БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 1, с. 160–167

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 57.085.23: 617-089.844

ПАССИВНЫЙ АСЕПТИЧЕСКИЙ КАЛЬЦИНОЗ ФИКСИРОВАННЫХ ПЕРИКАРДИАЛЬНЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ ОПОСРЕДОВАН НАРУШЕНИЯМИ СТРУКТУРЫ И МИКРОАРХИТЕКТОНИКИ ИХ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

© 2022 г. А.И. Звягина*, А.И. Даль*, В.В. Минайчев*, О.А. Краснова*,, В.С. Акатов*, И.С. Фадеева*,****

**Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пущино Московской области, Институтская ул., 3*

***Пущинский государственный естественно-научный институт, 142290, Пущино Московской области, просп. Науки, 3*

E-mail: fadeeva.iteb@gmail.com

Поступила в редакцию 09.09.2021 г.
После доработки 09.09.2021 г.
Принята к публикации 06.10.2021 г.

Изучен механизм пассивного (независимого от клеток реципиента) асептического кальциноза фиксированных глутеральдегидом перикардиальных материалов, используемых для изготовления биопротезов клапанов сердца, а также определена зависимость интенсивности кальцификации от степени повреждения структуры и микроархитектоники их внеклеточного матрикса. Методом сканирующей электронной микроскопии исследован микрорельеф поверхности внутреннего серозного слоя перикарда экспериментальных и контрольных материалов с определением степени деламинации и интенсивности микроповреждений в зависимости от типа предимплантационной обработки. Для определения склонности к асептическому кальцинозу фиксированных биоматериалов с интактным и поврежденным внеклеточным матриксом проведено исследование степени кальцифилаксии образцов при их инкубации в модельных условиях нормокальциемии *in vitro*. Показана прямая зависимость интенсивности кальцификации фиксированных биоматериалов от степени повреждения их внеклеточного матрикса.

Ключевые слова: биоматериалы, ксеногенный перикард, сердечно-сосудистая хирургия, асептический кальциноз, деламинация, внеклеточный матрикс.

DOI: 10.31857/S0006302922010173

Дисфункция клапанов сердца является третьим по частоте сердечно-сосудистым заболеванием после ишемической болезни сердца и системной артериальной гипертензии [1–3]. При этом в большинстве случаев фармакотерапия пороков клапанов сердца совершенно неэффективна и хирургическая замена поврежденного клапана соответствующим функциональным заменителем (трансплантатом или протезом клапана сердца) или реконструктивная операция по коррекции клапанного порока сердца является единственным способом лечения данной группы заболеваний [4]. В свою очередь, развитие антитромбогенной хирургии клапанов сердца [5] привлекло особое внимание ученых к разработке способов получения неиммуногенных биологических материалов на основе донорских тканей (преимущественно ксеноперикарда), которые применяются как для изготовления биопротезов клапанов сердца, так и для различных реконструктивно-восстановительных и клапан-сберегающих операций [2, 4–6]. Несмотря на несомненные преимущества биологических заменителей клапанов сердца перед механическими, склонность используемых биоматериалов к патологической асептической кальцификации (кальцинозу) в организме реципиента приводит к высокому проценту вторичных дисфункций биопротезов клапанов сердца и, следовательно, необходимости высокотравматичных реопераций, что связано с дополнительным риском летального исхода для пациента [4, 6–8]. Таким образом, разработка технологий получения биологических материалов, не подверженных кальцинозу, по-прежнему является острой и востребованной задачей.

Сокращение: ГА – глутаровый альдегид.

В свою очередь, разработка эффективных технологий подавления способности биоматериалов к развитию кальциноза должна базироваться на ясном понимании механизмов инициации данного патологического процесса в организме реципиента. Однако на сегодняшний день патофизиология дегенерации биопротезных клапанов изучена недостаточно, а триггеры асептического кальциноза неизвестны [9]. При этом накоплено достаточно много экспериментальных данных, указывающих на потенциальные механизмы кальциноза биологических протезов клапанов сердца. В частности, рассматриваются предположения о связи инициации кальциноза фиксированной ткани с компонентами погибших клеток донора и апоптотическими тельцами [2, 10–13], компонентами тканевого матрикса (коллагеном I типа, фибронектином, эластином) [14-17], кальцийсвязывающими белками (Gla-протеины, остеокальцин, остеопонтин, остеонектин, фетуин-А) и фосфопротеинами [18, 19], щелочной фосфатазой [20, 21], липидами [22–24] митохондриями погибших клеток донора или погибающих на биопротезе клеток реципиента [25, 26] и т.д. На основании клинических наблюдений также установлено, что кальциноз интенсифицируется при молодом возрасте реципиента и повышенных механических нагрузках на биопротез [10].

Одновременно с вышесказанным известно, что фиксация биологических тканей таким кросс-сшивающим агентом как глутаровый альдегид (ГА) также может способствовать кальцинозу имплантированной ткани [4, 10, 11, 13], однако вариативность полученных клинических данных от пациентов одной возрастной группы, получивших биопротезы клапанов сердца, фиксированные стандартным раствором ГА без кэппирования, но подвергшиеся различным протоколам децеллюляризации/девитализации, указывают на то, что непосредственно сам технологический процесс предимплантационной обработки вносит существенный вклад в инициацию асептического кальциноза имплантированной ткани. Помимо вышесказанного известно, что непосредственно стабилизированная ГА ткань бипротезов обладает контактным токсическим эффектом, вследствие чего наблюдаемый на ранних стадиях кальциноз является преимущественно пассивным физико-химическим процессом и осуществляется без участия клеток реципиента [4, 27]. Ранее мы установили, что повреждения внеклеточного матрикса трансплантатов клапанов сердца, вызванные различными протоколами децеллюляризации, напрямую способствуют развитию кальцификации имплантированной ткани вне зависимости от участия в данном процессе клеток реципиента [25, 28, 29], и полагаем, что предложенный ранее механизм асептического кальциноза трансплантатов клапанов сердца, опосредованный повреждениями ультраструктуры их внеклеточного матрикса также применим по отношению к биопротезам клапанов сердца на основе ксеноперикарда.

Таким образом, цель настоящей работы состояла в том, чтобы оценить, насколько кальцификация тканей ксеноперикарда, используемого для изготовления биопротезов клапанов сердца, определяется повреждениями его внеклеточного матрикса. Для достижения поставленной цели исследовали степень повреждения поверхности внутреннего серозного слоя (*p. serosum*) фрагментов ксеноперикарда после стандартных и матрикс-сберегающих протоколов децеллюляризации и сравнили полученные результаты со степенью пассивной, независимой от клеток реципиента кальцификации ткани (кальцифилаксии) при инкубации образцов в модельных средах, имитирующих внутреннюю среду организма с нормальным содержанием кальция в среде (модельная нормокальциемия) *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все исследуемые материалы изготавливали в лабораторных условиях с учетом требований, предъявляемых к производству искусственных клапанов сердца [30]. В качестве основного материала использовали бычий перикард, полученный от половозрелых животных, имеющих соответствующие ветеринарные свидетельства. Перикарды извлекали не позднее чем через 1 ч после забоя животных и помещали в стерильный физиологический раствор (0.9% NaCl) с добавлением гентамицина (400 мкг/мл) и флуконазола (20 мкг/мл). После доставки в лабораторию при 2–8°C (не позднее чем через 8 ч после забоя и извлечения) нативный материал очищали физически и отмывали от крови в физиологическом растворе с гепарином (5000 ЕД/100 мл, Московский эндокринный завод, Москва). После очищения и отмывки от гепарина часть материалов хранили в стерильном физиологическом растворе в качестве нативного нулевого контроля при 4°C (группа К.0). Часть материалов подвергали стандартной химической стабилизации 0.625%-м раствором глутарового альдегида (Applichem GmbH, Германия) с последующей процедурой децеллюляризации в 1.0%-м растворе додецилсульфата натрия (группа ЭК.1) (по ТУ 9444-003-01897446-2011, данный способ обработки является самым распространенным и активно используется в клинической практике). Часть материалов подвергали щадящей децеллюляризации в растворе липофильных детергентов низкой концентрации по методике, описанной в работе [31], с последующей химической стабилизацией раствором мономерного глутарового альдегида при комнатной

температуре (группа Э1.0). Часть материалов подвергали также щадящей децеллюляризации в растворе липофильных детергентов низкой концентрации (по аналогии с группой Э1.0), но химическую стабилизацию проводили в растворе полимеризованного ГА при 38°С с целью улучшения степени химической стабилизации ткани и снижения количества реакционно способных групп ГА (группа Э1.1). Группы ЭК.1, Э1.0 и Э1.1 после процесса химической стабилизации хранили в стандартном общепринятом консервирующем растворе, представляющем собой 0.1% ГА в 20%-м растворе этилового спирта.

Также часть образцов была обработана аналогично группе Э1.0, но после процесса химической стабилизации в мономерном ГА дополнительно хранилась в 4%-м растворе пропиленоксида по методике, описанной в работе [32] (группа Э2.0). Соответственно часть образцов была обработана по аналогии с группой Э1.1, но после процесса химической стабилизации в полимеризованном ГА при температуре 38°С дополнительно хранилась в 4%-м растворе пропиленоксида по вышеуказанной методике (группа Э2.1). Данные группы (Э2.0 и Э2.1) были включены в эксперимент, поскольку консервация в пропиленоксиде является достаточно распространенным методом хранения бипротезов клапанов сердца, но данные о влиянии такого способа хранения материалов на сохранность матрикса и степень их кальцифилаксии в литературе не представлены. Все манипуляции с материалами проводили в стерильных условиях ламинарного бокса класса IIa (Lamsystems, Россия) с использованием стерильных растворов.

По завершении были получены следующие группы материалов сравнения:

К.0 – нативный перикард, контроль сравнения;

ЭК.1 – образцы, обработанные по стандартному протоколу предимплантационной обработки, включающему децеллюляризацию с фиксацией в мономерном ГА и хранение в стандартном консервирующем растворе;

Э1.0 – образцы, обработанные по протоколу матрикс-сберегающей децеллюляризации с фиксацией в мономерном ГА при комнатной температуре, хранение в стандартном консервирующем растворе;

Э1.1 – образцы, обработанные по протоколу матрикс-сберегающей децеллюляризации с фиксацией в полимеризованном ГА при температуре 38°С, хранение в стандартном консервирующем растворе;

Э2.0 – образцы, обработанные по протоколу матрикс-сберегающей децеллюляризации с фиксацией в мономерном ГА при комнатной температуре, хранение в 4%-м растворе пропиленоксида;

Э2.1 – образцы, обработанные по протоколу матрикс-сберегающей децеллюляризации с фиксацией в полимеризованном ГА при температуре 38°С, хранение в 4%-м растворе пропиленоксида.

Сканирующая электронная микроскопия. Для оценки степени повреждения внеклеточного матрикса образцов после каждого типа предимплантационной обработки оценивали микрорельеф поверхности *p. serosum* перикардиальных материалов с помощью сканирующей электронной микроскопии. Для анализа фрагменты образцов всех исследуемых групп разрезали на квадратные пластинки площадью 1 см^2 (для каждой группы $n = 6$) и предварительно замораживали в течение 12 ч при –80°С с помощью низкотемпературного морозильника Premium U410 (New Brunsweek, США). Затем замороженные образцы, закрепленные в подвешенном состоянии на специальных держателях карусельного типа, помещали в колбы лиофильной сушилки FreeZone 2.5 L Benchtop Freeze Dry System (Labconco, США) и лиофилизировали в течение 24 ч. 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 проводили съемку при давлении $7.3 \cdot 10^{-2}$ Па в колонне и $1.5 \cdot 10^{-1}$ Па в камере.

Моделирование условий нормокальциемии *in vitro*. Для определения степени пассивной физико-химической минерализации биоматериалов после воздействия стандартных и матрикс-сберегающих протоколов предимплантационной обработки, образцы групп сравнения инкубировали в модельных средах, имитирующих условия сыворотки крови и тканевой жидкости с нормальным содержанием кальция и фосфатов. Известно, что в условиях гиперкальциемии наблюдается ускоренное и в том числе пассивное (независимое от клеток реципиента) осаждение кальциевых депозитов на тканях бипротезов клапанов сердца [11, 33]. При этом данные о влиянии нормальных концентраций кальция на степень кальцифилаксии фиксированных перикардиальных материалов в литературе практически не представлены. В качестве модельной среды инкубации, имитирующей сыворотку крови, был выбран 5%-й раствор бычьего сывороточного альбумина фракции V (стандартные референсные значения [34] (Amresco, США)) в фосфатно-солевом буфере по рекомендациям Kiesendahl и др. [33] без ионов магния с добавлением 2.5 мМ $CaCl_2$ [33, 35, 36] (Panreac Quimica, Испания)

Оценка степени повреждения/деламинации образцов

Группа	Степень повреждения после обработки в % от общей площади поверхности *p. serosum*
К.0	0.8 ± 0.1%
ЭК.1	80.9 ± 8.9%*
Э1.0	12.1 ± 3.5%*
Э2.0	10.9 ± 2.1%*
Э1.1	26.1 ± 8.2%*, **
Э2.1	79.1 ± 5.5%*, ***

Примечание. * – $p < 0.05$ относительно контроля, ** – $p < 0.05$ относительно группы Э1.0, *** – $p < 0.05$ относительно группы Э2.0.

Исследуемые материалы нарезали в ламинарном боксе на фрагменты размером 6 × 4 × 1 мм ($n = 6$ для каждой группы) и помещали в инкубационный раствор в соотношении 1 : 30 (v/v). Инкубацию проводили в шейкере-инкубаторе ES-20/60 (BioSan, Латвия) в течение 6 недель при 30 об/мин и температуре 37°C. Замену среды на свежую осуществляли также в стерильных условиях каждые 48 ч.

Измерение минерализованного кальция методом абсорбционной спектроскопии. Содержание кальция во фрагментах тканей исследуемых групп определяли методом абсорбционной спектроскопии. Из различных областей нативных и обработанных материалов до и после инкубации в модельных средах получали фрагменты размером 2 × 2 мм ($n = 6$), которые затем высушивали в течение 2 ч при 100°C в сухожаровом шкафу (Binder, Германия) и измеряли сухой вес образцов. Затем каждый высушенный фрагмент помещали в 0.5 мл 1 н HCl (для растворения минерализованного кальция) на 24 ч при 20–25°C. В дальнейшем проводили измерение количества минерализованного кальция в растворе с помощью стандартного набора для определения кальция Calcium AS FS Arsenazo III (DiaSys, Германия), используя планшетный спектрофлуориметр Infinity F200 (Tecan, Австрия). Расчет значений минерализованного кальция в образцах (в мкг кальция на мг сухого веса ткани) проводили согласно инструкции производителя. Для расчета количества кальция по показателям оптической плотности в лунках с экспериментальными образцами использовали уравнение для аппроксимации калибровочной кривой. 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 (10 мг/дл) добавляли аликвоту соляной кислоты, равную аликвоте опытных образцов.

Статистический анализ. Результаты усредняли по шести образцам и определяли среднеквадратическую ошибку. Результаты исследований представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего. Все эксперименты проводили не менее чем в трех повторах ($n \geq 3$). Статистическую значимость отличий определяли с помощью ANOVA с последующим множественным сравнением Холм–Сидака или критерия Манна–Уитни для двух групп сравнения, $p \geq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии. Для всех групп был детализированно изучен микрорельеф поверхности *p. serosum* с оценкой степени повреждения/деламинации образцов, выраженной в % от общей площади анализа. Поверхность *p. serosum* перикардиальных материалов является наиболее важной для оценки, поскольку подвергается основным гидравлическим ударам тока крови и наибольшему механическому воздействию. Процентное содержание микроповреждений поверхности перикардиальных материалов оценивали по оцифрованным изображениям поверхности *p. serosum* (не менее десяти областей анализа с каждого образца), полученных при одинаковом увеличении. Анализ проводили методом прямого подсчета участков перфорации, разволокнения и продольных микроразрывов поверхности и измерения площади оголения подлежащего под *p. serosum* коллагенового слоя. Оценку степени повреждения проводили в сравнении с нативным контролем – фрагментами перикарда без какой-либо обработки (группы К.0). Результаты представлены в таблице и на рис. 1 и 2.

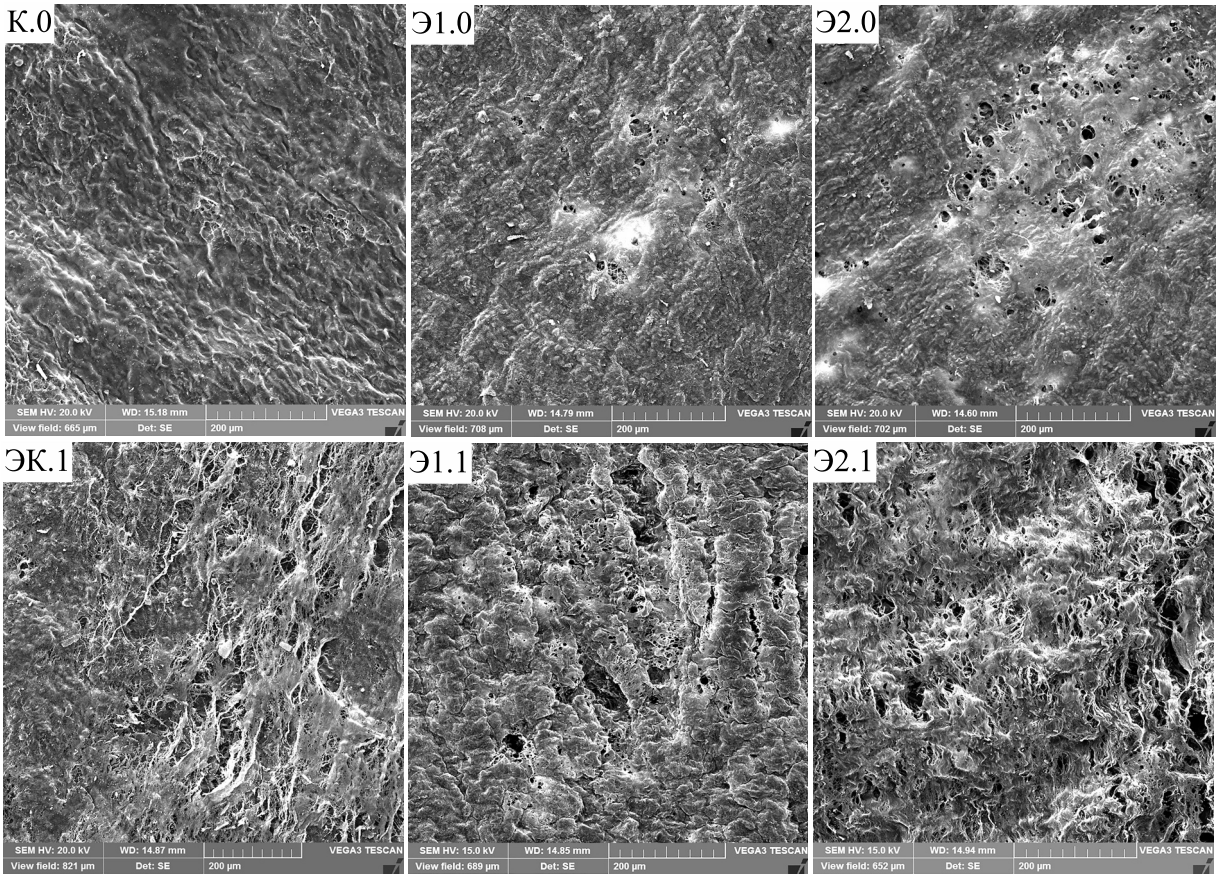

Рис. 1. Сканирующая электронная микроскопия поверхности *p. serosum* образцов контрольной и экспериментальных групп фиксированных перикардиальных материалов после полного цикла предимплантационной обработки, общий план (пояснения в тексте).

Было выявлено, что наименее поврежденной по отношению к контролю является поверхность материалов групп Э1.0 и Э2.0, т. е. групп, обработанных по протоколу матрикс-сберегающей децеллюляризации с последующей фиксацией в мономерном ГА при комнатной температуре; степень повреждения *p. serosum* образцов данных групп составила 12.1 ± 3.5% и 10.9 ± 2.1% соответственно. Более выраженная степень повреждения – 26.1 ± 8.2% от всей площади образца – наблюдалась для поверхности материалов группы Э1.1, обработанных в аналогии с группами Э1.0, но с последующей фиксацией в полимеризованном ГА при температуре 38°С. Наибольшая степень повреждения наблюдалась для образцов групп ЭК.1 и Э2.1 и составила 80.9 ± 8.9% и 79.1 ± 5.5% соответственно.

На рис. 1 представлены сводные микрофотографии типичных поверхностей *p.serosum* образцов ксеноперикарда после различных вариантов предимплантационной обработки и хранения, полученные методом сканирующей электронной микроскопии. Видно, что наименьшая степень повреждения наблюдается для образцов групп Э1.0 и Э2.0, а наибольшая степень повреждения – для образцов ЭК.1 и Э2.1.

При большем увеличении в образцах группы нативного контроля выявлен надлежащий над поверхностью гладкий сиропообразный слой, покрывающий сверху коллагеновый матрикс, представляющий собой гликозоаминогликаны базальной ламины поверхности *p. serosum*. При сравнительном анализе обнаружено, что данный слой сохранен в образцах групп Э1.0, Э2.0 и частично группы Э1.1, но практически полностью отсутствует в образцах групп ЭК.1 и Э2.1 (рис. 2).

В группах ЭК.1 и Э2.1 повреждения гликозаминогликанового слоя и деламинация достигали 80% от площади всей исследованной поверхности, при этом в подлежащем слое коллагенового матрикса дополнительно наблюдались признаки частичного продольного разволокнения и микроразрывы коллагеновых волокон.

Полученные данные свидетельствуют о том, что стандартная децеллюляризация 1%-м раствором додецилсульфата натрия обладает выражен-

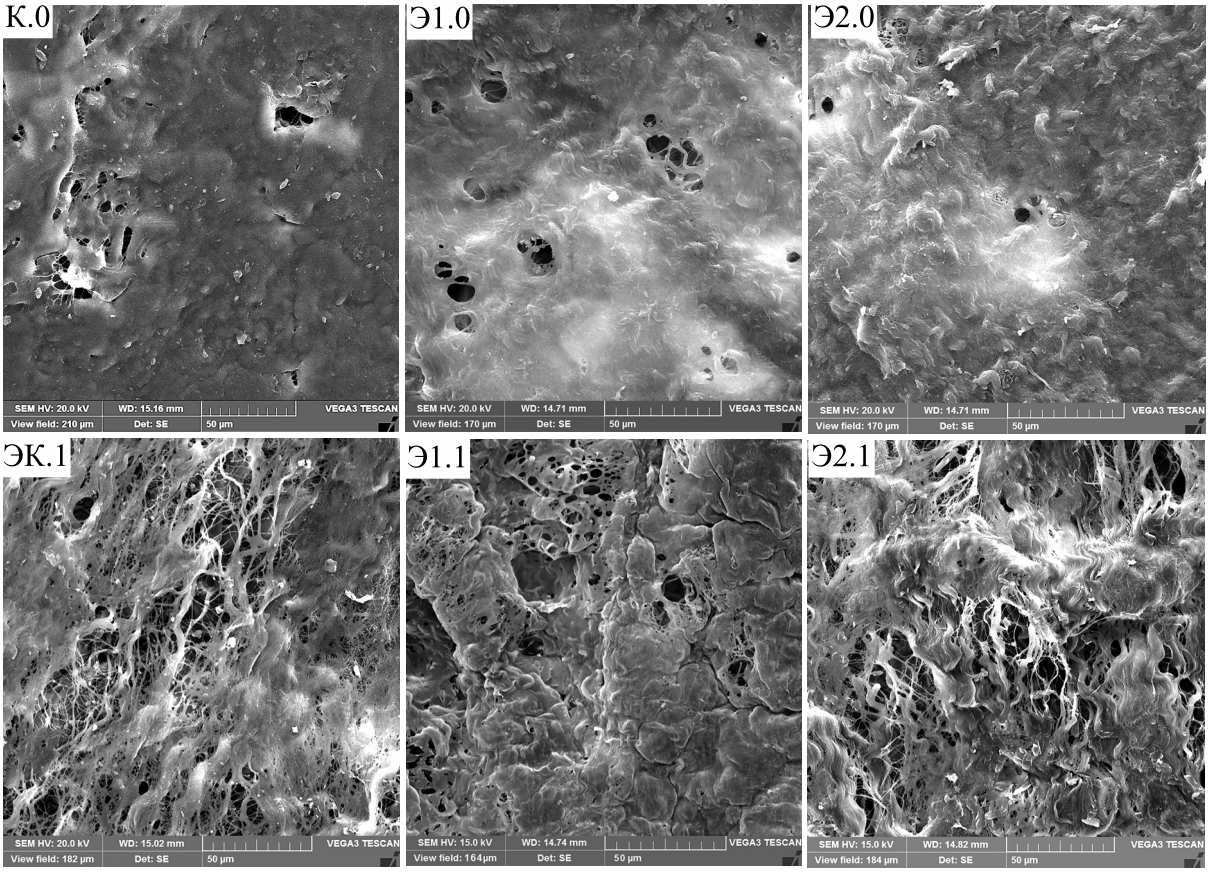

Рис. 2. Сканирующая электронная микроскопия поверхности образцов *p. serosum* и подлежащего коллагенового слоя контрольной и экспериментальных групп фиксированных перикардиальных материалов после полного цикла предимплантационной обработки, крупный план (пояснения в тексте).

ным повреждающим воздействием на внеклеточный матрикс *p. serosum* образцов, при этом выявлено, что даже при использовании матрикс-сберегающей децеллюляризации дальнейшая фиксация в полимеризованном ГА при температуре 38°С оказывает выраженное повреждающее воздействие на внеклеточный матрикс перикардиальных материалов. При этом значимая и достоверная разница в степени повреждения для групп Э1.1 и Э2.1 свидетельствует о том, что консервация в 4%-м растворе пропиленоксида после процедуры химической стабилизации в ГА при температуре 38°С дополнительно повреждает внеклеточный матрикс материалов.

Результаты измерения кальция. Способность материалов пассивно осаждать на себе фосфаты кальция (степень кальцифилаксии) исследовали в модельных условиях *in vitro* при инкубации в растворах, имитирующих сыворотку крови с нормальным содержанием кальция. Через шесть недель инкубации количество адсорбированного кальция на материалах измеряли спектрофотометрически. Выявлено, что наибольшая степень минерализации матрикса была свойственна для образцов, имевших наибольшую же степень повреждения внеклеточного матрикса. Сводные результаты измерения минерализованного кальция и оценки степени повреждения ВКМ групп сравнения представлены на рис. 3.

Из рисунка видно, что нативный контроль минерализовался достаточно активно, что объясняется наличием в матриксе перикарда клеток донора и клеточного дебриса, которые, как известно, могут выступать центрами инициации пассивного кальциноза [2, 10–13]. В случае материалов, подвергшихся децеллюляризации (удалению клеток донора) выявлена прямая корреляция между степенью повреждения внеклеточного матрикса и интенсивностью пассивного осаждения минерализованного кальция на компонентах внеклеточного матрикса.

Выявленная достоверная разница ($p < 0.001$) между нативным контролем (К.0) и группой Э1.0 свидетельствует о том, что матрикс-сберегающая децеллюляризация с последующей фиксацией в ГА при комнатной температуре в значительной

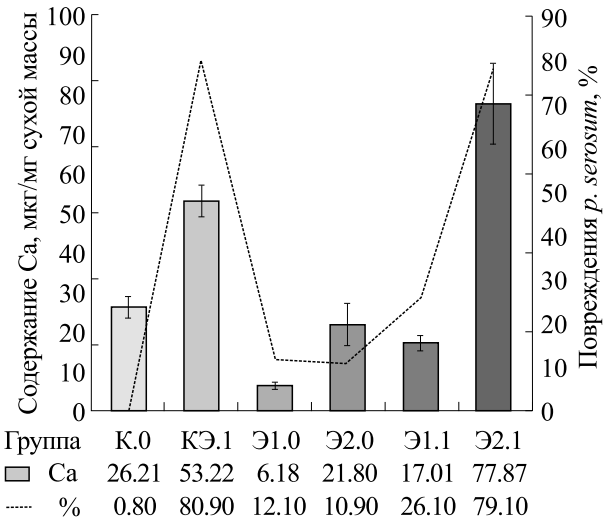

Рис. 3. Сводный график степени кальцифилаксии контрольной и экспериментальных групп фиксированных перикардиальных материалов после 45 суток инкубации в модельной среде, имитирующей сыворотку крови в условиях нормокальциемии, в сравнении со степенью повреждения *p. serosum* данных групп, выраженной в процентах.

степени подавляет способность химически-стабилизированного материала абсорбировать на себе фосфаты кальция. При этом выявленная достоверная разница в степени кальцификации между группами К.0 и КЭ.1 ($p < 0.001$), а также группами К.0, КЭ.1 и Э1.0 ($p < 0.001$) отчетливо свидетельствует о том, что процесс матрикс-сберегающей децеллюляризации является определяющим этапом предимплантационной обработки перикардиальных материалов для придания им свойства кальциноз-резистентности.

При этом статистически достоверная разница между группами Э1.0 и Э2.0 ($p < 0.05$) и группами Э1.1 и Э2.1 ($p < 0.05$), обработанных с той лишь разницей, что группы Э2.0 и Э2.1 хранились в консервирующем 4%-м растворе пропиленоксида, свидетельствует о том, что либо непосредственно технологический процесс консервации, либо процесс перехода пропиленоксида в пропиленгликоль могут способствовать дополнительному повреждению внеклеточного матрикса либо образованию дополнительных реакционных групп, способствующих осаждению фосфатов кальция на компонентах внеклеточного матрикса. Это требует отдельных детализированных исследований. В свою очередь, выявленная достоверная разница в степени кальцификации ($p < 0.01$) между группами Э1.0 и Э1.1, отличающихся способом химической стабилизации в мономерном (Э1.0) и полимеризованном (Э1.1) глутеральдегиде также свидетельствует о том, что непосредственно технологический процесс фиксации ткани (предположительно, использование нефизиологической температуры в 38°C) способствуют повреждению ультраструктуры внеклеточного матрикса и абсорбции фосфатов кальция на его компонентах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют, что пассивная физико-химическая минерализация химически стабилизированных глутеральдегидом ксеноперикардиальных материалов, используемых для изготовления биопротезов клапанов сердца, напрямую зависит от степени повреждения их внеклеточного матрикса вследствие процесса предимплантационной обработки. Дополнительно выявлено, что консервация и хранение фиксированного ГА биоматериала в 4%-м растворе пропиленоксида может дополнительно способствовать осаждению фосфатов кальция на компонентах внеклеточного матрикса материалов и что данное явление требует дополнительных детализированных исследований, поскольку влияние консервирующих растворов на степень кальцифилаксии перикардиальных материалов является практически не изученным.

БЛАГОДАРНОСТИ

При выполнении работы была использована приборная база Центра коллективного пользования ИТЭБ РАН.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-315-90101.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. B. R. Lindman, M.-A. Clavel, P. Mathieu, et al., Nat. Rev. Dis. Primers **3** (2), 16006 (2016).
2. О.Б. Аникеева, О.В. Павленко, С.Н. Титов и др., Аналитич. вестн. **44**, 597 (2015).

3. А. Карпантье, *Реконструктивная хирургия клапанов сердца по Карпантье: от анализа клапана к его реконструкции* (Логосфера, М., 2019).
4. D. Dvir, T. Bourguignon, C. M. Otto, et al., Circulation **137** (4), 388 (2018).
5. B. Zhang, E. Salaun, N. Côté, et al., J. Am. Coll. Cardiol. **76** (15), 1737 (2020).
6. P. R. Vogt, H. Brunner-LaRocca, P. Sidler et al., Eur. J. Cardiothorac. Surg. **17** (2), 134 (2000).
7. T. R. G. Cartlidge, M. K. Doris, S. L. Sellers, et al., J. Am. Coll. Cardiol. **73** (10), 1107 (2019).
8. F. J. Schoen and R. J. Levy, Ann. Thorac. Surg. **79** (3), 1072 (2005).
9. E. Aikawa and M. C. Blaser, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **41** (1), 117 (2021).
10. F. Ghadially, Ultrastruct. Pathol. **25**, 243 (2001).
11. K. E. Watson, F. Parhami, V. Shin, et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **18**, 1964 (1998).
12. J. S. Lee, D. M. Basalyga, A. Simionescu, et al., Am. J. Pathol. **168** (2), 490 (2006).
13. M. A. Bowler and W. D. Merryman, Cardiovasc. Pathol. **24** (1), 1 (2015).
14. M. T. Bailey, S. Pillarisetti, H. Xiao, et al., J. Biomed. Mater. Res A **66** (1), 93 (2003).
15. W. Jahnen-Dechent, A. Heiss, C. Schäfer, et al., Circ. Res. **108** (12), 1494 (2011).
16. M. Santin, W. Rhys-Williams, J. O'Reilly, et al., J. R. Soc. Interface **3** (7), 277 (2006).
17. M. Hui and H. C. Tenenbaum, Anat. Rec. (New Anat.). **253**, 91 (1998).
18. P. A. Price, D. Toroian, and W. S. Chan, J. Biol. Chem. **284** (7), 4594 (2009).
19. H. A. Baba, M. Deiwick, D. Breukelmann, et al. Pathologe **19** (6), 420 (1998).
20. E. Jorge-Herrero, P. Fernández, N. de la Torre, et al., Biomaterials **15** (10), 815 (1994).
21. R. Shetty, P. Pibarot, A. Audet, et al., Eur. J. Clin. Invest. **39** (6), 471 (2009).
22. В. С. Акатов, И. С. Фадеева, А. В. Чеканов и др., Биофизика **55** (5), 937 (2010).
23. В. С. Акатов, Н. И. Рындина, Р. М. Муратов и др. Докл. РАН **406** (6), 832 (2006).
24. E. Gendler, S. Gendler, and M. E. Nimni, J. Biomed. Mater. Res. **18** (7), 727 (1984).
25. В. С. Акатов, *Кальцификация трансплантатов клапанов сердца и сосудов: механизмы кальцификации и ее предотвращение* (Akademikerverlag Publ., Saarbrucken, 2012).
26. И. С. Фадеева, Дис. ... канд. биол. наук (ИТЭБ РАН, Пущино, 2013).
27. ГОСТ 26997-2002 Клапаны сердца искусственные. Общие технические условия (с попр. ИУС N 6-2004) (2004).
28. И. С. Фадеева, Патент РФ №2678966, № 4 (2019).
29. W. M. L. Neethling, Patent WO 2013/067598 Al (2013).
30. N. Kiesendahl, C. Schmitz, A. von Berg, et al., Ann. Biomed. Eng. **48**, 282 (2020).
31. В. М. Лифшиц, *Лабораторные тесты у здоровых людей* (Триада-Х, М., 2004).
32. J. J. Grzesiak and M. D. Pierschbacher, J. Clin. Invest. **95** (1), 227 (1995).
33. P. A. Price, W. S. Chan, and D. M. Jolson, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **26** (5), 1079 (2006).

Passive Aseptic Calcification of Fixed Pericardial Biomaterials Is Mediated by Damage to the Structure and Microarchitectonics of Its Extracellular Matrix

A.I. Zvyagina*, A.I. Dal*, V.V. Minaychev*, O.A. Krasnova*, **, V.S. Akatov*, and I.S. Fadeeva*, **

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Pushchino State Natural Science Institute, prosp. Nauki 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

Our research focused on understanding the mechanism of passive (independent of recipient cells) aseptic calcification of pericardial materials fixed with gluteraldehyde used to produce bioprosthetic heart valves. Also, the dependence of the intensity of calcification on the degree of damage to the structure and microarchitectonics of their extracellular matrix was determined. The microrelief of the surface of *p. serosum* of experimental and control materials was studied by scanning electron microscopy. The degree of delamination was estimated and the intensity of micro-injuries was evaluated depending on the type of preimplantation treatment. In order to assess the propensity for aseptic calcinosis of fixed biomaterials with intact and damaged extracellular matrix, the degree of calciphylaxis of samples during their incubation under model conditions of normocalcemia *in vitro* was investigated. It was shown that the intensity of calcification of fixed biomaterials was in direct dependence on the degree of damage to their extracellular matrix.

Keywords: biomaterials, xenogenic pericardium, cardiovascular surgery, aseptic calcification, delamination, extracellular matrix