

АНТИАДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА ЭПОКСИОБРАБОТАННОГО КСЕНОПЕРИКАРДА, МОДИФИЦИРОВАННОГО ПОЛИВИНИЛОВЫМ СПИРТОМ: ИССЛЕДОВАНИЕ *in vitro* АДГЕЗИИ ЛЕЙКОЦИТОВ В МОДЕЛИ ПУЛЬСИРУЮЩЕГО ПОТОКА

DOI: 10.17691/stm2024.16.2.04

УДК 616.126.3–089–77

Поступила 21.09.2023 г.



Е.А. Овчаренко, к.т.н., зав. лабораторией новых биоматериалов;
Т.В. Глушкова, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов;
Д.К. Шишкова, к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной
и цифровой медицины;
М.А. Резвова, младший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов;
Е.А. Великанова, к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточных технологий;
К.Ю. Клышников, к.м.н., научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов;
Т.Н. Акентьева, младший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов;
А.Е. Костюнин, к.б.н., научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний,
бульвар им. академика Л.С. Барбараша, 6, Кемерово, 650002

Цель исследования — оценка защитных возможностей полимерного покрытия из поливинилового спирта для предотвращения адгезии лейкоцитов к эпоксиобработанному бычьему перикарду, используемому в производстве ксеногенных биопротезов клапанов сердца.

Материалы и методы. Фрагменты неизмененного (контрольного) и модифицированного поливиниловым спиртом эпоксиобработанного бычьего перикарда инкубировали в специальных камерах, подключенных к системе пульсирующего потока (Ibidi GmbH, Германия). Инкубацию проводили в течение 48 ч в цельной донорской плазме, содержащей $3 \cdot 10^6$ клеток мононуклеарной фракции. Для моделирования потока плазмы на сторонах притока и оттока биопротеза в аортальной позиции устанавливали напряжение сдвига в 50 и 20 дин/см² соответственно. После завершения эксперимента поверхность изучаемых образцов исследовали посредством сканирующей электронной микроскопии и иммунофлуоресцентного метода с использованием антител к пан-лейкоцитарному маркеру CD45.

Результаты. Интенсивное осаждение лейкоцитов (CD45⁺) наблюдали и на серозной (имитация стороны оттока), и на фиброзной (имитация стороны притока) поверхностях контрольного эпоксиобработанного ксеноперикарда, тогда как обе поверхности материала, модифицированного поливиниловым спиртом, были свободны от иммунных клеток. Сканирующая электронная микроскопия подтвердила адгезию лейкоцитов к неизменной биоткани: клетки, присутствующие на поверхности контрольного ксеноперикарда, имели неправильную форму и образовывали многочисленные псевдоподии.

Заключение. Предложенная модификация эпоксиобработанного бычьего перикарда поливиниловым спиртом препятствует адгезии иммунных клеток к его поверхности и потенциально может защитить биопротезы клапанов сердца от иммунного отторжения.

Ключевые слова: ксеногенные биопротезы клапанов сердца; поливиниловый спирт; иммунное отторжение; лейкоциты; адгезия.

Для контактов: Резвова Мария Александровна, e-mail: rezvovama@gmail.com

Как цитировать: Ovcharenko E.A., Glushkova T.V., Shishkova D.K., Rezvova M.A., Velikanova E.A., Klyshnikov K.Yu., Akentyeva T.N., Kostyunin A.E. Anti-adhesive properties of epoxy-treated xenopericardium modified with polyvinyl alcohol: *in vitro* study of leukocyte adhesion in the pulsatile flow model. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2024; 16(2): 40, <https://doi.org/10.17691/stm2024.16.2.04>

English

Anti-Adhesive Properties of Epoxy-Treated Xenopericardium Modified with Polyvinyl Alcohol: *in vitro* Study of Leukocyte Adhesion in the Pulsatile Flow Model

E.A. Ovcharenko, PhD, Head of the Laboratory of New Biomaterials;
T.V. Glushkova, PhD, Senior Researcher, Laboratory of New Biomaterials;
D.K. Shishkova, PhD, Researcher, Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine;
M.A. Rezvova, Junior Researcher, Laboratory of New Biomaterials;
E.A. Velikanova, PhD, Researcher, Laboratory of Cell Technologies;
K.Yu. Klyshnikov, PhD, Researcher, Laboratory of New Biomaterials;
T.N. Akentyeva, Junior Researcher, Laboratory of New Biomaterials;
A.E. Kostyunin, PhD, Researcher, Laboratory of New Biomaterials

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, 6 Academician L.S. Barbarash Blvd,
Kemerovo, 650002, Russia

The aim of the study is to assess protective capabilities of the polymer coating made of polyvinyl alcohol to prevent leukocyte adhesion to epoxy-treated bovine pericardium, which is used in production of bioprosthetic heart valves.

Materials and Methods. Fragments of unmodified (control) and modified with polyvinyl alcohol epoxy-treated bovine pericardium were incubated in the dedicated chambers connected to a pulsatile flow system (Ibidi GmbH, Germany). During 48 h incubation was conducted in whole donor plasma containing $3 \cdot 10^6$ of mononuclear fraction cells. To simulate plasma flow, the shear stress on the inflow and outflow sides of of bioprosthetic heart valve in the aortic position was set to 50 and 20 dynes/cm², respectively. After the experiment was completed, the surface of the studied samples was subjected to scanning electron microscopy and immunofluorescence using antibodies to the pan-leukocyte marker CD45.

Results. Adhesion of leukocytes (CD45⁺) was seen for both the serous (outflow side) and fibrous (inflow side) surfaces of the control epoxy-treated bovine pericardium, whereas both surfaces of the material modified with polyvinyl alcohol were clear of immune cells. Scanning electron microscopy confirmed the adhesion of leukocytes to intact biological tissue: the cells on the surface of the control xenopericardium were of an irregular shape and formed numerous pseudopodia.

Conclusion. The suggested modification of epoxy-treated bovine pericardium with polyvinyl alcohol prevents the adhesion of immune cells to the implant surface and can potentially protect bioprosthetic heart valves from immune rejection.

Key words: bioprosthetic heart valves; polyvinyl alcohol; immune rejection; leukocytes; adhesion.

Введение

В последние десятилетия для протезирования несостоятельных клапанов сердца все чаще используют ксеногенные биологические протезы, изготовленные из химически стабилизированных тканей животных (свинных аортальных комплексов, перикарда быка или свиньи) [1]. Ксенобиопротезы характеризуются низкой тромбогенностью и не требуют пожизненного приема антикоагулянтов реципиентами [2]. В то же время из-за развития дегенеративных изменений в створчатом аппарате долговечность клапанных заменителей этого типа лимитирована в среднем 15 годами [3]. Указанный недостаток ограничивает возможности биопротезирования клапанов сердца у пациентов моложе 65 лет, чья ожидаемая продолжительность жизни превышает средние показатели долговечности ксенобиопротезов [4].

Одной из основных причин структурной дегенерации биопротезов клапанов сердца является клеточно-опосредованный воспалительный ответ [5]. Инвазия иммунных клеток (прежде всего нейтрофилов, макрофагов и гигантских многоядерных клеток) приводит к накоплению в биоматериале протезов производимых этими клетками матрикс-разрушающих и прокальцинирующих факторов: матриксных металлопротеиназ, катепсинов, миелопероксидазы нейтрофилов и других ферментов, а также остеогенных связывающих кальций белков (остеопонтина, остеокальцина и сиалопротеина кости) [6–9]. Взаимодействие перечисленных веществ с биотканью створчатого аппарата ведет к фрагментации и минерализации ее коллагеновой основы. Несмотря на совершенствование подходов к обработке биоматериала, направленных на снижение его иммуногенности, решить проблему иммунного отторжения ксенобиопротезов пока не удалось [5].

В качестве наиболее перспективного современного направления в поиске способа устранить негативное влияние факторов реципиента (в том числе клеточных элементов иммунной системы) на ткань ксенобиопротезов клапанов сердца выступает ее обработка биосовместимыми полимерами [10, 11]. Последние призваны сформировать гидрогель в межфибрилярном пространстве биоматериала, а также образовать защитную пленку на его поверхности, препятствуя имbibции растворенных в крови веществ и инвазии иммунных клеток.

Ранее нами была разработана оригинальная модификация эпоксиобработанного поливиниловым спиртом бычьего перикарда, которая существенно повысила устойчивость биоматериала к кальцификации, не ухудшая его механических и гемосовместимых свойств [11]. Принцип указанной модификации состоит в пропитывании биологической ткани жидким поливиниловым спиртом и дальнейшей полимеризации последнего методом криоструктурирования. Конечным итогом этой процедуры служит получение композиционного материала, представляющего собой матрицу коллагеновых волокон ксеноперикарда, заполненную гидрогелем [11]. В настоящем исследовании мы оцениваем возможность использования указанного подхода для защиты биоматериала от адгезии иммунных клеток. Для этого разработана модель *in vitro*, позволяющая создавать на поверхности образца ламинарный поток плазмы, содержащей живые клеточные элементы.

Цель исследования. При реализации настоящего исследования мы преследовали две цели. Основная заключалась в оценке защитных свойств покрытия из поливинилового спирта для предотвращения адгезии иммунных клеток к эпоксиобработанному ксеноперикарду, используемому в производстве ксенобиопротезов клапанов сердца. Дополнительная цель состояла в тестировании оригинальной модели *in vitro*, которая имитирует поток крови с живыми клетками, омывающей створки аортального клапана.

Материалы и методы

Исследуемый биоматериал. В качестве материала для исследования мы использовали фрагменты ксеноперикардальных лоскутов «КемПериплас-Нео» (КРi7080М; «НеоКор», Россия) толщиной 0,6–0,7 мм, модифицированных 12% водным раствором поливинилового спирта в соответствии с разработанной нами оригинальной методикой [11]. Группой контроля послужили неизмененные перикардальные лоскуты.

Моделирование потока плазмы, омывающей створки биопротеза. С целью изучения адгезивных свойств эпоксиобработанного ксеноперикарда, модифицированного поливиниловым спиртом, нами была разработана специальная конструкция (рис. 1), позволяющая создавать на поверхности образца ламинарный поток плазмы, содержащей живые клеточные элементы (лейкоциты). Для этого мы использова-

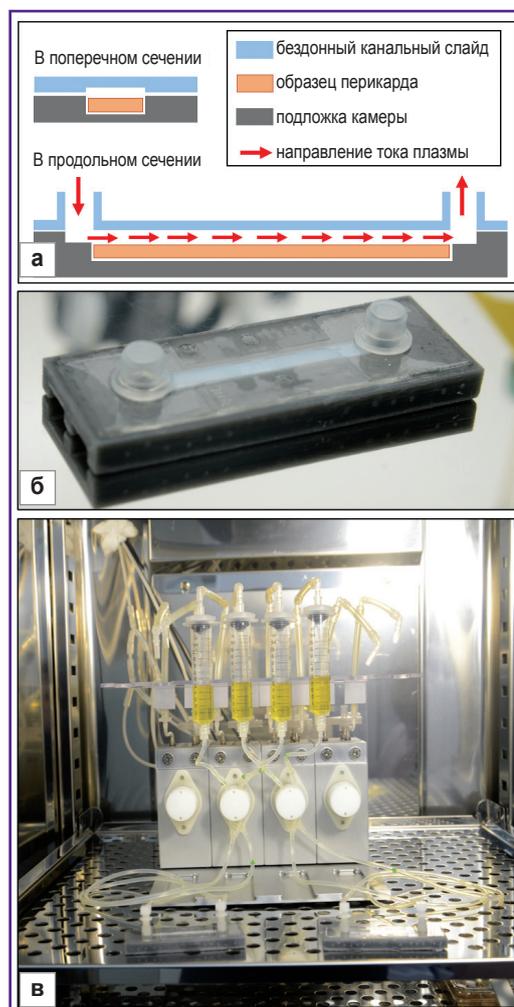


Рис. 1. Конструкция камеры для создания ламинарного потока плазмы на поверхности образца:

а — схема конструкции камеры; *б* — внешний вид камеры; *в* — камеры, подключенные к системе пульсирующего потока

ли бездонные каналные слайды (80168; Ibidi GmbH, Германия), к нижней самоклеящейся поверхности которых прикрепляли стерильные кастомизированные подложки из полилактида (002863; REC, Россия). Последние изготавливали методом послойного наплавления с помощью 3D-принтера Ender-3 S1 PRO (Creality, Китай). Образцы биоматериала помещали в желобок на дне подложки, а конструкцию подключали к системе пульсирующего потока Ibidi Pump System Quad (Ibidi GmbH, Германия) при помощи соответствующего набора коннекторов для перфузии Perfusion Set Yellow/Green (10964; Ibidi GmbH, Германия). Следует отметить, что применяемое в настоящем исследовании оборудование (включая систему пульсирующего потока и бездонные каналные слайды), как правило, используют для имитации условий *in vivo* при культивировании клеток в потоке (например, эндотелиальных клеток кровеносных и лимфатических сосудов) [12, 13]. Благодаря изготовленным нами под-

ложкам для канальных слайдов система была адаптирована под задачи проводимого эксперимента.

Для моделирования потока на приточной стороне биопротеза в аортальной позиции устанавливали напряжение сдвига в 50 дин/см^2 , для его моделирования на стороне оттока — 20 дин/см^2 [14, 15]. На каждый модуль системы потока использовали по 15 мл донорской плазмы. Одновременно подключали две камеры, содержавшие модифицированный и неизменный ксеноперикард, располагаемый к потоку фиброзной (имитация приточной стороны клапана) или серозной (имитация стороны оттока) поверхностью. Вышеописанную конструкцию помещали в углекислотный инкубатор при 37°C . Продолжительность экспозиции образцов в экспериментах составила 48 ч. Все исследования проводили с использованием крови и клеточных элементов одного условно здорового донора.

До начала работы с системой пульсирующего потока было подготовлено 60 мл плазмы, полученной путем центрифугирования цельной крови в течение 10 мин при 2000 г. До востребования плазма хранилась при -80°C .

Выделение лимфоцитов из крови проводили с помощью метода осаждения в градиенте фиколла плотностью $1,077 \text{ г/см}^3$ (Р053; «ПанЭко», Россия). Для этого цельную кровь разбавляли в соотношении 1:1 фосфатно-солевым буферным раствором Дульбекко без кальция и магния (1.2.4.7; «БиолоТ», Россия). Разбавленную кровь наслаивали на раствор фиколла из расчета 1,5 мл крови на 1 мл раствора и центрифугировали в течение 30 мин при 400 г и комнатной температуре. Затем мононуклеарную фракцию клеток крови, образующую белесую интерфазу на границе между раствором фиколла и плазмой, переносили в чистую пробирку и дважды отмывали буферным раствором Дульбекко в течение 10 мин при 350 г, а затем еще 10 мин при 300 г и комнатной температуре. Наконец, осадок лимфоцитов растворяли в заранее подготовленной плазме из расчета $3 \cdot 10^6$ клеток на один модуль системы потока.

Иммунофлуоресцентный анализ. Детекцию клеточных элементов, адгезировавшихся к исследуемым образцам ксеноперикарда, выполняли с помощью иммунофлуоресцентного анализа. Для этого фрагменты биоматериала в течение 10 мин фиксировали в 4% параформальдегиде при комнатной температуре с двукратной отмывкой (по 10 мин каждая) в фосфатно-солевом буфере ($\text{pH}=7,4$) на шейкере Polymax 1040 (Heidolph, Германия) при 50 об./мин. Блокировку неспецифического связывания антител выполняли путем инкубации образцов в 1% растворе бычьего сывороточного альбумина в течение 1 ч. Первичные антитела к пан-лейкоцитарному маркеру CD45 (ab10558; Abcam, Великобритания) разводили в 1% растворе бычьего сывороточного альбумина в соотношении 1:1500. Затем в раствор помещали исследуемые образцы, где их инкубировали в течение 20 ч при 4°C .

После завершения инкубации образцов в растворе с первичными антителами их дважды отмывали в фосфатно-солевом буфере (по 10 мин) и инкубировали в 1% растворе бычьего сывороточного альбумина с добавлением вторичных противокроличьих антител (ab150074; Abcam, Великобритания; разведение в пропорции 1:500), конъюгированных с флуоресцентными метками Alexa Fluor 555 (Thermo Fisher Scientific, США). После двукратной отмывки в фосфатно-солевом буфере образцы 5 мин обрабатывали 70% этиловым спиртом и еще 5 мин — реагентом для устранения аутофлуоресценции (2160; Merck, Германия). После троекратной отмывки в 70% этаноле (по 1 мин на шейкере) фрагменты ткани инкубировали в растворе 4',6-диамидино-2-фенилиндола ($0,1 \text{ мг/мл}$) в течение 30 мин. Затем выполняли две отмывки в фосфатно-солевом буфере и одну — в бидистиллированной воде (по 10 мин каждая), закрепляя образцы на предметных стеклах для дальнейшего изучения с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss, Германия).

Обработку изображения проводили в программе Zen (Carl Zeiss, Германия). Для полуколичественной оценки адгезировавшихся лейкоцитов выполняли подсчет клеток в 15 случайно выбранных полях зрения при 200-кратном увеличении.

Сканирующая электронная микроскопия. Для подтверждения адгезии лейкоцитов к изучаемому биоматериалу применяли метод сканирующей электронной микроскопии. С этой целью образцы предварительно отмывали от неадгезировавшихся клеток в фосфатно-солевом буферном растворе (3 раза по 5 мин) с последующей фиксацией в 2% глутаровом альдегиде в течение ночи. Далее производили отмывку образцов от глутарового альдегида в фосфатно-солевом буфере (3 раза по 15 мин) и однократно — в бидистиллированной воде (5 мин). После этого образцы замораживали при -40°C и лиофилизировали с помощью установки FreeZone 2.5 Plus (Labconco Corporation, США) в течение суток. Потом образцы монтировали на специальные столики и формировали на их поверхности токопроводящие покрытия (Au/Pd) с помощью системы EM ACE200 (Leica Microsystems, Германия). Структуру поверхности образцов изучали на сканирующем электронном микроскопе S-3400N (Hitachi, Япония) в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 10 кВ в режиме вторичных электронов.

Статистический анализ. Статистическая обработка данных была выполнена в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Тип распределения данных определяли по критерию Колмогорова–Смирнова. Поскольку распределение в группах было отличным от нормального, данные представлены в виде медианы и квартилей [Q1; Q3], а также минимальных и максимальных значений (min–max). Межгрупповое сравнение проводили с применением критерия Краскела–Уоллиса с поправкой на

множественное сравнение (FDR). Межгрупповые различия считали статистически значимыми при максимально допустимой вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализ исследуемых образцов биоматериала иммунофлуоресцентным методом продемонстрировал присутствие скоплений лейкоцитов (CD45⁺) на обеих поверхностях контрольного эпоксиобработанного ксеноперикарда (рис. 2). Полуколичественная оценка показала, что статистически значимо больше лейкоцитов оседало на ворсистой фиброзной поверхности контрольного ксеноперикарда, нежели на гладкой серозной (14 [9; 84]; 5–231 против 3 [2; 10]; 0–43 соответственно, $p=0,017$). В то же время на поверхности образцов, обработанных поливиниловым спиртом, клеточные элементы практически отсутствовали. Подсчет адгезировавшихся клеток не выявил различий между серозной и фиброзной поверхностями модифицированного перикарда (соответственно 0 [0; 0]; 0–1 и 0 [0; 0]; 0–2, $p=0,292$), однако образцы биоматериала в экспериментальной группе резко отличались по этому показателю от контрольных образцов ($p < 0,0002$; рис. 3).

Данные, полученные с применением сканирующей электронной микроскопии, подтвердили адгезию лейкоцитов к немодифицированному (контрольному) ксеноперикарду: клетки, обнаруживаемые на поверхности биоматериала, имели неправильную форму и многочисленные псевдоподии (рис. 4). В свою очередь

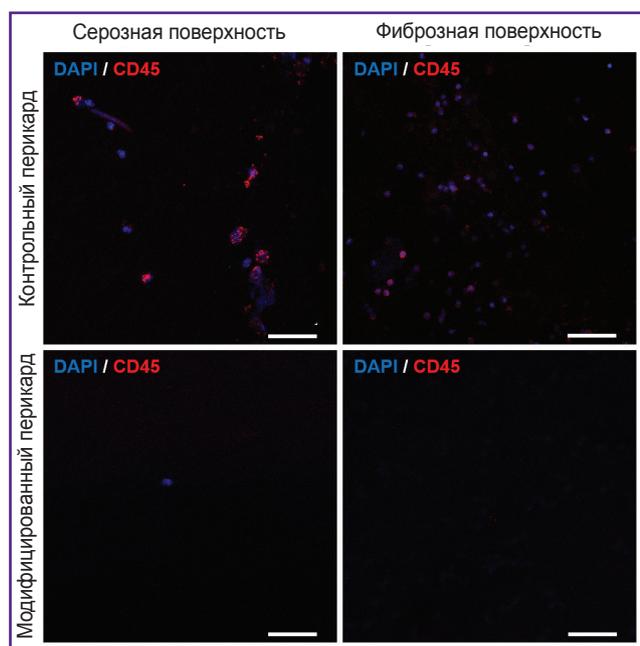


Рис. 2. Визуализация лейкоцитов (CD45⁺) на поверхности контрольного и модифицированного поливиниловым спиртом ксеноперикарда. Бар — 50 мкм

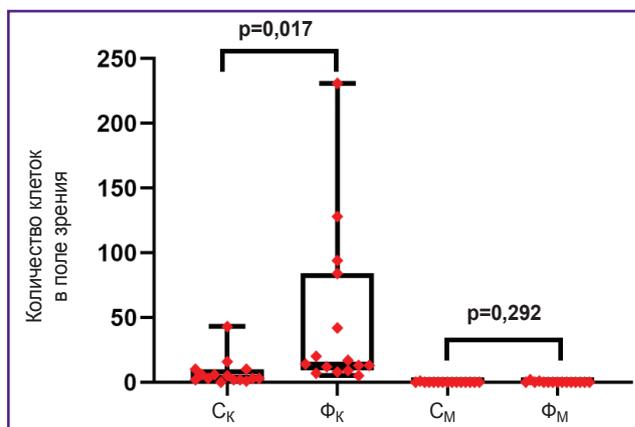


Рис. 3. Полуколичественная оценка лейкоцитов, адгезировавшихся к исследуемым образцам:

C_К и Ф_К — соответственно серозная и фиброзная поверхности немодифицированного эпоксиобработанного ксеноперикарда (контроль); C_М и Ф_М — соответственно серозная и фиброзная поверхности ксеноперикарда, модифицированного поливиниловым спиртом

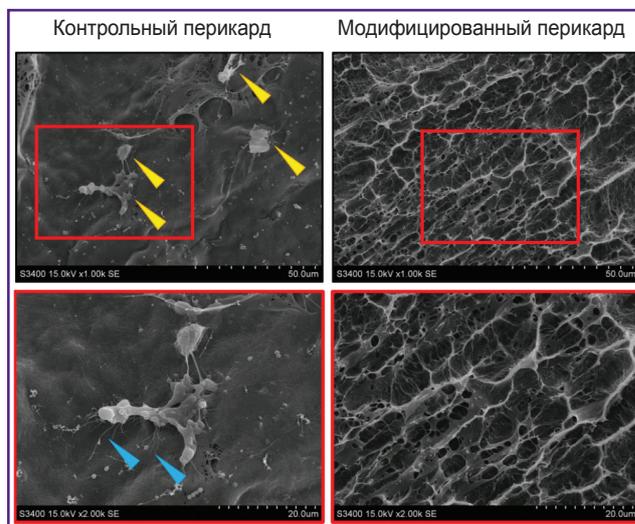


Рис. 4. Электронная микроскопия поверхности контрольного и модифицированного поливиниловым спиртом ксеноперикарда

Многочисленные псевдоподии лейкоцитов свидетельствуют об адгезии клеток к биоматериалу. Желтые стрелки указывают на иммунные клетки, голубые — на псевдоподии лейкоцитов. Изображения в нижнем ряду являются увеличением изображений из верхнего ряда

на обработанных поливиниловым спиртом фрагментах ксеноперикарда иммунные клетки не обнаружены, поверхность образцов имела типичную для гидрогеля мелкоячеистую структуру [11].

В целом полученные результаты свидетельствуют о превосходных защитных свойствах покрытия из полимеризованного поливинилового спирта: поскольку гидрогель не имеет сайтов клеточной адгезии, лейкоциты не могут прикрепляться к поверхности модифицированного биоматериала и, соответствен-

но, проникать в его толщу. Таким образом, предложенная нами модификация потенциально способна решить проблему уязвимости современных биопротезов клапанов сердца к воспалительной клеточной инфильтрации, что будет иметь решающее значение для увеличения долговечности рассматриваемых медицинских изделий. Впрочем, для подтверждения этих выводов требуются дополнительные испытания *in vivo* с участием крупных лабораторных животных (овцы или свиньи).

Следует отметить, что в известной нам литературе нет указаний о пригодности применяемого в настоящем исследовании оборудования для изучения осаждаемости лейкоцитов и других клеточных элементов крови (например, тромбоцитов, циркулирующих стволовых клеток) на различных материалах, возможно, ввиду отсутствия соответствующих коммерческих камер для размещения тестируемых образцов. Наш опыт использования кастомизированных подложек показывает возможности такого подхода, существенно расширяя рамки экспериментального моделирования *in vitro*.

Заключение

Результаты выполненных исследований продемонстрировали, что модификация эпоксиобработанного бычьего перикарда поливиниловым спиртом исключает адгезию циркулирующих иммунных клеток к его поверхности. Модифицированный биоматериал оказывается защищен от инвазии лейкоцитов и иммунного отторжения. Потенциально предложенная нами модификация может быть полезна для разработки биопротезов клапанов сердца следующего поколения, более устойчивых к структурной дегенерации по сравнению с современными моделями этих медицинских изделий.

Разработанные нами подложки, выполненные из полилактида и совместимые с бездонными канальными слайдами и системой пульсирующего потока Ibbi Pump System Quad (Ibbi GmbH, Германия), позволяют тестировать различные материалы на адгезию живых клеточных элементов (лейкоцитов, тромбоцитов, стволовых клеток), циркулирующих в кровотоке. Такой подход описан впервые.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда №21-75-10107.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Bax J.J., Delgado V. Bioprosthetic heart valves, thrombosis, anticoagulation, and imaging surveillance. *JACC Cardiovasc Interv* 2017; 10(4): 388–390, <https://doi.org/10.1016/j.jcin.2017.01.017>.

2. Head S.J., Çelik M., Kappetein A.P. Mechanical versus bioprosthetic aortic valve replacement. *Eur Heart J* 2017; 38(28): 2183–2191, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx141>.

3. Pibarot P., Dumesnil J.G. Prosthetic heart valves: selection of the optimal prosthesis and long-term management. *Circulation* 2009; 119(7): 1034–1048, <https://doi.org/10.1161/circulationaha.108.778886>.

4. Otto C.M., Nishimura R.A., Bonow R.O., Carabello B.A., Erwin J.P. III, Gentile F., Jneid H., Krieger E.V., Mack M., McLeod C., O’Gara P.T., Rigolin V.H., Sundt T.M. III, Thompson A., Toly C. 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, <https://doi.org/10.1161/cir.0000000000000923>.

5. Kostyunin A.E., Yuzhalin A.E., Rezvova M.A., Ovcharenko E.A., Glushkova T.V., Kutikhin A.G. Degeneration of bioprosthetic heart valves: update 2020. *J Am Heart Assoc* 2020; 9(19): e018506, <https://doi.org/10.1161/jaha.120.018506>.

6. Nair V., Law K.B., Li A.Y., Phillips K.R., David T.E., Butany J. Characterizing the inflammatory reaction in explanted Medtronic Freestyle stentless porcine aortic bioprosthesis over a 6-year period. *Cardiovasc Pathol* 2012; 21(3): 158–168, <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2011.05.003>.

7. Sakaue T., Nakaoka H., Shikata F., Aono J., Kurata M., Uetani T., Hamaguchi M., Kojima A., Uchita S., Yasugi T., Higashi H., Suzuki J., Ikeda S., Higaki J., Higashiyama S., Izutani H. Biochemical and histological evidence of deteriorated bioprosthetic valve leaflets: the accumulation of fibrinogen and plasminogen. *Biol Open* 2018; 7(8): bio034009, <https://doi.org/10.1242/bio.034009>.

8. Shetty R., Pibarot P., Audet A., Janvier R., Dagenais F., Perron J., Couture C., Voisine P., Després J.P., Mathieu P. Lipid-mediated inflammation and degeneration of bioprosthetic heart valves. *Eur J Clin Invest* 2009; 39(6): 471–480, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2009.02132.x>.

9. Lu F., Wu H., Bai Y., Gong D., Xia C., Li Q., Lu F., Xu Z. Evidence of osteogenic regulation in calcific porcine aortic valves. *Heart Surg Forum* 2018; 21(5): E375–E381, <https://doi.org/10.1532/hsf.2033>.

10. Ding K., Zheng C., Huang X., Zhang S., Li M., Lei Y., Wang Y. A PEGylation method of fabricating bioprosthetic heart valves based on glutaraldehyde and 2-amino-4-pentenoic acid co-crosslinking with improved antithrombogenicity and cytocompatibility. *Acta Biomater* 2022; 144: 279–291, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.03.026>.

11. Костюнин А.Е., Резвова М.А., Глушкова Т.В., Шишкова Д.К., Кутихин А.Г., Акентьева Т.Н., Овчаренко Е.А. Модификация поливиниловым спиртом эпоксиобработанного ксеноперикарда повышает его резистентность к кальцификации *in vitro*. *Трансплантология* 2023; 15(1): 34–45, <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2023-15-1-34-45>.

Kostyunin A.E., Rezvova M.A., Glushkova T.V., Shishkova D.K., Kutikhin A.G., Akentieva T.N., Ovcharenko E.A. Polyvinyl alcohol improves resistance of epoxy-treated bovine pericardium to calcification *in vitro*. *Transplantology* 2023; 15(1): 34–45, <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2023-15-1-34-45>.

12. Betterman K.L., Sutton D.L., Secker G.A., Kazenwadel J., Oszmiana A., Lim L., Miura N., Sorokin L., Hogan B.M., Kahn M.L., McNeill H., Harvey N.L. Atypical

cadherin FAT4 orchestrates lymphatic endothelial cell polarity in response to flow. *J Clin Invest* 2020; 130(6): 3315–3328, <https://doi.org/10.1172/jci99027>.

13. Bosseboeuf E., Chikh A., Chaker A.B., Mitchell T.P., Vignaraja D., Rajendrakumar R., Khambata R.S., Nightingale T.D., Mason J.C., Randi A.M., Ahluwalia A., Raimondi C. Neuropilin-1 interacts with VE-cadherin and TGFB2 to stabilize adherens junctions and prevent activation of endothelium under flow. *Sci Signal* 2023;

16(786): eabo4863, <https://doi.org/10.1126/scisignal.abo4863>.

14. Sadeghpour F., Fatourae N., Navidbakhsh M. Haemodynamic of blood flow through stenotic aortic valve. *J Med Eng Technol* 2017; 41(2): 108–114, <https://doi.org/10.1080/03091902.2016.1226439>.

15. Sun L., Rajamannan N.M., Sucosky P. Defining the role of fluid shear stress in the expression of early signaling markers for calcific aortic valve disease. *PLoS One* 2013; 8(12): e84433, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084433>.