

ЗВЯГИНА АЛЕНА ИГОРЕВНА

**РОЛЬ СТРУКТУРНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА
В ИНИЦИАЦИИ АСЕПТИЧЕСКОГО КАЛЬЦИНОЗА ХИМИЧЕСКИ
СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ КСЕНОПЕРИКАРДА**

3.1.14 – трансплантология и искусственные органы

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, г. Пущино.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Фадеева Ирина Сергеевна

Официальные оппоненты:

Кудрявцева Юлия Александровна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник отдела экспериментальной медицины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Легонькова Ольга Александровна – доктор технических наук, руководитель отдела перевязочных, шовных и полимерных материалов в хирургии, руководитель испытательного центра Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр хирургии имени А.В. Вишневского» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского».

Защита диссертации состоится «18» сентября 2025 г. в 14.00 часов на заседании Диссертационного Совета ДСТИО 001.21 при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России по адресу: 123182, Москва, ул. Щукинская, дом 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, а также на сайте <http://www.transpl.ru>.

Автореферат разослан «____»

2025 г.

Ученый секретарь

диссертационного Совета ДСТИО 001.21

кандидат ветеринарных наук

Волкова Елена Алексеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Согласно данным Национальной медицинской библиотеки, опубликованным в 2022 году, ежегодно во всём мире проводится более 290 тысяч операций по замене сердечных клапанов [Naso F. et al., 2018]. Прогнозируется, что к 2050 году это число увеличится до 850 тысяч [Naso F. et al., 2018; Wen S. et al., 2022]. Замене подвергаются все типы клапанов, однако почти половину проводимых операций составляет именно замена аортального клапана на механический протез [Musumeci L. et al., 2018]. Механические протезы изготавливают из прочных материалов, таких как титан, углерод или пироуглерод. Они рассчитаны на всю жизнь и очень долговечны [Kostyunin A.E. et al., 2020]. Однако их установка неотъемлемо связана с пожизненным приемом антикоагулянтных препаратов, таких как варфарин, которые необходимы для предотвращения образования тромбов на жесткой поверхности механического протеза [Head S.J. et al., 2017].

С 1960-х годов в клинической практике начали появляться биопротезы клапанов сердца, которые изготавливали сначала на основе алло- и ксенотрансплантатов, а затем из химически стабилизированных ксеногенных перикардальных (перикард крупного рогатого скота) биоматериалов [Cohn L.H. et al., 1989; Carpentier A. et al., 1969]. В отличие от механических протезов, биопротезы не требуют использования антикоагулянтов, обладают лучшими гемодинамическими свойствами и способны к реэндартализации [Marro M. et al., 2021]. Универсальные биомеханические свойства (гибкость, прочность, эластичность) биопротезов клапанов сердца позволили создать транскатетерные техники замены сердечных клапанов, которые значительно снижают операционные риски для пациентов по сравнению с открытой операцией на сердце [Wen S. et al., 2022].

Однако, несмотря на общий прогресс в развитии высокотехнологичной сердечно-сосудистой хирургии, клинические рекомендации до сих пор чаще склоняются в сторону использования механических протезов клапанов сердца [Vahanian A. et al., 2013]. В руководствах «АНА/АСС» (American Heart Association/American College of Cardiology) и «ESC/EACTS» (European Society of Cardiology/European Association for Cardio-Thoracic Surgery) по замене сердечных клапанов от 2017 года указано, что биопротез следует устанавливать только в следующих случаях: если пациент старше 65 лет при установке протеза в аортальном положении или старше 70 лет при установке протеза в митральном положении; если ожидаемая продолжительность жизни пациента составляет менее 10 лет [Baumgartner H. et al., 2017; Nishimura R.A. et al., 2017].

Такие рекомендации обусловлены кратковременным сроком службы биопротезов клапанов сердца, который составляет не более 10-15 лет [Kostyunin A.E. et al., 2020]. По истечении данного срока требуется повторное хирургическое вмешательство для замены утратившего функциональность протеза, которое несёт в себе высокие риски для пациента. Основной причиной выхода из строя биопротезов клапанов сердца, особенно для пациентов молодого возраста, является неизбежная структурная клапанная дегенерация [Dvir D. et al., 2018]. Прогнозируемый риск необходимости хирургической замены биопротеза вследствие структурной клапанной дегенерации составляет 50% для пациентов в возрасте 20 лет [Siddiqui R.F. et al., 2009]. При этом статистические данные указывают, что именно асептический кальциноз является наиболее распространенной формой структурной клапанной дегенерации [Koziaz A. et al., 2020].

Тем не менее, несмотря на до сих пор нерешенную проблему кальциноза химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов, использование биопротезов клапанов сердца значительно расширилось за последние десятилетия даже среди пациентов молодого возраста [Dunning J. et al., 2011; Isaacs A.J. et al., 2015; Siregar S. et al., 2014], что полностью

противоречит клиническим рекомендациям. Необходимость пожизненного приема антикоагулянтов накладывает ряд ограничений, которые значительно влияют на качество жизни, особенно для трудоспособных пациентов. Наиболее значимые из них связаны с ограничениями трудовой деятельности (напряженные и спортивные профессии), физической нагрузки и неблагоприятным исходом беременности и родов [Nishimura R.A. et al., 2017]. Кроме того, ряд заболеваний, таких как диабет, почечная недостаточность, гемофилия и др., имеющих противопоказания к антикоагулянтной терапии, также исключают возможность установки механических протезов. Внедрение в сердечно-сосудистую хирургию высокотехнологичных процедур транскатетерной имплантации и имплантации бесшовных клапанов (упрощение процедуры имплантации и снижение рисков техники «клапан в клапане») также склоняет все большее количество хирургов и пациентов в сторону использования биопротезов клапанов сердца [Head S.J. et al., 2012].

Помимо широкого ряда операций по восстановлению сердечных клапанов, проблема кальциноза актуальна и для других процедур, в которых используются химически стабилизированные ксеноперикардимальные биоматериалы: закрытие ушка левого предсердия, эндоваскулярное лечение аневризмы аорты, замена и реконструкция сосудистых и венозных кондуитов, заплаточная ангиопластика, восстановление дефектов межпредсердной перегородки и многое др. [Texakalidis P. et al., 2018; Shklover J. et al., 2019; Morales M.M. et al., 2021]. В свете всего вышесказанного, выявление механизмов асептического кальциноза химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов и разработка технологий его предотвращения несомненно является актуальной и востребованной задачей.

Этиология асептического кальциноза сердечно-сосудистых биопротезов до сих пор не ясна, однако существует несколько предполагаемых механизмов, которые можно разделить на две группы: (1) активные механизмы (реципиент-зависимый или активный кальциноз) и (2) пассивные механизмы (физико-химический или пассивный кальциноз) [Williams D.F. et al., 2021].

Существующие гипотезы инициации активного кальциноза включают иммунный ответ реципиента (инфильтрация иммунных клеток, экспрессия провоспалительных цитокинов, хемокинов и молекул адгезии и запуск механизмов по типу минерализации внеклеточного матрикса (ВКМ) при ремоделировании костной ткани) и нарушение метаболизма тканей (окисление липопротеинов, образование пенистых клеток и кальцификация по типу атеросклероза) [Williams D.F. et al., 2021].

Пассивные механизмы включают три гипотезы и три ассоциированных с ними подхода подавления асептического кальциноза: (1) возникновение центров кальцификации на клетках донора и клеточном дебрисе и, соответственно использование техник децеллюляризации для предотвращения развития данного механизма, (2) зарождение ядер кристаллизации фосфатов кальция на оставшихся в матриксе фосфолипидах, образовавшихся вследствие неполного их удаления из матрикса и использование спиртов в качестве превентивного подхода для подавления данного типа кальциноза и (3) изменение конформации молекул внеклеточного матрикса и повышение их аффинности к фосфатам кальция, а также возникновение хронического воспаления и источника постоянной гибели клеток реципиента вследствие цитотоксического эффекта глутаральдегида и использование техник подавления реактивности глутарового альдегида за счет инактивации свободных альдегидных групп как способ предотвращения ГА-ассоциированного кальциноза.

В свою очередь, ранее в Лаборатории тканевой инженерии Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук была сформулирована и экспериментально доказана теория о том, что повреждение структуры коллагеновых и

эластиновых волокон внеклеточного матрикса нефиксированных трансплантатов сосудов и клапанов сердца вследствие их децеллюляризации провоцирует их минерализацию независимо от клеток реципиента (пассивный механизм кальциноза сосудов эластического типа) [Фадеева И.С., 2013]. Также, в научной литературе в последнее время все чаще постулируется, что сохранение нативной структуры внеклеточного матрикса способствует снижению иммунного ответа клеток реципиента на биоматериалы на его основе. Одновременно с этим, во многих исследовательских работах показано, что повреждение коллагенового компонента внеклеточного матрикса нефиксированных перикардальных материалов приводит к развитию хронического воспалительного ответа в организме реципиента и интенсивной ферментативной деградации матрикса биоматериалов [Звягина А.И., 2018; Hwang J. et al., 2017; Reing J.E. et al., 2010; Kasravi M. et al., 2023], что, как было указано выше, может инициировать развитие активного кальциноза химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов. При этом многими исследователями отмечается, что даже химически стабилизированные ВКМ-материалы не полностью устойчивы к ферментативной деградации и не являются метаболически инертными [Wen S. et al., 2022], что говорит о возможности дальнейшего их повреждения в ходе иммунного ответа организма реципиента. Таким образом, структурное повреждение внеклеточного матрикса в ходе предимплантационной обработки химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов и их последующая ферментативная деградация в процессе иммунной реакции организма реципиента могут способствовать открытию кальций-связывающих сайтов на поврежденных волокнах коллагена, что обеспечивает пространственное облегчение их кальцификации.

Однако, несмотря на множество имеющихся косвенных данных, указывающих, что повреждение матрикса химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов может быть основной причиной асептического кальциноза, данного прямого утверждения или соответствующей гипотезы в научной литературе не встречается. Это объясняется устоявшимся с 70-х гг. прошлого века представлением о том, что предшествующая этапу обесклеточивания химическая стабилизация ксеноперикарда кросс-сшивающими агентами (прежде всего глутаральдегидом) предотвращает последующее повреждение матрикса при проведении децеллюляризации (в том числе детергентами) и, следовательно, матрикс данных материалов является неповрежденным. Помимо этого, дополнительным ограничивающим фактором является отсутствие прямых данных о влиянии повреждения структуры химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов на их биосовместимость и кальцинозрезистентность, а также отсутствие эффективных методов количественной и качественной оценки структурных повреждений внеклеточного матрикса химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов [Akhyari P. et al., 2011; Mendibil U. et al., 2020].

Таким образом, исходя из предположения, что повреждение внеклеточного матрикса химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов в ходе предимплантационной обработки может влиять на развитие как пассивных, так и активных механизмов кальциноза в работе были поставлены следующие цель и задачи.

Цель исследования

Выявить роль структурных повреждений внеклеточного матрикса ксеноперикарда в инициации асептического кальциноза химически стабилизированных биоматериалов, предназначенных для сердечно-сосудистой хирургии.

Задачи исследования

1. Исследовать структурные изменения внеклеточного матрикса химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов в зависимости от способа их предимплантационной обработки;
2. Изучить влияние структурных повреждений внеклеточного матрикса химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов на процессы зависящего от клеток (активного) асептического кальциноза;
3. Изучить влияние структурных повреждений внеклеточного матрикса химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов на процессы независимого от клеток (пассивного) асептического кальциноза;
4. На основании полученных экспериментальных данных разработать матрикс-сберегающий способ получения химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов, обеспечивающий подавление развития их асептического кальциноза.

Научная новизна

В работе впервые показано, что интенсивность и скорость развития процессов как активного, так и пассивного асептического кальциноза химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов имеет высокую корреляционную связь со степенью предимплантационного повреждения их внеклеточного матрикса. Впервые разработан комплексный подход квантификации предимплантационных повреждений внеклеточного матрикса химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов. Впервые показано, что интенсивность экстракции токсических агентов, используемых в предимплантационной обработке химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов, имеет высокую корреляционную связь со степенью повреждения их 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, и что степень его осаждения также имеет высокую корреляционную связь со степенью повреждения внеклеточного матрикса химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов. В работе представлены авторские методы матрикс-сберегающих предимплантационных обработок химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов и показано, что использование мягких методов, обеспечивающих максимальное сохранение интактности внеклеточного матрикса перикарда, радикально повышает устойчивость химически стабилизированных биоматериалов к развитию как активного, так и пассивного асептического кальциноза.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные расширяют современные представления о первопричинах и механизмах развития кальциноза химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов. Используемые в работе методологические подходы для оценки склонности материалов к активному и пассивному кальцинозу могут быть полезны для усовершенствования протоколов контроля качества и методов выявления кальцификации химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов. Часть полученных данных имеет прямую практическую значимость, а именно: рекомендации исключить из протоколов обработки химически стабилизированных биоматериалов додецилсульфат натрия, глутаровый альдегид и спирты (особенно изопропиловый) в высоких концентрациях; использовать исключительно матрикс-

сберегающие методы предимплантационной обработки химически стабилизированных биоматериалов, обеспечивающие максимальное сохранение интактности внеклеточного матрикса перикарда, в первую очередь коллагена. Проведенная работа может внести значительный вклад в развитие новых подходов создания кальциноз-резистентных долговечных сердечно-сосудистых биопротезов и имплантатов, в основе которых будет лежать принцип матрикс-сберегающего производства химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов.

Методология и методы исследования

Для достижения поставленных задач в работе использовались методы клеточной биологии, биохимии и биофизики. Для выявления степени повреждения химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов после обработки использовались сканирующая электронная микроскопия, а также дифференциальный гистохимический анализ на структурные белковые компоненты внеклеточного матрикса (коллаген и эластин) и гликозаминогликаны.

Для выявления характера взаимодействия клеток с химически стабилизированными ксеноперикардальными биоматериалами после обработки использовались *in vitro* методы исследования цитотоксического и цитостатического эффекта материалов, а также методы оценки динамики численности популяции клеток, включающих проточную цитофлуориметрию и адсорбционную спектроскопию.

Для выявления склонности химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов к активному (зависимому от клеток реципиента) кальцинозу использовали *in vivo* модель гетеротопической (подкожной) имплантации (ISO 10993-6-2023) на срок 8 недель (для оценки клеточно-резорбтивных процессов и деградации материалов) и длительный срок 24 недели (для выявления признаков отсроченного кальциноза). Оценку характера взаимодействия материалов с организмом реципиента и их кальцификации проводили с использованием общегистологических и дифференциальных гистохимических методов исследования.

Для выявления склонности химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов к пассивному кальцинозу условия нормокальциемии моделировали *in vitro* и проводили анализ осажденного кальция с использованием методов спектрофотометрии и гистохимического анализа на депозиты кальция.

Обработку данных проводили с помощью некоммерческого программного обеспечения ImageJ. Для статистического анализа результатов использовали односторонний ANOVA. Корреляцию между изучаемыми переменными оценивали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Статистическая обработка данных производилась с использованием Python 3 (вер. 3.10.10) в среде разработки Spyder (v. 5.4.1) с библиотеками Pandas (v. 1.5.2), Numpy (v.1.24.2) и Scipy (v. 1.5.2) и Scipy (v. 1.5.2). 1.10.0).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Обработка ксеногенного перикарда с применением стандартных реагентов в концентрациях, используемых в производственных протоколах, таких как 1% додецилсульфат натрия, этиловый спирт свыше 50%, изопропиловый спирт в любых концентрациях и глутаральдегид более 0,2%, приводит к значительному повреждению внеклеточного матрикса химически стабилизированных биоматериалов.

2. Интенсивность активного (зависимого от клеток) асептического кальциноза химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов зависит от степени повреждения их внеклеточного матрикса в результате предимплантационной обработки, что приводит к клеточно-ассоциированной протеолитической резорбции материалов через развитие утилизационной кальцификации.

3. Интенсивность пассивного (независимого от клеток) асептического кальциноза химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов зависит от степени повреждения их внеклеточного матрикса в результате предимплантационной обработки, что приводит к неспецифической адсорбции кальций-фосфатных соединений в комплексе с альбумином и жирными кислотами.

4. Применение матрикс-сберегающего метода децеллюляризации и делипидизации химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов, который позволяет сохранить целостность их внеклеточного матрикса в процессе предимплантационной обработки, значительно снижает иммуногенные свойства материалов, повышает их потенциал к репопуляции и обеспечивает подавление развития как пассивных, так и активных механизмов асептического кальциноза.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность полученных результатов диссертации подтверждается применением сертифицированного научного оборудования, высококачественных расходных материалов и современных методик при проведении экспериментов. Анализ результатов выполнен с применением пакетов статистического анализа (MS Excel, SigmaPlot, Python). Результаты, полученные в работе, статистически достоверны и воспроизводимы. Статистическую обработку данных проводили с использованием дисперсионного анализа ANOVA.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на научном форуме «XXIII Съезд Российского физиологического общества имени И.П. Павлова» (Воронеж, 2017), Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов, «Симбиоз - Россия-2017» (Казань, 2017), Всероссийском симпозиуме «Биологическая подвижность» (Пушино, 2019), Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2019), Пушинской конференции молодых ученых «Методы естественно-научных дисциплин» (Пушино, 2019), Всероссийской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы медицины – 2020» (Санкт-Петербург, 2020), Конференции «Экспериментальная и теоретическая биофизика» (Пушино, 2021), Международной конференции «III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов» (Сочи, 2021).

Апробация диссертационной работы состоялась «08» июля 2024 года на открытом межсекционном семинаре Секций Ученого совета «Биофармакология и биоинженерия», «Биотехнология и биобезопасность» и «Биоэнергетика» Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук.

Связь работы с научными программами и темами

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-315-90101 «Выявление основных структурных и биофункциональных факторов внеклеточного матрикса биоматериалов, определяющих процессы направленной регенерации тканей» (2020-2022 гг.) и стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам СП-1813.2021.4 «Выявление ВКМ-ассоциированных факторов интеграции биоматериалов для реконструктивной сердечно-сосудистой хирургии» (2021-2023 гг.).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты диссертационного исследования используются в научно-исследовательской практике лаборатории биомедицинских технологий, лаборатории тканевой инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук. Кроме того, результаты исследований внедрены в программу подготовки научных и научно-педагогических кадров по специальности 1.5.6. Биотехнология в аспирантуре Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук.

Личный вклад автора

Все результаты, представленные в диссертации, были получены соискателем лично, в частности, автор непосредственно выступал инициатором и исполнителем планирования диссертационной работы, включая составление дизайна экспериментов, постановку целей и задач, подбор методов проведения исследований, анализ российских и зарубежных источников литературы, а также проведения всего спектра исследований, представленных в работе. Автором лично проводились подбор протоколов изготовления химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов и получение экспериментальных образцов биоматериалов из бычьего перикарда, гистологический анализ и биоимиджинг повреждений внеклеточного матрикса изготовленных биоматериалов после обработки, *in vitro* исследования цитотоксичности и цитостатичности экспериментальных биоматериалов, а также *in vivo* и *in vitro* исследования склонности экспериментальных биоматериалов к асептическому кальцинозу, включая анестезию и проведение хирургических операций на лабораторных животных, дифференциальный гистохимический анализ, цифровой биоимиджинг полученных гистологических изображений, анализ полученных результатов и статистическая обработка данных.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 19 научных работ, в том числе 4 статьи, индексируемые в международных наукометрических базах данных, из них 2 статьи в журналах, включенных в перечень рецензируемых научных изданий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; более 15 тезисов в сборниках материалов конференций. Получен патент РФ на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа 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, из них 7 – отечественных и 339 – зарубежных авторов. Работа изложена на 150 страницах машинописного текста, проиллюстрирована 38 рисунками и содержит 10 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В работе использовались химически стабилизированные ксеноперикардальные биоматериалы (хсКПБ), полученные из бычьего перикарда здоровых половозрелых животных с помощью протоколов, представленных в таблице 1.

Таблица 1 – Отобранные для корреляционного анализа протоколы обработки химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов

Группа	Химическая стабилизация	Децеллюляризация	Делипидизация	Консервация и хранение
A1	0,625% ГА, 4% ФА	1% ДСН	0,9% NaCl	0,1% ГА, 20% ЭтС
A2	0,5% ГА	1% ДСН	70% ИзС, 90% ЭтС	0,1% ГА, 20% ЭтС
Б1	0,2% ГА	0,02% ЭДТА, 0,25% ТрХ, 0,25% ДХНм	35% ИзС	0,1% ГА, 20% ЭтС
Б2	0,2% ГА	0,02% ЭДТА, 0,25% ТрХ, 0,25% ДХНм	35% ИзС	0,25% Дн, 20% ЭтС
В1	0,2% ГА	0,02% ЭДТА, 0,25% ТрХ, 0,25% ДХНм	30% ЭтС	0,25% Дн, 20% ЭтС
В2	0,2% ГА	0,02% ЭДТА, 0,25% ТрХ, 0,25% ДХНм	30% ЭтС	0,1% ГА, 20% ЭтС

ГА – глутаровый альдегид, ФА – формальдегид, ДСН – додецилсульфат натрия, ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота, ТрХ – тритон X100; ДХНм – дезоксихолат натрия моногидрат, ИзС – изопропиловый спирт, ЭтС – этиловый спирт, Дн – диоксидин

Согласно известным представлениям о воздействии общепринятых агентов обработки хсКПБ на их внеклеточный матрикс (ВКМ), используемые в работе протоколы обработки были разделены на следующие категории: (1) агрессивные методы обработки (группы А1 и А2); (2) методы обработки, предположительно оказывающие умеренное воздействие на матрикс (группы Б1 и Б2); (3) авторские матрикс-сберегающие методы обработки (патент РФ №2678966), (группы В1 и В2). В качестве материалов сравнения также использовались нативный бычий перикард (группа Н) и образцы (створки) коммерческого биопротеза «PERIMOUNT Plus» (Edwards Lifesciences, США), (группа Edw).

Степень повреждения поверхности *p.serosum* обработанных хсКПБ в лиофилизированном состоянии оценивалась с помощью сканирующей электронной микроскопии (VEGA3, Tescan, Чехия). Структурные изменения коллагенового ВКМ хсКПБ после обработки оценивали на основе гистологического анализа. Оценку цитотоксического и цитостатического воздействия материалов *in vitro* проводили с использованием культуры эмбриональных фибробластов мыши линии NIH/3T3 (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург) в трех модельных условиях: (1) посев клеток на образцы хсКПБ в стандартных условиях (20 минут в стерильном физ. р-ре); (2) посев клеток на дополнительно отмытые образцы хсКПБ (4 суток в р-ре питательной среды DMEM с 20% сыворотки крови КРС); (3) инкубация клеток с экстрактами из хсКПБ. Оценку жизнеспособности и пролиферативной активности клеток на материалах проводили с использованием флуоресцентной микроскопии (DM 6000, Leica, Германия) и проточной цитометрии (Accuri C6 BD Bioscience, США). Оценка биологического действия и активной

(зависимой от клеток реципиента) кальцификации хсКПБ *in vivo* проводилась согласно стандарту ISO 10993-6. Для гистологических исследований эксплантированных образцов использовались дифференциальные гистохимические окраски Н&Е, альциановым синим-ШИК, методами Трихром по Лилли и МакГи-Рассела [Lillie, R.D, 1969]. Гистоморфометрический анализ полученных гистологических изображений проводился с использованием программного обеспечения ImageJ (версия 1.54h, NIH, Bethesda, MD, США). Степень пассивной физико-химической кальцификации хсКПБ оценивали методом адсорбционной спектроскопии (Infinity F200, Tecan, Австрия) с помощью набора для определения кальция (Calcium AS FS Arsenazo III, DiaSys, Germany). Для этого проводили *in vitro* инкубацию хсКПБ в модельных средах, имитирующих условия сыворотки крови и тканевой жидкости с нормальным содержанием кальция и фосфатов: (1) 2,5 мМ р-р CaCl_2 в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) без ионов магния (Panreac Química, Испания); (2) 2,5 мМ CaCl_2 в ФСБ, содержащий 5% бычьего сывороточного альбумина V фракции (0,02 мг/г жирных кислот) (АлбV) (Amresco, США); (3) 2,5 мМ CaCl_2 в ФСБ, содержащий 5% делипидизированного альбумина (АлбДЛ) (Amresco, США).

Таблица 2 – Интерпретация коэффициента ранговой корреляции Спирмена

Абсолютное значение r_{xy} (coeff)	Теснота (сила) корреляционной связи
<0,3	слабая
0,3 – 0,5	умеренная
0,5 – 0,7	заметная
0,7 – 0,9	высокая
>0,9	весьма высокая

Для статистического анализа результатов использовали односторонний ANOVA. Корреляцию между изучаемыми переменными оценивали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (таблица 2). Статистическая обработка данных производилась с использованием Python 3 (вер. 3.10.10) в среде разработки Spyder (v. 5.4.1) с библиотеками Pandas (v. 1.5.2), Numpy (v.1.24.2) и Scipy (v. 1.5.2) и Scipy (v. 1.5.2). 1.10.0).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования структурных изменений внеклеточного матрикса химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов в зависимости от способа предимплантационной обработки

При оценке повреждения структуры хсКПБ после обработки в качестве контроля использовали нативный перикард (группа Н). Для каждой группы была тщательно изучена поверхность *p. serosum* на предмет «оголения» лежащего под базальной мембраной коллагенового слоя, а также разрывов и разволокнения коллагеновых волокон.

Наибольшие структурные повреждения поверхности наблюдались в группе А1, что проявлялось в частичном отслоении *p. serosum* (оголение) и сильном разволокнении подлежащих волокон (рис. 1). В группах А2 и Б2 повреждения поверхности характеризовались частичным прободением верхнего слоя поверхности и разволокнением подлежащих волокон. В группе Б1, а также в группах В1 и В2, серозная поверхность не имела выраженных повреждений.

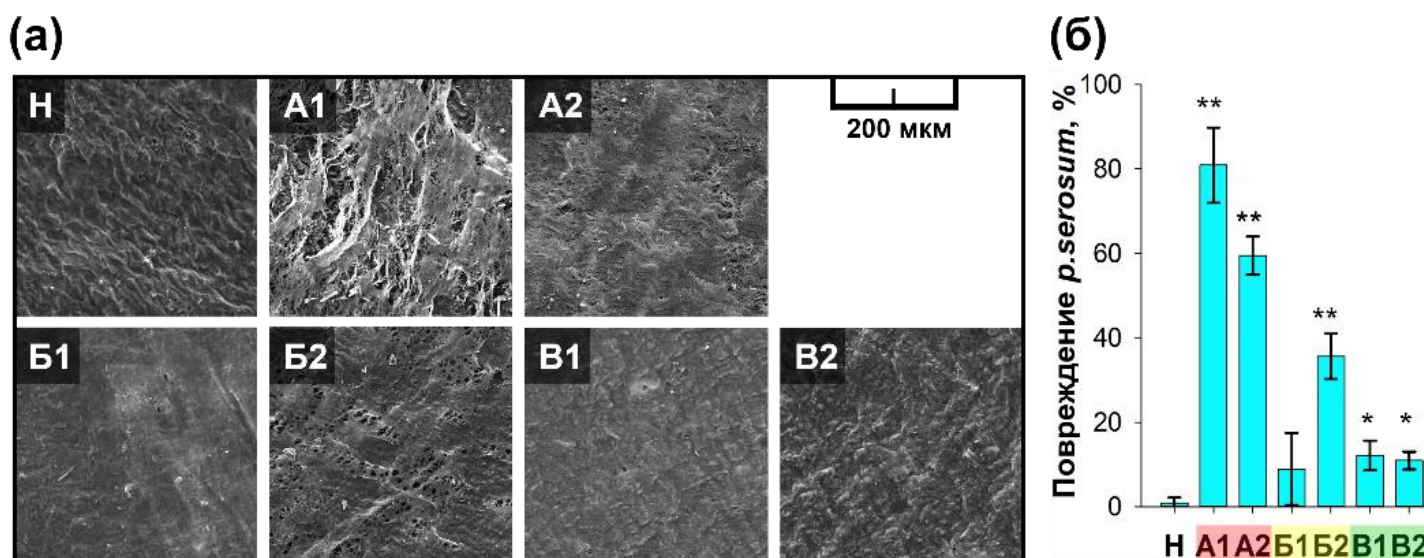


Рисунок 1 – Структура поверхности *p. serosum* нативного перикарда и химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов после обработки и результаты биоимиджинга полученных изображений (а) – сканирующая электронная микроскопия; (б) – результаты биоимиджинга и обчета изображений, $n=16$, $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,001$ относительно контроля (тест Холма-Сидака)

При гистологическом анализе матрикса материалов после обработки образцы исследовались на наличие признаков структурной дезорганизации ВКМ, участков микроразрывов, слияния и разволокнения коллагеновых фибрилл.

Наибольшая сохранность структуры ВКМ наблюдалась в образцах групп В1 и В2 (рисунок 2). Не смотря на высокую целостность *p. serosum*, в группе Б1 были выявлены повреждения коллагенового матрикса: слияние и микроразрывы коллагеновых волокон, а также поперечное растрескивание матрикса материалов со стороны *p. fibrosum*. В группах А1 и А2 наблюдалось продольное и поперечное растрескивание и уплотненная структура матрикса, что типично для перефиксированных материалов. В группе Б2 отмечены истончение, выпрямление и сильное разволокнение коллагеновых волокон.

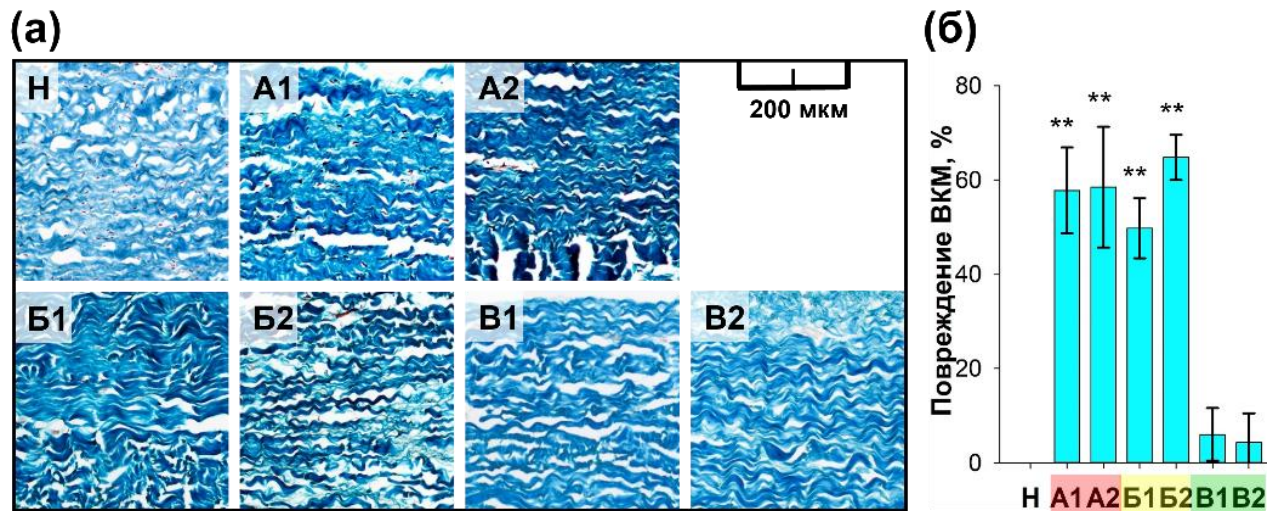


Рисунок 2 – Структура внеклеточного матрикса нативного перикарда и химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов после обработки и результаты биоимиджинга полученных изображений: (а) – световая микроскопия, окраска трихром по Лилли: collagen – сине-зеленый, ядра клеток – черно-коричневые, неколлагеновые компоненты – красно-малиновые; (б) – результаты биоимиджинга и обчета изображений, $n=16$, $**p \leq 0,001$ относительно контроля (тест Холма-Сидака)/ ВКМ – внеклеточный матрикс

Для всех исследуемых групп также было характерно фуксинофильное насыщение коллагеновых волокон, что может быть связано как с повреждением коллагенового матрикса, так и с концентрацией ГА, поскольку наименьшая степень фуксинофилии наблюдалась для образцов групп В1 и В2, а наибольшая для А1 (рисунок 3). В образцах всех исследуемых групп после обработки кислые ГАГ, наблюдавшиеся в структуре базальной мембраны *p.serosum* в нативных образцах, обнаружены не были (рисунок 3).

Таким образом, наибольшей степенью повреждения как поверхности *p.serosum*, так и самого ВКМ обладали группы А1, А2, и В2, а наименьшей – группы В1 и В2 (таблица 3). Результаты проведенного анализа показали, что использование додецилсульфата натрия и спиртов в высоких концентрациях, изопропилового спирта особенно, оказывает выраженное повреждающее воздействие на ВКМ перикарда (группы А1-В2).

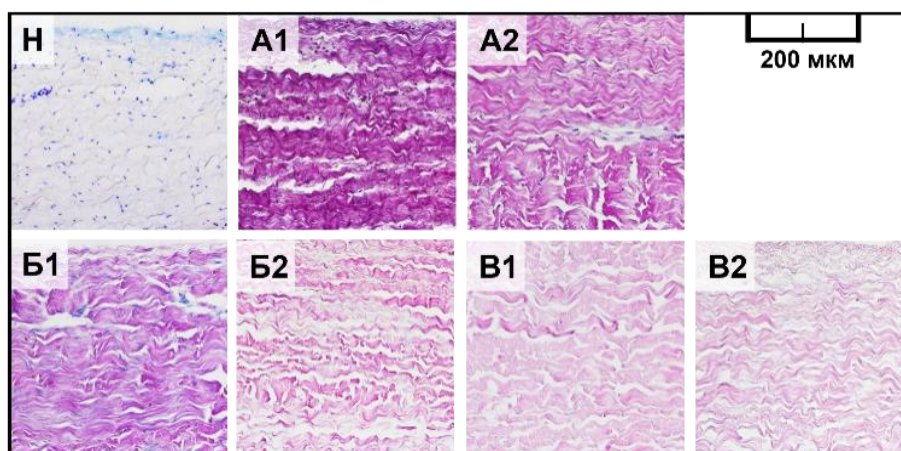


Рисунок 3 – Структура внеклеточного матрикса нативного перикарда и химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов после обработки, световая микроскопия, окраска альциановым синим-ШИК: ядра клеток – фиолетовые, кислые гликозаминогликаны – голубые, нейтральные гликозаминогликаны и свободные альдегидные группы – розовые

Таблица 3 – Сводная степень повреждения химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов в зависимости от их предимплантационной обработки

Гр	ХС	Дц	Дл	КХ	Повреждение, %		
					Р.с.	ВКМ	Ср.знач.
A1	0,625% ГА	1% ДСН	NaCl	ГА, ЭтС	80,9±8,9	57,8±9,1	69,35
A2	0,5% ГА	1% ДСН	70% ИзС 90% ЭтС	ГА, ЭтС	59,5±4,5	58,5±12,8	59,02
B1	0,2% ГА	ТрХ, ДХНм	35% ИзС	ГА, ЭтС	8,9±8,5	49,8±6,4	29,33
B2	0,2% ГА	ТрХ, ДХНм	35% ИзС	Дн, ЭтС	35,6±5,4	64,8±4,8	50,22
B1	0,2% ГА	ТрХ, ДХНм	30% ЭтС	Дн, ЭтС	12,1±3,5	6,0±5,6	9,07
B2	0,2% ГА	ТрХ, ДХНм	30% ЭтС	ГА, ЭтС	10,9±2,1	4,3±6,2	7,6

Гр – группа; ХС – химическая стабилизация; Дц – децеллюляризация; Дл – делипидизация; Р.с. – р.serosum; КХ – консервация и хранение; ГА – глутаровый альдегид; ТрХ – тритон X-100; ДСН – додецилсульфат натрия; ДХНм – дезоксихолат натрия моногидрат; ИзС – изопропиловый спирт; ЭтС – этиловый спирт; Дн – диоксидин

Использование ГА в концентрации выше 0,2% вносит значимые изменения в пространственную организацию волокон коллагена и нарушает тем самым общую структуру ВКМ (группы A1 и A2). Также можно предположить, что использование ГА в качестве компонента растворов хранения, способствует визуальному восстановлению макроструктуры серозной поверхности материалов, что наблюдалось для материалов групп B1 в сравнении с B2, однако повреждения толщи ВКМ при этом сохраняются. При сильном повреждении поверхности, как в случае групп A1 и A2, ГА в составе растворов хранения на состояние поверхности не влияет.

Результаты исследований влияния структурных изменений внеклеточного матрикса на инициацию процессов активного асептического кальциноза химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов

В *in vitro* исследованиях цитотоксичности в качестве контроля использовались клетки, посеянные на культуральный пластик (К).

Было показано, что в условиях стандартной отмывки образцов все группы хсКПБ обладают высокой токсичностью для клеток (через 96 часов культивирования количество живых клеток не превышало 10,3±6,2%) (рисунок 4а).

Дополнительная отмывка существенно подавляла цитотоксическое действие материалов групп B2, B1 и B2, (выживаемость клеток не менее 80%) и частично групп A2 и B1, но не препятствовала цитотоксичности образцов группы A1 (выживаемость клеток не превышала 15%) (рисунок 4б). Исследование бесконтактной цитотоксичности показало, что экстракты из всех исследуемых групп обладают высокой токсичностью для клеток (рисунок 4в).

При анализе динамики численности клеточных популяций было обнаружено, что прирост количества клеток, культивируемых на образцах всех групп хсКПБ без предварительной отмывки, полностью отсутствовал. Также было показано снижение числа клеток, вследствие выраженного цитотоксического действия экспериментальных образцов (рисунок 4г). После дополнительной отмывки образцы биоматериалов групп A1, A2 и B1 не только препятствовали приросту клеток, но и способствовали снижению их количества вследствие высокой цитотоксичности (рисунок 4д). В случае образцов групп B2, B1 и B2 снижения количества клеток не происходило, но прироста количества клеток также не было зарегистрировано, что может быть обусловлено как модификацией поверхности

образцов после обработок, так и слабой экстракцией токсических веществ из образцов биоматериалов данных групп.

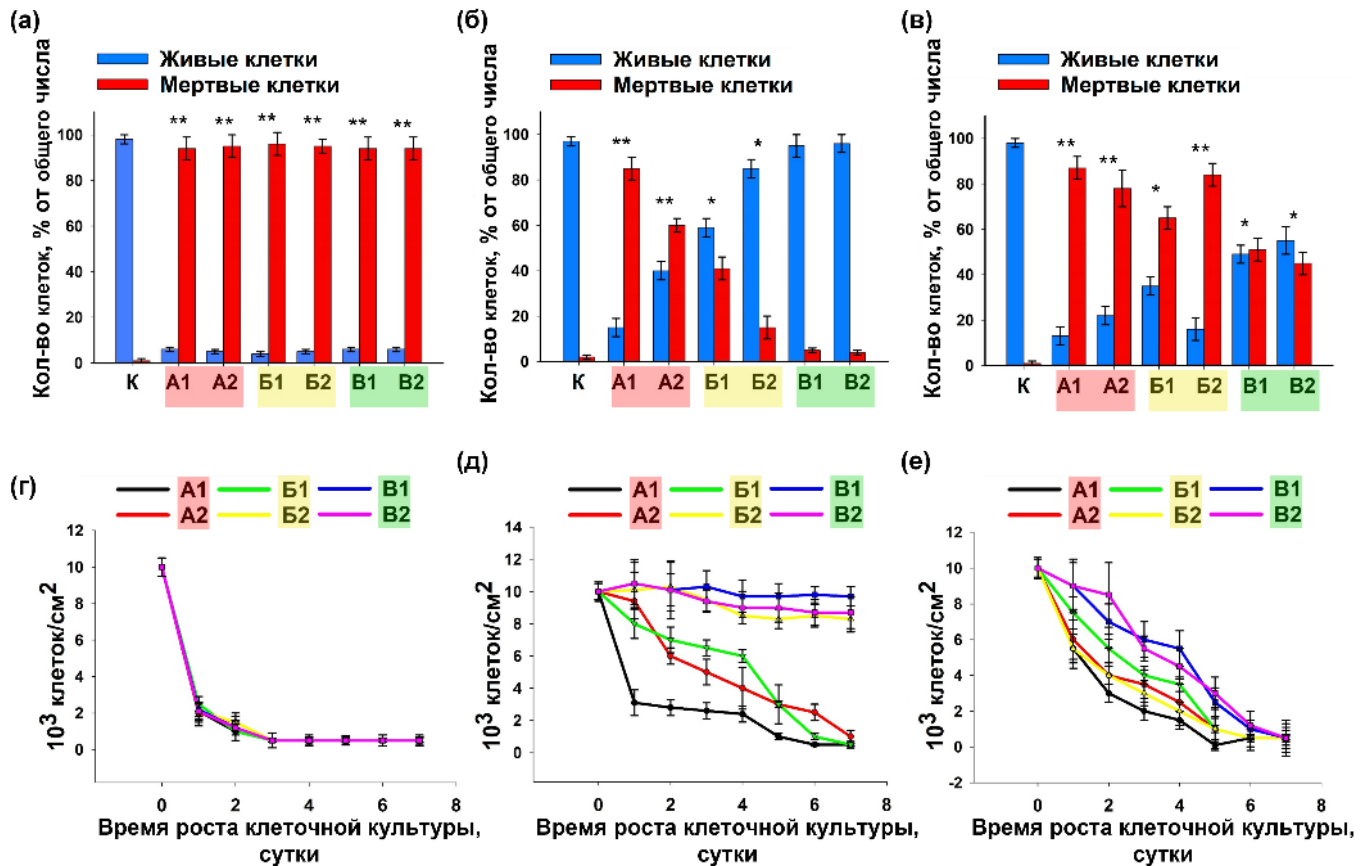


Рисунок 4 – Результаты *in vitro* исследований экспериментальных материалов при их сокультивировании с клетками NIH/3T3, $n = 5$, $*p \leq 0,05$, $**p < 0,001$ относительно контроля (U-критерий Манна-Уитни) (а) контактная цитотоксичность экспериментальных биоматериалов в условиях стандартной отмывки после 96ч культивирования; (б) контактная цитотоксичность экспериментальных биоматериалов в условиях дополнительной отмывки после 96ч культивирования; (в) бесконтактная цитотоксичность экстрактов экспериментальных биоматериалов после 96ч культивирования; (г) кривые роста клеток при их культивировании на поверхности отмываемых по стандартной методике экспериментальных биоматериалов; (д) кривые роста клеток при их культивировании на поверхности дополнительно отмываемых экспериментальных биоматериалов; (е) кривые роста клеток при их культивировании в присутствии экстрактов из экспериментальных биоматериалов

Также было показано, что экстракты из биоматериалов всех групп не только препятствуют приросту количества клеток, но и способствуют снижению их количества, вследствие выраженного цитотоксического действия (рисунок 4е).

Так как одним из основных предполагаемых механизмов развития активного кальциноза является развитие иммунной реакции для всех материалов были тщательно изучены интенсивность и характер клеточной миграции после 8 недель имплантации (срок хронического воспаления).

Морфологический анализ эксплантированных после 2 мес. образцов показал, что клетки наиболее активно мигрируют в пограничные слои матрикса преимущественно с фиброзной стороны (рисунок 5а). При этом в материалах группы Б1 клеточная миграция в толщу матрикса практически полностью отсутствовала, что может быть связано с сохранением высокой цитотоксичности и с более медленной экстракцией цитотоксичных агентов из материалов данной группы.

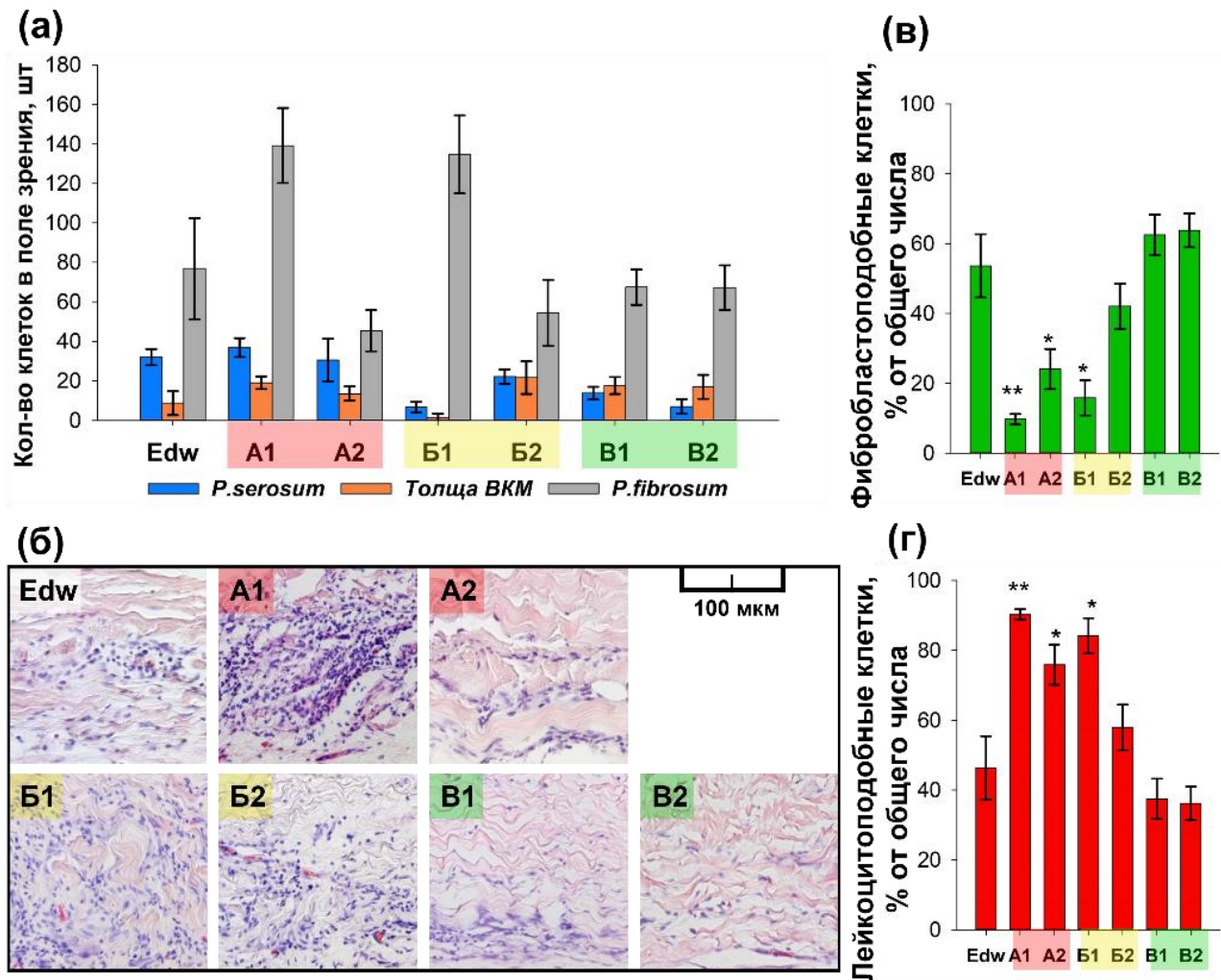


Рисунок 5 – Состав популяции клеток, мигрировавших в пограничные слои матрикса химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов после 8 недель гетеротопической имплантации: (а) миграция клеток реципиента в различные слои матрикса; (б) пограничные слои матрикса экспериментальных образцов, световая микроскопия, окраска Н&Е: ядра клеток – темно-фиолетовые, компоненты матрикса – розовые; (в) и (г) отношение фибробласто- и лейкоцитоподобных клеток соответственно к общему числу мигрировавших клеток, $n=16$, $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,001$ относительно контроля (тест Холма-Сидака)

Анализ морфологии мигрировавших клеток показал, что в группах А1 и Б1 более 80% клеток имели небольшие округлые ядра (лейкоцитоподобные), что указывает на очаговую гистиолимфоцитарную инвазию (рисунок 5б). В контрольной группе Edw клетки были представлены лейкоцито- и фибробластоподобными клетками в равной степени. В группах В1 и В2 доля лейкоцитоподобных клеток не превышала 45% (рисунок 5в и 5г).

Дальнейший анализ коллагенового матрикса экспериментальных материалов показал, что участки лейкоцитарной инвазии локализованы с областями резорбции ВКМ во всех группах, что указывает на классический клеточный характер утилизации поврежденных коллагеновых компонентов матрикса (рисунок 6).

После 8 недель имплантации в группах А1 и Б1 выявлялась наиболее выраженная клеточная утилизация матрикса, площадь резорбции составляла $38,12 \pm 2,39$ и $29,66 \pm 1,09$ % соответственно (рисунок 6а, таблица 4). При этом для материалов всех групп было характерно сохранение целостности основной толщи матрикса. Исключение составила группа Б2, где пограничная резорбция

имела очаговый характер, а также наблюдались небольшие области локальной резорбции срединной толщи матрикса.

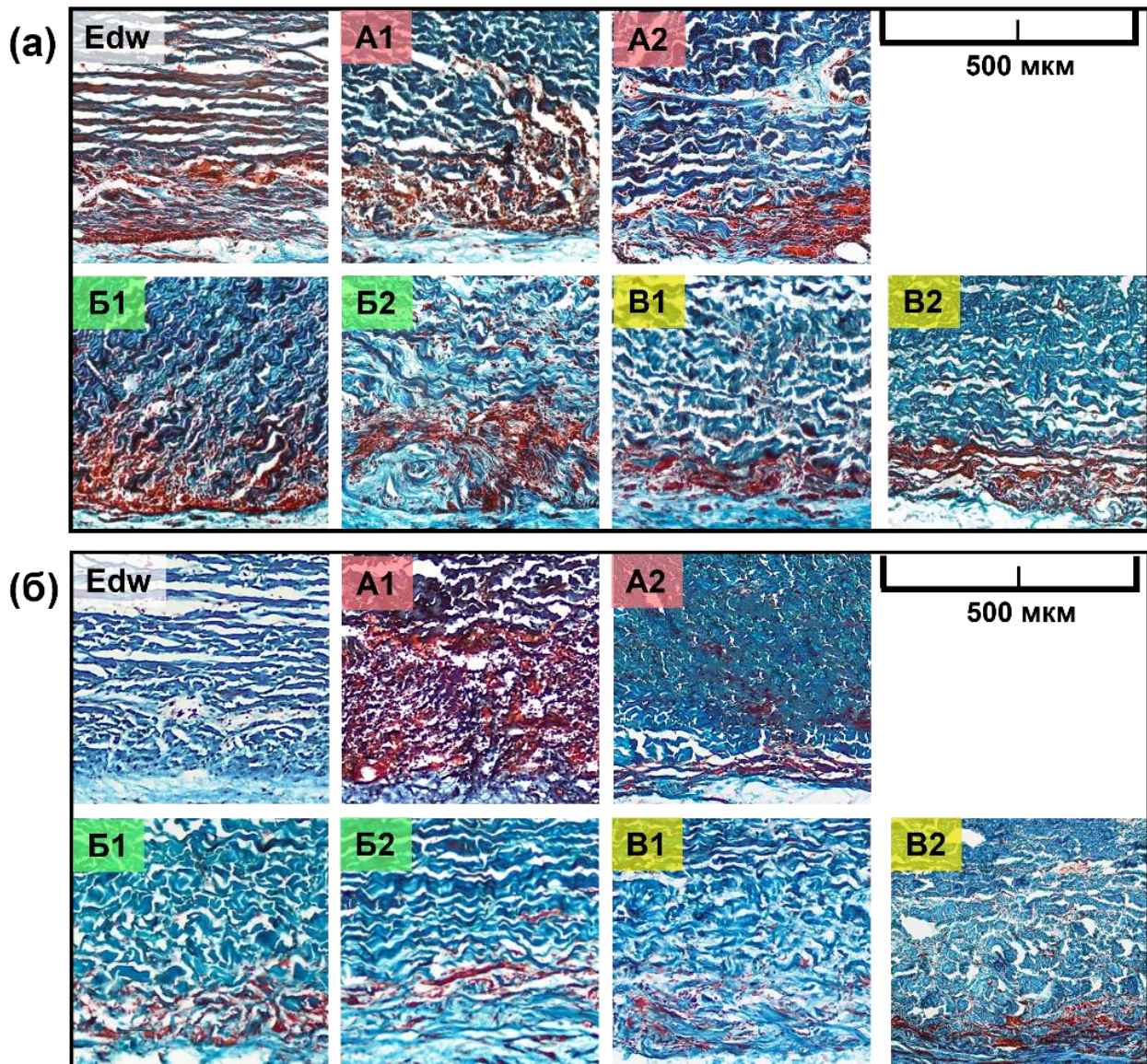


Рисунок 6 – Гистологический анализ резорбции химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов через 8 (а) и 24 (б) недели после имплантации, световая микроскопия, окраска трихромом по Лилли: collagen – сине-зеленый, ядра клеток – черно-коричневые, неколлагеновые компоненты – красно-малиновые

После 24 недель имплантации интенсивность резорбции матрикса материалов всех групп снизилась, площадь резорбции не превышала 15% (рисунок 6б, таблица 4). Исключение составила группа A1, где резорбция достигла 50%. В группах B1 и B2 признаков активных резорбтивных процессов на всех сроках имплантации обнаружено не было.

Для образцов группы A2 процессы патологического кальциноза наблюдались уже через 2 месяца имплантации (рисунок 7а). При этом для минерализованных образцов данной группы на этих сроках имплантации были также характерны не самые высокие показатели резорбции коллагенового матрикса (таблица 4). Группы B1 и B2 подверглись минерализации только на более поздних сроках имплантации (24 недели), что происходило также на фоне значительного снижения интенсификации клеточно-резорбтивных процессов (таблица 4, рисунок 6б). При этом в группе B1 интенсивность кальцификации была относительно низкой, что может быть связано с низкой степенью репопуляции срединной толщи матрикса клетками реципиента. В группе A1, в которой не наблюдалось признаков

развития асептического кальциноза, наблюдалась активная клеточная резорбция с миграцией большого количества резорбирующих клеток даже на поздних сроках имплантации. Группы B1, B2 и Edw не проявили признаков кальцификации на протяжении всего наблюдаемого срока.

Таблица 4 – Сравнительный анализ показателей резорбции и кальцификации химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов

Группа	8 недель		24 недели	
	Резорбция, %	Кальциноз, %	Резорбция, %	Кальциноз, %
Edw	$11,4 \pm 1,21$	0	$2,6 \pm 1,05$	0
A1	$38,12 \pm 2,39$	0	$49,22 \pm 6,93$	0
A2	$15,86 \pm 3,45$	$33,8 \pm 5$	$10,36 \pm 1,15$	$79,7 \pm 9,3$
B1	$29,66 \pm 1,09$	0	$10,08 \pm 2,05$	$15,3 \pm 4$
B2	$20,36 \pm 1,33$	0	$12,79 \pm 1,1$	$65,5 \pm 7,5$
B1	$10,46 \pm 1,88$	0	$6,12 \pm 1,41$	0
B2	$12,58 \pm 3,65$	0	$9,3 \pm 1,13$	0

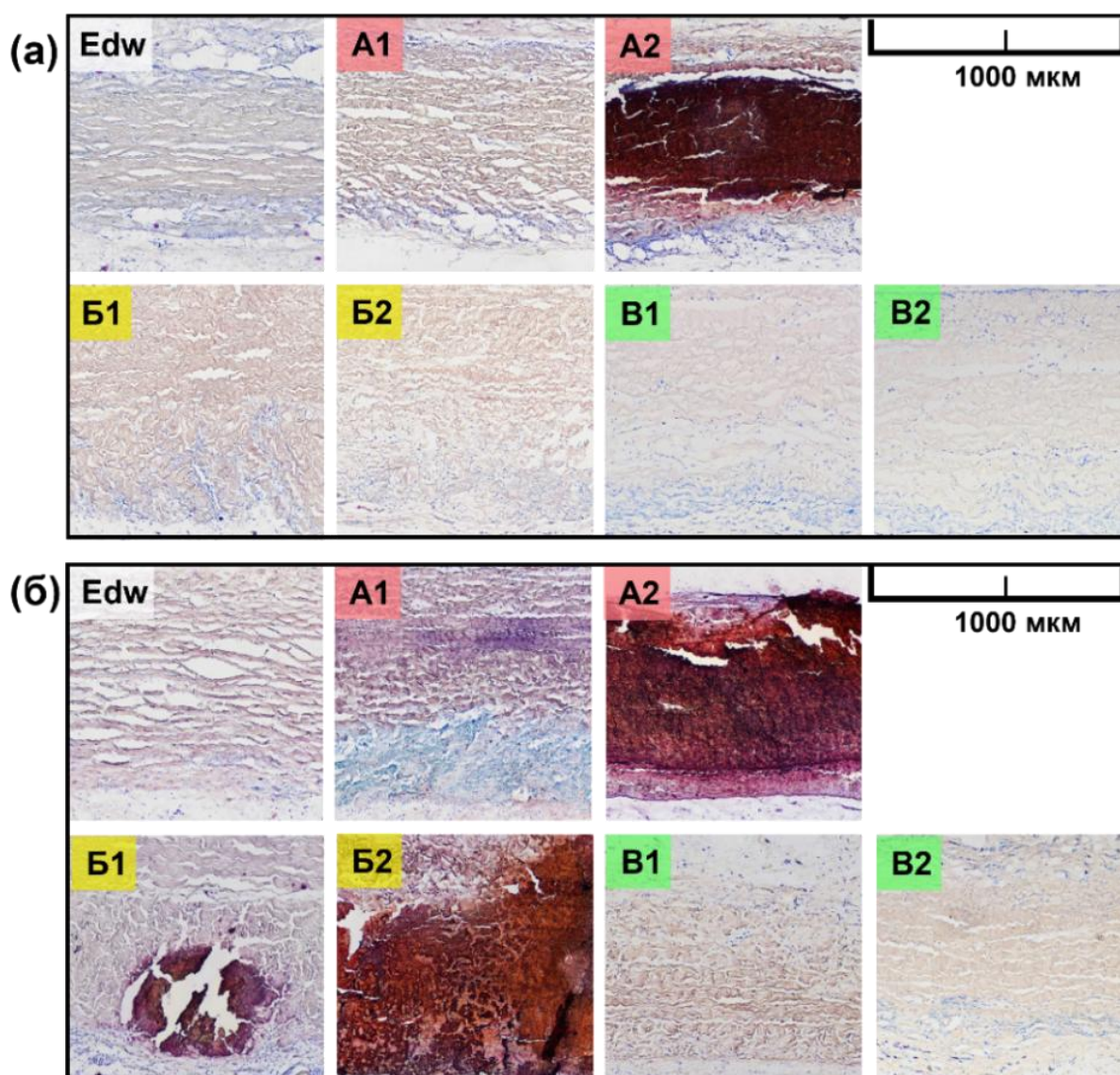


Рисунок 7 – Гистохимический анализ кальцификации химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов через 8 (а) и 24 (б) недели после имплантации, световая микроскопия, окраска ализариновым красным S по МакГи-Расселу: соли кальция – темно-красные/красно-малиновые, ядра клеток – темно-синие, цитоплазма клеток и внецитоплазматические базофильные структуры дезорганизованного матрикса – голубой

Корреляционный анализ показал высокую корреляцию между миграцией лейкоцитоподобных клеток и повреждением матрикса материалов ($r_{xy} > 0,7$) (рисунок 8б), подтверждающую, что наблюдаемый иммунный ответ в группах с установленным повреждением ВКМ развивался непосредственно на ассоциированные с повреждением молекулярные паттерны коллагеновых фибрилл (DAMP-ассоциированный иммунный ответ). Также была обнаружена высокая корреляция между миграцией клеток и цитотоксичностью хсКПБ (рисунок 8а). Таким образом, поврежденный в ходе предимплантационной обработки хсКПБ способствует привлечению большего количества лейкоцитоподобных клеток, что обуславливается сразу двумя факторами: гибелью клеток реципиента при контакте с токсичным материалом и развитием хронического воспаления в ответ на поврежденный коллаген.

Также была обнаружена высокая корреляция между кальцификацией хсКПБ и их контактной цитотоксичностью ($r_{xy} > 0,7$). Однако, как видно из рисунка 9а, материалы с высокой и низкой цитотоксичностью могут интенсивно кальцифицироваться (группы А2 и В2), что указывает на влияние третьего параметра, который может влиять и на выживаемость клеток на материале и на кальцификацию хсКПБ. Таким параметром может быть степень повреждения ВКМ хсКПБ, для которой корреляционная связь с показателем цитотоксичности определялась как высокая (рисунок 9б), а с показателем кальцификации – как весьма высокая (рисунок 9в).

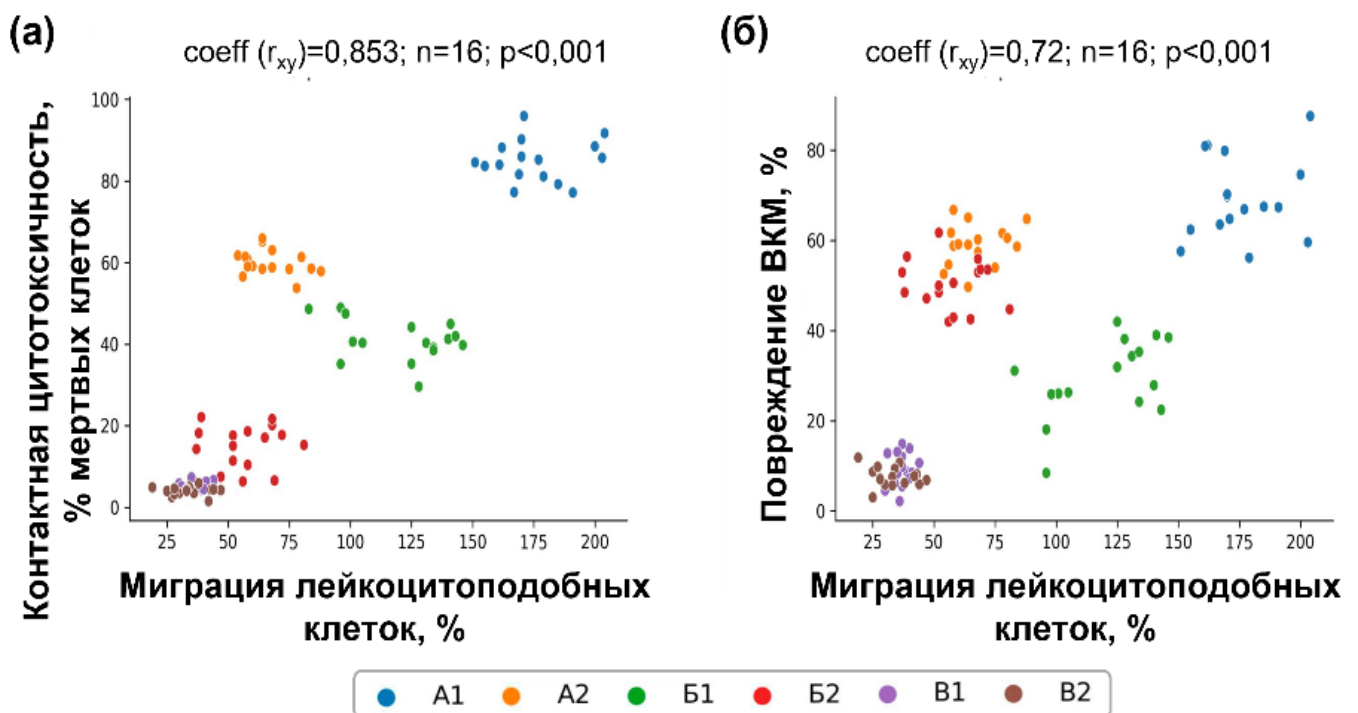


Рисунок 8 – Коэффициент ранговой корреляции Спирмена между показателями: (а) контактной цитотоксичности экспериментальных биоматериалов в условиях их дополнительной отмывки и миграцией лейкоцитоподобных клеток в матрикс экспериментальных биоматериалов после 24 недель гетеротопической имплантации; (б) степени повреждения экспериментальных биоматериалов после обработки и миграцией лейкоцитоподобных клеток в матрикс экспериментальных биоматериалов после 24 недель гетеротопической имплантации/ ВКМ – внеклеточный матрикс

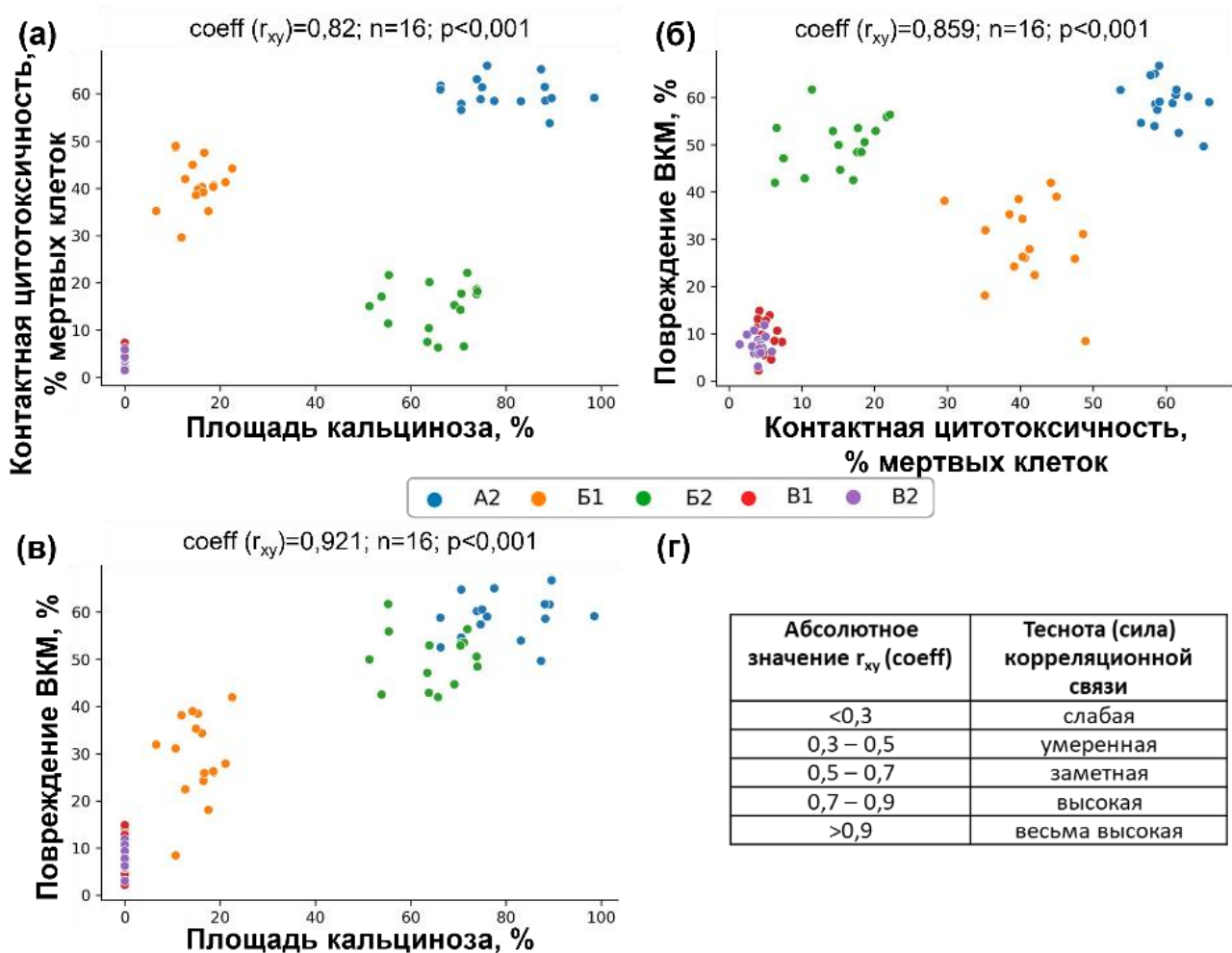


Рисунок 9 – Коэффициент ранговой корреляции Спирмена между показателями: (а) контактной цитотоксичности экспериментальных биоматериалов в условиях их дополнительной отмывки и площадью кальцификации матрикса экспериментальных биоматериалов после 24 недель имплантации; (б) общего повреждения экспериментальных биоматериалов после обработки и контактной цитотоксичностью экспериментальных биоматериалов в условиях их дополнительной отмывки; (в) степени повреждения экспериментальных биоматериалов после обработки и площадью кальцификации матрикса экспериментальных биоматериалов после 24 недель имплантации; (г) интерпретация коэффициента ранговой корреляции Спирмена/ ВКМ – внеклеточный матрикс

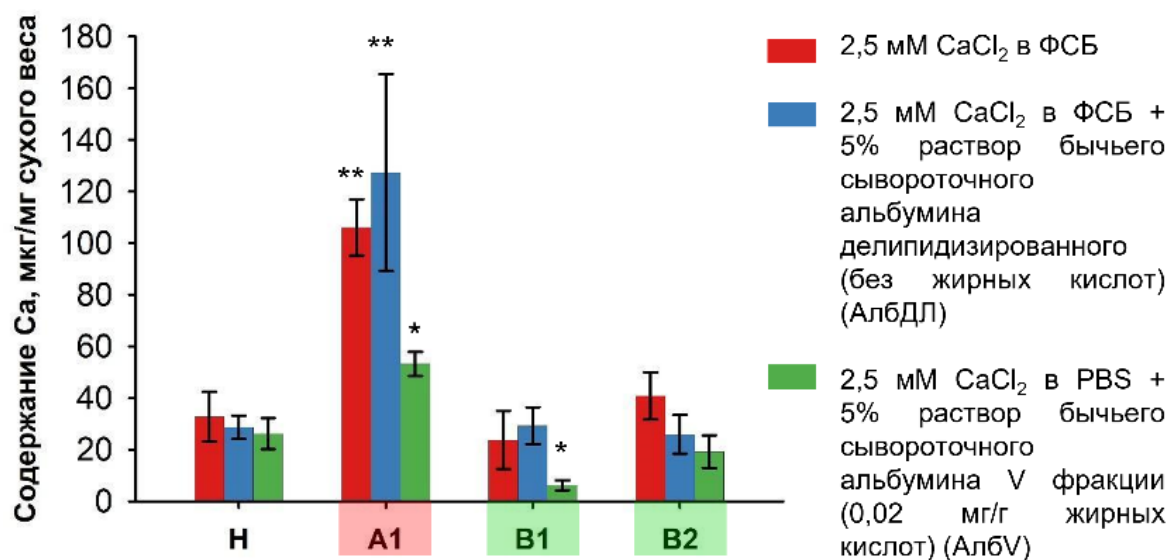
Таким образом повреждение структуры ВКМ хсКПБ в ходе их предимплантационной обработки может способствовать сразу двум механизмам развития асептического кальциноза: более интенсивной экстракции цитотоксичных веществ из биоматериалов (ГА-ассоциированный кальциноз) и развитию более интенсивного иммунного ответа по DAMP-ассоциированному механизму (Иммуно-ассоциированный кальциноз).

Результаты исследования влияния структурных изменений внеклеточного матрикса на инициацию процессов пассивного асептического кальциноза химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов

Так как для групп А2, Б1 и Б2 была установлена склонность к активному асептическому кальцинозу, результаты исследования данных групп не были представлены в данном разделе. В качестве дополнительного контроля были исследованы образцы нативного перикарда (Н).

Из рисунка 10 видно, что нативный контроль минерализовался достаточно активно (содержание кальция $32,8 \pm 9,6$ мкг/мг), что объясняется наличием в матриксе перикарда клеток

донора и клеточного дебриса, которые, как известно, могут выступать центрами инициации пассивного кальциноза. При культивировании материалов в растворах ФСБ и ФСБ+АлбДЛ, уровень содержания кальция для группы А1 превышал нативный контроль более чем в 3 раза. При этом содержание кальция в группах В1 и В2 значимо не отличалось от контроля. При культивации материалов в растворе с АлбV, количество депонированного кальция снижалось для групп А1 и В1, но значительно не снижалось для групп Н и В2.



ФСБ – фосфатно-солевой буфер; АлбДЛ – делипидизированный альбумин; АлбV – альбумин V фракции

Рисунок 10 – Содержание минерализованного кальция в химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалах после 40 суток инкубации в растворах, имитирующих условия нормокальциемии, $n = 5$, $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,001$ относительно контроля (U-критерий Манна-Уитни)

При морфологическом анализе образцов после инкубации в растворах без альбумина и с обезжиренным альбумином было обнаружено, что осаждение кальций фосфатных соединений происходит по типу поверхностного осаждения депозитов кальция преимущественно со стороны фиброзной поверхности материалов и не происходит в толще матрикса (рисунок 11а и 11б).

После инкубации образцов в растворе, содержащем альбумин с содержанием жирных кислот, депозиты кальция на материалах располагались строго локально и имели специфическую концентрическую форму, характерную для метастатического кальциноза, наблюдаемого в кальцинированных биопротезах, извлеченных из системного кровотока. По-видимому, в данном случае именно адсорбирующийся на материале комплекс «альбумин–кальций–жирные кислоты» является структурной формой пассивного кальциноза поврежденных хсКПБ. Учитывая тот факт, что только для группы А1 (наиболее поврежденной) кальциноз наблюдался во всей толще матрикса, можно предположить, что в случае значительных повреждений ВКМ для белков облегчена диффузия вглубь матрикса и при этом адсорбция белка наиболее интенсивно происходит непосредственно на поврежденном коллагене, и роль линкера как с компонентами матрикса, так и (скорее всего) с соединениями кальция могут играть связанные с альбумином жирные кислоты.

На основе полученных данных была выявлена прямая корреляция между степенью повреждения внеклеточного матрикса и интенсивностью пассивного осаждения минерализованного кальция на компонентах внеклеточного матрикса (таблица 5).

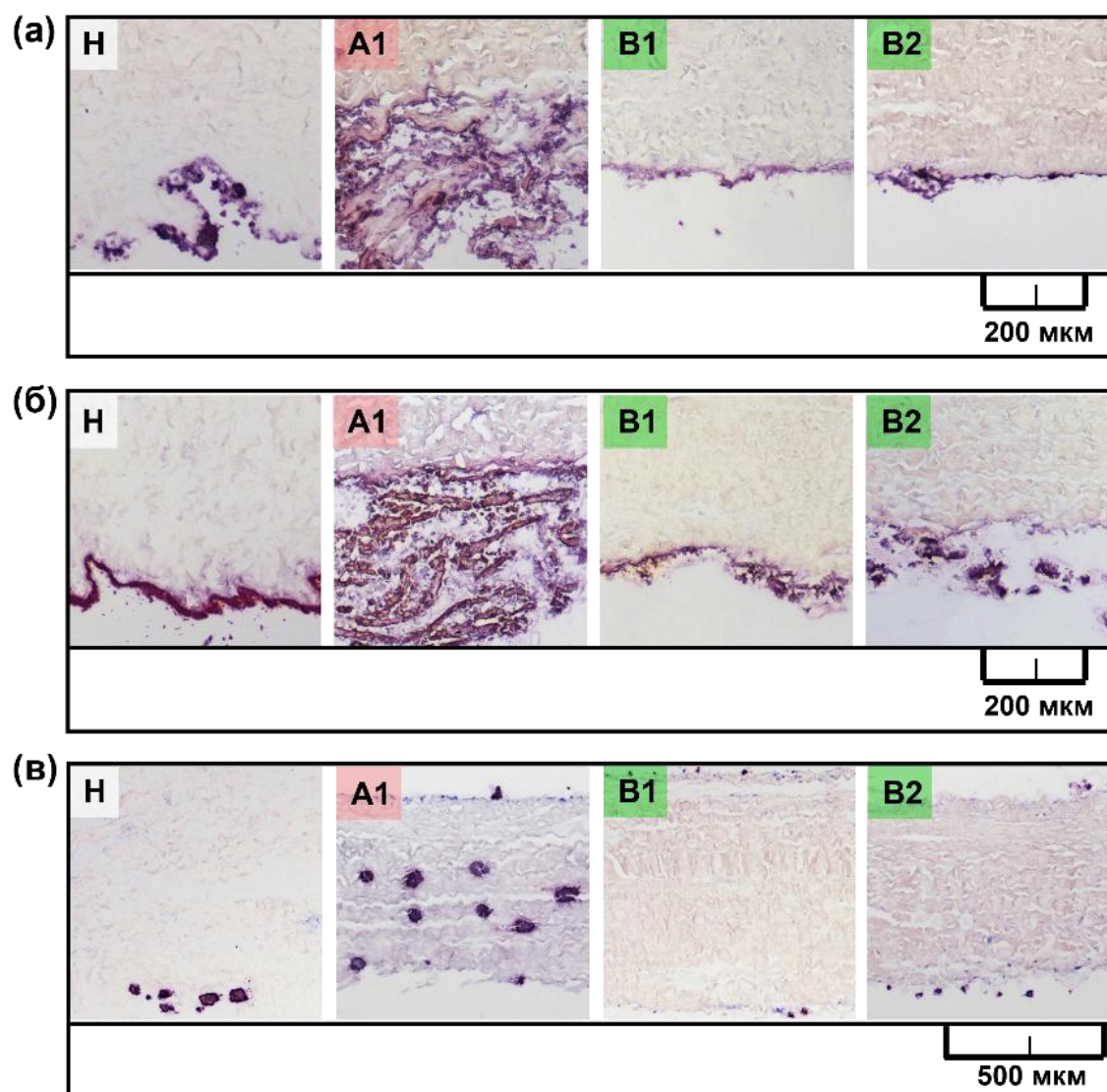


Рисунок 11 – Морфология депозитов кальция в матрике химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов после 40 суток инкубации в растворах, имитирующих условия нормокальциемии, световая микроскопия, окраска по МакГи-Расселу: соли кальция – темно-красные/красно-малиновые; (а) – 2,5 мМ CaCl_2 в фосфатно-солевом буфере; (б) – 2,5 мМ CaCl_2 в фосфатно-солевом буфере + 5% делипидизированный альбумин; (в) – 2,5 мМ CaCl_2 в фосфатно-солевом буфере + 5% альбумин V фракции (0,02 мг/г жирных кислот)

Таблица 5 – Коэффициент ранговой корреляции Спирмена между показателями степени повреждения химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов и пассивной адсорбции кальция на их матрике после 40 суток инкубации в растворах 2,5 мМ CaCl_2

Состав инкубационного раствора	Значение r_{xy} (coeff)	Сила корреляционной связи
2,5 мМ CaCl_2 в фосфатно-солевом буфере	coeff = 0,757	высокая
2,5 мМ CaCl_2 в фосфатно-солевом буфере с альбумином V фракции	coeff = 0,643	заметная

Таким образом, неспецифическая адсорбция белка (альбумина) на поверхности материалов вносит вклад в развитие именно пассивных механизмов кальцификации посредством образования ядер кальцификации из комплекса «альбумин–кальций–жирные кислоты» и, по-видимому, также взаимосвязана со степенью повреждения ВКМ хсКПБ.

ВЫВОДЫ

1. Обработка ксеногенного перикарда с использованием стандартных реагентов в соответствии с используемыми в производственных протоколах концентрациями (1% додецилсульфата натрия, этилового спирта в концентрации свыше 50%, изопропилового спирта в любых концентрациях, и глутаральдегида свыше 0,2%) вызывает выраженное повреждение внеклеточного матрикса химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов;
2. Интенсивность активного (зависимого от клеток) асептического кальциноза химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов напрямую зависит от степени повреждения их внеклеточного матрикса. Общее повреждение матрикса перикарда в процессе обработки более чем на 40% приводит к развитию интенсивного кальциноза химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов по зависимому от клеток реципиента механизму;
3. Интенсивность пассивного (независимого от клеток) асептического кальциноза химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов напрямую зависит от степени повреждения их внеклеточного матрикса. Неспецифическая адсорбция альбумина с жирными кислотами в матриксе химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов вносит вклад в развитие пассивных механизмов кальциноза, и также взаимосвязана со степенью повреждения внеклеточного матрикса;
4. Применение матрикс-сберегающих методов получения химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов значительно снижает иммуногенные свойства материалов, повышает их потенциал к репопуляции и способствует их резистентности к развитию асептического кальциноза;
5. Разработан способ подавления асептического кальциноза химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов за счет использования матрикс-сберегающей децеллюляризации/делипидизации.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для получения высоко биосовместимых (неиммуногенных) биоматериалов на основе различных гистотипов ксеногенных тканей рекомендуется использовать матрикс-сберегающие технологии децеллюляризации и делипидизации.

Для оценки степени повреждения внеклеточного матрикса химически стабилизированных биоматериалов после предимплантационной обработки рекомендуется использование комбинированного подхода гистохимического дифференциального анализа и биоимиджинга гистологических данных с последующей квантификацией выявленных повреждений.

Инкубация химически стабилизированных биоматериалов в модельной среде с необезжиренным альбумином является достоверным способом оценки скрытых повреждений внеклеточного матрикса и степени ассоциированного с ними пассивного асептического кальциноза и может быть использована для совершенствования методов контроля качества кардиохирургических биоматериалов при их производстве.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Звягина А.И.**, Минайчев В.В., Кобякова М.И., Ломовская Я.В., Пятина К.В., Сенотов А.С., Тетерина А.Ю., Фадеева И.С. / Исследование гистоархитектоники бычьего перикарда как основного материала, используемого в реконструктивной хирургии и биопротезировании // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2025. – Т. 27. – №1. – С. 135-144.
2. **Alyona I. Zvyagina**, Vladislav V Minaychev, Margarita I Kobyakova, Yana V Lomovskaya, Anatoliy S Senotov, Kira V Pyatina, Vladimir S Akatov, Roman S Fadeev, Irina S Fadeeva. / Soft Biomimetic Approach for the Development of Calcinosis-Resistant Glutaraldehyde-Fixed Biomaterials for Cardiovascular Surgery // Biomimetics (Basel). – 2023. – Aug 10;8(4):357.
3. **Звягина А.И.**, Даль А.И., Минайчев В.В., Краснова О.А., Акатов В.С., Фадеева И.С. / Пассивный асептический кальциноз фиксированных перикардальных биоматериалов опосредован нарушениями структуры и микроархитектоники их внеклеточного матрикса // Биофизика. – 2022. – 67(1). – С. 160-167.
4. Фадеева И.С., Соркомов М.Н., **Звягина А.И.**, Бритиков Д.В., Сачков А.С., Евстратова Я.В., Фадеев Р.С., Муратов Р.М., Акатов В.С. / Исследование биоинтеграции и прочностных свойств нового биоматериала, изготовленного из ксеногенного перикарда для реконструктивной сердечно-сосудистой хирургии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – №4. – С. 483-487.

Патент

1. Фадеева И.С., Акатов В.С., **Звягина А.И.**, Фадеев Р.С., Соркомов М.Н., Сенотов А.С., Минайчев В.В. «Способ повышения биосовместимости перикардальных биоматериалов для реконструктивной хирургии». Патент РФ № 2678966 от 05.02.2019.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

НН/ЗТЗ – клеточная линия эмбриональных фибробластов мыши;

АлбV – альбумин V фракции (содержит 0,02мг/г жирных кислот);

АлбДЛ – альбумин делипидизированный (без жирных кислот);

ВКМ – внеклеточный матрикс;

ГА – глутаровый альдегид;

ГАГ – гликозаминогликан;

Дн – диоксидин;

ДСН – додецилсульфат натрия;

ДХН – дезоксихолат натрия;

ДХНм – дезоксихолат натрия моногидрат;

ИзС – изопропиловый спирт;

ТрХ – тритон X100;

ФА – формальдегид;

ФСБ – фосфатно-солевой буфер;

хсКПБ – химически стабилизированный ксеноперикардальный биоматериал;

ШИК реакция – реакция Шифф-йодной кислотой;

ЭтС – этиловый спирт.