

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОФИЗИКИ

На правах рукописи

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

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Ирина Сергеевна Фадеева

Пущино 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Сердечно-сосудистая реконструктивная хирургия	15
1.1.1 Механические протезы клапанов сердца.....	17
1.1.2 Биопротезы клапанов сердца	18
1.1.3 Клиническое применение механических и биопротезных клапанов сердца	20
1.2 Ксеноперикард как основная ткань, используемая для изготовления сердечно-сосудистых биопротезов.....	22
1.2.1 Функциональные особенности компонентов внеклеточного матрикса перикарда	24
1.3 Предимплантационная обработка химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов	26
1.3.1 Сшивание, фиксация и постфиксация ксеноперикардимальных биоматериалов.....	28
1.3.1.1 Глутаровый альдегид	30
1.3.1.2 Карбодиимиды.....	34
1.3.1.3 Генипин	34
1.3.1.4 Альтернативные методы фиксации, как способы подавления кальциноза.....	35
1.3.2 Децеллюляризация ксеноперикардимальных биоматериалов как способ подавления кальциноза	36
1.3.2 Делипидизация ксеноперикардимальных биоматериалов, как способ подавления кальциноза	39
1.4 Структурная дегенерация биопротезов клапанов сердца	40
1.4.1 Кальциноз как самая распространённая патологическая форма структурной дегенерации биопротезов клапанов сердца.....	41
1.5 Механизмы развития асептического кальциноза химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов	44
1.5.1 Глутаральдегид-ассоциированные механизмы развития кальциноза	44
1.5.2 Иммуно-ассоциированные механизмы развития кальциноза	46
1.5.2.1 Роль окислительного стресса в иммуно-ассоциированном кальцинозе	48
1.5.2.2 Роль тканевого метаболизма в иммуно-ассоциированном кальцинозе	49
1.5.2.3 Роль тромбоцитов в иммуно-ассоциированном кальцинозе	50
1.5.3 Ассоциированный с фосфолипидами механизм развития кальциноза	51
1.5.3 Ассоциированный с повреждением внеклеточного матрикса механизм развития кальциноза	52
1.5.3.1 Повреждение матрикса биоматериалов в процессе их децеллюляризации	54
1.5.3.2 Повреждение матрикса биоматериалов в процессе их делипидизации.....	55

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	57
2.1 Экспериментальные материалы	57
2.2 Анализ гистоархитектоники нативного перикарда	57
2.3 Количественное определение концентрации ДНК в ткани.....	58
2.4 Предимплантационная обработка и получение химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов	58
2.5 Оценка степени повреждения <i>p.serosum</i> экспериментальных материалов после обработки	61
2.6 Оценка структурных изменений внеклеточного матрикса экспериментальных материалов после обработки	62
2.7 Использование постоянной клеточной линии для проведения <i>in vitro</i> исследований	63
2.8 Пробоподготовка экспериментальных материалов для <i>in vitro</i> исследований	63
2.9 Получение экстрактов из экспериментальных материалов	64
2.10 Анализ цитотоксического действия материалов	64
2.11 Анализ цитостатического действия материалов	64
2.12 Анализ динамики численности клеток в присутствии материалов	65
2.13 Экспериментальные животные	65
2.14 Модель подкожной имплантации	65
2.15 Гистологический анализ	67
2.15.1 Фиксация ткани	67
2.15.2 Получение криосрезов.....	67
2.15.3 Окрашивание криосрезов	68
2.16 Гистоморфометрический анализ.....	69
2.17 Моделирование условий нормокальциемии <i>in vitro</i>	71
2.18 Количественное измерение минерализованного кальция	72
2.19 Статистический анализ	73
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	74
3.1 Результаты исследования структурных изменений внеклеточного матрикса химически стабилизированных ксеноперикардальных материалов в зависимости от способа предимплантационной обработки.....	74
3.1.1 Топология распределения компонентов внеклеточного матрикса нативного ксеноперикарда в различных областях ткани	74
3.1.2 Анализ повреждений структуры поверхности <i>p.serosum</i> химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов после обработки	79
3.1.3 Анализ повреждений фибриллярной структуры матрикса химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов после обработки	81

3.1.4 Результаты сводного анализа структурных повреждений химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов в зависимости от способа предимплантационной обработки	86
3.2 Результаты исследований влияния структурных изменений внеклеточного матрикса на инициацию процессов активного асептического кальциноза химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов	89
3.2.1 Анализ цитотоксического действия химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов в условиях <i>in vitro</i>	89
3.2.2 Анализ цитостатического действия химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов в условиях <i>in vitro</i>	91
3.2.3 Анализ динамики численности клеточных популяций культивируемых в присутствии химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов	92
3.2.5 Изучение активного реципиент-зависимого кальциноза химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов в условиях <i>in vivo</i>	93
3.2.6 Результаты корреляционного анализа склонности химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов к активному кальцинозу в зависимости от способа предимплантационной обработки	103
3.3 Результаты исследования влияния структурных изменений внеклеточного матрикса на инициацию процессов пассивного асептического кальциноза химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов	109
3.3.1 Изучение пассивного материал-зависимого кальциноза химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов в условиях <i>in vitro</i>	109
3.3.2 Результаты корреляционного анализа склонности химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов к пассивному (независимому от клеток) кальцинозу в зависимости от способа предимплантационной обработки	111
3.4 Разработка способа предотвращения асептического кальциноза химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов.....	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	114
ВЫВОДЫ	117
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	118
СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ	119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	121

ВВЕДЕНИЕ

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 [1]. Прогнозируется, что к 2050 году это число увеличится до 850 тысяч [1, 2]. Замене подвергаются все типы клапанов, однако почти половину проводимых операций составляет именно замена аортального клапана на механический протез [3]. Механические протезы изготавливают из прочных материалов, таких как титан, углерод или пироуглерод. Они рассчитаны на всю жизнь и очень долговечны [4]. Однако их установка неотъемлемо связана с пожизненным приемом антикоагулянтных препаратов, таких как варфарин, которые необходимы для предотвращения образования тромбов на жесткой поверхности механического протеза [5].

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 [6, 7]. В отличие от механических протезов, биопротезы не требуют использования антикоагулянтов, обладают лучшими гемодинамическими свойствами и способны к реэндотелизации [8]. 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 [2].

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 [9]. В руководствах «АНА/ACC» (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 [10, 11].

Такие рекомендации обусловлены кратковременным сроком службы биопротезов клапанов сердца, который составляет не более 10-15 лет [4]. 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 [12]. Прогнозируемый риск необходимости хирургической замены биопротеза вследствие структурной клапанной дегенерации составляет 50% для пациентов в возрасте 20 лет [13]. При этом статистические данные указывают, что именно асептический кальциноз является наиболее распространенной формой структурной клапанной дегенерации [14].

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 [15, 16, 17], 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 [11]. 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 [18].

Помимо широкого ряда операций по восстановлению сердечных клапанов, проблема кальциноза актуальна и для других процедур, в которых используются химически стабилизированные ксеноперикардальные 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. [19, 20, 21]. В свете всего вышесказанного, выявление механизмов асептического кальциноза химически стабилизированных ксеноперикардальных 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) [22].

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) [22].

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) [23]. 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 [24, 25, 26, 27], 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 [2], 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 [28, 29].

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 ксеноперикардальных биоматериалов в зависимости от способа их предимплантационной обработки;
2. Изучить влияние структурных повреждений внеклеточного матрикса химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов на процессы зависимого от клеток (активного) асептического кальциноза;
3. Изучить влияние структурных повреждений внеклеточного матрикса химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов на процессы независимого от клеток (пассивного) асептического кальциноза;
4. На основании полученных экспериментальных данных разработать матрикс-сберегающий способ получения химически стабилизированных ксеноперикардальных 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 ксеноперикардальных биоматериалов имеет высокую корреляционную связь со степенью предимплантационного повреждения их внеклеточного матрикса. Впервые разработан комплексный подход квантификации предимплантационных повреждений внеклеточного матрикса химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов. Впервые показано, что интенсивность экстракции токсических агентов, используемых в предимплантационной обработке химически стабилизированных ксеноперикардальных 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 ксеноперикардальных биоматериалов. В работе представлены авторские методы матрикс-сберегающих предимплантационных обработок химически стабилизированных ксеноперикардальных 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 кальцифилаксии 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 ксеноперикардимальных биоматериалов.

Методология и методы исследования

Для достижения поставленных задач в работе использовались методы клеточной биологии, биохимии и биофизики. Для выявления степени повреждения химически стабилизированных ксеноперикардимальных 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 ксеноперикардимальными 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 утилизирующей 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Сердечно-сосудистая реконструктивная хирургия

Сердечно-сосудистые заболевания занимают первое место как среди причин инвалидизации, так и преждевременной гибели людей во всем мире. Известно, что почти четверть от всех сердечно-сосудистых заболеваний составляют заболевания клапанного аппарата сердца человека (приобретённые и врожденные пороки). При этом заболевание аортального клапана является наиболее частым заболеванием клапанов сердца в западных странах [30]. Эффективных медицинских методов коррекции этого заболевания не существует, и хирургическая замена аортального клапана соответствующим протезом до сих пор остается единственным способом лечения заболеваний аортального клапана [31].

Процедура замены аортального клапана проводится с 1950-х годов [32]. С тех пор данная хирургическая процедура подверглась множеству изменений с целью оптимизации и снижения риска развития связанных с оперативным вмешательством осложнений. Несколько десятилетий назад стандарт медицинской помощи при клапанной недостаточности включал открытую операцию на сердце с преимущественным использованием либо механических протезов и, реже, «тканевых клапанов». При этом, нехватка аллогенных материалов привела к внедрению сшитых кросс-сшивающими агентами ксеногенных тканей для изготовления заменителей клапанов сердца в клиническую практику уже с конца 1960-х годов [6, 7]. Несмотря на высокий успех в целом, эти процедуры имели некоторые недостатки, включающие инвазивность операции, частоту развития сопутствующих заболеваний у пожилых пациентов [33, 34], тенденцию к образованию тромбов, необходимость пожизненной антикоагулянтной терапии [35], случайные отказы механических протезов [36] и преждевременную, в значительной степени зависящую от возраста, кальцификацию и дегенерацию тканевых биопротезов [37, 38].

Высокая востребованность процедур по установке протезов сердечных клапанов способствовала тому, что со временем некоторые из этих недостатков удалось устранить. Во-первых, появилась общая тенденция к более активному использованию биопротезов по сравнению с механическими клапанами [22]. Во-вторых, были разработаны коррекционные хирургические методики [39], для которых не было необходимости в имплантации механического протеза клапана целиком. Дополнительно, для молодых пациентов альтернативой хирургической имплантации механического протеза сердечного клапана в аортальное положение стала операция Росса [40, 41], при которой легочный клапан пациента перемещается в положение аорты, в то время как в качестве легочного клапана пациенту имплантируется аллотрансплантат или ксеногенный биопротез. Также появилась возможность

сохранения нативных клапанов у отдельных пациентов, страдающих от стеноза или регургитации сердечных клапанов, с помощью различных реконструктивных операций, основанных на использовании вспомогательных биоматериалов [42, 43]. Однако эти узкоспециализированные операции со специфическими показаниями часто выполняются в исключительных случаях и только в профильных медицинских центрах. И наконец разработка транскатетерных методов протезирования клапанов устранила необходимость в операциях на открытом сердце [44, 45].

Несомненно, прогресс вышеперечисленных разработок и само их существование было обусловлено эволюцией концепции биопротезирования и реконструктивной сердечно-сосудистой хирургии. В настоящее время биоматериалы используются в различных типах кардиохирургических операций, таких как транскатетерная замена аортального клапана, транскатетерное восстановление или протезирование митрального клапана, транскатетерное восстановление трехстворчатого клапана, закрытие ушка левого предсердия, чрескожная имплантация клапана легочной артерии, транскатетерное протезирование клапана легочной артерии, эндоваскулярное лечение аневризмы аорты, сегментарная реконструкция воротной вены и верхней брыжеечной вены, замена сосудистых кондуитов, восстановление дефектов межпредсердной перегородки, а также заплаточная ангиопластика после каротидной эндартерэктомии, аневризмы вен и артерий и других сердечно-сосудистых заболеваний [19, 20, 21, 46].

При этом, какая бы из вышеперечисленных хирургических операций не потребовалась, материалом выбора будет химически стабилизированный ксеноперикард (хсКПБ) [22]. Протезы, изготовленные из хсКПБ, обладают наиболее подходящими для системного кровотока механическими характеристиками, обеспечивающими хорошую гемодинамическую функцию [47], и также обладают наименьшим риском тромбоэмболических осложнений [48]. Однако у данных материалов есть один существенный недостаток, вернее, совокупность взаимосвязанных недостатков. Они касаются специфических механизмов биосовместимости стабилизированного перикарда, включающих аспекты токсичности, иммуногенности и неполноценной или отсутствующей полностью резндотелизации данного типа материалов. Эти факторы со временем могут привести к быстрым осложнениям, включающим лимфоцитарное воспаление и развитие асептического кальциноза [49], или к длительным медленным последствиям, которые в конечном итоге приводят к структурной дегенерации и дисфункции протеза, требующих его хирургической замены [50].

Однако, несмотря на такие серьезные последствия, ценные преимущества хсКПБ все же превосходят имеющиеся недостатки, что делает их наиболее перспективным материалом в сердечно-сосудистой хирургии. Для более четкого представления перспективности и

эффективности биопротезов на основе хсКПБ, рассмотрим подробно все преимущества и недостатки механических протезов и биопротезов клапанов сердца.

1.1.1 Механические протезы клапанов сердца

Данные протезы клапанов сердца изготовлены из прочных материалов, таких как титан, углерод или более современный пироуглерод [4]. Срок их службы очень долговечен и рассчитан на всю жизнь пациента. Из-за тромбогенности материалов, используемых в механических клапанах, а также из-за формирования сильного ударного давления (гемодинамический удар) вокруг протеза особенно при обратных токах крови, происходит повреждение эритроцитов и активация свертывающей системы, вследствие чего пациентам требуется пожизненная антикоагулянтная терапия, чтобы избежать образования тромбов [5]. Риски установки механических клапанов в первую очередь связаны именно с антикоагулянтной терапией, что часто является причиной воздерживания от выбора механического протеза как среди пациентов, так и среди врачей.

Пациенты, не принимающие антикоагулянты, имеют высокий риск развития тромбоза клапана, и напротив при использовании антикоагулянтов возникает очевидный риск превышения стандарта протромбинового индекса (ПТИ), определяющего норму скорости свертывания крови. Превышение нормы ПТИ приводит к риску спонтанного кровотечения (например, желудочно-кишечного кровотечения) или кровотечений, связанных с травмой (например, субдуральной гематомой), что обуславливает значительную смертность и заболеваемость среди пациентов [50]. Даже у тех пациентов, которые тщательно стремятся поддерживать показатель ПТИ в идеальном диапазоне, наблюдаются серьезные колебания, которые повышают риск возникновения либо кровотечения, либо тромбоэмболических осложнений [51, 52]. Однако основным преимуществом механических протезов является крайне низкий риск структурного разрушения клапана. В клинической практике, особенно на ранних стадиях развития техник протезирования сердечных клапанов, конечно, фиксировались случаи разрушения механических протезов [53], однако с тех пор как в 1980–х годах клапаны Бьорк-Шайли® были изъяты из производства в виду их частых поломок, такие случаи чрезвычайно редки. Помимо структурного разрушения, существуют и другие причины для замены механических клапанов, например, такие как рост паннуса, эндокардит и тромбоз, но потребность в повторных операциях все равно остается низкой [54].

1.1.2 Биопротезы клапанов сердца

Несомненное преимущество биопротезов клапанов сердца (БКС) заключается в том, что они не требуют пожизненной антикоагулянтной терапии. С другой стороны, использование органических материалов действительно создает высокий риск раннего «износа» и дегенерации такого протеза, что практически не свойственно для механических протезов. БКС можно разделить на следующие группы: (1) гомотрансплантаты, (2) аутоотрансплантаты, (3) ксенотрансплантаты, (4) каркасные и тканеинженерные биопротезы.

Гомотрансплантаты (называемые также аллотрансплантаты) довольно редко используются в клинической практике. Они представляют собой корень аорты и легочный ствол, полученные во время трансплантации сердца или в результате посмертного донорства [55]. В отличие от ксенотрансплантатов, они не подвергаются предварительной обработке фиксаторами, вместо этого они подвергаются стерилизации в растворах антибиотиков и необязательной децеллюляризации с последующим замораживанием или кратковременным хранением при 4°C до имплантации [55]. Подобно ксенотрансплантатам, гомотрансплантаты со временем подвержены структурной дегенерации. Кроме того, имплантация гомотрансплантата более сложна, чем имплантация даже механических протезов клапанов сердца или большинства ксенотрансплантатов, и их использование ограничено доступностью аллогенного материала [55].

Аутоотрансплантаты – это собственные ткани пациента, эксплантируемые из одного положения и имплантируемые в другое с помощью процедуры Росса, как описывалось выше. Использование аутоотрансплантатов сердечных клапанов особенно актуально для пациентов детского возраста с врожденными пороками сердца, что обусловлено их высокой иммунной совместимостью, адаптацией к соматическому росту и низким риском развития тромбоза [56]. Кроме того, аутоотрансплантаты демонстрируют наилучшие гемодинамические параметры среди всех БКС [56]. Несмотря на многочисленные преимущества, процедура Росса является сложной операцией с многочисленными периоперационными рисками, в виду чего, такие вмешательства редки и в основном ограничены пациентами педиатрических отделений или молодыми женщинами, планирующими беременность [56]. Тем не менее, аутоотрансплантаты представляют собой единственный доступный в настоящее время «живой» (заселенный функционирующими клетками) биопротез сердечного клапана [4].

Учитывая недостатки гомо- и аутоотрансплантатов тканеинженерные клапаны дают большие надежды на решение проблемы недостатка «живых» БКС. Однако, несмотря на обилие используемых высокотехнологичных подходов, тканеинженерные конструкции на

сегодняшний день остаются экспериментальными и пока имеющиеся разработки далеки от внедрения в клиническую практику [57].

Поскольку ткани животного происхождения широко доступны, ксеногенные материалы составляют большую часть всех видов БКС [4]. Основным источником для данной группы материалов являются перикард крупного рогатого скота или свиньи, а также аортальные клапаны свиней, предварительно обработанные химическими стабилизаторами и детергентами. Все ксеногенные материалы, в отличие от прочих видов БКС, проходят обязательную процедуру многоступенчатой обработки, включающую этапы децеллюляризации, фиксации и отмывки донорской ткани с целью снижения ее иммуногенности и повышения износостойкости.

Основным негативным последствием имплантации БКС является необходимость в проведении повторной операции по замене протеза, что связано с быстро развивающейся структурной клапанной дегенерацией (СКД). Средняя продолжительность функционирования БКС у пожилых пациентов оценивается в 15 лет, но этот риск выше у более молодых пациентов, у которых дегенерация тканей протеза ускоряется из-за более выраженного иммунологического ответа на клапан и его усиленной кальцификации [13, 58, 59]. В то же время, считается, что риск прочих, не связанных со структурной дегенерацией осложнений для БКС столь же низок, как и для механических протезов клапанов сердца [60]. При учете связанных с самой процедурой протезирования рисков, особенный акцент делается на склонности протезов к инициации эндокардита, который является тяжелым диагнозом, безусловно требующим реоперации. Однако сообщается, что случаи развития эндокардита имеют сходную частоту как при протезировании механических, так и биопротезных сердечных клапанов [60]. Частота крупных кровотечений, выявленных инсультов и тромбозов при имплантации БКС невелика, хотя недавние исследования поставили под сомнение ранее сообщавшиеся данные. В исследовании, включавшем практически 200 пациентов с установленными БКС, с помощью методов мультиспиральной компьютерной томографии было показано, что у 7% пациентов наблюдалось снижение подвижности створок протеза именно в результате тромбоза [61].

Хотя существует множество противоречивых результатов исследований, направленных на выявление факторов риска развития СКД, некоторые исследования предоставляют достоверные доказательства, подтверждающие ускорение процессов СКД для пациентов, ведущих менее здоровый образ жизни. Среди таких факторов риска можно выделить: курение [62, 63], повышенные показатели уровня холестерина [64, 65], диабет [66] и метаболический синдром [67].

1.1.3 Клиническое применение механических и биопротезных клапанов сердца

Выделение отдельных преимуществ и недостатков применения механических и биопротезных клапанов сердца привело к оформлению рекомендаций по лечению пороков клапанов сердца, которые были согласованы и изложены в клинических руководствах АНА/ACC и ESC/EACTS [11, 68]. Согласно данным руководствам, имплантация механических протезов клапана сердца в аортальном положении рекомендуется пациентам моложе 60 лет. Рекомендации к использованию БКС в аортальном положении даны пациентам в возрасте старше 65 лет в европейских руководствах, и старше 70 лет в американских руководствах, либо пациентам, ожидаемая продолжительность жизни которых не превышает 10 лет. Промежуток в 5-10 лет представляет собой область неопределенности, в которой могут использоваться как механические протезы, так и БКС, в зависимости от предпочтений хирургов и пациентов, а также определенных характеристик пациента (Рисунок 1а) [5].

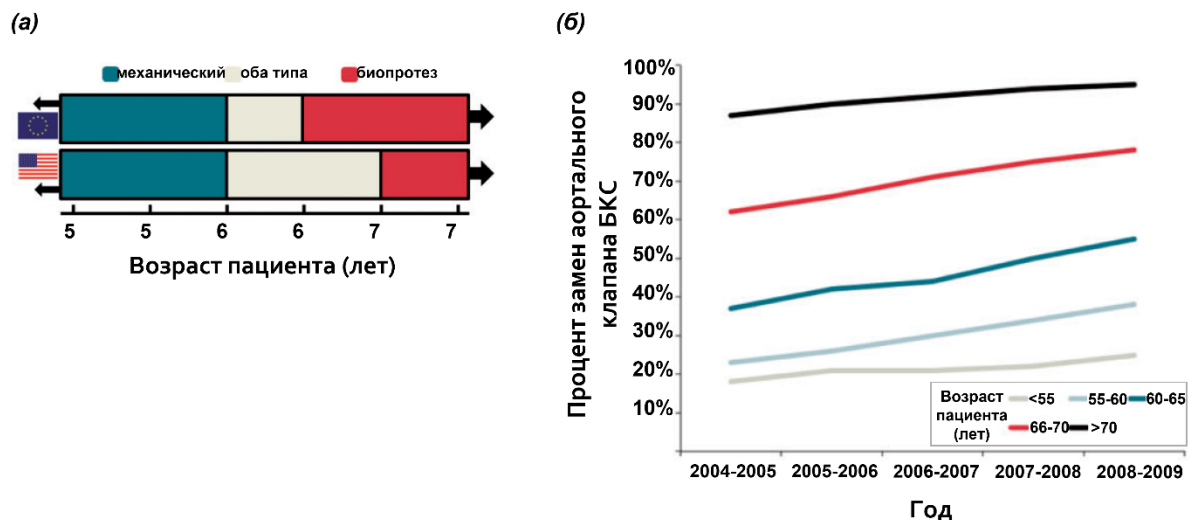


Рисунок 1 – Использование биопротезов клапанов сердца в сердечно-сосудистой хирургии [5 с изм.]: (а) рекомендации АНА/ACC (American Heart Association/American College of Cardiology) и ESC/EACTS (European Society of Cardiology/European Association for Cardio-Thoracic Surgery) по использованию механических протезов и биопротезов для замены аортального клапана; (б) процент замен аортального клапана биопротезами в Великобритании и Ирландии

В руководстве ESC/EACTS перечислены следующие факторы, определяющие выбор конкретного клапана: (1) ожидаемая продолжительность жизни; (2) предполагаемый риск возможной повторной операции в будущем; (3) риск кровотечений, который может быть выше из-за специфических сопутствующих заболеваний, географических условий или особенностей профессии и образа жизни пациента; (4) сопутствующие заболевания, такие как фибрилляция предсердий, заболевания периферических сосудов, гиперкоагуляция или другие состояния, требующие применения антикоагулянтов; (5) риск СКД, который может ускориться у

пациентов с гиперпаратиреозом или почечной недостаточностью; (6) желание пациентки забеременеть; и (7) предпочтения пациента [10].

Вопреки рекомендациям руководства, использование БКС значительно расширилось за последние десятилетия (Рисунок 16). Например, материалы национальной базы данных Великобритании и Ирландии показывают, что использование БКС увеличилось с 65,4% до 77,8% в период с 2004 по 2009 год (Рисунок 16) [15]. Примечательно, что у пациентов в возрастных категориях моложе 55 и от 55 до 60 лет наблюдался аналогичный рост по сравнению с пациентами в более старших возрастных категориях. Анализ национальной базы данных по кардиохирургии Нидерландов показал увеличение использования БКС в период с 1995 по 2010 год, особенно в возрастных категориях пациентов 55-65, 65-70 и 70-100 лет, но не у пациентов в возрасте 18-55 лет [17]. Использование биопротезов в период с 1999 по 2011 гг. в США увеличилось больше всего у пациентов в возрасте 55–64 лет [16].

За последнее десятилетие, прошедшее с момента внедрения техник транскатетерной имплантации протезов клапанов сердца, многочисленные рандомизированные исследования показали, что данные техники не уступают, если не превосходят открытую операцию на сердце, о чем говорят улучшенные показатели послеоперационной смертности или заболеваемости пациентов [69, 70, 71, 72, 73]. За это время было произведено множество транскатетерных протезов клапанов сердца, и все они являются биопротезными клапанами. Хотя транскатетерная имплантация в настоящее время в основном применяется для пожилых пациентов, низкий уровень связанных с процедурой осложнений открывает возможности для имплантации транскатетерных протезов более молодым пациентам. Меньшая инвазивность и более быстрое время восстановления по сравнению с открытой операцией при имплантации механического клапана могут склонить чашу весов в пользу выбора транскатетерной имплантации БКС, если долгосрочные результаты, по крайней мере, будут не хуже [18], особенно после внедрения в хирургическую практику упрощенной процедуры имплантации «клапан в клапане», которая стала выходом для пациентов с уже установленным БКС, требующим замены [74, 75].

И все же, несмотря на все преимущества современных техник протезирования клапанов сердца и хирургических методов коррекции сердечно-сосудистых заболеваний, из-за до сих пор нерешенной проблемы структурной дегенерации и кальциноза, изменение тенденций в сторону использования биоматериалов (хСКПБ) затруднено по двум основным причинам. Во-первых, как указывалось выше, износ хСКПБ ускоряется у молодых пациентов. Во-вторых, постоянно увеличивающаяся продолжительность жизни подвергает все более старших пациентов риску (многократных) повторных операций.

Таким образом, ряд преимуществ делает биопротезы клапанов сердца наиболее эффективными и предпочтительными имплантатами. Однако, срок службы биопротезов в сердечно-сосудистой системе (около 15 лет) обуславливает клинические рекомендации по установке таких протезов только пациентам пожилого возраста (старше 70), либо молодым пациентам с прогнозируемой продолжительностью жизни 10 лет. Для пациентов моложе 65 рекомендуемым протезом все еще являются механические протезы клапанов не смотря на все имеющиеся недостатки. Однако, молодые пациенты, ведущие активный образ жизни, работающие в сфере напряженной трудовой деятельности или в спорте, имеющие противопоказания к антикоагулянтной терапии, страдающие почечной недостаточностью, а также планирующие беременность женщины не могут себе позволить установку механического клапана в виду большого количества связанных с этим ограничений. Такие пациенты вынуждены либо подвергать себя постоянному риску и тратам, связанным с регулярной заменой БКС, либо отказываться от привычной жизни в связи с пожизненной антикоагулянтной терапией и вероятной инвалидизацией после имплантации механического протеза клапана сердца. Внедрение в сердечно-сосудистую хирургию (ССХ) высокотехнологичных процедур транскатетерной имплантации и имплантации бесшовных клапанов склоняет все большее количество пациентов в сторону установки именно биопротезных клапанов сердца. В свою очередь доказанные преимущества изготовленных на основе хсКПБ биопротезов в сравнении с прочими делает именно этот вид протезов наиболее актуальным.

1.2 Ксеноперикард как основная ткань, используемая для изготовления сердечно-сосудистых биопротезов

Перикард представляет собой замкнутый соединительнотканый мешок, который окружает сердце и корни магистральных кровеносных сосудов [76] (Рисунок 2). В целом перикард это биологическая ткань богатая коллагеном, преимущественно I типа, хотя также присутствуют и коллагены III, VI и XII типов. Эти волокна встроены в аморфную матрицу протеогликанов и гликозаминогликанов (ГАГ), включающих в том числе гиалуроновую кислоту [22]. Такой матрикс служит резервуаром для сигнальных молекул, таких как цитокины и факторы роста. Внеклеточный матрикс перикарда также характеризуется относительно низкой клеточной плотностью и заселен преимущественно фибробластами [22].

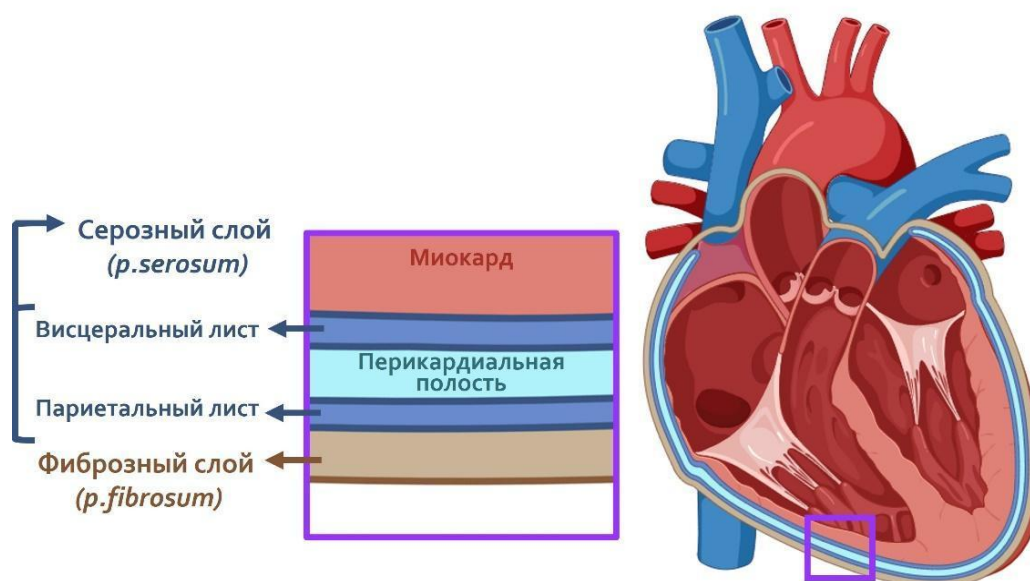


Рисунок 2 – Строение перикарда

Перикард состоит из двух слоев ткани, наружного фиброзного перикарда (*p.fibrosus*) и внутреннего серозного перикарда (*p.serosum*) (Рисунок 2, 3). Внутренний серозный слой в свою очередь делится на 2 листка: висцеральный (эпикард – плотно сращен с миокардом) и париетальный, сращенный с внутренней поверхностью *p.fibrosus* и выстилающий его изнутри [77]. Фиброзный перикард состоит из соединительной ткани с рыхлым расположением коллагеновых волокон (преимущественно коллаген I типа) и других неколлагеновых компонентов, таких как эластин и фибриллин. Серозный перикард состоит из мезотелия (эпителиоподобных клеток) и базальной мембраны, покрывающей тонкий слой рыхлой соединительной ткани [20]. Мезотелиальные клетки образуют монослой, выстилающий висцеральный лист перикарда [78], который играет важную роль в процессах воспаления и регенерации тканей [79]. Гладкая и плотная структура *p.serosum* определяется структурными белками базальной мембраны, такими как ламинин и коллаген IV типа. Таким образом, используемый в тканевой инженерии ксеноперикард состоит из двух различных по составу и структуре слоев, что придает ткани свойство структурной полярности (Рисунок 3) [80]. Такая полярная структура ткани перикарда представляет особый интерес для тканеинженерных разработок и позволяет как исследовать различные ниши ВКМ (н-р, с наличием или отсутствием базальной мембраны), так и изготавливать биоматериалы с различной функциональностью.

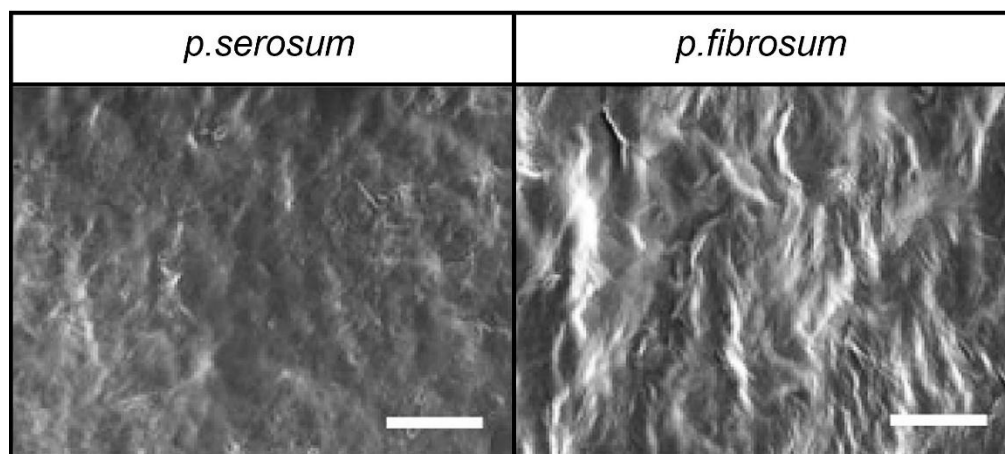


Рисунок 3 – Сканирующая электронная микроскопия поверхностей p.serosum и p.fibrosus бычьего перикарда [81]: Серозная поверхность гладкая с волнистой морфологией, фиброзная поверхность показывает более рыхлую волокнистую структуру

Толщина перикарда варьируется в зависимости от вида и может широко варьироваться в пределах вида. Толщина перикарда взрослого человека обычно достигает 2 мм, при этом фиброзный слой в несколько раз толще серозного [82]. Для видов, которые наиболее широко используются в производстве биопротезов, толщина перикарда обычно находится в диапазоне 400-500 мкм (для крупного рогатого скота), либо 100-200 мкм (для свиней) [83].

Нативный перикард анизотропен, что обусловлено структурной организацией коллагенов разных типов: от фибрилл до волокон и пучков волокон. Интересно, что различные части перикарда в зависимости от их толщины и укладки коллагеновых волокон могут различаться в механических свойствах, что требует тщательного отбора образцов при изготовлении биоимплантата или разработке протокола обработки биоматериала [84, 85]. Специфическая укладка коллагеновых волокон определяет механические и деформационные свойства ткани в различных ее областях, что сказывается как на статической, так и на усталостной прочности биоматериала [86, 87]. В ряде работ было показано, что по равномерности укладки коллагеновых фибрилл наиболее предпочтительной является область перикарда, расположенная над левым желудочком [88].

1.2.1 Функциональные особенности компонентов внеклеточного матрикса перикарда

Известно, что клетки по своей природе чувствительны к физическим, химическим и биохимическим стимулам, исходящим от их непосредственного окружения [89]. В естественных условиях стволовые клетки расположены в определенном микроокружении, называемым «нишей», которая регулирует поведение стволовых клеток на основе входных сигналов от всех ее составляющих, что является основным механизмом сохранения,

распространения или дифференцировки стволовых клеток и клеток-предшественников [90, 91, 92, 93, 94].

Внеклеточный матрикс (ВКМ) является основной и наиболее важной частью «ниши» как стволовых, так и прогениторных клеток, которые крайне чувствительны не только к биологическим, но и физическим параметрам окружающей микросреды и способны адаптировать свою дифференцировку в соответствии с топологией, полярностью или эластичностью поверхности [95, 96, 97].

Кроме того известно, что ВКМ состоит из различных адгезивных белков. Как уже говорилось выше, ВКМ перикарда преимущественно состоит из коллагена, при этом относительное содержание коллагена в ткани составляет до 95%, эластина около 4%, гликопротеинов и гликозаминогликанов около 1% [98]. Коллаген и гликопротеины (фибронектин и тенасцин С) обеспечивают клетки биологическими стимулами и механическим каркасом для миграции, адгезии и пролиферации [99]. Их молекулы содержат в своей структуре трипептидные последовательности RGD, с которыми связываются интегрины $\alpha_1\beta_1$ и $\alpha_2\beta_1$, присутствующие на мембранах различных типов клеток [100]. С помощью таких белок-белковых взаимодействий сигнал может передаваться как из межклеточного матрикса в клетку, так и в обратном направлении, влияя таким образом на морфологию и поведение клеток [101]. Известно также, что адгезия клеток к ВКМ определяет их дифференцировку и, как следствие, функциональную активность [102, 103].

Также известно, что производные эластана, такие как тропоэластин, представляют собой важную платформу для поддержки активности многих клеток мягких тканей, включая фибробласты, эндотелиальные и гладкомышечные клетки [24]. Связывание клеток с внеклеточными фрагментами эластана или эластиновыми пептидами активирует процессы миофибриллогенеза, опосредованного сосудистыми гладкомышечными клетками (ГМК), а также хемотаксис фибробластов и моноцитов. Считается, что разрушение эластана, самого прочного белка ВКМ, вызывает мощный клеточный ответ, который включает все этапы восстановления раны: воспаление, репарацию и ремоделирование. Было показано, что поврежденный эластин в организме увеличивает количество ГМК в тканях и инициирует интенсивный рост сосудов [77, 101].

Известно также, что гликопротеины играют ключевую роль в определении регенеративного потенциала тканей [24]. Аморфный матрикс, состоящий из гликозаминогликанов и протеогликанов, служит источником сигнальных молекул, таких как цитокины и факторы роста, которые необходимы для ремоделирования тканей, привлечения клеток и формирования ответа на повреждение. [36, 51].

Структурная полярность ткани перикарда также проявляется и в функциональных особенностях его поверхностей. Так было показано, что ламинин и коллаген IV, входящие в состав базальной мембраны *p.serosum*, опосредуют не только изменение морфологии клеток, но и могут приводить к изменению уровня транскрипции генов и даже влиять на ремоделирование хроматина [103, 104, 105]. Кроме того, было показано, что связывание клеток с ламинином приводит к ингибированию апоптоза в клетках [105]. Таким образом, ламинин является не просто пассивным белком адгезии, а активно модулирующим клеточную дифференцировку, миграцию и стабильность клеточного фенотипа агентом. Различные исследования показали, что основные белки *p.serosum*, значительно способствуют «плоской» миграции клеток, что опосредуется взаимодействием ламинина с интегрином $\alpha_3\beta_1$ [104]. Тогда как фиброзная поверхность, не содержащая ламинина и коллагена IV, модулирует более медленную «плоскую» миграцию и более быструю миграцию клеток в глубь матрикса, опосредованную взаимодействием коллагена I с интегрином $\alpha_{11}\beta_1$ [104].

Таким образом, при использовании перикарда в качестве материала для изготовления биоимплантатов структура и сохранность основных биоактивных белков ВКМ обработанной ткани будут играть важную роль в определении клеточной реакции на имплантированный материал. Более того, при применении перикардальных биоматериалов в сердечно-сосудистой хирургии, разумно ориентировать серозную поверхность материала в направлении просвета сосудов по направлению тока крови. Более гладкая и ровная структура *p.serosum* будет благоприятно сказываться на тромборезистентных свойствах биоматериала. Также биофункциональные особенности *p.serosum*, а именно индукция более быстрой миграции клеток и образования результирующего монослоя, могут определять в том числе и потенциал биоматериала к реэндотелизации.

1.3 Предимплантационная обработка химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов

С тех пор, как БКС были введены в клиническую практику в качестве альтернативы механическим клапанам сердца, и была признана необходимость как в стерильности, так и в биостабильности используемых для изготовления биопротезов ксеногенных тканей, глутаровый альдегид (ГА) рассматривался как основной агент для предимплантационной обработки биопротезов [106]. Еще в 1968 году доктор Ален Карпентье обнаружил антииммуногенные и антидегенеративные эффекты ГА [107]. Кроме того, глутаровый альдегид является одним из наиболее эффективных средств для стерилизации. Результаты ранних клинических применений изготовленных таким образом биопротезов оказались достаточно приемлемыми, и

производители по всему миру приняли обработку ксеноперикарда ГА за основной стандарт [108]. Однако вскоре стало ясно, что такой простой одноэтапной обработки только ГА недостаточно для достижения долгосрочных результатов. В частности, было продемонстрировано, что стандартная обработка 0,625% раствором ГА (раствор Карпентье) не обеспечивает достаточного снижения иммуногенности биоматериала и, вероятно, влияет на его склонность к асептическому кальцинозу [109].

В последующие 3-4 десятилетия предпринималось много попыток понять процессы, происходящие при предимплантационной обработке перикарда, и оптимизировать эти процессы с целью максимального повышения кальцинозрезистентности БКС и увеличения продолжительности срока их службы.

Было выявлено, что образование кальцификатов в структуре хсКПБ связано с тремя основными факторами:

- цитотоксическое воздействие фиксирующих агентов на клетки реципиента (ГА-ассоциированный кальциноз). При этом погибшие клетки реципиента и апоптотические тельца становятся центрами инициации кальциноза;

- погибшие клетки донора и клеточный дебрис, оставшиеся в материале после обработки. Погибшие клетки сами по себе выступают в качестве центров инициации кальциноза, и более того являются сильными антигенами, которые инициируют развитие иммунного ответа и связанных с ним последствий, вероятно также способствующих кальцинозу (иммуно-ассоциированный кальциноз);

- физико-химические свойства фосфолипидов клеточных мембран, оставшихся в матриксе материалов после обработки. Фосфолипиды поглощают кальций и также образуют точки зарождения кристаллизации фосфатов кальция (ассоциированный с фосфолипидами кальциноз).

Стало очевидно, что при обработке ксеноперикарда для ССХ необходимо более тщательно очищать биоматериал от клеток и внутриклеточных компонентов донора, фосфолипидов и непрореагировавших фиксирующих агентов. При этом одним из ключевых специфических условий имплантации сердечно-сосудистых биоматериалов (непосредственно в системный кровоток) являются высокие гидродинамические нагрузки, которые не позволяют полностью исключить использование фиксирующих агентов и подталкивают применять наиболее эффективные и стабильные сшиватели, обеспечивающие высокую механическую прочность и метаболическую устойчивость биоматериалов. Это понимание привело к формированию трех основных этапов обработки которые используются мировыми производителями для изготовления хсКПБ: децеллюляризация (удаление клеток донора и

других иммуногенов), делипидизация (удаление липидов) и фиксация (применение фиксирующих агентов для повышения прочности материала).

1.3.1 Сшивание, фиксация и постфиксация ксеноперикардальных биоматериалов

В физиологических условиях при фибриллогенезе коллаген сшивается как внутри-, так и межмолекулярно под воздействием двух различных процессов [110]. Один из них включает специфические ферментативные реакции, приводящие к образованию остатков лизина и гидроксизина с высокореакционными альдегидными группами, которые самопроизвольно вступают в реакцию друг с другом или другими остатками лизина и гидроксизина с образованием стабильных сложных поперечных связей. Второй процесс включает в себя несколько неспецифических взаимодействий, в которых участвуют глюкоза и продукты ее окисления, приводящие к образованию конечных продуктов гликирования. По мере созревания коллагена эти ферментативно и неферментативно индуцированные поперечные связи обеспечивают для волокон коллагена очень низкую растворимость и устойчивость к ферментативным и химическим изменениям.

Концепция предварительной обработки коллагеновых биоматериалов для ССХ включает усиление этих поперечных связей [111, 112], для чего используются физические, ферментативные и химические методы стабилизации (Таблица 1). Общая цель всех этих методов сшивания – добиться «полного сшивания» коллагена, при котором не менее 80% молекул коллагена будут соединены поперечными сшивками.

К физическим методам фиксации ксеноперикарда относятся: плазменный метод [113], дегидротермальный метод [114] и метод, основанный на ионизирующем облучении [115]. Основной принцип действия вышеуказанных методов основан на прямом сшивании коллагена под воздействием высоких температур, УФ-лучей или иных физических факторов воздействия, приводящих к образованию большего количества поперечных связей коллагена. Однако, все эти методы также приводят к денатурации коллагена уже на этапе предимплантационной обработки. Помимо этого, сшивание с помощью физических методов хоть и приводит к прямому сшиванию, но, как правило, с низкой плотностью, что не обеспечивает материалу необходимую прочность. Следовательно, несмотря на то, что сшивание может выполняться с помощью физических методов, данные способы не подходят для сердечно-сосудистых материалов, предназначенных для пожизненной имплантации, но могут быть с успехом использованы для резорбируемых материалов на основе коллагена.

Таблица 1 – Преимущества и недостатки методов сшивки [116]

Метод сшивки	Преимущества	Недостатки
Физические	Безопасно	Связи намного слабее, чем у химических сшивателей
	Низкая токсичность	Может изменить свойства материалов
	Дешевизна	Длительный процесс сшивки
	Минимальная реакция после сшивки	Отсутствие контроля над кинетикой реакции сшивания
		Более низкие степени сшивания
Ферментативные	В отличие от многих химических агентов, ферменты наиболее активны в мягких условиях водной реакции. Процессом сшивания часто можно управлять, изменяя температуру, pH или ионную силу	Самые дорогие сшиватели
		Субстрат специфичность
Химические	Сильные сшивки	Могут быть токсичными для клеток
		Необходима отмывка
		Дороже физической сшивки

Ферментативные методы сшивки включают в себя воздействие ферментов, присутствующих в различных организмах, включая позвоночных, беспозвоночных, растения и микроорганизмы, и катализирующих сшивание белков в определенных биологических процессах, таких как ороговение эпидермиса, свертывание крови и другие. В последнее время стратегия ферментативного сшивания с использованием трансглутаминаз (TGase; протеинглутаминазная гамма-глутамилтрансфераза) [117], пероксидазы хрена (HRP) и перекиси водорода (H_2O_2) [118] все чаще используется для изготовления различных типов резорбируемых биополимерных каркасов и гидрогелей благодаря эффективности их сшивания, мягким условиям реакции и низкой цитотоксичности. Тем не менее, субстрат-специфичность и высокая стоимость ферментов значительно ограничивают применение ферментативных методов сшивки в производстве биоимплантатов. В том числе, данные методы сшивки, не смотря на все их преимущества, не применяются для изготовления сердечно-сосудистых биопротезов.

Таблица 2 – Преимущества и недостатки химических сшивателей [116]

Сшиватель	Преимущества	Недостатки
Глутаровый альдегид	– дешевизна – высокая степень сшивания – снижение иммуногенности – сшивает множество различных биополимеров	– высокая токсичность – требуют дополнительного экранирования в материалах для медицинского применения – необходимость дополнительной промывки специфическими реагентами – изменение цвета материала на желтый
Карбодиимиды	– меньшая токсичность в сравнении с ГА и ДГЭЭ – можно отмыть деминерализованной водой	– дороговизна – низкая степень сшивки в сравнении с ГА
Генипин	– биосовместимость – низкая токсичность – высокая степень сшивания – снижение иммуногенности больше, чем с ГА	– дороговизна – изменение цвета материала на синий

ГА – глутаровый альдегид; ДГЭЭ – диглицидиловый эфир этиленгликоля

Методы химической сшивки ксеноперикарда являются наиболее часто используемыми для улучшения биомеханических свойств коллагеновых биоматериалов. Эти способы включают реакцию бифункционального реагента (т.е. спейсера) с аминогруппами остатков лизина или гидроксизина в различных полипептидных цепях или активацию карбоксильных групп остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот с последующей реакцией с аминогруппой другой полипептидной цепи с образованием амидной связи [119].

Среди наиболее часто применяемых реагентов для сшивки выделяют альдегиды (глутаровый альдегид (ГА) и формальдегид (ФА)), карбодиимиды, эпоксисоединения (диглицидиловый эфир этиленгликоля (ДГЭЭ)) и генипин (Таблица 2).

1.3.1.1 Глутаровый альдегид

Первоначальные попытки использовать для химической фиксации ксеноперикарда формальдегид (ФА) показали, что образующиеся связи в значительной степени обратимы и относительно неэффективны. Кроме того, превращение ФА при длительном хранении в параформальдегид также негативно сказалось на эффективности использования данного вещества в качестве фиксатора для биоматериалов.

По сравнению с другими известными методами, сшивание коллагена глутаровым альдегидом (ГА) обеспечивает материалы с наивысшей степенью сшивания. В настоящее время это наиболее часто используемый химический реагент для сшивания материалов на основе коллагена. Этот сшивающий агент легкодоступен, недорог и образует водные растворы, которые могут эффективно сшивать ткани за относительно короткий период [120]. С помощью сшивания ГА можно добиться повышенной устойчивости к биodeградации, снижения антигенности и улучшения механических свойств материалов на основе коллагена. Помимо фиксации ткани, глутаровый альдегид является отличным стерилизующим средством для подготовки биологических тканей к имплантации.

Глутаровый альдегид – это диальдегид, который способен химически взаимодействовать с аминоклуппами коллагена с образованием химических связей. Глутаровый альдегид является бифункциональным из-за присутствия альдегида на обоих концах пятиуглеродной алифатической цепи. ГА вступает в реакцию с аминными или гидроксильными функциональными группами белков и полимеров, соответственно, посредством реакции основания Шиффа и соединяет биополимерные цепи посредством внутри- или межмолекулярных взаимодействий. Таким образом, все свободные аминоклуппы при обработке ГА формируют сильно сшитую сеть [121]. При этом раствор ГА, используемый для фиксации коллагеновых биоматериалов, обычно состоит из смесей свободного альдегида, мономерного и дигидратированного мономерного ГА, мономерных и полимерных полуацеталей и различных ненасыщенных полимеров [122]. Свободный ГА, циклический гемиацеталь и олигомеры находятся в равновесии друг с другом, при этом количество свободного ГА обычно не превышает 4% [123]. Уровень полимеризованного ГА в растворе может изменяться и зависит от условий хранения и возраста раствора [124]. В процессе полимеризации принимают участие как свободный ГА, так и ненасыщенный полимер, и обе эти формы могут оказывать влияние на биологические характеристики фиксированного биоматериала, такие как, например, цитотоксичность [125]. Из вышесказанного следует, что биохимические характеристики фиксированных ГА биоматериалов зависят от стабильности полимеров ГА в фиксирующем растворе, а также в растворе хранения [126].

Вероятнее всего, при фиксации коллагена ГА, сшивание происходит в результате комбинированного воздействия связей, образующихся в результате реакций между альдегидной группой мономерного ГА с аминоклуппой и полимеризации ГА посредством альдольной конденсации между соседними альдегидами.

Таким образом, двумя наиболее важными характеристиками перикарда, обработанного ГА, будут плотность сшивания и точная молекулярная структура связей, а они, в свою очередь, будут зависеть от концентрации ГА и присутствия любых других химических веществ в фиксирующем растворе, особенно аминокислот [127, 128, 129, 130]. Указанные свойства фиксирующего раствора ГА имеют важное значение, поскольку, как отмечалось ранее, химические характеристики

фиксированного перикарда сильно влияют как на механические свойства БКС, так и на его склонность к кальцинозу [131, 132, 133].

Среди существующих на сегодняшний день коммерческих БКС встречаются различные способы фиксации ГА. Чаще всего встречаются протоколы, при которых проводится один или несколько начальных этапов фиксации 0,2 – 0,8% ГА с последующим хранением, обычно в 0,1 % ГА и органическом растворителе, таком как этанол или октанол. Некоторые протоколы включают фазы постфиксации лизином [134] или глицином [125]. Некоторыми производителями предпринимались попытки избежать длительного хранения протезов в фиксирующих растворах, например, путем сублимационной сушки, однако такой способ консервации оказывал сильное повреждающее воздействие на коллагеновые фибриллы [135].

Важно отметить, что ГА является токсичным химическим сшивателем и требует долгой и тщательной промывки после проведения сшивки. Большинство исследований *in vitro* доказали значительную цитотоксичность ГА для различных типов клеток [136]. Согласно рекомендациям производителей, хранящиеся в фиксирующих растворах БКС следует несколько раз тщательно промывать физиологическим раствором (10-20 минут) перед клиническим применением. Более того, исследования *in vivo* показали, что фиксация ксеноперикардальных биоматериалов с помощью ГА может способствовать развитию воспаления [137] и кальциноза [138].

Во-первых, непрореагировавший ГА или ГА, адсорбированный в биоматериале при хранении, может выделяться из биоматериалов в организм непосредственно после имплантации. Кроме того, известно, что при реакции ГА с первичными аминами в биоматериалах образуются нестабильные имины (основания Шиффа), при разрушении которых происходит постепенное вымывание ГА из биоматериала в течение долгого времени после имплантации. Несвязанные альдегиды, выделяющиеся из биоматериала, вызывают гибель клеток, развитие воспалительных реакций как локальных, так и общих при выделении в системный кровоток, что способствует развитию кальциноза [139].

В литературе также постулируется, что в фиксированной ткани обычно присутствуют непрореагировавшие альдегидные группы, которые могут окисляться до карбоксильных фрагментов. Эти фрагменты могут притягивать ионы кальция и также способствовать инициированию кальциноза [140].

Для борьбы с негативными последствиями использования ГА, в мировой патентной литературе представлены способы, предлагающие дополнительные этапы обработки фиксированных ГА биоматериалов, направленные на деактивацию молекул свободного ГА и непрореагировавших альдегидных групп [141, 142, 143, 144, 145]. Например, предложенные в патенте США №5862806 [146] методы включают дегидратацию тканей, обработанных ГА, с использованием органического раствора (т.е. этанола, но без глицерина) и нанесение химического

восстановителя, такого как цианоборгидрид натрия или борогидрид натрия в органическом растворителе. Методы, указанные в патенте США №5476516 [147], включают добавление полиолов (например, глицерина) и спиртов в обработку биоматериалов. Патенты США №6630001 [148] и №6277555 [149] предлагают использование консервирования глицерином и лиофилизации ткани. Выше представленные патенты направлены на снижение кальцификации хсКПБ за счет подавления токсического действия ГА, но не затрагивают какие-либо стратегии предотвращения окисления тканей.

Закрытие альдегидных групп в ткани с помощью обработки этиловым спиртом, антиоксидантами, а также восстановительное аминирование может предотвращать окисление ткани. Например, методы уменьшения кальцификации, раскрытые в патентах США №6471,723 [150] и патентах США №4786,287 [151], включают добавление различных аминов для детоксикации альдегидных групп в фиксированной ГА ткани. Однако, эти химические вещества не прикрепляются к ткани надолго и, таким образом, со временем диффундируют из ткани, что резко снижает эффективность этих процедур по снижению кальциноза.

Для блокировки альдегидных групп также используется метод, известный как кэппинг. Он предполагает обработку кислотным раствором, содержащим любую кислоту (но лучше всего использовать аминокарбоновые кислоты), способную инактивировать и/или модифицировать фрагменты сшивающего агента и таким образом уменьшить количество доступных сайтов связывания кальция. Аминокарбоновые кислоты представляют собой соединения, в молекуле которых присутствует по меньшей мере одна аминогруппа и одна карбоксильная группа. Более предпочтительно, чтобы аминокарбоновую кислоту выбирали из группы, состоящей из L-аргинина, L-лизина, L-гистидина, L-глутамата или L-аспартата. Например, для инактивации непрореагировавших групп ГА в технологии «АОА Tissue Treatment» (Medtronic) предлагают использовать аминоклеиновую кислоту (АОА).

В усовершенствованном процессе изготовления тканей сердечного клапана Carpentier-Edwards ThermaFix™ (Edwards Lifesciences) используются как обработка, направленная на инактивацию нестабильных непрореагировавших молекул ГА, так и обработка, направленная на инактивацию свободных альдегидных групп. В технологии «ThermaFix» используют сложный набор, включающий химическую стабилизацию ткани в ГА с последующим воздействием восстановителя (борогидрид натрия или цианоборогидрид натрия), затем воздействию комплекса восстановительного аминирования за счет реакции с этаноламином, гидроксизиноном, таурином, сульфатом декстрана, сульфатом хондроитина, поливиниловым спиртом, 3-дезоксиглюкозоном, гидразином, гидразидом адипиновой кислоты и гепарином [152]. Показано, что такая комбинированная химическая обработка значительно снижает поглощение кальция биоматериалом по сравнению с контролем, обработанным только ГА.

1.3.1.2 Карбодиимиды

Существуют также химические методы фиксации коллагена, целью которых являются карбоксильные группы. Большинство таких методов основано на активации карбоксильных групп в полипептидной цепи, которые могут вступать в реакцию с аминогруппами в других цепях. Для таких сшивок, как правило, используются карбодиимиды.

1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид (ЭДК) представляет собой водорастворимый карбодиимид, который может вступать в реакцию с карбоксильными, гидроксильными и сульфгидрильными функциональными группами. ЭДК реагирует с карбоксигруппами, первоначально с образованием О-ацилизомочевины, которая затем соединяется с диаминами с образованием амидных связей [153]. О-ацилизомочевина также может быть гидролизована или преобразована в N-ацилмочевину, которая гораздо более стабильна и не вступает в реакцию с образованием поперечных связей. Однако добавление N-гидроксисукцинимид (N-ГС) предотвращает эту перегруппировку [153]. В присутствии N-ГС О-ацилизомочевина может превращаться в активированную N-ГС карбоксильную группу, которая также может вступать в реакцию со свободной аминогруппой с образованием поперечной связи [153]. Добавление N-ГС увеличивает скорость реакции. Кроме того, сшивание ЭДК и N-ГС обеспечивает коллагеновому материалу высокую степень сшивания [153]. Однако в сравнении с ГА-стабилизацией, использование ЭДК/N-ГС также приводит к получению материала со значительно меньшей прочностью на разрыв [154].

1.3.1.3 Генипин

Наименьшей цитотоксичностью и наибольшей биосовместимостью обладают природные сшивающие агенты, к числу которых относят генипин. Генипин является продуктом гидролиза генипозид, выделяемого из плодов гардении. Обладает большим количеством гидрокси- и карбоксильных активных групп и низкой токсичностью, по сравнению с ГА [155, 156]. Более того, исследования показывают, что обработка биоматериалов генипином способствует снижению их иммуногенности [157], и также индуцирует синтез новых коллагеновых волокон клетками [158]. Хотя генипин является безопасным сшивающим агентом, он дорог, особенно при массовом использовании в производстве биоматериалов. Биологическое действие генипина на клетки также является малоизученным, а результаты некоторых исследований вызывают опасения. В частности, было показано, что генипин в концентрации 0,5 мкМ может ингибировать реорганизацию цитоскелета и препятствовать росту клеток [159].

1.3.1.4 Альтернативные методы фиксации, как способы подавления кальциноза

В дополнение к обычным сшивающим веществам, в практике могут также использоваться сквараиновая (квадратная) кислота [160], коричный альдегид [161], нордигидрогваяретовая кислота [162], дубильная кислота [163], сшивающие вещества на основе эпоксидной смолы (например, 1,4-диглицидиловый эфир бутандиола) [164], а также метилглицидиловый эфир и полиглицидиловый эфир глицерина [165].

Также были исследованы возможности дисульфидного сшивания для конъюгации коллагена с полиэтиленгликолем диакриламидом [166]. Однако все выше озвученные дополнительные сшивающие агенты не используются в клинической практике, и пока их применение имеет сугубо экспериментальный характер.

Сшивание также может быть достигнуто с помощью диизоцианатов путем образования мостиков из аминок групп на двух соседних полипептидных цепях. Эти вещества используются для сшивания коллагена [167] и даже рассматриваются некоторыми исследователями для фиксации бычьего перикарда. Недостатком, однако, является токсичность диизоцианатов и ограниченная растворимость в воде большинства из них [168].

Другой метод сшивания основан на многоэтапной реакции, приводящей к образованию ацилазида [22]. Ацилазидный метод включает активацию карбоксильных групп в полипептидной цепи. Активированные группы образуют поперечные связи в результате реакции с аминок группами коллагена другой цепи [169]. Сначала карбоксильные группы этерифицируются в результате реакции со спиртом. Затем этот сложный эфир превращается в гидразид в результате реакции с гидразином ($\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$). Ацилазидные группы образуются в результате реакции с кислым раствором нитрита натрия. При низких температурах и основных значениях pH ацилазидная группа вступает в реакцию с первичной аминок группой с образованием амидных связей. Эта многостадийная реакция приводит к хорошим свойствам материала; однако необходимо длительное время реакции (например, 7 дней и более) [170]. В качестве альтернативы недавно был разработан способ, который не требует стадии этерификации или использования гидразина. В этом методе карбоксильная группа превращается в ацилазидную группу за одну стадию путем реакции с дифенилфосфорилазидом (DPPA/ДФФА). Это значительно увеличивает скорость реакции; однако реакцию проводят в органическом растворителе (например, диметилформамиде, ДМФ, который опасен для организма [171].

Еще одна группа химических методов сшивки коллагена основана на использовании эпоксидных соединений, например, эпихлоргидрина [169]. Эпоксидные соединения (т.е. эпоксиды) могут подвергаться как кислотнo-катализируемому, так и катализируемому

основанием реакциям с рядом функциональных групп, включая аминогруппы и группы карбоновых кислот, при соответствующих условиях. Обычно сшивание коллагена эпоксидами осуществляется при базовом значении pH (например, pH 8-10), в результате чего сшивание происходит через свободные аминогруппы коллагена [164, 165]. Сшивка эпоксисоединениями активно внедряется в производство БКС в настоящее время, например, в патентах США №4806595 [172], США №5080670 [173], США №5880242 [174], США №6117979 [175] и США №7918899 [176]. Однако данный способ сшивки кардинально изменяет физико-химические свойства биоматериалов. По сути, при обработке эпоксисоединениями происходит полное «запечатывание» биоматериала и его волокон эпоксидным покрытием, которое в дальнейшем исключает контакт клеток реципиента с волокнами биоматериала. Таким образом реакция организма развивается непосредственно на эпоксисоединения, но не на сам биоматериал. При этом в виду относительно недавнего введения эпоксисоединений в производство хсКПБ, долгосрочный ответ организма на эти соединения неизвестен.

Таким образом, не смотря на многолетний поиск альтернативных менее токсичных способов фиксации, которые могли бы положительно сказаться на кальцинозрезистентности хсКПБ и при этом обеспечить высокую прочность и стабильность имплантатов, наиболее эффективным и используемым сшивающим агентом по-прежнему остается ГА. ГА применяется для изготовления практически всех имеющихся на сегодняшний день коммерческих БКС в виду его хорошей растворимости в воде, более универсальных характеристик сшивания белков ВКМ и наиболее оптимальных механических характеристик получаемого с его помощью матрикса [122]. Однако в настоящее время его преимущественно применяют в небольших концентрациях (<0,5%), чтобы снизить токсичное воздействие непрореагировавших молекул альдегида, уменьшить количество свободных альдегидных групп и повысить устойчивость ГА-фиксированных биоматериалов к кальцинозу.

1.3.2 Децеллюляризация ксеноперикардальных биоматериалов как способ подавления кальциноза

В большинстве патентов основным способом подавления кальцификации считается децеллюляризация. Под «децеллюляризацией» понимается способ удаления клеток донора и клеточного дебриса из ткани и тканевых структур. На сегодняшний день децеллюляризация применяется для БКС, изготовленных как из ксенотрансплантатов, так и из ксеноперикардальных материалов [177]. Методы децеллюляризации можно разделить на три группы: физические, биологические (ферментативные) и химические.

Физические методы децеллюляризации тканей включают механическое удаление клеток, воздействие ультразвука или циклы замораживания/размораживания (Таблица 3) [177]. Данные методы исключают использование потенциально токсичных химических агентов, однако они также не обеспечивают удаление из тканей клеточного дебриса, который может привести к иммунным реакциям у реципиента и кальцинозу биоматериалов [178]. Также стоит отметить, что физическая децеллюляризация требует длительного воздействия на ткани, что повреждает ВКМ биоматериалов и приводит к снижению их прочностных характеристик [88], поэтому такая обработка для хсКПБ не проводится.

Таблица 3 – Физические методы децеллюляризации

Метод	Тип действия	Воздействие на внеклеточный матрикс
Циклы замораживания/оттаивания	Клетки разрываются за счет образования внутриклеточных кристаллов льда	Кристаллы льда могут повредить или нарушить структуру ВКМ
Механическое воздействие	Механический разрыв клеток под действием давления	Прямое воздействие, повреждающее ВКМ
Ультразвуковое воздействие	Лизис клеток под действием ультразвука	Прямое воздействие, повреждающее ВКМ

Для биологической децеллюляризации используют ферменты (трипсин, диспазы, нуклеазы, коллагеназы), которые способствуют откреплению клеток донора от ВКМ тканей и разрушению внутриклеточных компонентов. Однако данный метод не подходит для сердечно-сосудистых биоматериалов, которые еще до этапа децеллюляризации подвергаются химической сшивке, делающий ткань устойчивой к действию большинства ферментов. В протоколах децеллюляризации хсКПБ в некоторых случаях ферменты используются в комбинации с химическими методами воздействия для более эффективного удаления ДНК и РНК донора, которые являются источником фосфатов и могут способствовать кальцификации.

Децеллюляризацию хсКПБ преимущественно осуществляют с помощью химических методов (Таблица 4). Для этого используют различные поверхностно-активные вещества [179, 180], преобладающими из которых являются смеси из ионного и неионного детергентов [181].

Таблица 4 – Химические методы децеллюляризации

Метод	Тип действия	Воздействие на внеклеточный матрикс
Кислоты и щелочи	Денатурируют белки и нуклеиновые кислоты и солюбилизируют цитоплазму клеток	Возможно удаление или повреждение ГАГ, коллагена и других сигнальных молекул
Гипо- и гипертонические растворы	Лизируют клетки и разрушают ДНК-белковые взаимодействия	Эффективно лизирует клетки, но не удаляет клеточный дебрис
Неионные детергенты (Тритон X-100)	Нарушают липид-липидные, липид-белковые и ДНК-белковые взаимодействия	Эффективность зависит от типа ткани. Удаляет ГАГ и вызывает повреждения ультраструктуры ВКМ
Ионные детергенты (ДСН, ДХН, Тритон X-200)	И ядерные, и цитоплазматические мембраны растворяются, происходит незначительная денатурация белков	ДСН: эффективно удаляет цитоплазматические белки и остатки ядер, но нарушает ультраструктуру ВКМ, повреждает коллаген и удаляет ГАГ. ДХН: незначительно нарушает ультраструктуру ВКМ и вымывает часть ГАГ. Не так эффективен в удалении клеточных компонентов. Тритон X-200: эффективен при удалении клеток, но также вызывает более сильное нарушение ультраструктуры ВКМ

ДСН – додецилсульфат натрия; ДХН – дезоксихолат натрия; ГАГ – гликозаминогликаны

В таких протоколах обработки предлагается использовать поэтапно сначала окисляющие агенты, которые могут инактивировать центры нуклеации кальциноза (гипохлорит натрия, перформиновая кислота, периодная кислота, надуксусная кислота и их комбинации) в комплексе с хелатирующим агентом (ЭДТА, ЭГТА, лимонной кислотой, их солей и их комбинаций) с последующей обработкой ионным и неионным детергентом в присутствии восстановителя (такого как дитиотреитол и др.), которые способны восстанавливать дисульфидные связи [180, 181]. В патентах США №6509145 [180] и №7078163 [182] утверждается, что такая децеллюляризация снижает кальцификацию хсКПБ.

Долгое время наиболее популярным ионным детергентом оставался Тритон X-100, используемый в различных концентрациях и в комбинации чаще всего с додецилсульфатом натрия (ДСН), реже с гипо- и гипертоническими растворами и ферментами [183, 184, 185, 186, 187, 188]. Дезоксихолат натрия (ДХН) начал использоваться как альтернатива смеси Тритон X-100 и ДСН относительно недавно [189]. Сравнительные исследования результатов

децеллюляризации показали, что ДСН, хотя и является одним из наиболее эффективных агентов для удаления клеток донора, вызывает повреждения структуры ВКМ биоматериалов. В то время как ДХН был признан более щадящим агентом децеллюляризации, позволяющим эффективно удалить все липидные компоненты как клеток, так и ткани, а также сохранить структуру, а значит и высокую прочность будущих биоматериалов [190].

Результаты современных исследований децеллюляризованных хсКПБ показывают значительное снижение не только в иммуногенности, но и кальцификации по сравнению с недецеллюляризованным контролем [191]. В этой связи, на сегодняшний день именно ДСН используется для изготовления хсКПБ большинства коммерческих БКС. В первую очередь ДСН среди всех детергентов наиболее эффективно разрушает клетки и удаляет цитоплазматические белки и остатки клеточных компонентов из тканей. Кроме того, ДСН также разрушает и удаляет гликозаминогликаны (ГАГ) из ткани биоматериала, что в случае сердечно-сосудистых биоматериалов считается преимуществом, так как поврежденные ГАГ также могут выступать центрами инициации кальциноза [2]. Например, технология «ThermaFix» (Edwards Lifesciences) использует термическое воздействие на биоматериалы для разрушения ГАГ.

1.3.2 Делипидизация ксеноперикардимальных биоматериалов, как способ подавления кальциноза

В научной литературе обычно описываются методы обработки фиксированных тканей спиртом перед имплантацией. Использование спиртов при обработке биоматериалов хорошо известно, и его использование подразумевается не только в качестве растворителя и/или стерилизующего средства, но и (прежде всего) как дефосфолипидизирующий агент [192, 193, 194].

Спиртосодержащие растворы – это водные растворы, в которых содержание спирта составляет более 50%. В производстве чаще всего встречаются растворы с содержанием спиртов в диапазоне от 60 до 80%. Может использоваться либо забуференный, либо незабуференный спиртосодержащий раствор. Однако предпочтительнее использовать незабуференный спиртосодержащий раствор, поскольку было обнаружено, что забуференные растворы отрицательно влияют на последующие этапы сшивания и консервации и приводят к пожелтению биоматериала. В патентной литературе [192, 193] указывается, что лучше всего использовать низшие спирты C1-C6 и особенно рекомендуют метанол, этанол, циклогексанол, изопропанол, пропанол, бутанол, пентанол, изобутанол, вторичный бутанол и т-бутанол. В некоторых вариантах спиртосодержащий раствор содержит смесь двух или более спиртов при условии, что общий объем спирта превышает 50%. Например, эффективна смесь примерно из 70% этанола и примерно 10%

изобутанола [195]. При этом в вышеуказанном техническом решении постулируется, что биоматериал на стадии, предшествующей фиксации ГА, может подвергаться воздействию спиртосодержащего раствора в течение любого периода времени, достаточного для придания биоматериалу устойчивости к кальцификации – по меньшей мере от 24 до 48 часов [192, 193]. В случае фиксации ГА до воздействия спиртов, время обработки спиртами может быть еще увеличено.

Все вышеуказанные методы могут в различных вариациях и комбинациях использоваться производителями БКС, как дополнительные этапы обработки хсКПБ при их изготовлении. Тем не менее, когда речь заходит о стратегиях подавления склонности БКС к кальцинозу, наиболее распространенными и устоявшимися этапами обработки являются делипидизация и децеллюляризация, которые на сегодняшний день стали обязательными этапами обработки для современных хсКПБ.

1.4 Структурная дегенерация биопротезов клапанов сердца

Структурная дегенерация БКС или структурная клапанная дегенерация (СКД) определяется как «приобретенная внутренняя патология БКС, которая характеризуется износом створок или поддерживающих конструкций, приводящим к утолщению, разрыву или разрушению биоматериала протеза с возможной связанной с этим гемодинамической дисфункцией клапана, проявляющейся в виде стеноза или регургитации» [196]. Как следует из определения, СКД не зависит от внутренней механической неисправности самого протеза или технических проблем во время имплантации, а опосредована накоплением структурных и биохимических изменений биоматериалов БКС [197]. Всеобъемлющее, единообразное и стандартизированное определение структурной дегенерации БКС до сих пор не сформулировано, однако на сегодняшний день стало предельно ясно, что данный процесс всецело зависит от биосовместимости хсКПБ.

Биосовместимость, определяемая как «способность материала, изделий или устройств функционировать в организме, не вызывая отрицательных реакций, и индуцировать клеточный и тканевой ответ, необходимый для достижения оптимального терапевтического эффекта» [198], затрагивает все аспекты взаимодействия между имплантированным биоматериалом и различными системами организма реципиента. Эти процессы включают в себя как воздействие организма на биоматериал, так и биоматериала на организм, причем механизмы этих, казалось бы, отдельных процессов явно взаимосвязаны [22].

Как отмечалось в предыдущем разделе, биоматериалы, используемые в ССХ, подвергаются воздействию различных химических агентов, которые изменяют в том числе и биологические свойства хсКПБ. К этим биологическим свойствам можно отнести цитотоксическое действие ГА и

остаточных децеллюляризирующих агентов, модификацию поверхности и изменение структуры матрикса биоматериалов, антигенные свойства, а также химические характеристики, влияющие на склонность хсКПБ к кальцинозу.

Таким образом, можно выделить следующие основные аспекты биосовместимости хсКПБ, которые вносят вклад в развитие их структурной дегенерации:

- взаимодействие между хсКПБ и кровью, включая токсическое воздействие высвобождаемых с поверхности биоматериала агентов обработки и тромборезистентные характеристики поверхности биоматериала;
- структурные изменения ВКМ хсКПБ, а именно дегенерация/деградация белков внеклеточного матрикса;
- иммунологические реакции на хсКПБ, которые, по определению, являются ксеногенными и, следовательно, потенциально антигенными;
- кальцификация хсКПБ.

Все эти воздействия могут приводить к разрушению хсКПБ и дисфункции биопротеза. Стоит отметить, что из данного перечня был исключен эндокардит, который может повлиять на биосовместимость всех видов протезов клапанов сердца, но не имеет прямого отношения к биоматериалам.

Статистические данные указывают, что именно асептический кальциноз является наиболее распространенной патологической формой СКД, который приводит к быстрой и полной дисфункции БКС, требующей его немедленной замены. Асептический кальциноз – это независимый от инфекционного поражения (то есть агента бактериальной природы) процесс отложения кальциевых депозитов в тканях биопротеза клапана сердца. Полагают, что кальциноз инородных поверхностей, контактирующих с кровью и мягкими тканями, является дистрофическим и характеризуется отложением фосфатов кальция в местах повреждения или дегенерации тканей при нормальной концентрации ионов кальция и фосфора в крови и внеклеточной жидкости [198].

1.4.1 Кальциноз как самая распространённая патологическая форма структурной дегенерации биопротезов клапанов сердца

Хотя только 1% кальция, содержащегося в организме человека, содержится в жидкостях (внеклеточные жидкости и внутриклеточные жидкости, кровь), этот кальций выполняет чрезвычайно важные функции, включающие сокращение мышц, передачу нервных импульсов и клеточный метаболизм. Неудивительно, что в зависимости от локальных и системных условий кальций может иметь тенденцию к осаждению в некоторых тканях, особенно в тканях

сердечно-сосудистой системы [199]. Явление отложения солей кальция в мягких тканях и органах организма уже давно определено, как патологический процесс, называемый кальцификацией или кальцинозом. Например, такой патологический кальциноз часто наблюдается в тканях клапанов сердца и является основным фактором в этиологии развития дисфункции аортального клапана [200].

Утверждается, что молекулярные механизмы кальциноза нативных клапанов аналогичны тем, которые задействованы при атеросклерозе [201]. Активация интерстициальных клеток сердечного клапана и путей кальцифицирующего стеноза являются результатом напряжения сдвига, повреждения эндотелия и отложения липопротеидов низкой плотности, которые запускают воспалительные процессы в тканях клапана [22]. Моноциты, макрофаги и Т-клетки продуцируют цитокины, включая TGF- β , который регулирует пролиферацию и дифференцировку клеток, TNF- α , который регулирует иммунные клетки, и ИЛ-2 [22]. В этих условиях активированные интерстициальные клетки превращаются в миофибробласты, которые проявляют ангиогенную активность и могут далее трансформироваться в остеогенные клетки, минерализующие окружающие ткани [22].

Конечно, существуют значительные различия между кальцинозом нативных створок клапанов сердца и створок БКС, но есть и достаточно сходств, позволяющих провести некоторую экстраполяцию молекулярных путей, задействованных при развитии кальциноза аортального клапана, на кальциноз БКС [202].

Толщина каждой створки аортального клапана человека составляет несколько сотен микрон и состоит из трех слоев: фиброзного, спонгиозного и вентрикулярного, которые образуют сложную микроструктуру, имеющую многослойный архитектурный рисунок, оптимально отвечающий биомеханическим потребностям клапана [203]. Внеклеточный матрикс створок клапана состоит из коллагена, эластина, протеогликанов и ГАГ. Фиброзная оболочка богата коллагеном, спонгиозная оболочка – ГАГ, а вентрикулярная оболочка – эластином. На поверхностях створок, контактирующих с кровью, находятся эндотелиальные клетки, а интерстициальные клетки присутствуют во всех слоях, особенно в более глубоких. При этом интерстициальные клетки обладают различными характеристиками фибробластов, миофибробластов и гладкомышечных клеток и могут изменять свой фенотип в зависимости от, например, механических воздействий.

Дисфункция аортального клапана, по-видимому, инициируется образованием узелков/ядер кальцификации, состоящих из гидроксиапатитоподобного фосфата кальция, в первую очередь и наиболее значительно в структурах фиброзного слоя створок [204]. Депозиты фосфатов кальция обычно возникают в местах прикрепления створок в областях наибольшего функционального напряжения [22]. Один из возможных механизмов, называемый

дистрофической кальцификацией, включает реакцию между кальцийсодержащей внеклеточной жидкостью и фосфат-содержащими мембранами нефункционирующих (поврежденных) клеток. То есть значительный градиент ионов кальция через клеточную мембрану вызывает приток кальция при повреждении клеток, а фосфаты, естественно присутствующие в клеточных мембранах, связываются с кальцием и способствуют образованию ядер кальцификации [22]. Альтернативным механизмом предполагается окостенение, при котором в поврежденных тканях происходит остеогенная дифференцировка клеток [22]. В обоих случаях в качестве потенциальных регуляторов могут рассматриваться либо механические, либо биохимические факторы, воздействующие на клетки и ВКМ створок клапанов.

Предполагается, что асептический кальциноз биоматериалов, таких как хсКПБ, определяется сочетанием факторов, зависящих от метаболизма реципиента, биохимических характеристик самого материала и влияющих на него механических воздействий [59, 205, 206]. Первостепенную значимость в данном процессе отдают клеткам и ВКМ неживой (децеллюляризованной) и измененной (фиксированной) ткани, которые, как предполагается, являются основными очагами патологической кальцификации, происходящей внутри материала (внутренняя кальцификация) или связанной с прикрепленными клетками и белками на поверхности (внешняя кальцификация) соответственно [206]. Динамический стресс безусловно способствует кальцинозу хсКПБ, но не является необходимым условием [4].

Здесь необходимо упомянуть два других важных фактора, которые также могут быть вовлечены в процесс развития асептического кальциноза именно хсКПБ. Во-первых, до сих пор ведутся споры относительно роли иммунной системы в кальцинозе БКС. Хотя существует убеждение, что иммунный ответ и воспаление не оказывают существенного влияния на процессы кальциноза, и предполагается, что обнаружение антител в кальцинированных БКС может отражать вторичную реакцию на повреждение протеза вследствие его кальцификации, а не причину отказа, имеющиеся более углубленные исследования доказывают обратное [22]. В частности, было показано, что фиксированный ГА бычий перикард провоцирует клеточные и гуморальные иммунные реакции как у крыс, так и у людей [207], и доказана вовлеченность циркулирующих графт-специфичных антител в развитие кальциноза БКС [208, 209, 210]. В пользу данной теории также говорят экспериментальные данные, демонстрирующие благоприятное влияние децеллюляризирующей обработки хсКПБ на кальцинозрезистентность этих материалов [211].

Другим фактором является спорная роль процесса фиксации хсКПБ в их кальцификации. Изначально предполагалось, что использование только фиксирующих агентов, которые обладают одновременно антибактериальными и противогрибковыми свойствами, а также вступает в реакцию с белками для устранения их антигенности, будет достаточно для

обеспечения неиммуногенности готовых хсКПБ [122]. Однако, хотя БКС, фиксированные ГА, обладают хорошими механическими свойствами и гемосовместимостью, стало ясно, что использование фиксирующих агентов также влияет и на кальцификацию протезов.

Рассмотрим далее более подробно все предполагаемые механизмы развития кальциноза в зависимости от факторов, которые могут в них участвовать: влияние ГА, остаточный клеточный дебрис, иммунный ответ и др.

1.5 Механизмы развития асептического кальциноза химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов

Механизмы развития асептического кальциноза хсКПБ можно условно разделить на пассивные (для пассивного кальциноза) и активные (для активного кальциноза). Активные механизмы индуцируются клетками реципиента и зависят непосредственно от характера клеточной реакции, развивающейся при имплантации хсКПБ. Они могут быть опосредованы гибелью клеток реципиента при контакте с токсичным ГА и образованием клеточного дебриса и апоптотических телец, а также развитием иммунной реакции в тканях биопротеза. В то время как пассивные механизмы не зависят от клеток реципиента и включают неспецифическую адгезию белков плазмы крови на поверхности хсКПБ, связывание кальция и фосфатов фосфолипидами, присутствующими в тканях биоматериала, а также пассивную адгезию ионов кальция и фосфора на поврежденном матриксе хсКПБ.

1.5.1 Глутаральдегид-ассоциированные механизмы развития кальциноза

Впервые механизм кальцификации хсКПБ, вызванный ГА, был подтвержден в 1999 г. [212, 213]. Тогда было выдвинуто предположение, что кальцификация биоматериала была обусловлена в основном цитотоксическим воздействием ГА на клетки реципиента. При нормальных физиологических условиях внутриклеточный уровень кальция в тысячу раз ниже внеклеточного [214], что постоянно поддерживается митохондриями через кальциевый насос (Ca^{2+} -АТФаза и натрий-кальциевый обменник). Помимо того, что живые клетки в норме регулируют гомеостаз кальциевых и фосфатных ионов, они также секретируют вещества, ингибирующие кальцификацию, уничтожают некротизированные клетки и другие продукты взаимодействия биоматериала с кровью (продукты деструкции, фрагменты органических образований), которые могли бы стать центрами кальцификации [198]. Таким образом, функционирующие клетки играют в основном регуляторную роль в процессе кальцификации, в то время как нарушение их функции и гибель могут инициировать и ускорять этот процесс

[198]. Исследования *in vitro* показали, что обработка ГА вызывает гибель контактирующих с обработанным материалом клеток и инактивацию кальциевого насоса, вызывая немедленное высвобождение ионов кальция и фосфора из митохондрий [212]. При этом из-за очень низкой/полностью отсутствующей васкуляризации имплантированных хсКПБ клеточный дебрис не может быть быстро удален из ткани макрофагами. Клетка перестает играть роль буферной емкости и погибая, высвобождает весь внутриклеточный кальций, а нарушение синтеза АТФ и реакции фосфорилирования белков и фосфолипидов приводит к увеличению локальной концентрации фосфатных ионов. Также происходит высвобождение внутриклеточных компонентов, таких как щелочная фосфатаза, АТФ-аза, пирофосфатаза, гидролизующих естественные ингибиторы кальцификации (АТФ, пирофосфат) [198].

Другой важный участок зарождения кальцификации может быть локализован во внеклеточных везикулах, задействованных в клеточном метаболизме и синтезе, и прочих клеточных везикулах, таких как «матриксные везикулы», «апоптотические тельца», «экзосомы» и др. [215]. Такие начальные очаги кальцификации представляют собой концентрически расположенные многослойные структуры, которые были названы сферолитами [216, 217], и как предполагается, оказывают сильное стимулирующее воздействие на кальциноз БКС.

Более того, обработка ГА, изменяет поверхностный заряд коллагенового матрикса и также может способствовать осаждению ионов кальция на материале. Молекула ГА является нейтральной, однако непрореагировавшие с белками свободные альдегидные группы, которые остаются в биоматериале после его фиксации, несут отрицательный заряд и связывают положительно заряженные ионы кальция.

Однако предполагаемые механизмы участия ГА в развитие кальциноза довольно сложно соотнести с результатами экспериментальных и клинических применений фиксированных ГА хсКПБ и протезов, изготовленных из них. Одни исследования демонстрируют, что обработка ксеноперикарда без использования ГА значительно повышает антикальцинозные характеристики материалов [218, 219, 220, 221]. Но существуют и противоположные данные. Так в исследовании было показано, что после 2 месяцев имплантации среднее содержание кальция в тканях перикарда, фиксированных 0,6% ГА, было значительно ниже, чем в тканях перикарда, фиксированных 0,4% ГА, независимо от времени фиксации [138]. Таким образом некоторые исследователи предполагают, что использование ГА в более высоких концентрациях предпочтительно, так как такие материалы обладают превосходящими механическими характеристиками, более устойчивы к ферментативной деградации и постимплантационному кальцинозу.

Такие явные противоречия в выводах от различных исследовательских групп явственно говорят о том, что вопрос участия ГА в асептическом кальцинозе БКС до сих пор не решен, а

предполагаемые механизмы развития кальциноза вследствие цитотоксического воздействия ГА весьма сомнительны.

1.5.2 Иммуно-ассоциированные механизмы развития кальциноза

Молодой возраст пациентов рассматривается как один из наиболее точных факторов риска развития раннего кальциноза БКС [12, 222]. Широко распространено мнение, что это напрямую связано с иммунным ответом, поскольку у молодых людей иммунный ответ более выражен, чем у пожилых. Фактически, за последнее десятилетие накопилось все больше доказательств, убедительно указывающих на решающее участие иммунного ответа в кальцификации и структурной дегенерации БКС [13, 223, 224]. Так было неоднократно показано, что в кальцифицировавшихся хсКПБ наблюдается значительная инфильтрация иммунных клеток, включая Т-клетки, макрофаги, В-клетки, нейтрофилы и плазматические клетки, сопровождающаяся повышенной концентрацией провоспалительных цитокинов [224, 225]. Кроме того, ряд крупных когортных исследований доказывают повышение уровня трансплантат-специфичных антител в кальцифицированных БКС [226, 227]. Приведенные выше факты безусловно показывают, что воспалительная реакция и иммунный ответ могут играть критически важную роль в процессах кальцификации БКС.

Имплантация любых биоматериалов обязательно вызывает реакцию инородного тела на ранних сроках имплантации. Реакция на инородное тело – это иммуноопосредованная реакция на имплантированные материалы, при которой каскад воспалительных процессов приводит к образованию грануляционной ткани с последующей фиброзной трансформацией и инкапсуляцией импланта [228]. В отличие от других биоматериалов, имплантированный хсКПБ не подвергается видимой фиброзной инкапсуляции, что обусловлено высокой силой сдвига и интенсивной гемодинамической нагрузкой на БКС, но допускает неспецифическую адсорбцию белка на своей поверхности [229, 230]. Адсорбция белков плазмы крови приводит к ряду последующих реакций, включающих активацию системы комплемента и тромбоцитов, каскад свертывания крови и адгезию воспалительных клеток [231, 232]. Кроме того, предполагается, что адсорбция сывороточного альбумина и сахаров (гликирование) приводят к изменению биомеханических свойств створок БКС [233], что также может влиять на воспаление. Например, конечные продукты гликирования не только сшивают молекулы коллагена, потенциально вызывая упрочнение створки протеза, но и приводят к модуляции клеточных фенотипов и провоцируют воспаление посредством передачи опосредованных механотрансдукцией сигналов клеточным рецепторам [233].

Белки и продукты гликирования рекрутируют моноциты и макрофаги. При этом, на более поздних сроках имплантации, неоваскуляризация облегчает миграцию макрофагов и других иммунных клеток, а также приносит еще больше ионов кальция [232, 234, 235]. Мигрировавшие макрофаги высвобождают протеолитические ферменты, такие как матриксные металлопротеиназы (ММП) и плазминоген [230], что подтверждается исследовательскими данными, показывающими, заметное повышение содержания ММП-2 и ММП-9 в кальцифицировавшихся БКС по сравнению с некальцифицировавшимися [236, 237]. ММП могут разрушать частично фиксированный ГА коллаген и особенно эластин [232]. Кроме того, ММП играют важную роль в индукции избыточной экспрессии генов воспаления, а также фибро- и остеогенеза [238]. Экспериментальные данные подтверждают присутствие плазминогена в везикулах CD68-положительных макрофагов, мигрирующих в кальцинированные БКС [230]. Известно, что плазминоген, также действуя как мощный провоспалительный медиатор, способствует индукции цитокинов и внутриклеточных сигнальных путей, активирующих макрофаги [239]. В этих условиях сильный ММП-зависимый протеолиз и фибринолитическая система могут расщеплять большинство белков ВКМ [232].

Активированные макрофаги также секретируют кальцийсвязывающие белки, такие как остеокальцин и остеокальсин. Остеонектин (кислый и богатый цистеином секретируемый белок) обладает высоким сродством к кальцию [240, 241]. Остеонектин также модулирует функцию клеток путем взаимодействия с рецепторами клеточных мембран, металлопротеиназами, факторами роста и другими молекулами-биоэффекторами, участвующими в ремоделировании, репарации и росте тканей [242, 243]. Также известно, что макрофагальные матричные везикулы способствуют микрокальцификации в атеросклеротических бляшках [244], и можно предположить, что макрофаги также секретируют матричные везикулы во время кальциноза БКС.

Помимо неспецифической адсорбции белка, факторы, влияющие на инициацию такого воспалительного ответа, остаются не до конца известны. На сегодняшний день к основной причине, провоцирующей адаптивные иммунные реакции после имплантации БКС, относят ксеноантигены. Хотя фиксация ГА и другие предварительные обработки сводят к минимуму антигенные детерминанты хсКПБ, иммуногенность такого биоматериала все еще считается высокой в виду сохранения в ткани углеводных антигенов. Хорошо установлено, что эпитоп α -Gal является основным медиатором иммунного ответа для ксеноимплантатов [245, 246, 247]. В связи с этим, α -Gal повреждающие обработки хсКПБ представляют собой новую и потенциально эффективную стратегию для снижения кальцификации БКС [248, 249, 250]. Дополнительными двумя идентифицированными иммуногенными углеводными антигенами являются антиген N-гликолилнейраминовой кислоты (Neu5Gc) [251, 252] и антиген группы крови Sid (Sd(a)) [247]. Помимо углеводных антигенов, [253] было также идентифицировано 19 специфических

белковых антигенов для БКС, изготовленных из фиксированных ГА хсКПБ, которые стимулируют специфичный к имплантату гуморальный иммунный ответ у пациентов.

В гуморальном ответе, запускаемом незамаскированными/нефиксированными ксеноантигенами, уже существующие антитела играют жизненно важную роль в опсонизации воспалительных клеток для рекрутирования и пролиферации, фагоцитоза, эффероцитоза и т.д., тем самым значительно облегчая общий иммунный ответ. Воспалительные клетки, такие как нейтрофилы и макрофаги, адгезируют к поверхности хсКПБ и впоследствии проникают в матрикс, высвобождая ММП [254]. Таким образом, и клеточный иммунитет участвует в кальцификации БКС. Гистологические исследования БКС, удаленных у пациентов, показали, что лейкоциты разрушают коллагеновые волокна, а на их поверхности присутствуют кристаллы солей кальция, что позволяет предположить, что, возможно, именно лейкоциты в данном случае выступают как очаг кальцификации [255].

Независимо от того, гуморальный или клеточный иммунитет задействуется при имплантации БКС, накопленный пласт данных позволяет утверждать, что развивающиеся иммунные реакции определенно приводят к повреждению структуры матрикса биопротеза, и создают цитокиновый профиль, индуцирующий остеогенную дифференцировку миофибробластов в остеобласты, таким образом опосредуя кальцификацию, хотя точные механизмы этих процессов, а также их инициаторы до сих пор обсуждаются.

1.5.2.1 Роль окислительного стресса в иммуно-ассоциированном кальцинозе

Хорошо известно, что активные формы кислорода и азота (АФК/АФА) оказывают потенциально серьезное воздействие как на ткани реципиента, так и на имплантированные биоматериалы. АФК/АФА непрерывно генерируются как нормальные побочные продукты клеточного метаболизма и в низких концентрациях действуют как сигнальные молекулы, контролируемые клеточную пролиферацию и дифференцировку для многих типов клеток [256]. Но избыточная продукция АФК/АФА участвует в многочисленных патологических процессах, приводя к повреждению ДНК, белков и углеводов, что в целом принято обозначать как окислительный стресс [257]. Анализ утративших функцию БКС после клинической имплантации показал, что уровни орто-тирозина, мета-тирозина и дитирозина заметно повышаются при СКД [258]. Кроме того, уровень 3-хлортирозина, окисленной аминокислоты, которая образуется под действием миелопероксидазы, коррелировал с кальцификацией БКС [259].

Обработанный ГА бычий перикард, модифицированный антиоксидантом 3-(4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилфенил) пропиламином, показал значительное снижение степени кальцификации

после подкожной имплантации крысам [258]. Также отмечается, что под воздействием H_2O_2 и $FeSO_4$ (имитации действия окислительного стресса) в обработанном ГА перикарде наблюдаются потеря плотности сшивки и морфологические изменения ВКМ [258]. В совокупности можно предположить, что окислительный стресс приводит к разрушению коллагена и повышает восприимчивость хсКПБ к действию коллагеназ, особенно через гидроксильно-радикальные и тирозилрадикалопосредованные пути, что приводит к кальцификации БКС.

Таким образом, как и в случае иммунного ответа, роль окислительного стресса в развитии кальциноза БКС может быть обусловлена именно повреждающим воздействием на ВКМ хсКПБ.

1.5.2.2 Роль тканевого метаболизма в иммуно-ассоциированном кальцинозе

Как указывалось выше, несколько исследований показали, что кальцификация БКС является процессом, подобным атеросклерозу [260]. Клинические исследования показывают, что после имплантации БКС уровни общего холестерина, липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), таких как аполипопротеин В (АпоВ), окисленных липопротеинов низкой плотности (ок-ЛПНП) в плазме пациентов с имплантированным БКС были заметно выше, чем у пациентов без БКС [64, 261, 262]. Таким образом, существует предположение, что соотношение АпоВ и алипопротеина AI [64] и соотношение ок-ЛПНП/ЛПВП [261] можно рассматривать как независимые предикторы развития СКД. В совокупности все эти результаты подчеркивают ключевую роль липид-опосредованного механизма кальцификации БКС.

Иммуногистохимические исследования подвергшихся кальцинозу БКС подтверждают присутствие ок-ЛПНП в фиброзном слое хсКПБ вместе с CD68-позитивными макрофагами [263]. Таким образом, механизм липид-опосредованной деградации и кальцификации БКС заключается в депонировании ЛПНП в тканях протеза, *in situ* образование ок-ЛПНП и последующей активации макрофагов [264].

Несмотря на отсутствие глубокого понимания, в некоторых исследованиях предпринимаются попытки объяснить липид-опосредованные воспалительные механизмы, участвующие в кальцинозе БКС. Предполагается, что ок-ЛПНП связываются и интернализуются макрофагами через CD36 рецептор [263], который обладает сродством к ок-ЛПНП [265]. Активированные насыщенные липидами макрофаги образуют псевдоподии, а также продуцируют цитокины и ММП-9, что в конечном итоге приводит к разрушению и кальцификации ВКМ хсКПБ.

Кроме того, существуют доказательства повышенной активности липопротеин-ассоциированной фосфолипазы А2 (Лп-ФЛА2) как в плазме, так и в поврежденных тканях БКС [266, 267]. Основным источником Лп-ФЛА2 могут быть тканевые макрофаги, а не

циркулирующие лейкоциты [268]. Также ок-ЛПНП могут усиливать экспрессию Лп-ФЛА2 в моноцитах/макрофагах через сигнальный путь PI3K и протеинкиназы, активируемые митогеном p38 [269]. Лп-ФЛА2 быстро расщепляет молекулы окисленного фосфатидилхолина, образующиеся при окислении ЛПНП, образуя растворимый провоспалительный фосфатидилхолин [270], в то время как последний является остеогенным стимулом [271]. Другой функцией ок-ЛПНП является индуцирование экспрессии пропротеиновой конвертазы субтилизин-кексинового типа 9 в макрофагах и стимуляция Toll-подобных рецепторов [261], что индуцирует остеогенный воспалительный путь через активацию ядерного фактора NF-κB [272, 273]. В совокупности ок-ЛПНП могут вносить существенный вклад в кальцификацию БКС.

В дополнение к нарушению липидного обмена, метаболический синдром, также известный как синдром X, инсулинорезистентность и т.д., представляет собой совокупность клинических состояний, характеризующихся центральным и абдоминальным ожирением, системной гипертензией и инсулинорезистентностью [274]. Предыдущие исследования показали, что рассеянный склероз является сильным независимым предиктором дегенерации БКС [67]. Пациенты с сахарным диабетом 2 типа более восприимчивы к асептическому кальцинозу БКС [66].

И все же в настоящее время метаболические механизмы, ответственные за кальциноз БКС, плохо определены, но окислительный стресс, вторичный по отношению к сахарному диабету, гипотетически все же вовлечен в этот процесс [275], и также как и два предыдущих механизма может опосредовать кальцификацию еще и через повреждение ВКМ хсКПБ.

1.5.2.3 Роль тромбоцитов в иммуно-ассоциированном кальцинозе

Тромбоз БКС является редким, но опасным для жизни пациента осложнением, которое вызывает обструкцию протеза клапана [276]. Однако субклинический тромбоз створок протезов все же встречается и по статистике выявляется у 12% пациентов после имплантации БКС [277]. Не так давно в научной литературе появились данные о том, что субклинический тромбоз створок протеза также связан с кальцификацией БКС [278]. Исследователи, наблюдавшие тесную пространственную сококализацию депозитов кальция с тромбами на поверхности створок предположили, что тромбоз может быть потенциальным спусковым механизмом кальцификации.

Фактор Виллебранда (ФВ) является основным медиатором тромбоза, взаимодействующим с тромбоцитами. У пациентов со стенозом аорты ФВ в условиях высокого напряжения сдвига стенки сосуда деактивируется и расщепляется тромбоспондином 1, а затем поддерживается в низкой концентрации в крови [279]. Как только уровень напряжения сдвига корректируется

после операции, концентрация ФВ мгновенно возрастает [280]. Такое резкое высвобождение большого количества ФВ способствует образованию тромбов, как это было показано в *in vivo* исследованиях. Физиологически взаимодействие ФВ плазмы крови с тромбоцитами индуцируется коллагеном субэндотелиального слоя сосудов. Фактически, в обработанных БКС монослой эндотелиальных клеток полностью отсутствует, поэтому коллаген I типа, который является основным компонентом ВКМ, непосредственно инициирует активацию ФВ. Развитие субклинического тромбоза створок БКС вызывает воспалительные реакции, фиброз клапана и кальцификацию. Более того, было показано резкое повышение уровня кальция в тромбоцитах при контакте с коллагеном I типа, возможно, за счет активации кальциевых каналов с помощью фосфолипазы C и инозитол трисфосфата [281, 282]. Приведенные выше данные могут помочь объяснить взаимосвязь между тромбообразованием и кальцификацией, хотя на сегодняшний день тромбоз не рассматривается в качестве основанного инициатора асептического кальциноза БКС, а скорее предполагается как сопутствующее осложнение.

1.5.3 Ассоциированный с фосфолипидами механизм развития кальциноза

По мнению Фадеевой И.С., автора исследования кальцификации трансплантатов сосудов и клапанов сердца, «ярко выраженная минерализация атеросклеротических бляшек на фоне холестеринэстеровых инфильтратов, чрезвычайная склонность к кальцификации некротизированной жировой ткани позволили исследователям предположить, что отложению неорганических солей кальция в БКС предшествует образование депозитов кальция с липидными компонентами клеток донора» [23].

Первые сообщения, которые побудили задуматься об этом, появились в период с 1990-94 гг. [283, 284, 285]. В них говорилось, что экстракция липидов из матрикса хСКПБ с помощью смеси хлороформ-метанола или этанола может значительно снизить риск развития кальциноза этих биоматериалов [194, 284].

Эти выводы заставили исследователей предположить, что в основе кальцификации БКС лежат механизмы, связанные с фосфолипидами клеточных мембран донора, остающихся в биоматериалах протеза после предимплантационной обработки и выдвинуть липидную теорию кальцификации БКС [286]. При этом проведенные ультраструктурные исследования неделипидизированных БКС показали, что клеточный дебрис обнаруживается в хСКПБ даже спустя несколько лет после имплантации в системный кровоток [287].

При таких обстоятельствах кислые фосфолипиды образуют так называемые комплексы кальций-фосфолипид-фосфат и зарождение ядер кальцификации, по-видимому, происходит именно на мембранах погибших клеток [288, 289]. Предполагается, что присутствие таких

комплексов в метастабильном растворе кальция и фосфатов провоцирует пассивное осаждение нерастворимого гидроксиапатита [23].

Предположение, что холестерин и фосфолипиды клеточных мембран играют важную роль в процессе кальцификации БКС, также подтверждается вовлеченностью данных веществ в процессы остеогенеза [290]. Известно, что процесс кальцификации начинается с включения липидов в области образования неокостной ткани, что инициирует формирование кристаллов кальция и минерализацию костного коллагена [291, 292]. В экспериментах *in vitro* было обнаружено, что каждое ядро минерализации во внеклеточном матриксе кости содержит липиды [293, 294]. Матриксные везикулы остеобластов (клеток, отвечающих за образование костной ткани), также содержат фосфолипиды, фосфопротеины и ферменты, такие как щелочная фосфатаза [23]. Эти вещества инициируют и регулируют процесс минерализации гидроксиапатита, который является основным компонентом костной ткани [23].

Исходя из анализа литературы, можно сделать вывод, что кальцификация БКС в рамках липидной гипотезы рассматривается как исключительно пассивный процесс, не контролируемый клетками реципиента [23]. Это также подтверждается данными гистологических исследований эксплантированных хсКПБ, где было показано, что кальцификации могут подвергаться и внутренние слои биоматериалов, в которые еще не проникли живые клетки [23].

Однако в дальнейшем исключительно пассивный механизм развития ассоциированной с липидами кальцификации БКС был подвергнут сомнению. Дальнейшие исследования показали, что липиды действительно могут инициировать развитие кальциноза, но уже как аттрактантный или трансформирующий фактор [23].

1.5.3 Ассоциированный с повреждением внеклеточного матрикса механизм развития кальциноза

Долгое время кальцификация ВКМ рассматривалась как вторичный процесс кальциноза хсКПБ, который происходит после того, как мертвые клетки донора или внутриклеточные везикулы инициируют образование ядер кальцификации непосредственно среди волокон коллагена и эластина [295].

Также отмечается, что ткани хсКПБ, несмотря на фиксацию ГА, не полностью устойчивы к ферментативной деградации и не являются метаболически инертными [2]. Внеклеточный матрикс хсКПБ при этом, в основном состоящий из фибриллярных коллагенов, эластина и ГАГ, является крупнейшим источником свободных ионов кальция при кальцификации БКС [2]. Ассоциированные с иммунными реакциями деградация и распад ВКМ обеспечивают не только

локальное повышение концентрации ионов кальция, но и также пространственное облегчение кальцификации за счет предоставления большого количества аффинных к кальцию участков поврежденных молекул, как это происходит, например, при разрушении ГАГ. В норме ГАГ опосредуют гидратацию и обводненность матрикса нативных клапанов, и также важны для стабильной сборки волокон ВКМ [2]. В частности, ГАГ специфически взаимодействуют с фибриллярным коллагеном I типа, соединяя и стабилизируя соседние фибриллы [296]. Тем не менее, ГАГ не могут быть сшиты фиксирующими агентами и постепенно разрушаются или удаляются во время предобработки, хранения и имплантации хсКПБ [297]. Дегградация ГАГ нарушает целостность коллагена, в результате чего обнажаются зоны зазора – трехмерные структуры (зазоры между молекулами тропоколлагена в коллагеновых фибриллах), которые в физиологических условиях костной ткани являются местами образования кристаллов гидроксиапатита [2].

Параллельно ГА не вступает в реакцию и с эластином. Показано, что протеолитическая дегградация эластина после имплантации фиксированных биоматериалов также способствует кальцификации этих волокон [237, 298, 299]. Многочисленные исследования показали, что стабилизация эластина в структуре матрикса хсКПБ помогает снизить кальцификацию БКС [297, 300, 301, 302].

Помимо ферментативной дегградации, волокна матрикса хсКПБ могут быть разорваны или повреждены вследствие механического напряжения. Такие разрывы/микроразрывы также будут выступать центрами инициации кальциноза [303].

Несмотря на все выше сказанное, для хсКПБ фактор повреждения ВКМ рассматривается не в качестве основной, а лишь в качестве сопутствующей причины инициации кальциноза БКС по вышеизложенным механизмам.

Однако, в последнее время в научной литературе все чаще встречается разрозненные данные о важности сохранения структуры ВКМ имплантируемых биоматериалов для их биосовместимости и долговечности. Так многие современные исследователи считают, что сохранение неповрежденной структуры коллагенового ВКМ в ходе предимплантационной обработки крайне желательно для снижения иммунного ответа реципиента на децеллюляризованные биоматериалы [25, 26, 27]. Проводимые исследования нефиксированных биоматериалов, антигенность которых была снижена или устранена с помощью децеллюляризации, показывают, что такие биоматериалы могут предоставлять клеткам реципиента нативное (при условии сохранения матрикса) микроокружение, которое не запускает иммунное распознавание, а наоборот способствует клеточной репопуляции, интеграции с тканями хозяина и, в конечном счете, ремоделированию матрикса имплантата

[20]. Учитывая, что иммунный ответ является одним из механизмов развития кальциноза, такие свойства неповрежденного ВКМ важно сохранить в ходе предимплантационной обработки.

Помимо этого, известно, что предимплантационная обработка и, прежде всего, техники децеллюляризации, могут также повреждать волокна эластина. В работе Фадеевой И.С. по исследованию механизмов кальциноза нефиксированных трансплантатов клапанов сердца показано, что повреждение структуры эластиновых волокон ВКМ сосудов эластического типа путем их многоступенчатой предимплантационной обработки провоцирует их кальцификацию независимо от клеток реципиента (пассивный эластокальциноз) [23].

1.5.3.1 Повреждение матрикса биоматериалов в процессе их децеллюляризации

Парадигма децеллюляризации изначально была задумана как метод снижения антигенности ксеногенных тканей при сохранении свойств нативного ВКМ [304]. Однако сохранение антигенов в явно бесклеточных биоматериалах [25, 305], снижение долговечности биопротезов [306] и интенсивная деградация структур ВКМ биоматериалов после имплантации [304, 307] поставили под сомнение жизнеспособность децеллюляризации как основного метода получения долговечных и биосовместимых биоматериалов.

Кроме того, было показано, что децеллюляризирующие агенты приводят к различной степени повреждения ВКМ и в наибольшей степени нежных базальных мембран [308]. Базальные мембраны являются важнейшим компонентом ВКМ сосудистой ткани, который поддерживает и облегчает рост и функционирование клеток. Исследования децеллюляризованных хсКПБ показывают, что отсутствие базальной мембраны, удаленной в ходе предимплантационной обработки, потенциально может негативно влиять на реэндартелизацию створок БКС [20]. И все же, несмотря на эти результаты, влияние сохранения структуры ВКМ хсКПБ, в частности наличия базальной мембраны, на процессы реэндартелизации и поддержания активного эндотелиального клеточного фенотипа остается в значительной степени неисследованным.

В свете вышесказанного, особое внимание привлекают к себе данные о том, что наиболее часто используемые реагенты для децеллюляризации, такие как додецилсульфат натрия, нарушают структуру и изменяют состав матрикса биоматериалов, и в особенности их базальной мембраны [104]. Действительно, различные исследования демонстрируют снижение жизнеспособности клеток при посеве на децеллюляризованный бычий перикард даже спустя 7 суток отмывки цитотоксичного агента [104]. При этом результаты исследований всецело не отражают основную причину снижения жизнеспособности клеток, которая может быть связана как с цитотоксичностью, так и с изменениями в микрорельефе поверхности, которые

препятствуют адгезии клеток. Более вероятно, что оба фактора одновременно снижают выживаемость клеток на децеллюляризованном материале. Кроме того, доказано, что дифференцировка и функциональная активность дифференцированных клеток, опосредованные ВКМ, также значительно снижаются или полностью отсутствуют в присутствии децеллюляризованных биоматериалов [104].

1.5.3.2 Повреждение матрикса биоматериалов в процессе их делипидизации

Делипидизация биоматериалов в спиртовых растворах также может оказывать повреждающее воздействие на их ВКМ. Как заявлялось ранее, непосредственно перед имплантацией хранящийся в фиксирующем растворе БКС тщательно промывается в физиологическом растворе. Так жидкая фаза имплантируемого хсКПБ в основном состоит из воды с очень низким содержанием остаточных компонентов обработки, включая некоторое количество свободного ГА. Результаты исследований степени гидратации различных кардиохирургических имплантатов демонстрируют, что значения содержания воды в хсКПБ находится в диапазоне от 83 до 84% [127]. Безусловно, необходимо учитывать, что степень гидратации хсКПБ будет зависеть от условий обработки и на разных этапах гидратация матрикса материалов будет варьироваться [309, 310].

Образование поперечных связей между молекулами коллагена при фиксации ГА приводит к увеличению общего содержания воды в биоматериалах. Однако, как это ни парадоксально, коллагеновые биоматериалы, фиксированные ГА, более гидрофобные, чем нефиксированные [311].

Несомненно, необходимость длительного вымывания детергентов из материалов с помощью спиртовых растворов может приводить к обезвоживанию коллагенового матрикса. Уже давно известно, что механические свойства коллагена сильно зависят от связанной с ним воды, а чрезмерная дегидратация фибрилл может приводить к их структурной деградации [312]. В то же время существуют исследования, показывающие, что дегидратация фибрилл коллагена I типа под действием спиртов происходит в два этапа [313]. На первом этапе дегидратации волокна коллагена не изменяют свою длину, и их усадка происходит за счет увеличения области зазора и уменьшения области перекрытия между молекулами и сокращения расстояния между витками спирали тропоколлагена [313]. Такие изменения структуры коллагеновых фибрилл являются обратимыми и при условии восстановления нормального уровня гидратации матрикса не ведут к серьезным повреждениям [313]. Только при дальнейшем обезвоживании коллагенового матрикса длина коллагеновых фибрилл уменьшается, что приводит к грубым

структурным изменениям архитектоники ВКМ вследствие повреждения и внешней усадки его фибриллярной основы [313].

Несмотря на активное использование высококонцентрированных спиртовых растворов в протоколах обработки хсКПБ, данных о степени дегидратации биоматериалов после этапа делипидизации автором не обнаружено. Также можно предположить, что более высокая гидрофобность ГА-фиксированных биоматериалов может препятствовать полноценному восстановлению гидратации их матрикса на последующих этапах обработки, использующих водные растворы.

Таким образом, сохранение структуры ВКМ имплантируемых биоматериалов в процессе их предимплантационной обработки крайне желательно, поскольку денатурация структурных белков матрикса оказывает отрицательное влияние на индуцируемый материалом клеточный ответ [306, 314]. В случае сердечно-сосудистых биоматериалов, сохранение неповрежденной структуры контактирующей с кровью поверхности материала также может сказываться на его тромборезистентных характеристиках. К сожалению, имеющиеся методы оценки степени повреждения матрикса (сканирующая электронная микроскопия, дифференциальная сканирующая калориметрия) не позволяют точно и единообразно идентифицировать степень денатурации молекул матрикса биоматериалов и данные о степени повреждающего воздействия тех или иных методов обработки на их ВКМ, встречающиеся в литературе, рознятся и зачастую противоречат друг другу. Из-за отсутствия эффективных и стандартизированных методов оценки структурных повреждений ВКМ деструктивные эффекты предимплантационной обработки и влияние связанных структурных повреждений на биологические свойства материалов часто обсуждаются [28, 29, 308]. Данные о влиянии повреждения структуры хсКПБ на биосовместимость и кальцинозрезистентность БКС и вовсе довольно скудны или полностью отсутствуют.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Экспериментальные материалы

В работе использовались материалы, полученные из бычьего перикарда половозрелых быков. Перикард был получен у потенциально здоровых животных, что подтверждалось соответствующими ветеринарными свидетельствами. Ткань извлекали в течении 30 минут после забоя животных. Весь полученный материал помещали в физиологический раствор с добавлением гентамицина (400 мкг/мл) и флуконазола (50 мкг/мл), а затем транспортировали в лабораторию в термоконтейнере при 2-8°C.

2.2 Анализ гистоархитектоники нативного перикарда

Для отбора наиболее подходящих участков перикарда для изготовления хсКПБ проводили гистологический анализ фрагментов ткани, полученных из различных областей с оценкой топологии распределения основных компонентов ВКМ, влияющих на склонность материалов к кальцинозу (Рисунок 4) – эластиновых волокон и ГАГ.

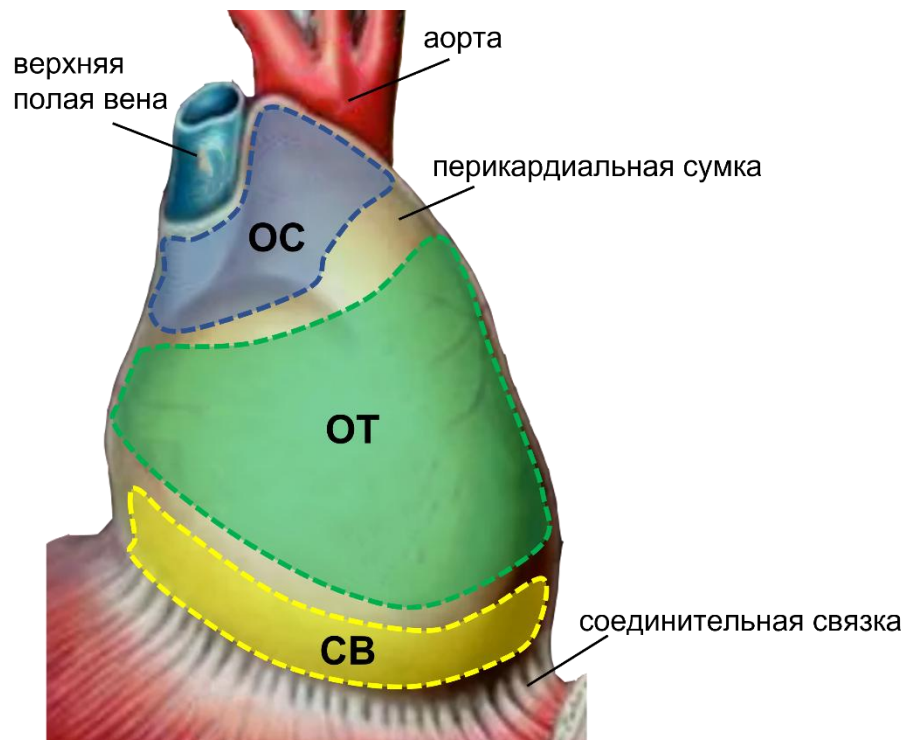


Рисунок 4 – Зоны забора исследуемых фрагментов нативного перикарда: ОС – зона у основания сосудов; ОТ – основная часть ткани, СВ – зона у основания связок

Сразу после доставки нативного перикарда в лабораторию, целевые фрагменты ткани отбирались и помещались в фиксирующий раствор 4% нейтрального формалина по Лилли и хранились при 4°C до проведения гистологического анализа (см. п.2.15 текущего раздела).

2.3 Количественное определение концентрации ДНК в ткани

Для количественного определения содержания ДНК в различных областях ткани нативного перикарда из каждой группы экспериментальных образцов (группы ОТ, ОС, СВ) отбирали фрагменты ткани (n=3) весом 20 мг и помещали в пробирки типа эппендорф (2 мл). Далее ткань в каждой пробирке гомогенизировали пестиком (SSI, США).

Выделение ДНК из ткани осуществляли с помощью набора для выделения геномной ДНК из тканей животных «ДНК-ЭКСТРАН-2» (Синтол, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Измерение ДНК в полученных растворах осуществляли на спектрофотометре NanoVue Plus (Biochrom, США) при 260 нм.

2.4 Предимплантационная обработка и получение химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов

На основе проведенного анализа литературы (см. п.1.3 главы 1 данной диссертации) были отобраны агенты и условия обработки, наиболее часто используемые современными производителями биопротезов клапанов сердца. Опираясь на те алгоритмы обработок, которые используются для изготовления БКС, дошедших до клинического использования, были выделены 3 основных этапа, которые обязательно включаются в протоколы обработки хсКПБ: фиксация, децеллюляризация и отмывка в спиртах (делипидизация).

Учитывая, что работа в первую очередь нацелена на выявление роли структурных изменений ВКМ в инициации процессов кальциноза хсКПБ, наиболее активно используемых в клинической практике, из протоколов также были исключены экспериментальные или малоиспользуемые кислотные и температурные воздействия, приводящие к прямой денатурации коллагенового матрикса, а также гипер- и гипотонические растворы, вызывающие неспецифическое набухание коллагенового матрикса.

Протоколы получения хсКПБ, оказывающие минимальное повреждающее воздействие на ВКМ, составлялись на основе матрикс-сберегающего метода децеллюляризации перикардальных материалов, который был разработан в лаборатории тканевой инженерии ИТЭБ РАН (Патент РФ №2678966) [315]. Данный метод децеллюляризации комбинировался исключительно с низкими концентрациями ГА.

Таблица 5 – Экспериментальные протоколы обработки химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов, составленные на основе анализа патентной литературы

№	Химическая стабилизация	Децеллюляризация	Делипидизация	Хранение
1	0,625% ГА, 4% ФА	1% ДСН	0,9% NaCl	0,1 %ГА, 20% ЭтС
2	0,5% ГА	1% ДСН	70% ИзС, 90% ЭтС	0,1% ГА, 20% ЭтС
3	0,5% ГА	1% ДСН	35% ИзС, 30% ЭтС	0,25% Дн, 20% ЭтС
4	0,2% ГА	0,02% ЭДТА, 0,25% ТрХ100, 0,25% ДХНм	35% ИзС, 30% ЭтС	0,1% ГА, 20% ЭтС
5	0,2% ГА	0,02% ЭДТА, 0,25% ТрХ100, 0,25% ДХНм	70% ИзС, 30% ЭтС	0,25% Дн, 20% ЭтС
6	0,2% ГА, t 36°C	0,02% ЭДТА, 0,25% ТрХ100, 0,25% ДХНм	70% ИзС, 30% ЭтС	0,1% ГА, 20% ЭтС
7	0,2% ГА, t 36°C	0,02% ЭДТА, 0,25% ТрХ100, 0,25% ДХНм	35% ИзС, 30% ЭтС	0,25% Дн, 20% ЭтС
8	0,2% ГА, t 36°C	0,02% ЭДТА, 0,25% ТрХ100, 0,25% ДХНм	30% ЭтС, TWEEN80	4% ПО
9	0,2% пГА, t 36°C	0,02% ЭДТА, 0,25% ТрХ100, 0,25% ДХНм	30% ЭтС, TWEEN80	4% ПО
10	0,2% ГА	0,02% ЭДТА, 0,25% ТрХ100, 0,25% ДХНм	30% ЭтС, TWEEN80	4% ПО
11	0,2% ГА	0,02% ЭДТА, 0,25% ТрХ100, 0,25% ДХНм	30% ЭтС, TWEEN80	0,25% Дн, 20% ЭтС
12	0,2% ГА	0,02% ЭДТА, 0,25% ТрХ100, 0,25% ДХНм	30% ЭтС, TWEEN80	0,1% ГА, 20% ЭтС

ГА – глутаровый альдегид, пГА – полимеризованный глутаровый альдегид, ФА – формальдегид, ДСН – додецилсульфат натрия, ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота, ТрХ100 – тритон Х100, ДХНм – дезоксихолата натрия моногидрат, ИзС – изопропиловый спирт, ЭтС – этиловый спирт, Дн – диоксидин, ПО – пропиленоксид.

Таким образом, в работе были воспроизведены 12 подходов предимплантационной обработки, представленные в таблице 5.

В качестве контрольных материалов использовались створки коммерческих биопротезов:

– перикардиальный клапан «БиоЛАБ-КС» (ФГБУ «НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева», Москва, Россия)

- аортальный перикардиальный клапан «PERIMOUNT» (Edwards Lifesciences, Калифорния, США)
- митральный перикардиальный клапан «PERIMOUNT Plus» (Edwards Lifesciences, Калифорния, США)
- биологический протез аортального клапана ТиАра (НеоКор, Кемерово, Россия)

Из выше представленных протоколов были отобраны те, которые в наибольшей степени отражают определенную степень воздействия на ВКМ хсКПБ. Повреждающее воздействие ДСН на ВКМ биоматериалов является известным фактом [316, 317], при этом результаты сравнительных исследований показывают, что ДХН является менее агрессивным детергентом, чем ДСН и в меньшей степени повреждает коллагеновые фибриллы [318]. Также спирты в высоких концентрациях могут вызывать критическую дегидратацию матрикса и приводить к потере физических свойств коллагеновых волокон и, как правило, необратимым изменениям их структуры [319, 320]. Кроме того показано, что использование ГА не только повышает цитотоксичность биоматериалов на основе ВКМ, но приводит к агрегации и конформационным изменениям молекул коллагена, а также может способствовать изменению гидратации ткани [321, 322]. Повреждающее воздействие растворов хранения на структуру ВКМ в литературе не освещается, поэтому вклад данного этапа обработки в структурные изменения хсКПБ оценивался в ходе исследования.

Таблица 6 – Отобранные для корреляционного анализа протоколы обработки химически стабилизированных ксеноперикардиальных биоматериалов

Группа	Химическая стабилизация	Децеллюляризация	Отмывка	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% Тритон X100, 0,25% ДХНм	35% ИзС	0,1% ГА, 20% ЭтС
Б2	0,2% ГА	0,02% ЭДТА, 0,25% Тритон X100, 0,25% ДХНм	35% ИзС	0,25% Дн, 20% ЭтС
В1	0,2% ГА	0,02% ЭДТА, 0,25% Тритон X100, 0,25% ДХНм	30% ЭтС	0,25% Дн, 20% ЭтС
В2	0,2% ГА	0,02% ЭДТА, 0,25% Тритон X100, 0,25% ДХНм	30% ЭтС	0,1% ГА, 20% ЭтС

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

Таким образом, исследуемые материалы были разделены на следующие категории (Таблица 6):

- агрессивные методы обработки, воспроизводящие известные клинические протоколы получения хсКПБ (группы А1 и А2);
- методы обработки, предположительно оказывающие умеренное воздействие на матрикс хсКПБ (группы В1 и В2);
- авторские матрикс-сберегающие методы обработки хсКПБ (патент РФ №2678966), (группы В1 и В2).

В качестве материалов сравнения использовались нативный бычий перикард (группа Н) и образцы (створки) коммерческого биопротеза аортального перикардального клапана «PERIMOUNT Plus» (Edwards Lifesciences, Калифорния, США), (группа Edw), который обрабатывался с использованием многоступенчатой технологии «ТermoFix», показавшей отличные результаты кальцинозрезистентности БКС в клинике.

2.5 Оценка степени повреждения *p.serosum* экспериментальных материалов после обработки

Степень повреждения поверхности *p.serosum* обработанных хсКПБ в лиофилизированном состоянии оценивалась с помощью сканирующего электронного микроскопа VEGA3 (Tescan, Чехия).

На подготовительном этапе фрагменты ткани экспериментальных и контрольных материалов подвергались быстрой глубокой заморозке для предотвращения образования кристаллов льда, разрушающих компоненты матрикса. Щадящую матрикс-сберегающую лиофилизацию проводили на специальной лиофильной сушилке, обеспечивающей максимально мягкую сублимацию ткани.

Пробоподготовку осуществляли по следующей схеме:

1) Образцы материалов перед лиофилизацией разрезали на квадратные пластинки площадью 1 см² и аккуратно закрепляли хирургическим швом на расправочные квадратные рамки по углам с помощью атравматичной иглы с хирургической нитью Лавсан 4/0 (М 1,5);

2) Расправленные пластинки материалов быстро замораживали в лабораторном кельвинаторе в открытых пробирках объемом 50 мл при –80°С (до условной точки эвтектики – 57°С);

3) Для обеспечения наименьших повреждений и изменений архитектоники поверхности образцов в процессе пробоподготовки, замороженные образцы, закрепляли на специальные

держатели карусельного типа и помещали в колбы лиофильной сушки в подвешенном состоянии избегая контакта образцов с поверхностью колбы;

4) Далее образцы лиофилизировали в течение 24 ч с помощью лиофильной сушки (FreeZone 2.5 Liter Benchtop Freeze Dry System, Labconco, Канада);

5) Непосредственно перед микроскопией высушенные образцы приклеивали на предметные столики специальным скотчем, столики закрепляли в держателе и напыляли пластинки частицами золота в вакуумном распылителе Q150R ES (Quorum Technologies, Англия), после чего вентилировали для избавления от излишка золотых частиц.

После пробоподготовки образцы быстро переносили в камеру электронного микроскопа VEGA3 (Tescan, Чехия) и делали снимки при давлении $7,3 \cdot 10^{-2}$ Па в колонке и $1,5 \cdot 10^{-1}$ Па в камере.

2.6 Оценка структурных изменений внеклеточного матрикса экспериментальных материалов после обработки

Для оценки структурных изменений ВКМ материалов после обработки, часть обработанных материалов через 30 сут. содержания в растворах хранения фиксировали в соответствии с п.2.12.1 текущего раздела.

Поскольку известно, что спирты, которые используются при заливке образцов в парафин для микротомии, могут негативно влиять на ВКМ, чтобы избежать обезвоживания образцов и получить наиболее точное представление о состоянии ВКМ хсКПБ после обработки, гистологические препараты материалов были изготовлены методом криотомии (см. п.2.15.2 текущего раздела).

Структурные изменения коллагенового матрикса хсКПБ после обработки оценивали на основе гистологического анализа окрашенных трихромом по Лилли препаратов (см. п.2.15.3 текущего раздела). Окраска альтиановым синим-ШИК (см. п.2.15.3 текущего раздела) использовалась для качественной оценки содержания ГАГ в материалах после обработки. Взаимодействие реактива Шиффа с альдегидными группами в этой окраске также использовалось для качественной оценки степени фиксации материалов глутаровым альдегидом.

Микрофотографии окрашенных препаратов получали с помощью микроскопической флуоресцентной станции Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Токио, Япония).

2.7 Использование постоянной клеточной линии для проведения *in vitro* исследований

Поскольку фибробласты направляют и регулируют все процессы, происходящие при приживлении имплантированных биоматериалов, для проведения *in vitro* исследований была выбрана культура эмбриональных фибробластов мыши линии NIH/3T3. Кроме того, фибробласты играют решающую роль в процессах реэндотелизации хсКПБ, поскольку клетки эндотелия могут садиться только на компоненты матрикса, синтезированные адгезировавшими на поверхность створок фибробластами [323].

Клетки эмбриональных фибробластов мыши линии NIH/3T3 были получены из Всероссийской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт–Петербург). Клетки выращивали в среде DMEM (Биолот, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 40 мкг/мл гентамицина, при 37°C и 5% углекислого газа в условиях CO₂–инкубатора (Binder, Германия).

2.8 Пробоподготовка экспериментальных материалов для *in vitro* исследований

Для получения результатов, наиболее достоверно отражающих клеточную реакцию на материал в аналогии с условиями *in vivo* посев клеток на серозную поверхность хсКПБ осуществлялся в трех разных условиях:

1) Посев клеток на образцы материалов, отмытые от консервирующего раствора и излишков ГА в соответствии с рекомендациями производителя. Для этого образцы хсКПБ трехкратно отмывали в стерильном изотоническом растворе в течение 20 минут. Отмывка всех групп образцов осуществлялась при 100-кратном соотношении объема отмывочного раствора к объему ткани;

2) Посев клеток на образцы хсКПБ, дополнительно отмытых от консервирующего раствора и излишков ГА в растворе питательной среды DMEM (Биолот, Россия) с добавлением 20% сыворотки крови крупного рогатого скота (Sigma, США). Отмывка осуществлялась в течение 4 суток 8-ми кратной сменой среды при 30–кратном соотношении объема питательной среды к объему ткани. Постулируется, что данная инкубация в питательной среде должна не только эффективно вымывать растворимые химические вещества из матрикса материала, но и прогнозировать реакцию клеток на материал, имплантированный в системный кровоток и насыщенный аминокислотами плазмы крови (кэппинг свободных альдегидных групп).

3) Получение водных вытяжек (экстрактов) из хсКПБ, отражающих влияние экстрагируемых из материала примесей (остаточных агентов предимплантационной обработки) на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток (см. п.2.9 текущего раздела).

2.9 Получение экстрактов из экспериментальных материалов

Экстракцию проводили в питательной среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки при 37°C, в течении 72 часов, при постоянном покачивании 50 об/мин в условиях шейкера-инкубатора (ES-20/80, Biosan, Латвия). Далее полученные экстракты фильтровали через стерильную мембрану с диаметром пор 0,22 мкм и использовали в экспериментах.

2.10 Анализ цитотоксического действия материалов

При исследовании цитотоксичности биоматериалов *in vitro* обычно руководствуются ГОСТ ИСО 10993-5, в соответствии с которым клетки культивируют в питательной среде на культуральном пластике до субконфлюэнтности и затем помещают исследуемый образец поверх клеточного слоя. В данном анализе для достижения условий исследования, наиболее приближенных к условиям *in vivo*, клетки высевались непосредственно на поверхность хсКПБ.

Через 24 и 96 часов после посева клеток проводили определение количества живых и погибших клеток с помощью окрашивания флуоресцентными красителями кальцеином АМ (Sigma-Aldrich, США) и йодидом пропидия (Sigma-Aldrich, США). Для этого клетки открепляли от поверхности образцов с помощью коктейля Accutase® (Stemcell Technologies, США). Затем клетки окрашивали в среде L-15, содержащей 1% эмбриональной телячьей сыворотки, с добавлением 1 мкг/мл кальцеина АМ и 2 мкг/мл йодида пропидия, в течение 25 минут при 37°C. Анализ живых и погибших клеток осуществляли с использованием проточного цитометра Accuri C6 (BD Bioscience, США).

2.11 Анализ цитостатического действия материалов

Число митотических клеток определяли с помощью флуоресцентной микроскопии, используя прижизненное окрашивание флуоресцентным ядерным красителем Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, США). Митотические клетки выявляли по распределению хроматина, характерному для профазы, метафазы, анафазы и телофазы с помощью флуоресцентного микроскопа DM 6000 (Leica, Германия). Для анализа подсчитывали не менее 500 клеток.

Митотический индекс (MI) вычисляли по формуле $MI = (P+M+A+T)/N * 100\%$, где (P+M+A+T) - сумма клеток, находящихся на стадии профазы, метафазы, анафазы и телофазы, а N - общее число проанализированных клеток.

2.12 Анализ динамики численности клеток в присутствии материалов

Динамику численности клеток (кривые роста популяций), культивируемых на образцах, оценивали по прямому подсчету числа клеток открепленных с поверхности образцов. Клетки открепляли от поверхности образцов с помощью коктейля Accutase® (Stemcell Technologies, США), ресуспендировали в питательной среде L-15 (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 1% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США). Далее клетки окрашивали 0,4% раствором трипанового синего в течение 1 минуты. Изучение динамики численности клеточных популяций проводили путем регистрации количества клеток, выросших на поверхности экспериментальных образцов биоматериалов каждые 24 часа в течение 7 суток культивирования с помощью автоматического счетчика клеток Countess (Invitrogen, США). Также исследование численности клеточных популяций проводили в условиях инкубации клеток с экстрактами из экспериментальных биоматериалов.

2.13 Экспериментальные животные

В эксперименте использовали 60 самцов крыс Wistar 180-200 г (возраст 2 месяца). Животные содержались в стандартных условиях (температура 21-23°C, влажность 30–70%, 12-ти часовой период освещения, корм и вода – *ad libitum*). Эксперимент проводили в соответствии с Правилами проведения исследований на экспериментальных животных (Постановление Минздрава России от 12 августа 1997 г. № 755), а также в соответствии с ГОСТ ИСО 10993-11-2021. Протокол одобрен Комиссией по биологической безопасности и этике Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (протокол №27/2022).

2.14 Модель подкожной имплантации

Использовалась общепринятая модель гетеротопической (подкожной) имплантации биоматериалов (ГОСТ ИСО 10993-6-2021). Фрагменты хсКПБ с линейными размерами 8×8 мм отмывали в стерильном изотоническом растворе в течение 20 минут и имплантировали крысам подкожно по следующей методике:

1) перед проведением операции животных наркотизировали внутримышечным введением золетила (6.0 мг/1 кг веса) и ксилазина (12.0 мг/1 кг веса) в наружные мышцы бедра (каждый препарат в разную мышцу);

2) затем, в условиях операционного бокса, шерсть вдоль позвоночника от шеи до надхвостовой области спины выщипывали и обрабатывали кожу антисептическим раствором (70% этиловый спирт);

3) пинцетом (щипковым движением) кожу приподнимали над мышцами спины и рассекали продольным разрезом (длиной 2 см) в трех местах вдоль позвоночника с помощью прямых тупоконечных ножниц;

4) далее, в кожный разрез вводили прямые тупоконечные ножницы и параллельно коже тупым способом раздвигали подкожное пространство, формируя по 2 подкожных кармана на каждый разрез (билатерально);

5) фрагменты экспериментальных образцов, помещали в каждый карман (по 1 шт. на карман), не более 6 образцов в одном животном (Рисунок 5);

6) введенные под кожу фрагменты расправляли пальпированием;

7) после имплантации фрагментов, непосредственно в подкожное пространство вводили смесь антибиотиков (гентамицин/ципрофлоксацин) из расчета по 4 мг/кг массы тела крысы;

8) кожный разрез ушивался лавсаном (4/0 USP) простыми хирургическими швами;

9) операционный шов обрабатывался спиртовым раствором бриллиантового зеленого.

Стандартный протокол оценки безопасности медицинских изделий включает 4-8-недельные сроки (ГОСТ ИСО 10993-6-2023, п.5.3.6) подкожной имплантации крысам, которые также наиболее часто встречаются в литературе в исследованиях кальцификации фиксированных биоматериалов [324, 325, 326, 327, 328, 329]. Однако, учитывая, что СКД характеризуется долгосрочными и медленными изменениями, в данном исследовании было принято решение использовать длительные сроки имплантации в 8 и 24 недели.

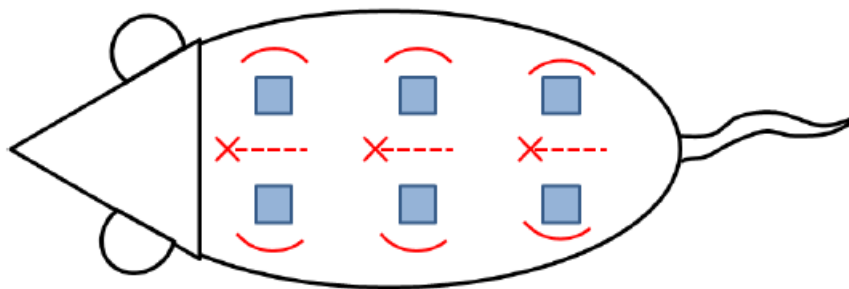


Рисунок 5 – Схема гетеротопической (подкожной) имплантации образцов химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов: Синий квадрат – образец экспериментального материала, красный штрих – линия разреза, красная линия – граница подкожного кармана

В послеоперационном периоде животные содержались в стандартных условиях. Выведение животных из эксперимента осуществлялось в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 10993-2-2009 с помощью подхода гуманной эвтаназии в CO₂-установке (OpenScience, Россия). Эксплантацию образцов проводили с захватом пограничных (контактных) здоровых тканей реципиента.

2.15 Гистологический анализ

2.15.1 Фиксация ткани

Образцы эксплантированных материалов фиксировали в растворе нейтрального формалина по Лилли при 4°C, не менее 24 часов, и затем отмывали от излишков фосфатов фиксатора инкубацией в проточной воде в течение часа.

2.15.2 Получение криосрезов

Криосекционирование исследуемых образцов проводили по следующей методике:

1) После отмывки излишка формалина фиксированные образцы помещали в формы для заморозки и заливали полным покрытием заливочной средой для криостатов O.C.T. Compound Tissue Tek (Sakura, Япония).

2) Заливочную форму с фрагментом образца помещали в камеру охлажденного криотома MEV (SLEE medical GmbH, Германия) и на столике быстрой заморозки (Cryobar Boost, на основе элемента Пельтье) с помощью теплоотвода (Thermo Scientific™ Heat Extractor) проводили мгновенную заморозку залитых в заливочную среду образцов (при –60°C);

3) С помощью тонкого слоя заливочной среды O.C.T. замороженный блок с образцом крепили на предметном столике, помещали в зажимный патрон подвижной головки криостата и делали криосрезы толщиной 9 мкм;

4) Полученные криосрезы переносили на предметные стекла, покрытые желатиновым адгезивом, с помощью кисточки;

5) Предметные стекла с наклеенными криосрезами расправляли на нагревательной плате OTS 40 (Medite, Германия) при температуре 37°C в течение не более чем 1 минуты.

Секционирование срезов проводилось при температуре рабочей камеры от –15°C до –21°C (в зависимости от внешних условий).

2.15.3 Окрашивание криосрезов

Для гистологических исследований криосрезы окрашивали с использованием стандартных обзорных и дифференциальных гистохимических окрасок.

1) Окраска гематоксилином Майера и эозином Y (H&E) [330]. При этом способе H&E позволяет оценить клеточную плотность нативной ткани, степень децеллюляризации хсКПБ после обработки, и отражает процессы клеточной инвазии и биосовместимости хсКПБ после имплантации. Ядра клеток окрашиваются в тёмно-фиолетовый цвет, компоненты матрикса – в розовый.

2) Трихромная дифференциальная окраска по методу Лилли [330]. Этот метод используется для идентификации коллагеновых фибрилл и определения состояния коллагенового матрикса в различных типах тканей. Данная окраска также отражает клеточно-резорбтивные процессы и фибротические изменения матрикса хсКПБ после имплантации, а также возможное ремоделирование матрикса образцов. Коллаген окрашивается в сине-зеленый цвет, неколлагеновые компоненты – в темно-красный, ядра клеток – в коричневый.

3) Окраска альциановым синим – ШИК [330]. Это комбинированный метод, в котором используются свойства как ШИК реакции, так и методики окраски альциановым синим. Данный метод позволяет продемонстрировать полный набор тканевых гликозаминогликанов. Принцип метода заключается в предварительном окрашивании всех кислых муцинов альциановым синим с последующим окрашиванием нейтральных муцинов, которые являются положительными исключительно для ШИК реакции. Кислые ГАГ окрашиваются в голубой цвет, нейтральные ГАГ – в розовый, комбинация кислых и нейтральных ГАГ – в фиолетовый/пурпурный, ядра клеток – в темно-синий, цитоплазма тучных клеток (также содержит кислые ГАГ) – в ярко-голубой, эритроциты – в желтый.

4) Дифференциальная окраска по методу Вейерхгофа-Ван-Гизона [330]. Этот метод используется для идентификации эластиновых фибрилл в различных типах тканей. Эластин обладающий высокой аффинностью по отношению к хлориду железа III с гематоксилином, задерживает большее количество красящего раствора Вейерхгофа. Окружающие ткани выделяются с помощью «контрокраски» по методу Ван-Гизона. Эластиновые компоненты окрашиваются в темно-синий/черный цвет, коллаген – в розовый, неколлагеновые компоненты – в желтый.

5) Окраска суданом III [330]. Данная окраска является наиболее распространенным методом выявления липидов в тканях. Липидные вещества окрашиваются в интенсивно оранжевый цвет, клеточные ядра – в синий.

6) Окраска ализариновым красным S по методу МакГи-Рассела [330]. Данная окраска позволяет выявить соли кальция в тканях и оценить степень кальцификации материалов. Кроме того, метахроматический краситель толуидиновый синий О, используемый в данной методике для окраски цитоплазмы и ядер клеток, позволяет успешно выявлять дезорганизацию соединительной ткани (внецитоплазматическая ортохромная окраска базофильных структур) и гранулы тучных клеток (фиолетовая метахромазия); соли кальция окрашиваются в темно-красный/красно-малиновый цвет, ядра клеток – в темно-синий, цитоплазма клеток, базофильные структуры дезорганизованного матрикса – в голубой.

2.16 Гистоморфометрический анализ

Микроскопическая станция Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Токио, Япония) и метод спличинга использовались для получения гистотопограмм высокого разрешения окрашенных гистологических образцов, которые затем обрабатывались с помощью ПО NIS Elements AR4.13.05 (сборка 933, Nikon, Токио, Япония).

Гистоморфометрический анализ полученных гистологических изображений проводился с использованием программного обеспечения ImageJ (версия 1.54h, NIH, Bethesda, MD, США, <https://github.com/imagej/ImageJ>, по состоянию на 16 марта 2023 г.). В каждой группе анализировали не менее 4 гистотопограмм, представляющих собой спличинг в среднем 35 ± 15 стандартных изображений $\times 4$ ув. Для анализа использовали не менее 16 полей на группу ($n=16$). Биоимиджинг микрофотографий проводили следующим образом:

1) Соотношение коллагенового, эластинового и липидного компонентов ткани нативного перикарда оценивали в полях зрения размером 1500×1500 мкм на гистологических препаратах поперечных срезов образцов, окрашенных по методу Лилли (коллаген окрашивается зеленым), по методу Вейерхгофа-Ван-Гизона (эластин окрашивается черным) и суданом III (липиды окрашиваются оранжевым) соответственно. Площадь зеленой, черной и оранжевой окраски подсчитывалась и выражалась в процентах от общей площади оцениваемого фрагмента среза;

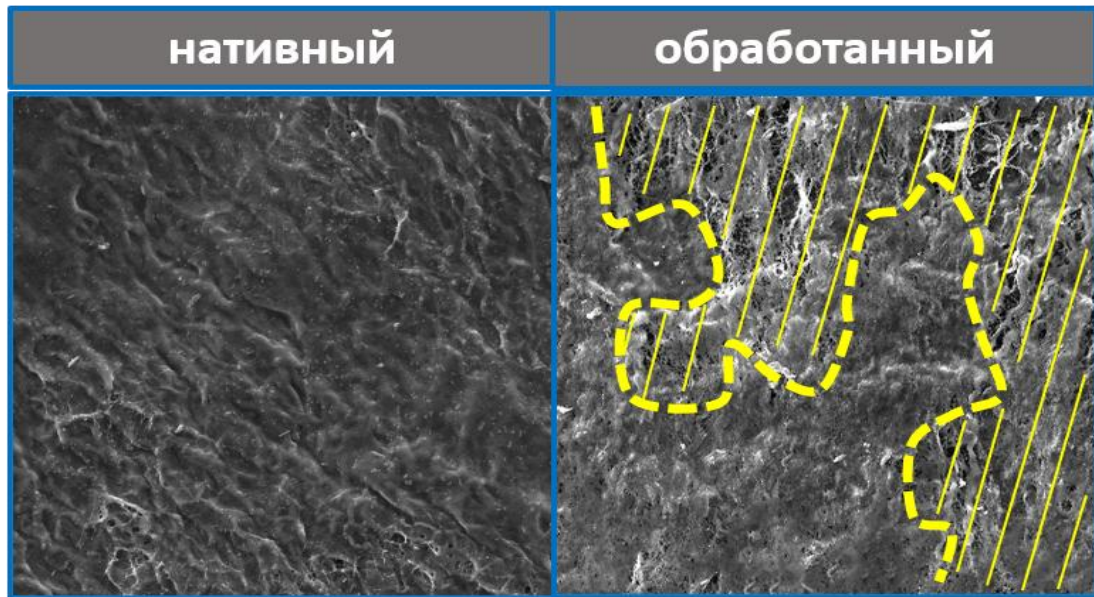


Рисунок 6 – Пример подсчета степени повреждения микрофотографий поверхности *p.serosum* химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов: Желтый штрих – область повреждений с наложенной маской. Сканирующая электронная микроскопия

2) Степень повреждения *p.serosum* хсКПБ после обработки оценивали по изображениям СЭМ в поле зрения 200×200 мкм. В качестве параметров повреждения оценивались такие признаки, как «оголение» подлежащего под базальной мембраной *p.serosum* коллагенового слоя и наличие участков разволокнения и продольных микроразрывов коллагеновых волокон. Площадь поврежденных участков поверхности измеряли с помощью наложения масок на изображение (Рисунок 6) и выражали в процентах от общей площади наблюдаемого поля зрения;

3) Степень повреждения толщи матрикса хсКПБ после обработки оценивали на окрашенных трихромом по Лилли гистологических препаратах поперечных срезов образцов в поле зрения 200×200 мкм. В качестве параметров повреждения оценивались такие признаки, как разволокнение, слияние, растрескивание и дезорганизация коллагеновых волокон (Рисунок 7). Степень повреждения ВКМ хсКПБ выражалась в процентах поврежденных волокон (микроразрывов, слияний, разволокнений) относительно общего количества наблюдаемых волокон в поле зрения;

4) Интенсивность воспалительной реакции на имплантированные хсКПБ оценивали на окрашенных Н&Е гистологических препаратах поперечных срезов образцов в поле зрения 200×200 мкм по количеству мигрировавших лейкоцитоподобных и фибробластоподобных клеток. При этом количество мигрировавших лейкоцито- и фибробластоподобных клеток подсчитывалось и выражалось в % от общего числа мигрировавших клеток;

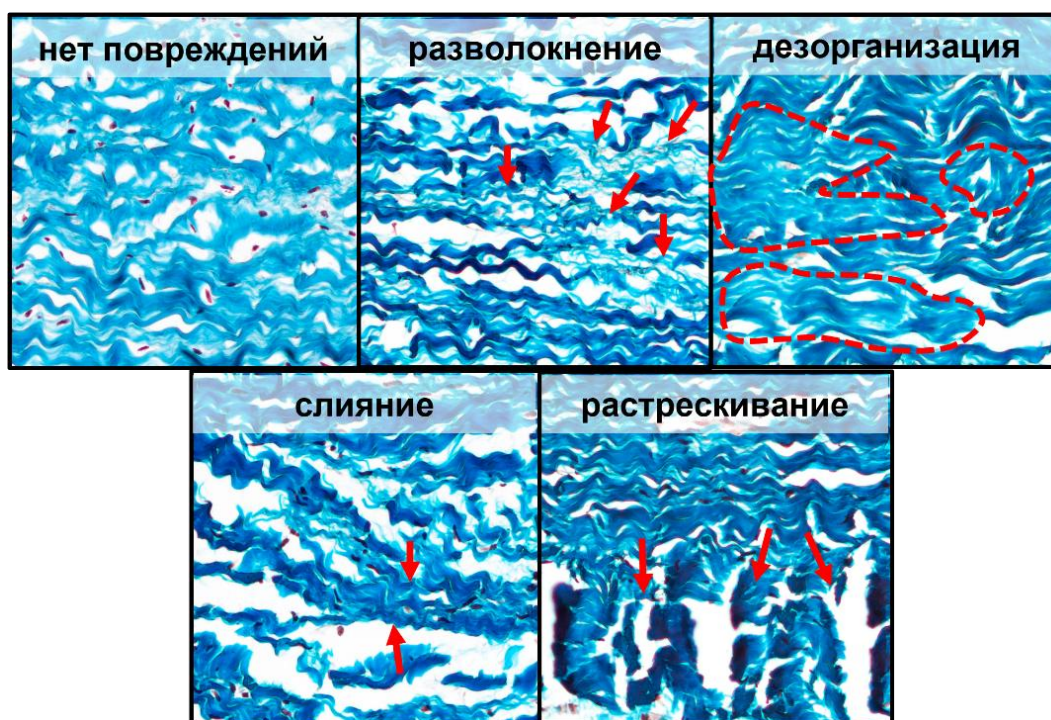


Рисунок 7 – Типы повреждений, оцениваемые на гистологических препаратах поперечных срезов химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов

5) Интенсивность резорбции ВКМ имплантированных хсКПБ оценивали в поле зрения 1000×1000 мкм по появлению красной окраски (неколлагеновые компоненты) на окрашенных трихромом по Лилли гистологических препаратах поперечных срезов образцов. Площадь красной окраски подсчитывалась и выражалась в процентах от общей площади оцениваемого фрагмента среза;

6) Интенсивность кальцификации ВКМ имплантированных хсКПБ оценивали в поле зрения 1000×1000 мкм по появлению красной/малиновой окраски (соли кальция) на окрашенных ализариновым красным S гистологических препаратах поперечных срезов образцов. Площадь красной/малиновой окраски подсчитывалась и выражалась в процентах от общей площади оцениваемого фрагмента среза.

2.17 Моделирование условий нормокальциемии *in vitro*

Для определения степени пассивной физико-химической минерализации хсКПБ после обработки, образцы инкубировали в модельных средах, имитирующих условия сыворотки крови и тканевой жидкости с нормальным содержанием кальция и фосфатов. В качестве модельной среды инкубации был выбран 2,5 мМ раствор CaCl_2 в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) без ионов магния (Panreac Química, Испания) (по рекомендациям Н. Кизендаля и соавт. [331]). Опираясь на работы Розановой И.Б. [332], Прайса П.А. и Торояна Д. [333, 334, 335, 336],

указывающие на важную роль альбумина и жирных кислот в развитии пассивного асептического кальциноза, в качестве двух дополнительных модельных сред использовали: раствор 2,5 мМ CaCl_2 в ФСБ, содержащий 5% бычьего сывороточного альбумина V фракции (0,02 мг/г жирных кислот) (АлбV) (Amresco, США); раствор 2,5 мМ CaCl_2 в ФСБ, содержащий 5% делипидизированного (lipid-free) альбумина (АлбДЛ) (Amresco, США).

Фрагменты хсКПБ (6×4 мм) в условиях ламинарного бокса помещали в инкубационный раствор (v/v 1:30). Инкубация проводилась в условиях шейкера-инкубатора ES-20/60 (BioSan, Латвия) в течение 6 недель при 30 об/мин и температуре 37°C. Замена среды на свежую осуществлялась также в стерильных условиях каждые 48 часов.

Количественное измерение минерализованного кальция в образцах проводили методом адсорбционной спектроскопии (см. п.2.14 текущего раздела). Морфологию и локализацию депозитов кальция в матриксе образцов определяли гистологическим методом с использованием окраски ализариновым красным S (метод МакГи-Рассела) (см. п.2.12.3 текущего раздела).

2.18 Количественное измерение минерализованного кальция

Содержание кальция во всех образцах до и после инкубации в модельных средах определяли методом адсорбционной спектроскопии на планшетном спектрофлуориметре Infinity F-200 (TECAN, Австрия).

После эксплантации образцы высушивали в течение 2 часов при 100°C в сухожаровом шкафу (Binder, Германия), после чего измеряли сухой вес образцов на аналитических весах (Ohaus Pioneer, Швейцария). Затем каждый высушенный фрагмент помещали в 1 мл 1М HCl для растворения минерализованного кальция на 24 часа при 20-25°C. В дальнейшем проводили измерение количества минерализованного кальция в растворе с помощью стандартного набора для определения кальция Calcium AS DiaS Arsenazo III (DiaSys, Германия).

Расчёт значений минерализованного кальция в образцах (мкг кальция на мг сухого веса образца) проводили согласно инструкции производителя. С целью исключения погрешности измерений оптической плотности комплексов кальция и Arsenazo III в лунках опытных образцов как следствие использования соляной кислоты (изменение pH раствора), при проведении калибровки в лунки со стандартом Calcium AS FS добавляли аликвоту соляной кислоты, равную аликвоте опытных образцов.

2.19 Статистический анализ

Результаты исследований *in vitro* представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm SD$). Каждый эксперимент *in vitro* проводился не менее чем в пяти повторах ($n \geq 5$). Для сравнения двух независимых выборок использовали U-критерий Манна-Уитни, различия между группами считали статистически значимыми ($p < 0,05$).

Таблица 7 – 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

Результаты исследований *in vivo* представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm SD$). Каждый эксперимент проводился не менее чем в четырех повторах ($n \geq 4$). Для анализа микроскопических изображений оценивали по 16 полей зрения на одну группу ($n = 16$). Статистическую значимость различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим множественным сравнением Холма-Сidakа ($p < 0,05$). 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. 1.10.0). Графическое отображение полученных результатов осуществлялось с использованием Python 3 (версия 3.10) с библиотеками Seaborn (v. 0.12.2) и Matplotlib (v. 3.7.0).

Теснота (сила) корреляционной связи определялась в соответствии с Таблицей 7.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

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

3.1.1 Топология распределения компонентов внеклеточного матрикса нативного ксеноперикарда в различных областях ткани

Состав ВКМ перикарда может влиять на общую кальцинозрезистентность хсКПБ. Эластиновые волокна являются известными центрами кальцификации биоматериалов, также, как и поврежденные ГАГ. Поскольку данных о специфике гистоархитектоники и состава бычьего перикарда, полученных с помощью методов дифференциальной гистохимии, в научной литературе обнаружено не было, был проведен комплексный гистохимический анализ внеклеточного матрикса нативной ткани с целью выявления тех областей ткани, которые обладают наиболее однородным коллагеновым составом с минимальным содержанием эластина и ГАГ. Дополнительно, поскольку в научной литературе встречались противоречивые данные по содержанию эластиновых компонентов и жировой ткани, данный анализ проводился с учетом топологии тканей перикардальной сумки.

Таким образом для анализа были взяты образцы основной ткани перикарда (группа ОТ), зоны у основания сердца (группа ОС) и области у основания связок (группа СВ).

При гистохимическом анализе образцов группы ОТ, было обнаружено, что матрикс нативного перикарда состоит преимущественно из коллагеновых волокон, имеющих волнообразную структуру (Рисунок 8а). Общая архитектура матрикса характеризовалась пористой структурой с наличием большого количества полостей от 7 до 60 мкм в диаметре, которые имеют важную физиологическую функцию поддержания биомеханической прочности и тургора перикарда для обеспечения физиологической гипертрофии тканей сердца при физической нагрузке. Также стоит отметить, что между серозной и фиброзной поверхностями перикарда имеется слой коллагенового матрикса, обладающего нестандартной перпендикулярной и круговой укладкой коллагеновых фибрилл, формирующей особенно крупные полости до 120 мкм. В таких крупных полостях матрикса обнаруживались локальные включения липидов (Рисунок 8б). Весь матрикс основной ткани перикарда был равномерно насыщен небольшим количеством нейтральных ГАГ, из-за чего матрикс приобретал однородное светло-розовое окрашивание при проведении ШИК-реакции. В то же время, при использовании комбинированной методики окрашивания альциановый синий-ШИК,

обнаруживалось наличие кислых ГАГ в структуре базальной мембраны, располагающейся под серозной поверхностью нативного перикарда, которая, как известно, играет определяющую роль в адгезии, пролиферации и синтетической активности мезотелиальных клеток перикарда, а также опосредует процессы регенерации и ремоделирования ткани (Рисунок 8в). При использовании дифференциальной окраски на эластин, также было обнаружено присутствие незначительного количества эластиновых фибрилл, пронизывающих всю толщу ткани и в наибольшей степени представленных со стороны фиброзной поверхности (Рисунок 8г).

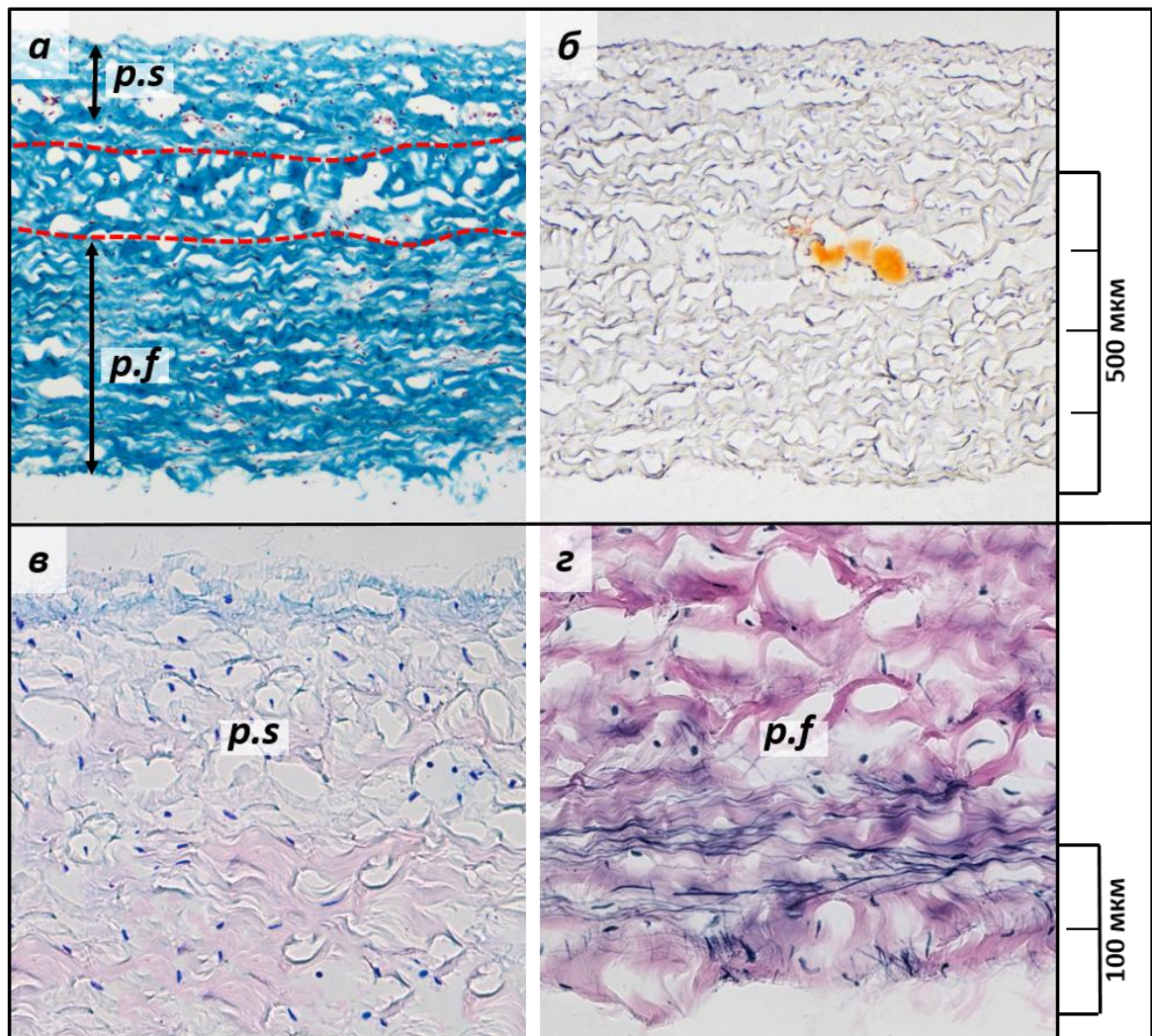


Рисунок 8 – Структура и состав основной ткани нативного перикарда: Световая микроскопия: а – окраска трихром по Лилли: collagen – сине-зеленый, ядра клеток – черно-коричневые, неколлагеновые компоненты – красно-малиновые; б – окраска суданом III: липиды – оранжево-желтые, ядра клеток – темно-фиолетовые; в – увеличенный фрагмент *p.serosum*, окраска альциановым синим-ШИК: ядра клеток – фиолетовые, кислые гликозаминогликаны – голубые, нейтральные гликозаминогликаны – розовые; г – увеличенный фрагмент *p.fibrosum*, окраска по Вейерхгофу-Ван-Гизону: ядра клеток – темно-синие, эластин – черный, фон – розовый; красный пунктир – область матрикса, где обнаруживались включения липидов; *p.s* – *p.serosum*; *p.f* – *p.fibrosum*

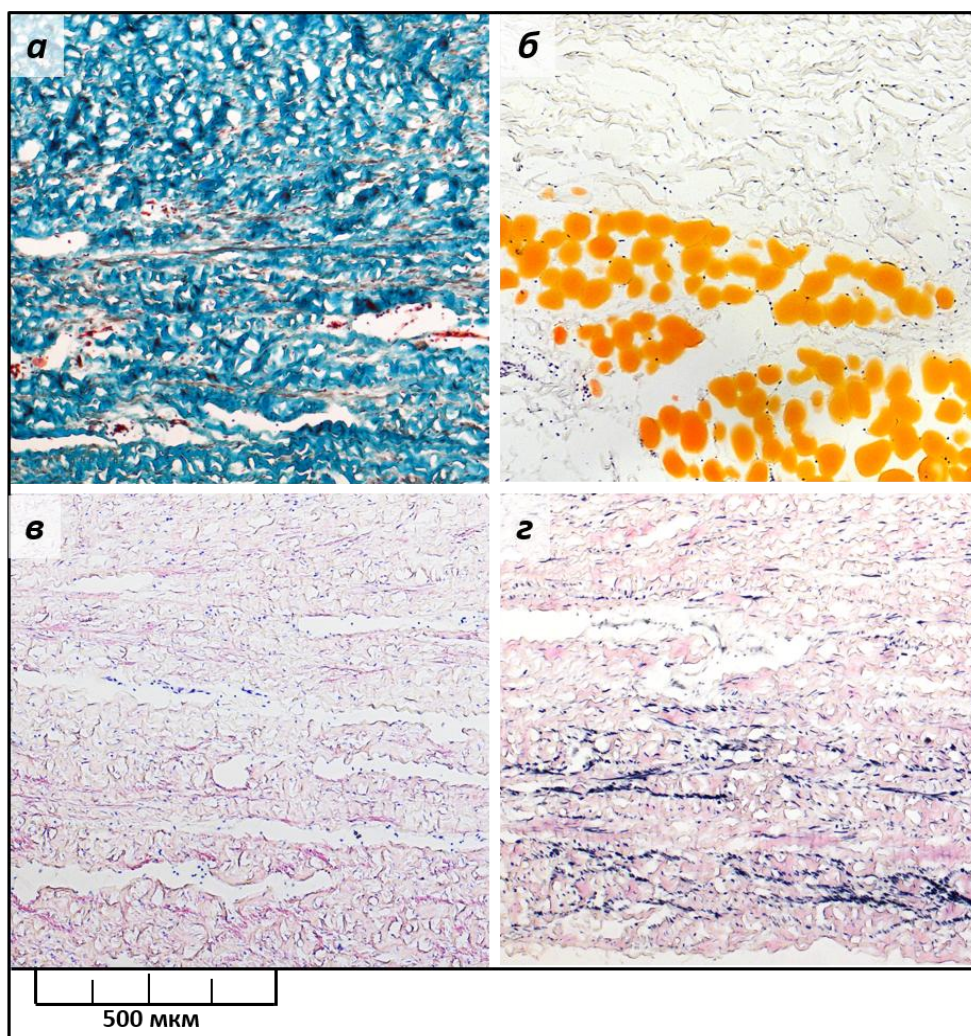


Рисунок 9 – Структура и состав ткани нативного перикарда в области у основания сердца): Световая микроскопия: а – фрагмент *p.fibrosus*, окраска трихром по Лилли: collagen – сине-зеленый, ядра клеток – черно-коричневые, неколлагиновые компоненты – красно-малиновые; б – фрагмент *p.fibrosus*, окраска суданом III: липиды – оранжево-желтые, ядра клеток – темно-фиолетовые; в – фрагмент *p.fibrosus*, окраска альциановым синим-ШИК: ядра клеток – фиолетовые, кислые гликозаминогликаны – голубые, нейтральные гликозаминогликаны – розовые; г – фрагмент *p.fibrosus*, окраска по Вейерхгофу-Ван-Гизону: ядра клеток – темно-синие, эластин – черный, фон – розовый

ВКМ образцов группы ОС демонстрировал более плотную укладку коллагеновых волокон при сравнительно более низкой клеточной плотности (Рисунок 9а). При этом со стороны *p.fibrosus* в ткани наблюдались обширные жировые включения (Рисунок 9б). Также преимущественно с фиброзной стороны было обнаружено большее содержание эластина, формирующего плотные тяжи между коллагеновыми волокнами, и нейтральных ГАГ, которые были расположены в непосредственной близости с эластиновыми фибриллами (Рисунок 9в, г).

Группа СВ характеризовалась значительно более высокой клеточной плотностью и высоким содержанием неколлагиновых компонентов во ВКМ ткани (Рисунок 10а). Дифференциальная окраска на эластин выявила присутствие большого количества эластиновых

структур в ткани перикарда, преимущественно с фиброзной стороны (Рисунок 10г). Также на эластиновых фибриллах было обнаружено присутствие нейтральных ГАГ (Рисунок 10в). В образцах данной группы обнаруживалось как большое количество липидов в самой ткани, так и наличие крупных липидных депозитов на поверхности *p.fibrosus* (Рисунок 10б).

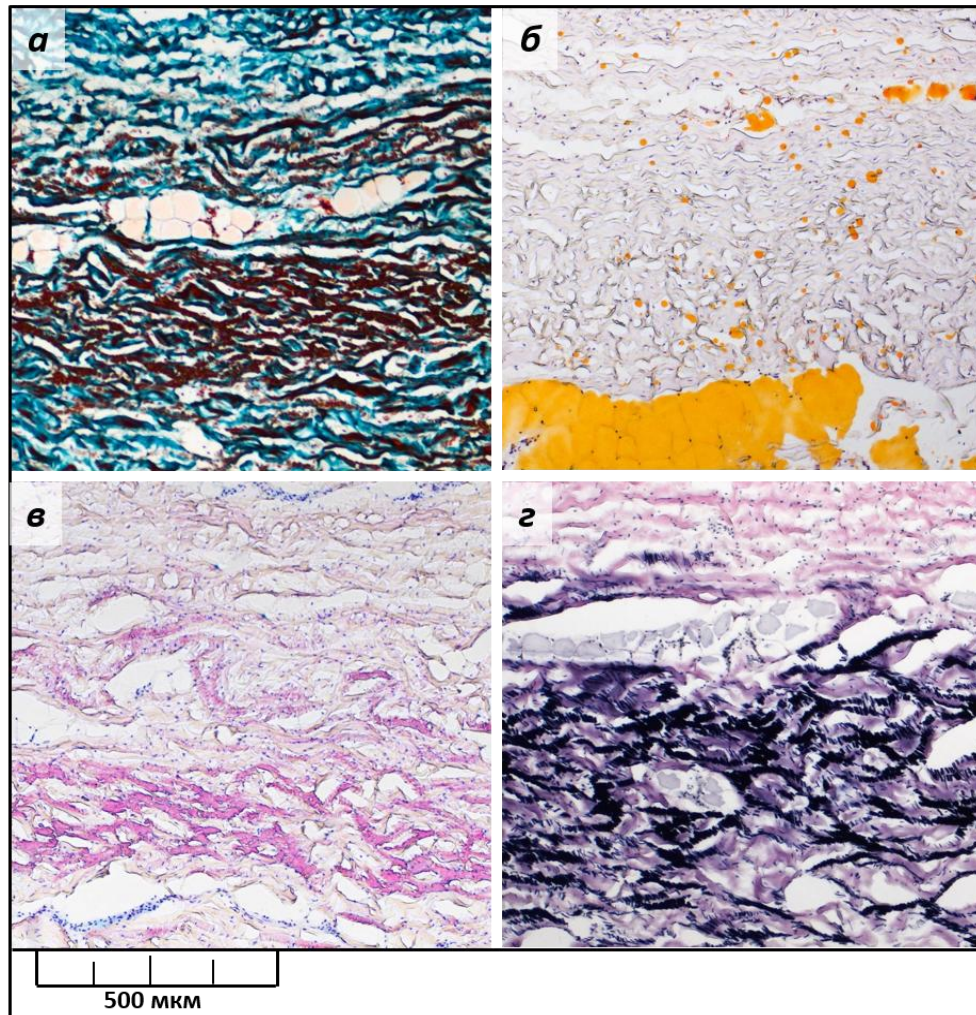
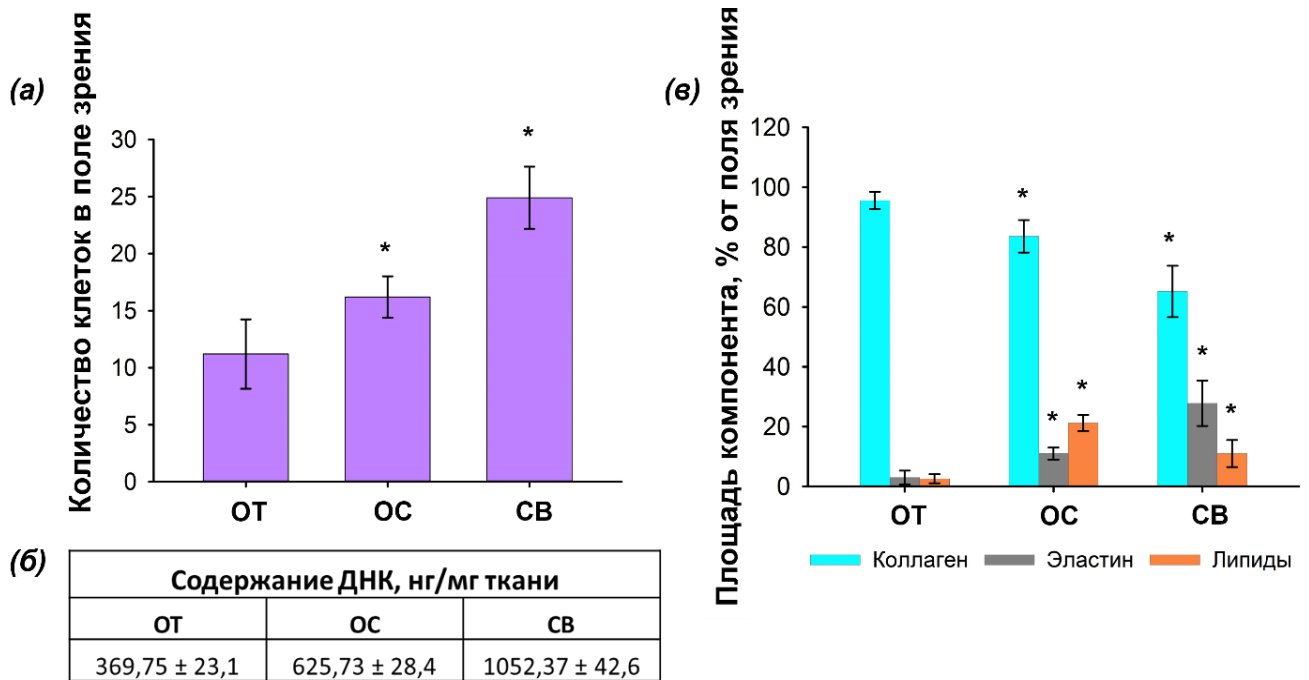


Рисунок 10 – Структура и состав ткани нативного перикарда в области у основания связок: Световая микроскопия: а – фрагмент *p.fibrosus*, окраска трихром по Лилли: collagen – сине-зеленый, ядра клеток – черно-коричневые, неколлагеновые компоненты – красно-малиновые; б – фрагмент *p.fibrosus*, окраска суданом III: липиды – оранжево-желтые, ядра клеток – темно-фиолетовые; в – фрагмент *p.fibrosus*, окраска альциановым синим-ШИК: ядра клеток – фиолетовые, кислые гликозаминогликаны – голубые, нейтральные гликозаминогликаны – розовые; г – фрагмент *p.fibrosus*, окраска по Вейерхгофу-Ван-Гизону: ядра клеток – темно-синие, эластин – черный, фон – розовый

Гистоморфометрический анализ полученных микрофотографий выявил, что наивысшим показателем клеточной плотности обладает область перикарда у основания связок (группа СВ) (Рисунок 11а). Клеточная плотность – одна из важнейших характеристик донорской ткани, используемой для изготовления биоматериалов, поскольку мембраны клеток несут основные

антигены, инициирующие отторжение имплантата. Критически важное значение данный показатель имеет именно для кардиохирургических биоматериалов, поскольку липиды клеточных мембран могут запускать кальциноз. При этом ядерное ДНК, как самая прочная молекула, с трудом поддается разрушению и удалению из ткани в процессе децеллюляризации. Более того ДНК, как крупный источник фосфатов, может также способствовать кальцинозу [2].



* ОТ – основная ткань перикарда; ОС – зона перикарда у основания сосудов; СВ – зона перикарда у основания связок

Рисунок 11 – Состав ткани нативного перикарда в различных областях: (а) – диаграмма, демонстрирующая клеточную плотность перикарда в различных областях ткани, $n=16$, $*p \leq 0,05$, относительно группы ОТ (тест Холма-Сидака); (б) – содержание ДНК в различных областях ткани перикарда (нг/мг); (в) – диаграмма, демонстрирующая соотношение площади, занимаемой компонентом перикарда в различных областях ткани, $n=16$, $*p \leq 0,05$, относительно группы ОТ (тест Холма-Сидака)

Таким образом, основная ткань перикарда (группа ОТ), содержащая наименьшее количество клеток и следовательно ДНК (Рисунок 11а, б), является наиболее подходящей для изготовления кардиохирургических биоматериалов.

Кроме того выявлено, что основная ткань перикарда обладает наиболее однородным составом ВКМ и низким содержанием липидов (Рисунок 11в). Учитывая, что гетерогенность ВКМ может влиять как на характер клеточного ответа реципиента, так и на скорость резорбции биоматериала данная область (ОТ) является максимально предпочтительной при изготовлении материалов хсКПБ, вследствие чего все экспериментальные материалы были получены непосредственно из основной ткани перикарда.

3.1.2 Анализ повреждений структуры поверхности *p.serosum* химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов после обработки

На данном этапе, методом сканирующей электронной микроскопии был проведен анализ характера и степени изменения структуры *p.serosum* хсКПБ в зависимости от способа их предимплантационной обработки в сравнении с *p.serosum* нативного перикарда.

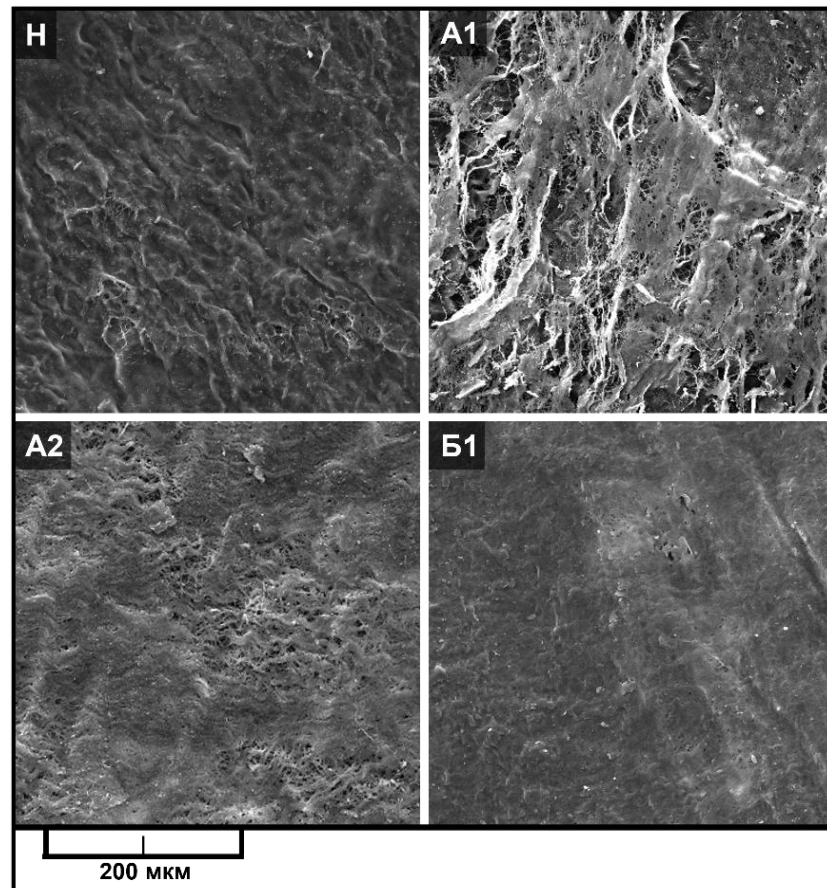


Рисунок 12 – Структура поверхности *p.serosum* нативного перикарда и экспериментальных материалов групп A1, A2 и B1 после обработки: Сканирующая электронная микроскопия. H – нативный перикард; A1, A2 и B1 – экспериментальные группы A1, A2 и B1 соответственно

Для всех групп была детализировано изучена поверхность *p.serosum* как наиболее важная для оценки поверхность створок биопротезов, испытывающих основной гидродинамический удар тока крови. Учитывая также тот факт, что данная поверхность должна быть максимально интактной для сохранения свойства тромбрезистентности, поверхность отдельно изучалась на предмет «оголения» подлежащего под базальной мембраной *p.serosum* коллагенового слоя, а также наличия или отсутствия участков разволокнения и продольных микроразрывов, являющихся как правило местом осаждения фибрина и тромбоцитарной агрегации.

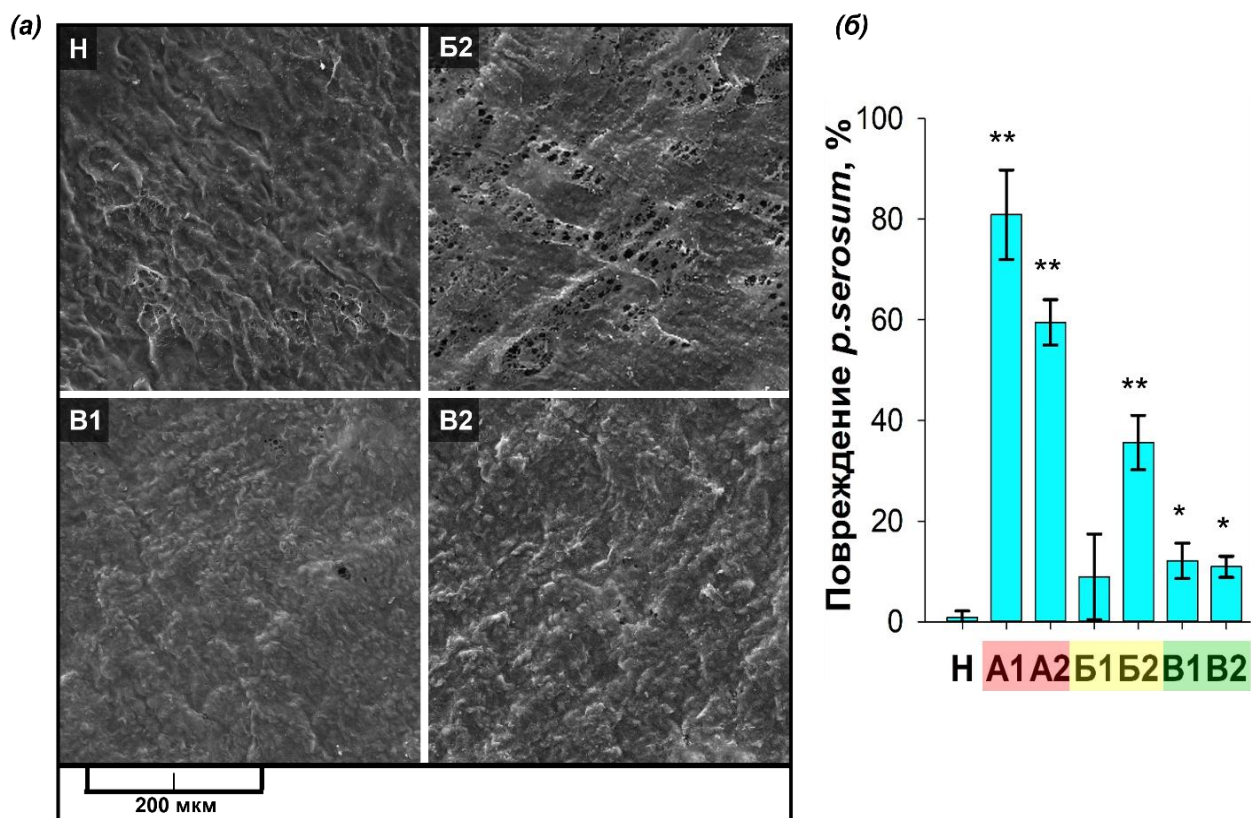


Рисунок 13 – Структура поверхности *p.serosum* нативного перикарда и экспериментальных материалов групп B2, B1 и B2 после обработки и результаты биоимиджинга полученных изображений: Сканирующая электронная микроскопия. H – нативный перикард; B2, B1 и B2 – экспериментальные группы A1, A2 и B1 соответственно. (a) – сканирующая электронная микроскопия; (б) – результаты биоимиджинга и обсчета изображений, $n=16$, $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,001$ относительно контроля (тест Холма-Сидака)

В образцах группы нативного контроля на серозной поверхности выявлен надлежащий над поверхностью «сиропообразный» (предположительно, гликозаминогликановый) слой, покрывающий сверху коллагеново-ламининовый матрикс *p.serosum* (Рисунок 12). При сравнительном анализе обнаружено, что подобный слой, хоть и менее выраженный, также наблюдается на образцах групп B1, B1 и B2 (Рисунок 12, 13a). Однако, поверхность материалов группы B1 выглядела более гладкой, а в некоторых местах на поверхности наблюдались заломы и складки. В то же время в группах B1 и B2 ГАГ-слой был явно более тонким, чем в контроле, и через него просматривалась структура подлежащих коллагеновых волокон серозной поверхности, однако других видимых признаков повреждения поверхности образцов данных групп обнаружено не было (Рисунок 13a).

Наибольшая степень повреждения, проявляющаяся в продольном разволокнении коллагеновых волокон и наличии поперечных микроразрывов именно коллагеновых волокон наблюдалась в образцах группы А1 (рисунок 13б), при этом для данной группы было также свойственно частичное отслоение *p.serosum* от подлежащего слоя (оголение).

В то же время, для образцов групп А2 и В2 было свойственно частичное сохранение ГАГ-слоя и структурной целостности поверхности. В материалах группы В2 приблизительно на 30-40% поверхности встречались участки прободения гликозаминогликановой оболочки, но без признаков продольного разволокнения подлежащих коллагеновых волокон. У материалов группы А2 ГАГ-слой отсутствовал практически полностью, а даже в областях минорных остаточных очагов наблюдалось его сильное истончение. Кроме того, подлежащие волокна матрикса данной группы характеризовались интенсивным разволокнением и имели распушенную (бахромистую) структуру.

3.1.3 Анализ повреждений фибриллярной структуры матрикса химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов после обработки

Для оценки структурных изменений/повреждений коллагенового матрикса проводили гистологический анализ экспериментальных материалов после их обработки в сравнении с нативным контролем с использованием дифференциальной трихромной окраски по Лилли. В качестве образца сравнения также был дополнительно исследован внеклеточный матрикс нативного перикарда (Н).

Материалы всех групп после обработки характеризовались уплотненной структурой ВКМ, что свойственно для фиксированных материалов. Наименьшая степень структурных изменений ВКМ наблюдалась в группах В1 и В2 (Рисунок 15б), где помимо общего уплотнения матрикса также наблюдались минорные признаки частичного разволокнения и отслоения коллагеновых фибрилл со стороны *p.fibrosum* (Рисунок 15а).

В остальных экспериментальных группах наблюдалось возникновение участков разволокнения коллагеновых фибрилл в основной (срединной) толщии материалов, а также формирование крупных продольно вытянутых полостей, по-видимому, обусловленных стягиванием пучков коллагеновых фибрилл из-за изменений вязко-эластических свойств матрикса вследствие проведенной химической стабилизации (Рисунок 14, 15а).

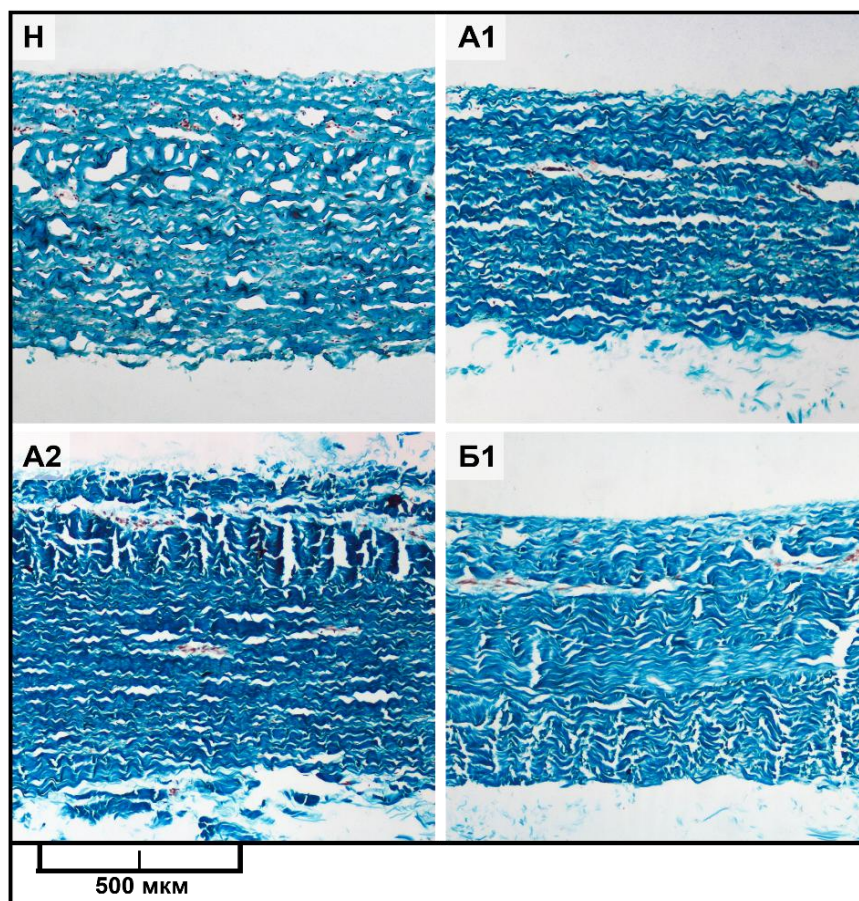


Рисунок 14 – Структура внеклеточного матрикса нативного перикарда и экспериментальных материалов групп A1, A2 и B1 после обработки: Световая микроскопия, окраска трихром по Лилли: collagen – сине-зеленый, ядра клеток – черно-коричневые, неколлагеновые компоненты – красно-малиновые. H – нативный перикард; A1, A2 и B1 – экспериментальные группы A1, A2 и B1 соответственно

Подобные признаки слияния волокон и общего растрескивания материала в наибольшей степени наблюдались в материалах группы A1. Отдельно стоит отметить, что идентификация *p.serosum* в группе A1 была затруднена в виду ее сильного повреждения или практически полного отсутствия (Рисунок 16).

Наиболее заметные изменения волокнистой структуры внеклеточного матрикса обнаруживались в группах A2, B1 и B2 (Рисунок 16, 17). В группах B2 и A2, коллагеновый матрикс со стороны *p.fibrosus* обладал рыхлой бахромистой структурой.

Несмотря на структурную целостность *p.serosum* в группе B1, матрикс материалов также обладал сильно измененной архитектоникой. В данной группе наблюдалось слияние и дезорганизация коллагеновых волокон особенно выражено в срединной части матрикса, где изменилось взаимное расположение волокон относительно друг друга и полностью отсутствовала упорядоченная структура нормального коллагенового ВКМ (Рисунок 17). Также в группах A2 и B1 преимущественно со стороны *p.fibrosus* наблюдались признаки поперечного

растрескивания матрикса материалов, что является характерным признаком потери гибкости коллагеновых фибрилл вследствие их дегидратации.

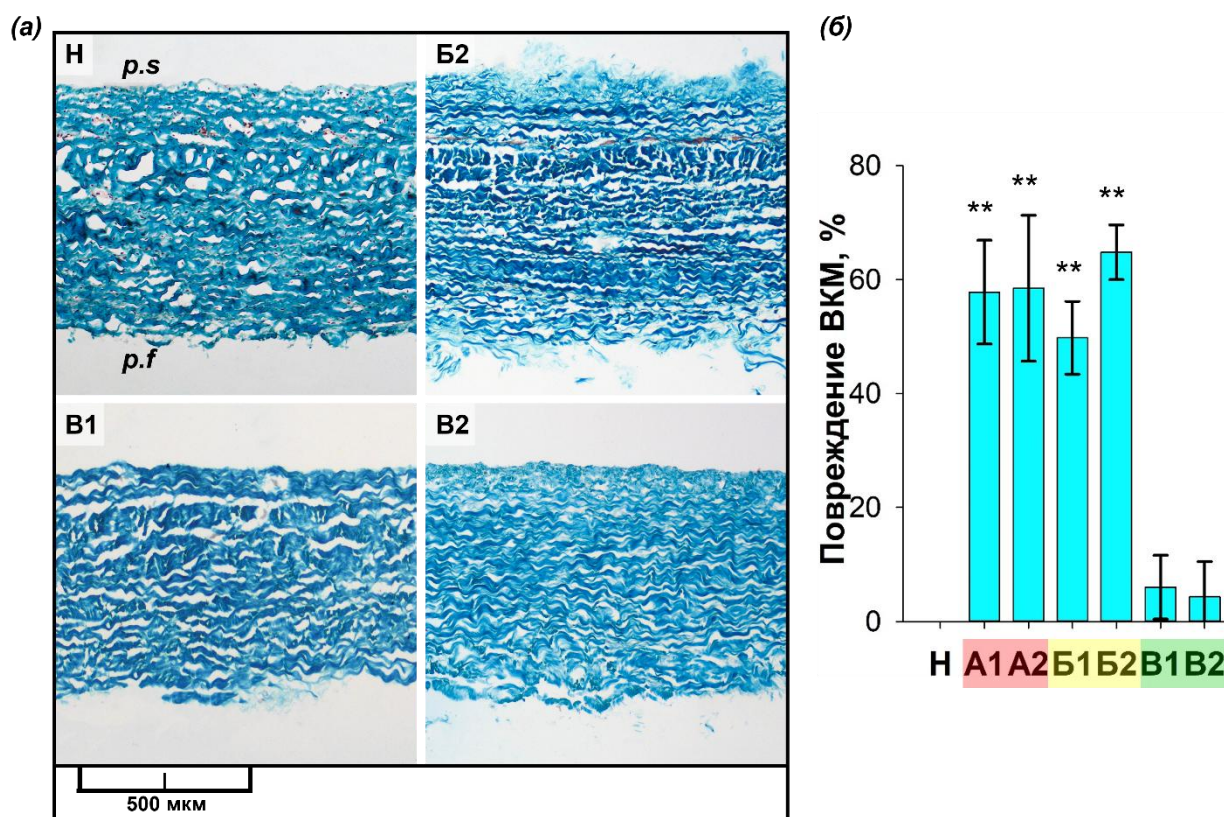


Рисунок 15 – Структура внеклеточного матрикса нативного перикарда и экспериментальных материалов группы B2, B1 и B2 после обработки и результаты биоимиджинга полученных изображений: H – нативный перикард; B2, B1 и B2 – экспериментальные группы A1, A2 и B1 соответственно. (a) – световая микроскопия, окраска трихром по Лилли: коллаген – сине-зеленый, ядра клеток – черно-коричневые, неколлагеновые компоненты – красно-малиновые; (б) – результаты биоимиджинга и обсчета изображений, $n=16$, $**p \leq 0,001$ относительно контроля (тест Холма-Сидака)/ ВКМ – внеклеточный матрикс

Особо явные признаки продольного и поперечного растрескивания волокон матрикса наблюдались в группе A2 как с фиброзной, так и с серозной поверхности (Рисунок 16). Также матрикс материалов данной группы, как и группы A1, отличался типичной для перефиксированных биоматериалов уплотненной структурой.

Отдельно стоит отметить, что в группах A1, A2, B1 и B2 редукция коллагеновых волокон сочеталась с изменением их сродства к красителю, что проявлялось в различной степени перенасыщения красителем (Fast Green FCF) отдельных фибриллярных пучков или всего коллагенового матрикса. Наряду с этим особо высокая степень насыщения красителем всего матрикса наблюдалась в группе A2, что говорит о явном обезвоживании и повреждении матрикса материалов данной группы.

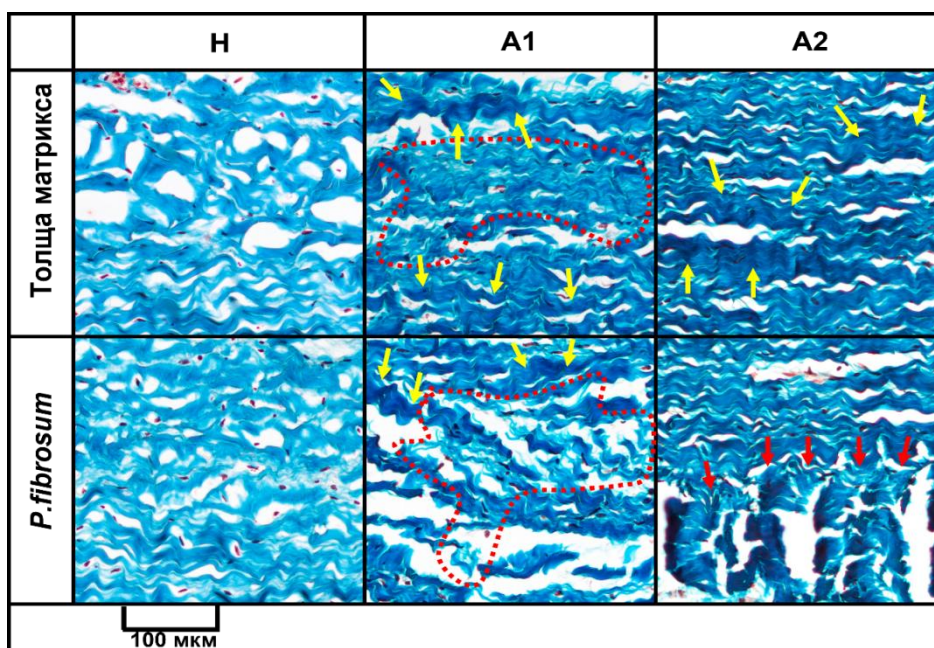


Рисунок 16 – Увеличенные фрагменты материалов A1 и A2 после обработки, представляющие типичные повреждения внеклеточного матрикса: Световая микроскопия, окраска трихром по Лилли: collagen – сине-зеленый, ядра клеток – черно-коричневые, неколлагеновые компоненты – красно-малиновые; красный пунктир – зона разволокнения коллагеновых фибрилл; красные стрелки – поперечное растрескивание внеклеточного матрикса; желтые стрелки – слияние коллагеновых фибрилл

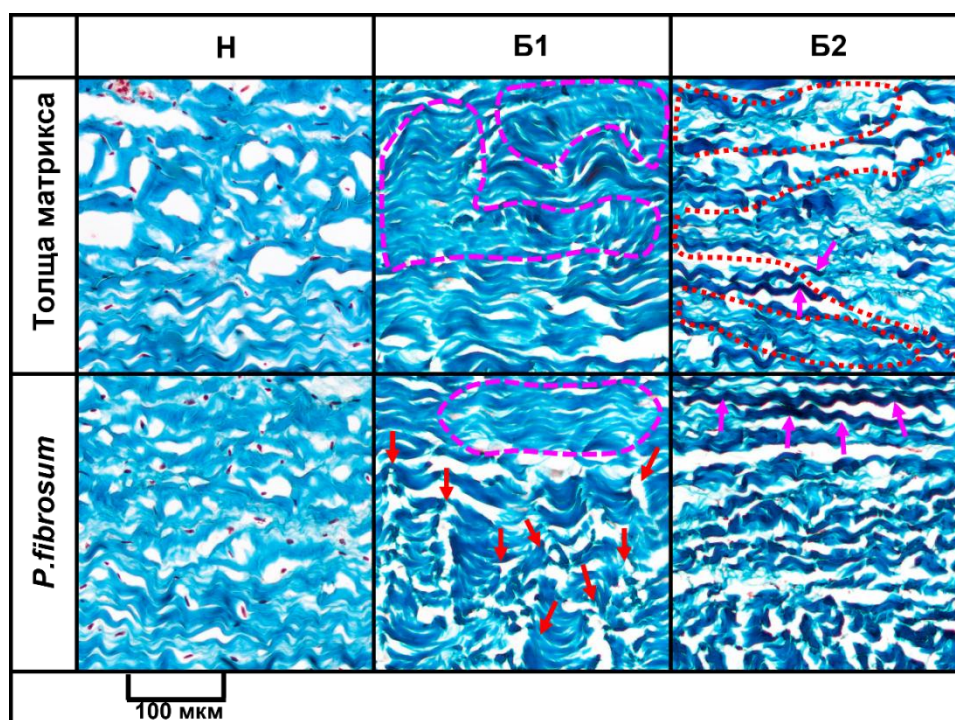


Рисунок 17 – Увеличенные фрагменты материалов Б1 и Б2 после обработки, представляющие типичные повреждения внеклеточного матрикса: Световая микроскопия, окраска трихром по Лилли: collagen – сине-зеленый, ядра клеток – черно-коричневые, неколлагеновые компоненты – красно-малиновые; красный пунктир – зона разволокнения коллагеновых фибрилл; красные стрелки – поперечное растрескивание внеклеточного матрикса; розовый пунктир – зона дезорганизации коллагеновых фибрилл; розовые стрелки – отдельные коллагеновые фибриллы с повышенным насыщением красителем

При гистохимическом анализе с использованием дифференциальной окраски альциановым синим-ШИК было обнаружено, что для всех исследуемых групп характерно фуксинофильное насыщение коллагеновых волокон, что может быть связано как с повреждением коллагенового матрикса, так и с фиксацией ГА, поскольку наименьшая степень фуксинофилии наблюдалась для образцов В1 и В2 (минимально поврежден + 0.2% ГА), а наибольшая для А1 (поврежден в наибольшей степени + 0.625% ГА) (Рисунок 18). При этом для материалов разных групп также определялось изменение сродства к красителю, что проявлялось вариабельностью образцов с высокой и низкой степенью фуксинофилии. Наиболее интенсивная импрегнированность фуксином была характерна для материалов группы А1, наименее интенсивная для групп В1 и В2.

В образцах всех исследуемых групп после обработки кислые ГАГ, наблюдавшиеся в структуре базальной мембраны *p.serosum* в нативных образцах, обнаружены не были (Рисунок 18).

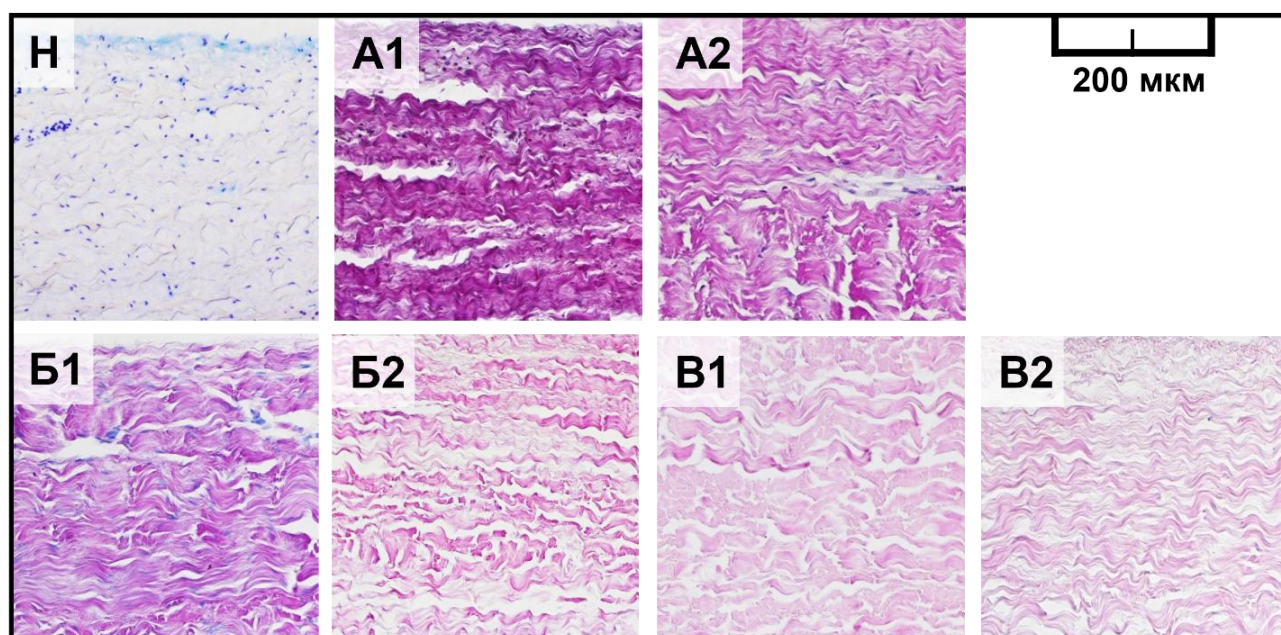


Рисунок 18 – Структура внеклеточного матрикса нативного перикарда и экспериментальных материалов после обработки: Световая микроскопия, окраска альциановым синим-ШИК: ядра клеток – фиолетовые, кислые гликозаминогликаны – голубые, нейтральные гликозаминогликаны и свободные альдегидные группы – розовые

3.1.4 Результаты сводного анализа структурных повреждений химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов в зависимости от способа предимплантационной обработки

Результаты сводного анализа оценки степени целостности матрикса материалов в зависимости от способа предимплантационной обработки представлены в таблице 8.

Результаты проведенного анализа показали, что использование додецилсульфат натрия и спиртов в высоких концентрациях, прежде всего изопропилового спирта, оказывает выраженное повреждающее воздействие на внеклеточный матрикс перикарда.

Таблица 8 – Сводная степень повреждения химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов в зависимости от их предимплантационной обработки

Группа	ХС	Дц	Отмывка	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
Б1	0,2% ГА	Тр Х, ДХНм	35% ИзС	ГА, ЭтС	8,9±8,5	49,8±6,4	29,33
Б2	0,2% ГА	Тр Х, ДХНм	35% ИзС	Дн, ЭтС	35,6±5,4	64,8±4,8	50,22
В1	0,2% ГА	Тр Х, ДХНм	30% ЭтС	Дн, ЭтС	12,1±3,5	6,0±5,6	9,07
В2	0,2% ГА	Тр Х, ДХНм	30% ЭтС	ГА, ЭтС	10,9±2,1	4,3±6,2	7,6

ХС – химическая стабилизация; ВКМ – внеклеточный матрикс; Дц – децеллюляризация; Р.с. – р.серозум; КХ – консервация и хранение; ГА – глутаровый альдегид; Тр Х – тритон Х-100; ДСН – додецилсульфат натрия; ДХНм – дезоксихолат натрия моногидрат; ИзС – изопропиловый спирт; ЭтС – этиловый спирт; Дн – диоксидин

ДСН – известный детергент, который широко используется для денатурации белков, например, в методах электрофореза, когда создаваемый ДСН отрицательный заряд нарушает ковалентные связи нативных белков. Он также является одним из наиболее широко используемых детергентов для децеллюляризации тканей и его повреждающее действие на внеклеточный матрикс является известным фактом [337, 338]. Было показано, что воздействие ДСН приводит не только к повреждению коллагеновых фибрилл, но и разворачивает тройные спирали коллагеновых молекул, тем самым повреждая белок на молекулярном уровне. В то же

время результаты сравнительных исследований показывают, что ДХН является менее агрессивным детергентом, чем ДСН и в меньшей степени повреждает коллагеновые фибриллы и максимально эффективно солюбилизирует липидные компоненты матрикса. Однако, поскольку методы оценки структурного повреждения ВКМ биоматериалов все еще не приведены к общему стандарту, повреждающее воздействие различных методов децеллюляризации и влияние связанного структурного повреждения на биологический ответ организма на биоматериал активно обсуждаются.

В проведенном исследовании материалы группы А1 и А2 демонстрируют наиболее выраженные повреждения как макроструктуры поверхности, так и волокнистой структуры толщи матрикса. Также все исследованные группы, которые подвергались обработке ДСН демонстрируют сильное истощение/полное отсутствие ГАГ-слоя, который как известно играет важную роль в стабилизации пространственной структуры и регуляции степени гидратации ВКМ. В частности, ГАГ специфически взаимодействуют с фибриллами коллагена I типа, связывая и стабилизируя соседние фибриллы коллагена [308]. Истощение или повреждение ГАГ, вызванное воздействием ДСН, может приводить к кальцинозу биоимплантатов на основе коллагена как из-за изменения пространственной организации фибрилл коллагена, так и за счет нуклеации депозитов кальция непосредственно на поврежденных ГАГ [4].

Изопропиловый спирт даже в невысоких концентрациях (35%) также оказывает выраженное повреждающее воздействие, как наблюдалось в группах А2, Б1 и Б2. В стабилизации структуры коллагена ключевую роль играет вода, поскольку она регулирует гибкость спиралей молекул коллагена и облегчает выравнивание и распознавание коллагеновых волокон, опосредованное водородными связями [313]. Дегидратация коллагена является повреждающим процессом, который приводит к потере физических свойств волокон и, как правило, необратим. Однако, существующие исследования показывают, что при допустимо низкой гидратации (до уровня первой оболочки волокна коллагена) некоторые молекулы воды остаются внутри фибрилл, что позволяет регидратации восстановить первоначальные структурные особенности коллагена [313]. Таким образом, истощение, растрескивание, слияние и ацидофилия волокон матрикса, наблюдаемые в матриксе материалов групп А2, Б1 и Б2 по всей видимости является результатом их критической дегидратации на фоне воздействия спиртовых растворов.

В свою очередь вариабельность степени повреждения коллагенового матрикса, наблюдаемая в исследуемых группах, указывает на различный уровень дегидратации коллагенового матрикса и в дальнейшем может быть использована для определения допустимых составов и концентраций спиртовых растворов отмывки, не допускающих превышения критического уровня дегидратации ВКМ.

Для всех исследуемых групп также нельзя исключать влияние фиксации ГА на структуру матрикса. Значительный объем данных показывает, что образованные ГА поперечные связи носят полимерный характер с шестью или более остатками глутарового альдегида, связывающими реактивные боковые цепи. Тот факт, что глутаровый альдегид рассматривается как наиболее эффективный фиксатор для «сохранения» ультраструктуры тканей, в немалой степени должен объясняться именно способностью этих длинных полимерных связей соединять довольно «большие» расстояния [339]. Однако существуют исследования, которые демонстрируют, что такие длинные поперечные сшивки приводят к агрегации и конформационным изменениям молекул коллагена, что, несомненно, является повреждающим воздействием для макроструктуры и функциональности ткани [339]. По результатам проведенного блока исследований можно сделать вывод, что использование ГА в концентрации выше 0,2% (прежде всего, 0,5% и выше) вносит значимые изменения в пространственную организацию волокон коллагена и нарушает тем самым общую архитектуру ВКМ.

Отдельно стоит отметить, что использование фиксирующих агентов (ГА и формалина) в качестве компонента растворов хранения, способствует визуальному восстановлению макроструктуры серозной поверхности материалов, что наблюдалось для материалов группы Б1 в сравнении с Б2. Такое «восстанавливающее» действие растворов хранения может приводить к неверной оценке пригодности готового биоматериала, как неповрежденного. Однако, результаты гистологического анализа коллагенового матрикса показали наличие широкого ряда различных типов повреждений даже в группе с неповрежденной поверхностью (Б1). Более того высокая степень повреждения матрикса не поддается частичному восстановлению даже в случае использования ГА в растворе хранения, как это было показано в группах А1 и А2, в обработке которых применялся ДСН и 70% изопропиловый спирт.

В свою очередь, отсутствие «восстанавливающего» структуру поверхности воздействия консервирующего раствора в группах А1 и А2 может указывать на более глубокие повреждения коллагена в данной группе и разрушение реактивных участков (аминогруппы лизина) для связывания ГА, которые уже не могут быть демаскированы фиксирующим агентом консервирующего раствора.

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

3.2.1 Анализ цитотоксического действия химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов в условиях *in vitro*

Исследование количества живых и погибших клеток при их культивировании непосредственно на поверхности *p.serosum* экспериментальных материалов проводили через 24 часа и 96 часов после посева. Перед посевом клеток материалы подвергались стандартной отмывке в физиологическом растворе в течение 20 минут, в соответствии с предельными сроками отмывки химически стабилизированных биопротезов клапанов сердца по рекомендации производителей. Одновременно с вышесказанным, для определения потенциала реэпителизации поверхности экспериментальных материалов проводили дополнительную отмывку образцов хсКПБ в питательной среде DMEM с 10% сыворотки в течение 4-х суток, имитирующих вымывание стабилизирующих агентов и кэппирование свободных альдегидных групп аминокислотами плазмы крови, происходящее в организме реципиентов после имплантации хсКПБ в системный кровоток. Клетки высевались на поверхность исследуемых материалов. В качестве контроля использовались клетки, посеянные на культуральный пластик (К).

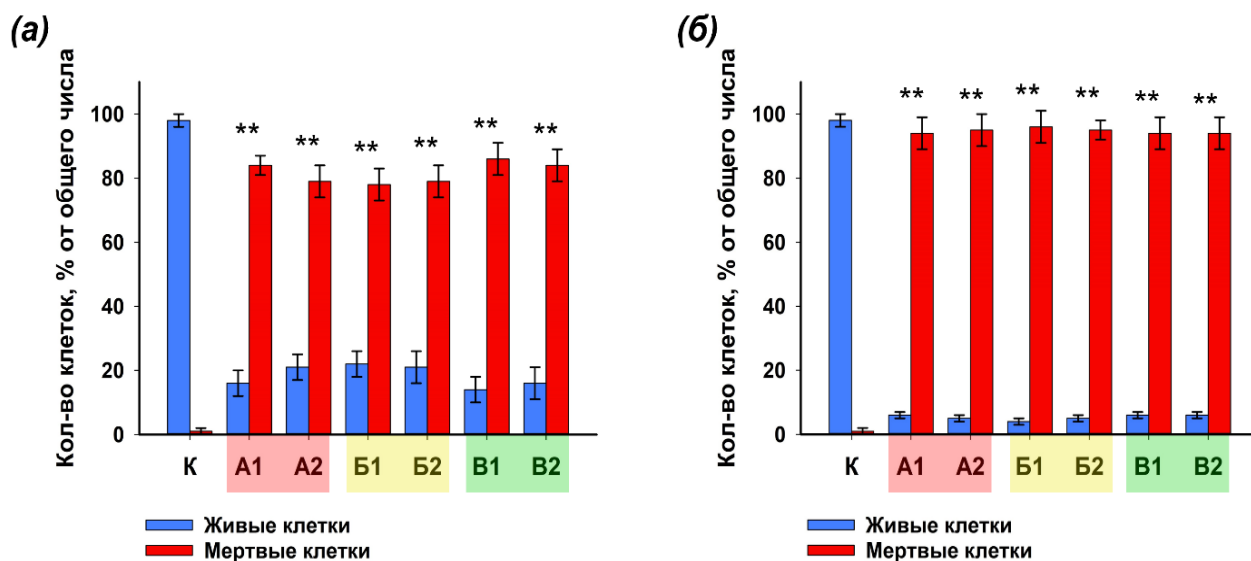


Рисунок 19 – Цитотоксическое действие химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов на клетки NIH/3T3 в условиях стандартной отмывки через 24 (а) и 96 часов (б) культивирования: $n = 5$, $**p < 0,001$ относительно контроля (U-критерий Манна-Уитни)

На рисунке 19 представлены результаты исследования цитотоксического эффекта экспериментальных биоматериалов, по отношению к культивируемым на их поверхности фибробластам.

Из графика видно, что в условиях стандартной отмывки (красные столбцы) все исследуемые образцы обладали выраженным цитотоксическим эффектом; уже через 24 ч культивирования количество погибших клеток для всех образцов превышало 75%. Через 96 часов культивирования количество погибших клеток на поверхности биоматериалов превышало $94 \pm 5\%$.

Дополнительная отмывка существенно подавляла цитотоксическое действие биоматериалов (Рисунок 20). После 24 ч культивирования наименьшим цитотоксическим воздействием на клетки обладали материалы групп А2, В2, В1 и В2, выживаемость клеток в которых составляла не менее 90%. При этом в группах А1 и В1, выживаемость клеток через 24 часа культивирования составляла не менее 50%.

После 96 часов культивирования в группе А1 количество живых клеток снизилось в 3 раза, а в группе В1 в 1,5. В группах А2, В2, В1 и В2 выживаемость клеток сохранялась на высоком уровне и достигала 80%.

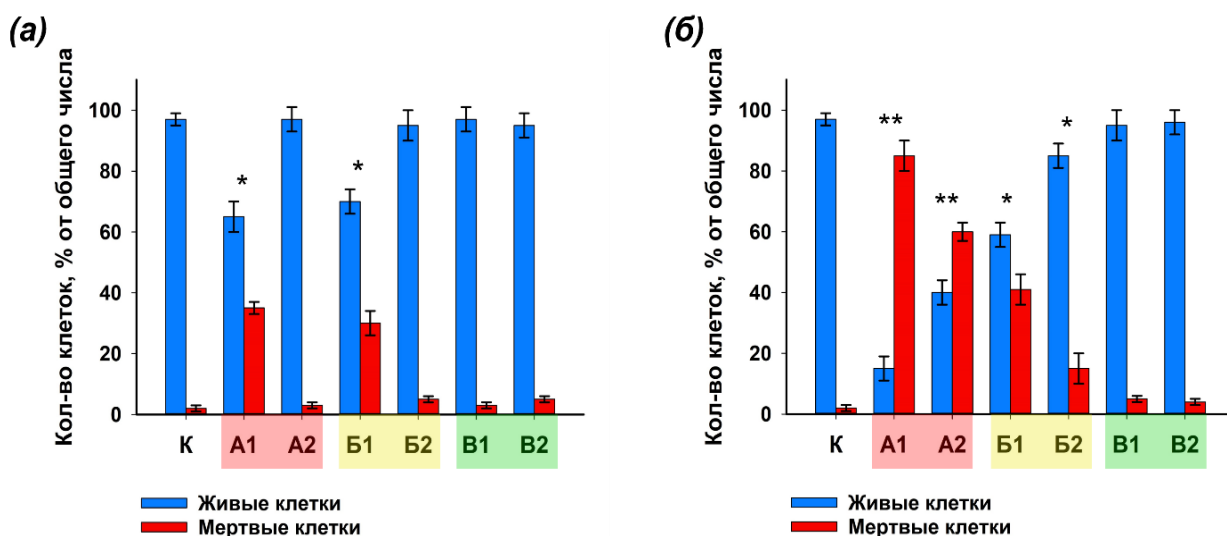


Рисунок 20 – Цитотоксическое действие химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов на клетки NIH/3T3 в условиях дополнительной отмывки через 24 (а) и 96 часов (б) культивирования: $n = 5$, $*p \leq 0,05$, $**p < 0,001$ относительно контроля (U-критерий Манна-Уитни)

Для выявления бесконтактного цитотоксического действия дополнительно проводилась оценка выживаемости клеток в присутствии экстрактов из хсКПБ (Рисунок 21а). Показано, что через 24 часа культивирования с экстрактами из биоматериалов с фибробластами наибольшее цитотоксический эффект оказывали материалы группы А1.

Через 92 часа культивирования экстракты из всех групп показали выраженное цитотоксическое воздействие на клетки (Рисунок 21б). Однако, в группах Б1, В1 и В2 цитотоксическое воздействие было ниже, чем в остальных исследуемых группах.

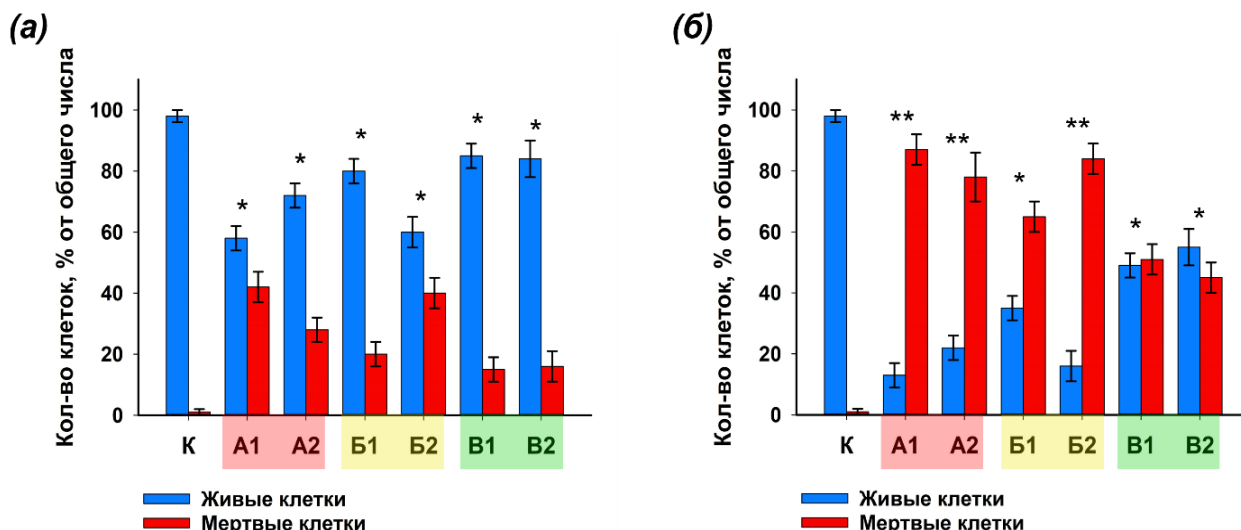


Рисунок 21 – Цитотоксическое действие экстрактов химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов на клетки NIH/3T3 через 24 (а) и 96 часов (б) культивирования: $n = 5$, $*p \leq 0,05$, $**p < 0,001$ относительно контроля (U-критерий Манна-Уитни)

3.2.2 Анализ цитостатического действия химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов в условиях *in vitro*

Проведенный анализ показал, что митотическая активность клеток NIH/3T3, культивированных на образцах всех групп биоматериалов, как без предварительной отмывки, так и с предварительной отмывкой полностью отсутствовала, как через 48, так и 96 часов инкубации. В случае с образцами биоматериалов без предварительной отмывки, выраженное цитостатическое действие основано на продолжающемся цитотоксическом действии материалов. В случае образцов хсКПБ с предварительной отмывкой для групп А1 и Б1 цитостатическое действие также, как и в случае, с образцами без предварительной отмывки, опосредованно выраженным цитотоксическим действием экстрагирующих из материала химических агентов. В свою очередь, цитостатическое действие образцов биоматериалов групп А2, Б2, В1 и В2 может быть обусловлено как слабой экстракцией токсических веществ из образцов биоматериалов, так и модификацией поверхности образцов после обработок, на что также указывает повышение количества погибших клеток через 96 часов культивирования на поверхности отмывших образцов, по сравнению с количеством погибших клеток, на тех же образцах, после 24 часов культивирования.

Также было оценено цитостатическое действие экстрактов хсКПБ. Показано, что как через 48 часов, так и через 96 часов инкубации экстрактов из биоматериалов с фибробластами митотическая активность клеток полностью отсутствовала.

3.2.3 Анализ динамики численности клеточных популяций культивируемых в присутствии химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов

Из рисунка 22а видно, что прирост количества фибробластов, культивируемых на образцах всех хсКПБ без предварительной отмывки, не наблюдался. Также было показано снижение числа клеток, что связано с выраженным цитотоксическим действием экспериментальных образцов, обнаруженным ранее.

На рисунке 22б представлены результаты анализа прироста количества клеточных популяций фибробластов, культивируемых на образцах биоматериалов, после предварительной отмывки. Показано, что образцы биоматериалов групп А1, А2 и В1 не только препятствовали приросту клеток, но и способствовали снижению их количества, вследствие выраженного цитотоксического эффекта. В случае образцов групп В2, В1 и В2 прироста клеточной популяции также не было зарегистрировано, однако снижения количества клеток не наблюдалось.

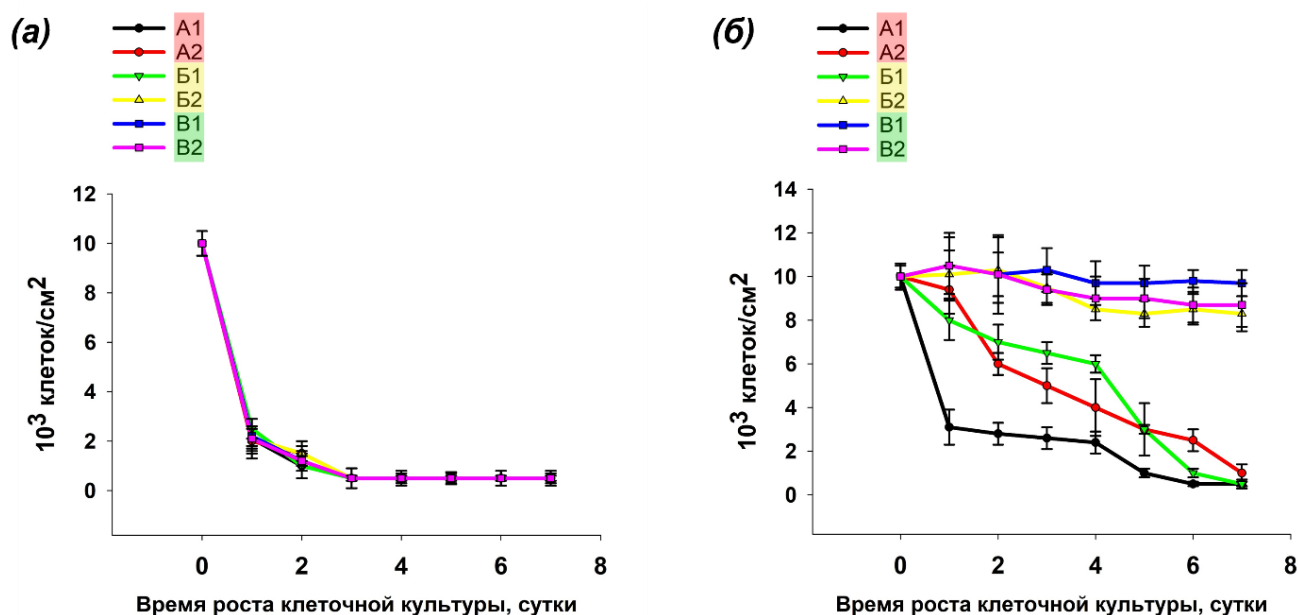


Рисунок 22 – Кривые роста эмбриональных фибробластов мыши NIH/3T3 культивируемых на поверхности экспериментальных химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов: (а) образцы химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов без предварительной отмывки, (б) образцы химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов с предварительной отмывкой, $n \geq 5$

Также была проведена оценка прироста численности клеточных популяций фибробластов в присутствии экстрактов из хсКПБ. Было показано, что экстракты из биоматериалов всех групп не только препятствуют приросту популяции клеток, но и способствуют снижению их количества, вследствие выраженного цитотоксического действия (Рисунок 22), следовательно негативный цитотоксический и цитостатический эффект связан непосредственно с экстрагируемыми из материала химическими агентами.

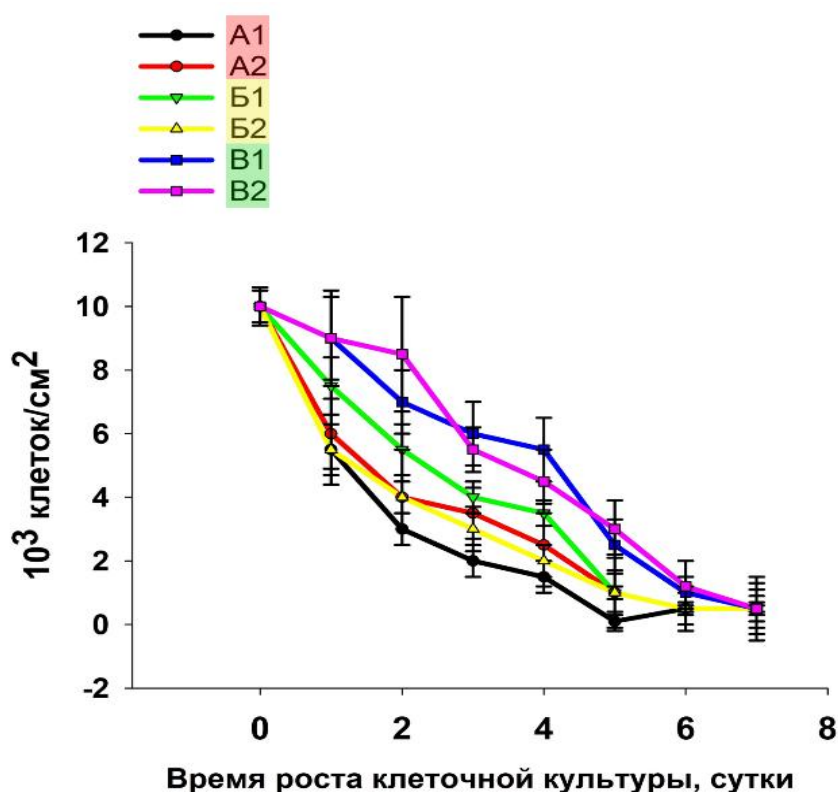


Рисунок 23 – Кривые роста эмбриональных фибробластов мыши NIH/3T3 культивируемых в присутствии экстрактов из экспериментальных химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов ($n \geq 5$)

3.2.5 Изучение активного реципиент-зависимого кальциноза химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов в условиях *in vivo*

Так как одним из основных предполагаемых механизмов развития активного кальциноза является развитие иммунной реакции для всех материалов были тщательно изучены интенсивность и характер клеточной реакции после 8 недель имплантации (срок установления хронического воспаления). В качестве контроля сравнения в *in vivo* исследованиях использовались образцы створок коммерческого биопротеза клапана сердца Edwards Lifesciences «PERIMOUNT Plus» (группа Edw).

Морфологический анализ эксплантированных после 8 недель гетеротопической имплантации образцов показал, что клетки наиболее активно мигрируют в пограничные слои матрикса преимущественно с фиброзной стороны (Рисунок 24). При этом только в материалах группы Б1 клеточная миграция в толщу матрикса практически полностью отсутствовала, что может быть связано как с сохранением выраженного цитотоксического эффекта, так и с более медленной экстракцией цитотоксичных агентов из материалов данной группы.

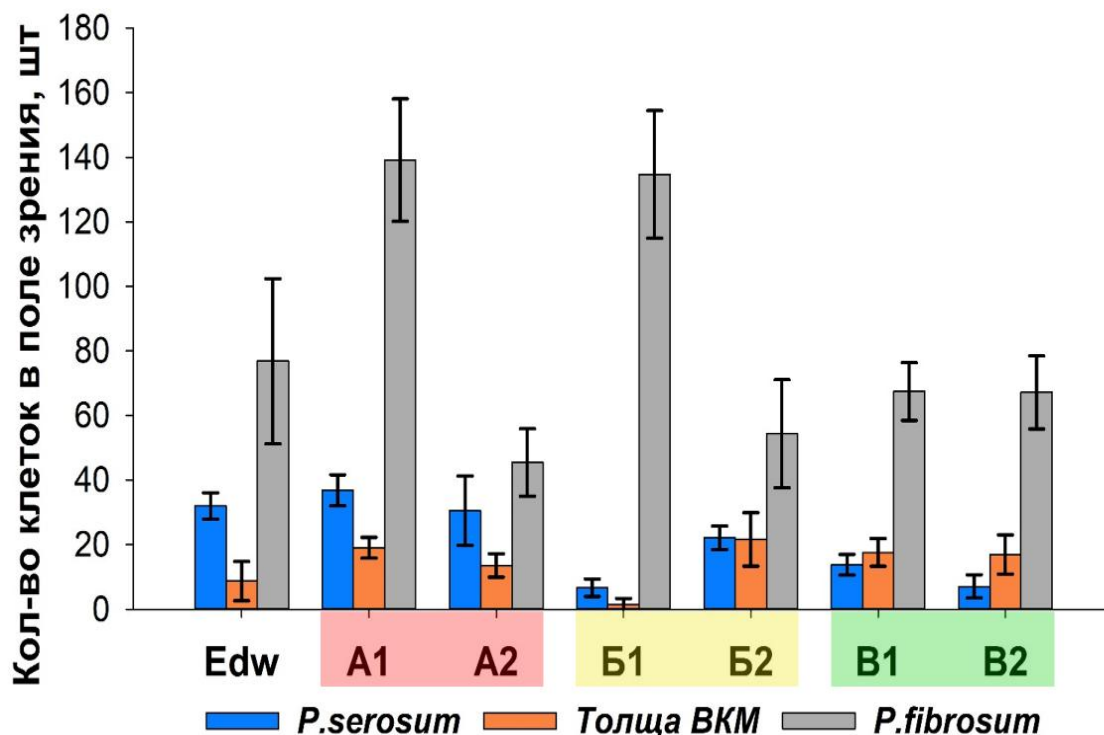
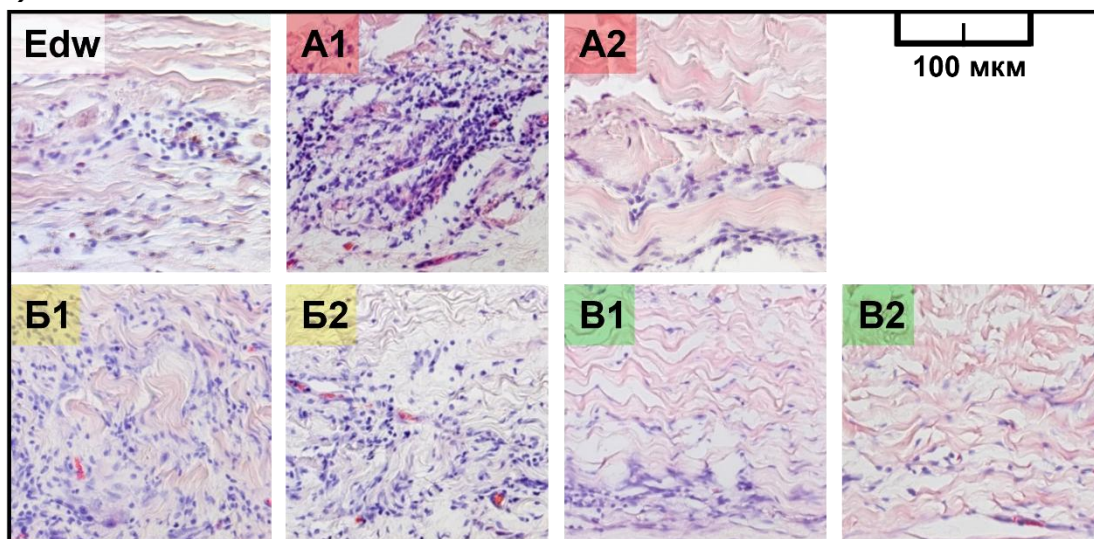


Рисунок 24 – Миграция клеток реципиента в различные слои матрикса химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов после 8 недель гетеротопической имплантации ($n \geq 16$)

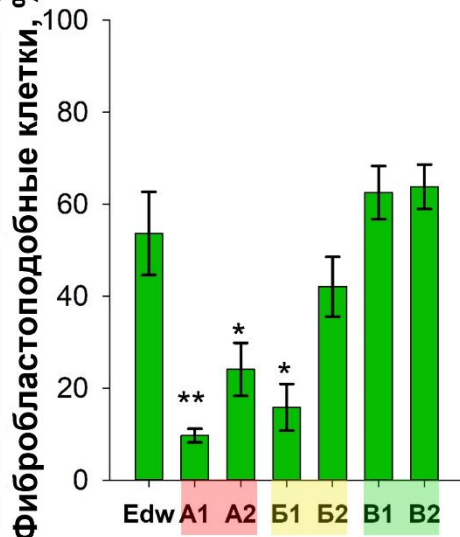
При анализе морфологии клеток, мигрировавших в пограничные зоны матрикса, было обнаружено что в группах А1 и Б1 большинство клеток (более 80%) имеют небольшие и округлые ядра (лейкоцитоподобные клетки), что говорит о развитии очаговой гистиолимфоцитарной инвазии (Рисунок 25а, в).

В группах А2 и Б2 относительное количество лейкоцитоподобных клеток составляло более 60 %, в то время как в контрольной группе Edw клеточная популяция была представлена практически в равной степени и лейкоцито- и фибробластоподобными клетками (Рисунок 25б, в). В группе В1 и В2 количество мигрировавших лейкоцитоподобных клеток не превышало 45% (Рисунок 25в).

(a)



(б) %



(в)

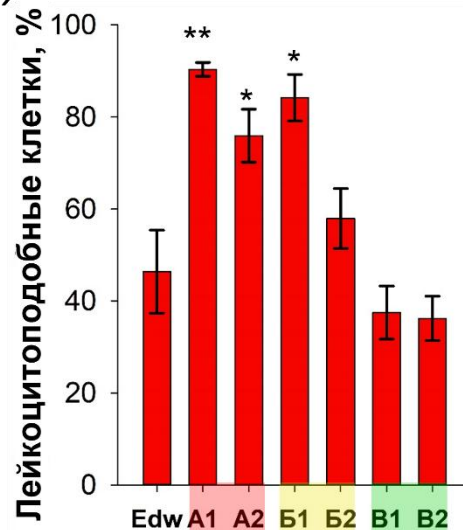


Рисунок 25 – Состав популяции клеток, мигрировавших в пограничные слои матрикса химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов после 8 недель гетеротопической имплантации: (а) – микрофотографии пограничных слоев матрикса экспериментальных образцов, световая микроскопия, окраска Н&Е: ядра клеток – темно-фиолетовые, компоненты матрикса – розовые; (б) и (в) отношение фибробласто- и лейкоцитоподобных клеток соответственно к общему числу мигрировавших клеток, $n \geq 16$, $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,001$ относительно контроля (тест Холма-Сидака)

При сравнительном анализе результатов клеточной миграции *in vivo* и выживаемости клеток на поверхности материалов *in vitro* можно увидеть, что фибробластоподобные клетки наиболее активно мигрируют в матрикс материалов тех групп, которые обладали низкими показателями цитотоксичности в условиях их дополнительной прединкубации в питательной среде.

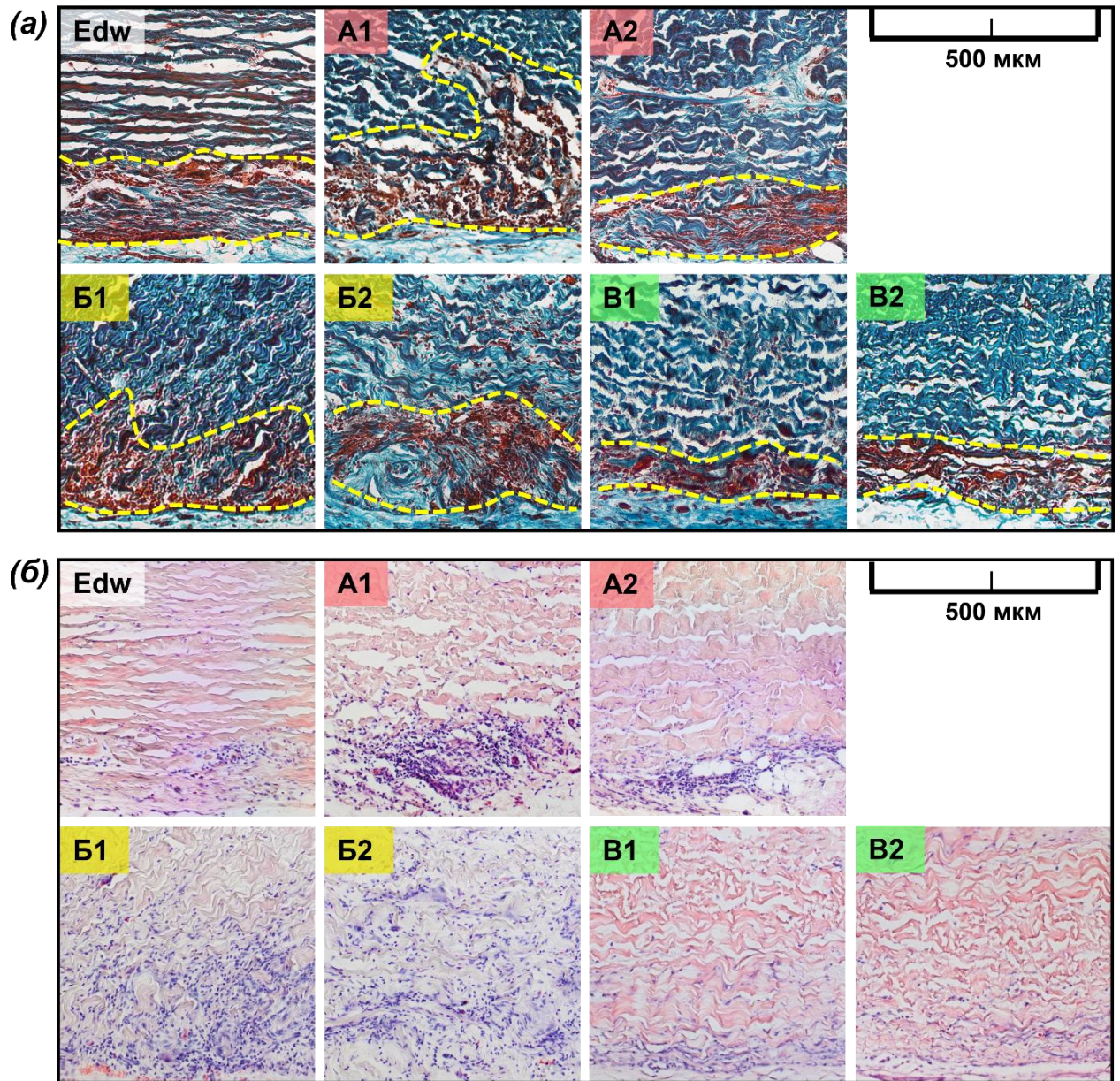


Рисунок 26 – Пограничная клеточно-резорбтивная утилизация внеклеточного матрикса химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов со стороны *p.fibrosus* после 8 недель гетеротопической имплантации. Световая микроскопия: (а) – окраска трихром по Лилли: collagen – сине-зеленый, ядра клеток – черно-коричневые, неколлагеновые компоненты – красно-малиновые, желтый пунктир – граница области клеточной резорбции ВКМ; (б) – окраска H&E: ядра клеток – темно-фиолетовые, компоненты матрикса – розовые

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 26).

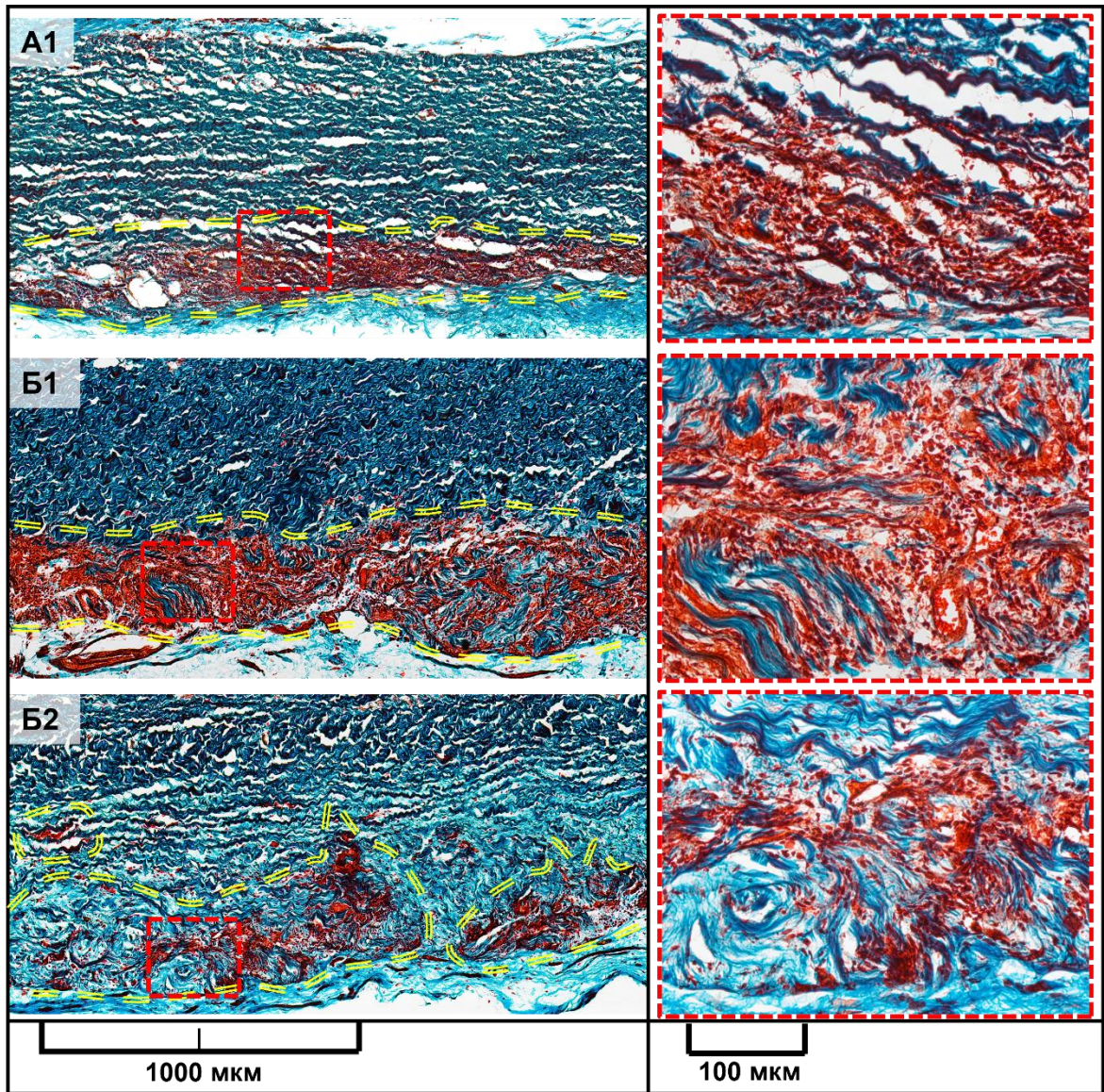


Рисунок 27 – Группы химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов с наиболее выраженной резорбцией внеклеточного матрикса после 8 недель гетеротопической имплантации: Световая микроскопия, окраска трихром по Лилли: collagen – сине-зеленый, ядра клеток – черно-коричневые, неколлагеновые компоненты – красно-малиновые, желтый пунктир – зона резорбции; красный квадрат – область увеличения

Только в группах B1 и B2 не наблюдалось признаков активных клеточно-резорбтивных процессов, о чем свидетельствовало отсутствие признаков как выраженной пограничной гистиолимфоцитарной инвазии, так и резорбции коллагенового матрикса. В группе B1 выявлялась наиболее выраженная пограничная дефрагментация ВКМ, сопровождающаяся разволокнением коллагеновых фибрилл и образованием промежуточных компонентов резорбции коллагенового ВКМ (красно-оранжевая окраска), что говорит об интенсивном развитии клеточно-резорбтивных процессов (Рисунок 27). При этом для материалов всех групп было характерно сохранение целостности основной толщи матрикса. Исключение составила группа B2, где пограничная

резорбция имела очаговый характер, а также наблюдались небольшие области локальной резорбции срединной толщи матрикса (Рисунок 27).

Для группы A1 процессы активной резорбции коллагеновых волокон проходили без выраженного образования промежуточных продуктов резорбции коллагена, что указывает на преимущественно утилизационный характер наблюдающейся репопуляции, при которой мигрировавшие клетки реципиента непосредственно разрушают поврежденный коллаген. Отдельно необходимо отметить, что только в данной группе наблюдались выраженные дистрофические изменения волокнистой структуры предпограничных зон ВКМ, характерные для протеолитической деградации ВКМ (Рисунок 27).

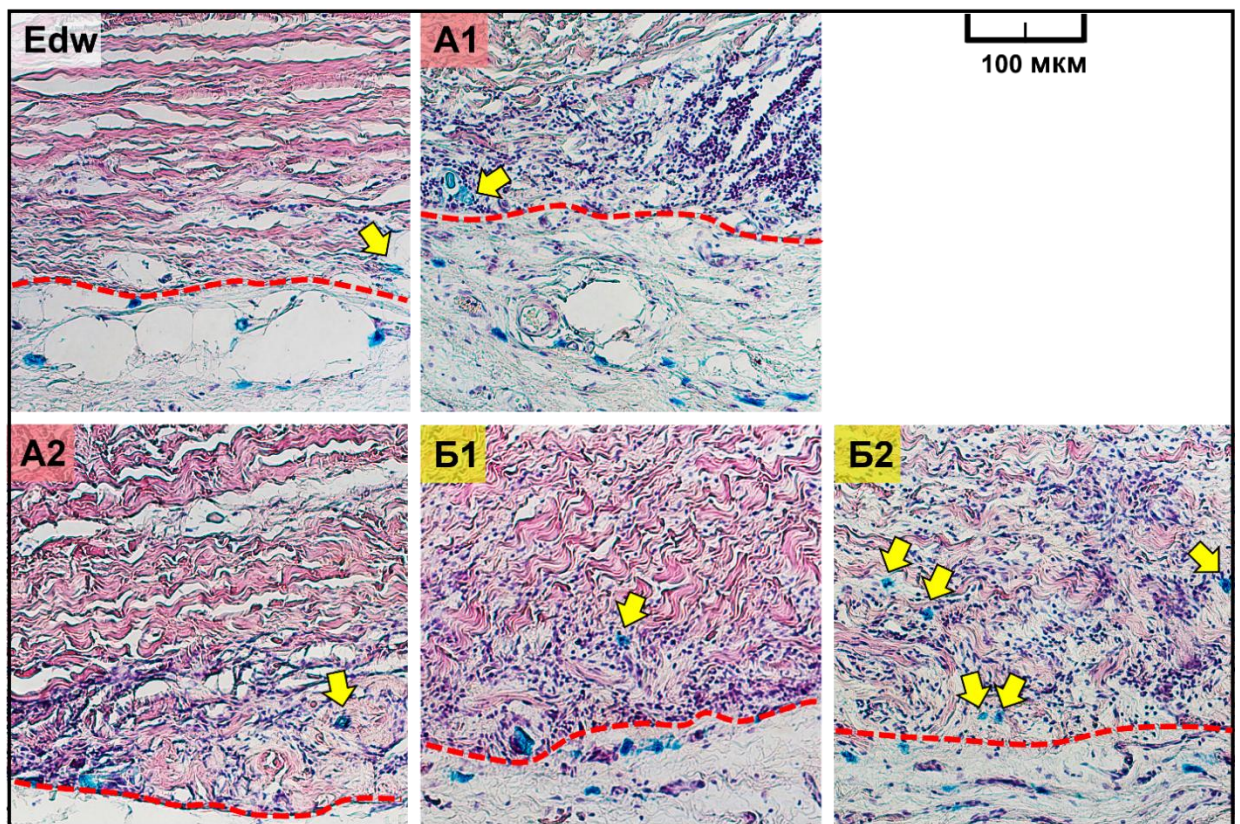


Рисунок 28 – Миграция тучных клеток в контактные ткани и матрикс химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов поврежденных групп (A1, A2, B1 и B2) после 8 недель гетеротопической имплантации: Световая микроскопия, окраска альциановым синим-ШИК: ядра клеток – фиолетовые, кислые гликозаминогликаны и гранулы тучных клеток – голубые, нейтральные гликозаминогликаны – розовые, красный пунктир – граница химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов; желтые стрелки – тучные клетки, мигрировавшие в матрикс химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов

На возможную протеолитическую деградацию матрикса групп A1, A2, B1 и B2 также указывает активная миграция в контактные ткани реципиента тучных клеток, которые, как известно участвуют в процессах резорбции коллагеновых волокон. Наибольшие скопления тучных клеток наблюдались вокруг крупных сосудов окружающих тканей реципиента, что говорит о

целенаправленной миграции и дифференцировке клеток предшественников. Важно отметить, что в некоторых группах (все группы, кроме В1 и В2) клетки также мигрировали в контактные, подвергающиеся утилизационной резорбции зоны матрикса материалов (Рисунок 28).

Для образцов группы А2 процессы асептического кальциноза наблюдались уже через 8 недель имплантации (Рисунок 29). При этом даже в тех областях матрикса, которые еще не подверглись явной кальцификации, наблюдалось повышенное насыщение слившихся коллагеновых волокон ионами кальция (кальцифилаксия), что в последующем может стать участками интенсивного кальциноза – то есть данные области являются местами инициации депозитов кальция. Эти области материалов демонстрировали признаки потери тургора (обводнения), слияния волокон матрикса и общего растрескивания, что свидетельствует о полной потере эластичности материала вследствие интенсивной кальцифилаксии.

Признаков развития кальциноза для образцов остальных исследованных групп на данном сроке выявлено не было.

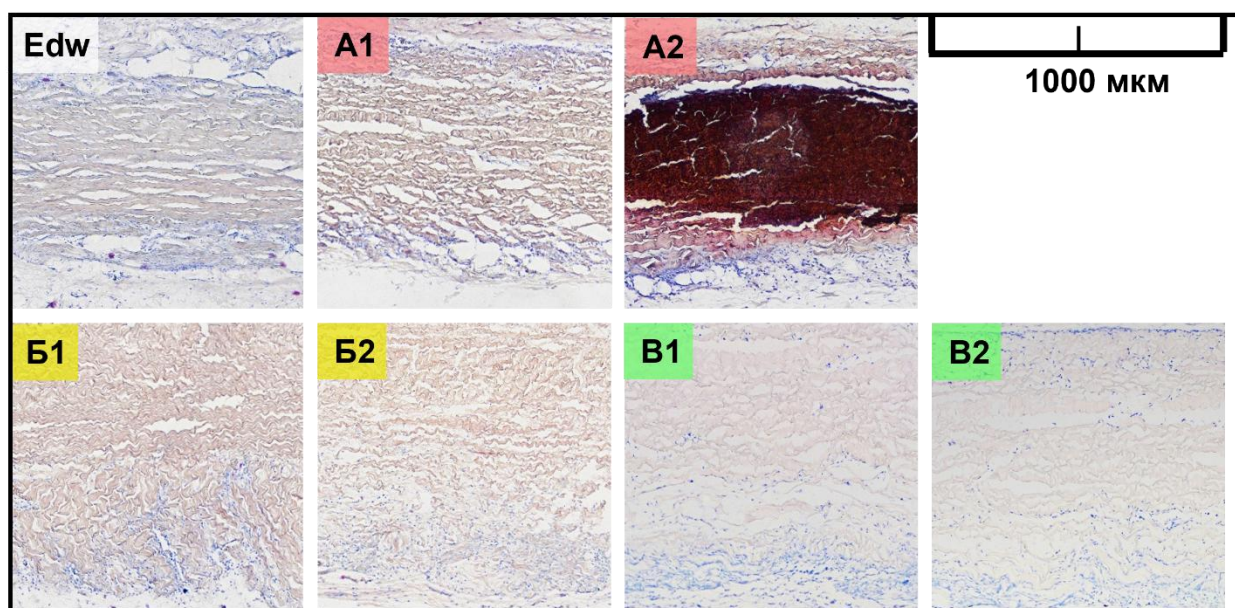


Рисунок 29 – Кальцификация химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов после 8 недель гетеротопической имплантации: Световая микроскопия, окраска по МакГи-Расселу: соли кальция – темно-красные/красно-малиновые, ядра клеток – темно-синие

После 24 недель имплантации в группах В1 и В2 отмечалось радикальное снижение интенсификации процессов пограничной инфильтрации и обнаруженные в матриксе клетки были представлены уже преимущественно фибробластами и редко – лейкоцитарным звеном. Области клеточной резорбции были незначительны и обнаруживались локально только в краевых областях образцов (Рисунок 30а). Не обнаруживалось тучных клеток и признаков образования плотной фиброзной капсулы, что свидетельствует об отсутствии отсроченного токсического влияния

материала на клетки и ткани реципиента и отсутствии отсроченной фиброзной трансформации контактной грануляционной ткани.

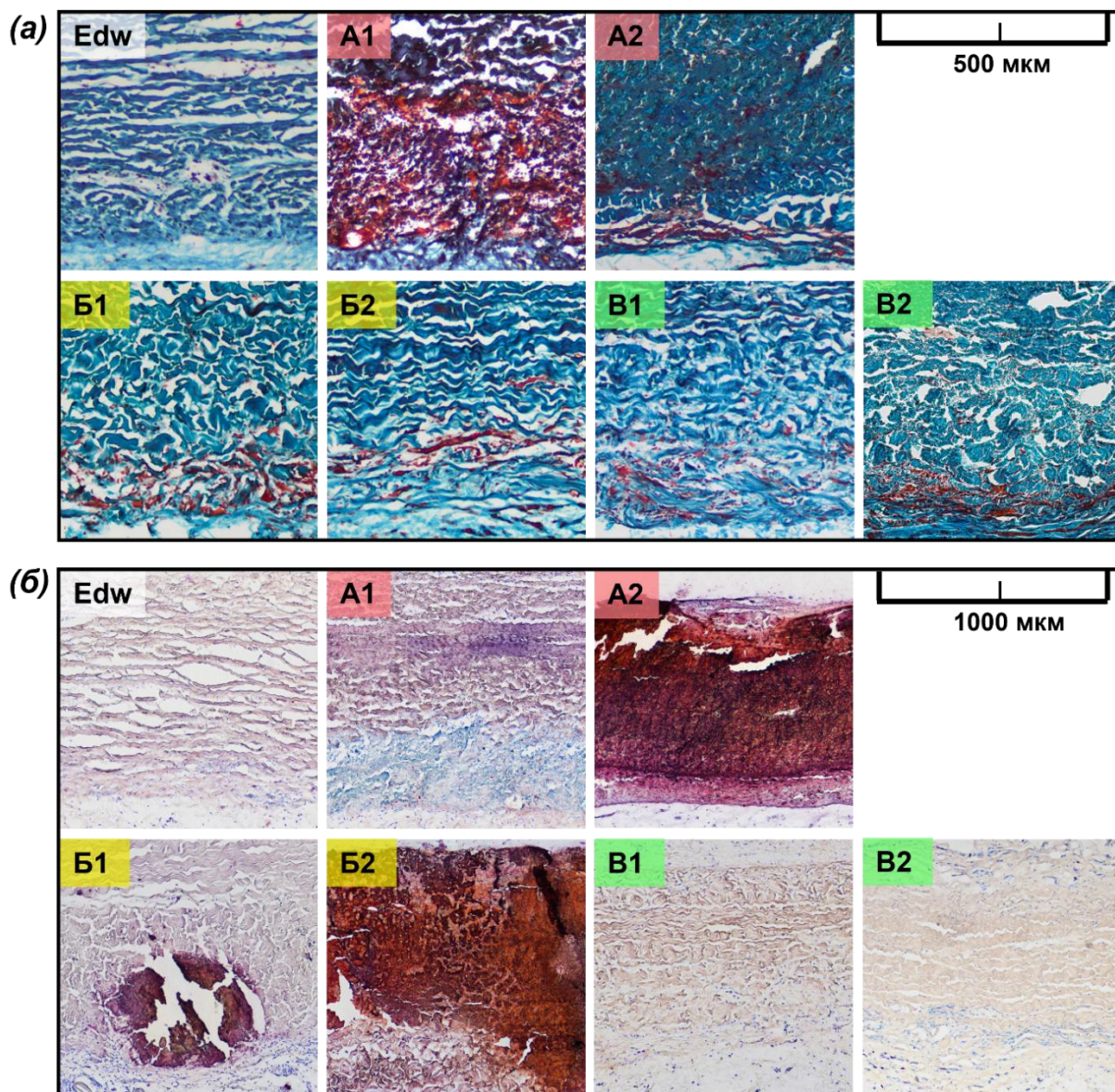


Рисунок 30 – Внеклеточный матрикс химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов после 24 недель гетеротопической имплантации: Световая микроскопия: (а) – окраска трихром по Лилли: collagen – сине-зеленый, ядра клеток – черно-коричневые, неколлагеновые компоненты – красно-малиновые; (б) окраска по МакГи-Расселу: соли кальция – темно-красные/красно-малиновые, ядра клеток – темно-синие, цитоплазма клеток и внецитоплазматические базофильные структуры дезорганизованного матрикса – голубой

В группе Б1 локально все еще сохранялся относительно высокий уровень пограничной лейкоцитарной инфильтрации при гораздо менее выраженной резорбции коллагенового матрикса. То есть хоть лейкоциты и продолжали мигрировать в пограничные зоны материала, они были неспособны утилизировать более глубокие слои матрикса. Кроме того, в областях активной миграции лейкоцитов обнаруживались единичные тучные клетки (Рисунок 31а). В срединной

толщи матрикса, как и после 8 недель имплантации, не наблюдалось мигрировавших клеток реципиента, однако в зонах пограничной инфильтрации наблюдались очаги локальной кальцификации материала. Необходимо отметить, что кальцификация матрикса была сравнительно слабой (сравнение далее), однако можно предполагать, что в дальнейшем процессы наблюдающегося начального патологического кальциноза образцов в организме будут только нарастать. При этом такие очаги кальциноза обнаруживались именно со стороны фиброзной поверхности, где на более ранних сроках имплантации в данной группе наблюдались активные клеточно-резорбтивные процессы (Рисунок 30б).

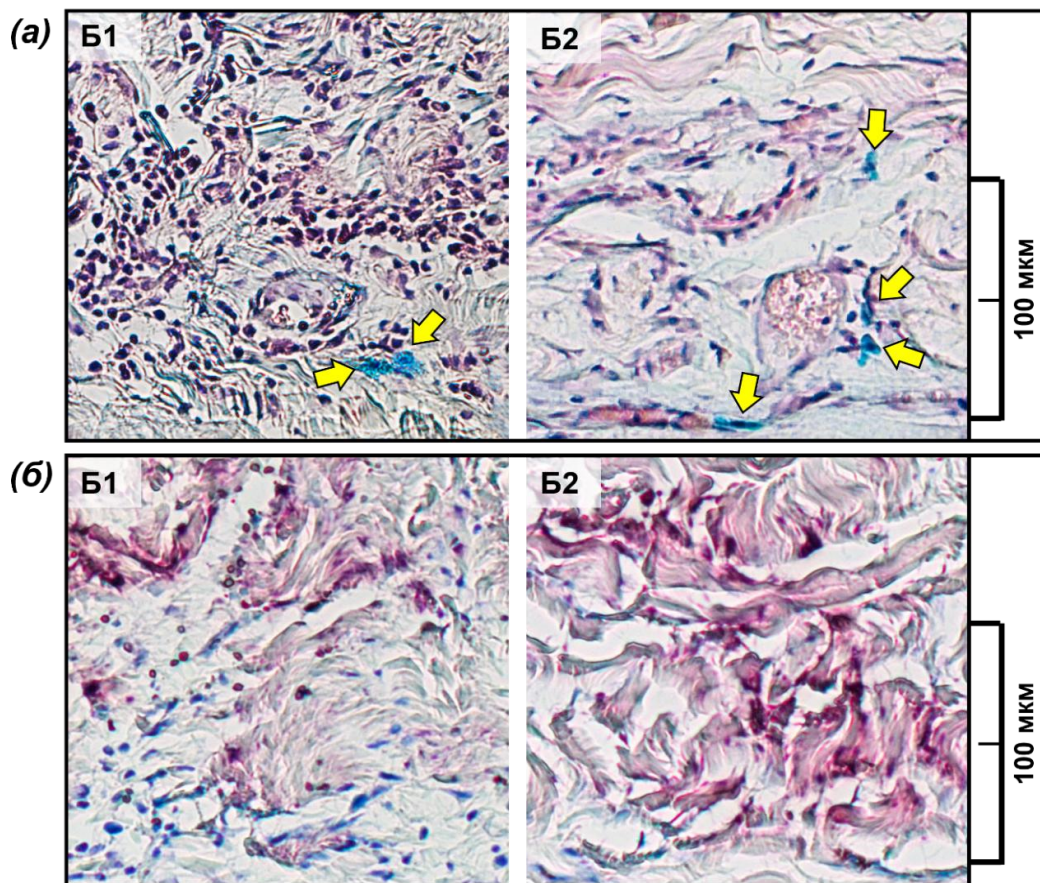


Рисунок 31 – Материалы групп Б1 и Б2 после 24 недель гетеротопической имплантации. Световая микроскопия: (а) – окраска альциановым синим-ШИК: ядра клеток – фиолетовые, кислые гликозаминогликаны и гранулы тучных клеток – голубые (желтые стрелки), нейтральные гликозаминогликаны – розовые; (б) – окраска по МакГи-Расселу: соли кальция – темно-красные/красно-малиновые, ядра клеток – темно-синие

Выраженный кальциноз наблюдался в материалах группы Б2, где обнаруживались как обширные области минерализации матрикса, распространяющиеся со стороны *p.fibrosum* (Рисунок 30б), так и мелкие ядра начальной минерализации, располагающиеся преимущественно у фиброзной поверхности и в небольшом количестве у серозной (Рисунок 31б). Ядра начальной минерализации были со-локализованы с участками клеточной инфильтрации, где в том числе обнаруживались тучные клетки (Рисунки 31а).

В группе А2 процессы кальцификации образцов стали еще более выраженными и охватывали до 90% всей площади материала (Рисунок 30б).

Необходимо отметить, что в образцах всех групп, подвергшихся минерализации (Б1 и Б2), кальциноз сопровождался интенсивным образованием кислых ГАГ в зонах кальциноза, что свидетельствует об остеогенно-подобном клеточном характере минерализации ВКМ материалов (Рисунок 32).

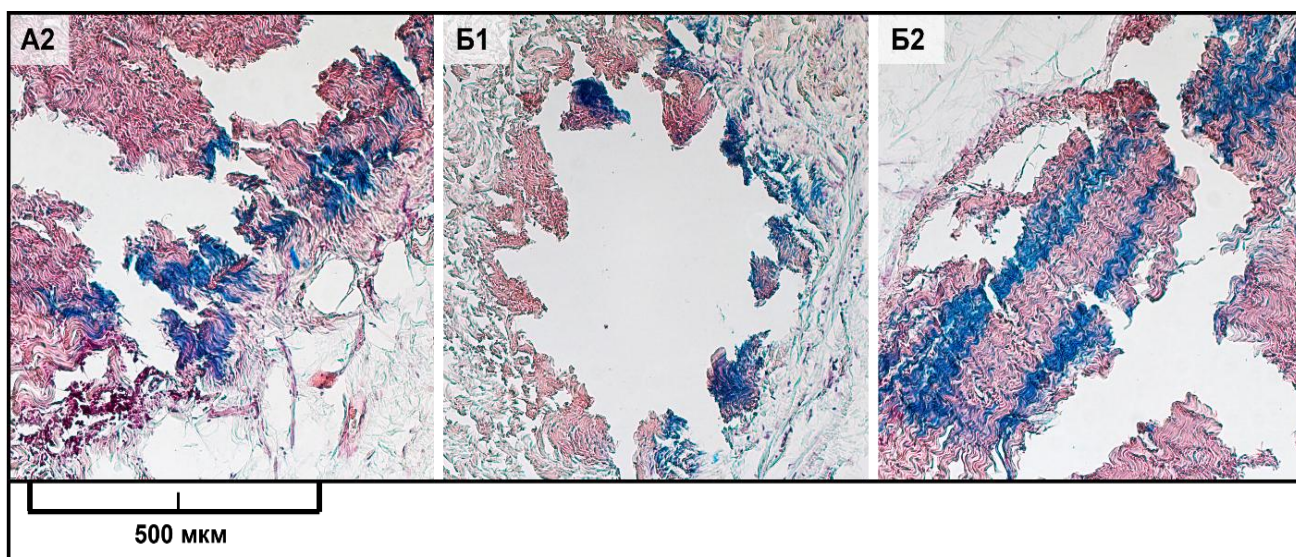


Рисунок 32 – увеличенные фрагменты кальцинированных участков химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов (группы А2, Б1 и Б2) после 24 недель гетеротопической имплантации: Световая микроскопия, окраска альциановым синим-ШИК: ядра клеток – фиолетовые, кислые гликозаминогликаны и гранулы тучных клеток – голубые, нейтральные гликозаминогликаны – розовые

В группе А1 наблюдались признаки наиболее выраженной среди всех исследованных групп дегенерации внеклеточного матрикса материалов, при этом процессы интенсивной утилизации материалов данной группы сопровождалась клеточно-опосредованными процессами. Из рисунка 33 видно, что почти треть материала резорбирована мигрировавшими лейкоцитоподобными клетками, и что данный процесс до сих пор крайне интенсивный, несмотря на длительные сроки имплантации. Это свидетельствует об интенсивном и усугубляющемся со временем процессе деградации фибриллярного матрикса, благодаря которому клетки могут утилизировать внеклеточный матрикс материала, минуя процесс промежуточной минерализации. При этом коллагеновые волокна пока еще не резорбированной части матрикса также утратили специфическое сродство к фибриллярным красителям (Рисунок 22).

Срединная часть матрикса была расслоена вследствие его обезвоживания и характеризовалась общим насыщением ионами кальция с более выраженной импрегнированностью кальциевым красителем некоторых волокон.

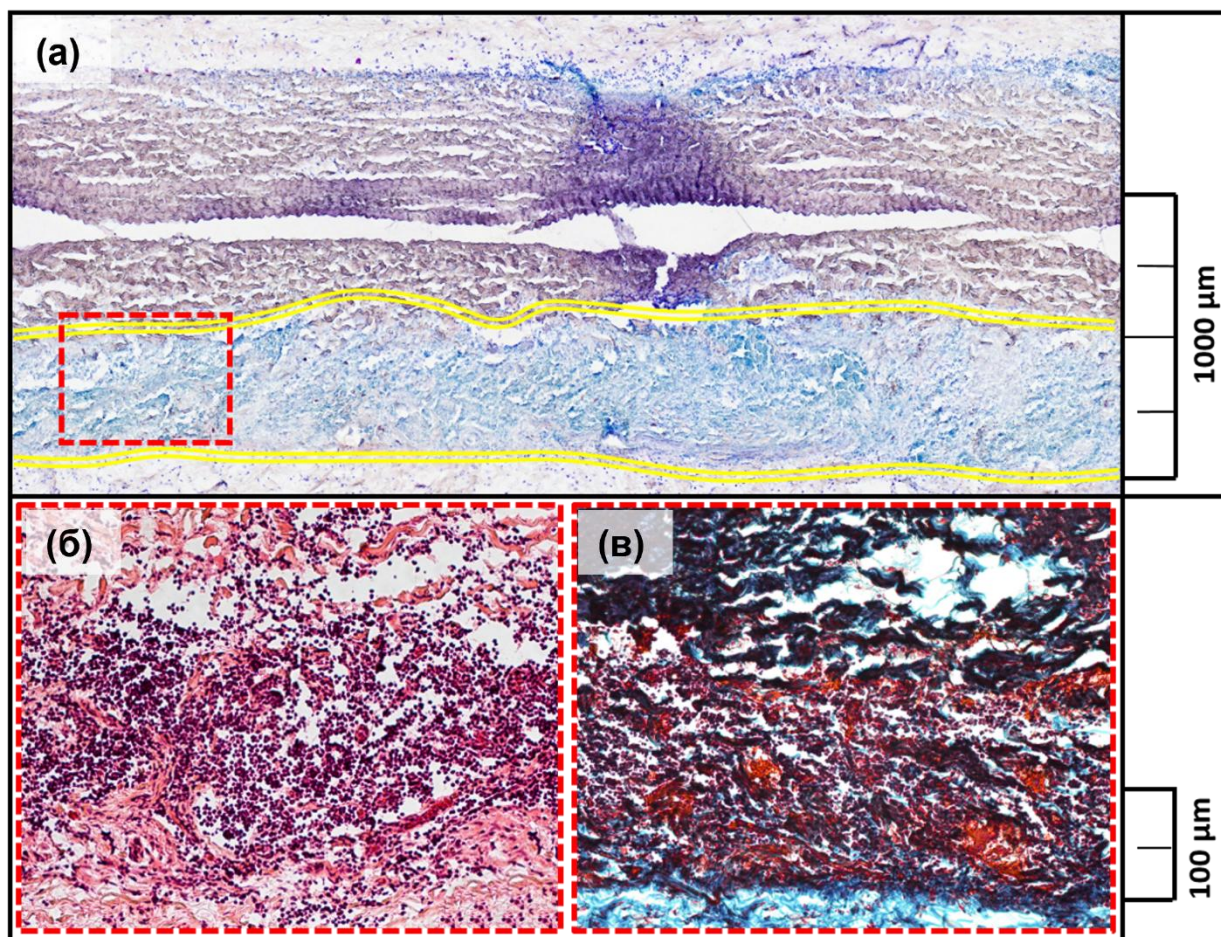


Рисунок 33 – Материалы группы A1 после 24 недель гетеротопической имплантации. Световая микроскопия: (а) – окраска по МакГи-Расселу: соли кальция – темно-красные/красно-малиновые, ядра клеток – темно-синие, цитоплазма клеток и внецитоплазматические базофильные структуры дезорганизованного матрикса – голубые; (б) – окраска Н&Е: ядра клеток – темно-фиолетовые, компоненты матрикса – розовые; (в) – окраска трихром по Лилли: collagen – сине-зеленый, ядра клеток – черно-коричневые, неколлагеновые компоненты – красно-малиновые

3.2.6 Результаты корреляционного анализа склонности химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов к активному кальцинозу в зависимости от способа предимплантационной обработки

Фактически на сегодняшний день патогенез кальцификации биопротезов клапанов сердца остается неясным. Однако за последнее десятилетие накапливается все больше данных, убедительно указывающих на решающее участие иммунного ответа в развитии активного кальциноза кардиохирургических материалов. Как указывалось ранее, основной причиной, провоцирующей развитие адаптивных иммунных реакций при имплантации биопротезов, считается наличие в биоматериале незамаскированных (нефиксированных) ксеноантигенов углеводной природы (α -Gal, Neu5Gc, Sd(a)). Результаты множества гистологических

исследований имплантированных биопротезов клапанов сердца показывают присутствие в них лейкоцитов, которые активно участвуют в утилизации коллагеновых волокон [2].

Проведенное автором исследование также указывает на ведущую роль иммунного ответа в развитии асептического кальциноза кардиохирургических биоматериалов. При этом наблюдается выраженная зависимость склонности материалов к кальцинозу от степени его повреждения при предимплантационной обработке.

В работе показано, что выраженные дегенеративные повреждения матрикса материалов, наблюдаемые в образцах групп Б1, Б2 и в первую очередь в А1, вызванные критическим обезвоживанием и повреждающим воздействием ДСН и спиртов, приводят к инициации процессов интенсивной резорбции ВКМ хсКПБ, сопровождающихся активной миграцией лейкоцитоподобных клеток. В то же время отсутствие какой-либо обработки, направленной на разрушение или маскировку углеводных антигенов для всех исследованных материалов, позволяет предположить, что наблюдаемый иммунный ответ в группах с установленным повреждением ВКМ развивался непосредственно на ассоциированные с повреждением молекулярные паттерны коллагеновых фибрилл (DAMP-ассоциированный иммунный ответ).

Данное предположение также подтверждают результаты корреляционного анализа, который показал высокую корреляционную связь между показателями миграции лейкоцитоподобных клеток и степенью повреждения матрикса материалов ($r_{xy} > 0,7$) (рисунок 34). Кроме того, корреляционная связь между показателями миграции лейкоцитоподобных клеток и цитотоксичностью хсКПБ также определялась как высокая.

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.

Существуют исследования, которые показывают, что остаточный ДСН способствует развитию воспаления, что говорит о потенциально более высоком провоспалительном потенциале материалов группы А1 и А2. Однако проведенное исследование показало, что кальцификации подвержены в том числе и материалы, обработанные без использования ДСН (группы Б1 и Б2), в то время как не все группы, обработанные ДСН, подверглись кальцинозу (группа А1). Полученные данные свидетельствуют о том, что провоспалительное повреждающее воздействие ДСН могло ускорить/усилить развитие кальцификации материалов группы А2, но не является первопричиной развития кальциноза.

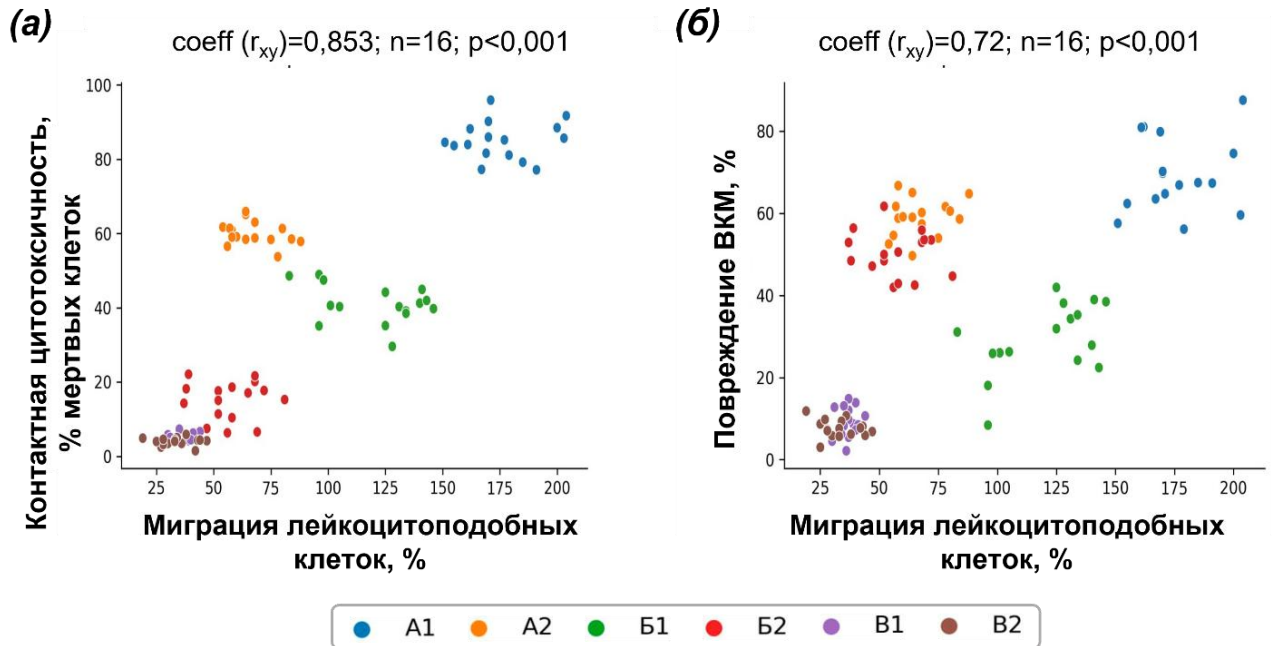


Рисунок 34 – Коэффициент ранговой корреляции Спирмена между показателями: (а) – контактной цитотоксичности экспериментальных биоматериалов в условиях их дополнительной отмывки и миграцией лейкоцитоподобных клеток в матрикс экспериментальных биоматериалов после 24 недель гетеротопической имплантации; (б) – общего повреждения экспериментальных биоматериалов после обработки и миграцией лейкоцитоподобных клеток в матрикс экспериментальных биоматериалов после 24 недель гетеротопической имплантации/ ВКМ – внеклеточный матрикс. Интерпретация коэффициента ранговой корреляции Спирмена: $r_{xy} < 0,3$ слабая; $r_{xy} 0,3 - 0,5$ умеренная; $r_{xy} 0,5 - 0,7$ заметная; $r_{xy} 0,7 - 0,9$ высокая; $r_{xy} > 0,9$ весьма высокая

Многие исследователи склоняются к предположению о том, что протеолитическая резорбция коллагеновых волокон биоматериалов в ходе иммунного ответа приводит к обнажению участков осаждения кальция на фибриллах, которые в свою очередь способствуют пассивному кальцинозу, развивающемуся параллельно активному [2].

В данном исследовании развитие асептического кальциноза поврежденных хсКПБ происходило на фоне снижения интенсификации клеточно-резорбтивных процессов (Таблица 9). Таким образом, наблюдаемые клеточно-резорбтивные процессы, предшествующие кальцинозу (особенно показательные для групп Б1 и Б2), свидетельствуют об утилизационном характере данного процесса, однако кальциноз развивается в том случае, когда прямая протеолитическая деградация матрикса затруднена.

Таким образом было показано, что в случае свободной миграции клеток во всю толщу внеклеточного матрикса, поврежденные области, не поддающиеся клеточной и протеолитической деградации, подвергаются интенсивной минерализации уже через 2 месяца имплантации, как это наблюдалось для группы А2. Вероятно использование формалина в составе консервирующего раствора данной группы оказало дополнительное стабилизирующее воздействие на основную

толщю матрикса образцов, из-за чего данный материал не мог быть утилизирован через клеточную резорбцию, минуя кальциноз. И напротив, в материалах группы B2, которые также активно репопуляризировались клетками реципиента на ранних сроках имплантации, признаки развития кальциноза отсутствовали, однако наблюдались признаки активной резорбции пограничных областей и даже очаги резорбции самой толщи матрикса. Однако на поздних сроках имплантации, та часть внеклеточного фибриллярного матрикса, что, по-видимому, сравнительно хорошо сохранилась и не могла быть напрямую утилизирована за счет протеолитической активности клеток, подвергалась промежуточной фазе кальцификации, предшествующей процессам интенсивной утилизации, но уже минерализованного фибриллярного матрикса. И наконец материалы контрольной группы A1, где даже после 6 месяцев имплантации наблюдалась деградация и клеточная резорбция ВКМ, не проявили никаких признаков кальциноза.

Таблица 9 – Сравнительный анализ резорбции и кальцификации химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов после 8 и 24 недель имплантации

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

Таким образом, можно сделать вывод, что кальциноз фиксированных ГА биоматериалов по активному механизму развивается через инициацию воспалительного ответа на поврежденный коллаген и только в том случае, когда утилизация поврежденных участков матрикса клетками напрямую за счет протеолитического лизиса затруднена или невозможна. При этом процесс отложения кальция в данном случае может протекать аналогично клеточной минерализации костной ткани. В то же время активная клеточная резорбция ВКМ исключает развитие кальциноза хсКПБ, вследствие чего группа A1 была исключена из дальнейшего корреляционного анализа.

Корреляционная связь между кальцификацией хсКПБ и их контактной цитотоксичностью определялась как высокая ($r_{xy} > 0,7$). Однако, детальное изучение данных, представленных на рисунке 35а, показывает, что материалы как с высокой, так и с низкой цитотоксичностью могут подвергаться интенсивному кальцинозу (группы A2 и B2). Вероятно, здесь имеет место вклад третьего параметра, который может влиять и на выживаемость клеток на материале и на кальцификацию. Таким параметром может быть степень повреждения ВКМ, для которой

корреляционная связь с показателем цитотоксичности определялась как высокая (Рисунок 35б), а с показателем кальцификации – как весьма высокая (Рисунок 35в).

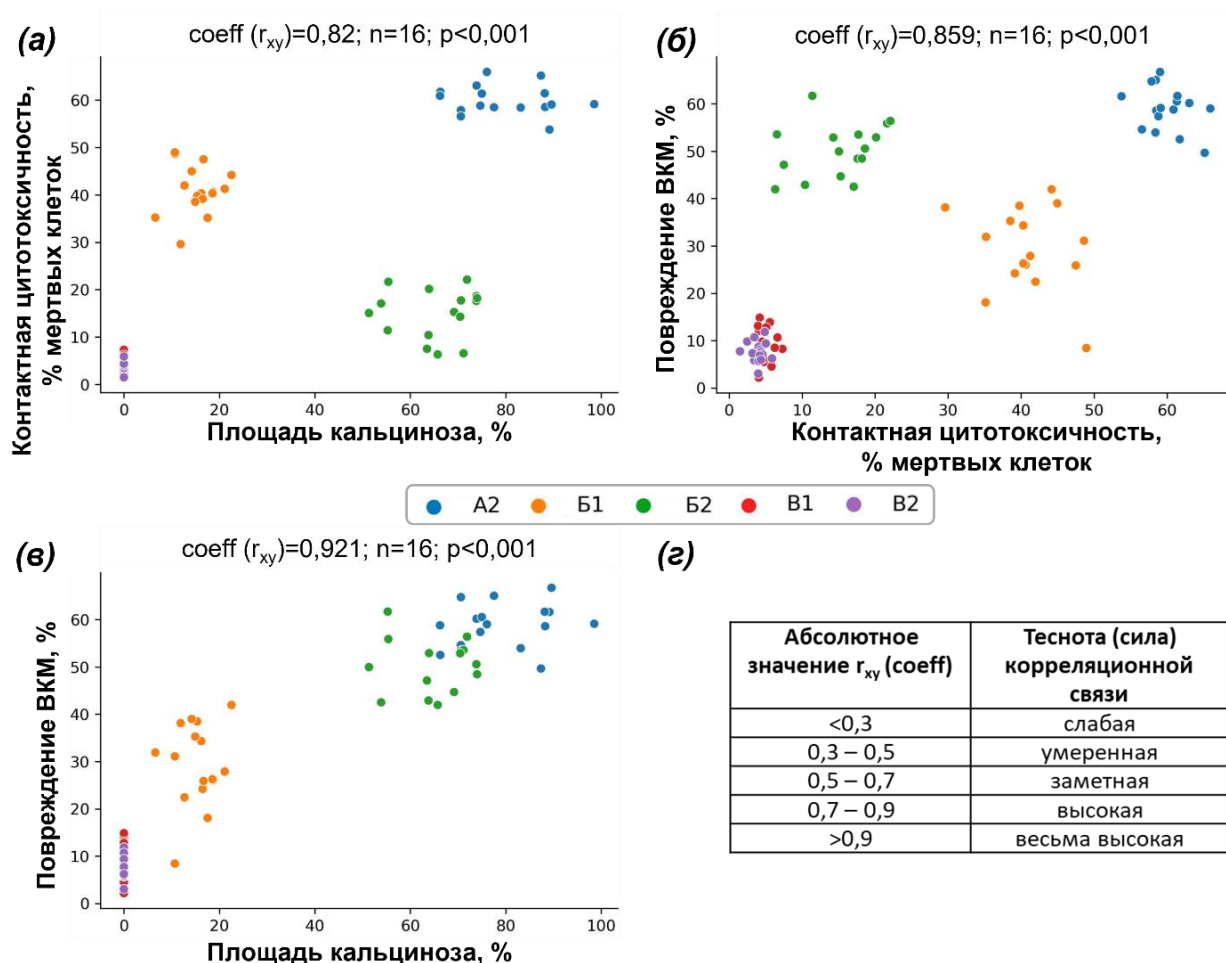


Рисунок 35 – Коэффициент ранговой корреляции Спирмена между показателями: (а) – контактной цитотоксичности экспериментальных биоматериалов в условиях их дополнительной отмывки и площадью кальцификации матрикса экспериментальных биоматериалов после 24 недель имплантации; (б) – общего повреждения экспериментальных биоматериалов после обработки и контактной цитотоксичностью экспериментальных биоматериалов в условиях их дополнительной отмывки; (в) – общего повреждения экспериментальных биоматериалов после обработки и площадью кальцификации матрикса экспериментальных биоматериалов после 24 недель имплантации; (г) – интерпретация коэффициента ранговой корреляции Спирмена/ ВКМ – внеклеточный матрикс

Исходя из вышесказанного можно предположить, что ассоциированная с ГА контактная цитотоксичность, в некоторых случаях может отсрочивать процесс кальцификации, вероятно, за счет ограничения доступа живых клеток к матриксу хсКПБ. Однако такое «протекторное» действие будет сохраняться лишь до момента полного вымывания цитотоксичных агентов из биоматериала, после чего процессы асептического кальциноза будут только нарастать. Такие поздние проявления кальциноза, наблюдаемые в начальной стадии развития даже после 24 недель имплантации (группа

Б1), указывают на необходимость проведения долгосрочных имплантаций для достоверной доклинической оценки кальцинозрезистентности кардиохирургических биоматериалов.

Таблица 10 – Степень повреждения химически стабилизированных ксеноперикардимальных биоматериалов в зависимости от их предимплантационной обработки

Группа	ХС	Дц	Отмывка	КХ	Поврежд. ср.знач.	Резорбция, %	Кальциноз, %
A1	0,625% ГА	1% ДСН	NaCl	ГА, ЭтС	69,4	49,2 ± 6,9	0
A2	0,5% ГА	1% ДСН	70% ИзС 90% ЭтС	ГА, ЭтС	59	10,4 ± 1,2	79,7 ± 9,3
Б1	0,2% ГА	Тр Х, ДХНм	35% ИзС	ГА, ЭтС	29,3	10,1 ± 2,1	15,3 ± 4
Б2	0,2% ГА	Тр Х, ДХНм	35% ИзС	Дн, ЭтС	50,2	12,8 ± 1,1	65,5 ± 7,5
В1	0,2% ГА	Тр Х, ДХНм	30% ЭтС	Дн, ЭтС	9	6,1 ± 1,4	0
В2	0,2% ГА	Тр Х, ДХНм	30% ЭтС	ГА, ЭтС	7,6	9,3 ± 1,1	0

ХС – химическая стабилизация; Дц – децеллюляризация; КХ – консервация и хранение; ГА – глутаровый альдегид; Тр Х – тритон Х-100; ДСН – додецилсульфат натрия; ДХНм – дезоксихолат натрия моногидрат; ИзС – изопропиловый спирт; ЭтС – этиловый спирт; Дн – диоксидин

Таким образом, можно сделать вывод что 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. При этом повреждение матрикса хсКПБ более чем на 60% инициирует развитие протеолитической утилизации и высокой клеточной активности, исключающей/тормозящей развитие кальциноза, а общее повреждение структуры хсКПБ более чем на 20 % приводит к развитию интенсивного кальциноза по активному (зависимому от клеток) механизму. При этом, незначительно поврежденные хсКПБ (менее чем на 10%) не подвергаются кальцинозу, т.е. являются кальциноз-резистентными (Таблица 10).

Однако, понимая, что поврежденный ВКМ сам по себе может связывать фосфаты кальция и способствовать развитию пассивного кальциноза хсКПБ, в дальнейшем проведено исследование влияния структурных изменений ВКМ на инициацию процессов независимого от клеток асептического кальциноза.

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

3.3.1 Изучение пассивного материал-зависимого кальциноза химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов в условиях *in vitro*

Поскольку для материалов групп А2, Б1 и Б2 была установлена склонность к развитию активного асептического кальциноза, данные группы были исключены из экспериментов по выявлению влияния структурных изменений ВКМ на инициацию процессов пассивного асептического кальциноза хсКПБ. В качестве контроля были исследованы образцы нативного перикарда (Н).

Для исследования процессов пассивного осаждения фосфатов кальция на коллагеновом матриксе использовалась модель длительной (40 сут) инкубации материалов в растворах, имитирующих условия нормокальциемии.

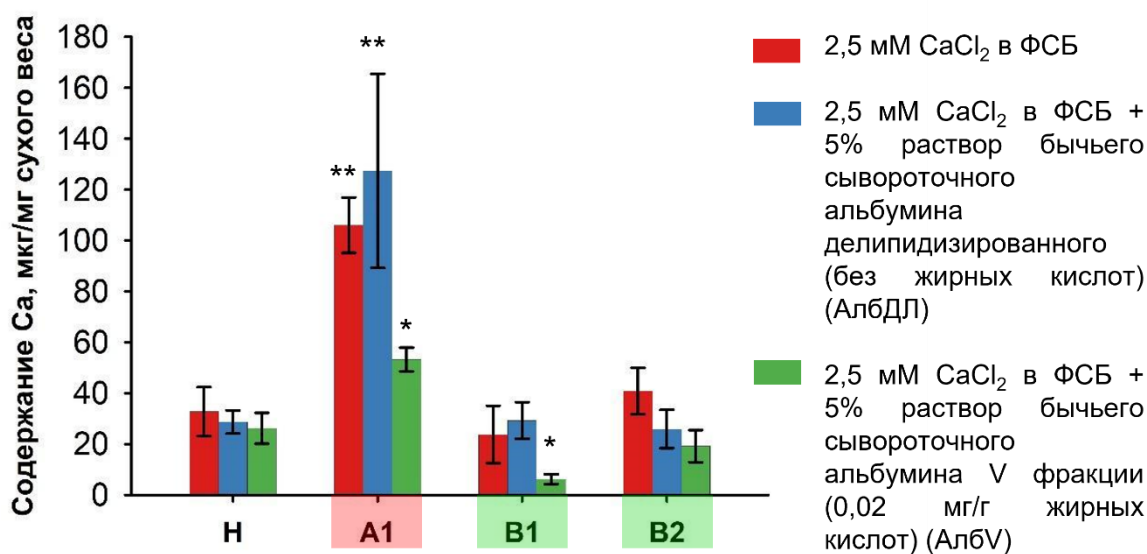


Рисунок 36 – Содержание минерализованного кальция в химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалах после 40 суток инкубации в растворах, имитирующих условия нормокальциемии: ФСБ – фосфатно-солевой буфер/ $n = 5$, $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,001$ относительно контроля (U-критерий Манна-Уитни)

Из рисунка 36 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 инкубации материалов в растворах ФСБ и ФСБ+АлбДЛ, уровень

содержания кальция для группы A1 превышал нативный контроль более чем в 3 раза. При этом содержание кальция в группах B1 и B2 значимо не отличалось от контроля.

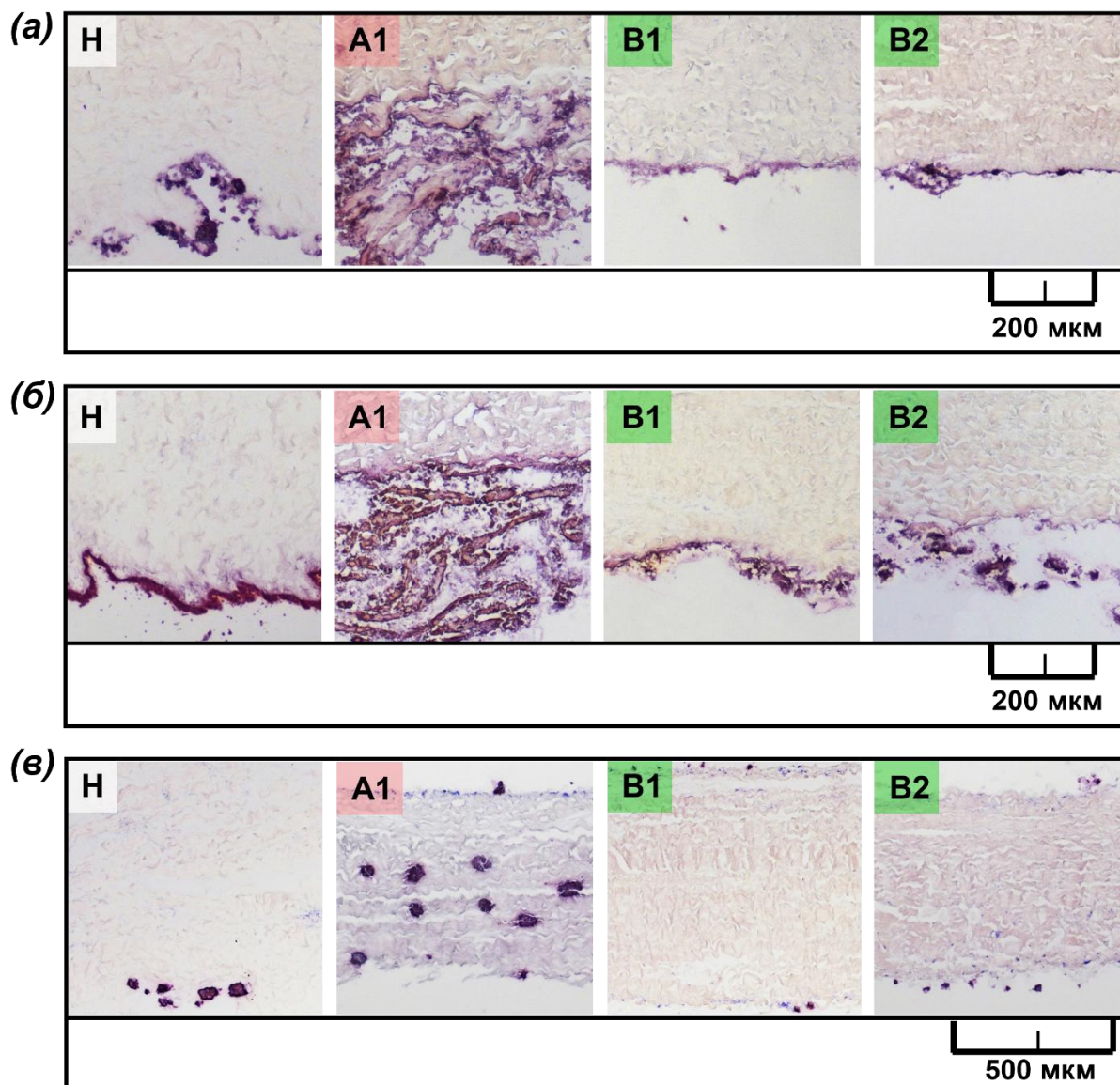


Рисунок 37 – Морфология депозитов кальция в химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалах после 40 суток инкубации в растворах, имитирующих условия нормокальциемии: Световая микроскопия, окраска по МакГи-Расселу: соли кальция – темно-красные/красно-малиновые: (а) – раствор 2,5 мМ CaCl_2 в фосфатно-солевом буфере; (б) – раствор 2,5 мМ CaCl_2 в фосфатно-солевом буфере + 5% раствор бычьего сывороточного альбумина делипидизированного (без жирных кислот); (в) – раствор 2,5 мМ CaCl_2 в фосфатно-солевом буфере + 5% раствор бычьего сывороточного альбумина V фракции (0,02 мг/г жирных кислот)

При проведении сравнительного анализа количественных результатов было выявлено, что в присутствии содержащего жирные кислоты альбумина степень кальцификации материалов всех групп снижалась, достоверная разница в снижении количества депонированного кальция на материалах наблюдалась для групп A1 и B1. При этом инкубация в растворе с обезжиренным

альбумином достоверной разницы в количестве депонированного кальция в сравнении с раствором без альбумина не показала.

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 37а, б).

После инкубации образцов в растворе, содержащем альбумин с содержанием жирных кислот, депозиты кальция на материалах располагались строго локально и в толще матрикса и имели специфическую концентрическую форму, характерную для метастатического кальциноза, наблюдаемого в кальцинированных биопротезах, извлеченных из системного кровотока (Рисунок 37в). 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.

3.3.2 Результаты корреляционного анализа склонности химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов к пассивному (независимому от клеток) кальцинозу в зависимости от способа предимплантационной обработки

Данный блок исследований подтверждает предположенный ранее пассивный механизм развития асептического кальциноза.

Наблюдаемое в исследовании пассивное осаждение кальция на поверхности материалов может объясняться также наличием в структуре материалов альдегидных групп. Результаты некоторых исследований показывают, что свободные альдегидные группы, в сочетании с циркулирующим кальцием и фосфолипидами приводят к пассивному процессу кальцификации [218]. Так, высокие показатели адсорбции кальция на материалах группы А1 могут быть обусловлены не только повреждением ВКМ, но и высокой концентрацией ГА, используемого для его обработки.

Особенно интересна роль альбумина в формировании и развитии пассивного кальциноза. Известно, что при имплантации хсКПБ происходит неспецифическая адсорбция белков плазмы крови на поверхности этих материалов. Так, например, исследования Шена, Карпентье и соавт.

показали, что содержание адсорбированных белков в тканях фиксированного перикарда после имплантации составило $108 \pm 12,7$ мкг/мг [229]. При этом ГА, как известно, повышает гидрофобность молекул коллагена [311], а гидрофобные поверхности побуждают адсорбированные белки разворачиваться и заставляют их обнажать свои обычно скрытые гидрофобные остатки и, таким образом, увеличивать экспозицию других сайтов связывания с белками [340]. Известно также, что альбумин играет решающую роль в транспорте различных ионов – как электрически нейтральных, так и заряженных молекул [341], включая те, которые необходимы для нормальной физиологической функции (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) [342]. В норме именно альбумин является важным переносчиком Ca^{2+} в плазме крови, однако сродство альбумина к связыванию Ca^{2+} относительно слабое (K_d 0,67 мМ, $K_a = 1,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$), и только около 45% из 2,4 мМ циркулирующего Ca^{2+} связывается с альбумином [343].

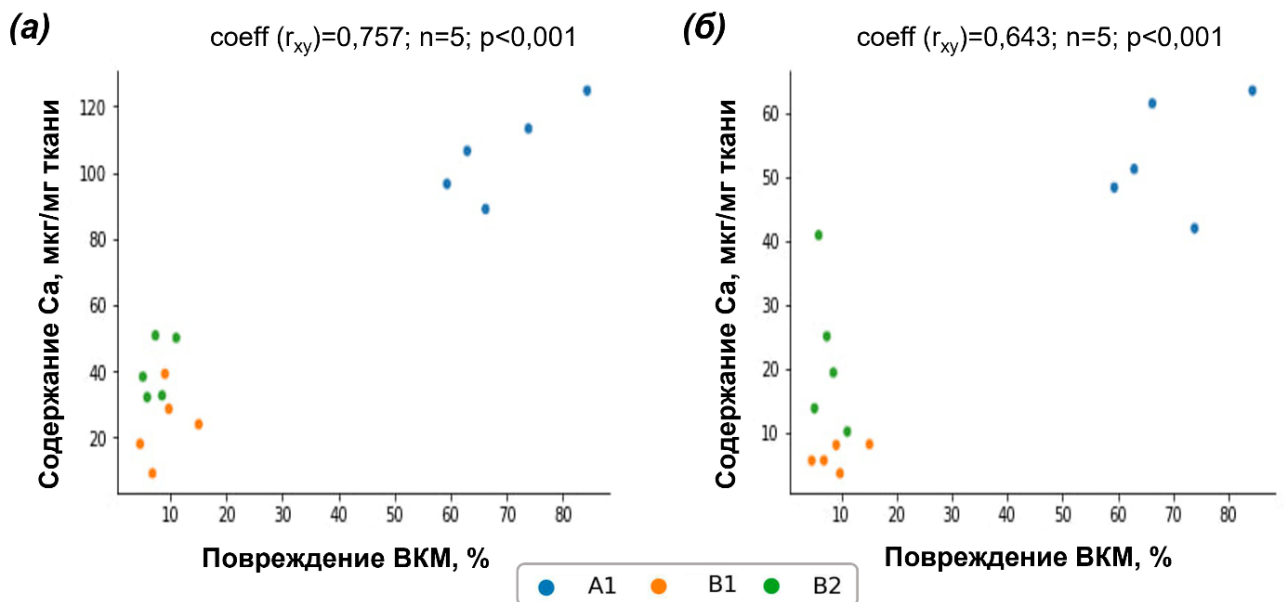


Рисунок 38 – Коэффициент ранговой корреляции Спирмена между показателями пассивной адсорбции кальция на матриксе химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов и степенью их повреждения в ходе предимплантационной обработки после 40 суток инкубации в растворе: (а) 2,5 мМ CaCl_2 в фосфатно-солевом буфере (б) 2,5 мМ CaCl_2 в фосфатно-солевом буфере и АлбV/ ВКМ – внеклеточный матрикс. Интерпретация коэффициента ранговой корреляции Спирмена: $r_{xy} < 0,3$ слабая; $r_{xy} 0,3 - 0,5$ умеренная; $r_{xy} 0,5 - 0,7$ заметная; $r_{xy} 0,7 - 0,9$ высокая; $r_{xy} > 0,9$ весьма высокая

Опираясь на работы, демонстрирующие важную роль как альбумина, так и жирных кислот в развитии пассивного кальциноза биоматериалов, в данном исследовании был использован раствор альбумина V фракции (АлбV), содержащего 0,02 мг/г жирных кислот [332, 333, 334, 335, 336]. Только в присутствии АлбV наблюдался метастатический тип кальцификации, наблюдаемый в клинической практике и в проведенном в данной работе исследовании *in vivo* (показательна группа Б2).

Жирные кислоты с длинной цепью могут существенно влиять на связывание лигандов с сайтами альбумина и вызывать аллостерические взаимодействия между этими сайтами посредством конформационных изменений молекул [344]. В свою очередь выявлено, что альбумин демонстрирует значительную степень конформационных изменений, связанных как с изменением концентрации кальция, так и концентрациями жирных кислот [345]. Учитывая тот факт, что фактически все три сайта связывания Ca^{2+} в альбумине локализованы в непосредственной близости от сайтов связывания жирных кислот, можно предположить, что связывание Ca^{2+} потенциально также может быть нарушено в присутствии жирных кислот [346].

Таким образом, можно сделать вывод, что неспецифическая адсорбция белка (альбумина) на поверхности материалов также 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 (Рисунок 38). Инкубация образцов хСКПБ в модельной среде с необезжиренным альбумином является достоверным способом оценки скрытых повреждений внеклеточного матрикса материалов и степени ассоциированного с ними пассивного асептического кальциноза. Кроме того, выявленная корреляция между степенью повреждения поверхности материала и интенсивностью его кальцификации (Рисунок 38) в сумме с полученными результатами кальцификации *in vivo* показывают, что как активный, так и пассивный кальциноз зависят от степени повреждения ВКМ материала в ходе его предимплантационной обработки.

3.4 Разработка способа предотвращения асептического кальциноза химически стабилизированных ксеноперикардальных биоматериалов

На основании полученных результатов был разработан матрикс-сберегающий способ предимплантационной обработки кардиохирургических материалов, позволяющий избегать всех выявленных агрессивных воздействий на ВКМ.

Исходя из всего вышесказанного, из авторского протокола предимплантационной обработки были исключены ДСН, изопропиловый спирт и этиловый спирт в концентрациях свыше 30%. Роль децеллюляризирующего и делипидизирующего агента выполнял дезоксихолат натрия моногидрат, обладающий выраженным липофильными свойствами и не оказывающий влияние на компоненты ВКМ.

В качестве консервирующего раствора был использован раствор диоксида в этиловом спирте и из состава раствора полностью исключены кросс-сшивающие агенты (ГА и формальдегид) ввиду их негативного влияния на биосовместимость и структуру ВКМ хСКПБ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании данных научной и патентной литературы выявлено, что альтернативы химически стабилизированным глутаральдегидом донорским биоматериалам для сердечно-сосудистой хирургии на сегодняшний день пока нет. При этом, более активное внедрение биопротезов в сердечно-сосудистую хирургию требует, чтобы используемые биоматериалы имели высокие прочностные характеристики, были способны выдерживать пожизненные гидродинамические нагрузки, а также обладали высокими антитромбогенными показателями, что как следствие требует способности материала к реэндотелизации. В этой связи, коллагеновые хсКПБ, обладающие природным сигналингом ВКМ для клеток реципиента и при этом высокими прочностными характеристиками и максимально удовлетворительными показателями тромбрезистентности (в сравнении с механическим протезами), в настоящее время являются материалом выбора для изготовления сердечно-сосудистых протезов. Однако проблема кальциноза и структурной дегенерации хсКПБ до сих пор не решена.

Представленные в работе результаты свидетельствуют, что в основе развития активного кальциноза хсКПБ лежит открытие паттернов повреждения молекул коллагена вследствие повреждающего воздействия реагентов в процессе предимплантационной обработки материалов, что в свою очередь инициирует развитие DAMP-ассоциированного иммунного ответа, направленного на утилизацию поврежденных компонентов матрикса клетками реципиента. При этом, на основании полученных результатов можно предполагать, что если прямая протеолитическая утилизация клетками отдельных участков фиксированного матрикса (недостаточно поврежденных) невозможна, инициируется промежуточная фаза кальцификации, предшествующая интенсивной утилизации минерализованного фибриллярного матрикса инородного тела остеокластоподобными клетками.

1. Обнаружена высокая степень корреляционной зависимости показателей клеточной миграции лейкоцитоподобных клеток ($r_{xy} > 0,72$) *in vivo* со степенью повреждения внеклеточного матрикса хсКПБ.

2. Обнаружена заметная корреляционная зависимость ($r_{xy} > 0,594$) показателей резорбции материала со степенью активного (зависимого от клеток) кальциноза хсКПБ.

3. Наибольшая степень корреляционной зависимости ($r_{xy} > 0,921$) обнаружена для показателей активного (зависимого от клеток) кальциноза со степенью повреждения внеклеточного матрикса хсКПБ.

Уже на протяжении многих лет обсуждается роль цитотоксичности ГА в процессах кальциноза. При этом существуют исследования, которые экспериментально доказывают усиление кальцификации хсКПБ, фиксированных ГА, что объясняется гибелью клеток реципиента при контакте с цитотоксичным материалом и формированием ядер минерализации на клеточном дебрисе. Одновременно с этим, существуют исследования, указывающие на протекторное свойство цитотоксического воздействия ГА, которое перекрывает доступ клеткам реципиента к матриксу хсКПБ, тем самым замедляя развитие асептического кальциноза. Благодаря использованию длительных сроков имплантации, в работе показано, что высокая токсичность ГА может задерживать кальцификацию, ингибируя развития кальциноза на ранних сроках имплантации. В то же время, несмотря на такую задержку, кальцификация поврежденных материалов все равно происходит на более поздних сроках имплантации. При этом динамика изменения цитотоксичности имплантированных материалов, не связана с концентрацией используемого ГА, а связана со степенью повреждения матрикса биоматериала и скоростью вымывания из него токсичных веществ.

1. Обнаружена высокая степень корреляционной зависимости показателей клеточной миграции лейкоцитоподобных клеток ($r_{xy} > 0,853$) *in vivo* со степенью контактной цитотоксичности материалов *in vitro*.

2. Наибольшая степень корреляционной зависимости ($r_{xy} > 0,859$) обнаружена между показателями повреждения внеклеточного матрикса хсКПБ и контактной цитотоксичности материалов *in vitro*.

3. Наибольшая степень корреляционной зависимости ($r_{xy} > 0,82$) обнаружена между показателями кальциноза хсКПБ *in vivo* и контактной цитотоксичности материалов *in vitro*.

Также в работе показан вклад пассивных механизмов в развитие кальциноза хсКПБ. Как предполагается во многих исследовательских работах, в основе развития пассивного кальциноза лежит повреждение коллагенового матрикса и ГАГ хсКПБ, что приводит к открытию кальций-связывающих доменов на поверхности коллагеновых фибрилл. Однако, в данной работе показано, что неспецифическая адсорбция белка (альбумина, содержащего жирные кислоты) на поверхности материалов также вносит вклад в развитие пассивных механизмов кальциноза посредством образования ядер кальцификации комплекса «альбумин–кальций–жирные кислоты». Кроме того, интенсивность пассивной минерализации хсКПБ в присутствии альбумина, содержащего жирные кислоты также зависит от степени повреждения ВКМ.

1. Обнаружена высокая степень корреляционной зависимости ($r_{xy} > 0,757$) показателей повреждения и пассивной адсорбции кальция на хсКПБ в растворе ФСБ.

2. Обнаружена умеренная степень корреляционной зависимости ($r_{xy} > 0,436$) показателей повреждения и пассивной адсорбции кальция на хсКПБ в растворе ФСБ+АлбДЛ.

3. Обнаружена заметная степень корреляционной зависимости ($r_{xy} > 0,643$) показателей повреждения и пассивной адсорбции кальция на хсКПБ в растворе ФСБ+АлбV.

Таким образом, интенсивность развития процессов асептического кальциноза как по активному, так и по пассивному механизму зависит от степени сохранности ВКМ хсКПБ. Более того, оба этих механизма взаимосвязаны, образуя замкнутую последовательность событий, взаимно усиливающих друг друга и кальцификацию материалов.

Суммируя вышесказанное можно заключить, что современные исследования и разработки, направленные на подавление кальциноза БКС, значительно усложняют предварительную обработку хсКПБ за счет добавления в нее дополнительных этапов, включающих использование сложных многоэтапных реакций и дорогостоящих реактивов. В проведенной работе наглядно показано, что использование мягких методов предимплантационной обработки хсКПБ, обеспечивающих максимальное сохранение интактности ВКМ перикарда, радикально повышает устойчивость биоматериалов как к активному, так и пассивному кальцинозу.

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 УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ACC - Американский колледж кардиологии с англ. American College of Cardiology;
АНА - Американская кардиологическая ассоциация с англ. American Heart Association;
EACTS - Европейская ассоциация кардиоторакальной хирургии с англ. European Association for Cardio-Thoracic Surgery;
ESC - Европейское общество кардиологии с англ. European Society of Cardiology;
HRP – пероксидаза хрена;
MI – митотический индекс;
Neu5Gc - N-гликолилнейраминная кислота;
NF-κB - ядерный фактор «каппа-би»;
NIH/3T3 – клеточная линия эмбриональных фибробластов мыши;
N-ГС - N-гидроксисукцинимид;
PI3K – внутриклеточный сигнальный путь, центральными компонентами которого являются фермент фосфоинозитид-3-киназа;
RGD - аргинилглициласпарагиновая кислота;
Sd(a) – антиген группы крови «Sid»;
TGF-β - трансформирующий фактор роста бета;
TNF-α - фактор некроза опухоли;
α-Gal - альфа-галактозидаза;
АлбV – альбумин V фракции (содержит 0,02мг/г жирных кислот);
АлбДЛ – альбумин делипидизированный (без жирных кислот);
АОА - аминоолеиновая кислота;
АпоВ - аполипопротеин В;
АТФ – аденозинтрифосфат;
АТФ-аза – аденозинтрифосфатаза;
АФА – активные формы азота;
АФК – активные формы кислорода;
БКС – биопротез клапана сердца;
ВКМ – внеклеточный матрикс;
ГА – глутаровый альдегид;
ГАГ – гликозаминогликан;
ГМК – гладкомышечные клетки
ДГЭЭ - диглицидиловый эфир этиленгликоля;
Дн – диоксидин;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
ДСН – додецилсульфат натрия;
ДХН – дезоксихолат натрия;
ДХНм – дезоксихолат натрия моногидрат;
ИзС – изопропиловый спирт;
ИЛ – интерлейкин;
ЛПВП – липопротеин высокой плотности;
ЛПНП - липопротеин низкой плотности;
Лп-ФЛА2 - липопротеин-ассоциированная фосфолипаза А2;
ММП – матриксная металлопротеиназа;
ок-ЛПНП - окисленный липопротеин низкой плотности;
пГА – полимеризованный глутаровый альдегид;
ПО – пропиленоксид;
ПТИ - протромбиновый индекс;
РНК - рибонуклеиновая кислота;
СКД – структурная клапанная дегенерация;
ССХ – сердечно-сосудистая хирургия;
ТрХ – тритон X100;
УФ-лучи – ультрафиолетовые лучи;
ФА – формальдегид;
ФВ - фактор Виллебранда;
ФСБ – фосфатно-солевой буфер;
хсКПБ – химически стабилизированный ксеноперикардальный биоматериал;
ШИК реакция – реакция Шифф-йодной кислотой;
ЭГТА - этиленгликольтетрауксусная кислота;
ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота;
ЭтС – этиловый спирт.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Naso, F. Different approaches to heart valve decellularization: A comprehensive overview of the past 30 years / F. Naso, A. Gandaglia // *Xenotransplantation*. – 2018. – Т. 25. – Different approaches to heart valve decellularization. – № 1.
2. Mechanisms and Drug Therapies of Bioprosthetic Heart Valve Calcification / S. Wen, Y. Zhou, W. Y. Yim [и др.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2022. – Т. 13. – С. 909801.
3. Prosthetic Aortic Valves: Challenges and Solutions / L. Musumeci, N. Jacques, A. Hego [и др.] // *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. – 2018. – Т. 5. – Prosthetic Aortic Valves. – С. 46.
4. Degeneration of Bioprosthetic Heart Valves: Update 2020 / A. E. Kostyunin, A. E. Yuzhalin, M. A. Rezvova [и др.] // *Journal of the American Heart Association*. – 2020. – Т. 9. – Degeneration of Bioprosthetic Heart Valves. – № 19. – С. e018506.
5. Head, S. J. Mechanical versus bioprosthetic aortic valve replacement / S. J. Head, M. Çelik, A. P. Kappetein // *European Heart Journal*. – 2017. – Т. 38. – № 28. – С. 2183-2191.
6. Fifteen-year experience with 1678 Hancock porcine bioprosthetic heart valve replacements / L. H. Cohn, J. J. Collins, V. J. DiSesa [и др.] // *Annals of Surgery*. – 1989. – Т. 210. – № 4. – С. 435-442; 442-443.
7. Biological factors affecting long-term results of valvular heterografts / A. Carpentier, G. Lemaigre, L. Robert [и др.] // *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. – 1969. – Т. 58. – № 4. – С. 467-483.
8. Noncalcific Mechanisms of Bioprosthetic Structural Valve Degeneration / M. Marro, A. P. Kossar, Y. Xue [и др.] // *Journal of the American Heart Association*. – 2021. – Т. 10. – № 3. – С. e018921.
9. Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012) The Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) / A. Vahanian, O. Alfieri, F. Andreotti [и др.] // *Giornale italiano di cardiologia* (2006). – 2013. – Т. 14. – С. 167-214.
10. 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease / H. Baumgartner, V. Falk, J. J. Bax [и др.] // *European Heart Journal*. – 2017. – Т. 38. – № 36. – С. 2739-2791.
11. 2017 AHA/ACC Focused Update of the 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines / R. A. Nishimura, C. M. Otto, R. O. Bonow [и др.] // *Circulation*. – 2017. – Т. 135. – 2017 AHA/ACC Focused Update of the 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease. – № 25. – С. e1159-e1195.

12. Standardized Definition of Structural Valve Degeneration for Surgical and Transcatheter Bioprosthetic Aortic Valves / D. Dvir, T. Bourguignon, C. M. Otto [и др.] // *Circulation*. – 2018. – Т. 137. – № 4. – С. 388-399.
13. Siddiqui, R. F. Bioprosthetic heart valves: modes of failure / R. F. Siddiqui, J. R. Abraham, J. Butany // *Histopathology*. – 2009. – Т. 55. – Bioprosthetic heart valves. – № 2. – С. 135-144.
14. Modes of bioprosthetic valve failure: a narrative review / A. Koziarz, A. Makhdoum, J. Butany [и др.] // *Current Opinion in Cardiology*. – 2020. – Т. 35. – Modes of bioprosthetic valve failure. – № 2. – С. 123-132.
15. Aortic valve surgery: marked increases in volume and significant decreases in mechanical valve use--an analysis of 41,227 patients over 5 years from the Society for Cardiothoracic Surgery in Great Britain and Ireland National database / J. Dunning, H. Gao, J. Chambers [и др.] // *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. – 2011. – Т. 142. – Aortic valve surgery. – № 4. – С. 776-782.e3.
16. National trends in utilization and in-hospital outcomes of mechanical versus bioprosthetic aortic valve replacements / A. J. Isaacs, J. Shuhaiber, A. Salemi [и др.] // *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. – 2015. – Т. 149. – № 5. – С. 1262-1269.e3.
17. Trends and outcomes of valve surgery: 16-year results of Netherlands Cardiac Surgery National Database / S. Siregar, F. de Heer, R. H. H. Groenwold [и др.] // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery*. – 2014. – Т. 46. – Trends and outcomes of valve surgery. – № 3. – С. 386-397; discussion 397.
18. Non-inferiority study design: lessons to be learned from cardiovascular trials / S. J. Head, S. Kaul, A. J. J. C. Bogers, A. P. Kappetein // *European Heart Journal*. – 2012. – Т. 33. – Non-inferiority study design. – № 11. – С. 1318-1324.
19. A meta-analysis of randomized trials comparing bovine pericardium and other patch materials for carotid endarterectomy / P. Texakalidis, S. Giannopoulos, N. Charisis [и др.] // *Journal of Vascular Surgery*. – 2018. – Т. 68. – № 4. – С. 1241-1256.e1.
20. Bovine pericardial extracellular matrix niche modulates human aortic endothelial cell phenotype and function / J. Shklover, J. McMasters, A. Alfonso-Garcia [и др.] // *Scientific Reports*. – 2019. – Т. 9. – № 1. – С. 16688.
21. Saccular Superior Vena Cava Aneurysm: Case Report and Comprehensive Review / M. M. Morales, A. Anacleto, J. C. Ferreira Leal [и др.] // *Annals of Vascular Surgery*. – 2021. – Т. 72. – Saccular Superior Vena Cava Aneurysm. – С. 666.e23-666.e32.
22. Long-Term Stability and Biocompatibility of Pericardial Bioprosthetic Heart Valves / D. F. Williams, D. Bezuidenhout, J. de Villiers [и др.] // *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. – 2021. – Т. 8. – С. 728577.

23. Фадеева, И. С. Роль клеток реципиента и нарушения структуры тканевого матрикса в механизме кальцификации трансплантатов сосудов и клапанов сердца : дис. ...канд. биол. наук: 03.03.01 / И. С. Фадеева; Ин-т теорет. и эксперим. биофизики РАН – Пущино, 2013. – 158 с.
24. Звягина, А. И. Исследование биоинтеграции перикардимальных ограничительных мембран для направленной регенерации тканей : Маг.дисс.: 06.04.01 / А. И. Звягина; Пущинский государственный естественно-научный ин-т. – Пущино, 2018. - 75 с.
25. Molecular assessment of collagen denaturation in decellularized tissues using a collagen hybridizing peptide / J. Hwang, B. H. San, N. J. Turner [и др.] // *Acta Biomaterialia*. – 2017. – Т. 53. – С. 268-278.
26. The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds / J. E. Reing, B. N. Brown, K. A. Daly [и др.] // *Biomaterials*. – 2010. – Т. 31. – № 33. – С. 8626-8633.
27. Immunogenicity of decellularized extracellular matrix scaffolds: a bottleneck in tissue engineering and regenerative medicine / M. Kasravi, A. Ahmadi, A. Babajani [и др.] // *Biomaterials Research*. – 2023. – Т. 27. – Immunogenicity of decellularized extracellular matrix scaffolds. – № 1. – С. 10.
28. The quest for an optimized protocol for whole-heart decellularization: a comparison of three popular and a novel decellularization technique and their diverse effects on crucial extracellular matrix qualities / P. Akhyari, H. Aubin, P. Gwanmesia [и др.] // *Tissue Engineering. Part C, Methods*. – 2011. – Т. 17. – The quest for an optimized protocol for whole-heart decellularization. – № 9. – С. 915-926.
29. Tissue-Specific Decellularization Methods: Rationale and Strategies to Achieve Regenerative Compounds / U. Mendibil, R. Ruiz-Hernandez, S. Retegi-Carrion [и др.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Т. 21. – Tissue-Specific Decellularization Methods. – № 15. – С. 5447.
30. Surgical aortic valve replacement in patients aged 50-69 years-insights from the German Aortic Valve Registry (GARY) / F. Vogt, G. Santarpino, B. Fujita [и др.] // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery*. – 2022. – Т. 62. – № 1. – С. 286.
31. 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease / A. Vahanian, F. Beyersdorf, F. Praz [и др.] // *European Heart Journal*. – 2022. – Т. 43. – № 7. – С. 561-632.
32. Edwards, W. S. Aortic valve replacement with a subcoronary ball valve / W. S. Edwards, L. Smith // *Surgical Forum*. – 1958. – Т. 9. – С. 309-313.
33. Aortic valve replacement in patients 80 years and older. Operative risks and long-term results / M. A. Elayda, R. J. Hall, R. M. Reul [и др.] // *Circulation*. – 1993. – Т. 88. – № 5 Pt 2. – С. II11-16.
34. Rostagno, C. Heart valve disease in elderly / C. Rostagno // *World Journal of Cardiology*. – 2019. – Т. 11. – № 2. – С. 71-83.

35. Prosthetic Heart Valve Thrombosis / G. D. Dangas, J. I. Weitz, G. Giustino [и др.] // Journal of the American College of Cardiology. – 2016. – Т. 68. – № 24. – С. 2670-2689.
36. Outlet strut fracture of Björk-Shiley convexo-concave valves: can valve-manufacturing characteristics explain the risk? / R. Z. Omar, L. S. Morton, M. Beirne [и др.] // The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. – 2001. – Т. 121. – Outlet strut fracture of Björk-Shiley convexo-concave valves. – № 6. – С. 1143-1149.
37. Prosthetic heart valves: catering for the few / P. Zilla, J. Brink, P. Human, D. Bezuidenhout // Biomaterials. – 2008. – Т. 29. – Prosthetic heart valves. – № 4. – С. 385-406.
38. Scherman, J. Poorly suited heart valve prostheses heighten the plight of patients with rheumatic heart disease / J. Scherman, P. Zilla // International Journal of Cardiology. – 2020. – Т. 318. – С. 104-114.
39. Pibarot, P. Prosthetic heart valves: selection of the optimal prosthesis and long-term management / P. Pibarot, J. G. Dumesnil // Circulation. – 2009. – Т. 119. – Prosthetic heart valves. – № 7. – С. 1034-1048.
40. Ross, D. N. Homograft replacement of the aortic valve / D. N. Ross // Lancet (London, England). – 1962. – Т. 2. – № 7254. – С. 487.
41. Survival comparison of the Ross procedure and mechanical valve replacement with optimal self-management anticoagulation therapy: propensity-matched cohort study / M. M. Mokhles, H. Kortke, U. Stierle [и др.] // Circulation. – 2011. – Т. 123. – № 1. – С. 31-38.
42. David, T. E. An aortic valve-sparing operation for patients with aortic incompetence and aneurysm of the ascending aorta / T. E. David, C. M. Feindel // The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. – 1992. – Т. 103. – № 4. – С. 617-621; discussion 622.
43. Late results of a valve-preserving operation in patients with aneurysms of the ascending aorta and root / M. H. Yacoub, P. Gehle, V. Chandrasekaran [и др.] // The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. – 1998. – Т. 115. – № 5. – С. 1080-1090.
44. Cribier, A. The development of transcatheter aortic valve replacement (TAVR) / A. Cribier // Global Cardiology Science & Practice. – 2016. – Т. 2016. – № 4. – С. e201632.
45. Figulla, H. R. The History of Transcatheter Aortic Valve Implantation (TAVI)-A Personal View Over 25 Years of development / H. R. Figulla, M. Franz, A. Lauten // Cardiovascular Revascularization Medicine: Including Molecular Interventions. – 2020. – Т. 21. – № 3. – С. 398-403.
46. Bovine pericardium for portal vein reconstruction in abdominal surgery: a surgical guide and first experiences in a single center / M. Jara, M. Malinowski, M. Bahra [и др.] // Digestive Surgery. – 2015. – Т. 32. – Bovine pericardium for portal vein reconstruction in abdominal surgery. – № 2. – С. 135-141.
47. Sotiropoulos, F. Fluid Mechanics of Heart Valves and Their Replacements | Annual Reviews / F. Sotiropoulos, T. B. Le, A. Gilmanov. – 2016. – Т. 48. – С. 259-283.

48. Roudaut, R. Thrombosis of prosthetic heart valves: diagnosis and therapeutic considerations / R. Roudaut, K. Serri, S. Lafitte // Heart (British Cardiac Society). – 2007. – Т. 93. – Thrombosis of prosthetic heart valves. – № 1. – С. 137-142.
49. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients / P. Simon, M. T. Kasimir, G. Seebacher [и др.] // European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery. – 2003. – Т. 23. – № 6. – С. 1002-1006; discussion 1006.
50. Chikwe, J. Age cutoffs for bioprosthetic vs mechanical aortic valve replacement--reply / J. Chikwe, N. N. Egorova, D. H. Adams // JAMA. – 2015. – Т. 313. – № 5. – С. 523-524.
51. Better anticoagulation control improves survival after valve replacement / E. G. Butchart, N. Payne, H.-H. Li [и др.] // The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. – 2002. – Т. 123. – № 4. – С. 715-723.
52. Telemedicine-guided, very low-dose international normalized ratio self-control in patients with mechanical heart valve implants / H. Koertke, A. Zittermann, O. Wagner [и др.]. – 2014. – Т. 36. – № 21. – С. 1297-1305.
53. Leaflet escape in a new bileaflet mechanical valve: TRI technologies / T. Bottio, D. Casarotto, G. Thiene [и др.] // Circulation. – 2003. – Т. 107. – Leaflet escape in a new bileaflet mechanical valve. – № 18. – С. 2303-2306.
54. Guidelines for reporting mortality and morbidity after cardiac valve interventions / C. W. Akins, D. C. Miller, M. I. Turina [и др.] // The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. – 2008. – Т. 135. – № 4. – С. 732-738.
55. Allograft Heart Valves: Current Aspects and Future Applications / M. Lisy, G. Kalender, K. Schenke-Layland [и др.] // Biopreservation and Biobanking. – 2017. – Т. 15. – Allograft Heart Valves. – № 2. – С. 148-157.
56. Ross Procedure in Adults for Cardiologists and Cardiac Surgeons: JACC State-of-the-Art Review / A. Mazine, I. El-Hamamsy, S. Verma [и др.] // Journal of the American College of Cardiology. – 2018. – Т. 72. – Ross Procedure in Adults for Cardiologists and Cardiac Surgeons. – № 22. – С. 2761-2777.
57. Искусственные клапаны сердца / П. И. Орловский, В. В. Гриценко, А. Д. Юхнев, [и др.]. – Под редакцией академика РАМН Ю.Л. Шевченко. – Санкт-Петербург : ЗАО «ОЛМА Медиа Групп», 2007. – 448 с.
58. Carpentier-Edwards supraannular porcine bioprosthesis evaluation over 15 years / W. R. Jamieson, H. Ling, L. H. Burr [и др.] // The Annals of Thoracic Surgery. – 1998. – Т. 66. – № 6 Suppl. – С. S49-52.
59. Schoen, F. J. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention - PubMed / F. J. Schoen, R. J. Levy. – 2005. – Т. 79. – № 3. – С. 1072-80.

60. Mechanical versus Bioprosthetic Aortic Valve Replacement in Middle-Aged Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis / Y. Jiang, S. Wang, J. Bian [и др.] // *Journal of Cardiovascular Development and Disease*. – 2023. – Т. 10. – Mechanical versus Bioprosthetic Aortic Valve Replacement in Middle-Aged Adults. – № 2. – С. 90.
61. Possible Subclinical Leaflet Thrombosis in Bioprosthetic Aortic Valves / R. R. Makkar, G. Fontana, H. Jilaihawi [и др.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2015. – Т. 373. – № 21. – С. 2015-2024.
62. Risk factors for atherosclerosis and the degeneration of pericardial valves after aortic valve replacement / G. Nollert, J. Miksch, E. Kreuzer, B. Reichart // *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. – 2003. – Т. 126. – № 4. – С. 965-968.
63. Late incidence and determinants of reoperation in patients with prosthetic heart valves / M. Ruel, A. Kulik, F. D. Rubens [и др.] // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery*. – 2004. – Т. 25. – № 3. – С. 364-370.
64. ApoB/ApoA-I ratio is associated with increased risk of bioprosthetic valve degeneration / H. Mahjoub, P. Mathieu, M. Sénéchal [и др.] // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2013. – Т. 61. – № 7. – С. 752-761.
65. Farivar, R. S. Hypercholesterolemia is a risk factor for bioprosthetic valve calcification and explantation / R. S. Farivar, L. H. Cohn // *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. – 2003. – Т. 126. – № 4. – С. 969-975.
66. Type 2 diabetes mellitus is associated with faster degeneration of bioprosthetic valve: results from a propensity score-matched Italian multicenter study / R. Lorusso, S. Gelsomino, F. Lucà [и др.] // *Circulation*. – 2012. – Т. 125. – Type 2 diabetes mellitus is associated with faster degeneration of bioprosthetic valve. – № 4. – С. 604-614.
67. Metabolic syndrome is associated with faster degeneration of bioprosthetic valves / M. Briand, P. Pibarot, J.-P. Després [и др.] // *Circulation*. – 2006. – Т. 114. – № 1 Suppl. – С. I512-517.
68. Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012): the Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) / A. Vahanian, O. Alfieri, F. Andreotti [и др.] // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery*. – 2012. – Т. 42. – Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012). – № 4. – С. S1-44.
69. 5-year outcomes of transcatheter aortic valve replacement or surgical aortic valve replacement for high surgical risk patients with aortic stenosis (PARTNER 1): a randomised controlled trial / M. J. Mack, M. B. Leon, C. R. Smith [и др.] // *Lancet (London, England)*. – 2015. – Т. 385. – 5-year outcomes of

transcatheter aortic valve replacement or surgical aortic valve replacement for high surgical risk patients with aortic stenosis (PARTNER 1). – № 9986. – С. 2477-2484.

70. Transcatheter or Surgical Aortic-Valve Replacement in Intermediate-Risk Patients / M. B. Leon, C. R. Smith, M. J. Mack [и др.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2016. – Т. 374. – № 17. – С. 1609-1620.

71. Transcatheter aortic valve replacement versus surgical valve replacement in intermediate-risk patients: a propensity score analysis / V. H. Thourani, S. Kodali, R. R. Makkar [и др.] // *Lancet* (London, England). – 2016. – Т. 387. – Transcatheter aortic valve replacement versus surgical valve replacement in intermediate-risk patients. – № 10034. – С. 2218-2225.

72. Transcatheter aortic-valve replacement with a self-expanding prosthesis / D. H. Adams, J. J. Popma, M. J. Reardon [и др.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2014. – Т. 370. – № 19. – С. 1790-1798.

73. Transcatheter Versus Surgical Aortic Valve Replacement in Patients With Severe Aortic Valve Stenosis: 1-Year Results From the All-Comers NOTION Randomized Clinical Trial / H. G. H. Thyregod, D. A. Steinbrüchel, N. Ihlemann [и др.] // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2015. – Т. 65. – Transcatheter Versus Surgical Aortic Valve Replacement in Patients With Severe Aortic Valve Stenosis. – № 20. – С. 2184-2194.

74. Transcatheter heart valve failure: a systematic review / D. Mylotte, A. Andalib, P. Thériault-Lauzier [и др.] // *European Heart Journal*. – 2015. – Т. 36. – Transcatheter heart valve failure. – № 21. – С. 1306-1327.

75. Transcatheter aortic valve implantation in failed bioprosthetic surgical valves / D. Dvir, J. G. Webb, S. Bleiziffer [и др.] // *JAMA*. – 2014. – Т. 312. – № 2. – С. 162-170.

76. Mammalian Pericardium-Based Bioprosthetic Materials in Xenotransplantation and Tissue Engineering / E. A. Grebenik, E. R. Gafarova, L. P. Istranov [и др.] // *Biotechnology Journal*. – 2020. – Т. 15. – № 8. – С. e1900334.

77. Козлов, В. И. Анатомия сердечно-сосудистой системы: учебное пособие для студентов медицинских вузов / В. И. Козлов. – Москва : Практическая медицина, 2013. – 192 с.

78. Pericardium: structure and function in health and disease / M. Jaworska-Wilczynska, P. Trzaskoma, A. A. Szczepankiewicz, T. Hryniewiecki // *Folia Histochemica Et Cytobiologica*. – 2016. – Т. 54. – Pericardium. – № 3. – С. 121-125.

79. Mutsaers, S. E. The mesothelial cell / S. E. Mutsaers // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2004. – Т. 36. – № 1. – С. 9-16.

80. A comparative study of bovine and porcine pericardium to highlight their potential advantages to manufacture percutaneous cardiovascular implants / R. Gauvin, G. Marinov, Y. Mehri [и др.] // *Journal of Biomaterials Applications*. – 2013. – Т. 28. – № 4. – С. 552-565.

81. Comparison of Bovine- and Porcine-Derived Decellularized Biomaterials: Promising Platforms for Tissue Engineering Applications / H. M. El-Husseiny, E. A. Mady, M. Kaneda [и др.] // *Pharmaceutics*. – 2023. – Т. 15. – Comparison of Bovine- and Porcine-Derived Decellularized Biomaterials. – № 7. – C. 1906.
82. Rodriguez, E. R. Structure and Anatomy of the Human Pericardium / E. R. Rodriguez, C. D. Tan // *Progress in Cardiovascular Diseases*. – 2017. – Т. 59. – № 4. – C. 327-340.
83. Murdock, K. Characterization of mechanical properties of pericardium tissue using planar biaxial tension and flexural deformation / K. Murdock, C. Martin, W. Sun // *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. – 2018. – Т. 77. – C. 148-156.
84. Hiester, E. D. Optimal bovine pericardial tissue selection sites. I. Fiber architecture and tissue thickness measurements / E. D. Hiester, M. S. Sacks // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 1998. – Т. 39. – № 2. – C. 207-214.
85. Bovine Pericardium: A Highly Versatile Graft Material / Y. Athar, S. L. A. Zainuddin, Z. Berahim [и др.] // *International Medical Journal*. – 2014. – Т. 21. – № 3. – C. 321-324.
86. Bioprosthetic heart valve heterograft biomaterials: structure, mechanical behavior and computational simulation / M. S. Sacks, A. Mirnajafi, W. Sun, P. Schmidt // *Expert Review of Medical Devices*. – 2006. – Т. 3. – Bioprosthetic heart valve heterograft biomaterials. – № 6. – C. 817-834.
87. Collagen fibre orientation and dispersion govern ultimate tensile strength, stiffness and the fatigue performance of bovine pericardium / A. Whelan, J. Duffy, R. T. Gaul [и др.] // *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. – 2019. – Т. 90. – C. 54-60.
88. Pericardial Processing: Challenges, Outcomes and Future Prospects / E. Rémi, N. Khelil, I. Di Centa [и др.] // *Biomaterials Science and Engineering*. – 2011. – C. 437-456.
89. Stevens, M. M. Exploring and engineering the cell surface interface / M. M. Stevens, J. H. George // *Science (New York, N.Y.)*. – 2005. – Т. 310. – № 5751. – C. 1135-1138.
90. Jones, D. L. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche / D. L. Jones, A. J. Wagers // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. – 2008. – Т. 9. – No place like home. – № 1. – C. 11-21.
91. Watt, F. M. Out of Eden: stem cells and their niches / F. M. Watt, B. L. Hogan // *Science (New York, N.Y.)*. – 2000. – Т. 287. – Out of Eden. – № 5457. – C. 1427-1430.
92. Knoblich, J. A. Mechanisms of asymmetric stem cell division / J. A. Knoblich // *Cell*. – 2008. – Т. 132. – № 4. – C. 583-597.
93. Ding, S. A role for chemistry in stem cell biology / S. Ding, P. G. Schultz // *Nature Biotechnology*. – 2004. – Т. 22. – № 7. – C. 833-840.

94. Control of stem cell fate by engineering their micro and nanoenvironment / M. F. Griffin, P. E. Butler, A. M. Seifalian, D. M. Kalaskar // *World Journal of Stem Cells*. – 2015. – Т. 7. – № 1. – С. 37-50.
95. Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate / B. Trappmann, J. E. Gautrot, J. T. Connelly [и др.] // *Nature Materials*. – 2012. – Т. 11. – № 7. – С. 642-649.
96. Murphy, W. L. Materials as stem cell regulators / W. L. Murphy, T. C. McDevitt, A. J. Engler // *Nature Materials*. – 2014. – Т. 13. – № 6. – С. 547-557.
97. Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix / F. Guilak, D. M. Cohen, B. T. Estes [и др.] // *Cell Stem Cell*. – 2009. – Т. 5. – № 1. – С. 17-26.
98. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies / E. Anitua, M. Sánchez, A. T. Nurden [и др.] // *Trends in Biotechnology*. – 2006. – Т. 24. – № 5. – С. 227-234.
99. Rozario, T. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view / T. Rozario, D. W. DeSimone // *Developmental Biology*. – 2010. – Т. 341. – The extracellular matrix in development and morphogenesis. – № 1. – С. 126-140.
100. Aumailley, M. Structure and biological activity of the extracellular matrix / M. Aumailley, B. Gayraud // *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*. – 1998. – Т. 76. – № 3-4. – С. 253-265.
101. Elastin-based biomaterials and mesenchymal stem cells / J. Ozsvar, S. M. Mithieux, R. Wang, A. S. Weiss // *Biomaterials Science*. – 2015. – Т. 3. – № 6. – С. 800-809.
102. Collagen for bone tissue regeneration / A. M. Ferreira, P. Gentile, V. Chiono, G. Ciardelli // *Acta Biomaterialia*. – 2012. – Т. 8. – № 9. – С. 3191-3200.
103. Kular, J. K. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering / J. K. Kular, S. Basu, R. I. Sharma // *Journal of Tissue Engineering*. – 2014. – Т. 5. – The extracellular matrix. – С. 2041731414557112.
104. Basement membrane proteins modulate cell migration on bovine pericardium extracellular matrix scaffold / Q. Xing, M. Parvizi, M. Lopera Higueta, L. G. Griffiths // *Scientific Reports*. – 2021. – Т. 11. – № 1. – С. 4607.
105. Halper, J. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins / J. Halper, M. Kjaer // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2014. – Т. 802. – Basic components of connective tissues and extracellular matrix. – С. 31-47.
106. A NEW METHOD FOR FIXATION OF PROSTHETIC CARDIAC VALVES AND CLOSURE OF THE AORTOTOMY WITH STAPLES / I. H. Rygg, E. Westengaard, T. Frederiksen [и др.] // *The Journal of Cardiovascular Surgery*. – 1963. – Т. 4. – С. 467-472.
107. Carpentier, A. Cardiac valve surgery--the «French correction» / A. Carpentier // *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. – 1983. – Т. 86. – № 3. – С. 323-337.

108. [Glutaraldehyde preserved porcine pericardium in cardiovascular surgery--clinical application to forty-eight patients (author's transl)] / H. Nishiyama, H. Kaizuka, Y. Takanashi [и др.] // *Kyobu Geka. The Japanese Journal of Thoracic Surgery*. – 1980. – Т. 33. – № 10. – С. 755-760.
109. The role of glutaraldehyde-induced cross-links in calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprotheses / G. Golomb, F. J. Schoen, M. S. Smith [и др.] // *The American Journal of Pathology*. – 1987. – Т. 127. – № 1. – С. 122-130.
110. Meyer, M. Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties / M. Meyer // *Biomedical Engineering Online*. – 2019. – Т. 18. – № 1. – С. 24.
111. Paul, R. G. Chemical stabilisation of collagen as a biomimetic / R. G. Paul, A. J. Bailey // *TheScientificWorldJournal*. – 2003. – Т. 3. – С. 138-155.
112. Adamiak, K. Current methods of collagen cross-linking: Review / K. Adamiak, A. Sionkowska // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – Т. 161. – Current methods of collagen cross-linking. – С. 550-560.
113. Hovakimyan, M. Collagen cross-linking: current status and future directions / M. Hovakimyan, R. F. Guthoff, O. Stachs // *Journal of Ophthalmology*. – 2012. – Т. 2012. – Collagen cross-linking. – С. 406850.
114. Thermal cross-linking for biologically degradable materials. Preliminary report / X. H. Ma, Y. Noishiki, Y. Yamane [и др.] // *ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs: 1992)*. – 1996. – Т. 42. – № 5. – С. M866-871.
115. Optimisation of UV irradiation as a binding site conserving method for crosslinking collagen-based scaffolds / N. Davidenko, D. V. Bax, C. F. Schuster [и др.] // *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*. – 2016. – Т. 27. – № 1. – С. 14.
116. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds / A. Oryan, A. Kamali, A. Moshiri [и др.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2018. – Т. 107. – Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds. – № Pt A. – С. 678-688.
117. Enzymatically crosslinked dextran-tyramine hydrogels as injectable scaffolds for cartilage tissue engineering / R. Jin, L. S. Moreira Teixeira, P. J. Dijkstra [и др.] // *Tissue Engineering. Part A*. – 2010. – Т. 16. – № 8. – С. 2429-2440.
118. An Injectable Enzymatically Crosslinked Carboxymethylated Pullulan/Chondroitin Sulfate Hydrogel for Cartilage Tissue Engineering / F. Chen, S. Yu, B. Liu [и др.] // *Scientific Reports*. – 2016. – Т. 6. – С. 20014.
119. Methods of preparing crosslinked materials and bioprosthetic devices / M. Hendriks, F. Everaerts, M. Gillissen, [et al.]. – 2005. – URL: <https://patents.google.com/patent/US20050136510A1/en> (date accessed: 01.10.2024). – Text : electronic.

120. Thomas, S. Studies on the mechanism of the sporicidal action of glutaraldehyde / S. Thomas, A. D. Russell // *The Journal of Applied Bacteriology*. – 1974. – Т. 37. – № 1. – С. 83-92.
121. Collagen-based biomaterials and cartilage engineering. Application to osteochondral defects / H. Chajra, C. F. Rousseau, D. Cortial [и др.] // *Bio-Medical Materials and Engineering*. – 2008. – Т. 18. – № 1 Suppl. – С. S33-45.
122. Jayakrishnan, A. Glutaraldehyde as a fixative in bioprotheses and drug delivery matrices / A. Jayakrishnan, S. R. Jameela // *Biomaterials*. – 1996. – Т. 17. – № 5. – С. 471-484.
123. Whipple, E. B. Structure of Aqueous Glutaraldehyde / E. B. Whipple, M. Ruta. – 1974. – Т. 39. – № 12.
124. Jones, G. J. Polymerization of glutaraldehyde at fixative pH / G. J. Jones // *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*. – 1974. – Т. 22. – Letter. – № 9. – С. 911-913.
125. High-concentration glutaraldehyde fixation of bovine pericardium in organic solvent and post-fixation glycine treatment: in vitro material assessment and in vivo anticalcification effect / C. Lee, S. H. Kim, S.-H. Choi, Y. J. Kim // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery*. – 2011. – Т. 39. – High-concentration glutaraldehyde fixation of bovine pericardium in organic solvent and post-fixation glycine treatment. – № 3. – С. 381-387.
126. Huang-Lee, L. L. Biochemical changes and cytotoxicity associated with the degradation of polymeric glutaraldehyde derived crosslinks / L. L. Huang-Lee, D. T. Cheung, M. E. Nimni // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 1990. – Т. 24. – № 9. – С. 1185-1201.
127. The effects of cross-link density and chemistry on the calcification potential of diamine-extended glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart-valve materials / D. Bezuidenhout, A. Oosthuysen, P. Human [и др.] // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. – 2009. – Т. 54. – № 3. – С. 133-140.
128. Cheung, D. T. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde II. Reaction with monomeric and polymeric collagen / D. T. Cheung, M. E. Nimni // *Connective Tissue Research*. – 1982. – Т. 10. – № 2. – С. 201-216.
129. Diamine extension of glutaraldehyde crosslinks mitigates bioprosthetic aortic wall calcification in the sheep model / P. Zilla, D. Bezuidenhout, C. Weissenstein [и др.] // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 2001. – Т. 56. – № 1. – С. 56-64.
130. Diamine-extended glutaraldehyde- and carbodiimide crosslinks act synergistically in mitigating bioprosthetic aortic wall calcification / P. Zilla, D. Bezuidenhout, M. Torrianni [и др.] // *The Journal of Heart Valve Disease*. – 2005. – Т. 14. – № 4. – С. 538-545.
131. High glutaraldehyde concentrations mitigate bioprosthetic root calcification in the sheep model / P. Zilla, C. Weissenstein, P. Human [и др.] // *The Annals of Thoracic Surgery*. – 2000. – Т. 70. – № 6. – С. 2091-2095.

132. Glutaraldehyde detoxification in addition to enhanced amine cross-linking dramatically reduces bioprosthetic tissue calcification in the rat model / C. Weissenstein, P. Human, D. Bezuidenhout, P. Zilla // *The Journal of Heart Valve Disease*. – 2000. – Т. 9. – № 2. – С. 230-240.
133. The anticalcific effect of glutaraldehyde detoxification on bioprosthetic aortic wall tissue in the sheep model / P. Zilla, C. Weissenstein, M. Bracher, P. Human // *Journal of Cardiac Surgery*. – 2001. – Т. 16. – № 6. – С. 467-472.
134. The effects of cross-link density and chemistry on the calcification potential of diamine-extended glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart-valve materials / D. Bezuidenhout, A. Oosthuysen, P. Human [и др.] // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. – 2009. – Т. 54. – № 3. – С. 133-140.
135. Polak, R. Care during freeze-drying of bovine pericardium tissue to be used as a biomaterial: a comparative study / R. Polak, R. N. M. Pitombo // *Cryobiology*. – 2011. – Т. 63. – Care during freeze-drying of bovine pericardium tissue to be used as a biomaterial. – № 2. – С. 61-66.
136. Pharmacologic alternatives to riboflavin photochemical corneal cross-linking: a comparison study of cell toxicity thresholds / M. Kim, A. Takaoka, Q. V. Hoang [и др.] // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2014. – Т. 55. – Pharmacologic alternatives to riboflavin photochemical corneal cross-linking. – № 5. – С. 3247-3257.
137. To cross-link or not to cross-link? Cross-linking associated foreign body response of collagen-based devices / L. M. Delgado, Y. Bayon, A. Pandit, D. I. Zeugolis // *Tissue Engineering. Part B, Reviews*. – 2015. – Т. 21. – To cross-link or not to cross-link? – № 3. – С. 298-313.
138. Effects of glutaraldehyde concentration and fixation time on material characteristics and calcification of bovine pericardium: implications for the optimal method of fixation of autologous pericardium used for cardiovascular surgery / C. Lee, H.-G. Lim, C.-H. Lee, Y. J. Kim // *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*. – 2017. – Т. 24. – Effects of glutaraldehyde concentration and fixation time on material characteristics and calcification of bovine pericardium. – № 3. – С. 402-406.
139. Tod, T. J. The association of bound aldehyde content with bioprosthetic tissue calcification / T. J. Tod, J. S. Dove // *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*. – 2016. – Т. 27. – № 1. – С. 8.
140. Free-aldehyde neutralized and oligohyaluronan loaded bovine pericardium with improved anti-calcification and endothelialization for bioprosthetic heart valves / Y. Liu, C. Chen, T. Lu [и др.] // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2023. – Т. 11. – С. 1138972.
141. Nashef, A. S. Selective incorporation of a polymer into implantable biological tissue to inhibit calcification / A. S. Nashef. – 1988. – URL: <https://patents.google.com/patent/US4729139A/en?q=US4729139> (дата обращения: 01.10.2024). – Текст : электронный.
142. Nashef, A. S. Surfactant treatment of implantable biological tissue to inhibit calcification / A. S. Nashef, A. I. Ahmed. – 1989. – URL:

<https://patents.google.com/patent/US4885005A/en?q=US4885005+> (дата обращения: 01.10.2024). – Текст : электронный.

143. Carpentier, A. Implantable biological tissue and process for preparation thereof / A. Carpentier, S. Carpentier, A. S. Nashef. – 1987. – URL: <https://patents.google.com/patent/US4648881A/en?q=US4%2c648%2c881+> (дата обращения: 01.10.2024). – Текст : электронный.

144. Carpentier, A. Calcification mitigation of bioprosthetic implants / A. Carpentier, S. Carpentier, A. Nashef. – 1991. – URL: <https://patents.google.com/patent/US5002566A/en?q=US5%2c002%2c566> (дата обращения: 01.10.2024). – Текст : электронный.

145. Nashef, A. S. Surfactant treatment of implantable biological tissue to inhibit calcification / A. S. Nashef, A. I. Ahmed. – 1993. – URL: <https://patents.google.com/patent/US5215541A/en?q=US5%2c215%2c541+> (дата обращения: 01.10.2024). – Текст : электронный.

146. Cheung, D. T.-W. Borohydride reduction of biological tissues / D. T.-W. Cheung. – 1999. – URL: <https://patents.google.com/patent/US5862806A/en?q=US5862806+> (дата обращения: 02.10.2024). – Текст : электронный.

147. Seifter, E. Anticalcification treatment for aldehyde-tanned biological tissue / E. Seifter, R. W. M. Frater. – 1995. – URL: <https://patents.google.com/patent/US5476516A/en?q=US5%2c476%2c516+> (дата обращения: 01.10.2024). – Текст : электронный.

148. Duran, C. M. G. Compliant dehydrated tissue for implantation and process of making the same / C. M. G. Duran, D. T. Cheung, D. C. Pang. – 2003. – URL: <https://patents.google.com/patent/US6630001B2/en?q=US6630%2c001> (date accessed: 02.10.2024). – Text : electronic.

149. Duran, C. M. G. Compliant dehydrated tissue for implantation and process of making the same / C. M. G. Duran, D. T. Cheung, D. C. Pang. – 2001. – URL: <https://patents.google.com/patent/US6277555B1/en?q=US6277%2c555> (date accessed: 02.10.2024). – Text : electronic.

150. Biocompatible prosthetic tissue / P. E. Ashworth, M. F. Ogle, D. P. McTavish, [и др.]. – 2002. – URL: <https://patents.google.com/patent/US6471723B1/en?q=US6471%2c723> (дата обращения: 02.10.2024). – Текст : электронный.

151. Nashef, A. S. Process for decreasing residual aldehyde levels in implantable bioprosthetic tissue / A. S. Nashef, R. Dieck. – 1988. – URL: <https://patents.google.com/patent/US4786287A/en?q=US4786%2c287> (дата обращения: 02.10.2024). – Текст : электронный.

152. Bioprosthetic tissue with reduced calcification / J. S. Dove, D. P. Dobler, J. A. Davidson, G. A. Wright. – 2016. – URL: <https://patents.google.com/patent/US9320830B2/en?q=US9320830B2> (date accessed: 02.10.2024). – Text : electronic.
153. Carbodiimide crosslinked collagen from porcine dermal matrix for high-strength tissue engineering scaffold / J. Li, N. Ren, J. Qiu [и др.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2013. – Т. 61. – С. 69-74.
154. Biomechanical properties of carbodiimide crosslinked collagen: influence of the formation of ester crosslinks / F. Everaerts, M. Torrianni, M. Hendriks, J. Feijen // Journal of Biomedical Materials Research. Part A. – 2008. – Т. 85. – Biomechanical properties of carbodiimide crosslinked collagen. – № 2. – С. 547-555.
155. Electrospun hydroxyapatite-containing chitosan nanofibers crosslinked with genipin for bone tissue engineering / M. E. Frohbergh, A. Katsman, G. P. Botta [и др.] // Biomaterials. – 2012. – Т. 33. – № 36. – С. 9167-9178.
156. In vivo evaluation of cellular and acellular bovine pericardia fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin) / Y. Chang, C.-C. Tsai, H.-C. Liang, H.-W. Sung // Biomaterials. – 2002. – Т. 23. – № 12. – С. 2447-2457.
157. Genipin crosslinking reduced the immunogenicity of xenogeneic decellularized porcine whole-liver matrices through regulation of immune cell proliferation and polarization / Y. Wang, J. Bao, X. Wu [и др.] // Scientific Reports. – 2016. – Т. 6. – С. 24779.
158. In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation / H. W. Sung, R. N. Huang, L. L. Huang, C. C. Tsai // Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition. – 1999. – Т. 10. – № 1. – С. 63-78.
159. Cytocompatibility study of a natural biomaterial crosslinker--Genipin with therapeutic model cells / C. Wang, T. T. Lau, W. L. Loh [и др.] // Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials. – 2011. – Т. 97. – № 1. – С. 58-65.
160. Collagen/elastin hydrogels cross-linked by squaric acid / J. Skopinska-Wisniewska, J. Kuderko, A. Bajek [и др.] // Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications. – 2016. – Т. 60. – С. 100-108.
161. Behaviour of human dental pulp cells cultured in a collagen hydrogel scaffold cross-linked with cinnamaldehyde / Y. S. Kwon, S. H. Lee, Y. C. Hwang [и др.] // International Endodontic Journal. – 2017. – Т. 50. – № 1. – С. 58-66.
162. Effect of nordihydroguaiaretic acid cross-linking on fibrillar collagen: in vitro evaluation of fibroblast adhesion strength and migration / A. Y. Rioja, M. Muniz-Maisonet, T. J. Koob [et al.] // AIMS Bioengineering. – 2017. – Vol. 4. – Effect of nordihydroguaiaretic acid cross-linking on fibrillar collagen. – № 2. – P. 300-317.

163. Development of a tannic acid cross-linking process for obtaining 3D porous cell-laden collagen structure / J. Lee, M. Yeo, W. Kim [и др.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2018. – Т. 110. – С. 497-503.
164. Epoxy cross-linked collagen and collagen-laminin Peptide hydrogels as corneal substitutes / L. B. Koh, M. M. Islam, D. Mitra [и др.] // *Journal of Functional Biomaterials*. – 2013. – Т. 4. – № 3. – С. 162-177.
165. Fixation of bioprosthetic tissues with monofunctional and multifunctional polyepoxy compounds / R. Tu, S. H. Shen, D. Lin [и др.] // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 1994. – Т. 28. – № 6. – С. 677-684.
166. Singh, R. K. Capillary morphogenesis in PEG-collagen hydrogels / R. K. Singh, D. Seliktar, A. J. Putnam // *Biomaterials*. – 2013. – Т. 34. – № 37. – С. 9331-9340.
167. Structural dynamic of collagen fibers cross-linked with isocyanates: application of synchrotron radiation in macromolecular chemistry / E. Mosler, H. Dieringer, P. P. Fietzek [и др.]. – 1987. – № 26:551. – С. 2.
168. Mezger, W. J. Crosslinked human or animal tissue products and their methods of manufacture and use / W. J. Mezger, K. E. Myers. – 2020. – URL: <https://patents.google.com/patent/US20200299357A1/en?q=US20200299357A1> (date accessed: 02.10.2024). – Text : electronic.
169. Stabilized collagen scaffolds for heart valve tissue engineering / M. E. Tedder, J. Liao, B. Weed [и др.] // *Tissue Engineering. Part A*. – 2009. – Т. 15. – № 6. – С. 1257-1268.
170. Use of the acyl azide method for cross-linking collagen-rich tissues such as pericardium / H. Petite, I. Rault, A. Huc [и др.] // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 1990. – Т. 24. – № 2. – С. 179-187.
171. Use of diphenylphosphorylazide for cross-linking collagen-based biomaterials / H. Petite, V. Frei, A. Huc, D. Herbage // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 1994. – Т. 28. – № 2. – С. 159-165.
172. Method of preparing antithrombogenic medical materials / Y. Noishiki, K. Kodaira, M. Furuse, T. Miyata. – 1989. – URL: (дата обращения: 02.10.2024). – Текст : электронный.
173. Bioprosthetic valve / E. Imamura, Y. Noishiki, H. Koyanagi, [и др.]. – 1992. – URL: <https://patents.google.com/patent/US5080670A/en?q=US5080670> (дата обращения: 02.10.2024). – Текст : электронный.
174. Nonpolymeric epoxy compounds for cross linking biological tissue and bioprosthetic grafts prepared thereby / C. B. Hu, K. E. Myers, D. Nguyen-Thien-Nhon, R. Kafesjian. – 1999. – URL: <https://patents.google.com/patent/US5880242A/en?q=US5880242> (дата обращения: 02.10.2024). – Текст : электронный.
175. Process for making a bioprosthetic device and implants produced therefrom / M. Hendriks, M. Verhoeven, P. Cahalan, [и др.]. – 2000. – URL:

<https://patents.google.com/patent/US6117979A/en?q=US6117979> (дата обращения: 02.10.2024). – Текст : электронный.

176. Girardot, J.-M. Variably crosslinked tissue / J.-M. Girardot, M.-N. Girardot. – 2011. – URL: <https://patents.google.com/patent/US7918899B2/en?q=US7918899> (date accessed: 02.10.2024). – Text : electronic.

177. Ueda, Y. Processes for removing cells and cell debris from tissue and tissue constructs used in transplantation and tissue reconstruction / Y. Ueda, M. Torrianni. – 2005. – URL: <https://patents.google.com/patent/US20050266390A1/en?q=US20050266390A1> (дата обращения: 02.10.2024). – Текст : электронный.

178. A review of decellurization methods caused by an urgent need for quality control of cell-free extracellular matrix' scaffolds and their role in regenerative medicine / M. Kawecki, W. Łabuś, A. Kłama-Baryla [и др.] // *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*. – 2018. – Т. 106. – № 2. – С. 909-923.

179. Borck, A. Bioprosthetic components for an implant, in particular partly crosslinked biological heart valves / A. Borck. – 2017. – URL: <https://patents.google.com/patent/US9782255B2/en?q=US9782255B2> (date accessed: 02.10.2024). – Text : electronic.

180. Torrianni, M. W. Process for reducing mineralization of tissue used in transplantation / M. W. Torrianni. – 2003. – URL: <https://patents.google.com/patent/US6509145B1/en?q=US6509145B1> (дата обращения: 02.10.2024). – Текст : электронный.

181. Decellurisation processes for making bioprotheses / Y. Ueda, M. W. Torrianni, F. M. Everaerts, [et al.]. – 2006. – URL: <https://patents.google.com/patent/WO2005118014A3/en?q=WO2005118014A3> (date accessed: 02.10.2024). – Text : electronic.

182. Torrianni, M. W. Process for reducing mineralization of tissue used in transplantation / M. W. Torrianni. – 2006. – URL: <https://patents.google.com/patent/US7078163B2/en?q=US7078163> (date accessed: 02.10.2024). – Text : electronic.

183. Acellular matrix: a biomaterials approach for coronary artery bypass and heart valve replacement / G. J. Wilson, D. W. Courtman, P. Klement [и др.] // *The Annals of Thoracic Surgery*. – 1995. – Т. 60. – Acellular matrix. – № 2 Suppl. – С. S353-358.

184. Tissue engineering of heart valves--human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves / A. Bader, T. Schilling, O. E. Teebken [и др.] // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery*. – 1998. – Т. 14. – № 3. – С. 279-284.

185. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue / G. Steinhoff, U. Stock, N. Karim [и др.] // *Circulation*. – 2000. – Т. 102. –

Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits. – № 19 Suppl 3. – C. III50-55.

186. Tissue engineering of cardiac valve prostheses II: biomechanical characterization of decellularized porcine aortic heart valves / S. A. Korossis, C. Booth, H. E. Wilcox [и др.] // The Journal of Heart Valve Disease. – 2002. – Т. 11. – Tissue engineering of cardiac valve prostheses II. – № 4. – С. 463-471.

187. Kim, W. G. Tissue-engineered heart valve leaflets: an effective method of obtaining acellularized valve xenografts / W. G. Kim, J. K. Park, W. Y. Lee // The International Journal of Artificial Organs. – 2002. – Т. 25. – Tissue-engineered heart valve leaflets. – № 8. – С. 791-797.

188. Decellularization reduces the immune response to aortic valve allografts in the rat / S. R. Meyer, J. Nagendran, L. S. Desai [и др.] // The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. – 2005. – Т. 130. – № 2. – С. 469-476.

189. Decellularized xenogenic heart valves reveal remodeling and growth potential in vivo / W. Erdbrügger, W. Konertz, P. M. Dohmen [и др.] // Tissue Engineering. – 2006. – Т. 12. – № 8. – С. 2059-2068.

190. Physiological performance of a detergent decellularized heart valve implanted for 15 months in Vietnamese pigs: surgical procedure, follow-up, and explant inspection / M. Gallo, F. Naso, H. Poser [и др.] // Artificial Organs. – 2012. – Т. 36. – Physiological performance of a detergent decellularized heart valve implanted for 15 months in Vietnamese pigs. – № 6. – С. E138-150.

191. Decellularization as a method to reduce calcification in bovine pericardium bioprosthetic valves / C. Collatusso, J. G. Roderjan, L. de Noronha [и др.] // Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery. – 2019. – Т. 29. – № 2. – С. 302-311.

192. Levy, R. J. Method of making calcification-resistant bioprosthetic tissue / R. J. Levy, D. Hirsch. – 1998. – URL: <https://patents.google.com/patent/US5746775A/en?q=US5%2c746%2c775> (дата обращения: 02.10.2024). – Текст : электронный.

193. Nashef, A. S. Chemical sterilization of implantable biological tissue / A. S. Nashef, G. Lowery. – 1984. – URL: <https://patents.google.com/patent/WO1984001894A1/en?q=WO84%2f01894> (дата обращения: 02.10.2024). – Текст : электронный.

194. Prevention of bioprosthetic heart valve calcification by ethanol preincubation. Efficacy and mechanisms / N. Vyavahare, D. Hirsch, E. Lerner [и др.] // Circulation. – 1997. – Т. 95. – № 2. – С. 479-488.

195. Neethling, W. M. L. An implantable biomaterial and a method of producing same / W. M. L. Neethling, A. J. Hodge. – 2016. – URL: <https://patents.google.com/patent/EP1835948B1/de?q=EP1835948B1> (date accessed: 02.10.2024). – Text : electronic.

196. 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) / D. Capodanno, A. S. Petronio, B. Prendergast [и др.] // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery*. – 2017. – Т. 52. – Standardized definitions of structural deterioration and valve failure in assessing long-term durability of transcatheter and surgical aortic bioprosthetic valves. – № 3. – С. 408-417.
197. Baldwin, A. C. W. Tissue Valve Degeneration and Mechanical Valve Failure / A. C. W. Baldwin, G. Tolis // *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine*. – 2019. – Т. 21. – № 7. – С. 33.
198. Биосовместимость / С. А. Васин, Е. А. Немец, Н. В. Перова, [и др.]. – под ред. В.И. Севостьянова. – Москва : ГУП «Информационный центр ВНИИГеосистем», 1999. – 366 с.
199. Sendroy, J. Studies of the solubility of calcium salts: III. The solubility of calcium carbonate and tertiary calcium phosphates under various conditions. / J. Sendroy, A. B. Hastings. – 1927. – № 71. – С. 797-846.
200. Merryman, W. D. Mechanisms of calcification in aortic valve disease: role of mechanokinetics and mechanodynamics / W. D. Merryman, F. J. Schoen // *Current Cardiology Reports*. – 2013. – Т. 15. – Mechanisms of calcification in aortic valve disease. – № 5. – С. 355.
201. Lerman, D. A. Calcific Aortic Valve Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches / D. A. Lerman, S. Prasad, N. Alotti // *European Cardiology*. – 2015. – Т. 10. – Calcific Aortic Valve Disease. – № 2. – С. 108-112.
202. Schoen, F. J. Mechanisms of function and disease of natural and replacement heart valves / F. J. Schoen // *Annual Review of Pathology*. – 2012. – Т. 7. – С. 161-183.
203. Heart Valve Biomechanics and Underlying Mechanobiology / S. Ayoub, G. Ferrari, R. C. Gorman [и др.] // *Comprehensive Physiology*. – 2016. – Т. 6. – № 4. – С. 1743-1780.
204. Identification and characterization of calcifying valve cells from human and canine aortic valves / E. R. Mohler, M. K. Chawla, A. W. Chang [и др.] // *The Journal of Heart Valve Disease*. – 1999. – Т. 8. – № 3. – С. 254-260.
205. Causes of failure and pathologic findings in surgically removed Ionescu-Shiley standard bovine pericardial heart valve bioprostheses: emphasis on progressive structural deterioration / F. J. Schoen, J. Fernandez, L. Gonzalez-Lavin, A. Cernaiu // *Circulation*. – 1987. – Т. 76. – Causes of failure and pathologic findings in surgically removed Ionescu-Shiley standard bovine pericardial heart valve bioprostheses. – № 3. – С. 618-627.
206. Bonetti, A. Ectopic mineralization in heart valves: new insights from in vivo and in vitro procalcific models and promising perspectives on noncalcifiable bioengineered valves / A. Bonetti, M. Marchini,

- F. Ortolani // *Journal of Thoracic Disease*. – 2019. – T. 11. – Ectopic mineralization in heart valves. – № 5. – C. 2126-2143.
207. Relevance of immunologic reactions for tissue failure of bioprosthetic heart valves / M. Dahm, M. Husmann, null Eckhard-Mayer [и др.] // *The Annals of Thoracic Surgery*. – 1995. – T. 60. – № 2 Suppl. – C. S348-352.
208. Human, P. The possible role of immune responses in bioprosthetic heart valve failure / P. Human, P. Zilla // *The Journal of Heart Valve Disease*. – 2001. – T. 10. – № 4. – C. 460-466.
209. Human, P. Characterization of the immune response to valve bioprostheses and its role in primary tissue failure / P. Human, P. Zilla // *The Annals of Thoracic Surgery*. – 2001. – T. 71. – № 5 Suppl. – C. S385-388.
210. Human, P. The Neglected Villain of Bioprosthetic Degeneration: Inflammatory and Immune Processes / P. Human, P. Zilla // *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants*. – 2017. – T. 27. – The Neglected Villain of Bioprosthetic Degeneration. – № 2-4. – C. 159-180.
211. The Immune Responses and Calcification of Bioprostheses in the α 1,3-Galactosyltransferase Knockout Mouse / W. Sung Jeong, Y. Jin Kim, H.-G. Lim [и др.] // *The Journal of Heart Valve Disease*. – 2016. – T. 25. – № 2. – C. 253-261.
212. Kim, K. M. Role of glutaraldehyde in calcification of porcine aortic valve fibroblasts / K. M. Kim, G. A. Herrera, H. D. Battarbee // *The American Journal of Pathology*. – 1999. – T. 154. – № 3. – C. 843-852.
213. Schoen, F. J. Founder's Award, 25th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, perspectives. Providence, RI, April 28-May 2, 1999. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives / F. J. Schoen, R. J. Levy // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 1999. – T. 47. – Founder's Award, 25th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, perspectives. Providence, RI, April 28-May 2, 1999. Tissue heart valves. – № 4. – C. 439-465.
214. In Vitro Study of Calcium Microsecond Electroporation of Prostate Adenocarcinoma Cells / A. Kielbik, W. Szlasa, O. Michel [и др.] // *Molecules (Basel, Switzerland)*. – 2020. – T. 25. – № 22. – C. 5406.
215. Schraer, H. Matrix vesicles in newly synthesizing bone observed after ultracryotomy and ultramicroincineration / H. Schraer, C. V. Gay // *Calcified Tissue Research*. – 1977. – T. 23. – № 2. – C. 185-188.
216. Valente, M. Ultrastructural substrates of dystrophic calcification in porcine bioprosthetic valve failure / M. Valente, U. Bortolotti, G. Thiene // *The American Journal of Pathology*. – 1985. – T. 119. – № 1. – C. 12-21.
217. Lee, Y. S. Morphogenesis of calcification in porcine bioprosthesis: insight from high resolution electron microscopic investigation at molecular and atomic resolution / Y. S. Lee // *Journal of Electron*

- Microscopy. – 1993. – T. 42. – Morphogenesis of calcification in porcine bioprosthesis. – № 3. – C. 156-165.
218. Chen, W. Mechanism of efficacy of 2-amino oleic acid for inhibition of calcification of glutaraldehyde-pretreated porcine bioprosthetic heart valves / W. Chen, F. J. Schoen, R. J. Levy // *Circulation*. – 1994. – T. 90. – № 1. – C. 323-329.
219. Aortic Bioprosthetic Valve Durability: Incidence, Mechanisms, Predictors, and Management of Surgical and Transcatheter Valve Degeneration / T. Rodriguez-Gabella, P. Voisine, R. Puri [и др.] // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2017. – T. 70. – Aortic Bioprosthetic Valve Durability. – № 8. – C. 1013-1028.
220. A novel tissue treatment to reduce mineralization of bovine pericardial heart valves / B. Meuris, H. De Praetere, M. Strasly [и др.] // *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. – 2018. – T. 156. – № 1. – C. 197-206.
221. Badria, A. F. Decellularized tissue-engineered heart valves calcification: what do animal and clinical studies tell us? / A. F. Badria, P. G. Koutsoukos, D. Mavrilas // *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*. – 2020. – T. 31. – Decellularized tissue-engineered heart valves calcification. – № 12. – C. 132.
222. Structural Deterioration of Transcatheter Versus Surgical Aortic Valve Bioprostheses in the PARTNER-2 Trial / P. Pibarot, J. Ternacle, W. A. Jaber [и др.] // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2020. – T. 76. – № 16. – C. 1830-1843.
223. Hopkins, R. A. Bioprosthetic valves and laudable inflammation? / R. A. Hopkins // *Circulation*. – 2006. – T. 114. – № 4. – C. 261-264.
224. Manji, R. A. Xenograft bioprosthetic heart valves: Past, present and future / R. A. Manji, W. Lee, D. K. C. Cooper // *International Journal of Surgery (London, England)*. – 2015. – T. 23. – Xenograft bioprosthetic heart valves. – № Pt B. – C. 280-284.
225. Structural Valve Deterioration Is Linked to Increased Immune Infiltrate and Chemokine Expression / S. J. Bozso, J. J. H. Kang, R. Basu [и др.] // *Journal of Cardiovascular Translational Research*. – 2021. – T. 14. – № 3. – C. 503-512.
226. Glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve conduits calcify and fail from xenograft rejection / R. A. Manji, L. F. Zhu, N. K. Nijjar [и др.] // *Circulation*. – 2006. – T. 114. – № 4. – C. 318-327.
227. The role of antibody responses against glycans in bioprosthetic heart valve calcification and deterioration / T. Senage, A. Paul, T. Le Tourneau [и др.] // *Nature Medicine*. – 2022. – T. 28. – № 2. – C. 283-294.
228. Veisheh, O. Domesticating the foreign body response: Recent advances and applications / O. Veisheh, A. J. Vegas // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2019. – T. 144. – Domesticating the foreign body response. – C. 148-161.

229. Protein adsorption of calcified and noncalcified valvular bioprostheses after human implantation / M. Shen, S. M. Carpentier, A. J. Berrebi [и др.] // *The Annals of Thoracic Surgery*. – 2001. – Т. 71. – № 5 Suppl. – С. S406-407.
230. Biochemical and histological evidence of deteriorated bioprosthetic valve leaflets: the accumulation of fibrinogen and plasminogen / T. Sakaue, H. Nakaoka, F. Shikata [и др.] // *Biology Open*. – 2018. – Т. 7. – Biochemical and histological evidence of deteriorated bioprosthetic valve leaflets. – № 8. – C. bio034009.
231. Role of dendritic cells in the host response to biomaterials and their signaling pathways / F.-J. Zhu, Y.-L. Tong, Z.-Y. Sheng, Y.-M. Yao // *Acta Biomaterialia*. – 2019. – Т. 94. – С. 132-144.
232. Ultrastructural Pathology of Atherosclerosis, Calcific Aortic Valve Disease, and Bioprosthetic Heart Valve Degeneration: Commonalities and Differences / A. Kostyunin, R. Mukhamadiyarov, T. Glushkova [и др.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Т. 21. – Ultrastructural Pathology of Atherosclerosis, Calcific Aortic Valve Disease, and Bioprosthetic Heart Valve Degeneration. – № 20. – С. 7434.
233. Glycation and Serum Albumin Infiltration Contribute to the Structural Degeneration of Bioprosthetic Heart Valves / A. Frasca, Y. Xue, A. P. Kossar [и др.] // *JACC. Basic to translational science*. – 2020. – Т. 5. – № 8. – С. 755-766.
234. The relationship between inflammation and neoangiogenesis of epicardial adipose tissue and coronary atherosclerosis based on computed tomography analysis / T. Kitagawa, H. Yamamoto, K. Sentani [и др.] // *Atherosclerosis*. – 2015. – Т. 243. – № 1. – С. 293-299.
235. Aortic valve: anatomy and structure and the role of vasculature in the degenerative process / V. Katsi, N. Magkas, A. Antonopoulos [и др.] // *Acta Cardiologica*. – 2021. – Т. 76. – Aortic valve. – № 4. – С. 335-348.
236. Simionescu, A. Matrix metalloproteinases in the pathology of natural and bioprosthetic cardiac valves / A. Simionescu, D. T. Simionescu, R. F. Deac // *Cardiovascular Pathology: The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology*. – 1996. – Т. 5. – № 6. – С. 323-332.
237. Simionescu, D. T. Extracellular matrix degrading enzymes are active in porcine stentless aortic bioprosthetic heart valves / D. T. Simionescu, J. J. Lovekamp, N. R. Vyavahare // *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. – 2003. – Т. 66. – № 4. – С. 755-763.
238. A Role for MMP-10 (Matrix Metalloproteinase-10) in Calcific Aortic Valve Stenosis / L. Matilla, C. Roncal, J. Ibarrola [и др.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2020. – Т. 40. – № 5. – С. 1370-1382.
239. Plasminogen is a key proinflammatory regulator that accelerates the healing of acute and diabetic wounds / Y. Shen, Y. Guo, P. Mikus [и др.] // *Blood*. – 2012. – Т. 119. – № 24. – С. 5879-5887.

240. Calcium affinity, cooperativity, and domain interactions of extracellular EF-hands present in BM-40 / E. Busch, E. Hohenester, R. Timpl [и др.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – Т. 275. – № 33. – С. 25508-25515.
241. Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC/osteonectin/BM-40) binds to fibrinogen fragments D and E, but not to native fibrinogen / H. Wang, G. Workman, S. Chen [и др.] // *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*. – 2006. – Т. 25. – № 1. – С. 20-26.
242. Bradshaw, A. D. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury / A. D. Bradshaw, E. H. Sage // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2001. – Т. 107. – № 9. – С. 1049-1054.
243. Osteonectin regulates the extracellular matrix mineralization of osteoblasts through P38 signaling pathway / Y.-S. Zhu, Y. Gu, C. Jiang, L. Chen // *Journal of Cellular Physiology*. – 2020. – Т. 235. – № 3. – С. 2220-2231.
244. Macrophage-derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques / S. E. P. New, C. Goettsch, M. Aikawa [и др.] // *Circulation Research*. – 2013. – Т. 113. – Macrophage-derived matrix vesicles. – № 1. – С. 72-77.
245. First quantification of alpha-Gal epitope in current glutaraldehyde-fixed heart valve bioprostheses / F. Naso, A. Gandaglia, T. Bottio [и др.] // *Xenotransplantation*. – 2013. – Т. 20. – № 4. – С. 252-261.
246. Differences in xenoreactive immune response and patterns of calcification of porcine and bovine tissues in α -Gal knock-out and wild-type mouse implantation models / M.-S. Kim, S. Jeong, H.-G. Lim, Y. J. Kim // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery*. – 2015. – Т. 48. – № 3. – С. 392-399.
247. Li, K. Y. C. Bioprosthetic Heart Valves: Upgrading a 50-Year Old Technology / K. Y. C. Li // *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. – 2019. – Т. 6. – Bioprosthetic Heart Valves. – С. 47.
248. Anti alpha-gal immune response following porcine bioprosthesis implantation in children / C. S. Park, S.-S. Park, S. Y. Choi [и др.] // *The Journal of Heart Valve Disease*. – 2010. – Т. 19. – № 1. – С. 124-130.
249. Gal knockout pig pericardium: new source of material for heart valve bioprostheses / N. Lila, C. G. A. McGregor, S. Carpentier [и др.] // *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation*. – 2010. – Т. 29. – Gal knockout pig pericardium. – № 5. – С. 538-543.
250. Gal-knockout bioprostheses exhibit less immune stimulation compared to standard biological heart valves / C. G. A. McGregor, H. Kogelberg, M. Vlasin, G. W. Byrne // *The Journal of Heart Valve Disease*. – 2013. – Т. 22. – № 3. – С. 383-390.
251. Human antibody recognition of xenogeneic antigens (NeuGc and Gal) on porcine heart valves: could genetically modified pig heart valves reduce structural valve deterioration? / W. Lee, C. Long,

- J. Ramsoondar [и др.] // *Xenotransplantation*. – 2016. – Т. 23. – Human antibody recognition of xenogeneic antigens (NeuGc and Gal) on porcine heart valves. – № 5. – С. 370-380.
252. Characterization of immunogenic Neu5Gc in bioprosthetic heart valves / E. M. Reuven, S. Leviatan Ben-Arye, T. Marshanski [и др.] // *Xenotransplantation*. – 2016. – Т. 23. – № 5. – С. 381-392.
253. Gates, K. V. Immunoproteomic Identification of Noncarbohydrate Antigens Eliciting Graft-Specific Adaptive Immune Responses in Patients with Bovine Pericardial Bioprosthetic Heart Valves / K. V. Gates, Q. Xing, L. G. Griffiths // *Proteomics. Clinical Applications*. – 2019. – Т. 13. – № 4. – С. e1800129.
254. Models of immunogenicity in preclinical assessment of tissue engineered heart valves / M. Ground, S. Waqanivavalagi, R. Walker [и др.] // *Acta Biomaterialia*. – 2021. – Т. 133. – С. 102-113.
255. Leukocytes, platelets, and surface microstructure of spontaneously degenerated porcine bioprosthetic valves / P. D. Stein, C. H. Wang, J. M. Riddle, D. J. Magilligan // *Journal of Cardiac Surgery*. – 1988. – Т. 3. – № 3. – С. 253-261.
256. Manolagas, S. C. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis / S. C. Manolagas // *Endocrine Reviews*. – 2010. – Т. 31. – From estrogen-centric to aging and oxidative stress. – № 3. – С. 266-300.
257. Sies, H. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents / H. Sies, D. P. Jones // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. – 2020. – Т. 21. – № 7. – С. 363-383.
258. The effects of the covalent attachment of 3-(4-hydroxy-3,5-di-tert-butylphenyl) propyl amine to glutaraldehyde pretreated bovine pericardium on structural degeneration, oxidative modification, and calcification of rat subdermal implants / A. J. Christian, I. S. Alferiev, J. M. Connolly [и др.] // *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. – 2015. – Т. 103. – № 7. – С. 2441-2448.
259. Calcification and Oxidative Modifications Are Associated With Progressive Bioprosthetic Heart Valve Dysfunction / S. Lee, R. J. Levy, A. J. Christian [и др.] // *Journal of the American Heart Association*. – 2017. – Т. 6. – № 5. – С. e005648.
260. Andrographolide ameliorates aortic valve calcification by regulation of lipid biosynthesis and glycerolipid metabolism targeting MGLL expression in vitro and in vivo / C. Wang, Y. Huang, X. Liu [и др.] // *Cell Calcium*. – 2021. – Т. 100. – С. 102495.
261. Association between plasma lipoprotein levels and bioprosthetic valve structural degeneration / M. J. Nsaibia, A. Mahmut, H. Mahjoub [и др.] // *Heart (British Cardiac Society)*. – 2016. – Т. 102. – № 23. – С. 1915-1921.
262. Soluble CD14 is associated with the structural failure of bioprostheses / M. J. Nsaibia, M.-C. Boulanger, R. Bouchareb [и др.] // *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. – 2018. – Т. 485. – С. 173-177.

263. Lipid-mediated inflammation and degeneration of bioprosthetic heart valves / R. Shetty, P. Pibarot, A. Audet [и др.] // *European Journal of Clinical Investigation*. – 2009. – Т. 39. – № 6. – С. 471-480.
264. Plakkal Ayyappan, J. Lipid droplet-associated proteins in atherosclerosis (Review) / J. Plakkal Ayyappan, A. Paul, Y.-H. Goo // *Molecular Medicine Reports*. – 2016. – Т. 13. – № 6. – С. 4527-4534.
265. Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity / Y. I. Miller, S.-H. Choi, P. Wiesner [и др.] // *Circulation Research*. – 2011. – Т. 108. – № 2. – С. 235-248.
266. Lp-PLA2 is associated with structural valve degeneration of bioprostheses / A. Mahmut, H. Mahjoub, M.-C. Boulanger [и др.] // *European Journal of Clinical Investigation*. – 2014. – Т. 44. – № 2. – С. 136-145.
267. Circulating Lp-PLA2 is associated with high valvuloarterial impedance and low arterial compliance in patients with aortic valve bioprostheses / A. Mahmut, H. Mahjoub, M.-C. Boulanger [и др.] // *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. – 2016. – Т. 455. – С. 20-25.
268. Translational studies of lipoprotein-associated phospholipase A₂ in inflammation and atherosclerosis / J. F. Ferguson, C. C. Hinkle, N. N. Mehta [и др.] // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2012. – Т. 59. – № 8. – С. 764-772.
269. OxLDL stimulates lipoprotein-associated phospholipase A2 expression in THP-1 monocytes via PI3K and p38 MAPK pathways / W.-Y. Wang, J. Li, D. Yang [и др.] // *Cardiovascular Research*. – 2010. – Т. 85. – № 4. – С. 845-852.
270. Wilensky, R. L. Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and atherosclerosis / R. L. Wilensky, C. H. Macphee // *Current Opinion in Lipidology*. – 2009. – Т. 20. – № 5. – С. 415-420.
271. Vickers, K. C. Lyso-phosphatidylcholine induces osteogenic gene expression and phenotype in vascular smooth muscle cells / K. C. Vickers, F. Castro-Chavez, J. D. Morrisett // *Atherosclerosis*. – 2010. – Т. 211. – № 1. – С. 122-129.
272. PCSK9 siRNA suppresses the inflammatory response induced by oxLDL through inhibition of NF-κB activation in THP-1-derived macrophages / Z. Tang, L. Jiang, J. Peng [и др.] // *International Journal of Molecular Medicine*. – 2012. – Т. 30. – № 4. – С. 931-938.
273. Cardamonin inhibits osteogenic differentiation of human valve interstitial cells and ameliorates aortic valve calcification via interfering in the NF-κB/NLRP3 inflammasome pathway / C. Wang, Y. Xia, L. Qu [и др.] // *Food & Function*. – 2021. – Т. 12. – № 23. – С. 11808-11818.
274. McCracken, E. Pathophysiology of the metabolic syndrome / E. McCracken, M. Monaghan, S. Sreenivasan // *Clinics in Dermatology*. – 2018. – Т. 36. – № 1. – С. 14-20.
275. Oxidized low-density lipoprotein, angiotensin II and increased waist circumference are associated with valve inflammation in prehypertensive patients with aortic stenosis / N. Côté, P. Pibarot, A. Périen [и др.] // *International Journal of Cardiology*. – 2010. – Т. 145. – № 3. – С. 444-449.

276. Early thrombosis risk in patients with biologic valves in the aortic position / M. L. Brown, S. J. Park, T. M. Sundt, H. V. Schaff // *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. – 2012. – T. 144. – № 1. – С. 108-111.
277. Subclinical leaflet thrombosis in surgical and transcatheter bioprosthetic aortic valves: an observational study / T. Chakravarty, L. Søndergaard, J. Friedman [и др.] // *Lancet* (London, England). – 2017. – Т. 389. – Subclinical leaflet thrombosis in surgical and transcatheter bioprosthetic aortic valves. – № 10087. – С. 2383-2392.
278. Detection and Prediction of Bioprosthetic Aortic Valve Degeneration / T. R. G. Carlidge, M. K. Doris, S. L. Sellers [и др.] // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2019. – Т. 73. – № 10. – С. 1107-1119.
279. von Willebrand Factor and Management of Heart Valve Disease: JACC Review Topic of the Week / E. Van Belle, F. Vincent, A. Rauch [и др.] // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2019. – Т. 73. – von Willebrand Factor and Management of Heart Valve Disease. – № 9. – С. 1078-1088.
280. Transcatheter aortic valve implantation leads to a restoration of von Willebrand factor (VWF) abnormalities in patients with severe aortic stenosis - Incidence and relevance of clinical and subclinical VWF dysfunction in patients undergoing transfemoral TAVI / A. Sedaghat, H. Kulka, J.-M. Sinning [и др.] // *Thrombosis Research*. – 2017. – Т. 151. – С. 23-28.
281. A collagen-like peptide stimulates tyrosine phosphorylation of syk and phospholipase C gamma2 in platelets independent of the integrin alpha2beta1 / J. Asselin, J. M. Gibbins, M. Achison [и др.] // *Blood*. – 1997. – Т. 89. – № 4. – С. 1235-1242.
282. Roberts, D. E. Mechanism of collagen activation in human platelets / D. E. Roberts, A. McNicol, R. Bose // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Т. 279. – № 19. – С. 19421-19430.
283. Study of the calcification of bovine pericardium: analysis of the implication of lipids and proteoglycans / J.-H. E, F. P, G. M, C.-O. JI. – Text : electronic // *Biomaterials*. – 1991. – Vol. 12. – Study of the calcification of bovine pericardium. – № 7. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1742413/> (date accessed: 05.10.2024).
284. Inhibition of the calcification of porcine valve tissue by selective lipid removal / J.-H. E, F. P, de la T. N [et al.]. – Text : electronic // *Biomaterials*. – 1994. – Vol. 15. – № 10. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7986946/> (date accessed: 05.10.2024).
285. Lipid extraction attenuates the calcific degeneration of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses / M. A. Rossi, D. M. Braile, M. D. Teixeira [и др.] // *Journal of Experimental Pathology* (Oxford, England). – 1990. – Т. 71. – № 2. – С. 187-196.
286. Effect of ethanol and ether in the prevention of calcification of bioprostheses / M. Shen, A. Kara-Mostefa, L. Chen [и др.] // *The Annals of Thoracic Surgery*. – 2001. – Т. 71. – № 5 Suppl. – С. S413-416.

287. Ghadially, F. N. As you like it, Part 3: A critique and historical review of calcification as seen with the electron microscope / F. N. Ghadially // *Ultrastructural Pathology*. – 2001. – T. 25. – As you like it, Part 3. – № 3. – C. 243-267.
288. Boskey, A. L. Extraction of a calcium-phospholipid-phosphate complex from bone / A. L. Boskey, A. S. Posner // *Calcified Tissue Research*. – 1976. – T. 19. – № 4. – C. 273-283.
289. Schoen, F. J. Bioprosthetic heart valve calcification: membrane-mediated events and alkaline phosphatase / F. J. Schoen, R. J. Levy // *Bone and Mineral*. – 1992. – T. 17. – Bioprosthetic heart valve calcification. – № 2. – C. 129-133.
290. Role of lipids in calcification of cartilage / B. D. Boyan, Z. Schwartz, L. D. Swain, A. Khare // *The Anatomical Record*. – 1989. – T. 224. – № 2. – C. 211-219.
291. Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism / W. Jahnen-Dechent, A. Heiss, C. Schäfer, M. Ketteler // *Circulation Research*. – 2011. – T. 108. – № 12. – C. 1494-1509.
292. Thompson, B. Arterial calcification and bone physiology: role of the bone-vascular axis / B. Thompson, D. A. Towler // *Nature Reviews. Endocrinology*. – 2012. – T. 8. – Arterial calcification and bone physiology. – № 9. – C. 529-543.
293. Calcium-binding phospholipids as a coating material for implant osteointegration / S. M, R.-W. W, O. J [et al.]. – Text : electronic // *Journal of the Royal Society, Interface*. – 2006. – Vol. 3. – № 7. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16849237/> (date accessed: 05.10.2024).
294. Caveolin-1 in extracellular matrix vesicles secreted from osteoblasts / N. Sawada, Y. Taketani, N. Amizuka [и др.] // *Bone*. – 2007. – T. 41. – № 1. – C. 52-58.
295. Kim, K. M. Cells, rather than extracellular matrix, nucleate apatite in glutaraldehyde-treated vascular tissue / K. M. Kim // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 2002. – T. 59. – № 4. – C. 639-645.
296. How to make a heart valve: from embryonic development to bioengineering of living valve substitutes / M. D, L. G, D.-M. A [et al.]. – Text : electronic // *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. – 2014. – Vol. 4. – How to make a heart valve. – № 11. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25368013/> (date accessed: 05.10.2024).
297. Neomycin and carbodiimide crosslinking as an alternative to glutaraldehyde for enhanced durability of bioprosthetic heart valves / J. Leong, A. Munnelly, B. Liberio [и др.] // *Journal of Biomaterials Applications*. – 2013. – T. 27. – № 8. – C. 948-960.
298. Role of elastin in pathologic calcification of xenograft heart valves / B. Mt, P. S, X. H, V. Nr. – Text : electronic // *Journal of biomedical materials research. Part A*. – 2003. – Vol. 66. – № 1. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12833435/> (date accessed: 05.10.2024).
299. Procyanidins-crosslinked aortic elastin scaffolds with distinctive anti-calcification and biological properties / X. Wang, W. Zhai, C. Wu [и др.] // *Acta Biomaterialia*. – 2015. – T. 16. – C. 81-93.

300. Hyaluronic acid grafting mitigates calcification of glutaraldehyde-fixed bovine pericardium / R. Ohri, S. K. Hahn, A. S. Hoffman [и др.] // *Journal of Biomedical Materials Research. Part A.* – 2004. – Т. 70. – № 2. – С. 328-334.
301. D, R. Neomycin prevents enzyme-mediated glycosaminoglycan degradation in bioprosthetic heart valves / R. D, S. Dt, V. Nr. – Text: electronic // *Biomaterials.* – 2007. – Vol. 28. – № 18. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17353047/> (date accessed: 05.10.2024).
302. Enzyme-oxidative-polymerization method for improving glycosaminoglycans stability and reducing calcification in bioprosthetic heart valves / Y. Lei, Q. Ning, Y. Xia, Y. Wang // *Biomedical Materials (Bristol, England).* – 2019. – Т. 14. – № 2. – С. 025012.
303. Collagen fibre-mediated mechanical damage increases calcification of bovine pericardium for use in bioprosthetic heart valves / A. Whelan, E. Williams, E. Fitzpatrick [и др.] // *Acta Biomaterialia.* – 2021. – Т. 128. – С. 384-392.
304. Moroni, F. Decellularized matrices for cardiovascular tissue engineering / F. Moroni, T. Mirabella // *American Journal of Stem Cells.* – 2014. – Т. 3. – № 1. – С. 1-20.
305. In vivo xenogeneic scaffold fate is determined by residual antigenicity and extracellular matrix preservation / W. Ml, W. Jl, V. N, G. Lg. – Text: electronic // *Biomaterials.* – 2016. – Vol. 92. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27031928/> (date accessed: 05.10.2024).
306. Wong, M. L. Immunogenicity in xenogeneic scaffold generation: antigen removal vs. decellularization / M. L. Wong, L. G. Griffiths // *Acta Biomaterialia.* – 2014. – Т. 10. – Immunogenicity in xenogeneic scaffold generation. – № 5. – С. 1806-1816.
307. Changes of the Structural and Biomechanical Properties of the Bovine Pericardium after the Removal of α -Gal Epitopes by Decellularization and α -Galactosidase Treatment / J. Nam, S.-Y. Choi, S.-C. Sung [и др.] // *The Korean Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.* – 2012. – Т. 45. – № 6. – С. 380-389.
308. The effect of detergents on the basement membrane complex of a biologic scaffold material / F. Dm, C. Ca, W. Hj [et al.]. – Text: electronic // *Acta biomaterialia.* – 2014. – Vol. 10. – № 1. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24055455/> (date accessed: 05.10.2024).
309. Supramolecular structure of human aortic valve and pericardial xenograft material: atomic force microscopy study / J. M, M. I, B. B [et al.]. – Text: electronic // *Journal of materials science. Materials in medicine.* – 2008. – Vol. 19. – Supramolecular structure of human aortic valve and pericardial xenograft material. – № 1. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17597365/> (date accessed: 05.10.2024).
310. Hydration of glutaraldehyde-fixed pericardium tissue: Raman spectroscopic study / M. Jastrzebska, R. Wrzalik, A. Kocot [и др.] // *Journal of Raman Spectroscopy.* – 2003. – Т. 34. – № 6. – С. 424-431.
311. Multifactor analysis on the effect of collagen concentration, cross-linking and fiber/pore orientation on chemical, microstructural, mechanical and biological properties of collagen type I scaffolds / E. Suesca,

- A. M. A. Dias, M. E. M. Braga [и др.] // *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*. – 2017. – Т. 77. – С. 333-341.
312. Wess, T. J. Changes in Collagen Structure: Drying, Dehydrothermal Treatment and Relation to Long Term Deterioration / T. J. Wess, J. P. Orgel // *Thermochimica Acta*. – 2000. – Т. 351. – № 1-2. – С. 119-128.
313. Collagen dehydration / R. G. Haverkamp, K. H. Sizeland, H. C. Wells, C. Kamma-Lorger // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2022. – Т. 216. – С. 140-147.
314. Liu, Z. Z. Effect of bovine pericardial extracellular matrix scaffold niche on seeded human mesenchymal stem cell function / Z. Z. Liu, M. L. Wong, L. G. Griffiths // *Scientific Reports*. – 2016. – Т. 6. – С. 37089.
315. Способ повышения биосовместимости перикардальных биоматериалов для реконструктивной хирургии / И. С. Фадеева, В. С. Акатов, А. И. Звягина, [и др.]. – 2019. – URL: <https://patents.google.com/patent/RU2678966C1/ru?q=ru2678966> (дата обращения: 05.10.2024). – Текст : электронный.
316. McInnes, A. D. Preparation and Use of Decellularized Extracellular Matrix for Tissue Engineering / A. D. McInnes, M. A. J. Moser, X. Chen // *Journal of Functional Biomaterials*. – 2022. – Т. 13. – № 4. – С. 240.
317. Fernández-Pérez, J. The impact of decellularization methods on extracellular matrix derived hydrogels / J. Fernández-Pérez, M. Ahearne // *Scientific Reports*. – 2019. – Т. 9. – № 1. – С. 14933.
318. Lumpkins, S. B. A mechanical evaluation of three decellularization methods in the design of a xenogeneic scaffold for tissue engineering the temporomandibular joint disc / S. B. Lumpkins, N. Pierre, P. S. McFetridge // *Acta Biomaterialia*. – 2008. – Т. 4. – № 4. – С. 808-816.
319. Effects of tissue fixation and dehydration on tendon collagen nanostructure / M. J. Turunen, H. Khayyeri, M. Guizar-Sicairos, H. Isaksson // *Journal of Structural Biology*. – 2017. – Т. 199. – № 3. – С. 209-215.
320. Leo, L. Reversible processes in collagen dehydration: A molecular dynamics study / L. Leo, M. G. Bridelli, E. Polverini // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2021. – Т. 714. – Reversible processes in collagen dehydration. – С. 109079.
321. Lai, J.-Y. Glutaraldehyde cross-linking of amniotic membranes affects their nanofibrous structures and limbal epithelial cell culture characteristics / J.-Y. Lai, D. H.-K. Ma // *International Journal of Nanomedicine*. – 2013. – Т. 8. – С. 4157-4168.
322. Stability and mechanical evaluation of bovine pericardium cross-linked with polyurethane prepolymer in aqueous medium / B. Mendoza-Novelo, D. I. Alvarado-Castro, J. L. Mata-Mata [и др.] // *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*. – 2013. – Т. 33. – № 4. – С. 2392-2398.

323. Progressive Reinvention or Destination Lost? Half a Century of Cardiovascular Tissue Engineering / P. Zilla, M. Deutsch, D. Bezuidenhout [и др.] // *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. – 2020. – Т. 7. – Progressive Reinvention or Destination Lost? – С. 159.
324. Arginine-grafted porcine pericardium by copolymerization to improve the cytocompatibility, hemocompatibility and anti-calcification properties of bioprosthetic heart valve materials / X. Liang, C. Zheng, K. Ding [и др.] // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2022. – Т. 10. – № 29. – С. 5571-5581.
325. Decellularization and engineered crosslinking: a promising dual approach towards bioprosthetic heart valve longevity / P. Human, C. Ofoegbu, H. Ilsley [и др.] // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery*. – 2020. – Т. 58. – Decellularization and engineered crosslinking. – № 6. – С. 1192-1200.
326. Age-related enhanced degeneration of bioprosthetic valves due to leaflet calcification, tissue crosslinking, and structural changes / Y. Xue, A. P. Kossar, A. Abramov [и др.] // *Cardiovascular Research*. – 2023. – Т. 119. – № 1. – С. 302-315.
327. Tough pNAGA hydrogel hybridized porcine pericardium for the pre-mounted TAVI valve with improved anti-tearing properties and hemocompatibility / L. Jin, H. He, F. Yang [и др.] // *Biomedical Materials (Bristol, England)*. – 2020. – Т. 15. – № 6. – С. 065013.
328. Luo, Y. A novel detergent-based decellularization combined with carbodiimide crosslinking for improving anti-calcification of bioprosthetic heart valve / Y. Luo, S. Huang, L. Ma // *Biomedical Materials (Bristol, England)*. – 2021. – Т. 16. – № 4.
329. Cross-Linking Methacrylated Porcine Pericardium by Radical Polymerization Confers Enhanced Extracellular Matrix Stability, Reduced Calcification, and Mitigated Immune Response to Bioprosthetic Heart Valves / L. Jin, G. Guo, W. Jin [и др.] // *ACS biomaterials science & engineering*. – 2019. – Т. 5. – № 4. – С. 1822-1832.
330. Лилли, Р. Д. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Р. Д. Лилли. – Пер. с англ./Под ред. и с предисл. чл.-кор. АМН В.В. Португалова. – Москва : МИР, 1969. – 645 с.
331. In Vitro Calcification of Bioprosthetic Heart Valves: Investigation of Test Fluids / N. Kiesendahl, C. Schmitz, A. Von Berg [и др.] // *Annals of Biomedical Engineering*. – 2020. – Т. 48. – In Vitro Calcification of Bioprosthetic Heart Valves. – № 1. – С. 282-297.
332. Розанова, И. Б. Механизм первичных стадий кальцификации биоматериалов : Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / И. Б. Розанова. – Москва, 1995. – 218 с.
333. Toroian, D. The size exclusion characteristics of type I collagen: implications for the role of noncollagenous bone constituents in mineralization / D. Toroian, J. E. Lim, P. A. Price // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – Т. 282. – The size exclusion characteristics of type I collagen. – № 31. – С. 22437-22447.

334. Toroian, D. The essential role of fetuin in the serum-induced calcification of collagen / D. Toroian, P. A. Price // *Calcified Tissue International*. – 2008. – T. 82. – № 2. – C. 116-126.
335. Price, P. A. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is required for the calcification of collagen in serum: a possible mechanism for biomineralization / P. A. Price, D. Toroian, W. S. Chan // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – T. 284. – Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is required for the calcification of collagen in serum. – № 7. – C. 4594-4604.
336. Minerals form a continuum phase in mature cancellous bone / P.-Y. Chen, D. Toroian, P. A. Price, J. McKittrick // *Calcified Tissue International*. – 2011. – T. 88. – № 5. – C. 351-361.
337. Comparison of detergent-based decellularization protocols for the removal of antigenic cellular components in porcine aortic valve / L. X, L. N, G. D [et al.]. – Text : electronic // *Xenotransplantation*. – 2018. – Vol. 25. – № 2. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29446183/> (date accessed: 28.10.2024).
338. Efficient decellularization for bovine pericardium with extracellular matrix preservation and good biocompatibility / N. Li, Y. Li, D. Gong [и др.] // *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*. – 2018. – T. 26. – № 5. – C. 768-776.
339. Usha, R. Structure and conformation of intramolecularly cross-linked collagen / R. Usha, T. Ramasami // *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*. – 2005. – T. 41. – № 1. – C. 21-24.
340. Norde, W. Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface / W. Norde // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 1986. – T. 25. – № 4. – C. 267-340.
341. Serum Albumin in Health and Disease: Esterase, Antioxidant, Transporting and Signaling Properties / D. A. Belinskaia, P. A. Voronina, V. I. Shmurak [и др.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – T. 22. – Serum Albumin in Health and Disease. – № 19. – C. 10318.
342. Laurie, S. H. Transport and storage of metals / S. H. Laurie // *Journal of Inherited Metabolic Disease*. – 1983. – T. 6 Suppl 1. – C. 9-14.
343. Kragh-Hansen, U. Quantitative analyses of the interaction between calcium ions and human serum albumin / U. Kragh-Hansen, H. Vorum // *Clinical Chemistry*. – 1993. – T. 39. – № 2. – C. 202-208.
344. Long chain fatty acids alter the interactive binding of ligands to the two principal drug binding sites of human serum albumin / K. Yamasaki, S. Hyodo, K. Taguchi [и др.] // *PloS One*. – 2017. – T. 12. – № 6. – C. e0180404.
345. Vusse, G. J. van der. Albumin as fatty acid transporter / G. J. van der Vusse // *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. – 2009. – T. 24. – № 4. – C. 300-307.
346. Aguanno, J. Influence of fatty acids on the binding of calcium to human albumin. Correlation of binding and conformation studies and evidence for distinct differences between unsaturated fatty acids and saturated fatty acids / J. Aguanno, J. H. Ladenson // *Journal of Biological Chemistry*. – 1982. – T. 257. – № 15. – C. 8745-8.