

МЕХАНИЗМЫ КАЛЬЦИФИКАЦИИ СОСУДИСТО-КЛАПАННЫХ БИОПРОТЕЗОВ И МЕТОДЫ ЕЁ ИЗУЧЕНИЯ

Попандопуло А. Г., Петрова М. В., Юдицкий Д. Л., Мокрик И. Ю.

Государственное учреждение «Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В. К. Гусака Национальной академии медицинских наук Украины», г. Донецк

Материалы, используемые при изготовлении биопротезов клапанов и сосудов сердца, должны обладать рядом свойств, в том числе быть устойчивыми к кальцификации. Согласно одной из современных теорий, причиной отложения растворимых форм фосфатов кальция и их последующего перехода в нерастворимые принято считать гибель клеток. В связи с этим необходимой видится предимплантационная обработка биопротеза (девитализация) с целью последующего ингибирования процесса кальцификации.

Ключевые слова: кальцификация, фосфат кальция, гидроксипатит, предимплантационная обработка.

В хирургии клапанных пороков сердца наряду с механическими протезами применяются биологические заменители сердечных клапанов и сосудов. Материалы, используемые при их изготовлении, должны обладать определенными параметрами: способностью сохранять физико-химические свойства, обеспечивающие функционирование имплантатов; не вызывать хронического воспаления; не проявлять канцерогенный эффект; не подвергаться кальцификации [1, 3].

Под кальцификацией, в данном случае, подразумевается образование кальцийсодержащих отложений на поверхности или в толще имплантируемых изделий. Зачастую это приводит к потере функциональных свойств протезов и необходимости повторных операций, как в случае сердечнососудистой хирургии, офтальмологии, урологии, при операциях на брюшной полости. В то же время данный процесс играет положительную роль в случае восстановительной хирургии костных тканей, когда кальцификации подвергаются имплантированные конструкции (штифты, протезы суставов и др.) [2].

При исследовании причин и течения процесса кальцификации необходимо учитывать состав кальцийсодержащих отложений и их локализацию, которая бывает внутренней и внешней [19]. В первом случае отложения располагаются в толще материала, например, внутри коллагенового волокна (внутрифибрилярно), а при внешней локализации отложения формируются в межфибрилярном пространстве или на поверхности материалов. Существенную роль в месторасположении отложений играют механические нагрузки, которым подвержен имплантат. Так фосфаты кальция, как правило, обнаруживаются в местах интенсивных механических нагрузок независимо от типа биоматериала протеза. Это обуслов-

лено, по-видимому, изменением энергетических характеристик поверхности при динамических нагрузках и появлением областей с возросшей внутренней энергией. При использовании для изготовления протезов материалов естественного происхождения возможно разрыхление структуры материала и повреждение самих волокон. Это сопровождается образованием так называемых «ловушек» для клеток или макрокомплексов, содержащих кальций, что в последующем стимулирует появление мест кристаллизации.

Для понимания механизма кальцификации биоматериалов необходимо выявить факторы, влияющие на этот процесс. Целенаправленные экспериментальные исследования проводятся в условиях *in vitro* и *in vivo*. Ни те, ни другие методы не дают полной и четкой картины: в первом случае аппроксимировать данные из условий *in vitro* на организм недостаточно корректно, а во втором – многокомпонентная среда живого организма затрудняет оценку одного выделенного фактора. Тем не менее, работы по этим направлениям ведутся и небезуспешно. Зарубежными авторами предложено несколько классификаций действующих факторов кальцификации [18], однако все они не определяют роли каждой из выделенных групп, а именно то, какие факторы являются необходимыми для зарождения и роста кристаллов. Российскими учеными [9] была предложена классификация, подразделяющая факторы на необходимые (гуморальные) и регулирующие – клеточные и внешние факторы, которые интенсифицируют или ингибируют процесс кальцификации.

Также вызывает интерес изучение химического состава кальцийсодержащих отложений, соотношение органических и неорганических компонентов в их составе и роли органической матрицы в процессе кальцификации. Так, при

помощи трансмиссионной электронной микроскопии с применением декальцификации фиксированных срезов и последующей их окраски удалось обнаружить, что органический материал в кальцинированных отложениях состоит из структур, воспроизводящих форму и ориентацию растворенного кристалла, называемых «тенями кристалла» [15]. Во многих исследованных тканях «тень кристалла» обнаруживается в областях ранней кальцификации и в меньшей степени детектируется в районах полной кальцификации. Состав органических компонент зависит от типа минерализованных тканей. Основу кальциевых отложений составляют фосфаты кальция. Анализ образцов полиуретанов («Авкотан» и «Биомер») после 168 дней имплантации показал, что молярное соотношение Ca/P в их составе равно 1,88, что свидетельствует о присутствии в отложениях гидроксиапатита [17]. Исследования имплантатов, изготовленных из различных материалов, подвергнутых кальцификации, показали, что состав кальцинированных отложений на поверхности различных протезов из полимерных материалов практически идентичен составу атеросклеротических бляшек в сосудах человека: остеокальцин, белки (альбумин и фибриноген) и фосфолипиды; при этом некальцинированные участки не содержали остеокальцина [18]. Продолжительное воздействие избытка воды на любой фосфат кальция приводит к образованию гидроксиапатита, если в состав системы входят только CaO, P₂O₅ и вода. Из полученных различными методами разновидностей ГАП (с отношением Ca/P от 1,3 до 2), многие не имеют стехиометрического состава, соответствующего идеальной формуле с молярным соотношением Ca:P=5:3 (1,67). Установлено, что при продолжительной обработке водой ГАП с соотношением Ca/P больше или меньше 1,67, состав отложений изменяется, и они превращаются в вещество, которому приписывают формулу Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ [4]. Кинетика образования новой фазы определяется двумя стадиями: образованием зародышей и их ростом до кристаллов кальциатов. Причем при низкой скорости образования зародышей и высокой скорости их роста, что имеет место при незначительных пересыщениях, образуется небольшое количество крупных частиц. Высокая же скорость образования зародышей при низкой скорости их роста (значительные пересыщения) приводят к формированию в большом количестве мелких частиц. Методом рентгеновской дифракции установлено, что появлению кристаллического гидроксиапатита предшествует аморфная фаза. Химический анализ аморфной фазы показал, что она представляет собой гидратированный фосфат кальция Ca₃(PO₄)₂ · x (H₂O) при отношении Ca/P = 3/2 по сравнению с отношением 5/3 для кристаллического гидроксиапатита. Время жизни метастабильного аморфного

предшественника в водном растворе зависит от содержания органических макромолекул и ионов, pH, вязкости, ионной силы раствора и температуры, причем процесс перехода в кристаллическую фазу происходит автокаталитически. Однако вопрос о предшественнике гидроксиапатита до сих пор остается открытым. Некоторые исследователи предшественником ГАП считают брусит, октакальциум фосфат, аморфный фосфат кальция [14].

Наряду с физическими, биохимическими, иммунологическими методами исследования используют также моделирующие эксперименты в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Эксперименты *in vitro* по изучению кальцификации биоматериалов и имплантатов применяют для разъяснения механизма минерализации костей, хрящей, зубов, для оценки склонности биоматериалов к кальцификации и возможности минерализации органических матриц при образовании природных кристаллов. Информативность и достоверность результатов, получаемых методами *in vitro*, зависят от многих факторов: среда, в которой инкубируют образец; температура и pH; тип биоматериала и структура поверхности имплантата и т. д. [6, 13, 22]. Поэтому оценку склонности биоматериалов к кальцификации следует проводить в контролируемой по pH среде, в состав которой входят компоненты, играющие основную роль в кальцификации: из органических – белки и липиды; из неорганических – кальций и фосфаты. Результаты экспериментов *in vitro* по десорбции кальция и его комплексов выявили ведущую роль белковых и липидных компонентов в накоплении кальция на поверхности биоматериалов. Основное накопление кальция происходит при наличии в среде белка и избытка жирной кислоты, способствующей образованию адсорбированных комплексов, не участвующих в процессах обмена и десорбции.

Для исследования процесса кальцификации кардиоваскулярных трансплантатов проводят испытания в условиях *in vivo*. Как правило, применяют имплантацию протезов клапанов или сосудов интракардиально молодым животным (телята, овцы) или подкожную имплантацию образцов биоматериалов мелким животным (крысы, кролики, мыши).

Развитие кальцификации непосредственно в кровотоке изучают на крупных животных при сроках имплантации один – два года. Такие эксперименты длительны и дорогостоящи. Поэтому, наиболее широко распространены методы с использованием мелких животных (мыши, крысы, кролики). Для этого образец биоматериала имплантируется под кожу на время, необходимое для достижения половины максимальной минерализации (для крыс – 3 недели, для кроликов – 6 недель). По истечении данного срока имплантаты удаляют и проводят анализ на ко-

личественное содержание кальция и фосфора, а также вычисляют отношение кальций/фосфор.

Установлено, что биохимические и морфологические особенности образующихся кальцийсодержащих отложений в образцах биоматериалов, имплантируемых под кожу крысам и кроликам, аналогичны таковым для протезов сосудов или клапанов, имплантируемым ортотопически в экспериментальных или клинических условиях [1, 20].

С целью отделения гуморальных влияний от влияния клеточных факторов в процессе кальцификации имплантатов применяют модель подкожной имплантации исследуемых образцов в специальных камерах. Для исследования клеточного состава воспалительного экссудата применяют конструкции из металлической сетки в виде цилиндра длиной 3,5 см и диаметром 1 см [11, 16]. Поры занимают от 35% до 59% от всей поверхности системы. Диффузионные камеры с использованием пористых мембран из полиэтилентерефталата (размер пор от 0,4 до 12 мкм) разработаны для исследования остеогенеза деминерализованной костной ткани и для изучения влияния иммунной и воспалительной реакций на кальцификацию биологических протезов клапанов [12]. Использование мембран с размером пор от 0,22 до 0,56 мкм позволяет исключить прямой контакт клеток окружающих тканей с поверхностью исследуемого образца для сравнительного анализа вклада клеточных и гуморальных факторов в механизм кальцификации [9, 21].

Для анализа отложений фосфатов кальция на поверхности образцов биоматериалов естественного и искусственного происхождения привлекают также атомно-адсорбционную спектрофотометрию. С гладких полимерных образцов механически удаляют адсорбированный слой, а затем растворяют его в соляной кислоте. Пористые или волокнистые образцы отмывают непосредственно в разбавленной соляной кислоте. Образцы биоматериалов естественного происхождения, как правило, сжигают и определяют содержание кальция в золе. Одним из чувствительных количественных методов определения отложения кальция и фосфора на образцах биоматериалов является радиоизотопный метод с использованием ^{45}Ca и ^{32}P . Он позволяет регистрировать изменения активности изотопа в модельной среде и в образце [8].

На накопление кальция влияют физико-химические свойства материала, из которого изготовлен имплантат. С увеличением гидрофобности и шероховатости материала увеличивается количество адсорбированных белков, липидов и кальция. А значит, поверхностные свойства изделия влияют на избирательность к адсорбции и десорбции комплексов кальция.

В настоящее время существует ряд теоретических обоснований механизма кальцификации биоматериалов. Концентрационная теория

акцентирует внимание на роли концентрации ионов кальция и фосфатов в межклеточной жидкости, пытаясь разъяснить каким образом происходит накопление солей фосфатов кальция из раствора и их кристаллизация. Она появилась значительно раньше других, но позднее, в силу ряда нерешенных проблем, потеряла свою популярность. Предложенные физико-химические теории утверждали, что гетерогенные центры зарождения кристаллов гидроксиапатита связаны с макромолекулярной стереоконфигурацией коллагена. Приверженцы же клеточной теории отводят ведущую роль в процессе физиологической и патологической кальцификации клеткам. Так первичные стадии кальцификации связывают либо с наличием уже погибших клеток (как в случае с обработанными биологическими тканями), либо с гибелью клеток реципиента, адгезированных на биоматериале [1, 3, 7, 10]. Согласно этой теории кальцификация начинается с гибели клеток. Погибшие клетки являются необходимым условием, приводящим к локальному изменению концентрации кальция, фосфатов, белков, липидов, ферментов, что вызывает отложение растворимых форм фосфатов кальция и при определенных условиях переход их в нерастворимые. К клеточной теории можно отнести и наиболее популярную в настоящее время везикулярную теорию, согласно которой гибель клеток способствует появлению в среде фрагментов клеточных мембран, образующих везикулы. Кристаллы фосфатов формируются внутри такой структуры, а места их адсорбции на поверхности имплантата служат центрами последующей кальцификации. Кроме того, с гибелью клеток связано и появление в районе кальцификации обогащенных кальцием митохондрий [5].

Выводы

Следует признать, что, несмотря на достаточно большое количество способов ингибирования, влияющих на ту или иную стадию кальцификации, наиболее эффективным, все же, является комплексный метод, включающий в себя воздействия на все стадии процесса. Вполне возможно, что для эффективной борьбы с кальцификацией биопротеза придется использовать одновременно, или поэтапно, как введение лекарственных препаратов, так и предимплантационную обработку биоматериалов наряду с дозированным локальным введением ингибирующих препаратов. Предимплантационная обработка может быть реализована посредством эффективной и рациональной девитализации протеза, при помощи инициации апоптотической гибели его клеточного компонента. Предполагается, что это позволит избежать деструктивных изменений, имеющих место при некрозе, а также кальцификации трансплантата, являющейся их следствием.

Литература

1. Акатов В. С. Изучение биосовместимости трансплантатов клапанов сердца, девитализированных антикальцинозным способом. / В. С. Акатов, Р. М. Муратов, И. С.Фадеева [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т.V, № 2. – С. 36–41.
2. Барбараш Л. С. Биопротезы клапанов сердца: проблемы и перспективы / Л. С. Барабаш, Н. А. Барабаш, И. Ю. Журавлева; ред. Л. С. Барабаш. – Кемерово: Современная отечественная книга, 1994. – 547 с.
3. Бокерия Л. А. Крисиохраненные аллогraftы в реконструктивной хирургии пороков аортального клапана / Л. А. Бокерия, Р. М. Муратов, И. И. Скопин [и др.]. – М.: НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН, 2007. – 282 с.
4. Везер В. Фосфор и его соединения. / Ван Везер. – М.: Иностранная литература, 1962. – 344 с.
5. Волова Т. Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии / Т. Г. Волова, Е. И. Шишачкая, П. В. Миронов. – Красноярск: СФУ, 2009. – С. 168–170
6. Воробьев Ю. К. Закономерности роста и эволюции кристаллов минералов. / Ю. К. Воробьев. – М.: Наука, 1990. – 184 с.
7. Подавление кальцификации трансплантатов клапанов сердца путем их девитализации. / В. С. Акатов, Н. И. Фесенко, В. В. Соловьев [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т.V, № 1. – С. 41–46.
8. Розанова И. Б. Механизм первичных стадий кальцификации биоматериалов (экспериментальное исследование): дис. ...док. биол. наук: 14.00.41/ Розанова Ирина Борисовна. – М., 1995. – 218 с.
9. Розанова И. Б., Механизм начальных стадий кальцификации биоматериалов II. Взаимосвязь молекулярных и клеточных факторов кальцификации биоматериалов (эксперименты in vivo). / И. Б. Розанова, С. Л. Васин, Л. А. Саломатина [и др.] // Биосовместимость. – 1994. – № 2. – С. 195–209.
10. Снижение кальцификации бесклеточных трансплантатов клапанов сердца путем внедрения в них перед имплантацией изогенных гладкомышечных клеток. / В. С. Акатов, Н. И. Рындина, В. В. Соловьев [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2003. – № 4. – С. 64–67.
11. Biocompatibility study of As-polymerized Poly (L-lactide) in rats, using a cage implant system. / J. Bergsma, F. Rozena, R. Bos et al. // J. Biomed. Mater. Res. – 1995. – Vol. 29. – P. 173–181.
12. Bioprosthetic heart valve calcification: clinical features, pathobiology and prospects for prevention. / R. Levy, F. Schoen, G. Golomd // CRC, Critical Reviews in Biocompatibility. – 1986. – Vol. 2. – P. 147–187.
13. Calcification and stress distribution in bovine pericardial heart valve. / G. Bernacca, A. Fisher, R. Wilkinson // J. Biomed. Mater. Res. – 1992. – Vol. 26. – P. 959–966.
14. Current concepts of the physiology and biochemistry of calcification. / A. Boskey // Clinical Orthop. Rel. Res. – 1981. – Vol. 157. – P. 225–257.
15. Further investigation on the organic - inorganic relationship in calcifying cartilage. / E. Bonnucci // Calcif. Tissue Res. – 1969. – Vol. 3. – P. 38–45.
16. In vivo biocompatibility studies. I. The cage implant system and biodegradable hydrogel. / R. Marchant, A. Hilter, C. Hamlin // J. Biomed. Mater. Res. – 1983. – Vol. 17. – P. 301–325.
17. Mineralization of blood pump bladders. / D. Coleman // Trans. Am. Soc. Art. Inter. Org. – 1981. Vol. 27. – P. 708–718.
18. Physicochemical characterization of natural and bioprosthetic heart valve calcific deposits. Implication for prevention. / B. Thomazic, W. Edwards, F. Schoen // Abstracts of VI International Symposium Cardiac Bioprostheses, Barcelona, Spain. – 1994. – P. 124.
19. Tissue engineering of heart valves using decellularized xenogeneic or polymeric starter matrices / D. Schmidt, U. A. Stock, S. P. Hoerstrup // Phil. Trans. R. Soc. B. – 2007. – Vol. 362. – P. 1505–1512.
20. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits / G. Steinhoff, U. Stock, N. Karim [et al.] // Circulation. – 2000. – Vol. 102, Supl. III. – P. 50–55.
21. The effect of cells on biomaterials calcification: experiments with diffusion chamber. / I. Rosanova, B. Michenko, V. Zaitsev // J. Biomed. Mater. Res. – 1991. – Vol. 25. – P. 277–280.
22. The effect of dissolved impurity on calcium phosphate nucleation in supersaturated medium. / I. Melikhov, S. Ladic, Z. Vukovic // J. of Colloid and Int. Sci. – 1989. – Vol. 127. – P. 317–327.

MECHANISMS AND METHODS OF STUDYING VESSELS-VALVES BIOARTIFICIAL GRAFTS CALCIFICATION

Popandopulo A., Petrova M., Yuditsky D., Mokryk I.

Gusak's Institute of Urgent and Recovery Surgery of The National Academy of Medical Science of Ukraine

The materials which have been used for making bioartificial grafts of heart valves and vessels should have certain properties, moreover, be steady to calcification. According to one of the modern theories, the reason of deposition of soluble forms of calcium phosphates and their subsequent transformation to insoluble forms is called «cell's destruction». Therefore, we believe, that devitalization of bioartificial grafts is necessary before the implantation, in order to inhibit the calcification.

Keywords: calcification, calcium phosphate, hydroxyapatite, devitalization.