

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТРИБЛОК-СОПОЛИМЕРОВ SIBS В КАРДИОХИРУРГИИ: *IN VITRO* И *IN VIVO* ИССЛЕДОВАНИЕ В СРАВНЕНИИ С ePTFE

М.А. Резцова¹, Е.А. Овчаренко¹, П.А. Никишев^{2, 3}, С.В. Костюк²⁻⁴, Л.В. Антонова¹, Т.Н. Акентьева¹, Т.В. Глушкова¹, Е.Г. Великанова¹, Д.К. Шишкова¹, Е.О. Кривкина¹, К.Ю. Клышников¹, Ю.А. Кудрявцева¹, Л.С. Барбараиш¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация

² Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь

³ Химический факультет Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь

⁴ Институт регенеративной медицины, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация

Протезирование клапанов сердца полимерными конструкциями лепесткового типа в перспективе позволит решить проблемы существующих клапанных заменителей – механических и биологических. **Целью** настоящей работы является комплексная оценка свойств гемосовместимости полимерных материалов на основе синтезированного методом контролируемой катионной полимеризации триблок-сополимера стирола и изобутилена (SIBS) в сравнении с используемым в клинической практике политетрафторэтиленом (ePTFE). **Материалы и методы.** Пленки на основе SIBS изготавливали методом полива из раствора полимера; оценку биосовместимости *in vitro* проводили с использованием клеточных культур, определяя жизнеспособность клеток, клеточную адгезию и пролиферацию; склонность материалов к кальцификации определяли методом ускоренной кальцификации *in vitro*; оценку биосовместимости *in vivo* проводили путем подкожной имплантации образцов крысам; гемосовместимость определяли *ex vivo* по результатам оценки степени гемолиза, агрегации и адгезии тромбоцитов. **Результаты.** Молекулярная масса синтезированного полимера составила 33 000 г/моль с показателем полидисперсности 1,3. При изучении клеточной адгезии не выявлено достоверных отличий ($p = 0,20$) свойств полимера SIBS (588 кл/мм²) от свойств культурального пластика (732 кл/мм²), адгезия клеток для материала ePTFE составила 212 кл/мм². Процент мертвых клеток на образцах SIBS, ePTFE составил соответственно 4,40 и 4,72% ($p = 0,93$), для культурального пластика – 1,16% ($p < 0,05$). Пролиферация клеток на поверхности ePTFE (0,10%) оказалась значимо ниже ($p < 0,05$) тех же параметров для SIBS и культурального пластика (62,04 и 44,00%). Результаты имплантации (60 дней) показали формирование фиброзных капсул со средними толщинами 42 мкм (ePTFE) и 58 мкм (SIBS). Содержание кальция в эксплантированных образцах составило: 0,39 мг/г (SIBS), 1,25 мг/г (ePTFE) и 93,79 мг/г (GA-ксеноперикард) ($p < 0,05$). Уровень гемолиза эритроцитов крови после контакта с SIBS составил 0,35%, ePTFE – 0,40%, что ниже положительного контроля ($p < 0,05$). Максимум агрегации тромбоцитов интактной обогащенной тромбоцитами плазмы крови составил 8,60%, контактировавшей с полимером SIBS – 18,11%, ePTFE – 22,74%. **Заключение.** Исследуемый полимер SIBS при сравнении свойств гемосовместимости не уступает ePTFE и может быть использован в качестве основы при разработке полимерного протеза клапана сердца.

Ключевые слова: полимерный протез клапана сердца, поли(стирол-блок-полиизобутилен-блок-стирол), политетрафторэтилен, гемосовместимость.

Для корреспонденции: Резцова Мария Александровна. Адрес: 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6. Тел. (913) 079-61-40. E-mail: rezvovamaria@mail.ru

For correspondence: Rezvova Maria Alexandrovna. Address: 6, Sosnoviy blvd, 650002, Kemerovo, Russian Federation. Tel. (913) 079-61-40. E-mail: rezvovamaria@mail.ru

THE USE OF SIBS TRIBLOCK COPOLYMERS IN CARDIAC SURGERY: IN VITRO AND IN VIVO STUDIES IN COMPARISON WITH ePTFE

M.A. Rezvova¹, E.A. Ovcharenko¹, P.A. Nikishev^{2, 3}, S.V. Kostyuk^{2, 3, 4}, L.V. Antonova¹, T.N. Akent'eva¹, T.V. Glushkova¹, Y.G. Velikanova¹, D.K. Shishkova¹, E.O. Krivkina¹, K.Yu. Klyshnikov¹, Yu.A. Kudryavtseva¹, L.S. Barbarash¹

¹ Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

² Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

³ Faculty of chemistry of the Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

⁴ Institute of Regenerative Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Sechenovsky University), Moscow, Russian Federation

Prosthetics of heart valves by polymer has the potential to solve the problems of existing valve device – mechanical and biological. **Aim:** to investigate of styrene-isobutylene triblock copolymer (SIBS) biocompatibility synthesized by the controlled cation polymerization method in comparison with the polytetrafluoroethylene (ePTFE) used in clinical practice. **Materials and methods.** SIBS-based films were prepared by casting from a polymer solution; a biocompatibility assessment *in vitro* was performed using cell cultures, determining cell viability, cell adhesion, and proliferation; the resistance of materials to calcification was determined by the method of calcification *in vitro*; an *in vivo* biocompatibility assessment was performed by subcutaneous implantation of the samples to rats; hemocompatibility was determined *ex vivo* by evaluation of the degree of hemolysis, aggregation and platelet adhesion. **Results.** The molecular weight of the synthesized polymer was 33,000 g/mol with a polydispersity index of 1.3. In the study of cell adhesion, there was no significant difference ($p = 0.20$) in the properties of the SIBS polymer (588 cells/mm²) from the properties of the culture plastics (732 cells/mm²), the cell adhesion for the ePTFE material was 212 cells/mm². The percentage of dead cells on SIBS, ePTFE samples, respectively, was 4.40% and 4.72% ($p = 0.93$), for culture plastic – 1.16% ($p < 0.05$). The cell proliferation on the ePTFE surface (0.10%) was significantly lower ($p < 0.05$) than for SIBS and culture plastics (62.04% and 44.00%). Implantation results (60 days) showed the formation of fibrous capsules with average thicknesses: 42 μ m (ePTFE), 58 μ m (SIBS). The calcium content of the explanted samples was 0.39 mg/g (SIBS), 1.25 mg/g (ePTFE) and 93.79 mg/g (GA-xenopericardium) ($p < 0.05$). The hemolysis level of blood red blood cells after contact with SIBS was 0.35%, ePTFE 0.40%, which is below the positive control ($p < 0.05$). The maximum platelet aggregation by intact platelet-enriched plasma was 8.60%, which was in contact with the SIBS polymer – 18.11%, and ePTFE – 22.74%. **Conclusion.** The polymer SIBS when comparing the biocompatibility properties is not inferior to ePTFE and has the potential for use in the development of polymeric prosthetic heart valves new generation.

Keywords: heart valve prosthesis, poly(styrene-*b*-isobutylene-*b*-styrene), polytetrafluoroethylene, hemocompatibility.

ВВЕДЕНИЕ

Основным способом коррекции клапанных пороков в настоящее время является протезирование клапанов сердца. При этом ключевыми требованиями, предъявляемыми к данному типу изделий, являются эффективность функционирования, долговечность без необходимости антикоагулянтной терапии в сочетании с возможностью имплантации пациентам различных возрастных групп [1, 2]. Протезы клапанов сердца – механические с ригидным створчатым аппаратом и биологические на основе ксеноматериалов – используются в клинической практике в течение нескольких десятилетий. В то же время оба типа протезов имеют недостатки: первые – высокую тромбогенность, вторые – огра-

ниченную долговечность в результате деградации ксеноткани [1, 2]. Однако увеличение числа пациентов молодого возраста и продолжительности жизни населения сегодня требуют изменения парадигмы технологии клапанных конструкций и связанных с ними материалов. Створчатый аппарат лепесткового типа на основе эластомерных полимеров имеет перспективы успешного применения в клинической практике и может позволить решить проблему долговечности биопротезов (реоперации), исключить необходимость перманентного приема антикоагулянтов, требующихся при имплантации механических клапанных устройств, и обеспечить гемодинамику, сопоставимую с физиологической [3]. Возможность проектирования створчатого аппарата с заданной структурой и свойствами – еще одно преимущество

изделий на основе синтетических материалов [4, 5]. Кроме того, биостабильные полимерные матрицы привлекательны для использования в тканевой инженерии клапанов сердца [6].

Несмотря на значительное число работ, посвященных поиску подходящих материалов, полимерные клапаны по-прежнему ограниченно используются в клинической практике ввиду высокой степени нестабильности термопластичных эластомеров [7] и связанных с их применением процессов тромбообразования и кальцификации [8]. По этой причине поиск эффективной комбинации свойств биостабильности и гемосовместимости представляет актуальную задачу на пути отождествления полимерного клапана с клинической реальностью. Начиная с 1950-х годов были предприняты попытки использования в качестве основы створчатого аппарата ряда полимеров: полиуретанов [9], силиконов [10], трехмерно-сшитого поливинилового спирта [11], политетрафторэтилена (PTFE и ePTFE) [12, 5], POSS-PCU нанокомпозита [13], триблок-сополимеров стирола и изобутилена (SIBSs) [14] и др., в то же время идеального решения до сих пор не найдено.

Блок-сополимеры на основе стирола и изобутилена представляют особый интерес ввиду их высокой гемосовместимости и биостабильности [15], возможности регулирования свойств за счет вариации длины и структуры полимерных звеньев, относительной легкости процессов их обработки посредством экструзии или литьевого формования, а также значительному опыту использования в медицине [16]. Так, SIBS30 (содержание стирола 30%) производства Innovia является основой современных кардиохирургических стентов, демонстрируя высокую биосовместимость [17]. При этом низкие физико-механические характеристики чистого SIBS30, а также экспериментальные данные о процессах тромбообразования [18] потребовали поиска новых модификаций триблок-сополимера с целью разработки на его основе протеза клапана сердца лепесткового типа, в частности, поверхностного модифицирования и создания композитов с армирующими сетями из более прочных полимеров [19, 20].

В настоящей статье описан процесс синтеза модельного полимера SIBS методом контролируемой катионной полимеризации, исследование свойств гемосовместимости *in vitro* и *in vivo*. Комплексный подход к оценке свойств гемосовместимости представленных полимерных материалов на основе SIBS применяется впервые и особенно важен для адекватного прогнозирования потенциала использования исследуемых полимеров в клапанных конструкциях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез полимера группы SIBS

Стабилизированный стирол («Sigma-Aldrich», США, >99%) обрабатывали 10% раствором KOH, затем промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции, сушили CaCl_2 и дважды перегоняли над CaH_2 при пониженном давлении. Хлористый метилен и *n*-гексан («Экос-1», Россия, х. ч.) обрабатывали концентрированной H_2SO_4 , раствором соды, дистиллированной водой до нейтральной реакции, сушили CaCl_2 , дважды кипятили и перегоняли над CaH_2 . Четыреххлористый титан («Sigma-Aldrich», США, 99,9%) перегоняли над медной стружкой при пониженном давлении. Изобутилен («Sigma-Aldrich», США, >99%) осушали, пропуская через колонку, заполненную хлоридом кальция. 2,6-ди(трет-бутил)пиридин («Sigma-Aldrich», США, 97%), дикумиловый спирт («Aldrich», США, 97%) использовали без предварительной очистки.

Полимеризацию проводили в трехгорлой колбе, предварительно отвакуумированной и заполненной аргоном. В колбу вносили инициатор – свежеприготовленный дикумилхлорид (0,095 ммоль) по методике Kaszas [21]. Затем растворяли в смеси «гексан : хлористый метилен = 3 : 2» и добавляли 0,20 ммоль 2,6-ди(трет-бутил)пиридина, охлаждали до минус 60 °C в спиртовой бане и вносили охлажденный до минус 60 °C изобутилен (34 ммоль). Концентрация мономера составляла 1,0 М. Далее температуру понижали до минус 80 °C и вносили 1,9 ммоль четыреххлористого титана (20-кратный избыток) для начала полимеризации.

Через 25 минут от начала полимеризации вносили 9,2 ммоль предварительно охлажденного стирола (2,0 М раствор в смеси «гексан : хлористый метилен = 3 : 2»). Через 50 минут от начала реакции останавливали внесением 2 мл охлажденного метанола. Полученный образец дважды осаждали в 10-кратный избыток охлажденного этанола. Осажденный образец отделяли центрифугированием, промывали небольшим количеством этанола и сушили в вакууме при 55–60 °C/2 мм рт. ст. до прекращения изменения массы.

Гель-проникающая хроматография

Молекулярно-массовые характеристики полученных блок-сополимеров, эффективность блокообразования определяли методом гель-проникающей хроматографии на приборе Ultimate 3000, снабженным предколонкой PLgel (7,5×50 мм, размер частиц 5 мкм), колонкой PLgel MIXED-C (7,5×300 мм, размер частиц 5 мкм) с рефрактометрическим и УФ-детекторами (Thermo Fisher Scientific, Германия). В качестве растворителя использовали тетрагидрофуран, скорость элюирования составила 1 мл/мин при тем-

пературе колонки 30 °С. Значение среднечисловой молекулярной массы (M_n) и полидисперсности (M_w/M_n) полимеров рассчитывали с использованием программного пакета Chromeleon 7.0 (Thermo Scientific Dionex, Германия) по кривым элюирования, основываясь на калибровочных зависимостях, полученных с применением полистирольных стандартов (Agilent EasiCal) с $M_w/M_n \leq 1,05$.

Изготовление полимерных пленок

Полимерные пленки были получены методом полива из раствора полимера в хлороформе (в соотношении 1,6 г вещества на 8 мл растворителя) на стеклянную поверхность. Площадь полученных образцов составила 21 см². Формирование пленок проводили при температуре 25 °С в течение одного часа и затем при нагревании до 35 °С в течение трех часов при атмосферном давлении и влажности воздуха 50%. Дополнительно образцы высушивали с использованием вакуумной сушилки настольной FREEZONE 2.5 (LABCONCO, USA) при температуре -40 °С и давлении <0,133 мбар.

Оценка цитотоксичности *in vitro* с использованием клеточных культур

Эксперимент проведен с использованием клеточной линии Ea.hy 926 – гибридомы эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) и клеток карциномы легкого человека (клетки предоставлены доктором Cora-Jean S. Edgell, University of North Carolina, USA), что позволяет клеточной линии воспроизводить основные фенотипические и функциональные характеристики эндотелиальных клеток микрососудов человека. В качестве группы сравнения был использован материал сосудистого протеза из ePTFE марки Gore-tex (Gore & Associates, Inc, США), в качестве контроля – культуральный пластик.

Стерильные образцы ($n = 3$ для каждой группы; стерилизация этиленоксидом) с помощью 0,6% раствора агарозы (Helicon, Россия) фиксировали на дно стерильных 24-луночных культуральных планшетов. На полимерные образцы вносили по $2,0 \times 10^5$ клеток и культивировали в течение 5 суток в среде DME/F12 (Sigma Aldrich, США), содержащей 1% HEPES буфера (Hyclone, США), 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Sigma Aldrich, США), 1% L-глутамина, 100 ед/мл пенициллина, 0,1 мкг/мл стрептомицина, 0,1 мкг/мл амфотерицина В, Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine (HAT) (Sigma Aldrich, США) при температуре 37 °С и 5% CO₂. Смену среды проводили 1 раз в 2 дня. Абсолютное количество клеток на 1 мм² поверхности и относительное содержание погибших клеток оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии (Axio Observer Z1, Carl Zeiss, Германия). С этой целью за 30 мин до микроскопического

исследования добавляли ядерные флуоресцентные красители Hoechst 33342 (Molecular Probes, США) в количестве 2 мкг/мл и бромистый этидий (EtBr) (AppliChem, Испания) в концентрации 0,03 мг/мл (оранжевое окрашивание ядер погибших клеток). Для подготовки образцов к микроскопии их отделяли от агарозы и переносили в стерильный 24-луночный планшет клетками вниз. Подсчет количества клеток проводился в 5 различных полях зрения при увеличении $\times 200$ с последующим пересчетом на 1 мм² изучаемой поверхности. Относительное количество погибших клеток определяли из расчета соотношения абсолютного количества погибших клеток на 1 мм² поверхности к абсолютному количеству клеток на 1 мм².

Оценка клеточной пролиферации проведена на стерильных образцах ($n = 3$ для каждой группы) с использованием набора для изучения пролиферации Click-iT Plus EdU Imaging Kits (Molecular probes, США): ядра всех клеток окрашиваются ядерным красителем DAPI в синий цвет, а ядра пролиферирующих клеток окрашиваются флуоресцентным красителем Alexa Fluor 488 в зеленый цвет. Когда идет синтез ДНК, тимидин встраивается в ДНК, и обладая сродством с Alexa Fluor 488, позволяет избирательно детектировать синтезируемую ДНК, что выражается в зеленой флуоресценции ядер. Флуоресцентная микроскопия была выполнена на лазерном сканирующем микроскопе LSM 700 (Carl Zeiss, Германия). Относительное количество пролиферирующих клеток определяли из расчета соотношения абсолютного количества пролиферирующих клеток на 1 мм² поверхности к абсолютному количеству клеток на 1 мм² поверхности.

Определение кальцификации *in vitro*

Устойчивость к кальцификации определяли методом ускоренной кальцификации *in vitro*. Образцы размером 5×5 мм ($n = 5$ для каждой группы) помещали в 2 мл раствора на основе питательной среды DMEM (Sigma, США) и сыворотки альбумина (FBS, Sigma, США), содержащего CaCl₂ и Na₂HPO₄, и выдерживали в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С и концентрации углекислого газа 5%. Степень кальцификации оценивали после третьей и шестой недели инкубации. В качестве группы сравнения был использован материал сосудистого протеза из ePTFE марки Gore-tex (Gore & Associates, Inc, США), в качестве положительного контроля был выбран ксеноперикард крупного рогатого скота (КРС), консервированный по стандартной методике глутаровым альдегидом (GA) (ЗАО «НеоКор», Россия). Криосрезы биоматериала и полимерных образцов окрашивали на присутствие кальция ализариновым красным С («Реахим», Россия) и анализировали с

использованием микроскопа AXIO Imager A1 (Carl Zeiss, Германия).

Оценка биосовместимости *in vivo*

Ответная реакция ткани

Исследование воспалительной реакции и кальцификации *in vivo* проводили путем подкожной имплантации образцов размером 5×5 мм крысам-самцам субпопуляции Wistar (вес 55–70 г) на срок наблюдения 2 недели (оценка ответной реакции тканей, $n = 5$) и 2 месяца (оценка ответной реакции тканей, $n = 5$, степени кальцификации, $n = 5$). После окончания эксперимента часть образцов пленок биоптировали вместе с окружающими тканями, фиксировали в 4% растворе нейтрального формалина («Мини-Мед», Россия) с последующим заключением в парафин («Биовитрум», Россия). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином («Биовитрум», Россия), по Ван-Гизону смесью кислого фуксина и пикриновой кислоты («Биовитрум», Россия) и ализариновым красным С («Реахим», Россия), изучали на световом микроскопе AXIO Imager A1 (Carl Zeiss, Германия).

Анализ воспалительной реакции проводили согласно ISO 10993-6:2016 с применением полуколичественной системы оценки, для чего осуществляли подсчет количества очагов неоваскуляризации в пяти полях зрения для каждого животного при увеличении ×400. Ответную реакцию также оценивали исходя из толщины фиброзной капсулы (среднее значение 10 равномерно распределенных измерений ширины капсул, взятых по всей плотной ткани, ближайшей к имплантату), жирового инфильтрата и количества лимфатических узлов.

Кальцификация *in vivo*

Другую часть образцов с целью оценки количественного содержания кальция подвергали гидролизу, для чего помещали в 0,5 мл 50% хлорной кислоты и выдерживали при 150 °С до получения прозрачного раствора (ePTFE гидролизу не подвергался, при этом в раствор переходили сформировавшиеся в процессе эксперимента кальцификаты). Остывшие пробы разбавляли дистиллированной водой и оценивали содержание кальция методом оптико-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой на спектрометре iCAP 6500 DUO (Thermo Scientific, США).

В качестве групп сравнения был использован материал сосудистого протеза из ePTFE марки Gore-tex (Gore & Associates, Inc, США), в качестве положительного контроля – ксеноперикард КРС, консервированный по стандартной методике глутаровым альдегидом (GA) (ЗАО «НеоКор», Россия).

Оценка гемосовместимости *in vitro*

Степень гемолиза

Исследование выполнено в соответствии с требованиями стандарта ISO 10993-4:2017. Для оценки степени гемолиза эритроцитов использовали свежую донорскую кровь с добавлением 3,8% раствора цитрата натрия в соотношении 1 : 9 (цитрат : кровь). Исследуемые образцы размером 25 см² ($n = 5$ для каждого типа материала) помещали в бюксы, добавляли по 10 мл физиологического раствора и ставили в термостат при 37 °С на 120 мин. В качестве отрицательного и положительного контролей для оценки степени гемолиза эритроцитов были использованы физиологический раствор и дистиллированная вода соответственно. После этого в каждый бюкс добавляли по 200 мкл цитратной крови, перемешивали и вновь выдерживали в термостате при 37 °С в течение 60 мин. После инкубации производили отбор раствора из бюксов в пробирки с последующим центрифугированием в течение 10 минут при 2800 об/мин для осаждения эритроцитов. Измерение оптической плотности полученных растворов проводили при длине волны 545 нм на спектрофотометре GENESYS 6 (Thermo Scientific, США).

Степень гемолиза (H) в % определяли по формуле:

$$H = \frac{D_t - D_{ne}}{D_{pe} - D_{ne}} \times 100\%,$$

где D_t – оптическая плотность пробы, инкубируемой с исследуемым полимером; D_{ne} – оптическая плотность положительного контроля; D_{pe} – оптическая плотность пробы после 100% гемолиза.

За полное отсутствие гемолиза принимали среднее арифметическое значение показателя оптической плотности при измерении положительного контроля (физиологического раствора с цитратной кровью), за 100% гемолиз принимали среднее арифметическое значение оптической плотности прибора при измерении дистиллированной воды с цитратной кровью. Группами сравнения служили ePTFE марки Gore-tex (Gore & Associates, Inc, США) и Polyethylene (LDPE) ERM – EC590 (Merck, Германия).

Агрегация тромбоцитов

Исследование выполнено в соответствии со стандартом ISO 10993-4:2017. Для исследования использовали свежую донорскую кровь с добавлением цитрата натрия 3,8%, в соотношении 1 : 9 (цитрат : кровь). Для получения обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) цитратную кровь центрифугировали при температуре 25 °С в течение 10 минут при 1000 об/мин. Бедную тромбоцитами плазму (БТП) получали центрифугированием цитратной крови в течение 20 минут при комнатной температуре и при скорости вращения 4000 об/мин, которую

использовали для калибровки прибора. В качестве контроля была использована интактная обогащенная тромбоцитами плазма. В качестве группы сравнения высоких показателей агрегации тромбоцитов крови использовали Polyethylene (LDPE) ERM – EC590 (Merck, Германия).

Измерения проводили без индукторов агрегации в спонтанном режиме. В настоящем исследовании использовали полуавтоматический 4-канальный анализатор агрегации тромбоцитов (фотометр) «АРАСТ 4004» (LABiТес, Германия). Для инициации спонтанной агрегации в цитратной крови производили восстановление уровня ионов Ca^{2+} , в качестве реагента использовали приготовленный раствор CaCl_2 с молярной концентрацией 0,25 М. Соотношение пробы и реагента составило 250 мкл ОТП + 25 мкл CaCl_2 . Время контакта исследуемых образцов с ОТП составило 3 минуты.

Адгезия тромбоцитов

Для исследования использовали обогащенную тромбоцитами плазму, полученную из свежей цитратной донорской крови центрифугированием в течение 10 мин при 1000 об/мин. Группами сравнения служили ePTFE марки Gore-tex (Gore & Associates, Inc, США) и Polyethylene (LDPE) ERM – EC590 (Merck, Германия).

Образцы размером 1 см² инкубировали с 500 мкл ОТП при 37 °С в течение 2 ч, затем осторожно промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) для удаления неадсорбированных компонентов плазмы. После образцы фиксировали в 2% растворе глутаральдегида, приготовленного на 0,1 М фосфатном буфере в течение 6 ч. Далее производили обезвоживание образцов в серии спиртов восходящей концентрации (50, 75, 95 и 100%) в течение 15 минут в каждом. Оценку степени адгезии тромбоцитов осуществляли с помощью сканирующего электронного

микроскопа S3400N (Hitachi, Япония). Адгезивную способность поверхности материалов оценивали в 8 полях зрения, выбранных случайным образом, как индекс деформации тромбоцитов, который рассчитывали по формуле:

Индекс деформации = (число тромбоцитов степени I × 1 + число тромбоцитов степени II × 2 + число тромбоцитов степени III × 3 + число тромбоцитов степени IV × 4 + число тромбоцитов степени V × 5) / общее количество тромбоцитов (табл. 1).

Статистическая обработка

Обработку количественных данных осуществляли общепринятыми методами статистики при помощи пакета прикладной программы для обработки медицинской и биологической информации «STATISTICA 6.0» (StatSoft, Inc., USA). Характер распределения в выборках оценивали при помощи критерия Колмогорова–Смирнова. В группах наблюдали распределение, отличное от нормального ($p < 0,01$), в связи с чем все данные представлены как медианы (М) и квартили (25 и 75%). Статистическую значимость различий между двумя независимыми группами оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни, достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Синтез полимера SIBS

Поли(стирол-блок-изобутилен-блок-стирол), полученный по методу последовательного внесения мономеров в контролируемой катионной полимеризации, характеризуется среднечисловой молекулярной массой в 33 000 г/моль и показателем полидисперсности 1,3. Структура полимера подтверждена данными гель-проникающей хроматографии.

Оценка цитотоксичности *in vitro* с использованием клеточных культур

При изучении клеточной адгезии (рис. 1) не выявлено достоверных отличий ($p = 0,20$) свойств полимера SIBS (588 кл/мм²) от свойств культурального пластика (732 кл/мм²), который считается «золотым стандартом» для клеточной адгезии *in vitro*, при этом абсолютное количество адгезированных клеток для материала ePTFE (212 кл/мм²) оказалось в 3 раза меньше, чем для полимера SIBS ($p < 0,001$).

Относительное количество жизнеспособных клеток Ea.hy 926 на разных полимерных образцах (рис. 1, б) достоверно не различалось ($p = 0,56$). Соответственно, такая же ситуация складывалась и с относительным количеством мертвых клеток. На исследуемых полимерных образцах (SIBS, ePTFE) число мертвых клеток не различалось между собой ($p =$

Таблица 1

Степени деформации тромбоцитов
The platelet activation levels

Степень	Характеристика
I	Тромбоцит дискообразной формы, без деформации
II	Тромбоцит увеличен в размере с зачатками псевдоподий в виде выпячиваний (начальная стадия деформации)
III	Тромбоцит значительно увеличен в размере, неправильной формы, с ярко выраженными псевдоподиями, тромбоциты скапливаются
IV	Распластывание тромбоцита, цитоплазма распространяется между псевдоподиями
V	Тромбоцит в виде пятна с гранулами, за счет распространения цитоплазмы псевдоподии не могут быть идентифицированы

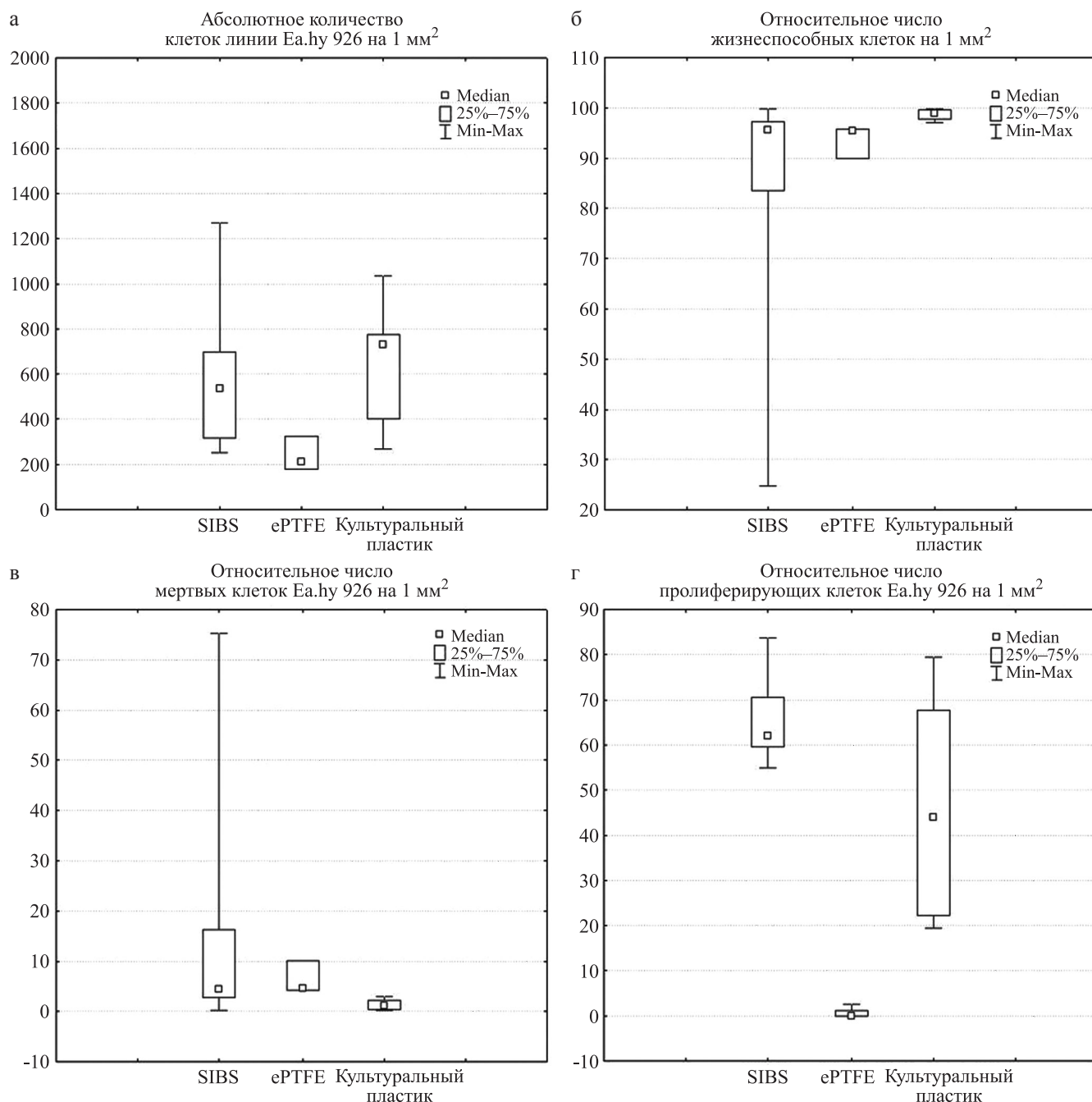


Рис. 1. Абсолютное количество клеток (а), относительное количество живых клеток (б), относительное количество мертвых клеток (в), относительное количество пролиферирующих клеток (г) Ea.hy 926 на различных полимерных поверхностях через 5 суток культивирования

Fig. 1. The absolute number of cells (a), the relative number of living cells (б), the relative number of dead cells (в), the relative amount of proliferating cells (г) Ea.hy 926 on different polymeric surfaces after 5 days of cultivation

0,93) и составило соответственно 4,40 и 4,72%, в то же время для культурального пластика данный параметр имел значение 1,16%, что оказалось в 4 раза ниже (рис. 1, в), чем на поверхностях материалов SIBS и ePTFE ($p < 0,05$).

Однако крайне низкая пролиферация клеток на поверхности ePTFE (0,10%) доказала невозможность клеточной адгезии и пролиферации на данном материале (рис. 1, г). Как видно из рис. 2, максимальная

пролиферативная активность клеток линии Ea.hy 926 выявлена на поверхности полимера SIBS (62,04%), что оказалось в 1,4 раза выше, чем на культуральном пластике (44,00%), ($p < 0,05$).

Определение кальцификации *in vitro*

В результате исследования была обнаружена резистентность к кальцификации полимерных материалов SIBS, ePTFE (рис. 3, б, в) в условиях *in vitro*

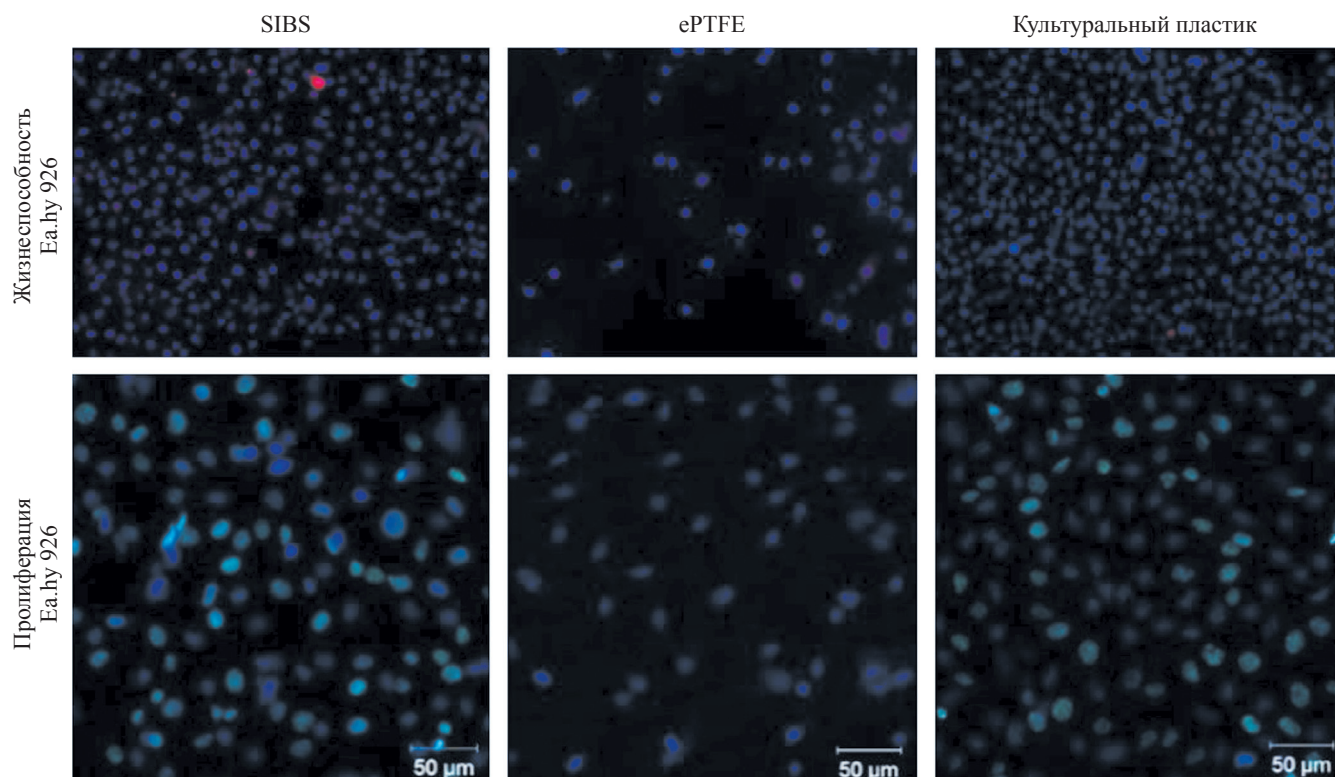


Рис. 2. Флюоресцентная микроскопия матриц с клетками. $\times 200$

Fig. 2. Fluorescence microscopy of matrices with cells. $\times 200$

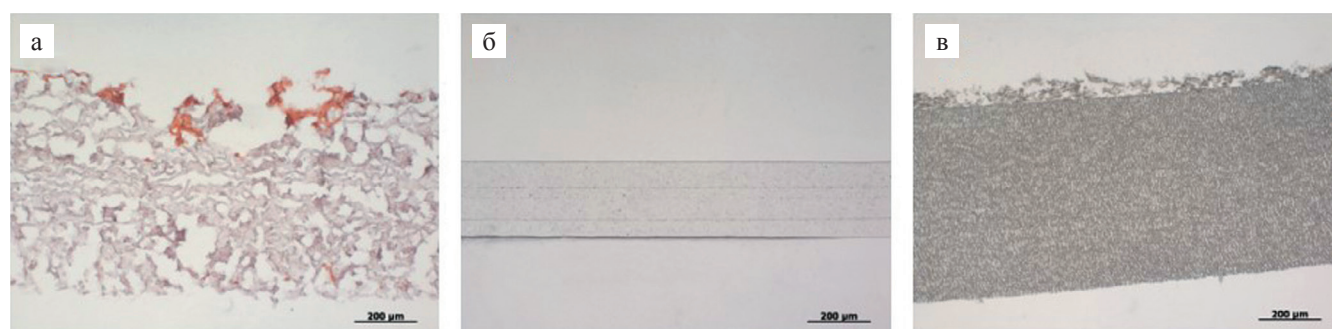


Рис. 3. Световая микроскопия, тест на кальцификацию *in vitro*, 6 недель инкубации; образцы материалов: GA-консервированный перикард крупного рогатого скота (а), SIBS (б), ePTFE (в). $\times 100$

Fig. 3. Light microscopy, *in vitro* calcification test, 6 weeks of incubation; samples of materials: GA-preserved bovine pericardium (а), SIBS (б), ePTFE (в). $\times 100$

теста, в отличие от образцов биологической ткани, минерализация которых наступала уже к 3-й неделе инкубации и становилась чуть более выраженной к 6-й неделе (рис. 3, а).

Оценка биосовместимости *in vivo*

Ответная реакция ткани

После 14 дней имплантации была обнаружена умеренная макрофагальная реакция ткани на имплантированные материалы, отсутствие гигантских клеток, что демонстрирует хорошую биосовместимость исследуемых полимеров (рис. 4, а–в). Присутствие лимфатических узлов в окружающей имплан-

таты ткани было отмечено для всех типов полимеров, что указывает на течение воспалительного процесса, при этом для образца SIBS наблюдали минимальное количество. Гистологические исследования показали формирование рыхлой волокнистой ткани, предшествующей образованию соединительно-тканной капсулы, охватывающей полимерные образцы со средней толщиной 69 мкм (ePTFE), 50 мкм (GA-ксеноперикард) и 98 мкм (SIBS). При этом в случае биологических образцов наблюдали жировой инфильтрат, связанный с коллагеновыми волокнами. Степень неоваскуляризации была сравнимой для всех типов материалов – минимальная капиллярная пролифера-

ция, 1–3 очага неоваскуляризации с фибробластными структурами в поле зрения (ув. $\times 400$). В случае биологических образцов и ePTFE (за счет его пористой структуры) была отмечена клеточная инфильтрация, особенно активная для GA-ксеноперикарда.

Долгосрочная имплантация (60 дней) привела к образованию плотной соединительно-тканной капсулы, представленной коллагеновыми волокнами, со средней толщиной 42 мкм для ePTFE и 58 мкм для SIBS (рис. 4, д, е). В случае GA-ксеноперикарда капсула четко не визуализировалась ввиду активного воспалительного процесса, причиной которого явилась значительная кальцификация. Присутствие гигантских клеток инородного тела после двух месяцев имплантации было отмечено для полимерного образца ePTFE и GA-ксеноперикарда, в случае SIBS гигантских клеток инородного тела обнаружено не было.

С позиции полуколичественной оценки (ISO 10993-6:2016), основанной на анализе показателей ответной реакции ткани (неоваскуляризация, фиброз, жировой инфильтрат), полимер SIBS можно отнести к биосовместимым относительно образцов сравнения (ePTFE, консервированный ксеноперикард, использующиеся сегодня в клинической практике протезирования клапанов сердца).

Кальцификация *in vivo*

Еще одним критерием биосовместимости является степень кальцификации материала в условиях контакта со средой организма. Гистологические исследования показали активную кальцификацию GA-ксеноперикарда (рис. 4, ж). Присутствие кальцификатов в случае ePTFE было обнаружено на поверхности полимерного образца (рис. 4, и). Точечные участки кристаллического кальция отмечены в толще

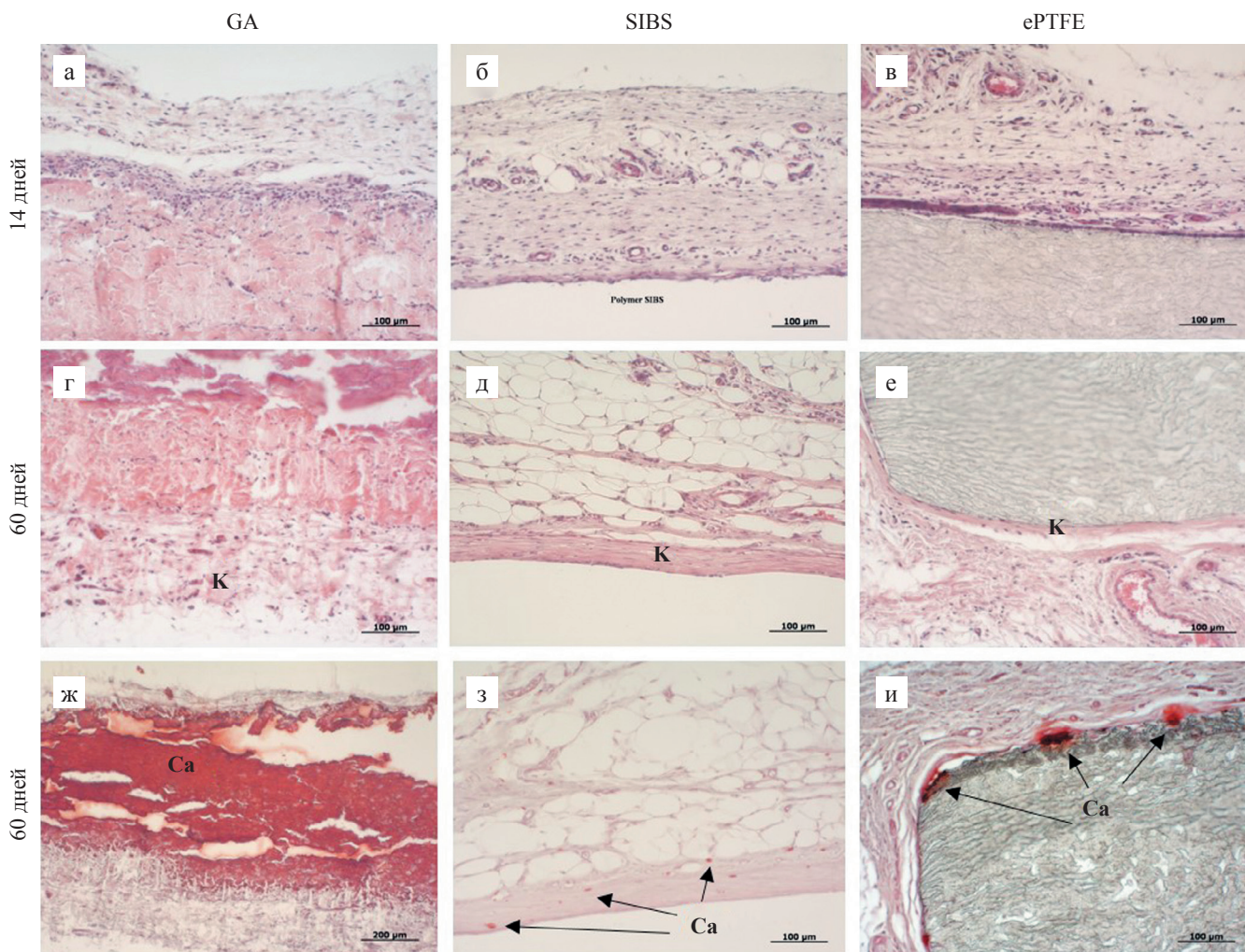


Рис. 4. Гистологические срезы полимерных матриксов GA-ксеноперикарда (а, г, ж), SIBS (б, д, з), ePTFE (в, е, и), после имплантации крысам на срок 2 недели (а, б, в), 2 месяца (г, д, е). Окраска гематоксилин-эозином (а–е), ализариновым красным С (ж–и). $\times 200$

Fig. 4. Histological sections of GA-xenopericardium (a, g, zh), SIBS (b, d, z), ePTFE (v, e, i), after implantation to rats for 2 weeks (a, b, v), 2 months (g, d, e). Staining with hematoxylin-eosin (a–e), coloring with alizarin red C (zh–i). $\times 200$

соединительно-тканной капсулы, образованной вокруг SIBS.

Результаты количественной оценки показали статистически значимые различия в содержании кальция образцов SIBS и ePTFE ($p < 0,05$). Также обнаружено значимое увеличение количества кальция в образцах GA-ксеноперикарда ($p < 0,05$). Полное описание результатов представлено в табл. 2.

Таблица 2

Количество кальция в образцах (мг/г)

Calcium content in the samples (mg/g)

	Min	25%	Me	75%	Max
SIBS	0,23	0,23	0,39	0,51	0,55
ePTFE	0,49	0,53	1,25	2,70	2,95
GA-ксеноперикард	1,77	2,57	93,79	155,30	159,80

Оценка гемосовместимости *in vitro*

Степень гемолиза

Результаты проведенного исследования показали отсутствие отрицательного влияния полимера SIBS на клеточную мембрану эритроцитов. Так, уровень гемолиза эритроцитов крови после контакта с SIBS составил 0,35% (min: 0,03; max: 0,60; 25%: 0,11; 75%: 0,40), что статистически меньше в сравнении с отрицательным контролем ($p < 0,05$).

При оценке степени лизиса эритроцитов после контакта с полимером на основе ePTFE уровень гемолиза составил 0,40% (min: 0,11; max: 2,40; 25%: 0,31; 75%: 0,67), что также статистически значимо ниже по сравнению с положительным контролем ($p < 0,05$). Уровень гемолиза эритроцитов после контакта с полиэтиленом составил 1,82% (min: 1,16; max: 2,30; 25%: 1,41; 75%: 2,10). При сравнении двух групп полимеров (SIBS и ePTFE) между собой по степени выраженности гемолиза достоверных различий выявлено не было ($p = 0,57$). При сравнении двух групп полимеров (SIBS и ePTFE) с полиэтиленом были получены достоверные отличия ($p < 0,05$).

Агрегация тромбоцитов

Максимум агрегации тромбоцитов интактной обогащенной тромбоцитами плазмы составил 8,60% (min: 7,79%; max: 15,91%; 25%: 8,02; 75%: 10,12%). При этом образцы обогащенной тромбоцитами плазмы, контактировавшие с полиэтиленом, показали степень агрегации тромбоцитов на уровне 73,40% (min: 67,73%; max: 82,74%; 25%: 72,35; 75%: 78,99%). При оценке степени агрегации тромбоцитов после контакта с полимерами SIBS и ePTFE были получены следующие результаты: максимум агрегации после контакта с полимером SIBS составил 18,11% (min: 16,40%; max: 23,78%; 25%: 16,66; 75%: 20,42%); максимум агрегации тромбоцитов после контакта

с ePTFE – 22,74% (min: 18,6%; max: 28,56%; 25%: 22,45; 75%: 24,52%), что статистически значимо ниже максимума агрегации, индуцированного полиэтиленом ($p < 0,05$).

Адгезия тромбоцитов

Тромбоциты, адгезированные на поверхности, были выявлены для всех исследуемых материалов (рис. 5). Стоит отметить, что на одном из образцов SIBS отмечены отдельные участки с нехарактерным скоплением тромбоцитов III типа, расположенные направленно в центральной части образца.

При подсчете индекса деформации тромбоцитов, адгезированных на поверхности полимеров, были получены следующие показатели: индекс деформации тромбоцитов, адгезированных на поверхности полиэтилена, был равен 3,61 (min: 2,0; max: 4,25; 25%: 2,82; 75%: 4,0). Для полиэтилена были более свойственны тромбоциты IV типа, что составило 61,29% от общего количества адгезированных тромбоцитов. Индекс деформации тромбоцитов, адгезированных на поверхности полимера SIBS, составил 3,25 (min: 2,1; max: 4,0; 25%: 3,06; 75%: 3,69). На поверхности SIBS были обнаружены тромбоциты преимущественно II–III типа, что в процентном соотношении от общего количества адгезированных тромбоцитов составляет 61,63 и 8,4% соответственно. Индекс деформации тромбоцитов, адгезированных на поверхности ePTFE, составил 3,76 (min: 3,0; max: 4,09; 25%: 3,29; 75%: 3,96). Для поверхности ePTFE были более свойственны тромбоциты III и IV типа, что составляет 41,54 и 26,76% соответственно.

При сравнении индексов деформации тромбоцитов, адгезированных на поверхности полимеров SIBS и ePTFE, с полиэтиленом статистически значимых различий не было выявлено ($p = 0,54$ и $p = 0,72$ соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Широкое применение в медицинской практике сегодня находят сополимеры и композиты благодаря своим уникальным свойствам, основанным на способности сочетать структурные фрагменты различной функциональности. В частности, блок-сополимеры стирола и изобутилена обладают термопластичностью, высокой прочностью, устойчивы к гидролитическому, окислительному и ферментативному воздействию ввиду линейной природы углеродной цепи с чередующимися вторичными и четвертичными атомами углерода, а также биологической инертности боковых групп (рис. 6) [15].

Оценка цитотоксичности пленок на основе синтезированного методом контролируемой катионной полимеризации модельного полимера группы SIBS показала его высокую гемосовместимость. Пролифе-

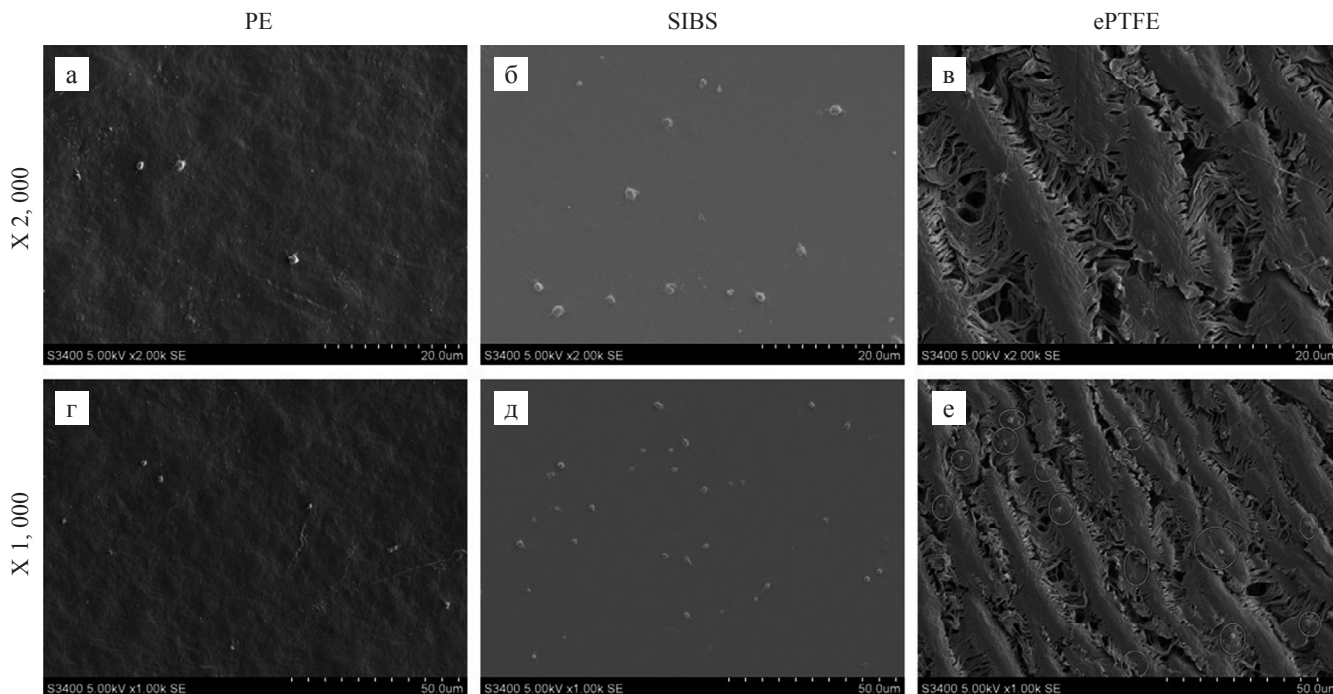


Рис. 5. Изображения СЭМ адгезии тромбоцитов на поверхности полимерных матриц из полиэтилена (а, г), SIBS (б, д) и ePTFE (в, е)

Fig. 5. SEM images of platelet adhesion on the surface of polymer matrices of polyethylene (а, г), SIBS (б, д) and ePTFE (в, е)

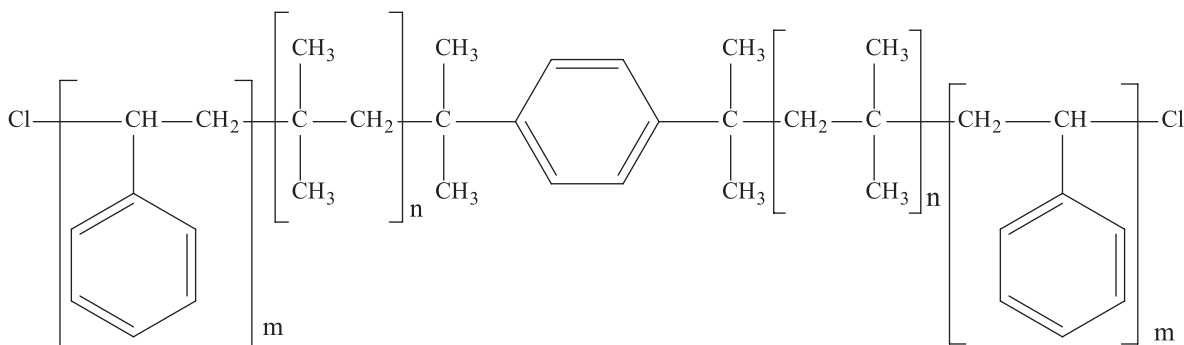


Рис. 6. Структурная формула поли(стирол-блок-полиизобутилен-блок-стирол)а

Fig. 6. The structural formula of poly(styrene-block-polyisobutylene-block-styrene)

ративный потенциал может дополнить картину функциональной активности клеток в случае проведения краткосрочных экспериментов, в которых полная динамика по изменению клеточной жизнеспособности не всегда успевает достичь своего максимума. В проведенных экспериментах была показана низкая способность к клеточной адгезии поверхности материала ePTFE, что коррелирует с результатами других исследований [22]. Способность к клеточной адгезии и пролиферации важна в тканевой инженерии клапанов сердца [6]. Учитывая полученные в ходе эксперимента результаты, можно сделать вывод о том, что полимер группы SIBS имеет большую способность к спонтанной эндотелизации и большой

потенциал при разработке тканеинженерных конструкций, чем ePTFE.

Имплантация любого инородного материала неизбежно сопровождается ответной реакцией организма, при этом формирование устойчивой соединительно-тканной (фиброзной) капсулы свидетельствует о завершении воспалительного процесса. Толщина фиброзной капсулы характеризует степень биосовместимости исследуемого материала и для образца SIBS после 60 дней эксперимента оказалась незначительно больше, чем аналогичное значение для образца ePTFE, что сопоставимо с результатами других экспериментов [17]. Образование соединительной ткани на створчатом аппарате имплантируемого протеза создает защитный барьер, отделяя

синтетический материал имплантата от среды организма, в то же время данный процесс необходим для образования плотного соединения с корнем аорты с целью предотвращения паравальвулярной регургитации и надежной фиксации имплантата. Гигантские клетки инородного тела, отмеченные для эксплантационных образцов ePTFE и GA-ксеноперикарда, способны секретировать активные формы кислорода и другие химические агенты, потенциально приводящие к окислительному повреждению и разрушению имплантированных устройств [23], при этом для материала SIBS клеток данного типа после 60 дней эксперимента обнаружено не было. Вероятнее всего, биосовместимость SIBS связана с тем, что наружная часть полимера (10 нм) представлена полиизобутиленовым блоком, в то время как полистирольные блоки расположены внутри полимерного образца и не находятся в непосредственном контакте с биологическими тканями [24].

Основной причиной аортального стеноза нативных клапанов и биопротезов является кальцификация – инициирование и рост кристаллов фосфата кальция, необходимых для костной ткани, в нетипичных локациях. Полимеры в отличие от ксеноматериалов не содержат богатый фосфором клеточный мусор и разрушенный коллаген, которые могут провоцировать минерализацию, вследствие чего более резистентны к данному процессу. На основании полученных в ходе *in vitro* эксперимента результатов можно судить об отсутствии провоцирующих образование кристаллических форм кальция характеристик исследуемых полимеров. При этом активная кальцификация GA-ксеноперикарда подтверждает данные проведенных ранее исследований [25].

Склонность к кальцификации исследуемых материалов также была оценена на модели *in vivo* при имплантации крысам. Результаты количественного содержания кальция для GA-ксеноперикарда, выбранного в качестве положительного контроля, соответствуют литературным данным [26] и значимо превышают те же значения для исследуемых полимеров. Выделяют два механизма минерализации, возникающей в результате контакта со средой организма синтетического материала: зарождение кальций-фосфатных кристаллов на поверхности или на границе раздела соединительно-тканной капсулы и имплантата; и кальцификацию биологической ткани, сформированной вокруг имплантата [27]. В случае материала группы сравнения, ePTFE, наблюдали первый тип минерализации: кальцификаты располагались на поверхности образца; в то время, как в случае материала SIBS кальций обнаружен в фиброзной капсуле. Резистентность к кальцификации полимера SIBS оказалась значимо выше по сравнению с ePTFE по результатам количественной оценки, что свидетельствует о возможности применения SIBS

в качестве основы синтетического протеза клапана сердца. В литературе также присутствуют сведения о склонности материалов из ePTFE к минерализации в клинических экспериментах [8]. Большая склонность ePTFE к кальцификации может быть обусловлена пористой структурой его поверхности, в результате чего происходит накопление клеточных элементов и вновь сформированного внеклеточного матрикса.

При оценке степени гемолиза эритроцитов, индуцированного поверхностью полимера SIBS, было выявлено отсутствие токсического действия полимера на форменные элементы крови (эритроциты). Также полимер ePTFE, который выступал в качестве группы сравнения, не вызывал разрушения клеточной мембраны эритроцитов. При этом уровень гемолиза эритроцитов после контакта с полиэтиленом составил 1,82%, что свидетельствует о его склонности к тромбообразованию. Согласно результатам оценки гемолиза эритроцитов, исследуемые полимеры SIBS и ePTFE можно считать гемосовместимыми, поскольку уровень гемолиза эритроцитов после контакта с поверхностью полимеров SIBS и ePTFE не превышал 0,4% при допустимых показателях степени гемолиза до 2% [28]. Полученные нами данные согласуются с результатами зарубежных авторов [29].

Адгезия тромбоцитов происходит в результате разной заряженности их поверхности и поверхности контактирующих с кровью материалов и является начальным этапом формирования тромба, однако одной адгезии недостаточно для запуска каскада тромбогенных реакций. Только активированные тромбоциты способны выделять в кровь вещества, способные привести к необратимой агрегации. Адгезия тромбоцитов, имеющих правильную круглую форму, которые еще не деформировались, не несет тромбогенной опасности, поскольку адсорбция тромбоцитов I степени является обратимой и их можно легко вернуть в кровоток [30]. Полученные нами результаты по оценке адгезионных свойств показали, что тромбоциты адгезируются на все полимеры, независимо от их вида. Возможно, это связано с разностью потенциалов поверхности полимеров и тромбоцитов [31].

В результате исследования влияния поверхности полимеров на степень агрегации тромбоцитов было выявлено, что полимеры SIBS и ePTFE не вызывают повышения агрегации тромбоцитов крови, в отличие от полиэтилена. На основании полученных данных о высокой степени агрегации крови после контакта с полиэтиленом можно предположить, что данный полимер содержит низкомолекулярные примеси, которые оказывают раздражающее действие на тромбоциты крови, что, в свою очередь, приводит к их активации и высвобождению индукторов агрегации, в то время как SIBS и ePTFE подобных примесей не содержат.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированный модельный полимер группы SIBS при сравнении свойств гемосовместимости не уступает используемому в настоящее время в клинической практике в качестве материала для протезирования клапанов сердца ePTFE. При этом эксперименты по определению степени кальцификации, клеточной адгезии и пролиферации продемонстрировали преимущества исследуемого полимера группы SIBS. Таким образом, можно сделать вывод о потенциале материала SIBS при разработке полимерных протезов клапанов сердца нового поколения. При этом дополнительное модифицирование поверхности полимерного материала с целью увеличения гидрофильности позволит снизить его адгезионные свойства. Повышение гемосовместимости модельного полимера возможно также за счет модифицирования различными веществами с антитромботическим действием, в частности гепарином.

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2015-0011 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов», а также при поддержке субсидии по программе 5-100.

This study was supported by the Complex Program of Basic Research under the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences within the Basic Research Topic of Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases No 0546-2015-0011 «Pathogenetic basis for the development of cardiovascular implants from biocompatible materials using patient-oriented approach, mathematical modeling, tissue engineering, and genomic predictors», also the study was supported by 5-100 program.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Manji RA, Ekser B, Menkis AH, Cooper DKC. Bioprosthetic heart valves of the future. *Xenotransplantation*. 2014; 21 (1): 1–10. doi: 10.1111/xen.12080. PMID: PMC4890621.
- Jaffer IH, Whitlock RP. A mechanical heart valve is the best choice. *Heart Asia*. 2016; 8 (1): 62–64. doi: 10.1136/heartasia-2015-010660. PMID: PMC4898622.
- Chambers J. Prosthetic heart valves. *Int J Clin Pract*. 2014; 68 (10): 1227–1230. doi: 10.1111/ijcp.12309. PMID: 24423099.
- Smith M, Cantwell WJ, Guan Z, Tsopanos S, Theobald MD, Nurick GN et al. The quasi-static and blast response of steel lattice structures. *Journal of Sandwich Structures and Materials*. 2011; 13 (4): 479–501. doi: 10.1177/1099636210388983.
- Hawreliak JA, Lind J, Maddox B, Barham M, Messner M, Barton N et al. Dynamic Behavior of Engineered Lattice Materials. *Sci Rep*. 2016; 6: 28094. doi: 10.1038/srep28094. PubMed PMID: 27321697. PubMed Central PMCID: PMC4913358.
- Hasan A, Ragaert K, Swieszkowski W, Selimovic S, Paul A, Camci-Unal G et al. Biomechanical properties of native and tissue engineered heart valve constructs. *Journal of Biomechanics*. 2014; 47: 1949–1963. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2013.09.023.
- Базылев ВВ, Воеводин АБ, Раджабов ДА, Россейкин ЕВ. Первый опыт транспикальной имплантации протеза аортального клапана «МедИнж». *Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания»*. 2016; 17 (6): 141. Bazylev VV, Voevodin AB, Radzhabov DA, Rossejkin EV. Pervyj opyt transapikal'noj implantacii proteza aortal'nogo klapana «MedInzh». *Bjulleten' NCCSSH im. A.N. Bakuleva RAMN «Serdechno-sosudistye zabolevanija»*. 2016; 17 (6): 141.
- Bezuidenhout D, Zilla P. Flexible leaflet polymeric heart valves. *Cardiovasc Card Ther Devices*. 2014; 15: 93–129.
- Daebritz SH, Fausten B, Hermanns B, Franke A, Schroeder J, Groetzner J et al. New flexible polymeric heart valve prostheses for the mitral and aortic positions. *Heart Surg Forum*. 2004; 7 (5): 525–532. PMID: 15799940. doi: 10.1532/HSF98.20041083.
- Chetta GE, Lloyd JR. The design, fabrication and evaluation prosthetic heart valve. *J Biomech Eng*. 1980; 102: 34–41. PMID: 7382451.
- Jiang H, Campbell G, Boughner D, Wand WK, Quantz M. Design and manufacture of a polyvinyl alcohol (PVA) cryogel tri-leaflet heart valve prosthesis. *Medical Engineering & Physics*. 2004; 26: 269–277. PMID: 15121052. doi: 10.1016/j.medengphy.2003.10.007.
- Quintessenza JA, Jacobs JP, Chai PJ, Morell VO, Lindberg H. Polytetrafluoroethylene bicuspid pulmonary valve implantation: experience with 126 patients. *World J Pediatr Congenit Heart Surg*. 2010; 1 (1): 20–27. PMID: 23804719. doi: 10.1177/2150135110361509.
- Kidane AG, Burriesi G, Edirisinghe M, Ghanbari H, Bonhoeffer P et al. A novel nanocomposite polymer for development of synthetic heart valve leaflets. *Acta Biomaterialia*. 2009; 5: 2409–2417. PMID: 19497802. doi: 10.1016/j.actbio.2009.02.025.
- Claiborne TE, Sheriff J, Kuetting M, Steinseifer U, Slepian MJ, Bluestein DJ. In vitro evaluation of a novel hemodynamically optimized trileaflet polymeric prosthetic heart valve. *Biomech Eng*. 2013; 135 (2): 021021. PMID: 23445066. PMID: PMC5413125. doi: 10.1115/1.4023235.

15. Strickler F, Richard R, McFadden S, Lindquist J, Schwarz MC, Faust R et al. In vivo and in vitro characterization of poly(styrene-*b*-isobutylene-*b*-styrene) copolymer stent coatings for biostability, vascular compatibility and mechanical integrity. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Feb; 92 (2): 773–782. doi: 10.1002/jbm.a.32418.
16. Pinchuk L, Wilson GJ, Barry JJ, Schoepfoerster RT, Patel JM, Kennedy JP. Medical applications of poly(styrene-block-isobutylene-block-styrene) («SIBS»). *Biomaterials*. 2008; 29 (4): 448–460. PMID: 17980425. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.09.041.
17. Fray ME, Prowans P, Puskas JE, Altsta V. Biocompatibility and Fatigue Properties of Polystyrene-Polyisobutylene-Polystyrene, an Emerging Thermoplastic Elastomeric Biomaterial. *Biomacromolecules*. 2006; 7, 844–850.
18. Wang Q, McGoron AJ, Bianco R, Kato Y, Pinchuk L, Schoepfoerster RT. In vivo assessment of a novel polymer (SIBS) trileaflet heart valve. *J Heart Valve Dis*. 2010; 19: 499–505. PMID: 20845899.
19. Duraiswamy N, Choksi TD, Pinchuk L, Schoepfoerster RT. A phospholipid-modified polystyrene-polyisobutylene-polystyrene (SIBS) triblock polymer for enhanced hemocompatibility and potential use in artificial heart valves. *J Biomater Appl*. 2009; 23 (4): 367–379. doi: 10.1177/0885328208093854.
20. Claiborne TE, Slepian MJ, Hossainy S, Bluestein D. Polymeric trileaflet prosthetic heart valves: evolution and path to clinical reality. *Expert Rev Med Devices*. 2012; 9 (6): 577–594. doi: 10.1586/erd.12.51. PMID: 23249154. PMCID: PMC3570260.
21. Kaszas G, Puskas JE, Kennedy JP, Hager WG, Polym J. Sci. Part A: Polym. Chem. 1991, 29, 427–435. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pola.1991.080290316>.
22. Lu S, Zhang P, Sun X, Gong F, Yang S, Shen L et al. Synthetic ePTFE grafts coated with an anti-CD133 antibody-functionalized heparin/collagen multilayer with rapid in vivo endothelialization properties. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2013 Aug 14; 5 (15): 7360–7369. doi: 10.1021/am401706w.
23. Wiggins MJ, Wilkoff B, Anderson JM, Hiltner A. Biodegradation of polyether polyurethane inner insulation in bipolar pacemaker leads. *J Biomed Mater Res*. 2001; 58: 302–307.
24. Knoll A, Magerle R, Krausch G. Tapping Mode Atomic Force Microscopy on Polymers: Where Is the True Sample Surface? *Macromolecules*. 2001, 34, 4159–4165.
25. Bracaglia LG, Yu L, Hibino N, Fisher JP. Reinforced pericardium as a hybrid material for cardiovascular applications. *Tissue Eng Part A*. 2014 Nov; 20 (21–22): 2807–2816. doi: 10.1089/ten.TEA.2014.0516.
26. Jee KS, Kim YS, Park KD, Kim YH. A novel chemical modification of bioprosthetic tissues using L-arginine. *Biomaterials*. 2003 Sep; 24 (20): 3409–3416.
27. Hilbert S, Ferrans V, Tomita Y, Eidbo E, Jones M. Evaluation of explanted polyurethane trileaflet cardiac valve prostheses. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 1987. 94 (3): 419–429.
28. Corvo MF, Dugan SW, Werth MS, Stevenson CM, Summers SA, Pohl DR et al. Cadaret Analytica AutoStart 150 mL Burette. *NAMSA*. 2008: 8.
29. Kakavand M, Yazdanpanah G, Ahmadiani A, Niknejad H. Blood compatibility of human amniotic membrane compared with heparin-coated ePTFE for vascular tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017 Jun; 11 (6): 1701–1709. doi: 10.1002/term.2064.
30. Xia Ye, Ze Wang, Xianghua Zhang, Ming Zhou, Lan Cai. Hemocompatibility research on the micro-structure surface of a bionic heart valve. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 2014; 24: 2361–2369.
31. Thevenot P, Hu W, Tang L. Surface chemistry influences implant biocompatibility. *Curr Top Med Chem*. 2008; 8 (4): 270–280.

Статья поступила в редакцию 13.09.2018 г.
The article was submitted to the journal on 13.09.2018