otto CM, Nishimura RA, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP 3rd, Gentile F et al. 2020 ACC/AHA Guideline for the management of patients with valvular heart disease: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2021;77(4):e25–e197. DOI: 10.1016/j.jacc.2020.11.018.
8. Bottio T, Thiene G, Pettenazzo E, Ius P, Bortolotti U, Rizzoli G et al. Hancock II bioprosthesis: A glance at the microscope in mid-long-term explants. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;126(1):99–105. DOI: 10.1016/s0022-5223(03)00131-4.
9. Shetty R, Pibarot P, Audet A, Janvier R, Dagenais F, Perron J et al. Lipid-mediated inflammation and degeneration of bioprosthetic heart valves. *Eur J Clin Invest*. 2009;39(6):471–80. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2009.02132.x.
10. Mahmut A, Mahjoub H, Boulanger MC, Fournier D, Després JP, Pibarot P et al. Lp-PLA2 is associated with structural valve degeneration of bioprostheses. *Eur J Clin Invest*. 2014;44(2):136–45. DOI: 10.1111/eci.12199.
11. Salaun E, Mahjoub H, Dahou A, Mathieu P, Larose É, Després JP et al. Hemodynamic deterioration of surgically implanted bioprosthetic aortic valves. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(3):241–51. DOI: 10.1016/j.jacc.2018.04.064.
12. Кудрявцева Ю.А. Биологические протезы клапана сердца. От идеи до клинического применения. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2015;4:6–16. DOI: 10.17802/2306-1278-2015-4-6-16.
13. Kudryavtseva YuA. Bioprosthetic heart valves. From idea to clinical use. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2015;4:6–16 (In Russ.) DOI: 10.17802/2306-1278-2015-4-6-16.
14. Tam H, Zhang W, Infante D, Parchment N, Sacks M, Vyavahare N. Fixation of bovine pericardium-based tissue biomaterial with irreversible chemistry improves biochemical and biomechanical properties. *J Cardiovasc Transl Res*. 2017;10(2):194–205. DOI: 10.1007/s12265-017-9733-5.
15. Rodriguez-Gabella T, Voisine P, Puri R, Pibarot P, Rodés-Cabau J. Aortic bioprosthetic valve durability: Incidence, mechanisms, predictors, and management of surgical and transcatheter valve degeneration. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(8):1013–28. DOI: 10.1016/j.jacc.2017.07.715.
16. Богданов Л.А., Кутихин А.Г. Оптимизация окрашивания элементов системы кровообращения и гепатолениальной системы гематоксилином и эозином. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2019;4(4):70–77. DOI: 10.23946/2500-0764-2019-4-4-70-77.
17. Bogdanov LA, Kutikhin AG. Optimization of hematoxylin and eosin staining of heart, blood vessels, liver, and spleen. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2019;4(4):70–77 (In Russ.) DOI: 10.23946/2500-0764-2019-4-4-70-77.
18. Grande-Allen KJ, Mako WJ, Calabro A, Shi Y, Ratliff NB, Vesely I. Loss of chondroitin 6-sulfate and hyaluronan from failed porcine bioprosthetic valves. *J Biomed Mater Res A*. 2003;65(2):251–9. DOI: 10.1002/jbm.a.10475.
19. Kostyunin A, Mukhamadiyarov R, Glushkova T, Bogdanov L, Shishkova D, Osaev N et al. Ultrastructural pathology of atherosclerosis, calcific aortic valve disease, and bioprosthetic heart valve degeneration: Commonalities and differences. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20):7434. DOI: 10.3390/ijms21207434.
20. Lepidi H, Casalta JP, Fournier PE, Habib G, Collart F, Raoult D. Quantitative histological examination of bioprosthetic heart valves. *Clin Infect Dis*. 2006;42(5):590–6. DOI: 10.1086/500135.
21. Nair V, Law KB, Li AY, Phillips KR, David TE, Butany J. Characterizing the inflammatory reaction in explanted Medtronic Freestyle stentless porcine aortic bioprosthesis over a 6-year period. *Cardiovasc Pathol*. 2012;21(3):158–68. DOI: 10.1016/j.carpath.2011.05.003.
22. Aguiari P, Fiorese M, Iop L, Gerosa G, Bagno A. Mechanical testing of pericardium for manufacturing prosthetic heart valves. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2016;22(1):72–84. DOI: 10.1093/icvts/ivv282.
23. Soares JS, Feaver KR, Zhang W, Kamensky D, Aggarwal A, Sacks MS. Biomechanical behavior of bioprosthetic heart valve heterograft tissues: Characterization, simulation, and performance. *Cardiovasc Eng Technol*. 2016;7(4):309–51. DOI: 10.1007/s13239-016-0276-8.
24. Dunn RM. Cross-linking in biomaterials: A primer for clinicians. *Plast Reconstr Surg*. 2012;130(5Suppl2):18S–26S. DOI: 10.1097/PRS.0b013e31825fe6a6.
25. Isenburg JC, Karamchandani NV, Simionescu DT, Vyavahare NR. Structural requirements for stabilization of vascular elastin by polyphenolic tannins. *Biomaterials*. 2006;27(19):3645–51. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.016.

24. *Lovekamp JJ, Simionescu DT, Mercuri JJ, Zubiato B, Sacks MS, Vyavahare NR.* Stability and function of glycosaminoglycans in porcine bioprosthetic heart valves. *Biomaterials.* 2006;27(8):1507–18. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.08.003.
25. *Kovanen PT, Pentikäinen MO.* Decorin links low-density lipoproteins (LDL) to collagen: A novel mechanism for retention of LDL in the atherosclerotic plaque. *Trends Cardiovasc Med.* 1999;9(3-4):86–91. DOI: 10.1016/s1050-1738(99)00013-4.
26. *Neufeld EB, Zadrozny LM, Phillips D, Aponte A, Yu ZX, Balaban RS.* Decorin and biglycan retain LDL in disease-prone valvular and aortic subendothelial intimal matrix. *Atherosclerosis.* 2014;233(1):113–21. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.12.038.
27. *Mendoza-Novelo B, Cauch-Rodríguez JV.* Decellularization, stabilization and functionalization of collagenous tissues used as cardiovascular biomaterials. In: R Pignatello (ed.). *Biomaterials – Physics and Chemistry.* London: IntechOpen, 2011. P. 159–182. DOI: 10.5772/25184.

### Информация об авторах

Александр Евгеньевич Костюнин – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний.

Татьяна Владимировна Глушкова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний.

Лев Александрович Богданов – младший научный сотрудник лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний.

Мария Александровна Резцова – младший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний.

Евгений Андреевич Овчаренко – кандидат технических наук, заведующий лабораторией новых биоматериалов НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний.

### Author information

Alexander E. Kostyunin – Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of New Biomaterials, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases.  
<https://orcid.org/0000-0001-6099-0315>

Tatiana V. Glushkova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of New Biomaterials, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases.  
<https://orcid.org/0000-0003-4890-0393>

Leo A. Bogdanov – Junior Researcher, Laboratory of Fundamental Aspects of Atherosclerosis, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases.  
<https://orcid.org/0000-0003-4124-2316>

Maria A. Rezvova – Junior Researcher, Laboratory of New Biomaterials, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases.  
<https://orcid.org/0000-0002-4405-8904>

Evgeniy A. Ovcharenko – Cand. Sci. (Engineering), Head of the Laboratory of New Biomaterials, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases.  
<https://orcid.org/0000-0001-7477-3979>