DOI: 10.15825/1995-1191-2025-1-135-144

ИССЛЕДОВАНИЕ ГИСТОАРХИТЕКТОНИКИ БЫЧЬЕГО ПЕРИКАРДА КАК ОСНОВНОГО МАТЕРИАЛА, ИСПОЛЬЗУЕМОГО В РЕКОНСТРУКТИВНОЙ ХИРУРГИИ И БИОПРОТЕЗИРОВАНИИ

А.И. Звягина¹, К.В. Пятина¹, В.В. Минайчев¹, М.И. Кобякова¹, Я.В. Ломовская¹, А.С. Сенотов¹, А.Ю. Тетерина², И.С. Фадеева¹

¹ ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук», Пущино, Российская Федерация

² ФГБУН «Институт металлургии и материаловедения имени А.А. Байкова Российской академии наук», Москва, Российская Федерация

Цель: изучить состав и топологию внеклеточного матрикса бычьего перикарда и определить наиболее оптимальные области ткани, подходящие для изготовления сердечно-сосудистых биопротезов (ССБ). Материалы и методы. Исследовали образцы перикарда здоровых половозрелых быков; нативный перикард разделялся на экспериментальные группы: область основной ткани (группа БП-ОТ), область основания сердца (БП-ОС) и область основания соединительной связки (БП-СВ). Проводили исследование структуры поверхностей перикарда (*p. serosum* и *p. fibrosum*) методом сканирующей электронной микроскопии, а также особенностей топологии различных областей перикарда методами дифференциального гистохимического анализа с выявлением и количественным определением основных компонентов внеклеточного матрикса (коллаген, эластин, липиды и гликозаминогликаны). Квантификацию осуществляли методами биоимиджинга и цифрового анализа гистологических изображений с использованием программного обеспечения ImageJ. Результаты. Наиболее низкой клеточной плотностью, и соответственно, содержанием ДНК (369,75 \pm 23,12 нг/мг), а также наиболее гомогенным, преимущественно коллагеновым (95,6 \pm 2,9%) составом матрикса с минимальным содержанием липидов ($2,6 \pm 1,5\%$), гликозаминогликанов ($0,68 \pm 0,7\%$) и эластина (3 ± 2,4%) обладала группа БП-ОТ. Наибольшее содержание эластина и гликозаминогликанов было обнаружено в группе БП-СВ (27.8 ± 3 и $17.5 \pm 0.6\%$ соответственно), а липидов – в группе БП-ОС (21,2 ± 2,7%.). Со стороны *p. serosum* наблюдалась выраженная гомогенность состава ВКМ, при этом локализация эластиновых волокон, гликозаминогликанов и липидных скоплений в данных группах наблюдалась преимущественно со стороны *p. fibrisum*, что указывает на природную полярность материала, которую необходимо учитывать при разработке биоматериалов. Заключение. По результатам исследования выявлена неоднородность топологии бычьего перикарда в различных областях ткани. Сравнительная гомогенность состава ВКМ и относительно низкая клеточная плотность указывают, что для изготовления биопротезов клапанов сердца может быть использована только основная ткань перикарда. Высокое содержание эластина, гликозаминогликанов и липидов в отдельных областях перикарда (группы БП-ОС и БП-СВ) указывает на необходимость либо более тщательного удаления данного слоя при изготовлении имплантатов (например, за счет техник селективной очистки), либо использования данных областей ткани перикарда там, где гетерогенность состава является более предпочтительной (например, в челюстно-лицевой и ортопедической хирургии).

Ключевые слова: бычий ксеноперикард, топология перикарда, внеклеточный матрикс, сердечнососудистые биопротезы, кальциноз.

Для корреспонденции: Звягина Алена Игоревна. Адрес: 142290, Московская обл., Пущино, ул. Институтская, д. 3. Тел. (960) 600-93-00. E-mail: alennazvyagina@gmail.com

Corresponding author: Alena Zvyagina. Address: 3, Institutskaya str., Pushchino, 142290, Russian Federation. Phone: (960) 600-93-00. E-mail: alennazvyagina@gmail.com

INVESTIGATION OF THE HISTOARCHITECTURE OF BOVINE PERICARDIUM AS THE PRIMARY MATERIAL USED IN RECONSTRUCTIVE SURGERY AND BIOPROSTHESIS

A.I. Zvyagina¹, K.V. Pyatina¹, V.V. Minaiychev¹, M.I. Kobyakova¹, Ya.V. Lomovskaya¹, A.S. Senotov¹, A.Yu. Teterina², I.S. Fadeeva¹

¹ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Moscow, Russian Federation ² Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science, Moscow, Russian Federation

Objective: to study the composition and topology of the extracellular matrix (ECM) of bovine pericardium and to identify the best tissue areas suitable for the fabrication of bioprosthetic heart valves (BHVs). Materials and methods. The pericardium samples of healthy sexually mature bulls were studied; the native pericardium was divided into three experimental groups: core tissue (BP-CT group), heart base (BP-HB) and connective ligament base (BP-CL). Scanning electron microscopy was used to examine the structure of the pericardial surfaces (p. serosum and *p. fibrosum*), while differential histochemical analysis was used to study the topology of various pericardial regions, with identification and quantification of the main constituents of the extracellular matrix (ECM) (collagen, elastin, lipids, and glycosaminoglycans). Quantification was performed by bioimaging and digital analysis of histological images using the ImageJ software. Results. The BP-CT group had the lowest cellular density and, consequently, DNA content ($369.75 \pm 23.12 \text{ ng/mg}$), in addition to having the most homogeneous, predominantly collagenous (95.6 \pm 2.9%) matrix composition with minimal lipid (2.6 \pm 1.5%), glycosaminoglycan (0.68 \pm 0.7%) and elastin $(3 \pm 2.4\%)$ content. The BP-CL group had the highest levels of elastin and glycosaminoglycans $(27.8 \pm$ 3% and $17.5 \pm 0.6\%$, respectively), while the BP-HB group had the highest lipid content ($21.2 \pm 2.7\%$). On the *p. serosum* side, the ECM composition was noticeably homogeneous, while elastin fibers, glycosaminoglycans, and lipid clusters were predominantly found on the *p. fibrisum* side, indicating the natural polarity of the material, which should be considered when fabricating biomaterials. Conclusion. The findings in this study revealed that bovine pericardial topology varied depending on the tissue area. Only the main pericardial tissue can be used to create BHVs, as evidenced by the comparative homogeneity of ECM composition and relatively low cellular density. The high content of elastin, glycosaminoglycans and lipids in specific pericardial tissue areas (the BP-HB and BP-CL groups) suggests that either this layer needs to be removed more thoroughly during implant fabrication (e.g., by selective purification techniques) or these pericardial tissue areas should be used where heterogeneity of the composition is desired (e.g., in maxillofacial and orthopedic surgery).

Keywords: bovine xenopericardium, pericardial topology, extracellular matrix, bioprosthetic heart valves, calcification.

ВВЕДЕНИЕ

Ксеногенные серозные оболочки находят все более широкое применение в качестве основы, используемой при изготовлении широкого ряда имплантируемых биоматериалов [1]. Так, бычий ксеноперикард (БП) – фиксированный, децеллюляризированный и делипидизированный – является одним из наиболее распространенных биоматериалов в современной сердечно-сосудистой хирургии [2]. Множество видов биопротезов и иных вспомогательных сердечно-сосудистых биоматериалов изготавливают из бычьего перикарда: биопротезы клапанов сердца, венозные и артериальные кондуиты, сердечно-сосудистые патчи и заплаты и др. [1, 3, 4]. Однако такие биоматериалы из БП в организме реципиента склонны к кальцинозу, из-за чего срок службы изготовленных из них имплантатов довольно-таки ограничен, что на сегодняшний день является одной из самых актуальных проблем реконструктивной сердечно-сосудистой хирургии [5–7].

Одновременно с вышесказанным известно, что состав внеклеточного матрикса (ВКМ) перикарда может влиять на общую тканевую и клеточную реакцию организма на имплантируемый материал [8, 9]. Так, например, показано, что белки базальной мембраны перикарда оказывают положительное воздействие на миграцию, адгезию, пролиферацию, уровень воспалительной реакции и выработку ламинина эндотелиальными клетками аорты человека, что, в свою очередь, способствует одному из важнейших показателей биоинтеграции ССБ – реэндотелизации. Помимо этого, существующие на сегодняшний день данные позволяют предположить, что склонность ССБ к кальцинозу также может зависеть от состава ВКМ перикарда. Так, например, эластиновые волокна являются известными центрами кальцификации биоматериалов [10, 11]. Эластин – это ключевой белок, который составляет основу стенок сосудов (преимущественно артерий), дермы и межальвеолярных перегородок легких. Известно, что при повреждении он может накапливать соли кальция и становиться центром кальцификации сосудов эластического типа при таких заболеваниях, как ассоциированная с почечной или эндокринной недостаточностью гиперфосфатемия, диабет, атеросклероз, pseudoxanthoma elasticum, β-талассемия, кальциноз Монгеберга, ревматоидный артрит, синдром Синглтона-Мертена, вторичный гиперпаратиреоз, болезнь Кавасаки, дефицит витамина К (включая варфарина-ассоциированный вариант) и нарушения обмена витамина D [10, 12]. В ряде исследований также было показано, что деградация и фрагментация эластиновых волокон в трансплантатах клапанов сердца и сосудов провоцирует их асептический кальциноз после имплантации в организм реципиента [10–14].

Центрами кальцификации в биоматериалах также могут выступать поврежденные (прежде всего сульфатированные) гликозаминогликаны (ГАГ) [12]. Помимо этого, разрушение протеогликанов (содержащих до 95% ГАГ) как основных молекул, отвечающих за стабилизацию коллагеновых волокон, приводит к обнажению зон зазора (H-zone) на коллагеновых фибриллах и способствует осаждению фосфатов кальция непосредственно во внеклеточном матриксе материалов [15].

На важную роль вышеуказанных компонентов матрикса в кальцификации биопротезов клапанов сердца указывают активные разработки методов антикальцинозной обработки биоматериалов, направленных именно на стабилизацию эластина и ГАГ. Многочисленные исследования показали, что стабилизация гликозаминогликанов и эластина помогает уменьшить кальцификацию ССБ [16–19].

Кроме того, клеточная плотность – одна из важнейших характеристик донорской ткани, используемой для изготовления биоматериалов, поскольку мембраны клеток несут основные антигены, инициирующие отторжение имплантата [20]. Критически важное значение данный показатель имеет именно для биопротезов клапанов сердца, так как помимо иммунологического отторжения остаточные липиды клеточных мембран могут спровоцировать инициацию пассивного асептического кальциноза [21, 22]. Важно отметить, что несмотря на многолетний опыт использования децеллюляризирующих и делипидизирующих агентов для обработки и удаления клеток и клеточного дебриса, полное удаление липидов из ткани может быть труднодостижимой задачей, требующей соблюдения идеального баланса между эффективностью делипидизации и сохранением структурно-механических свойств конечного биоматериала [23]. При этом ядерное ДНК, как самая прочная молекула, с трудом поддается разрушению и удалению из ткани в процессе децеллюляризации и дополнительно может выступать источником фосфатов, также способствующим кальцификации [24].

На сегодняшний день ведется активный поиск оптимальных областей перикарда, наиболее подходящих для изготовления биоматериалов [2], при этом существующие исследования явно демонстрируют, что локализация и состав кальцинатов биопротезов клапанов сердца во многом зависит от типа донорской ткани, из которой был изготовлен протез [25]. В данном направлении исследований для изготовления биопротезов клапанов сердца критически важно учитывать такие параметры донорской ткани, как содержание эластина, ГАГ, липидов и клеточную плотность ткани. Однако на сегодняшний день для бычьего перикарда такие данные отсутствуют, а все имеющиеся рекомендации основаны преимущественно на физических характеристиках ткани, таких как биомеханическая прочность и эластичность, обусловленных в первую очередь анизотропией и ориентацией волокон. Поскольку данных о специфике гистоархитектоники и состава бычьего перикарда, полученных с помощью методов дифференциальной гистохимии, в научной литературе обнаружено не было, в данном исследовании был проведен комплексный гистохимический анализ внеклеточного матрикса нативного перикарда быка с целью выявления тех областей ткани, которые обладают наиболее однородным коллагеновым составом с минимальным содержанием эластина, ГАГ и липидов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ Объект исследования

Образцы перикарда, полученные от половозрелых здоровых быков, были переданы для исследования бойней мясокомбината «Калужская нива АПК» (Калужская область, д. Торкотино). Весь полученный материал в течение 30 минут после забоя помещали в стерильный 0,9% раствор хлорида натрия с добавлением гентамицина (400 мкг/мл) и флуконазола (50 мкг/мл), а затем транспортировали в лабораторию в термоконтейнере при 2–8 °С. После доставки в лабораторию, не позднее чем через 4 часа после забоя и извлечения, перикард очищали механически от жира и отмывали от крови в 0,9% растворе NaCl с добавлением 5000 ЕД/100 мл гепарина (Московский эндокринный завод, Россия).

После очищения и отмывки от гепарина стерильным холодным 0,9% раствором хлорида натрия фрагменты перикарда разделяли на три исследуемые группы, в зависимости от области ткани (рис. 1):



Рис. 1. Зоны забора исследуемых фрагментов нативного перикарда. БП-ОС – зона у основания сосудов; БП-ОТ – основная часть ткани; БП-СВ – зона у основания связок

Fig. 1. Sampling areas of the studied fragments of the native pericardium. $\Box \Pi$ -OC – vessel base zone; $\Box \Pi$ -OT – main part of tissue; $\Box \Pi$ -CB – ligament base zone

область основной ткани (группа БП-ОТ), область перикарда у основания сердца (БП-ОС) и область основания соединительной связки (БП-СВ).

Сканирующая электронная микроскопия

Структуру поверхностей фрагментов БП (площадью 1 см²) в лиофилизированном состоянии оценивали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ, VEGA III, Tescan, Чехия). Для наиболее точного отображения структуры поверхности и предотвращения разрушения компонентов матрикса нативной ткани использовали матрикссберегающую лиофилизацию, включающую быструю глубокую заморозку фрагментов ткани в лабораторном кельвенаторе при -80 °C (до условной точки эвтектики -57 °C) и лиофилизацию в течение 24 ч в колбах лиофильной сушки (FreeZone 2.5 Liter Benchtop Freeze Dry System, Labconco, Канада) в подвешенном состоянии (избегая контакта образцов с поверхностью колбы).

После лиофилизации токопроводящее покрытие на поверхности исследуемых фрагментов формировали напылением частиц золота в вакуумном распылителе Q150R ES (Quorum Technologies, Англия). Для всех исследуемых фрагментов проводили анализ микрорельефа серозной (*p. serosum*) и фиброзной (*p. fibrosum*) поверхностей.

Количественное определение ДНК

Для определения количества ДНК отбирали фрагменты БП весом 20 мг,
 $n \geq 5$ для каждой исследуемой

группы. 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 длине волны 260 нм.

Дифференциальный гистологический анализ

Для выявления специфики нативной структуры ВКМ БП при получении гистологических препаратов использовались методы криотомии, позволяющие избежать вымывания липидов и сморщивания тканей вследствие обезвоживания, а также изменения архитектоники матрикса материалов. Для этого фрагменты БП фиксировали в 10% забуференном нейтральном формалине при 22 ± 2 °С не менее 24 часов, промывали проточной водой от излишков фосфатов и заключали в криосреду О.С.Т. Compound Tissue Tek (Sakura, Япония). Срезы толщиной 9 мкм получали на криотоме MEV (SLEE medical GmbH, Германия).

Гистологические препараты окрашивали с использованием гистологических и дифференциальных гистохимических окрасок: гематоксилином-эозином, суданом III (для идентификации липидов), трихромом по Лилли (для идентификации коллагена), по Вейерхгофу–Ван-Гизону (для идентификации эластина) и альциановым синим – ШИК-реакцией (для идентификации ГАГ) [26].

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

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). В каждой группе анализировали не менее 4 гистотопограмм, представляющих собой спличинг в среднем 35 ± 15 стандартных изображений ×4 ув.

Биоимиджинг микрофотографий проводили путем наложения цветовых масок на изображения и подсче-

та площади маски относительно всего среза образца, наблюдаемого в поле зрения (2000×2000 мкм). Площадь, занимаемая искомым компонентом (коллаген, эластин, липиды и ГАГ), выражалась в процентах от общей площади оцениваемого фрагмента среза.

Статистический анализ

Результаты исследований 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–Сидака (p < 0,05). 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), Scipy (v. 1.5.2) 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).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для всех групп был детально изучен микрорельеф поверхностей *p. serosum* и *p. fibrosum*, как наиболее важных структур ткани биопротеза, принимающих на себя основной гидравлический удар тока крови в системном кровотоке.

Благодаря использованию щадящих методов лиофилизации материалов и криотомии для всех исследуемых групп был выявлен надлежащий над поверхностью коллагенового матрикса нежный «сиропообразный» гликозоаминогликановый слой (рис. 2). При этом при сравнительном анализе обнаружено,



Рис. 2. Структура поверхностей *p. serosum* и *p. fibrosum* бычьего перикарда в различных областях ткани: область основной ткани (группа БП-ОТ), область перикарда у основания сердца (БП-ОС) и у основания соединительной связки (БП-СВ), сканирующая электронная микроскопия

Fig. 2. Surface structure of the *p. serosum* and *p. fibrosum* of bovine pericardium in different tissue areas: core tissue area (BP-CT group), pericardial region at the heart base (BP-HB group) and at the connective ligament base (BP-CL group). Scanning electron microscopy

что со стороны *p. serosum* подобный слой более плотный и гладкий в группах БП-ОС и БП-СВ, чем в группе БП-ОТ. Наличие подобного неразрушенного ГАГ-слоя, который закрывает собой все склонные к агрегации тромбоцитами и кальцинозу коллагеновые или эластиновые волокна, является важной характеристикой для долговечности и тромборезистентности биопротезов клапанов сердца.

Других отличий в структуре поверхностей исследуемых групп с помощью СЭМ выявлено не было.

При гистохимическом анализе образцов группы БП-ОТ было обнаружено, что матрикс основной тка-

ни перикарда состоит преимущественно из коллагеновых волокон, имеющих волнообразную структуру (рис. 3, а). Общая архитектоника матрикса характеризовалась пористой структурой с наличием большого количества полостей, которые имеют важную физиологическую функцию поддержания биомеханической прочности и тургора перикарда для обеспечения физиологической гипертрофии тканей сердца при физической нагрузке. Также стоит отметить, что в срединной части ВКМ перикарда имелся слой коллагенового матрикса, формирующего особенно крупные полости. В таких крупных полостях матрик-



Рис. 3. Структура и состав матрикса бычьего перикарда в различных областях ткани: область основной ткани (группа БП-ОТ), область основания сердца (БП-ОС) и основания соединительной связки (БП-СВ), световая микроскопия: а – окраска трихромом по Лилли: коллаген – зеленый, неколлагеновые компоненты – красно-коричневые; б – окраска суданом III: липиды – желто-оранжевые; в – окраска альциановым синим – ШИК: кислые ГАГ – голубые, нейтральные ГАГ – розовые; г – окраска по Вейерхгофу–Ван-Гизону: эластин – черный, фон – розовый. В связи с низкой клеточной плотностью и наименьшим содержанием эластина в структуре ВКМ препаратов группы БП-ОТ для удобства восприятия представлены увеличенные фрагменты

Fig. 3. Structure and composition of bovine pericardium matrix in different tissue areas: core tissue area (BP-CT group), heart base area (BP-HB) and connective ligament base (BP-CL). Light microscopy: a – Lillie's trichrome (collagen – green, non-collagen components – red-brown); δ – Sudan III (lipids – yellow-orange); B – Periodic Acid Schiff–Alcian Blue (acidic GAGs – blue, neutral GAGs – pink); Γ – Verhoeff–Van Gieson (elastin – black, background – pink). Due to low cellular density and the lowest elastin content in the ECM structure of preparations in the BP-CT group, enlarged fragments are presented for easy perception

са обнаруживались локальные включения липидов (рис. 3, б). Весь матрикс основной ткани перикарда был равномерно насыщен небольшим количеством нейтральных ГАГ, в то время как наличие кислых ГАГ обнаруживалось только в структуре базальной мембраны, располагающейся со стороны *p. serosum* нативного перикарда (рис. 3, в). 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 *p. fibrosum* (рис. 3, г).

ВКМ образцов группы БП-ОС демонстрировал более плотную укладку коллагеновых волокон. При этом со стороны *p. fibrosum* в ткани наблюдались обширные жировые включения. 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 к эластиновым фибриллам.

Группа БП-СВ характеризовалась значительно более высоким содержанием неколлагеновых компонентов ВКМ. Было выявлено присутствие большого количества эластиновых структур в ткани преимущественно с фиброзной стороны, которые были солокализованы с нейтральными ГАГ. В образцах данной группы обнаруживалось как большое количество липидов в самой ткани, так и наличие крупных липидных депозитов на поверхности *p. fibrosum*.

Гистоморфометрический анализ продемонстрировал, что наиболее однородным и преимущественно коллагеновым составом обладает область перикарда в зоне БП-ОТ, где относительное содержание коллагенового компонента составило $95,6 \pm 2,9\%$ (рис. 4). Наиболее высокое содержание эластина и ГАГ было обнаружено в группе БП-СВ, $27,8 \pm 3$ и $17,5 \pm 0,6\%$ соответственно. В то время как группа БП-ОС характеризовалась самым высоким содержанием липидов, достигавшим $21,2 \pm 2,7\%$.

Наиболее низкая клеточная плотность была обнаружена в основной ткани перикарда (группа БП-ОТ) (рис. 5, а). Данные наблюдения также подтверждались результатами количественного измерения ДНК, где содержание ДНК в группе БП-ОТ составило 369,75 ± 23,12 нг/мг ткани, что более чем в 1,5 и 2,5 раза ниже, чем в группах БП-ОС и БП-СВ соответственно (рис. 5, б).

Из вышеизложенного следует вывод, что основная ткань перикарда (группа БП-ОТ), содержащая наименьшее количество клеток, и следовательно ДНК, является наиболее предпочтительной для техник децеллюляризации, при которых можно достичь полного обесклеточивания (т. е. подавления иммуногенности) и сохранения структуры ВКМ. Кроме того, выявлено, что основная ткань перикарда обладает также и наиболее однородным (преимущественно коллагеновым) составом ВКМ, с низким содержанием липидов, эластина и ГАГ, которые при их повреждении в процессе предимплантационной обработки могут выступать в качестве кальциноз-инициирующих и провоспалительных агентов.

Таким образом, учитывая выявленные характеристики, максимально предпочтительным и безопасным источником биоматериала для изготовления неподверженных кальцинозу и дегенерации биопротезов клапанов сердца и иных вспомогательных сердечно-сосудистых материалов является основная ткань перикарда (область БП-ОТ), в то время как области перикарда у основания сердца (БП-ОС) и основания соединительной связки (БП-СВ) вследствие их гетерогенности и потенциальной способности к минерализации могут быть с успехом использованы для изготовления резорбируемых имплантируемых материалов, например барьерных мембран.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам исследования была показана неоднородность топологии бычьего перикарда в различных областях ткани. Более того, высокое содержание эластина, ГАГ и липидов в отдельных областях перикарда (группы БП-ОС и БП-СВ) демонстрирует важность выявления и отбора оптимальных участков ткани для изготовления биоматериалов, прежде всего биопротезов клапанов сердца, к которым предъявляются самые высокие требования, включая отсутствие иммуногенности, кальциноз- и тромборезистентность, биостойкость, биомеханическая прочность и способность к реэндотелизации.

На основании полученных результатов, включая достоверно высокие показатели гомогенности состава ВКМ, стабильности микроархитектоники, наименьшего количества таких иммуногенных и провоспалительных стимулов, как клетки и липидные фракции перикардиального жира и клеточного дебриса, а также стабильность базальной ламины *p. serosum*, имеющей, как известно, высокий потенциал реэндотелизации, и следовательно, тромборезистентности, непосредственно для изготовления биопротезов клапанов сердца и всех контактирующих с кровью и высоким давлением системного кровотока биоматериалов рекомендуется использовать исключительно область основной ткани ксеноперикарда (БП-ОТ).

В то же время богатые эластином области перикарда могут быть успешно использованы для изготовления других типов биоматериалов, применяемых в иных реконструктивных подходах, например,



Рис. 4. Результаты биоимиджинга и квантификации гистологических изображений бычьего ксеноперикарда в различных топографических зонах: область основной ткани (группа БП-ОТ), область перикарда у основания сердца (БП-ОС), область основания соединительной связки (БП-СВ): а – диаграммы, демонстрирующие состав ткани; общий процент квантифицированных компонентов ВКМ превышает 100% вследствие наложения областей обсчета солокализованных компонентов; б – графики, демонстрирующие соотношение компонентов, n = 16, p < 0,01 (тест Холма–Сидака)

Fig. 4. Results of bioimaging and quantification of histological images of bovine xenopericardium in different topographic areas: core tissue area (BP-CT group), pericardial area at the heart base (BP-HB), connective ligament base area (BP-CL): a – diagrams demonstrating tissue composition; the total percentage of quantified ECM components exceeds 100% owing to the overlap in the color mask areas of co-localized components; δ – graphs demonstrating the ratio of components, n = 16, p < 0.01 (Holm–Sidak test)



Рис. 5. Клеточный состав бычьего перикарда в различных областях ткани: область основной ткани (группа БП-ОТ), область перикарда у основания сердца (БП-ОС), область основания соединительной связки (БП-СВ): а – гистологические изображения, световая микроскопия, окраска гематоксилином-эозином: клеточные ядра – фиолетовые, компоненты матрикса – розовые; б – график, отражающий количественное содержание ДНК, n ≥ 5, p < 0,01 (тест Холма-Сидака)

Fig. 5. Cellular composition of bovine pericardium in different tissue areas: core tissue area (BP-CT group), pericardial area at the heart base (BP-HB), connective ligament base area (BP-CL): a – histological images, light microscopy, H&E stain (cell nuclei – purple, matrix components – pink); 6 – graph showing quantitative DNA content, $n \ge 5$, p < 0.01 (Holm–Sidak test)

в травматологии, ортопедии и челюстно-лицевой хирургии, для изготовления тонких, но прочных и высокоэластичных барьерных мембран, кальцификация которых может быть дополнительным способом индукции остеогенеза в периимплантном ложе.

Публикация настоящей работы поддержана Российским научным фондом, проект № 24-73-10208 «Разработка инжектируемых кальцийфосфатных гидратированных паст для малоинвазивного введения и полярно реминерализованных композитных барьерных мембран с целью направленной регенерации тканей в травматологии и челюстно-лицевой хирургии».

Соблюдение этических стандартов: настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

 Shklover J, McMasters J, Alfonso-Garcia A, Higuita ML, Panitch A, Marcu L, Griffiths L. Bovine pericardial extracellular matrix niche modulates human aortic endothelial cell phenotype and function. Sci Rep. 2019; 9 (1): 16688. doi: 10.1038/s41598-019-53230-1. PMID: 31723198.

- Stieglmeier F, Grab M, König F, Büch J, Hagl C, Thierfelder N. Mapping of bovine pericardium to enable a standardized acquirement of material for medical implants. J Mech Behav Biomed Mater. 2021; 118 (3): 104432. doi: 10.1016/j.jmbbm.2021.104432. PMID: 33853036.
- Texakalidis P, Giannopoulos S, Charisis N, Giannopoulos S, Karasavvidis T, Koullias G, Jabbour P. A meta-analysis of randomized trials comparing bovine pericardium and other patch materials for carotid endarterectomy. J Vasc Surg. 2018; 68 (4): 1241–1256.e1. doi: 10.1016/j.jvs.2018.07.023. PMID: 30244928.
- Morales MM, Anacleto A, Ferreira Leal JC, Greque VG, Souza AS Jr, Wolosker N. Saccular Superior Vena Cava Aneurysm: Case Report and Comprehensive Review. Ann Vasc Surg. 2021; 72: 666.e23–666.e32. doi: 10.1016/j.avsg.2020.10.033. PMID: 33333194.
- 5. Богданов ЛА, Осяев НЮ, Богданова ЮД, Мухамадияров РА, Шабаев АР, Евтушенко АВ, Кутихин АГ. Анализ топографических сценариев формирования очагов кальцификации в дисфункциональных клапанах сердца и атеросклеротических бляшках. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2021; 10 (3): 26–33. Bogdanov LA, Osyaev NYu, Bogdanova YuD, Mukhamadiyarov RA, Shabaev AR, Evtushenko AV, Kutikhin AG. Elemental analysis of valvular and atherosclerotic calcification. Complex Issues

of Cardiovascular Diseases. 2021; 10 (3): 26–33. (In Russ.). doi: 10.17802/2306-1278-2021-10-3-26-33.

- Kostyunin AE, Glushkova TV, Lobov AA, Ovcharenko EA, Zainullina BR, Bogdanov LA et al. Proteolytic Degradation Is a Major Contributor to Bioprosthetic Heart Valve Failure. J Am Heart Assoc. 2023; 12 (1): e028215. doi: 10.1161/JAHA.122.028215.
- Koziarz A, Makhdoum A, Butany J, Ouzounian M, Chung J. Modes of bioprosthetic valve failure: a narrative review. Curr Opin Cardiol. 2020; 35 (2): 123–132. doi: 10.1097/HCO.000000000000711. PMID: 31972604.
- 8. *Wong ML, Griffiths LG.* Immunogenicity in xenogeneic scaffold generation: antigen removal vs. decellularization. *Acta Biomater.* 2014; 10: 1806–1816. doi: 10.1016/j. actbio.2014.01.028.
- Liu ZZ, Wong ML, Griffiths LG. Effect of bovine pericardial extracellular matrix scaffold niche on seeded human mesenchymal stem cell function. Sci Rep. 2016; 6: 37089. doi: 10.1038/srep37089.
- 10. Фадеева ИС. Роль клеток реципиента и нарушения структуры тканевого матрикса в механизме кальцификации трансплантатов сосудов и клапанов сердца: дис. ... канд. биол. наук. Пущино, 2013; 158. Fadeeva IS. The role of recipient cells and tissue matrix structure disorders in the mechanism of calcification of vascular and heart valve transplants: diss. ... Cand. of Biological Sciences. Pushchino, 2013; 158.
- Bailey MT, Pillarisetti S, Xiao H, Vyavahare NR. Role of elastin in pathologic calcification of xenograft heart valves. J Biomed Mater Res A. 2003; 66 (1): 93–102. doi: 10.1002/jbm.a.10543. PMID: 12833435.
- Millán Á, Lanzer P, Sorribas V. The Thermodynamics of Medial Vascular Calcification. Front Cell Dev Biol. 2021; 9: 633465. doi: 10.3389/fcell.2021.633465. PMID: 33937234; PMCID: PMC8080379.
- Simionescu DT, Lovekamp JJ, Vyavahare NR. Extracellular matrix degrading enzymes are active in porcine stentless aortic bioprosthetic heart valves. J Biomed Mater Res A. 2003; 66 (4): 755–763. doi: 10.1002/jbm.a.10066. PMID: 12926026.
- Wang X, Zhai W, Wu C, Ma B, Zhang J, Zhang H et al. Procyanidins-crosslinked aortic elastin scaffolds with distinctive anti-calcification and biological properties. *Acta Biomater.* 2015; 16: 81–93. doi: 10.1016/j.actbio.2015.01.028. PMID: 25641644.
- Wen S, Zhou Y, Yim WY, Wang S, Xu L, Shi J et al. Mechanisms and Drug Therapies of Bioprosthetic Heart Valve Calcification. *Front Pharmacol.* 2022; 13: 909801. doi: 10.3389/fphar.2022.909801. PMID: 35721165; PMCID: PMC9204043.
- Ohri R, Hahn SK, Hoffman AS, Stayton PS, Giachelli CM. Hyaluronic acid grafting mitigates calcification of glutaraldehyde-fixed bovine pericardium. J Biomed Mater Res A. 2004; 70 (2): 328–334. doi: 10.1002/ jbm.a.30088. PMID: 15227678.
- 17. Raghavan D, Simionescu DT, Vyavahare NR. Neomycin prevents enzyme-mediated glycosaminogly-

can degradation in bioprosthetic heart valves. *Bio-materials*. 2007; 28 (18): 2861–2868. doi: 10.1016/j. biomaterials.2007.02.017. PMID: 17353047; PMCID: PMC2262162.

- Leong J, Munnelly A, Liberio B, Cochrane L, Vyavahare N. Neomycin and carbodiimide crosslinking as an alternative to glutaraldehyde for enhanced durability of bioprosthetic heart valves. J Biomater Appl. 2013; 27 (8): 948–960. doi: 10.1177/0885328211430542. PMID: 22207605.
- 19. Lei Y, Ning Q, Xia Y, Wang Y. Enzyme-oxidative-polymerization method for improving glycosaminoglycans stability and reducing calcification in bioprosthetic heart valves. *Biomed Mater.* 2019; 14 (2): 025012. doi: 10.1088/1748-605X/aafd7c. PMID: 30630147.
- Cravedi P, Farouk S, Angeletti A, Edgar L, Tamburrini R, Duisit J et al. Regenerative immunology: the immunological reaction to biomaterials. *Transpl Int.* 2017; 30 (12): 1199–1208. doi: 10.1111/tri.13068. PMID: 28892571; PMCID: PMC6697146.
- Ghadially FN. As you like it, Part 3: A critique and historical review of calcification as seen with the electron microscope. Ultrastruct Pathol. 2001; 25 (3): 243–267. doi: 10.1080/019131201300343874. PMID: 11465480.
- 22. *Boskey AL, Posner AS.* Extraction of a calcium-phospholipid-phosphate complex from bone. *Calcif Tissue Res.* 1976; 19 (4): 273–283. doi: 10.1007/BF02564010. PMID: 3268.
- Neishabouri A, Khaboushan AS, Daghigh F, Kajbafzadeh AM, Zolbin MM. Decellularization in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Evaluation, Modification, and Application Methods. Front Bioeng Biotechnol. 2022; 10: 805299. doi: 10.3389/ fbioe.2022.805299.
- 24. Coscas R, Bensussan M, Jacob MP, Louedec L, Massy Z, Sadoine J et al. Free DNA precipitates calcium phosphate apatite crystals in the arterial wall *in vivo*. Atherosclerosis. 2017; 259: 60–67. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.03.005.
- 25. Глушкова ТВ, Костюнин АЕ. Структура кальцификатов в биопротезах клапанов сердца, консервированных диглицидиловым эфиром этиленгликоля. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2021; 10 (2): 16–24. Glushkova TV, Kostyunin AE. Calcification of bioprosthetic heart valves treated with ethylene glycol diglycidyl ether. Complex Issues of Cardiovascular Diseases. 2021; 10 (2): 16–24. (In Russ.). doi: 10.17802/2306-1278-2021-10-2-16-24.
- 26. Лилли РД. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.: МИР, 1969; 645. *Lilly RD*. Pathohistological technique and practical histochemistry. Moscow: MIR, 1969; 645.

Статья поступила в редакцию 20.01.2025 г. The article was submitted to the journal on 20.01.2025