

© Коллектив авторов

СКРИНИНГОВЫЙ АНАЛИЗ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И ИХ ИНГИБИТОРОВ В СТВОРКАХ ЭПОКСИОБРАБОТАННЫХ БИОПРОТЕЗНЫХ КЛАПАНОВ СЕРДЦА, ЭКСПЛАНТИРОВАННЫХ ПО ПРИЧИНЕ ДИСФУНКЦИЙ

А.Е. Костюнин, Т.В. Глушкова, Д.К. Шишкова, В.Е. Маркова, Е.А. Овчаренко*

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний,
650002, Кемерово, Сосновый бульвар, 6; *эл. почта: rhabdophis_tigrina@mail.ru

Биопротезные клапаны сердца (БКС) характеризуются низкой тромбогенностью и превосходными гемодинамическими параметрами, приближенными к таковым естественных клапанов. Однако сроки функционирования этих медицинских изделий ограничены в среднем 15 годами, поскольку их биологическая составляющая подвержена структурной дегенерации. Одним из механизмов, ответственных за разрушение и кальцификацию БКС, является протеолитическая деградация биоматериала. В настоящее время спектр протеаз, встречающихся в ксенотканях имплантатов, остаётся слабоизученным. Посредством дот-блоттинга нами произведён скрининговый анализ протеолитических ферментов и их ингибиторов в створках пяти БКС, эксплантированных по причине дисфункций. В качестве группы сравнения использовали пять аортальных клапанов (АК), удалённых из-за кальцинирующего аортального стеноза. Результаты исследования показывают, что в БКС присутствует по меньшей мере 17 протеаз и 19 их ингибиторов, тогда как в АК выявлено 20 и 21 соединение соответственно. Протеомные профили нативных и протезных створок имели небольшие количественные различия. В частности, матриксные металлопротеиназы (ММП) были экспрессированы в БКС и АК на сопоставимых уровнях, тогда как продукция тканевых ингибиторов металлопротеиназ-1/-2 и RECK-белка в протезных створках оказалась ниже, чем в естественных. Это указывает на то, что активность ММП в БКС, вероятно, не регулируется ингибиторами, специфичными для этого семейства ферментов, вследствие чего они могут расщеплять склеропротейны ксеноткани, вызывая постепенное разрушение протезного биоматериала. Обнаружение в эксплантированных БКС широкого спектра протеолитических ферментов и их ингибиторов предполагает существование многих патофизиологических путей, которые способны приводить к структурной дегенерации имплантатов.

Ключевые слова: биопротезы клапанов сердца; структурная дегенерация клапана; протеолиз; протеолитические ферменты; ингибиторы ферментов; дот-блоттинг

DOI: 10.18097/PBMC20226801068

ВВЕДЕНИЕ

Для замены несостоятельных нативных клапанов сердца всё чаще используют ксеногенные биопротезные клапаны (БКС) [1]. Они выгодно отличаются от механических аналогов низкой тромбогенностью и не требуют пожизненного приёма антикоагулянтов реципиентами [2]. Тем не менее, даже современные модели БКС подвержены развитию дисфункций после 10-15 лет функционирования, что обуславливает потребность в репротезировании [3, 4]. В качестве главной причины дисфункций БКС выступает структурная дегенерация их биологического компонента, которая приводит к разрывам и кальцификации створчатого аппарата [5, 6]. Указанная особенность существенно ограничивает возможности применения БКС у лиц моложе 65 лет, чья ожидаемая продолжительность жизни превышает средние показатели долговечности имплантатов [7, 8].

БКС изготавливают из тканей животного происхождения (свиной аортальный комплекс или бычий перикард), стабилизированных такими сшивающими агентами, как диглицидиловый эфир этиленгликоля или глутаровый альдегид [9]. Считается, что химическая фиксация снижает иммуногенность ксенотканей и придаёт им устойчивость к воздействию агрессивных факторов

внутренней среды организма [9]. Впрочем, результаты проведённых в последние годы *in vitro* исследований показывают, что химически стабилизированный биоматериал остаётся подвержен протеолитической деградации [10, 11]. Также исследователи отмечают накопление плазмينا/плазминогена и нескольких типов матриксных металлопротеиназ (ММП) в створчатом аппарате БКС, эксплантированных по причине дисфункций [12-14]. Наконец, выявлена корреляция между присутствием в протезных ксенотканях ММП-9 и дисфункциями БКС, вызванными перфорацией и разрывами створок [15]. В совокупности имеющиеся данные дают основание предполагать, что протеолиз является важным фактором структурной дегенерации БКС. В то же время роль присутствующих в створках имплантатов ингибиторов ферментов остаётся неясной [16]. Гипотетически они могут защищать биоматериал от протеолиза, нейтрализуя активность ферментов.

Несмотря на потенциально важный вклад протеолитической деградации в процессы структурного разрушения и кальцификации БКС, до настоящего времени не предпринималось попыток определить спектр протеолитических ферментов, присутствующих в створках имплантатов. Предыдущие исследования затрагивали изучение экспрессии в БКС отдельных типов протеаз или их ингибиторов посредством иммуногистохимического метода [12-16].

Настоящая работа нацелена на выявление в створках БКС протеолитических ферментов и их ингибиторов, наиболее распространённых в дегенерировавших нативных тканях, для чего в качестве группы сравнения были взяты кальцинированные аортальные клапаны (АК). Скрининговый анализ позволил выявить ранее неизвестные факторы, которые могут быть ответственны за структурную дегенерацию БКС.

МЕТОДИКА

Материалом для исследования стали эпоксиобработанные БКС производства “НеоКор” (Россия), эксплантированные из митральной позиции в ходе репротезирования. Полученные имплантаты были представлены моделями КемКор (n=2) и ПериКор (n=3). Створчатый аппарат указанных моделей БКС изготовлен из аортального комплекса свиньи, тогда как обшивка каркаса представлена полиэфирной тканью и перикардом свиньи/телёнка соответственно. Средний срок функционирования БКС достигал $168,6 \pm 31,1$ месяцев, средний возраст реципиентов на момент репротезирования составил $62 \pm 10,5$ лет. Причиной для повторной операции стали гемодинамические нарушения, связанные с недостаточностью БКС, которые были обусловлены развитием дегенеративных изменений в створчатом аппарате (утолщением, перфорированием и кальцификацией биоматериала). В качестве группы сравнения использовали створки 5 нативных АК, удалённых при первичном протезировании по причине кальцинирующего аортального стеноза (КАС). Средний возраст пациентов с КАС составил $68 \pm 2,5$ лет.

Удалённые в ходе операций БКС и АК помещали в 0,9% раствор натрия хлорида и в течение 15 мин доставляли в лабораторию для макроскопического описания. Далее от каждой створки брали фрагменты биоматериала. Иссечённые фрагменты включали центральную часть каждой створки, а также участки с дегенеративными изменениями ткани. С целью проведения скринингового анализа протеолитических ферментов и их ингибиторов в образцах применяли метод дот-блоттинга.

Для выделения белка образцы помещали в предварительно охлаждённый до 4°C T-PER-буфер (“Thermo Scientific”, США) при добавлении смеси ингибиторов протеаз и фосфатаз Halt™ (“Thermo Scientific”, США) в соотношении 1:100; затем их гомогенизировали с помощью гомогенизатора FastPrep-24 5G (“MP Biomedicals”, США) в режиме 4 цикла по 40 с каждый с интервалом 300 с между ними. Полученный гомогенат центрифугировали при 14000 g на микроцентрифуге 20R (“Beckman Coulter Inc.”, Германия) в течение 10 мин. Собранную надосадочную жидкость центрифугировали при 200000 g на ультрацентрифуге Optima MAX-XP (“Beckman Coulter, Inc.”) в течение 30 мин. Количественную оценку белка в полученном супернатанте осуществляли на спектрофотометре Multiskan Sky (“Thermo Scientific”, Сингапур) с использованием набора BCA Protein Assay Kit

(“Thermo Scientific”, США) согласно протоколу производителя.

При осуществлении дот-блоттинга использовали 130 мкг белка от каждого образца. Детекцию протеолитических ферментов и их ингибиторов осуществляли на цифровом сканере хемилюминесцентных блотов C-DiGit (“LI-COR”, США) с использованием набора Proteome Profiler: Human Protease/Protease Inhibitor Array (“R&D Systems”, США) для выявления 35 протеаз и 32 ингибиторов ферментов в соответствии с протоколом производителя.

Полуколичественный анализ протеолитических ферментов и их ингибиторов, выявленных в БКС и АК методом дот-блоттинга, оценивали по площади детектируемых секторов с использованием программы ImageJ (“National Institutes of Health”, США). Статистическую обработку полученных данных выполняли при помощи программы GraphPad Prism 7 (“GraphPad Software”, США). 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 медиана, процентиля и минимальные/максимальные значения. Для множественного сравнения использовали h-критерий Краскела-Уоллиса с применением поправки FDR, достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительное макроскопическое изучение полученных при репротезировании БКС показало, что все образцы характеризовались признаками структурной дегенерации ксенотканей. В частности, для створок имплантатов отмечены утолщение, а также наличие разрывов в области комиссур и перфораций в куполе. Также в основании протезных створок были обнаружены крупные кальцификаты, хотя случаев тотального кальциноза нами не выявлено. Помимо кальцификации отмечено разрастание соединительной ткани (паннуса) на створчатом аппарате всех изученных БКС. Паннус присутствовал со стороны оттока и способствовал фиксации створок к каркасу с некоторым ограничением их подвижности и уменьшением площади эффективного отверстия. Ведущим клиническим проявлением структурной дегенерации БКС стала недостаточность. Створки нативных АК характеризовались значительным фиброзным утолщением и тотальной кальцификацией с ограничением их подвижности. Кальцификаты располагались преимущественно в основании створок, тогда как свободный край оставался некальцинированным. В целом, наблюдаемая картина была типична для КАС [17, 18].

По результатам дот-блоттинга фрагментов створок БКС (без наростов поверх биоматериала соединительной ткани) и АК в общей сложности детектировано 44 соединения, в том числе 21 протеолитический фермент и 23 их пептидных ингибитора (рис. 1). При этом в БКС отмечено

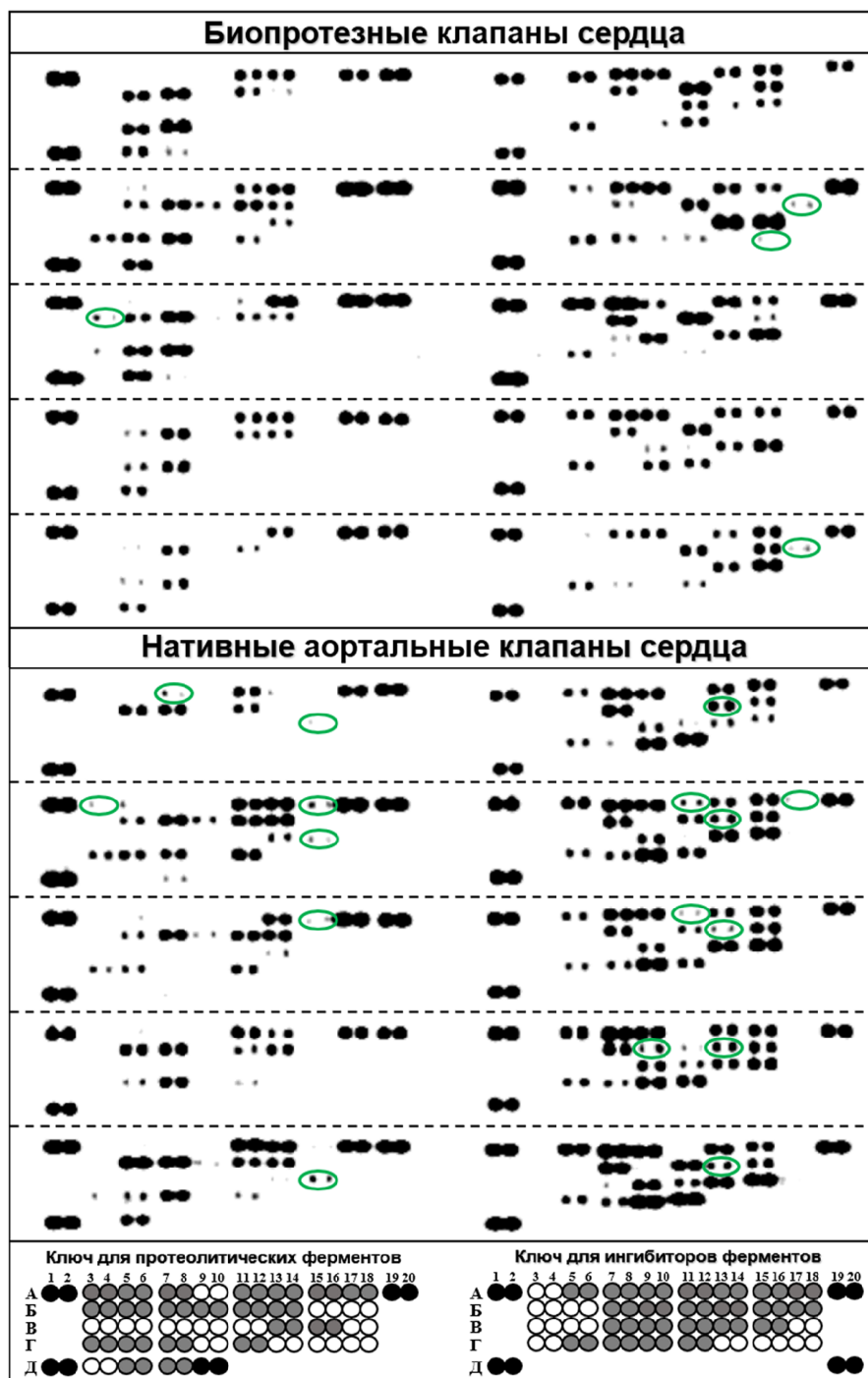


Рисунок 1. Результаты дот-блоттинга изученных створок дегенерировавших биопротезов и кальцинированных аортальных клапанов сердца. Кругами выделены соединения, уникальные для одного из видов исследуемых тканей.

Протеолитические ферменты: А3, 4 – ADAM-протеаза 8; А5, 6 – ADAM-протеаза 9; А7, 8 – ADAMTS-протеаза 1; А11, 12 – катепсин А; А13, 14 – катепсин В; А15, 16 – катепсин С; А17, 18 – катепсин D; В3, 4 – катепсин Е; В5, 6 – катепсин L; В7, 8 – катепсин S; В9, 10 – катепсин V; В11, 12 – катепсин X; В13, 14 – дипептидилпептидаза-4; В13, 14 – матриксная металлопротеиназа (ММП)-1; В15, 16 – ММП-2; Г3, 4 – ММП-7; Г5, 6 – ММП-8; Г7, 8 – ММП-9; Г11, 12 – ММП-12; Д5, 6 – протеиназа 3; Д7, 8 – урокиназа; А1, 2, 19, 20, Д1, 2 – референсные точки; Д9, 10 – отрицательный контроль.

Ингибиторы протеолитических ферментов: А5, 6 – цистатин А; А7, 8 – цистатин В; А9, 10 – цистатин С; А11, 12 – цистатин Е/М; А13, 14 – басигин; А15, 16 – фетуин В; А17, 18 – ингибитор активатора фактора роста гепатоцитов; В; В7, 8 – латексин; В9, 10 – липокалин-1; В11, 12 – липокалин-2; В13, 14 – RECK-белок; В15, 16 – ингибитор протеина С; В17, 18 – ангиотензиноген; В7, 8 – маспин; В9, 10 – серпин В6; В11, 12 – серпин В8; В13, 14 – ингибитор активатора плазминогена-1; В15, 16 – фактор, производный от пигментного эпителия; Г5, 6 – ингибитор пути тканевого фактора; Г7, 8 – ингибитор пути тканевого фактора-2; Г9, 10 – тканевой ингибитор металлопротеиназ (ТИМП)-1; Г11, 12 – ТИМП-2; Г15, 16 – ТИМП-4; А1, 2, 19, 20, Д1, 2 – референсные точки; Д19, 20 – отрицательный контроль.

17 протеаз и 19 их ингибиторов, а в створках АК — 20 протеаз и 21 их ингибитор соответственно. Уникальными для БКС оказались катепсин Е, ангиотензиноген и тканевый ингибитор металлопротеиназ (ТИМП)-4. Только в АК встречались ADAM-протеаза 8, ADAMTS-протеаза 1, катепсин С, ММП-2, цистатин Е/М, ингибитор активатора фактора роста гепатоцитов-1, липокалин-1 и RECK-белок.

Согласно результатам полуколичественного анализа, среди определяемых посредством имеющихся наборов протеаз наиболее обильными в тканях БКС и АК были катепсины А/В/Д/Л/С/Х, дипептидилпептидаза-4 и ММП-8/-9 (рис. 2). Достоверных различий по интенсивности сигналов детектированных ферментов между БКС и АК

не выявлено ($p>0,05$). Также в створках БКС, но не АК, отмечено высокое содержание протеиназы-3 ($p=0,0317$). В свою очередь, самыми представительными в количественном отношении ингибиторами ферментов, присутствующими в обоих типах изучаемых тканей, оказались цистатины А/В/С, басигин, фетуин В, латексин, липокалин-2, ингибитор активатора плазминогена-1, фактор пигментного эпителия и ингибитор пути тканевого фактора (рис. 3). АК отличались от БКС достоверно более высоким уровнем экспрессии фетуина В ($p=0,0317$), RECK-белка ($p=0,0079$) и ТИМП-1/-2 (в обоих случаях $p=0,0079$). Интенсивность сигналов других детектированных веществ не различалась между БКС и АК ($p>0,05$).

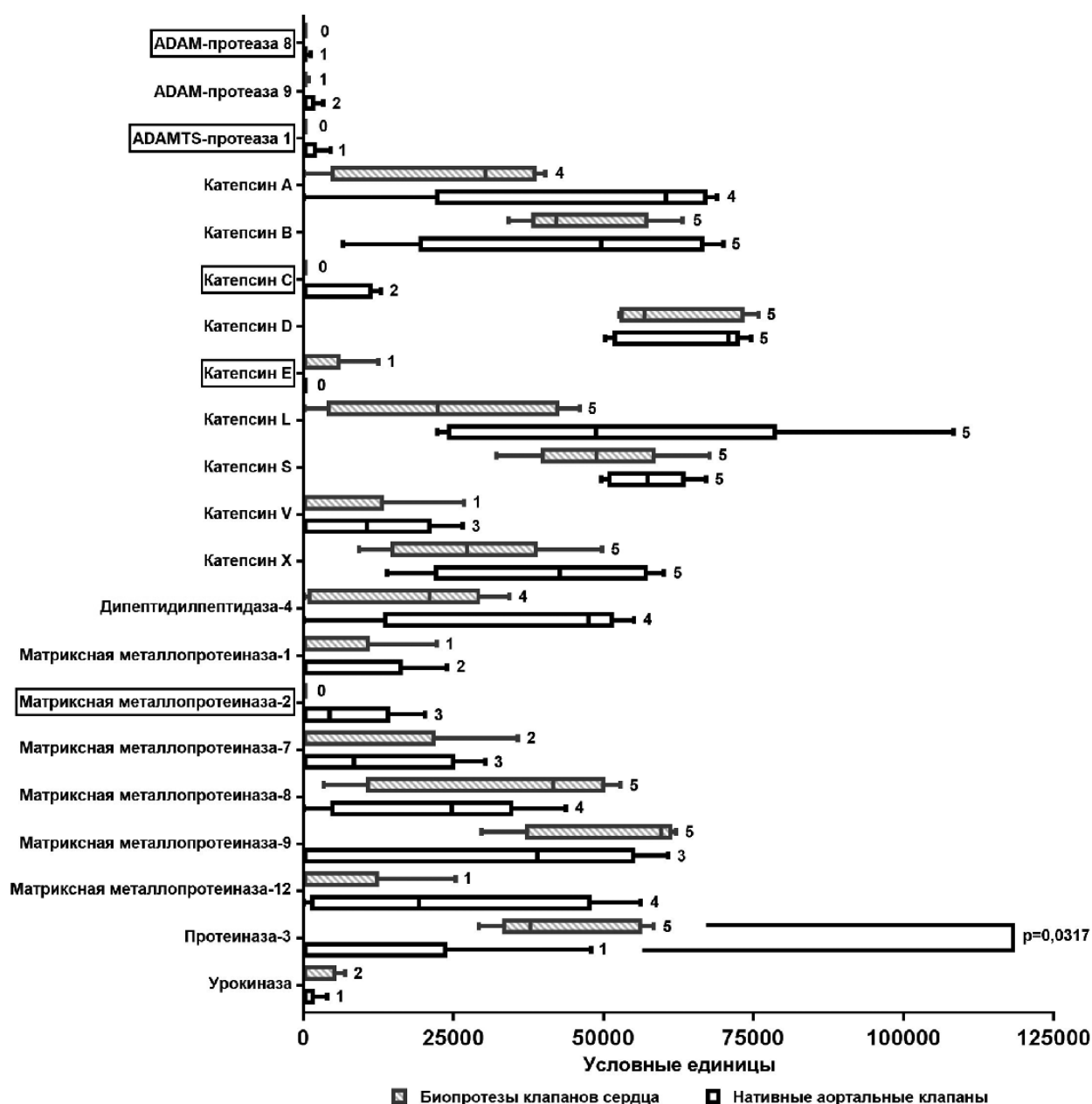


Рисунок 2. Полуколичественный анализ протеолитических ферментов в изученных створках дегенерировавших биопротезов и кальцинированных аортальных клапанов сердца. Цифры рядом со столбиками указывают на число образцов, в которых отмечена экспрессия конкретного соединения. Рамками выделены соединения, уникальные для одного из видов исследуемых тканей.

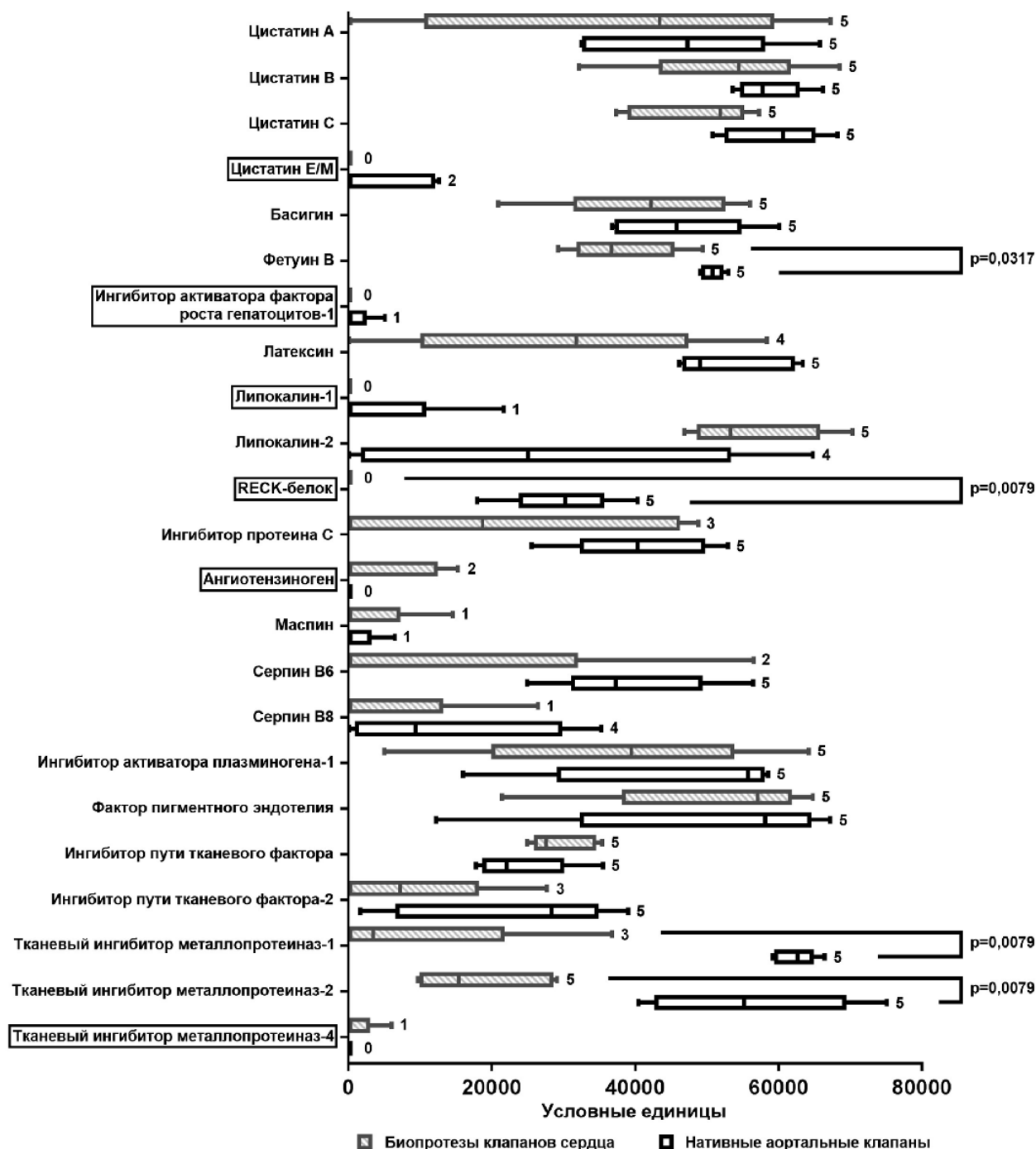


Рисунок 3. Полуколичественный анализ ингибиторов ферментов в изученных створках дегенерировавших биопротезов и кальцинированных аортальных клапанов сердца. Цифры рядом со столбиками указывают на число образцов, в которых отмечена экспрессия конкретного соединения. Рамками выделены соединения, уникальные для одного из видов исследуемых тканей.

В целом, протеомные профили нативных и протезных створок имели небольшие качественные и количественные различия. Полуколичественная оценка продемонстрировала, что уникальные для БКС и АК вещества (за исключением РЕСК-белка) присутствовали только в 1-2 образцах и, как правило, в следовых количествах. Это свидетельствует об их второстепенной роли в патофизиологии структурной дегенерации БКС и развитии КАС.

Особое внимание обращает на себя несоответствие уровней специфических ингибиторов ММП, таких как РЕСК-белок [19] и ТИМП-1/-2 [20], наблюдаемое при сравнении протеомных профилей створок БКС и АК. В отличие от тканей АК, в БКС ингибиторы ММП слабо экспрессированы или отсутствуют. При этом ряд ММП, включая ММП-8/-9, присутствует в сопоставимых количествах в БКС и АК.

Несоответствие уровней RECK-белка и ТИМП-1/-2 между БКС и АК, вероятнее всего, связано с отсутствием устойчивых популяций мезенхимальных клеток в ксенотканях [21]. Считается, что последние усиливают продукцию ингибиторов ММП в ответ на чрезмерный протеолиз, защищая матрикс от разрушения [20]. Подобная картина характерна для кальцинированных АК, где гиперэкспрессия ТИМП-1/-2 не только препятствует протеолитической деградации внеклеточного матрикса, но способствует фиброзированию створок ввиду нарушения процессов деструкции последнего [22].

Основываясь на полученных данных, можно предположить, что присутствующих в створках БКС ингибиторов ММП может быть недостаточно для подавления активности этих ферментов. Примечательно, что именно ММП являются основными кандидатами на роль главных факторов, ответственных за протеолитическую деградацию ксенотканей имплантатов [12, 13, 15]. Для проверки гипотезы о дисбалансе ММП и их ингибиторов в створках БКС, провоцирующем чрезмерный протеолиз, требуются дополнительные исследования с неизменёнными тканями.

Следует отметить, что настоящее исследование не отвечает на вопрос, касающийся происхождения протеолитических ферментов и их ингибиторов в створках БКС. Выявленные соединения могут поступать в биологическую ткань имплантатов как из плазмы крови реципиента, так и продуцироваться инфильтрирующими её иммунными клетками. Так, ранее нашей группе удалось установить, что единственным источником присутствующих в протезном биоматериале ММП-1/-2/-12 и ТИМП-1/-2 являются макрофаги, тогда как ММП-9 в основном диффундирует из плазмы крови [13, 16]. Примеры накопления в створках ряда циркулирующих в крови соединений, таких как фибриноген, остеокальцин, остеопонтин и липопротеины низкой плотности, также описаны в литературе [12, 14, 23]. Очевидно, данный аспект требует дальнейшего изучения, поскольку определение источников протеаз и их ингибиторов необходимо для разработки подходов к предотвращению их накоплений в тканях БКС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Результаты настоящего исследования показывают, что в створках БКС присутствует широкий спектр протеолитических ферментов и их ингибиторов. В общей сложности, для БКС отмечено 36 таких соединений, причём многие из них впервые выявлены в биоматериале имплантатов. Полуколичественный анализ показывает, что по сравнению с АК для ксенотканей БКС характерны меньшие уровни экспрессии ряда ингибиторов матриксных металлопротеиназ, включая, RECK-белок и ТИМП-1/-2. При этом уровни экспрессии ММП-8/-9 в тканях БКС и АК оказались сопоставимы.

Обнаружение в створках дегенерировавших БКС разнообразных протеаз предполагает, что расщеплению могут быть подвержены все основные склеропротеины

ксеноткани. Защита ксенотканей от накопления протеаз может стать перспективным направлением в совершенствовании существующих моделей имплантатов. Требуются дальнейшие исследования для выявления источников детектированных веществ и установления их возможного влияния на протезную ксеноткань.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (грант № 21-75-10107).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящее исследование проведено в соответствии со стандартами Надлежащей клинической практики и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации. Протокол исследования одобрен этическим комитетом Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. Все пациенты подписали письменное информированное согласие после объяснения сути исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bax J.J., Delgado V. (2017) Bioprosthetic heart valves, thrombosis, anticoagulation, and imaging surveillance. *JACC: Cardiovascular Interventions*, **10**(4), 388-390. DOI: 10.1016/j.jcin.2017.01.017
2. Head S.J., Çelik M., Kappetein A.P. (2017) Mechanical versus bioprosthetic aortic valve replacement. *Eur. Heart J.*, **38**(28), 2183-2191. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx141
3. Bourguignon T., Espitalier F., Pantaleon C., Vermes E., El-Arid J.M., Loardi C., Karam E., Candolfi P., Ivanov F., Aupart M. (2018) Bioprosthetic mitral valve replacement in patients aged 65 years or younger: long-term outcomes with the Carpentier-Edwards PERIMOUNT pericardial valve. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, **54**(2), 302-309. DOI: 10.1093/ejcts/ezy029
4. Foroutan F., Guyatt G.H., O'Brien K., Bain E., Stein M., Bhagra S., Sit D., Kamran R., Chang Y., Devji T., Mir H., Manja V., Schofield T., Siemieniuk R.A., Agoritsas T., Bagur R., Otto C.M., Vandvik P.O. (2016) Prognosis after surgical replacement with a bioprosthetic aortic valve in patients with severe symptomatic aortic stenosis: systematic review of observational studies. *The BMJ*, **354**, i5065. DOI: 10.1136/bmj.i5065
5. Capodanno D., Petronio A.S., Prendergast B., Eltchaninoff H., Vahanian A., Modine T., Lancellotti P., Sondergaard L., Ludman P.F., Tamburino C., Piazza N., Hancock J., Mehili J., Byrne R.A., Baumbach A., Kappetein A.P., Windecker S., Bax J., Haude M. (2017) Standardized definitions of structural deterioration and valve failure in assessing long-term durability of transcatheter and surgical aortic bioprosthetic valves: a consensus statement from the European Association of Percutaneous Cardiovascular

- Interventions (EAPCI) endorsed by the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur. Heart J.*, **38**(45), 3382-3390. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx303
6. Dvir D., Bourguignon T., Otto C.M., Hahn R.T., Rosenhek R., Webb J.G., Treede H., Sarano M.E., Feldman T., Wijesundera H.C., Topilsky Y., Aupart M., Reardon M.J., Mackensen G.B., Szeto W.Y., Kornowski R., Gammie J.S., Yoganathan A.P., Arbel Y., Borger M.A., Simonato M., Reisman M., Makkar R.R., Abizaid A., McCabe J.M., Dahle G., Aldea G.S., Leipsic J., Pibarot P., Moat N.E., Mack M.J., Kappetein A.P., Leon M.B. (2018) Standardized definition of structural valve degeneration for surgical and transcatheter bioprosthetic aortic valves. *Circulation*, **137**(4), 388-399. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030729
 7. Otto C.M., Nishimura R.A., Bonow R.O., Carabello B.A., Erwin J.P. 3rd, Gentile F., Jneid H., Krieger E.V., Mack M., McLeod C., O'Gara P.T., Rigolin V.H., Sundt T.M. 3rd, Thompson A., Toly C. (2021) 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*, **143**(5), e72-e227. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000923
 8. Otto C.M., Nishimura R.A., Bonow R.O., Carabello B.A., Erwin J.P. 3rd, Gentile F., Jneid H., Krieger E.V., Mack M., McLeod C., O'Gara P.T., Rigolin V.H., Sundt T.M. 3rd, Thompson A., Toly C. (2021) 2020 ACC/AHA guideline for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on clinical practice guidelines. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **77**(4), e25-e197. DOI: 10.1016/j.jacc.2020.11.018
 9. Резцова М.А., Кудрявцева Ю.А. (2018) Современные подходы к химической модификации белков в биологических тканях, последствия и применение. *Биоорганическая химия*, **44**(1), 1-16. [Rezova M.A., Kudryavceva Yu.A. (2018) Modern approaches to protein chemical modification in biological tissue, consequences and application. *Bioorganicheskaya Khimiya*, **44**(1), 1-16.] DOI: 10.7868/S0132342318010025
 10. Isenburg J.C., Simionescu D.T., Vyavahare N.R. (2004) Elastin stabilization in cardiovascular implants: improved resistance to enzymatic degradation by treatment with tannic acid. *Biomaterials*, **25**(16), 3293-3302. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.10.001
 11. 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. (2021) Cross-linking method using pentaepoxide for improving bovine and porcine bioprosthetic pericardia: a multiparametric assessment study. *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications*, **118**, 111473. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111473
 12. Shetty R., Pibarot P., Audet A., Janvier R., Dagenais F., Perron J., Couture C., Voisine P., Despres J.P., Mathieu P. (2009) Lipid-mediated inflammation and degeneration of bioprosthetic heart valves. *Eur. J. Clin. Invest.*, **39**(6), 471-480. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2009.02132.x
 13. Костюнин А.Е., Глушкова Т.В. (2020) Первые результаты изучения экспрессии матриксных металлопротеиназ-1/-2/-9/-12 в ксеногенных тканях эпоксиобработанных биопротезов клапанов сердца, эксплантированных по причине дисфункций. *Российский кардиологический журнал*, **25**(10), 49-55. [Kostyunin A.E., Glushkova T.V. (2020) Expression of matrix metalloproteinases 1, 2, 9, 12 in xenogenic tissues of epoxy-crosslinked bioprosthetic heart valves explanted due to dysfunction. *Russian Journal of Cardiology*, **25**(10), 49-55.] DOI: 10.15829/1560-4071-2020-3978
 14. 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. (2018) Biochemical and histological evidence of deteriorated bioprosthetic valve leaflets: the accumulation of fibrinogen and plasminogen. *Biology Open*, **7**(8), pii:bio034009. DOI: 10.1242/bio.034009
 15. Simionescu A., Simionescu D.T., Deac R.F. (1996) Matrix metalloproteinases in the pathology of natural and bioprosthetic cardiac valves. *Cardiovascular Pathology*, **5**(6), 323-332. DOI: 10.1016/s1054-8807(96)00043-9
 16. Костюнин А.Е., Глушкова Т.В., Богданов Л.А., Овчаренко Е.А. (2021) Экспрессия тканевых ингибиторов металлопротеиназ типа 1 и 2 в створках эксплантированных биопротезов клапанов сердца — новая патогенетическая параллель между структурной дегенерацией клапана и кальцинирующим аортальным стенозом. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*, **23**(3), 115-121. [Kostyunin A.E., Glushkova T.V., Bogdanov L.A., Ovcharenko E.A. (2021) Expression of tissue inhibitors of metalloproteinases type 1 and type 2 in the leaflets of explanted bioprosthetic heart valves: a new pathogenetic parallel between structural valve degeneration and calcific aortic stenosis. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*, **23**(3), 115-121.] DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-115-121
 17. Lindman B.R., Clavel M.A., Mathieu P., Jung B., Lancellotti P., Otto C.M., Pibarot P. (2016) Calcific aortic stenosis. *Nature Reviews Disease Primers*, **2**, 16006. DOI: 10.1038/nrdp.2016.6
 18. Miller J.D., Weiss R.M., Heistad D.D. (2011) Calcific aortic valve stenosis: methods, models, and mechanisms. *Circulation Res.*, **108**(11), 1392-1412. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.234138
 19. Chang C.K., Hung W.C., Chang H.C. (2008) The Kazal motifs of RECK protein inhibit MMP-9 secretion and activity and reduce metastasis of lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Cell. Mol. Med.*, **12**(6B), 2781-2789. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00215.x
 20. Arpino V., Brock M., Gill S.E. (2015) The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biology*, **44-46**, 247-254. DOI: 10.1016/j.matbio.2015.03.005
 21. Nair V., Law K.B., Li A.Y., Phillips K.R., David T.E., Butany J. (2012) Characterizing the inflammatory reaction in explanted Medtronic Freestyle stentless porcine aortic bioprosthesis over a 6-year period. *Cardiovascular Pathology*, **21**(3), 158-168. DOI: 10.1016/j.carpath.2011.05.003
 22. Kostyunin A.E., Yuzhalin A.E., Ovcharenko E.A., Kutikhin A.G. (2019) Development of calcific aortic valve disease: Do we know enough for new clinical trials? *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **132**, 189-209. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2019.05.016
 23. Shen M., Carpentier S.M., Berrebi A.J., Chen L., Martinet B., Carpentier A. (2001) Protein adsorption of calcified and noncalcified valvular bioprostheses after human implantation. *Ann. Thorac. Surg.*, **71**(5 Suppl), S406-S407. DOI: 10.1016/s0003-4975(01)02501-2

Поступила в редакцию: 20. 12. 2021.
После доработки: 09. 02. 2022.
Принята к печати: 16. 02. 2022.

SCREENING ANALYSIS OF PROTEOLYTIC ENZYMES AND THEIR INHIBITORS IN THE LEAFLETS OF EPOXY-TREATED BIOPROSTHETIC HEART VALVES EXPLANTED DUE TO DYSFUNCTION

A.E. Kostyunin, T.V. Glushkova, D.K. Shishkova, V.E. Markova, E.A. Ovcharenko*

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases,
6 Sosnovy blvd., Kemerovo, 650002 Russia; *e-mail: rhabdophis_tigrina@mail.ru

Bioprosthetic heart valves (BHVs) are known for their lower thrombogenicity rates and excellent hemodynamic parameters similar to native valves. However, the lifespan of these medical devices is limited to 15 years due to the structural valve degeneration. One of the mechanisms underlying functional impairment and calcification of BHVs includes proteolytic degradation of biomaterials. However, proteases found in xenogeneic BHVs tissue remain poorly studied. In this study using the dot blot assay, we have performed a screening analysis of proteolytic enzymes and their inhibitors in the leaflets of five BHVs explanted due to their dysfunction. Five aortic valves (AVs) explanted due to calcific aortic valve disease were studied as a comparison group. The results of the study have demonstrated that at least 17 proteases and 19 of their inhibitors can be found in BHVs. In the AVs 20 proteases and 21 their inhibitors were identified. Small quantitative differences were noted between proteomic profiles of the BHVs and AVs. Matrix metalloproteinases (MMPs) were expressed in BHVs and AVs at comparable levels, but the level of tissue inhibitors of metalloproteinases-1/-2 and RECK protein in implant tissues was lower than in natural valves. Probably, excessive activity of MMPs cannot be counterbalanced by their inhibitors in BHVs and therefore MMPs can degrade prosthetic biomaterial. Moreover, the detection of a wide range of proteolytic enzymes and their inhibitors in the degenerated BHVs suggests the existence of several pathophysiological pathways that can lead to structural valve degeneration.

Key words: bioprosthetic heart valves; structural valve degeneration; proteolysis; proteolytic enzymes; enzyme inhibitors; dot blot assay

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation (project no. 21-75-10107). <https://rscf.ru/en/project/21-75-10107/>

Received: 20.12.2021, revised: 09.02.2022, accepted: 16.02.2022.