

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, главного научного сотрудника отдела экспериментальной медицины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации Кудрявцевой Юлии Александровны на диссертационную работу Звягиной А.И. «Роль структурных повреждений внеклеточного матрикса в инициации асептического кальциноза химически стабилизированных биоматериалов на основе перикарда», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.14 – трансплантология и искусственные органы

### Актуальность темы исследования

Хирургическое лечение врожденных и приобретенных пороков сердца включает замену пораженного клапана сердца протезом (механическим или биологическим), а также пластику дефектов межпредсердной /межжелудочковой перегородок, атрезии легочной артерии и т.д.. Биологические протезы имеют ряд преимуществ перед механическими, но и один существенный недостаток, ограничивающий их применение, который заключается в кальцификации биологической ткани. Современные модели протезов клапана сердца подвергаются различным антикальциевым модификациям, но, как показывает опыт клинического применения, 100% защиты пока не удалось достигнуть. Использование гомографтов не решает проблемы кальцификации в отдаленном периоде. Причины кальцификации биологических клапанных заменителей активно изучаются, предполагается несколько механизмов, включая реципиент-зависимые и физико-химические, связанные с консервацией биоткани, однако этиология асептического кальциноза биоматериала до сих пор не ясна.

Структурное повреждение внеклеточного матрикса в процессе предимплантационной обработки биоматериала при изготовлении

кардиоваскулярных протезов и их последующая ферментативная деградация в процессе иммунной реакции реципиента могут быть пусковым фактором кальцификации биоматериала. Таким образом, выявление роли структурных повреждений внеклеточного матрикса биоткани в инициации кальцификации химическим стабилизированных биоматериалов, предназначенных для сердечно-сосудистой хирургии, является актуальным исследованием.

### **Новизна исследования и полученных результатов диссертации**

Показано, что интенсивность и скорость развития процессов как активного, так и пассивного асептического кальциноза химически стабилизированного ксеноперикарда имеет высокую корреляционную связь со степенью предимплантационного повреждения его внеклеточного матрикса. Доказано, что интенсивность экстракции токсических агентов, используемых в предимплантационной обработке ксеноперикарда, зависит от степени повреждения его внеклеточного матрикса. Впервые показано, что в условиях нормокальциемии, в неспецифической адсорбции к внеклеточному матриксу кальций-фосфатных соединений принимает участие сывороточный альбумин, содержащий в своей структуре жирные кислоты. Степень его осаждения имеет высокую корреляционную связь со степенью повреждения внеклеточного матрикса химически стабилизированного ксеноперикарда.

### **Значимость для науки и практики полученных результатов**

Данные, представленные в диссертационной работе, расширяют современные представления о причинах и механизмах кальцификации химически сшитых биоматериалов, в частности, ксеноперикарда. Разработанная матрикс-сберегающая технология децеллюляризации и делипидизации ксеноперикарда может быть использована при производстве биопротезов для сердечно-сосудистой хирургии.

### **Обоснованность и достоверность основных положений, результатов и выводов диссертации**

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений и подтверждается высоким научно-методическим уровнем исследования, шестью вариантами предимплантационной обработки, использованием современных статистических методов анализа, логичной интерпретацией полученных результатов. В диссертации представлено достаточное количество корректно иллюстративного материала и таблиц, что облегчает восприятие содержания работы.

### **Оценка содержания и завершенности исследования**

Диссертация Звягиной А.И. построена по классическому принципу, изложена на 150 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка цитируемой литературы, включающего 346 литературных источников. Работа содержит 38 рисунков и 10 таблиц.

В разделе «Введение» автор обосновывает актуальность исследования, научную новизну и практическую значимость диссертационной работы, формулирует цель, задачи и основные положения, выносимые на защиту. Все положения четко сформулированы.

Обзор литературы содержит подробный анализ литературных источников, включающий исторически значимые публикации, а также публикации отечественных и зарубежных авторов. В обзоре представлены особенности конструкций механических и биологических клапанов сердца, а также клинические аспекты их применения, описаны преимущества и недостатки. В качестве материала для производства биопротезов клапана сердца выбран перикард, подробно описано его строение с позиции анатомии и клеточного состава. Особое внимание уделено предимплантационной обработке химически стабилизированного ксеноперикарда, децеллюляризации и делипидизации биоматериала, как способа снижения риска кальцификации биоткани.

Основная часть литературного обзора посвящена обсуждению причин и процессов, приводящих к кальцификации биотканей, как со стороны реципиента, так и связанных с технологией обработки биопротезов.

В главе материалы и методы представлено обоснование экспериментальных групп (различные технологии предимплантационной обработки ксеноперикарда), описаны методики оценки структурных изменений биоткани в процессе обработки (сканирующая электронная микроскопия, стандартная гистология), эксперименты *in vitro* (фибробласты мыши) и *in vivo* с использованием лабораторных животных (крысы). Для статистического анализа применен пакет современных статистических программ для оценки полученных результатов.

Все полученные результаты представлены в третьей главе. Всего было предложено шесть технологий предимплантационной обработки, включающие консервацию (химическую сшивку), децеллюляризацию, отмывку и хранение биоматериала. Для всех экспериментальных групп была изучена серозная поверхность ксеноперикарда, как наиболее важная с позиции непосредственного контакта с током крови и принимающая на себя гидродинамический удар после имплантации в кровяное русло. Наибольшее повреждение поверхности отмечено для материалов, консервированных с использованием высоких концентраций глутарового альдегида (ГА, 0,625%) и подвергнутые последующей децеллюляризации 1% раствором додецилсульфата натрия (ДСН). Наибольшая сохранность внеклеточного матрикса (ВКМ) отмечена для образцов ксеноперикарда, обработанных 0,2% раствором ГА с последующей децеллюляризацией «щадящим» составом, включающий Тритон X100, 0,02% ЭДТА и 0,25% дезоксихолат натрия. На основании полученных результатов сделан вывод о необходимости исключения из технологии предимплантационной обработки ксеноперикарда высоких концентраций ГА (свыше 0,2%), изопропилового спирта (ИзС) и ДСН, с целью предупреждения повреждения ВКМ.

Автором проведен анализ влияния структурных изменений ВКМ на инициацию процессов активного асептического кальциноза ГА-обработанного ксеноперикарда. Оценка *in vitro* продемонстрировала высокую цитотоксичность всех исследуемых материалов, что в дальнейшем подтвердили результаты гистологического анализа. При имплантации подкожно крысам образцов ксеноперикарда через 8 недель наблюдения была выявлена кальцификация в группе А2 (0,625 %ГА+1%ДСН+70%ИС). Через 24 недели — в группах А2, В1 и В2 (применение 35% ИзС для отмывки биоткани). Для этих же групп, включая А1, также отмечен высокий уровень клеточной резорбции. Полученные результаты свидетельствуют, что поврежденный в ходе предимплантационной обработки ГА-обработанный ксеноперикард способствует привлечению большего количества лейкоцитоподобных клеток, что обусловлено влиянием двух факторов: гибель клеток реципиента при контакте с токсичным материалом и развитием хронического воспаления в ответ на повреждение коллагена. Таким образом, повреждение ВКМ биоматериала может способствовать развитию асептической кальцификации по двум направлениям — интенсивная экстракция цитотоксических веществ из биоткани (ГА-ассоциированный кальциноз) и развитие иммунного ответа по DAMP-ассоциированному механизму (иммунно-ассоциированный кальциноз).

Биоматериал групп, показавших наилучшие результаты: А1, В1 и В2 был исследован в модельном эксперименте кальцификации (*in vitro*). Исследовано влияние структурных изменений ВКМ на инициацию процессов пассивного асептического кальциноза. Все образцы, включая нативный перикард, подвергались кальцификации. Добавление в модельный раствор альбумина, содержащего жирные кислоты, снижало интенсивность кальцификации. Сделан вывод, что неспецифическая адсорбция альбумина на поверхности биоматериала носит вклад в развитие пассивных механизмов кальцификации посредством образования ядер кальцификации из комплекса «альбумин-кальций-жирные кислоты».

В заключении обобщены полученные результаты - доказано, что в основе развития активного кальциноза ксеноперикарда, консервированного ГА, лежит открытие паттернов повреждения молекул коллагена следствии повреждающего воздействия реагентов в процессе предимплантационной обработки материала, что, в свою очередь, через развитие иммунного ответа запускает процесс утилизации поврежденных компонентов матрикса клетками реципиента и инициирует процесс кальцификации биоткани путем формирования ядер минерализации на клеточном дебрисе. В работе показан вклад пассивных механизмов в развитие кальцификации биоматериала через неспецифическую адсорбцию белка альбумина на поверхности материала посредством образования ядер кальцификации комплекса «альбумин-кальций-жирные кислоты». Таким образом, интенсивность развития процессов асептического кальциноза как по активному, так и пассивному механизму зависит от степени сохранности ВКМ консервированного биоматериала.

Выводы полностью соответствуют поставленной цели и сформулированным задачам, подтверждены достаточным фактическим материалом с корректным уровнем достоверности. Полученные результаты подтверждают, что цель исследования достигнута, изучена и научно обоснована роль структурных повреждений внеклеточного матрикса ксеноперикарда в инициации асептического кальциноза химически стабилизированного биоматериала для применения в сердечно-сосудистой хирургии.

Практические рекомендации базируются на полученных результатах, могут быть использованы как при изготовлении биопротезов, так и для совершенствования методов контроля качества готовых изделий.

Диссертация оформлена грамотно и аккуратно, принципиальных замечаний по существу работы и оформлению диссертации нет.

**Замечания по содержанию и оформлению диссертационной работы**

В процессе изучения материалов диссертационного исследования у оппонента возникли замечания и вопросы, принципиально не снижающие значимости и научно ценности работы Звягиной А.И.:

**Замечания:**

1. В части литературного обзора, посвященного обсуждению применяемых консервантов биологических протезов для сердечно-сосудистой хирургии, не уделено должного внимания диглицидиловому эфиру этиленгликоля, при этом в российских клиниках биопротезы с данной обработкой занимают серьезную долю среди имплантируемых изделий, а опыт применения ДЭЭ-обработанных протезов клапанов сердца насчитывает более 30 лет.
2. В материалах и методах (п.2.4.) указано, что в качестве контрольных материалов были использованы створки коммерческих биопротезов, включая клапаны «БиоЛАБ-КС», «PERIMOUNT» для аортальной и митральной позиций, «ТиАра» (консервированный ДЭЭ), однако далее данные материалы не упоминаются в исследовании, за исключением протеза клапана сердца «PERIMOUNT».

**Вопросы:**

1. В модели подкожной имплантации с целью оценки риска кальцификации вы имплантировали ксеноперикард 2-х месячным крысам весом 180-200 грамм. Чем обусловлен выбор данного возраста и веса?
2. В разделе 3.4. вы делаете вывод, что из состава консервирующего раствора необходимо исключить глutarовый альдегид и использовать вместо него раствор диоксида в этиловом спирте. Вы предполагаете, что данный раствор способен к химической сшивке коллагеновой основы биоматериала и обеспечит необходимую долговечность готовому изделию, например, протезу клапана сердца?

**Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати**

По теме диссертации опубликовано 19 работ, в том числе 4 статьи в журналах, индексируемых в международных наукометрических базах данных, из них 2 статьи в журналах, включенных в перечень рецензируемых изданий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук. Получен патент РФ на изобретение.

### **Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации**

Автореферат в полном объеме отражает содержание диссертационной работы, в кратком изложении содержит все результаты, полученные в ходе исследования. В автореферате было бы желательно разместить информацию об опубликованных тезисах, что подтверждает представление результатов работы на научных конференциях.

### **Заключение**

Диссертационная работы Звягиной Алены Игоревны «Роль структурных повреждений внеклеточного матрикса в инициации асептического кальциноза химически стабилизированных биоматериалов на основе перикарда», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.14 – трансплантология и искусственные органы, является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена важная научно-практическая задача — определен вклад структурных повреждений внеклеточного матрикса ксеноперикарда в инициации асептической кальцификации химически стабилизированной биоткани и разработан способ подавления кальцификации за счет использования матрикс-сберегающей децеллюляризации/делипидизации.

По актуальности, научной новизне и практической значимости диссертационная работа Звягиной Алены Игоревны соответствует требованиям п. 17 «Положения о присуждении ученых степеней в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, утвержденным приказом директора от 12.02.2021 №70\8, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук и соответствует специальности 3.1.14 – трансплантология и искусственные органы, а сама автор, Звягина Алена Игоревна, достойна присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук.

Главный научный сотрудник отдела экспериментальной медицины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»,

доктор биологических наук



Кудрявцева Ю.А.

Подпись доктора биологических наук Кудрявцевой Ю.А. заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»

кандидат медицинских наук

«21» августа 2025



Казачек Я.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Почтовый адрес: 650002, г. Кемерово, бульвар имени академика Л.С.

Барбараша, стр. 6

Телефон: 8 (3842) 64-33-08/64-64-10

Электронная почта: kudrua@kemcardio.ru

Адрес в сети интернет: <https://kemcardio.ru>