

ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ КСЕНОГЕННОГО ПЕРИКАРДА, КОНСЕРВИРОВАННОГО ЭПОКСИДНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ В КАЧЕСТВЕ СШИВАЮЩИХ АГЕНТОВ

DOI: 10.17691/stm2021.13.4.03

УДК 616.11:547.441

Поступила 17.05.2021 г.

- © **Н.А. Бондаренко**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточных технологий¹; старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий Института экспериментальной биологии и медицины²;
М.А. Суровцева, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий¹; старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий Института экспериментальной биологии и медицины²;
А.П. Лыков, к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных технологий¹; старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий Института экспериментальной биологии и медицины²;
И.И. Ким, к.м.н., научный сотрудник лаборатории клеточных технологий¹; старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий Института экспериментальной биологии и медицины²;
И.Ю. Журавлева, д.м.н., профессор, директор Института экспериментальной биологии и медицины²;
О.В. Повещенко, д.м.н., зав. лабораторией клеточных технологий¹; зав. лабораторией клеточных технологий Института экспериментальной биологии и медицины²

¹Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, ул. Тимакова, 2, Новосибирск, 630117;

²Национальный медицинский исследовательский центр им. академика Е.Н. Мешалкина Минздрава РФ, ул. Речкуновская, 15, Новосибирск, 630055

Цель исследования — оценить цитотоксическое влияние ксеноперикардального биоматериала, обработанного ди- и пентаэпоксидами, на культуры клеток *in vitro*.

Материалы и методы. Используются образцы бычьего и свиного перикарда. Для консервации применяли три различных режима: 1) 0,625% раствор глутарового альдегида с двукратной сменой раствора на 2-е и 7-е сутки; 2) 5% раствор диглицидилового эфира этиленгликоля со сменой раствора на 2-е сутки; 3) 5% раствор диглицидилового эфира этиленгликоля в течение 10 дней, затем 2% раствор пентаэпоксида в течение 10 дней. Цитотоксичность биоматериала оценивали методом экстракции. Для определения цитотоксичности использовали клетки линии EA.hy926, мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (ММСК), фибробласты. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста, уровень апоптоза и некроза в культурах клеток — по окраске акридиновым оранжевым и этидиумом бромидом после культивирования с экстрактами ксеноперикарда с различными режимами консервации.

Результаты. Установлено, что наибольшее токсическое влияние на культуры клеток оказывают экстракты бычьего и свиного перикардов, консервированных глутаровым альдегидом: жизнеспособность клеток снижается на 20–33%. Экстракты ксеноперикарда, консервированного ди- и пентаэпоксидными соединениями, не оказывают токсического влияния на эндотелиальные клетки,

Для контактов: Бондаренко Наталья Анатольевна, e-mail: bond802888@yandex.ru

ММСК, фибробласты, поскольку жизнеспособность клеток снижается не более чем на 15%. Наименьший уровень апоптоза и некроза отмечается в культурах клеток под влиянием экстрактов перикардов, консервированных диэпоксидными и пентаэпоксидными соединениями.

Заключение. По оценке цитотоксичности, определению уровня апоптоза и некроза в культурах клеток установлено, что бычий и свиной перикарды, обработанные ди- и пентаэпоксидными, не оказывают цитотоксического влияния на культуру эндотелиальных клеток линии EA.hy926, ММСК, фибробластов *in vitro*. В то же время глутаровый альдегид в сравнении с ди- и пентаэпоксидными оказывает токсическое влияние на клетки.

Ключевые слова: ксеноперикард; глутаровый альдегид; диэпоксидные соединения; пентаэпоксидные соединения; эндотелиальные клетки; мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки; фибробласты.

Как цитировать: Bondarenko N.A., Surovtseva M.A., Lykov A.P., Kim I.I., Zhuravleva I.Yu., Poveschenko O.V. Cytotoxicity of xenogeneic pericardium preserved by epoxy cross-linking agents. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2021; 13(4): 27–35, <https://doi.org/10.17691/stm2021.13.4.03>

English

Cytotoxicity of Xenogeneic Pericardium Preserved by Epoxy Cross-Linking Agents

N.A. Bondarenko, PhD, Researcher, Cell Technology Laboratory¹; Senior Researcher, Cell Technology Laboratory, Institute of Experimental Biology and Medicine²;

M.A. Surovtseva, MD, PhD, Senior Researcher, Cell Technology Laboratory¹; Senior Researcher, Cell Technology Laboratory, Institute of Experimental Biology and Medicine²;

A.P. Lykov, MD, PhD, Leading Researcher, Cell Technology Laboratory¹; Senior Researcher, Cell Technology Laboratory, Institute of Experimental Biology and Medicine²;

I.I. Kim, MD, PhD, Researcher, Cell Technology Laboratory¹; Senior Researcher, Cell Technology Laboratory, Institute of Experimental Biology and Medicine²;

I.Yu. Zhuravleva, MD, DSc, Professor, Director of the Institute of Experimental Biology and Medicine²;

O.V. Poveschenko, MD, DSc, Head of the Cell Technology Laboratory¹; Head of the Cell Technology Laboratory, Institute of Experimental Biology and Medicine²

¹Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 2 Timakova St., Novosibirsk, 630117, Russia;

²Meshalkin National Medical Research Center, Ministry of Health of the Russian Federation, 15 Rechkunovskaya St., Novosibirsk, 630055, Russia

The aim of the study was to assess the cytotoxic effect of xenopericardial biomaterial treated with di- and pentaepoxides on the cell cultures *in vitro*.

Materials and Methods. Samples of bovine and porcine pericardium were used in the work. Three different modes were employed for preservation: 1) 0.625% solution of glutaraldehyde (GA) and a two-fold change on days 2 and 7; 2) 5% solution of ethylene glycol diglycidyl ether (EGDE) changed on day 2; 3) 5% EGDE solution for 10 days, then 2% pentaepoxide solution also for 10 days. The cytotoxicity of the biomaterial was assessed by the extraction method. To determine the cytotoxicity of the biomaterial, EA.hy926 cells, multipotent mesenchymal stem cells (MMSCs), and fibroblasts were used. Cell viability was determined by the MTT test. The level of apoptosis and necrosis in the cell cultures was assessed by staining with acridine orange and ethidium bromide after cultivation with xenopericardial extracts employing different modes of preservation.

Results. Extracts of bovine and porcine pericardium preserved with GA have been found to have the greatest toxic effect on the cell cultures showing 20–33% reduction of cell viability. Extracts from bovine and porcine pericardium preserved with di- and pentaepoxy compounds do not have a toxic effect on endothelial cells, MMSCs, and fibroblasts since cell viability reduction is by no more than 15%. The lowest level of apoptosis and necrosis is observed in the cell cultures under the influence of extracts from the pericardium, preserved with diepoxide and pentaepoxide compounds.

Conclusion. According to the MTT test for cytotoxicity and determination of the level of apoptosis and necrosis in cell cultures, bovine and porcine pericardia treated with di- and pentaepoxides have been established to have no cytotoxic effect on the culture of endothelial EA.hy926 cells, MMSCs, fibroblasts *in vitro*, whereas GA, in comparison with di- and pentaepoxides, has a toxic impact on the cells.

Key words: xenopericardium; glutaraldehyde; diepoxide compounds; pentaepoxide compounds; endothelial cells; multipotent mesenchymal stem cells; fibroblasts.

Введение

Поиск новых материалов для реконструктивно-восстановительной хирургии занимает важное место в биомедицинских исследованиях. В кардиохирургии для протезирования и пластики клапанов сердца и крупных магистральных сосудов широко применяется ксеноперикард (бычий и свиной). При изготовлении биопротезов из ксеноперикарда в качестве сшивающего агента часто используется глутаровый альдегид (ГА), который вызывает поперечную сшивку коллагена ксеноперикарда, обеспечивая его устойчивость к биодеградации и длительное функционирование в организме пациента. Однако было показано [1], что ГА-обработанные биопротезы могут подвергаться кальцификации в организме реципиента. Причем существует зависимость скорости и интенсивности кальцификации от возраста пациентов: у молодых пациентов процесс протекает быстрее.

Для профилактики кальцификации биопротезов предлагаются различные агенты, такие как α -аминоолеиновая кислота, октандиол и т.д. В 1987 г. С. Nojiri с соавт. [2] предложили использовать для поперечной сшивки перикарда эпоксидные соединения. В экспериментальных и клинических работах было показано, что биопротезы, обработанные диглицидиловым эфиром этиленгликоля (ДЭЭ), обладают устойчивостью к кальцификации, гидрофильностью, низкой цитотоксичностью и стерильностью [3, 4].

Обработанный диэпоксидом биоматериал не является мутагенным и имеет хорошие функциональные характеристики [5]. Диэпоксидные соединения обеспечивают увеличение плотности сшивки, улучшение механических характеристик и биологической стабильности биоматериала [6]. Доказано, что полифункциональные эпоксидные соединения (обладающие несколькими эпоксидными группами) по сравнению с бифункциональными усиливают эти эффекты [7]. Все эпоксидные консерванты блокируют кальцификацию коллагена, хотя в отношении эластана таких однозначных результатов не получено. Ткань перикарда вне зависимости от видовой принадлежности является полностью коллагеновым материалом, что позволяет с высокой степенью вероятности прогнозировать отсутствие кальцификации в изготовленных из него биопротезах при использовании ДЭЭ в качестве консерванта.

Одним из полифункциональных эпоксидных соединений является 1,2,3,4,6-пента-О-{1-[2-(глицидилокси)этил]-D-глюкопираноза (пентаэпоксид, ПЭ)}, содержащий в молекуле 5 реакционно-способных эпоксидных групп. Впервые он был синтезирован в Институте химии им. А. Фаворского Сибирского отделения РАН (Иркутск, Россия) в 1985 г. Оценка цитотоксичности биопротезных материалов, консервированных с использованием ПЭ, освещена лишь в одной работе и в отношении одного вида клеток [8].

Цель исследования — оценка цитотоксического влияния ксеноперикардального биоматериала, обра-

ботанного ди- и пентаэпоксидами, на культуры различных клеток *in vitro*.

Материалы и методы

Биоматериалы. Бычий перикард (БП) и свиной перикард (СП) забирали от здоровых животных на мясокомбинате, очищали образцы от соединительной ткани, несколько раз промывали 0,9% раствором хлорида натрия и разделяли на три равные части для дальнейшей консервации. Консервацию проводили при комнатной температуре в течение 6 ч после забора материала. Для консервации использовали три различных материала:

1) группа ГА: 0,625% раствор глутарового альдегида (Sigma-Aldrich, США); 0,1 М фосфатный буфер; pH=7,4; в течение 21 сут с двукратной сменой раствора — на 2-е и 7-е сутки;

2) группа ДЭЭ: 5% раствор диглицидилового эфира этиленгликоля; чистота — 97% (Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения РАН); 0,1 М фосфатный буфер; pH=7,4; в течение 14 сут со сменой раствора на 2-е сутки;

3) группа ДЭЭ+ПЭ: 5% раствор диглицидилового эфира этиленгликоля в течение 10 сут, затем 2% раствор пентаэпоксида (Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения РАН); 0,1 М фосфатный буфер, pH=7,4; в течение 10 сут.

Культуры клеток. Эндотелиальные клетки линии EA.hy926 были любезно предоставлены Dr. C.J. Edgel (Университет Каролины, США). Их культивировали в питательной среде DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС; HyClone Laboratories Inc., США), 40 мкг/мл гентамицина сульфата («ДАЛЬХИМФАРМ», Россия) и 2 ммоль L-глутамин (ICN, США) в CO₂-инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ до образования конфлюэнтного монослоя.

Культуру мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) получали из адгезивных мононуклеаров костного мозга от пациентов с ишемической болезнью сердца, давших информированное согласие, согласно протоколу, утвержденному Этическим комитетом Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии — филиала Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН. Культура клеток фибробластов ФЭЧ-16-2 была приобретена в Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (Новосибирская область). ММСК и фибробласты культивировали в питательной среде DMEM с добавлением 10% ЭТС, 2 ммоль L-глутамин и 40 мкг/мл гентамицина. В работе использовали клетки 3–5 пассажей.

Оценка цитотоксичности биоматериала. Токсичность биоматериала оценивали методом экстракции

в соответствии со стандартом ГОСТ ISO 10993-5-2011. Для исследования были приготовлены экстракты 6 групп биоматериалов: ГА, ДЭЭ и ДЭЭ+ПЭ бычьего и свиного перикарда. Экстракты готовили способом, описанным G. Guo с соавт. [9]. Образцы биоматериала промывали стерильным забуференным физиологическим раствором и взвешивали. Затем их стерилизовали путем инкубации с 70% этанолом в течение 24 ч и трижды промывали стерильным забуференным физиологическим раствором в течение 20 мин. Для получения экстрактов образцы биоматериала культивировали в полной ростовой среде в течение 72 ч при 37°C в соотношении 0,2 г ткани на 1 мл среды. По истечении срока инкубации супернатанты собирали.

Для определения цитотоксичности биоматериала клетки EA.hy926, ММСК и фибробласты кожи высевали в 96-луночные планшеты в количестве $1 \cdot 10^4$ кл. на лунку. Через 24 ч культивирования среду удаляли и добавляли 100 мкл экстрактов перикардов. Жизнеспособность клеток оценивали колориметрическим МТТ-методом (на основе 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромидом) через 24 и 72 ч. Поглощение растворенных кристаллов формазана измеряли при $\lambda=492$ нм с использованием планшетного ридера Stat Fax 2100 (Awareness Technology, Inc., США).

Определение апоптоза. Для изучения апоптоза клетки EA.hy926, ММСК и фибробласты ($1 \cdot 10^4$ кл. на лунку 96-луночного планшета) культивировали 24 ч в полной ростовой среде. Затем ростовую среду удаляли, добавляли 100 мкл супернатанта исследуемых

биообразцов. Через 24 и 72 ч лунки промывали по два раза холодным забуференным физиологическим раствором и добавляли в каждую лунку 8 мкл смеси красителей акридинового оранжевого (100 мкг/мл; «Диаэм», Россия) и этидиума бромидом (100 мкг/мл; «МЕДИГЕН», Россия) в соотношении 1:1 [10]. Клетки визуализировали с помощью микроскопа Axio Observer (Carl Zeiss, Германия), используя в расчетах минимум 500 клеток на образце.

Статистический анализ выполняли в программе Statistica 10.0 (StatSoft, США). Результаты представлены в виде Me [Q1; Q3]. Полученные данные проверяли на нормальность распределения с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Поскольку распределение в большинстве экспериментов отличалось от нормального, о достоверности различий судили по критерию Манна–Уитни, считая различия статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты

В 1-е сутки наблюдения жизнеспособность клеток EA.hy926 под влиянием экстракта БП, обработанного ГА (группа ГА–БП), была статистически значимо ($p=0,01$) ниже по сравнению с экстрактом перикарда, обработанного ДЭЭ и ДЭЭ+ПЭ (группы ДЭЭ–БП и ДЭЭ+ПЭ–БП) (рис. 1). На 3-и сутки отмечали аналогичную закономерность. При этом влияние экстрактов БП, обработанных ДЭЭ и ДЭЭ+ПЭ, на клетки EA.hy926 было почти идентичным на всех сроках наблюдения: жизнеспособность клеток через 1 сут

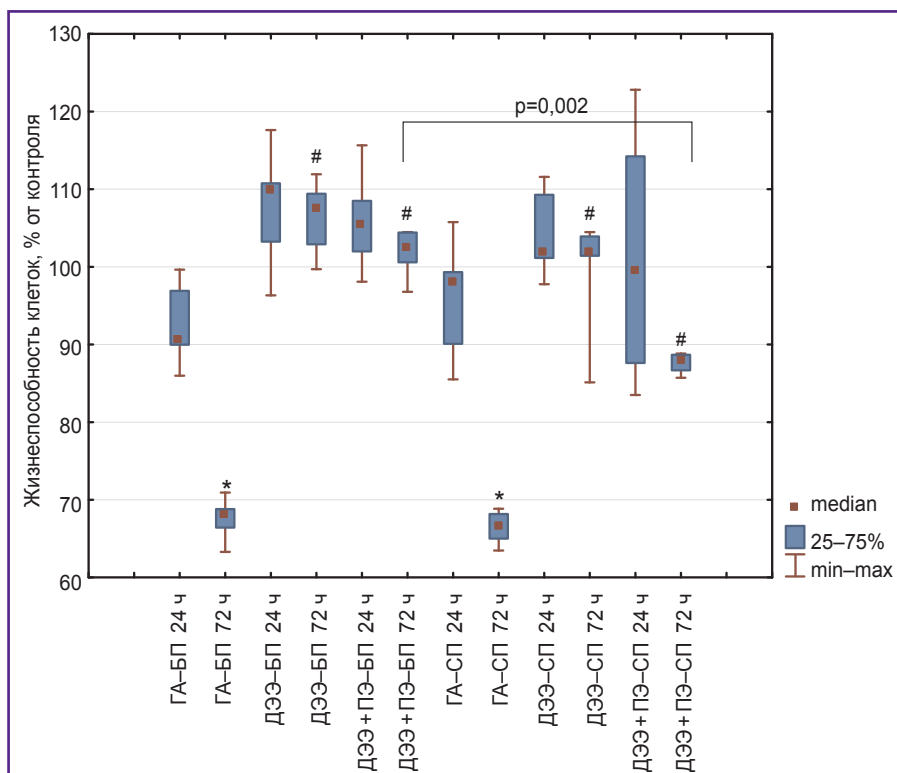
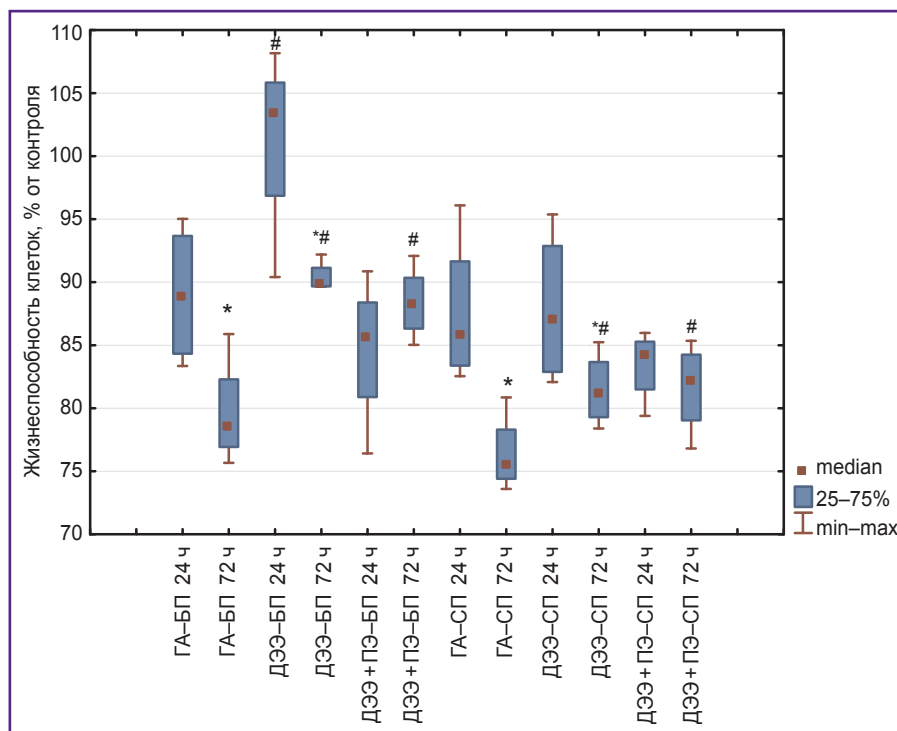


Рис. 1. Оценка токсического влияния ксеноперикарда, обработанного консервантами ГА, ДЭЭ, ДЭЭ+ПЭ, на жизнеспособность клеток EA.hy926

* — $p=0,001$ при сравнении внутри группы через 24 и 72 ч; # — $p < 0,01$ между группой ГА и подобными эпоксиконсервированными группами

Рис. 2. Оценка токсического влияния ксеноперикарда, обработанного консервантами ГА, ДЭЭ, ДЭЭ+ПЭ, на жизнеспособность ММСК

* — $p=0,003$ при сравнении внутри группы через 24 и 72 ч; # — $p<0,01$ между группой ГА и подобными эпоксиконсервированными группами



составила 110 и 105%, через 3 сут — 107 и 102% соответственно.

Жизнеспособность клеток EA.hy926 под влиянием экстракта от СП, обработанного ГА (группа ГА-СП), через 1 сут составила 98%, тогда как в группах ДЭЭ-СП и ДЭЭ+ПЭ-СП — 101 и 99% соответственно. Эта тенденция сохранялась в целом и через 3 сут эксперимента. Следует отметить, однако, что цитотоксичность при обработке свиного перикарда ДЭЭ+ПЭ была статистически значимо ($p=0,002$) выше по сравнению с экстрактом БП, обработанным тем же методом: жизнеспособность клеток EA.hy926 в этих группах через 72 ч составила 88 и 102% соответственно.

Гораздо меньшие различия цитотоксичности в зависимости от способа обработки биоматериалов наблюдали в культуре ММСК. Статистически значимо более высокая жизнеспособность ММСК через 1 сут была выявлена только в группе ДЭЭ-БП (рис. 2). Жизнеспособность ММСК через 3 сут эксперимента в группах ДЭЭ-БП и ДЭЭ+ПЭ-БП была статистически значимо ($p=0,01$) выше — 90 и 88% соответственно по сравнению с группой ГА-БП — 78%. Различий по жизнеспособности ММСК между группами ГА-СП, ДЭЭ-СП и ДЭЭ+ПЭ-СП в 1-е сутки не наблюдали.

Через 72 ч жизнеспособность ММСК в группе ГА-СП (75%) была статистически значимо ($p=0,01$) ниже по сравнению с группами ДЭЭ-СП и ДЭЭ+ПЭ-СП: жизнеспособность клеток в этих группах составила 81%. К 3-м суткам наблюдения жизнеспособность ММСК в группах ГА-БП, ГА-СП, ДЭЭ-СП и ДЭЭ-БП была статистически значимо ($p=0,003$) ниже в сравнении с 1-ми сутками, в то время как в группах

ДЭЭ+ПЭ-СП и ДЭЭ+ПЭ-БП жизнеспособность в эти сутки была сопоставимой.

При изучении влияния экстрактов перикардов на жизнеспособность фибробластов было установлено, что в группе ГА-БП через 1 сут наблюдения жизнеспособность клеток была статистически значимо ($p=0,01$) ниже (66%), чем в группах ДЭЭ (84%) и ДЭЭ+ПЭ (91%), однако к 3-м суткам эти различия нивелировались (рис. 3).

При воздействии экстрактов ГА-СП и ДЭЭ-СП жизнеспособность фибробластов в 1-е сутки была выше ($p=0,01$) по сравнению с соответствующими группами БП. Под влиянием экстракта ДЭЭ+ПЭ-СП жизнеспособность фибробластов составила 78% и была статистически значимо ($p=0,02$) ниже, чем в группе ДЭЭ-СП (96%). В 1-е сутки эксперимента в группе ДЭЭ-БП жизнеспособность фибробластов составила 84%, что статистически значимо ниже по сравнению с группой ДЭЭ+ПЭ-БП (91%). К 3-м суткам наблюдения жизнеспособность фибробластов практически выравнивается во всех группах вне зависимости от видовой принадлежности перикарда и использованных для его обработки сшивающих агентов.

Следующим этапом работы было изучение влияния экстрактов разных образцов ксеноперикарда на уровень апоптоза и некроза клеток EA.hy926, ММСК и фибробластов. В группах ГА-БП и ГА-СП выявлено статистически значимо большее ($p=0,003$) количество нежизнеспособных клеток, окрашенных этидиумом бромидом в красный цвет, по сравнению с контролем и другими группами: как через 24 ч, так и через 72 ч наблюдения (рис. 4).

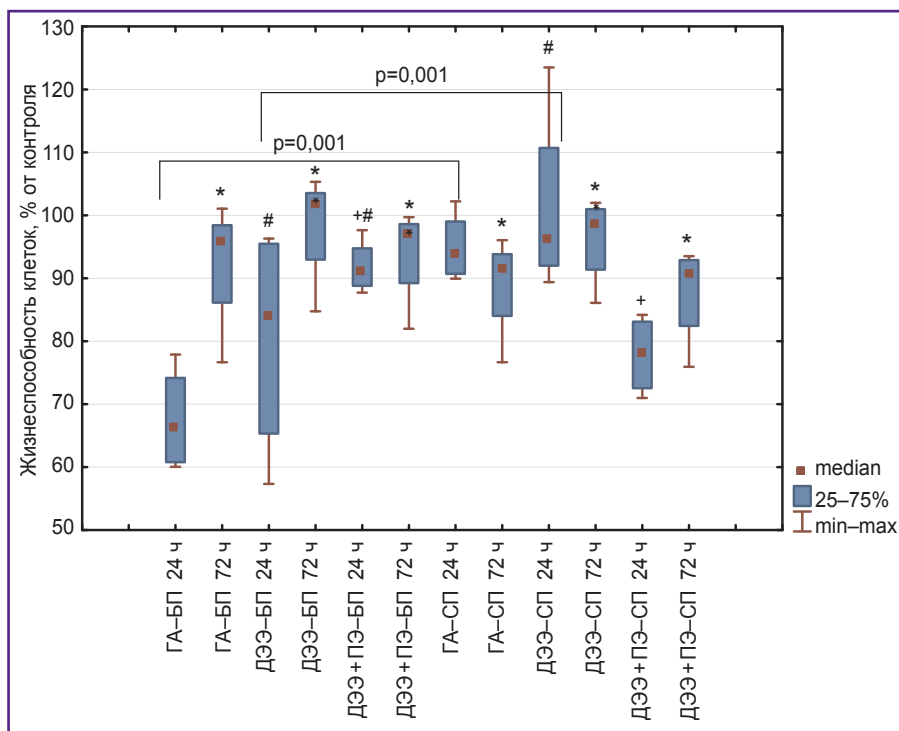


Рис. 3. Оценка токсического влияния экстрактов ксеноперикарда, обработанного консервантами ГА, ДЭЭ и ДЭЭ+ПЭ, на жизнеспособность фибробластов

* — $p=0,01$ при сравнении внутри группы через 24 и 72 ч; # — $p<0,01$ между группой ГА и эпоксиконсервированными группами; + — между группами ДЭЭ и ДЭЭ+ПЭ

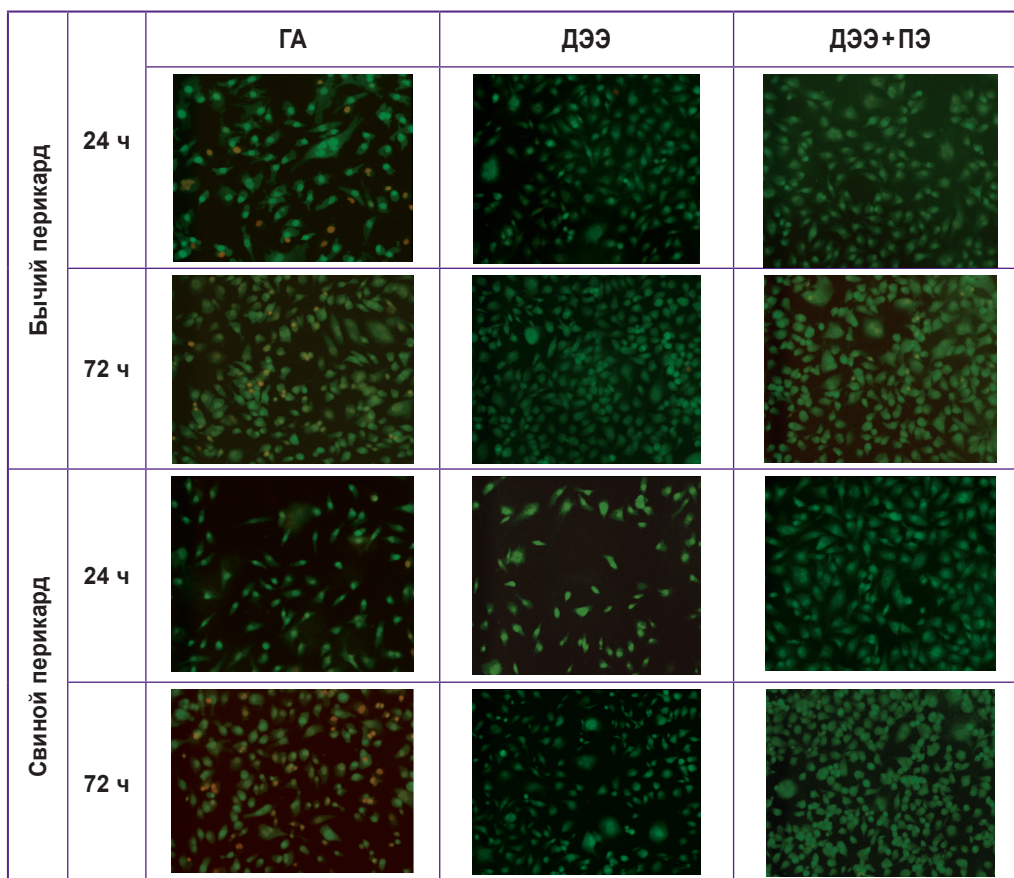


Рис. 4. Окраска акридиновым оранжевым + этидиумом бромидом эндотелиальных клеток линии EA.hy926 после добавления экстрактов БП и СП, обработанных различными консервантами

Зеленый цвет — живые клетки, красный цвет — клетки в стадии некроза; $\times 200$

Уровень апоптоза и некроза в клетках EA.hy926, фибробластах, ММСК под влиянием экстрактов перикарда, обработанных консервантами ГА, ДЭЭ, ДЭЭ+ПЭ, % (Ме [Q1; Q3])

Клетки	Контроль		Группы											
			ГА-БП		ГА-СП		ДЭЭ-БП		ДЭЭ-СП		ДЭЭ+ПЭ-БП		ДЭЭ+ПЭ-СП	
EA.hy926	<i>1-е сутки</i>													
	A	H	A	H	A	H	A	H	A	H	A	H	A	H
	0	0	21,5 [6,0; 83,0] [#]	13,0 [4,0; 23,0] ^{#^}	1,1 [1,1; 1,4]	2,2 [1,1; 1,4] [#]	4,2 [0; 15,0]	0 [0; 1,5] [*]	0 [0; 1,0]	0 [0; 4,0]	0 [0; 1,9]	0 [0; 0,74]	0,8 [0,4; 1,9]	0 [0; 0,4]
Фибро-бласти	<i>3-и сутки</i>													
	A	H	A	H	A	H	A	H	A	H	A	H	A	H
	3,7 [3,3; 5,4] [*]	9,2 [2,7; 16,0] [*]	0,5 [0,4; 0,9] [^]	5,2 [2,3; 6,0] [#]	9,2 [5,8; 11,0] ^{**^}	10,0 [5,5; 20,0] ^{**}	3,3 [2,6; 3,6]	0 [0; 0,6] [*]	1,4 [0,4; 4,2] [*]	0,8 [0; 2,3] [*]	0,7 [0,6; 1,0] [#]	2,3 [2,1; 5,4] ^{**}	1,7 [0,4; 3,0]	0 [0; 0,4]
ММСК	<i>1-е сутки</i>													
	A	H	A	H	A	H	A	H	A	H	A	H	A	H
	0 [0; 2,9]	0	0 [0; 0,3]	1,6 [1,1; 2,5]	0 [0; 0,3]	1,4 [1,2; 1,6]	0	1,6 [1,1; 2,2]	0,4 [0,1; 0,7]	1,5 [0,9; 1,9]	0	0,8 [0,7; 0,9]	0,1 [0; 0,5]	1,6 [1,5; 1,8]
ММСК	<i>3-и сутки</i>													
	A	H	A	H	A	H	A	H	A	H	A	H	A	H
	0,3 [0; 0,7]	0 [0; 1,6] [*]	1,8 [1,2; 2,4] ^{**^}	2,1 [1,0; 2,9] [#]	0,8 [0,6; 1,2] [^]	2,9 [2,5; 3,3] ^{**^}	1,6 [0,5; 1,9] [*]	0,9 [0,8; 1,1]	1,5 [1,4; 1,8] [*]	1,5 [1,4; 1,8]	1,2 [0; 2,4] [*]	0,8 [0,3; 0,9]	0,6 [0,3; 1,6]	1,1 [0,9; 2,3]

Примечания: А — апоптоз; Н — некроз; ГА — глутаровый альдегид; ДЭЭ — диглицидиловый эфир этиленгликоля; ДЭЭ+ПЭ — диглицидиловый эфир этиленгликоля и пентаэпоксид; БП — бычий перикард; СП — свиной перикард. Статистическая значимость различий: * — $p=0,001$ при сравнении значений группы через 24 и 72 ч; # — $p<0,03$ между подобными группами ГА и ДЭЭ; + — $p=0,02$ между группами ДЭЭ и ДЭЭ+ПЭ бычьего и свиного перикардов; ^ — $p=0,01$ между группами контроля и ГА-БП, контроля и ГА-СП.

Наименьшие статистически значимые различия значений по уровню апоптоза и некроза в клетках EA.hy926 наблюдали в группах ДЭЭ+ПЭ-БП и ДЭЭ-СП в 1-е сутки наблюдения (см. таблицу). Через 72 ч наибольший среди всех групп уровень апоптоза и некроза был выявлен в группе ГА-СП. Что касается цитотоксического эффекта эпоксиобработанного БП на клетки EA.hy926, то через 3 сут наблюдения уровень апоптоза был ниже в группе ДЭЭ+ПЭ по сравнению с группой ДЭЭ.

При изучении влияния различных экстрактов на фибробласты установлено, что уровень апоптоза в них через 1 сут статистически значимо ($p=0,02$) выше в группах ГА-БП и ГА-СП по сравнению с контролем. Кроме того, в группе ДЭЭ-БП уровень апоптоза в фибробластах был статистически значимо ($p=0,02$) выше в сравнении с группой ДЭЭ-СП как через 24 ч, так и через 72 ч наблюдения. Статистически значимые различия по уровню апоптоза в остальных группах в эти сроки не наблюдались. При этом группы не имели статистически значимых различий по уровню некроза в фибробластах в 1-е сутки. Уровень некроза в группе ГА-БП был статистически значи-

мо выше ($p=0,03$) в сравнении с группами ДЭЭ-БП и ДЭЭ+ПЭ-БП. В группе ГА-СП уровень некроза в фибробластах также был статистически значимо выше ($p=0,02$) при сравнении с группами ДЭЭ-СП и ДЭЭ+ПЭ-СП. При сравнении групп во временном интервале установлено, что к 3-м суткам уровень апоптоза в фибробластах статистически значимо ($p=0,001$) возрастает в группах контроля, ДЭЭ+ПЭ-БП и ДЭЭ+ПЭ-СП, а уровень некроза увеличивается в группах ГА-БП и ГА-СП.

Культура ММСК оказалась более устойчивой к влиянию экстрактов ксеноперикардов. В 1-е сутки наблюдения уровень апоптоза ММСК в контроле и опытных группах был сопоставим. К 3-м суткам он статистически значимо ($p=0,01$) увеличивается в группах ГА-БП и ГА-СП по сравнению с контролем. Уровень некроза ММСК в 1-е сутки эксперимента статистически значимо ($p=0,007$) возрастал в группах ГА-БП и ГА-СП по сравнению с контролем. К 3-м суткам уровень некроза в ММСК статистически значимо ($p=0,02$) увеличился в группе ГА-СП по сравнению с контролем, группами ГА-БП, ДЭЭ-СП и ДЭЭ+ПЭ-СП. Наименьший уровень апоптоза отмечался в

ММСК в группе ДЭЭ+ПЭ–СП в сравнении с другими консервантами.

Обсуждение

В данном исследовании поведена оценка цитотоксического эффекта экстрактов образцов БП и СП, консервированных ГА, ДЭЭ и ДЭЭ+ПЭ, на клетки EA.hy926, ММСК, фибробласты. Результаты показали, что экстракты БП и СП, обработанные ГА, уменьшают жизнеспособность клеток EA.hy926, ММСК и фибробластов. Это позволяет утверждать, что такие экстракты обладают цитотоксическим воздействием на все типы изученных клеток. Необходимо отметить, что оба вида перикарда, обработанные ГА, оказывают сопоставимый цитотоксический эффект на клетки EA.hy926 и ММСК, в то время как на фибробласты экстракты БП оказывают большее токсическое влияние, чем экстракты СП, в первые 24 ч. Цитотоксический эффект БП и СП, обработанных ГА, связан как со свободным ГА, остающимся в биоматериале после отмывки, так и с альдегидными группами, которые остаются несвязанными из-за маскирующего эффекта при ковалентном связывании сшивающего агента с биоматериалом [11–14].

Установлено, что экстракты БП и СП, консервированные ДЭЭ и комбинацией ди- и пентаэпоксидного соединений, не оказывают значительного токсического влияния на клетки EA.hy926, ММСК и фибробласты, поскольку жизнеспособность этих клеток под действием ди- и пентаэпоксидных сшивающих агентов сохраняется на уровне контроля или в среднем снижается на 15%.

Для идентификации механизмов цитотоксического эффекта экстрактов БП и СП был исследован уровень некроза и апоптоза в культурах клеток. Наименьший уровень апоптоза и некроза отмечали в клетках под влиянием экстрактов биоматериала, консервированного эпоксидными соединениями. Полученные нами данные согласуются с данными авторов [11], которые показали, что сшивание коллагеновых материалов эпоксидами приводит к более низкой цитотоксичности, чем их обработка ГА.

Экстракты БП и СП, консервированные ГА, по сравнению с ди- и пентаэпоксидами снижают жизнеспособность культур клеток. Так, к концу срока наблюдения уровень апоптоза под влиянием экстракта БП, обработанного ГА, выше, чем в других группах. Полученные данные о влиянии ГА на уровень апоптоза и некроза в клетках также согласуются с результатами предыдущих исследований [14, 15], в которых показано, что в составе ГА обнаруживаются не только ковалентно связанные с тканью альдегиды, но и адсорбированные альдегиды, особенно способствующие снижению жизнеспособности эндотелиальных клеток. Необходимо отметить, что уровень некроза в фибробластах под влиянием ГА увеличился в несколько раз. Полученные нами данные согласуются

с результатами исследования, в котором установлено наличие прямой цитотоксичности ГА на фибробласты *in vitro*, а также токсичности экстракта БП, обработанного ГА, по данным МТТ-теста [14].

Заключение

По результатам оценки цитотоксичности, определению уровня апоптоза и некроза установлено, что бычий и свиной перикарды, обработанные ди- и пентаэпоксидами, в условиях *in vitro* не обладают или обладают крайне низкой цитотоксичностью в отношении эндотелиальных клеток линии EA.hy926, мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток и фибробластов, в то время как глутаровый альдегид оказывает выраженный цитотоксический эффект.

Финансирование исследования. Работа выполнена по темам государственного задания №020059-2019-0046 и №121032300337-5.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Alperi A., Hernandez-Vaquero D., Pascual I., Diaz R., Silva I., Alvarez-Cabo R., Avanzas P., Moris C. Aortic valve replacement in young patients: should the biological prosthesis be recommended over the mechanical? *Ann Transl Med* 2018; 6(10): 183, <https://doi.org/10.21037/atm.2018.02.21>.
2. Nojiri C., Okano T., Grainger D., Park K.D., Nakahama S., Suzuki K., Kim S.W. Evaluation of nonthrombogenic polymers in a new rabbit A-A shunt model. *ASAIO Trans* 1987; 33(3): 596–601.
3. Nishi C., Nakajima N., Ikada Y. In vitro evaluation of cytotoxicity of diepoxy compounds used for biomaterial modification. *J Biomed Mater Res* 1995; 29(7): 829–834, <https://doi.org/10.1002/jbm.820290707>.
4. Sung H.W., Hsu H.L., Hsu C.S. Effects of various chemical sterilization methods on the crosslinking and enzymatic degradation characteristics of an epoxy-fixed biological tissue. *J Biomed Mater Res* 1997; 37(3): 376–383, [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(19971205\)37:3<376::aid-jbm8>3.0.co;2-i](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(19971205)37:3<376::aid-jbm8>3.0.co;2-i).
5. Lohre J.M., Baclig L., Wickham E., Guida S., Farley J., Thyagarajan K., Tu R., Quijano R.C. Evaluation of epoxy ether fixed bovine arterial grafts for mutagenic potential. *ASAIO J* 1993; 39(2): 106–113.
6. Trofimov B.A., Zhuravleva I.Yu., Oparina L.A., Sukhikh A.S., Vysotskaya O.V., Borisov V.V., Gusarova N.K. Penta-O-{1-[2-(glycidylloxy)ethoxy]ethyl}-D-glucopyranose: synthesis and application for the preservation of cardiovascular bioprotheses. *Russ Chem Bull* 2015; 64: 1451–1457, <https://doi.org/10.1007/s11172-015-1031-2>.
7. Sung H.W., Hsu C.S., Wang S.P., Hsu H.L. Degradation potential of biological tissues fixed with various fixatives: an in vitro study. *J Biomed Mater Res* 1997; 35(2): 147–155, [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(199705\)35:2<147::aid-jbm2>3.0.co;2-n](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(199705)35:2<147::aid-jbm2>3.0.co;2-n).
8. Zhuravleva I.Y., Karpova E.V., Oparina L.A.,

Poveschenko O.V., Surovtseva M.A., Titov A.T., Ksenofontov A.L., Vasilieva M.B., Kuznetsova E.V., Bogachev-Prokophiev A.V., Trofimov B.A. Cross-linking method using pentaepoxide for improving bovine and porcine bioprosthetic pericardia: a multiparametric assessment study. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2021; 118: 111473, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111473>.

9. Guo G., Jin L., Jin W., Chen L., Lei Y., Wang Y. Radical polymerization-crosslinking method for improving extracellular matrix stability in bioprosthetic heart valves with reduced potential for calcification and inflammatory response. *Acta Biomater* 2018; 82: 44–55, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.10.017>.

10. Ribble D., Goldstein N.B., Norris D.A., Shellman Y.G. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnology* 2005; 5: 12, <https://doi.org/10.1186/1472-6750-5-12>.

11. Elagin V., Kuznetsova D., Grebenik E., Zolotov D.A., Istranov L., Zharikova T., Istranova E., Polozova A., Reunov D., Kurkov A., Shekhter A., Gafarova E.R., Asadchikov V., Borisov S.M., Dmitriev R.I., Zagaynova A., Timashev P. Multiparametric optical bioimaging reveals the fate of epoxy

crosslinked biomeshes in the mouse subcutaneous implantation model. *Front Bioeng Biotechnol* 2020; 8: 107, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00107>.

12. Kim S.S., Lim S.H., Cho S.W., Gwak S.J., Hong Y.S., Chang B.C., Park M.H., Song K.W., Choi C.Y., Kim B.S. Tissue engineering of heart valves by recellularization of glutaraldehyde-fixed porcine valves using bone marrow-derived cells. *Exp Mol Med* 2006; 38(3): 273–283, <https://doi.org/10.1038/emm.2006.33>.

13. Siddiqui R.F., Abraham J.R., Butany J. Bioprosthetic heart valves: modes of failure. *Histopathology* 2009; 55(2): 135–144, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2008.03190.x>.

14. Umashankar P.R., Mohanan P.V., Kumari T.V. Glutaraldehyde treatment elicits toxic response compared to decellularization in bovine pericardium. *Toxicol Int* 2012; 19(1): 51–58, <https://doi.org/10.4103/0971-6580.94513>.

15. Lopez-Moya M., Melgar-Lesmes P., Kolandaivelu K., de la Torre Hernández J.M., Edelman E.R., Balcells M. Optimizing glutaraldehyde-fixed tissue heart valves with chondroitin sulfate hydrogel for endothelialization and shielding against deterioration. *Biomacromolecules* 2018; 19(4): 1234–1244, <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00077>.