

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени академика
Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Ничай Наталия Романовна

**Клинико-экспериментальное обоснование подходов к созданию новых
ксенокондуитов для протезирования пути оттока в легочную артерию
у педиатрических пациентов**

3.1.15. Сердечно-сосудистая хирургия

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научный консультант:
доктор медицинских наук
Богачев-Прокофьев А.В.

Новосибирск - 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. СТЕПЕНЬ РАЗРАБОТАННОСТИ ПРОБЛЕМЫ	25
1.1 Кондуиты для протезирования легочной артерии	25
1.1.1 Гомографты.....	25
1.1.2 Кондуиты, изготовленные из консервированного бычьего ксеноматериала	29
1.1.3 Кондуиты, изготовленные из консервированного свиного ксеноматериала.	31
1.2 Патологическая кальцификация биоматериалов	33
1.2.1 Детерминанты патологической кальцификации	34
1.2.1.1 Факторы метаболизма и иммунного ответа	36
1.2.1.2 Структура и химический состав имплантата	41
1.2.1.3 Механические факторы	46
1.2.2 Патогенез минерализации биоматериала.....	47
1.3 Методы профилактики патологической кальцификации.....	51
1.3.1 Децеллюляризация ткани	52
1.3.2 Смена основного сшивающего агента	54
1.3.3 Модификация консервированного биоматериала дополнительными химическими агентами.....	58
1.3.3.1 Аминоолеиновая кислота	59
1.3.3.2 Додецилсульфат натрия.....	60
1.3.3.3 Модификация поверхности полисахаридами	61
1.3.3.4 Спирты.....	62
1.3.3.5 Ионы трехвалентных металлов	63
1.3.3.6 Бисфосфонаты.....	64
1.4 Резюме	67
ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	69
2.1 Общий дизайн исследовательской работы.....	69
2.2 Характеристика методов исследования	72
2.3 Методы статистического анализа	73

2.4 Резюме	74
ГЛАВА 3. АНАЛИЗ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ЛЕГОЧНЫХ КЛАПАНОСОДЕРЖАЩИХ КОНДУИТОВ В ПЕДИАТРИЧЕСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ.....	76
3.1 Материалы и методы.....	76
3.1.1 Дизайн исследования	77
3.1.2 Характеристика пациентов	82
3.1.3 Хирургическая техника	84
3.1.4 Методы статистического анализа.....	85
3.2 Результаты	86
3.2.1 Конduit-обусловленная летальность.....	90
3.2.2 Реинтервенции на клапаносодержащих кондуитах.....	91
3.2.3 Конduit-обусловленные осложнения.....	95
3.2.4 Причины дисфункции кондуитов, потребовавшие выполнения реинтервенций.....	97
3.2.4.1 Кальцификация кондуитов	100
3.2.4.2 Неинтимальная гиперплазия.....	105
3.3 Обсуждение полученных результатов	110
3.4 Ограничения исследования.....	124
3.5 Резюме	124
ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ in vitro ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОНСЕРВАНТОВ С БИОМАТЕРИАЛОМ	128
4.1 Материалы и методы.....	129
4.1.1 Дизайн исследования	129
4.1.2 Подготовка биоматериалов	131
4.1.3 Аминокислотный анализ	132
4.1.4 Количественная оценка бисфосфоната в образцах.....	133
4.1.5 In vitro исследование взаимодействия бисфосфоната и консерванта	133
4.1.6 Инфракрасная спектроскопия	134
4.1.7 Методы статистического анализа.....	135

4.2 Результаты	135
4.2.1 Аминокислотный анализ	135
4.2.2 Взаимодействие бисфосфоната с консервантом.....	138
4.2.3 Инфракрасная спектроскопия	140
4.2.4 Содержание бисфосфонатов в модифицированных биоматериалах	146
4.3 Обсуждение полученных результатов	149
4.4 Ограничения исследования.....	153
4.5 Резюме	154
ГЛАВА 5. ЭКСПЕРИМЕНТ in vivo НА МОДЕЛИ МЕЛКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ (крысы).....	157
5.1 Материалы и методы.....	158
5.1.1 Дизайн исследования	158
5.1.2 Подготовка имплантируемых образцов	159
5.2.3 Подкожная имплантации биоматериала мелким лабораторным животным (крысам)	160
5.1.4 Микроскопическое исследование образцов.....	161
5.1.5 Сканирующая электронная микроскопия	161
5.1.6 Количественная оценка накопления кальция	162
5.1.7 Методы статистического анализа.....	162
5.2 Результаты	163
5.2.1 Анализ неимплантированных образцов.....	163
5.2.2 Микроструктурные изменения в образцах через 10, 30 и 60 дней подкожной имплантации	164
5.2.3 Сканирующая электронная микроскопия образцов через 10, 30 и 60 дней подкожной имплантации.....	172
5.2.4 Количественная оценка кальцификации эксплантированных образцов через 60 дней подкожной имплантации	175
5.3 Обсуждение полученных результатов	178
5.4 Ограничения исследования.....	185
5.5 Резюме	186

ГЛАВА 6. ЭКСПЕРИМЕНТ <i>in vivo</i> НА МОДЕЛИ КРУПНЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ (мини-свиньи)	189
6.1 Материалы и методы.....	190
6.1.1 Дизайн исследования	191
6.1.2 Описание имплантируемых кондуитов.....	194
6.1.2.1 Кондуиты из яремной вены быка	194
6.1.2.2 Ксеноперикардимальные кондуиты	196
6.1.2.3 Ксенокондуит Contegra	197
6.1.3 Характеристика испытуемых животных.....	198
6.1.4 Имплантация ксенокондуитов в ортотопическую позицию	199
6.1.4.1 Анестезиологическое обеспечение.....	199
6.1.10 Методы статистического анализа.....	209
6.2 Результаты	209
6.2.1 Послеоперационный период	209
6.2.2 Результаты имплантации диэпокси-обработанных ксеновенозных кондуитов и групп сравнения.....	210
6.2.2.1 Чреспищеводная эхокардиография	211
6.2.2.2 Макроскопическая оценка эксплантированных ксеновенозных кондуитов.....	214
6.2.2.3 Микроскопическая оценка эксплантированных ксеновенозных кондуитов.....	217
6.2.2.4 Сканирующая электронная микроскопия	224
6.2.3 Результаты имплантации диэпокси-обработанных ксеновенозных кондуитов и группы сравнения	225
6.2.3.1 Чреспищеводная эхокардиография	226
6.2.3.2 Макроскопическая оценка эксплантированных ксеноперикардимальных кондуитов.....	228
6.2.3.3 Микроскопическая оценка эксплантированных ксеноперикардимальных кондуитов.....	230
6.2.3.4 Сканирующая электронная микроскопия	236

6.3 Обсуждение полученных результатов	238
6.4 Ограничения исследования.....	251
6.5 Резюме	253
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	257
ВЫВОДЫ.....	261
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	264
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	266
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	269

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Согласно статистическим данным ежегодно в мире рождается около 140 миллионов новорожденных [<https://ourworldindata.org/future-population-growth#births-and-deaths>]. В среднем у 150 детей на каждые 100 000 живорожденных диагностируют врожденный порок сердца (ВПС), связанный с патологией пути оттока из правого желудочка (ПЖ) в легочную артерию (ЛА). При этом процент данной патологии неуклонно растет [Liu и др., 2019]. В медицинских учреждениях нашей страны ежегодно более 1,5 тысяч детей нуждаются в реконструктивных вмешательствах на уровне выходного отдела правого желудочка (ВОПЖ). Сложная анатомия этого спектра ВПС зачастую требует протезирования ЛА. Данное хирургическое вмешательство является самой частой процедурой по замене клапана в педиатрической группе пациентов [Hertmann, Brown, 2020]. Начиная с периода новорожденности и на протяжении всей жизни, по мере роста и развития ребенка, такие пациенты нуждаются в многократных повторных операциях.

Для реконструкции ВОПЖ и замены ЛА применяются различные типы клапаносодержащих кондуитов. Легочные гомографты продолжают оставаться наиболее оптимальным вариантом для таких операций и рекомендуются как детям, так и взрослым пациентам [Baumgartner и др., 2021; Hazekamp и др., 2021; Huayan, Chang, Song, 2021]. Однако использование ЛА-гомографтов, особенно малого диаметра, лимитировано из-за их ограниченной доступности, что связано с рядом экономических, правовых и организационно-технических факторов [Harris и др., 2023; Sharifulin и др., 2021b; Singh и др., 2025]. Вследствие острой нехватки ЛА-гомографтов небольшого размера у детей широко применяются кондуиты, изготовленные из ксеногенных биоматериалов [Harris и др., 2023; Homann и др., 2000].

Несмотря на разнообразие доступных в настоящее время кондуитов, ни один из них не соответствует всем требованиям «идеального протеза» [Crago и др., 2023;

Harris и др., 2023; Herrmann и др., 2020; Singh и др., 2025]. Вопрос выбора наиболее оптимального ксеногенного биоматериала для детской кардиохирургии остается открытым, особенно в контексте процедур, направленных на восстановление адекватного легочного кровотока. Существенные различия в жесткости и толщине тканей графта по сравнению с нативной ЛА могут вызывать гемодинамические нарушения на уровне протеза. Кроме того, активный рост ребенка и высокий уровень метаболических и иммунных процессов обуславливают необходимость ранней замены легочных кондуитов в педиатрической популяции [Homann и др., 2000; Simon, Hollander, McMichael, 2015; Vásquez-Alvarez и др., 2021].

И хотя в конечном итоге дети перерастают имплантированные биопротезы из-за их неспособности к росту, структурные изменения графта часто приводят к несостоятельности кондуита значительно раньше [Crago и др., 2023; Hazekamp и др., 2021]. Одной из основных причин дисфункции ЛА-кондуитов у детей является кальцификация их структур [Ong и др., 2013; Soor и др., 2009]. Отложения солей кальция в тканях графта - как в стенках, так и в створках - нарушают его работу, снижая подвижность створчатого аппарата, изменяя геометрию пути оттока из ПЖ и уменьшая площадь пропускного отверстия протеза.

Кальцификация наблюдается у всех типов ксенокондуитов, представленных на российском и зарубежном рынках [Ong и др., 2013; Soor и др., 2009]. В настоящее время не существует оптимального метода антикальциевой защиты, способного эффективно предотвращать минерализацию биоматериала, особенно в детской популяции, что подтверждается результатами клинических исследований, оценивающих долговечность клапаносодержащих легочных графтов [Homann и др., 2000; Mery и др., 2016]. Эта проблема требует активных поисковых исследований и разработки новых стратегий антикальциевой защиты, учитывающих различия в структуре и аминокислотном составе ксеногенных тканей. Решение данной задачи позволит не только снизить частоту повторных операций у детей после протезирования ВОПЖ, но и значительно улучшить качество их жизни.

К ключевым факторам, влияющим на кальцификацию биоматериалов, наряду с циклическим механическим воздействием, иммунными реакциями и

метаболическими особенностями пациента, относят также химический состав обработанных биоматериалов [Goldstone и др., 2017; Manji и др., 2014; Schoen, Levy, 2020; Wen и др., 2022]. Глутаровый альдегид (ГА) является наиболее часто используемым консервантом для ксеногенных тканей [Attia, Raja, 2021; Jorge-Herrero, Paez, Castillo-Olivares Ramos Del, 2005], поскольку он эффективно сшивает коллаген и скрывает ксеноантигены, что улучшает стабильность биоматериала и уменьшает иммунный ответ реципиента на трансплантат [Барбараш, 1995; Harris и др., 2023; Wen и др., 2022]. Однако сшивание тканевых белков с помощью ГА нарушает баланс зарядов, способствуя связыванию неорганического фосфора из окружающей среды. Это приводит к образованию отрицательно заряженных комплексов, которые притягивают ионы кальция и способствуют нуклеации минеральных кристаллов [Kim, Herrera, Battarbee, 1999; Zhuravleva и др., 2023]. Особую сложность представляет предотвращение кальцификации биоматериалов, богатых эластином [Bailey и др., 2003], так как эластиновые волокна не могут быть эффективно сшиты ГА [Brasselet и др., 2005].

Было предложено множество стратегий для снижения кальцификации биопротезов [Jorge-Herrero, Paez, Castillo-Olivares Ramos Del, 2005]. Одна из них предполагает замену сшивающего агента — глутарового альдегида — на эпоксидные соединения. В ФГБУ «НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России накоплен 20-летний опыт работы с различными типами ксеногенных правосторонних клапанных кондуитов. У взрослых пациентов наиболее высокая устойчивость к кальцификации была продемонстрирована в группе перикардальных ксенографтов, обработанных диглицидиловым эфиром этиленгликоля (диэпоксид, ДЭ) [Karaskov и др., 2016a; Karaskov и др., 2016b]. Однако в педиатрической практике опыт использования эпоксидных перикардальных кондуитов ограничен, их долговечность изучена недостаточно, а проблема профилактики кальцификации этих кондуитов у детей остается нерешённой. Таким образом, эффективность различных методов консервации биоматериалов в педиатрической группе пациентов по-прежнему вызывает вопросы и требует дальнейших исследований.

Еще одним направлением снижения кальций-связывающей активности ксеногенных тканей является их модификация. Для ГА-фиксированных тканей предложены различные варианты дополнительной обработки с использованием α -аминоолеиновой кислоты, октандиола и других химических агентов, а также технологий ThermoFix и Linx, направленных на повышение устойчивости биоматериала к кальцификации [Andreas и др., 2015; Cohen и др., 2018; Loog и др., 2016; Matsumoto и др., 2015; Schlömacher и др., 2017]. Тем не менее, на сегодняшний день отсутствуют убедительные клинические доказательства эффективности этих стратегий.

Одной из методик дополнительной антикальциевой защиты фиксированных ксеногенных тканей является их модификация бисфосфонатами (Бф). Экспериментальные исследования показали потенциальную эффективность этого метода для коллагеновых биоматериалов, обработанных ГА [Caffarelli и др., 2017; Nimni и др., 1990; Van Gelder и др., 1997; Webb, Schoen, Levy, 1989]. Однако вопрос эффективности бисфосфоновых кислот при модификации тканей, содержащих эластин, остаётся открытым. Также отсутствуют данные о возможности эффективной иммобилизации бисфосфонатов на биоматериалы, консервированные диэпоксидом. Механизм снижения кальций-связывающей активности тканей при иммобилизации бисфосфоновых кислот пока не до конца изучен. Предполагается, что способность Бф подавлять кальцификацию связана как с их собственной молекулярной структурой, так и со специфической химической средой конкретного биоматериала.

Таким образом, выбор наиболее подходящего кондуита для протезирования ВОПЖ у пациентов педиатрической группы остаётся одной из ключевых задач современной детской кардиохирургии. Это связано с высокой частотой использования ксеногенных графтов и их склонностью к ранней дисфункции у детей. Исследования, направленные на улучшение структурных характеристик и долговечности ксеногенных графтов, являются крайне актуальными. Для успешного решения этой задачи необходим комплексный подход, учитывающий структурные особенности биоматериалов, методы их базовой обработки и модификации, а также специфику метаболического статуса и иммунной активности у детей.

Степень разработанности темы диссертации

Проблема поиска оптимального графта для реконструкции пути оттока из ПЖ в ЛА у педиатрических пациентов в течение многих лет остаётся предметом активных дискуссий в мировой кардиохирургической литературе. Несмотря на проводимые исследовательские и поисковые работы в данной области, на настоящий момент не существует идеального клапаносодержащего кондуита для имплантации в легочную позицию [Crago и др., 2023; Harris и др., 2023; Herrmann и др., 2020; Singh и др., 2025]. Все доступные клапаносодержащие легочные кондуиты имеют существенные ограничения [Crago и др., 2023], неизбежно подвергаются дегенеративным изменениям и со временем требуют замены, что особенно значимо в педиатрической группе пациентов [Журавлева и др., 2016b; Dave и др., 2011; Lee и др., 2011; Ong и др., 2013; Qian и др., 2021; Romeo и др., 2019; Tweddell и др., 2000].

Одним из наиболее частых и клинически значимых механизмов дисфункции ЛА-кондуитов у детей является минерализация протезных структур, которая рассматривается как конечный этап структурной дегенерации биопротезной ткани [Carodanno и др., 2017; Ong и др., 2013; Soor и др., 2009; Wen и др., 2022]. В литературе предложены и обоснованы различные пути накопления кальциевых отложений в биоматериалах и факторы, ускоряющие этот патологический процесс. За последнее десятилетие накоплены убедительные данные, указывающие на ключевую роль иммунного ответа в механизмах кальцификации и дегенерации биологических клапанов сердца [Manji, Hara, Cooper, 2015; Wen и др., 2022; Cooper, 2020]. Феномен более быстрой и агрессивной минерализации биопротезной ткани у детей объясняется не только повышенной активностью иммунной системы [Simon, Hollander, McMichael, 2015], но и особенностями метаболизма этой возрастной группы [Homann и др., 2000; Vásquez-Alvarez и др., 2021]. В ряде исследований продемонстрирована роль циклической механической нагрузки, а также последующего повреждения и износа ткани в развитии кальцификации биопротезов [Liao и др., 2008; Vaesken и др., 2018]. Кроме того, структурные особенности и химический состав биоматериалов определяют предрасположенность к нуклеации кристаллов гидроксиапатита и

дальнейшему накоплению минеральных отложений [Guo и др., 2021; Parashar и др., 2021; Rapoport и др., 2007; Tsolaki и др., 2023; Zhuravleva и др., 2023].

На основе имеющихся данных предложены различные подходы к подавлению кальцификации трансплантата [Schoen, Levy, 2013; Zheng, Yang, Wang, 2024]. Хотя многие из этих методов продемонстрировали обещающие результаты в доклинических моделях, в частности при подкожной имплантации у крыс, их эффективность в условиях реальной гемодинамической среды не подтверждена, и трансляция в клиническую практику остаётся проблематичной [Jorge-Herrero, Paez, Castillo-Olivares Ramos Del, 2005; Schoen, Levy, 2013]. В настоящее время не существует эффективного и общепринятого способа предотвращения кальцификации биопротезной ткани в условиях клинического применения [Костюнин и др., 2023а; Attia, Raja, 2021; Dvir и др., 2018], что подчёркивает актуальность темы и необходимость дальнейших фундаментальных и поисковых исследований.

Цель исследования

Целью данного исследования является разработка ксеногенного клапаносодержащего кондуита с повышенной резистентностью к кальцификации для протезирования пути оттока из правого желудочка в легочную артерию у педиатрических пациентов.

Задачи исследования

Для реализации поставленной цели сформулированы следующие задачи исследовательской работы:

1) Оценить отдаленные результаты использования различных типов клапаносодержащих кондуитов для протезирования пути оттока в легочную артерию в педиатрической группе пациентов.

2) Проанализировать структуру причин дисфункции протезов легочной артерии в периоде наблюдения в зависимости от типа имплантированного клапаносодержащего графта.

3) Определить предикторы кондуит-ассоциированных реинтервенций у пациентов педиатрической группы.

4) Выявить риски ранней дисфункции легочных кондуитов в зависимости от типа биоматериала и варианта его обработки.

5) Исследовать механизмы кальцификации основных биоматериалов, используемых для создания ксенокондуитов, обработанных различными сшивающими агентами.

6) Обосновать принцип иммобилизации бисфосфоновых соединений на различные биоматериалы, консервированные глутаровым альдегидом и диэпоксидом.

7) Провести сравнительную оценку эффективности антикальциевой защиты различных типов биоматериалов в зависимости от способа базовой обработки и модификации бисфосфонатом.

8) Разработать технологию изготовления ксеногенного легочного кондуита и доказать ее эффективность в экспериментальных условиях, максимально приближенных к предполагаемой области применения протеза.

Научная новизна

Диссертационная работа характеризуется научной новизной, а её результаты имеют важное значение как для фундаментальной науки, так и для прикладной медицины.

Впервые представлен уникальный опыт имплантации различных типов легочных кондуитов именно в педиатрической популяции. Эта работа является крупнейшим исследованием различных вариантов кондуитов в России и одним из самых масштабных одноцентровых исследований, опубликованных в международной литературе. Особую новизну представляют впервые полученные данные по

использованию ДЭ-фиксированных кондуитов (ДЭ-консервированного ксеноперикардального кондуита; ДЭ-обработанного кондуита, содержащего свиной аортальный корень) у детей. По сведениям автора, НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина обладает наиболее обширным опытом имплантации кондуитов этих типов в лёгочную позицию. Стоит отметить, что зарубежных аналогов графтов, консервированных ДЭ, не существует, что подчёркивает уникальность описанных результатов.

В диссертационной работе впервые представлены убедительные доказательства высокой эффективности ДЭ-обработки как для ксеноперикарда, так и для клапаносодержащего сегмента яремной вены быка. Также данная работа является первым исследованием, направленным на верификацию молекулярных механизмов взаимодействия между фиксированными ксеногенными тканями, имеющими структурные отличия, и разными типами азот-содержащих бисфосфонатов. Впервые была продемонстрирована вариабельность эффективности различных бисфосфоновых кислот при их иммобилизации на тканях, отличающихся по структуре и способу фиксации. Более того, насколько известно автору, это первое исследование, которое изучает влияние иммобилизованных Бф на взаимодействие ионов кальция и фосфора с тканями биопротеза, раскрывая механизмы, лежащие в основе их эффекта подавления минерализации.

Также уникальность исследования заключается в том, что впервые продемонстрировано влияние полифиламентной шовной нити на усиление кальцификации ксеноматериала. При анализе литературы автором не было обнаружено исследований, посвящённых прямому воздействию типа шовного материала на процесс кальцификации биопротезов клапанов сердца. Данная работа впервые предоставляет доказательства того, что полифиламентные швы могут сами выступать в роли центров нуклеации.

Новые научные данные, полученные в рамках диссертационной работы, стали основой для разработки инновационного ксеногенного клапаносодержащего кондуита, обладающего повышенной резистентностью к минерализации и улучшенными структурными характеристиками по сравнению с ксенографтами, традиционно обработанными ГА. Гемодинамическая эффективность, способность к витализации

ткани графта, хорошая эндотелизация протеза, а также низкая склонность к минерализации структур и тромбозу были экспериментально подтверждены в хронических исследованиях на крупных лабораторных животных. Указанные преимущества нового ксенокондуита предполагают меньшую степень структурной дегенерации и повышение долговечности разработанного графта, что особенно важно для педиатрических пациентов, которым требуется реконструкция ВОПЖ. Разработка выполнена на основе использования клапаносодержащего фрагмента яремной вены быка и защищена патентом на изобретение № 2633544 С1 [Журавлёва и др., 2017a], что подтверждает её новизну и перспективы клинического применения.

Отличие полученных новых результатов от опубликованных ранее другими авторами

Результаты, полученные в данной диссертационной работе, существенно расширяют понимание механизмов дегенеративных изменений на уровне клапанного кондуита и открывают перспективные пути для смягчения патологических процессов. Ключевым отличительным фактором стала интеграция клинико-экспериментального подхода, при котором клинические данные и экспериментальные результаты взаимно дополняют и усиливают друг друга. Такой комплексный дизайн исследования выгодно отличает эту работу от большинства ранее опубликованных.

Преимущество результатов клинической части исследования заключается в фокусе на педиатрической группе пациентов с ВПС, а также на межгрупповом сравнительном анализе долговечности кондуитов и причин их дисфункции. В отличие от ранее опубликованных исследований, которые сконцентрированы преимущественно на анализе отдельных типов кондуитов и включают гетерогенные возрастные группы (от новорожденных до пожилых пациентов), данная работа сосредоточена исключительно на пациентах педиатрической

группы. Это позволило получить более релевантные и применимые в практике выводы именно для детской кардиохирургии. Кроме того, исследование охватывает различные типы легочных кондуитов, включая диэпокси-обработанные протезы, что дало возможность выявить преимущества и недостатки каждого варианта графтов и обосновать рекомендации по выбору оптимальных кондуитов для детей с ВПС.

Особенно стоит отметить корректное применение методов статистической обработки данных, включая сложные модели анализа с учетом кофакторов, что существенно повышает достоверность и научную ценность сформулированных выводов. В отличие от многих ранее опубликованных работ, где анализ исследуемых данных имеет исключительно описательный характер, это диссертационное исследование базируется на статистических методах, наиболее подходящих поставленным задачам.

Экспериментальный блок работы выделяется фундаментальной глубиной и многоуровневым подходом. Использование разнообразных экспериментальных моделей — от *in vitro* до *in vivo* на мелких и крупных лабораторных животных — в сочетании с применением высокоточных методов исследования позволило не только выявить закономерности патологической минерализации тканей, но и определить вероятные механизмы развития данного процесса. Представленная работа является поисковой, где результаты, полученные на предшествующем этапе, рассматривались как вводные данные для следующей части исследования. Логично выстроенная этапность диссертационной работы позволила обоснованно разработать стратегию изготовления ксеногенного кондуита с улучшенными характеристиками и экспериментально подтвердить её эффективность в условиях гемодинамической нагрузки и контакта с кровью. Такой системный и методологически продвинутый подход значительно превосходит традиционные исследования, ограниченные описательным анализом.

Таким образом, совокупность перечисленных факторов обеспечила получение новых, научно обоснованных и практически значимых данных, которые отражены в представленной диссертационной работе.

Теоретическая и практическая значимость работы

Диссертационная работа обладает высокой теоретической и практической значимостью, что подтверждается публикацией результатов исследования в ведущих научных журналах с высоким импакт-фактором, а также признанием со стороны экспертов Европейской Ассоциации кардиоторакальной хирургии (EACTS) – премия Young Investigator's Award.

В работе были выявлены независимые факторы риска реинтервенций на кондуите, дисфункции протеза по причине его кальцификации и неоинтимальной гиперплазии, а также развития инфекционного эндокардита, что позволило сформулировать рекомендации по выбору кондуита для протезирования ЛА у детей. В рамках проведенных исследований получены новые научные данные, раскрывающие механизмы связывания консервантов с тканями, существенно различающимися по структуре и составу внеклеточного матрикса. Также подробно изучены процессы связывания бисфосфоновых кислот как с сшивающими агентами, так и с фиксированными тканями. Дополнительно выявлены закономерности влияния различных типов Бф на интенсивность кальцификации тканей и состав образующихся кальциевых депозитов.

Результатом проведенной диссертационной работы стала разработка ксеногенного клапаносодержащего кондуита с повышенной резистентностью к минерализации и улучшенными структурными характеристиками. Данная разработка защищена патентом на изобретение (№ 2633544 С1, 13.10.2017), что подтверждает ее прикладной потенциал.

Таким образом, работа обладает высокой научно-прикладной значимостью и вносит существенный вклад в развитие данного направления науки. Результаты проведенного исследования подтверждают потенциал клинического применения разработанного ксенографта. Кроме того, полученные новые данные могут послужить фундаментом для дальнейшего улучшения подходов в обработке биоматериалов и совершенствовании конструкций графтов.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа представляет собой клинико-экспериментальное исследование.

Клиническая часть исследования направлена на оценку эффективности применения коммерческих кондуитов, имплантированных в легочную позицию, у педиатрических пациентов и выполнена на материале НМИЦ им. акад. Е. Н. Мешалкина, накопленном за период 2000–2024 гг. Все пациенты были отобраны из проспективно поддерживаемой базы данных и, в зависимости от типа имплантированного графта, распределены на пять групп для проведения сравнительного анализа долговечности протезов и причин их дисфункции. На основании результатов анализа клинических данных сформированы вводные данные для экспериментальной блока работы.

Экспериментальная часть посвящена изучению биоматериалов и стратегий их консервирования с целью повышения долговечности протезных конструкций и включает последовательные этапы:

- I. эксперимент *in vitro*;
- II. эксперимент *in vivo* на модели мелких лабораторных животных;
- III. эксперимент *in vivo* на модели крупных лабораторных животных.

Исследование образцов биоматериалов проводили с использованием следующих методов и приборов:

- аминокислотный анализ на аминокислотном анализаторе L-8800 (Hitachi Ltd., Япония);
- ядерный магнитный резонанс (^1H ЯМР, 400 МГц) на спектрометре Bruker AV-400 (Bruker Inc., Карлсруэ, Германия);
- инфракрасная спектроскопия на Фурье-спектрометре Tensor 27 (Bruker Inc., Карлсруэ, Германия);
- сканирующая электронная микроскопия, энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия и элементное картирование на микроскопе WIN SEM A6000LV с системой AzTec One EDX (Oxford Instruments, Абингдон, Великобритания);

- микроскопическое исследование окрашенных срезов на световом микроскопе Axioskop 40 (Carl Zeiss, Йена, Германия);
- атомно-абсорбционная спектрофотометрия на приборе Thermo Solaar M6 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США).

Гемодинамические характеристики имплантированного кондуита оценивали с помощью эхокардиографии.

Положения, выносимые на защиту

1. Кальцификация структур графта является основной причиной их дисфункции у педиатрических пациентов и характерна для всех типов кондуитов, однако интенсивность накопления кальциевых депозитов варьирует в исследуемых группах протезов, используемых при реконструкции выходного отдела правого желудочка.

2. Кондуиты, содержащие в структуре диэпокси-обработанный свиной аортальный корень и фиксированный глутаровым альдегидом ксеноперикард, характеризуются наибольшей скоростью дегенеративных изменений, что приводит к ранней дисфункции протеза.

3. Тип имплантированного легочного кондуита не оказывает влияния на структуру и частоту кондуит-обусловленных осложнений, в том числе на заболеваемость протезным инфекционным эндокардитом.

4. Диэпоксид обладает большей реакционной способностью по сравнению с глутаровым альдегидом, что обеспечивает плотную сшивку тканей и позволяет ковалентно связывать различные типы бисфосфонатов.

5. Эффективность модификации ткани бисфосфоновыми кислотами зависит от структуры биоматериала, варианта его базовой обработки и типа иммобилизованного бисфосфоната.

6. Кондуиты из диэпокси-обработанного ксеноперикарда обладают лучшими структурными характеристиками по сравнению с графтами, фиксированными глутаровым альдегидом, однако независимо от типа сшивающего агента и

использования модификации бисфосфонатами, ксеноперикардialные трансплантаты остаются склонными к кальцификации структур графта.

7. Конduit из диэпокси-обработанной яремной вены быка с дополнительной обработкой бисфосфонатами является наиболее подходящим протезом для реконструкции выходного отдела правого желудочка за счет меньшей склонности к структурной дегенерации.

Степень достоверности и апробация результатов

Проведение данного клинико-экспериментального исследования получило одобрение локальных Экспертного комитета (протокол №25 от 19.12.2017) и Этического комитета (протокол №17 от 14.06.2018). Диссертационная работа выполнена на высоком методологическом уровне с применением современных и высокоточных методов исследования, а также с корректным использованием статистического анализа данных. Каждая глава раскрывает различные аспекты диссертационного исследования: анализ клинических данных, эксперименты *in vitro* и *in vivo* на моделях мелких и крупных лабораторных животных.

Все оригинальные клинические и экспериментальные исследования, включённые в структуру диссертационной работы, были отобраны на конкурсной основе организационными комитетами Межрегионального общества детских кардиохирургов и специалистов по врожденным порокам сердца, Европейской Ассоциации кардиоторакальной хирургии (EACTS) и Всемирного общества детской и врождённой хирургии сердца (WSPCHS) для представления в виде докладов на аффилированных конгрессах. Данная работа получила высокую международную оценку — автор была удостоена премии Young Investigator's Award 2017 Европейской Ассоциации кардиоторакальной хирургии. Кроме того, различные части диссертационного исследования получили грантовую поддержку и положительную оценку экспертов (РНФ, Грант Президента РФ), что подтверждает высокий уровень проведённой научной работы.

Каждое из исследований, выполненных в рамках диссертации, получило положительные отзывы как минимум трёх экспертов в соответствующей области, а также одобрение профессиональных биостатистов по результатам оценки применённых методов статистической обработки данных. Исследования прошли проверку на оригинальность, соответствие биоэтическим нормам, корректность заимствований и цитирования, после чего были допущены к публикации в ведущих международных журналах с рейтингом Q1–Q2.

Высокий методологический уровень работы, применение высокоточных методов исследования и современных подходов углублённого статистического анализа, а также признание ведущих научных сообществ и рейтинговых изданий подтверждают обоснованность полученных выводов и сформулированных в диссертационной работе практических рекомендаций.

Результаты диссертационной работы были представлены автором на ведущих российских и международных научных конференциях и съездах:

1. The 31st EACTS Annual Meeting (Vienna, Austria, 2017);
2. The 32st EACTS Annual Meeting (Milan, Italy, 2018);
3. 7th Meeting of World Society for Pediatric and Congenital Heart Surgery (Marrakech, Morocco, 2022);
4. Второй Всероссийский съезд детских кардиохирургов и специалистов по врождённым порокам сердца (Волгоград, Россия, 2023);
5. XXV Московский Международный Конгресс по рентгенэндоваскулярной хирургии – МРК Россия 2023 (Москва, Россия, 2023);
6. 9th Scientific Meeting and World Summit for Pediatric and Congenital Heart Surgery (Bologna, Italy, 2024);
7. Третий Всероссийский съезд детских кардиохирургов и специалистов по врождённым порокам сердца (Казань, Россия, 2024);
8. VIII Петербургский Медицинский Инновационный Форум (Санкт-Петербург, Россия, 2025);
9. 25th Annual Conference Pediatric Cardiac Society of India (Mumbai, India, 2025);

10. Четвертый Всероссийский съезд детских кардиохирургов и специалистов по врожденным порокам сердца (Самара, Россия, 2025);

11. 9th World Congress of Paediatric Cardiology and Cardiac Surgery (Hong Kong, SAR China, 2025).

По теме диссертационной работы опубликовано 19 статей в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, утверждённый ВАК, а также включённых в актуальную версию «Белого списка» научных журналов Минобрнауки России (У1–У3).

Результатом исследовательской работы также стал патент на изобретение: «Способ изготовления клапансодержащего кондуита из яремной вены крупного рогатого скота» (патент RU 2633544 C1).

Личный вклад автора в получение новых научных результатов данного исследования

Автор принимала активное участие на всех этапах исследования. Самостоятельно осуществляла научный поиск, участвовала в планировании и организации как клинического, так и экспериментального блоков диссертационной работы.

В клинической части исследования автор лично проводила отбор пациентов, формировала базу данных и осуществляла проспективный сбор данных в течение всего периода наблюдения. В качестве врача-сердечно-сосудистого хирурга она проводила предоперационную подготовку пациентов, самостоятельно выполняла операции, связанные с протезированием или репротезированием пути оттока из ПЖ в ЛА, а также осуществляла ведение и лечение пациентов в раннем послеоперационном периоде и в периоде наблюдения.

В рамках экспериментального блока исследования автор лично подготавливала биоматериалы: выезжала на скотобойню для забора тканей, очищала их и готовила к

консервации. Она также участвовала в подкожной имплантации образцов биоматериалов мелким лабораторным животным.

Автор разработала и успешно внедрила методику имплантации легочного кондуита мини-свиньям. В качестве оперирующего хирурга она выполняла все экспериментальные операции на крупных лабораторных животных: обеспечивала доступ к полости перикарда, канюлировала магистральные сосуды и подключала аппарат искусственного кровообращения (ИК), проводила имплантацию клапаносодержащих кондуитов в легочную позицию в условиях параллельного нормотермического ИК, а также осуществляла деканюляцию и ушивание торакотомной раны. Она участвовала в послеоперационном наблюдении за экспериментальными животными; совместно с специалистом ультразвуковой диагностики интерпретировала данные чреспищеводной эхокардиографии (ЧП-ЭХОКГ). По окончании периода наблюдения автор эксплантировала кондуиты, совместно с гистологом готовила образцы и принимала участие в интерпретации результатов микроскопического исследования.

Автор лично представила полученные результаты в виде докладов на крупнейших российских и международных конгрессах и съездах, демонстрируя высокий уровень профессионализма и глубокое понимание темы исследования. Значительный личный вклад автора в диссертационную работу проявился не только в проведении всех этапов исследования, но и в активном участии в подготовке и публикации научных статей. Автор самостоятельно, а также в составе авторского коллектива подготовил и опубликовал результаты диссертационной работы в высокорейтинговых журналах.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа представлена в виде специально подготовленной рукописи и оформлена в соответствии с требованиями ГОСТ Р 7.0.11-2011 (переиздание: 2018 г.). Текст диссертации включает оглавление, введение, обзор

литературных данных, описания методологии и методов исследования, четыре главы собственных исследований, а также заключение, выводы, практические рекомендации, список условных сокращений, список использованной литературы. Каждая глава основного содержания описывает отдельный этап исследовательской работы и содержит такие разделы как материалы и методы, результаты, обсуждение полученных данных, характеристику ограничений исследований и резюме.

Диссертационная работа изложена на 309 страницах машинописного текста. Указатель литературы включает 447 источник, в том числе отечественные и зарубежные публикации, а также международные и российские нормативные документы. Работа содержит 15 таблиц и 67 рисунков, иллюстрирующих основные результаты проведенного исследования. Текст диссертации представлен в научном стиле, с четкой структурой и логическим изложением материала.

ГЛАВА 1. СТЕПЕНЬ РАЗРАБОТАННОСТИ ПРОБЛЕМЫ

Эра использования биологических протезов клапанов сердца начинается с 1960-х годов, когда впервые были выполнены оперативные вмешательства с использованием аортального и легочного гомографтов (Рисунок 1.1). В последующие десятилетия химически консервированные ксеногенные протезы, в том числе ксенокондуиты для протезирования легочной артерии (ЛА), стали коммерчески доступными и получили широкое распространение в кардиохирургической практике [Schoen, Levy, 2005].

1.1 Кондуиты для протезирования легочной артерии

В настоящее время наиболее часто используемые биологические кондуиты можно условно разделить на три группы: гомографты, бычьи и свиные клапаносодержащие кондуиты. К сожалению, каждый из этих типов имеет свои недостатки и ограничения. Кроме того, помимо отсутствия потенциала к росту у современных коммерчески доступных графтов, в детской популяции наблюдается более быстрый износ имплантированных биопротезов по сравнению со взрослыми пациентами [Huyan, Chang, Song, 2021; Singh и др., 2025; Хуе и др., 2023]. В совокупности это приводит к частым повторным хирургическим вмешательствам в педиатрической группе пациентов по поводу замены легочного кондуита, что увеличивает заболеваемость и смертность.

1.1.1 Гомографты

На протяжении многих лет гомографты используются в качестве клапаносодержащих кондуитов для реконструкции ВОПЖ при коррекции ВПС [Crago и др., 2023; Harris и др., 2023; Huyan, Chang, Song, 2021; Singh и др., 2025].

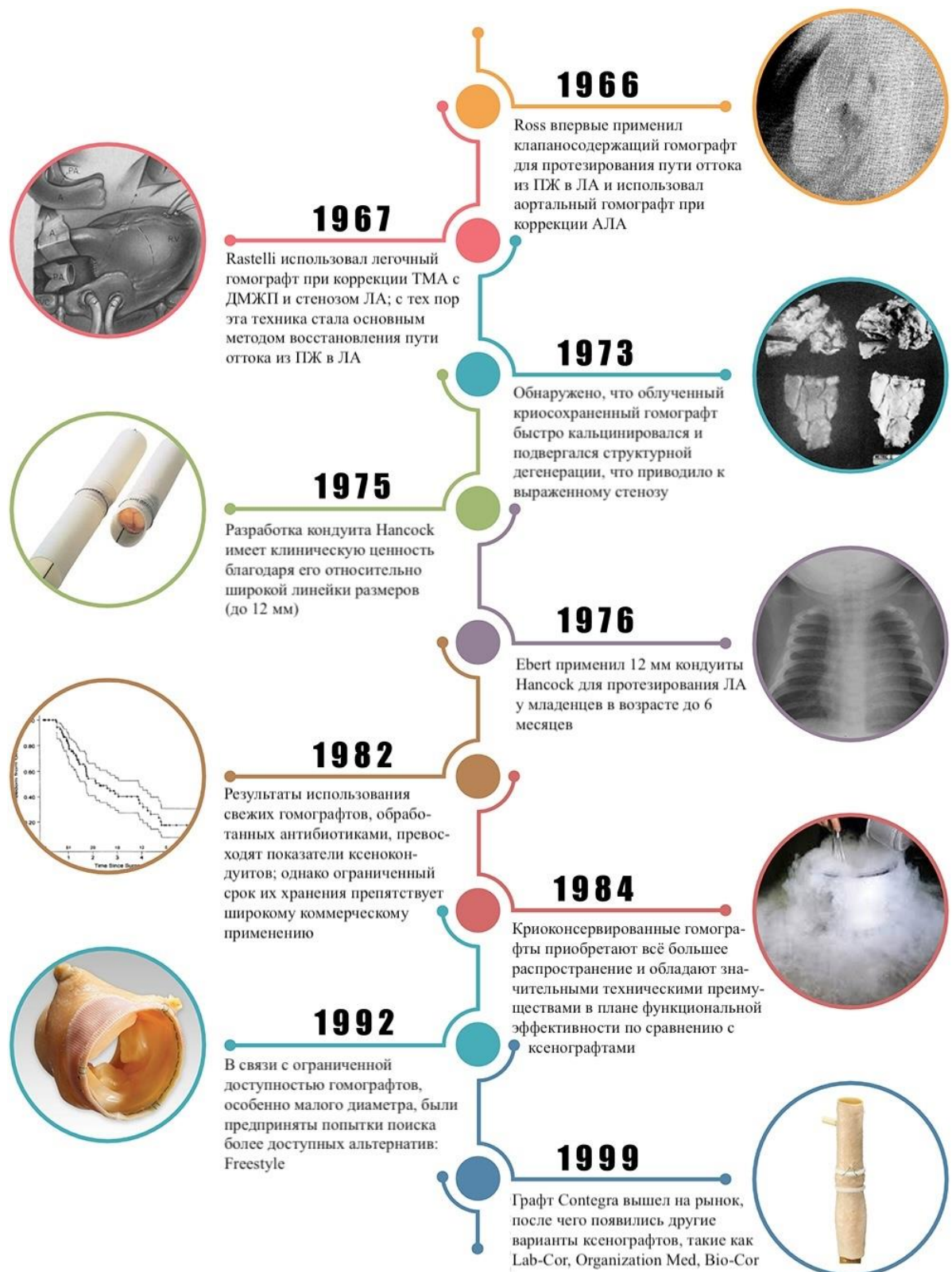


Рисунок 1.1 – Эволюция клапаносодержащих легочных кондуитов. АЛА, атрезия легочной артерии; ДМЖП, дефект межжелудочковой перегородки; ЛА, легочная артерия; ПЖ, правый желудочек; ТМА, транспозиция магистральных артерий [Адаптировано из: Huyan Y., Chang Y., Song J. Application of homograft valved conduit in cardiac surgery //Frontiers in Cardiovascular Medicine. – 2021. – Т. 8. – С. 740871]

Криоконсервация стала наиболее распространённым методом сохранения гомотрансплантатов, обеспечивающим длительное хранение и сохранность структурных характеристик ткани [Legare, Lee, Ross, 2000; Singh и др., 2025]. Криоконсервированные гомографты характеризуются оптимальными гемодинамическими показателями, повышенной тромборезистентностью и устойчивостью к инфекционным осложнениям [Lewis и др., 2023; Sharma и др., 2017; Singh и др., 2025]. Отдалённые результаты имплантации криоконсервированных гомографтов, представленные во множестве исследований, используются в качестве референтных показателей при сравнительном анализе с другими типами кондуитов, применяемыми в клинической практике [Bobylev и др., 2024; Hazekamp и др., 2021; Huyan, Chang, Song, 2021; Raja и др., 2021; Singh и др., 2025].

Однако при применении гомографтов в педиатрической популяции сохраняются некоторые спорные вопросы:

1) Выбор между легочным и аортальным гомографтами. В литературе представлены противоречивые данные относительно сравнения отдалённых результатов имплантации аортальных и легочных гомографтов (ЛА-гомографтов). Некоторые исследователи не выявили значимых различий между анализируемыми группами гомотрансплантатов [Junnil и др., 2021], в то время как другие отмечают преимущества легочных гомографтов [Herrmann и др., 2020; Romeo и др., 2019; Saxena и др., 2021], особенно у пациентов младенческого возраста.

2) Использование гомографтов у новорожденных и младенцев. Доступность гомографтов малого диаметра во всем мире существенно лимитирована [Harris и др., 2023]. Для решения данной проблемы некоторые авторы предлагают бикуспидализацию ЛА-гомографта с целью уменьшения его размера, отмечая сопоставимые результаты применения таких трансплантатов при реконструкции ВОПЖ по сравнению с трехстворчатыми гомографтами [Bramer и др., 2011; Junnil и др., 2021]. Кроме того, молодой возраст пациента является фактором риска ранней дисфункции гомотрансплантатов [Huyan, Chang, Song, 2021; Romeo и др., 2019]. Графты меньшего диаметра демонстрируют более быструю структурную

дегенерацию и признаны независимым фактором риска развития ранней дисфункции [Junnil и др., 2021; Mery и др., 2016; Meyns и др., 2005].

3) Иммунные реакции на гомографт. В ряде исследований сообщается, что у пациентов, получивших гомографты от доноров, несовместимых по системе АВО, наблюдается более высокая частота кальцификации протеза по сравнению с пациентами, которым были имплантированы трансплантаты, совместимые по системе АВО [Christenson и др., 2004; Sierra и др., 2007]. Одной из предложенных стратегий снижения выраженности иммунного ответа является использование децеллюляризированных гомографтов. В серии отчетов отмечаются более благоприятные результаты применения децеллюляризированных гомографтов по сравнению с криоконсервированными гомотрансплантатами и ксенопротезами как в среднесрочном, так и в отдалённом периодах наблюдения [Bibevski и др., 2017; Boethig и др., 2019]. Также выявлено, что децеллюляризированные гомографты ассоциированы с более низким уровнем образования антител к HLA в течение первого года после имплантации по сравнению с криоконсервированными трансплантатами [Chauvette и др., 2022].

4) Доступность гомографтов. Доступность гомографтов, в особенности небольших размеров, во всем мире ограничена, что связано с рядом экономических, правовых и организационно-технических факторов [Harris и др., 2023; Sharifulin и др., 2021b; Singh и др., 2025]. Высокая стоимость заготовки и хранения, сложность процесса донорского отбора, а также регуляторные требования и ограничения на использование донорских тканей существенно влияют на их доступность в клинической практике.

В связи с острым дефицитом ЛА-гомографтов малого диаметра у детей широко используются ксеногенные клапанные кондуиты [Harris и др., 2023; Nomann и др., 2000].

1.1.2 Кондуиты, изготовленные из консервированного бычьего ксеноматериала

Легочный кондуит Contegra (Contegra pulmonary valved conduit; Medtronic, Миннеаполис, Миннесота, США) изготовлен из клапаносодержащего фрагмента бычьей яремной вены (ЯВ), консервированной в растворе глутарового альдегида (ГА) низкой концентрации, что способствует сохранению гибкости створок [Singh и др., 2025]. Ключевыми преимуществами данного протеза являются анатомическая непрерывность между стенкой и клапаном ксенокондуита, широкий размерный ряд (от 12 до 22 мм), а также достаточная длина приточной и отточной частей протеза, что облегчает моделирование графта и его позиционирование с учётом анатомических особенностей ВПС [Singh и др., 2025]. Данный кондуит широко применяется в мировой кардиохирургической практике для реконструкции ВОПЖ и считается достойной альтернативой ЛА-гомографтам [Harris и др., 2023; Hazekamp и др., 2021; Herrmann и др., 2020]. Ряд исследований продемонстрировали сопоставимые результаты имплантации ксеновенозного кондуита Contegra с ЛА-гомографтами [Boshnakov и др., 2023; Christenson и др., 2010; Falchetti и др., 2019; Poinot и др., 2018]. Кроме того, для протезов малого диаметра Contegra была ассоциирована с меньшим риском повторного оперативных вмешательства на кондуите по сравнению с ЛА-гомографтами [Herrmann и др., 2020; Mery и др., 2016; Sandica и др., 2015], в связи с чем ряд авторов рекомендует этот ксенографт для реконструкции ВОПЖ при ВПС [Buckley и др., 2019; Hazekamp и др., 2021].

Однако во многих исследованиях отмечена достаточно высокая частота дисфункции протезов, при этом ведущую роль играет дистальный стеноз кондуита, который приводит к дилатации проксимальной части ксеноимплантата с развитием клапанной недостаточности, аневризм и псевдоаневризм ВОПЖ [Dave и др., 2011; Göber и др., 2005; Meyns и др., 2004; Schoenhoff и др., 2011; Urso и др., 2011; Yong и др., 2015]. Показано, что регрессия сети эластиновых волокон является предшественником утраты гибкости кондуита [Peivandi и др., 2019]. Почти в трети

случаев со временем развивается дилатация протеза в проксимальном отделе, являющаяся вторичной по отношению к дистальному стенозу ксенографта [Shebani и др., 2006]. Кроме того, ряд авторов выразил обеспокоенность высокой частотой выявления инфекционного эндокардита ксеновенозных кондуитов (Contegra; Melody transcatheter pulmonary valve, Medtronic, Миннеаполис, Миннесота, США) [Beckerman и др., 2018; Gröning и др., 2019; Hascoet и др., 2017; Malekzadeh-Milani и др., 2014; Mery и др., 2016; Stammnitz и др., 2022; Ugaki и др., 2015]. В данной группе легочных протезов частота развития эндокардита достигает 9–21% [Albanesi и др., 2014; Armstrong и др., 2019; Ugaki и др., 2015] и существенно превышает этот показатель для гомографтов и других ксенокондуитов [Gröning и др., 2019; Mery и др., 2016; Sandica и др., 2015; Sharma и др., 2017].

Ксенографты, изготовленные из фиксированного бычьего перикарда, также применяются для протезирования пути оттока из ПЖ в ЛА [Lee и др., 2011; Schubert и др., 2015; Shinkawa и др., 2010; Zubairi и др., 2011]. В своей работе Lee C. с соавторами продемонстрировали преимущества ксеноперикардальных кондуитов относительно показателя свободы от реинтервенций по сравнению с протезами, содержащими свиной аортальный корень [Lee и др., 2011]. Согласно данным Schubert S.A. и соавторов [Schubert и др., 2015], для ксеноперикардальных кондуитов Mitroflow bovine pericardial bioprosthesis (Sorin Group USA, Арвада, Колорадо, США) уровень свободы от повторных вмешательств на протезе через 5 лет составил 81%. Некоторые исследования, посвящённые оценке долговечности клапана Perimount (Edwards Lifesciences, Ирвин, Калифорния, США), имплантированного в ЛА-позицию, выявили показатели свободы от замены ксенопротеза на уровне от 50% до 98% через 10 лет наблюдения [Batlivala и др., 2012; Chen и др., 2013; Lee и др., 2011; Ruzmetov, Geiss, Fortuna, 2013; Rotes и др., 2014; Shinkawa и др., 2010; Zubairi и др., 2011]. На российском рынке представлены ксеноперикардальные кондуиты, обработанные как ГА (БиоЛАБ КК/Б, ФГБУ НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева, Москва, Россия), так и эпоксидным соединением (Пилон, НеоКор, Кемерово, Россия). Эти протезы применяются для реконструкции пути оттока в ЛА в кардиохирургических центрах Российской Федерации

[Караськов и др., 2013; Karaskov и др., 2016a; Karaskov и др., 2016b]; однако данные по их использованию в педиатрической популяции в отечественной и зарубежной литературе отсутствуют.

1.1.3 Кондуиты, изготовленные из консервированного свиного ксеноматериала

Протез Hancock Valved Conduit (Medtronic, Миннеаполис, Миннесота, США) изготовлен из свиного аортального клапана, вшитого в дакроновый кондуит. Основным преимуществом данного протеза является широкий ряд доступных размеров [Singh и др., 2025]. Клапан оснащён внешним армирующим кольцом, которое способствует поддержанию коаптации створок и обеспечивает рентгенконтрастность. Результаты нескольких исследований демонстрируют удовлетворительные отдалённые показатели применения кондуита Hancock [Belli и др., 2010; Vitanova и др., 2014]. По данным Belli E. и соавторов, отсутствие реопераций отмечалось в 98% случаев в течение первого года и в 81% — в течение пяти лет после имплантации [Belli и др., 2010]. В то же время, согласно другим исследованиям, риск структурной дегенерации и дисфункции этих протезов был в 5 раз выше по сравнению с гомографтами [Romeo и др., 2019]. Lee C. в своём исследовании указывает, что 10-летняя свобода от реинтервенций при использовании свиных лёгочных протезов (Hancock II; Carpentier–Edwards porcine valve, Edwards Lifesciences, Ирвин, Калифорния, США) у педиатрических пациентов с ВПС составила 48,5% [Lee и др., 2011].

Ксенокондуит Freestyle (Medtronic Inc., Миннеаполис, Миннесота, США) представляет собой свиной корень аорты, консервированный ГА при низком давлении и обработанный аминоолеиновой кислотой с целью предотвращения кальцификации ксеноматериала [Dunne и др., 2015]. В настоящее время ксенографт Freestyle широко применяется во многих центрах преимущественно для протезирования аортального клапана [Dunne и др., 2016; Lee и др., 2011].

Основными недостатками данного ксенопротеза при использовании в педиатрической кардиохирургии являются крайне низкий показатель свободы от повторных вмешательств, отсутствие небольших размеров (менее 19 мм) и недостаточная длина трубчатой части. В связи с этим при коррекции ВПС в большинстве случаев приходится удлинять "юбку" протеза с помощью заплат из ксеноперикарда, политетрафторэтилена или дакрона [Dunne и др., 2016; Englum и др., 2014; Lee и др., 2011; Salem, 2016].

Ксенографты Shelhigh (Shelhigh Inc., Юнион, Нью-Джерси, США) – бычий перикардальный конduit со свиным лёгочным клапаном, а также Bio-Core (Biocore Biotecnologia S.A., Каноас, Бразилия), LabCore (Labcor Laboratórios Ltda., Контагем, Бразилия) и TissueMed (Tissuemed Ltd., Лидс, Великобритания), представляющие из себя бычьи перикардальные кондуиты со свиным аортальным клапаном, также применялись для реконструкции ВОПЖ [Yuan и др., 2008]. На российском рынке представлены ДЭ-фиксированные кондуиты, содержащие свиной аортальный корень (АБ-Композит, НеоКор, Кемерово, Россия) [Karaskov и др., 2016a; Karaskov и др., 2016b]. В ряд исследований сообщается о высокой частоте повторных вмешательств и кальцификации как ГА-обработанных, так и ДЭ-консервированных кондуитов, содержащих свиной аортальный корень, в когорте взрослых пациентов [Flameng и др., 2011; Karaskov и др., 2016a; Karaskov и др., 2016b; Lee и др., 2011; Soor и др., 2009]. Несмотря на достаточно широкое применение данных протезов во взрослой популяции, их результаты при хирургическом лечении ВПС оцениваются как субоптимальные [Forbess, 2004] либо остаются недостаточно описанными.

Ксенографт Matrix P (AutoTissue GmbH, Берлин, Германия) представляет собой децеллюляризированный свиной ксенотрансплантат, который на короткое время приобрёл популярность в начале 2000-х годов. Ранние результаты имплантации данного протеза при операции Росса демонстрировали сопоставимую послеоперационную гемодинамику на уровне пути оттока из ПЖ в ЛА [Konertz и др., 2005]. Однако средне-отдалённые результаты оказались неудовлетворительными. Реконструкция ВОПЖ с использованием кондуита Matrix

Р при операции Росса сопровождалась высокой частотой повторных вмешательств, связанных с их структурной дегенерацией [Christ и др., 2019]. Аналогичные неудовлетворительные результаты наблюдали при применении клапанов следующего поколения — Matrix P plus. Даже краткосрочные, 10-месячные, наблюдения указывали на высокую частоту стенозов децеллюляризованного ксенотрансплантата [Rüffer и др., 2010]. Учитывая полученные данные, в настоящее время от использования этих ксенографтов отказались [Christ и др., 2019; Rüffer и др., 2010; Singh и др., 2025].

Таким образом, до настоящего времени не разработан и не внедрён в клиническую практику клапаносодержащий конduit для протезирования ВОПЖ у детей, полностью отвечающий всем критериям «идеального протеза». Как было описано выше, все существующие варианты легочных графтов обладают значимыми недостатками [Crago и др., 2023]. Долговечность биологических сердечных клапанов ограничена их склонностью к структурной дегенерации, которая проявляется в прогрессирующем разрушении ткани биопротеза и ведёт к нарушению его гемодинамических функций.

Структурная дегенерация биоматериала обусловлена двумя взаимосвязанными механизмами: кальцификацией протезных структур и некальцифицирующей деградацией тканей. Эти процессы деградации во многом обусловлены сложными изменениями в тканях биопротезов, возникающими как в ходе технологии изготовления клапана до имплантации, так и под воздействием факторов окружающей их среды уже после имплантации [Schoen, Levy, 2020].

1.2 Патологическая кальцификация биоматериалов

Кальцификация, или минерализация, представляет собой процесс образования узелковых отложений фосфата кальция и других кальцийсодержащих соединений в тканях или биоматериалах [Schoen, Levy, 2013]. В физиологических условиях данный процесс играет ключевую роль в формировании костной

системы, обеспечивая структурную прочность и функциональную целостность скелетной ткани [Schoen, Levy, 2013]. Однако патологическая, или эктопическая, минерализация развивается в тканях и областях, где кальцификация не является нормальным физиологическим явлением [Kirsch, 2008; Schoen, Levy, 2013].

В контексте биопротезов клапанов сердца патологическая кальцификация является наиболее распространённой формой структурной дегенерации биоматериала и рассматривается как конечный этап, приводящий к их дисфункции [Capodanno и др., 2017; Wen и др., 2022]. Этот патологический процесс выявлен не только в химически обработанных ксеногенных тканях, используемых в биопротезах, но также зафиксирован в гомографтах, синтетических материалах и компонентах медицинских устройств, таких как насосы для экстракорпоральной поддержки и другие имплантируемые системы [Костюнин и др., 2023b].

1.2.1 Детерминанты патологической кальцификации

Кальцификация биопротезов клапанов сердца изначально рассматривалась как пассивный дегенеративный процесс. Исследования Schoen F.J. и Levy R.J. систематизировали представления о механизмах минерализации, авторы предложили модель, учитывающую некоторые детерминанты данного процесса [Schoen, Levy, 2005]. Эта модель предполагает, что начальные очаги нуклеации минералов ассоциированы с повышенным внутриклеточным уровнем кальция в девитализированных клетках и их фрагментах, присутствующих в биоматериале, а также авторами подчёркивается роль минерализации коллагеновых волокон. Модель включает факторы хозяина, факторы имплантата и механические повреждения, детерминирующие минерализацию ткани клапана (Рисунок 1.2).



Рисунок 1.2 – Гипотетическая модель кальцификации биопротезной ткани, предложенная Schoen F.J. и Levy R.J. Эта модель учитывает факторы хозяина, имплантата и механического повреждения. Она связывает начальные места нуклеации минералов с повышенным внутриклеточным кальцием в девитализированных клетках и их фрагментах в биопротезной ткани, а также признает роль независимой минерализации коллагена [Адаптировано из: Schoen F. J., Levy R. J. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention // Ann Thorac Surg. 2005. Т. 79. № 3. С. 1072–1080]

Однако механизм кальцификации биоматериала не следует рассматривать исключительно как пассивный процесс отложения кальция. Он является сложным и многофакторным, и на сегодняшний день мы ещё далеки от полного понимания всех аспектов минерализации тканей биопротеза клапана сердца [Kostyunin и др., 2020a; Kostyunin и др., 2020b; Wen и др., 2022]. В современной литературе выделяют две основные категории детерминант кальцификации: связанные с материалом и связанные с хозяином [Kostyunin и др., 2020b; Schoen, Levy, 2005; Wen и др., 2022]. К первой категории относятся специфическая структура биоматериалов и их физико-химические свойства, определяющие высокую восприимчивость к кальцификации. Ко второй категории относятся реципиент-обусловленные факторы, влияющие на процессы минерализации после имплантации искусственного клапана сердца. В эту группу включают механическое воздействие циклических нагрузок, активацию иммунной системы, окислительный стресс, а также влияние уровня метаболизма реципиента.

1.2.1.1 Факторы метаболизма и иммунного ответа

За последнее десятилетие накоплено множество убедительных доказательств, свидетельствующих о ключевой роли иммунного ответа в процессах кальцификации и дегенерации биологических клапанов сердца [Manji, Hara, Cooper, 2015; Wen и др., 2022; Cooper, 2020]. Согласно ранее опубликованным данным, кальцинированные биопротезы характеризовались значимой инфильтрацией ткани иммунными клетками, включая Т-лимфоциты, макрофаги, В-лимфоциты, нейтрофилы и плазматические клетки, а также сопутствующим повышением концентрации цитокинов в ткани [Bozso и др., 2021b; Manji, Hara, Cooper, 2015; Wen и др., 2022]. В своем крупном когортном исследовании Senage T. с соавторами [Senage и др., 2022] продемонстрировали, что антитела, специфичные к ксеноантигенам биопротезов, существенно увеличиваются уже через месяц после имплантации. Эти антитела, оседая на ткани биоматериала, опосредуют

дисфункцию биопротеза за счет минерализации, что подтверждается обнаружением Neu5Gc, анти-Neu5Gc IgG и отложением комплемента в кальцинированных имплантатах.

Экспериментальные исследования на животных моделях также продемонстрировали активацию иммунного ответа на консервированный биоматериал. В работе Manji R.A. и соавторов было показано, что ксеногенные ткани, обработанные ГА, индуцируют как клеточные, так и гуморальные иммунные реакции [Manji и др., 2006]. Авторы изучали две экспериментальные группы крыс: сингенная группа, получавшая ГА-фиксированные сегменты аортального корня от крыс, и ксеногенная группа, которой имплантировали аналогичные сегменты от морских свинок. Результаты выявили значительное увеличение инфильтрации макрофагами и Т-лимфоцитами в ксеногенных трансплантатах по сравнению с сингенными. Кроме того, у животных ксеногенной группы наблюдался рост уровня IgG, который снижался при терапии стероидами. Важным выводом исследования стала выявленная линейная корреляция между степенью кальцификации ткани и интенсивностью её инфильтрации клеточными элементами, в частности макрофагами [Manji и др., 2006].

Реакция на инородное тело тоже оказывает существенное влияние на процессы минерализации трансплантатов, что особенно отчетливо проявляется при использовании синтетических материалов. Несмотря на отсутствие биологических антигенов, способных вызывать классическую реакцию антиген–антитело, хроническое воспаление, обусловленное небиodeградируемой природой синтетических имплантатов, приводит к фиброзной инкапсуляции и кальцификации ткани протеза [Chong и др., 2016; Lejay и др., 2023]. Активированные макрофаги и гигантские клетки инородного тела выделяют цитокины и факторы роста, формируя микросреду, которая способствует дифференцировке фибробластов в остеобластоподобные клетки, стимулируя минерализацию и гетеротопическую оссификацию ткани [Lejay и др., 2023; Ward, 2008]. Гистологические исследования демонстрируют, что кальцификация может поражать все слои синтетического трансплантата [Mehta и др., 2011; Watanabe и др., 2024].

Еще одним потенциальным механизмом, посредством которого воспалительная реакция способствует кальцификации, является участие протеолитических ферментов, таких как матриксные металлопротеиназы (ММП), а также кальций-связывающих белков, включая остеопонтин и остеонектин, продуцируемых макрофагами и Т-клетками [Manji и др., 2014; Wen и др., 2022]. ММП играют ключевую роль в деградации коллагена и эластина, что приводит к обнажению сайтов нуклеации минеральных кристаллов [Jorge-Herrero, Paez, Castillo-Olivares Ramos Del, 2005; Kostyunin и др., 2020a; Matilla и др., 2020]. Остеонектин и остеопонтин обладают высоким сродством к кальцию [Watanabe и др., 2024; Wen и др., 2022] и участвуют в регуляции дифференцировки остеобластоподобных клеток [Jorge-Herrero, Paez, Castillo-Olivares Ramos Del, 2005].

Ряд работ подтвердили роль иммунного ответа на травму швами в процессе образования кальциевых депозитов [Кудрявцева и др., 2013; Gersak, 1993]. Иммунные клетки, включая макрофаги и лимфоциты, активируются в ответ на повреждение ткани и эндотелиального слоя, инициируя воспалительный каскад, который создает благоприятную микросреду для минерализации [Wen и др., 2022].

Недавние исследования демонстрируют, что субклинический тромбоз створок тесно связан с кальцификацией биопротезов [Brown и др., 2020; Casula и др., 2021; Makkar и др., 2020]. Cartlidge T.R.G. и соавторы [Cartlidge и др., 2019] выявили пространственное совпадение зон кальцификации и тромбоза створок, что позволяет предположить, что тромбоз может выступать в роли потенциального триггера процессов минерализации. Кроме того, фибриновые сгустки, образующиеся на поверхности биоматериала, создают благоприятные условия для бессимптомной бактериальной колонизации [Ghazy и др., 2018; Kostyunin и др., 2023], что, в свою очередь, способствует ускоренной структурной дегенерации протеза. Таким образом, подострый или субклинический эндокардит может выступать одной из причин ранней кальцификации и прогрессирующей деградации биопротезного клапана [Ghazy и др., 2018].

Окислительный стресс, играющий ключевую роль в патогенезе различных заболеваний, включая воспалительные и метаболические расстройства,

способствует разрушению коллагена и повышению восприимчивости клапанных тканей к коллагеназе. Особенно значимы пути, опосредованные гидроксильными и тирозильными радикалами, которые усиливают процессы кальцификации биоматериала [Wen и др., 2022].

В ранее опубликованных работах было отмечено, что у детей и подростков наблюдается более быстрая и агрессивная минерализация биопротезной ткани [Parekh, 2015; Singh и др., 2025; Watanabe и др., 2024]. Этот феномен, вероятно, обусловлен повышенной активностью как иммунной системы [Simon, Hollander, McMichael, 2015], так и метаболических процессов [Homann и др., 2000; Vásquez-Alvarez и др., 2021]. Специфика минерального обмена у молодых пациентов, особенно у детей, направлена на физиологическое формирование костной системы, что может способствовать патологической минерализации биоматериала [Bass, Chan, 2006; Peacock, 2010]. Аналогичные закономерности были выявлены и в экспериментальных моделях на животных [Zhuravleva и др., 2023]. При этом попытки снизить минерализацию биопротезов с помощью системного применения противокальцинирующих препаратов, таких как бисфосфонаты, в экспериментальных условиях приводили к задержке роста животных [Schoen, Levy, 2013].

Скорость и степень дистрофической минерализации значительно увеличиваются при повышенных уровнях кальция и/или фосфора в крови. In vitro исследования продемонстрировали, что скорость роста кристаллов гидроксиапатита на ГА-обработанном бычьем перикарде была линейно пропорциональна степени пересыщения раствора фосфата кальция при стабильных концентрациях кальция и фосфора [D'Alessandro и др., 2020]. Ранее проведённые экспериментальные работы указывают на ключевую роль ионов фосфора в инициации механизма минерализации [Zhuravleva и др., 2023]. Повышение концентрации неорганического фосфата в окружающей среде способствует ускорению нуклеации минеральных кристаллов в тканях имплантата, что может объяснять более агрессивную кальцификацию при определённых метаболических состояниях. Возрастные изменения уровня фосфора в крови являются

значительными: с периода новорожденности до пожилого возраста физиологический уровень фосфатов снижается как минимум в два раза, тогда как уровень кальция колеблется в относительно более узком диапазоне [Lockitch и др., 1988; Watanabe и др., 2024]. Концентрация фосфатов характеризуется высокой лабильностью и зависит не только от возраста, но и от пола, функции почек, гормонального статуса и других факторов [Watanabe и др., 2024]. Значение уровня сывороточного фосфора на минерализацию тканей было подтверждено экспериментально. Так, инкубация *in vitro* конъюгатов щелочной фосфатазы (ЩФ) и коллагена в сыворотках молодых и старых крыс показала, что сывороточный фосфор играет значимую роль в нуклеации минералов *de novo* [Jorge-Herrero, Paez, Castillo-Olivares Ramos Del, 2005]. Этот вывод подкрепляется результатами анализа элементного состава биоматериала, имплантированного подкожно молодым и старым крысам: у молодых животных в минеральных частицах преобладал фосфор над кальцием, тогда как у старых крыс поверхностные частицы содержали кальция вдвое больше, чем фосфора [Zhuravleva и др., 2023].

Кроме того, ЩФ может опосредованно влиять на кальцификацию через регуляцию уровня неорганических фосфатов в крови. Дефосфорилируя органические фосфатные соединения, этот фермент повышает концентрацию циркулирующих неорганических фосфатов [Zhuravleva и др., 2023]. Уровень ЩФ достигает пика в возрасте до 4 лет и в пубертатном периоде, после 18 лет снижается и стабилизируется, что коррелирует с нормализацией концентрации фосфатов в плазме [Turan и др., 2011]. Физиологически высокие уровни циркулирующих неорганических фосфатов и ЩФ в плазме у педиатрических пациентов predispose к минерализации биопротезов. Примечательно, что у взрослых пациентов с дисфункцией биопротезов вследствие выраженной кальцификации также отмечается повышенная активность этого фермента [Uchasova и др., 2015].

Еще одной характерной особенностью молодого возраста является высокая скорость ремоделирования биоматериала, сопровождающаяся дифференцировкой сосудистых интерстициальных клеток в миофибробласты [van Geemen и др., 2016]. Миофибробласты способны экспрессировать остеобластные маркеры, такие как

остеокальцин и костный сиалопротеин, что в конечном итоге приводит к формированию узелковых кальцинированных отложений костного типа внутри структуры клапанной ткани [Badria, Koutsoukos, Mavrilas, 2020].

1.2.1.2 Структура и химический состав имплантата

Для создания биопротезов и легочных кондуитов используются различные биоматериалы, включая корень свиной аорты, свиной и бычий перикард (ПК), а также клапан-содержащий сегмент яремной вены быка (ЯВ) [Harris и др., 2023; Herrmann, Brown, 2020; Singh и др., 2025]. Эти материалы существенно различаются по видовой и тканевой принадлежности, что обуславливает отличия в микроструктуре тканей, составе и соотношении белков внеклеточного матрикса (ВКМ), а также в клеточной наполненности [Zhuravleva и др., 2023]. Стенка свиного аортального корня преимущественно состоит из эластина и гладкомышечных клеток (ГМК) [Mattson, Zhang, 2017], тогда как бычий перикард представлен преимущественно коллагеном I типа [Caballero и др., 2017; Landis, Silver, Freeman, 2006]. Яремная вена быка включает как эластиновые, так и коллагеновые волокна и характеризуется вариабельностью соотношения компонентов ВКМ, что зависит от индивидуальных факторов, таких как возраст, порода животного и особенности его рациона [Mattson, Zhang, 2017; Zhuravleva и др., 2023]. Именно ультраструктуры клеток и ВКМ обеспечивают субстрат и каркас для инициации и роста кристаллов фосфата кальция [Wen и др., 2022].

Все биоматериалы, используемые для изготовления клапаносодержащих кондуитов и биопротезов, требуют проведения химической обработки, направленной на повышение стабильности ткани и улучшение её механических свойств [Jorge-Herrero, Paez, Castillo-Olivares Ramos Del, 2005]. Наиболее распространённым консервирующим агентом для ксеногенных тканей является ГА [Attia, Raja, 2021; D'Alessandro и др., 2020; Jorge-Herrero, Paez, Castillo-Olivares Ramos Del, 2005; Parekh, 2015]. ГА эффективно маскирует ксеноантигены, снижая

иммуногенность ткани, а также препятствует ферментативной деградации материала, что способствует повышению стабильности биоматериала [Harris и др., 2023; Parekh, 2015; Wen и др., 2022].

Консервация с использованием ГА приводит к образованию дополнительных поперечных связей в коллагеновых спиральных структурах, стабилизируя структуру коллагеновых фибрилл [Ferrans и др., 1980; Jorge-Herrero, Paez, Castillo-Olivares Ramos Del, 2005]. В ходе реакции ГА взаимодействует с первичными аминами лизина (Lys), гидроксизина (OHLys) и N-терминальными остатками аминокислот коллагена, формируя, помимо классических оснований Шиффа, пиридиновые поперечные связи [Барбараш, 1995; Parekh, 2015]. Такой механизм ковалентного сшивания обеспечивает долговременную стабилизацию ВКМ, что является ключевым фактором для повышения прочности и биосовместимости биологического материала.

Однако изменение структуры коллагена вследствие ГА-обработки способствует минерализации ткани [Tsolaki и др., 2023]. В эксплантированных дисфункциональных клапанах выявлены кальцинированные волокна, диаметр которых соответствует фибриллам коллагена I типа [Tsolaki и др., 2023]. При этом, в отличие от ГА-консервированных тканей, в нефиксированной коллагеновой матрице признаки кальцификации отсутствовали [Guo и др., 2018; Guo и др., 2021; Levy и др., 1986; Zhuravleva и др., 2021a]. In vitro исследования с использованием перенасыщенных растворов фосфата кальция с постоянным уровнем содержания ионов кальция и фосфора показали, что необработанные перикардальные лоскуты не подвергались кальцификации [D'Alessandro и др., 2020].

Данный феномен можно объяснить нарушением баланса зарядов тканевых белков под воздействием консерванта [Badria, Koutsoukos, Mavrilas, 2020; Wen и др., 2022; Zhuravleva и др., 2023]. ГА-обработка приводит к обнажению большого количества отрицательно заряженных групп, которые могут служить активными сайтами для связывания ионов кальция и, таким образом, выступать в роли центров нуклеации минеральных кристаллов [Badria, Koutsoukos, Mavrilas, 2020; Kim, Herrera, Battarbee, 1999]. Помимо этого, пиридиновые поперечные связи,

образующиеся в коллагене после ГА-фиксации и специфичные для костной ткани, способны провоцировать кристаллизацию фосфатов кальция [Барбараш, 1995]. Положительно заряженные пиридиновые кольца могут выступать в качестве центров нуклеации минеральных кристаллов за счет активного связывания неорганических фосфатов из окружающей среды имплантата. В результате формируется комплекс «пиридиний/фосфат», который приобретает отрицательный заряд и способен дополнительно присоединять ионы Ca^{2+} (Рисунок 1.3) [Zhuravleva и др., 2023].

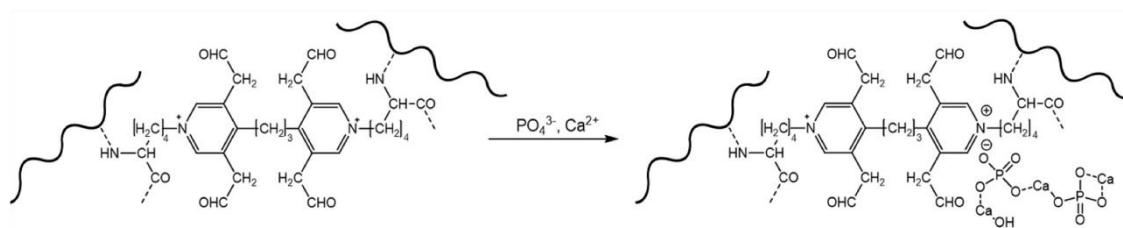


Рисунок 1.3 – Взаимодействие положительно заряженного азота в пиридинии ГА-фиксированного коллагена с Ca^{2+} [Zhuravleva I. Y. и др. Calcification of various bioprosthetic materials in rats: is it really different? // Int J Mol Sci. 2023. Т. 24. № 8. С. 7274]

В отличие от коллагена, которому свойственна кальцификация после обработки ГА [Guo и др., 2018; Guo и др., 2021; Levy и др., 1986; Zhuravleva и др., 2021a], эластин минерализуется как в несшитом состоянии, так и после альдегидной фиксации [Parashar и др., 2021; Rapoport и др., 2007]. Ранее было показано, что эластин не вступает в ковалентное связывание с ГА, однако содержит значительное количество сайтов для связывания ионов кальция [Vyavahare и др., 1999; Wen и др., 2022; Zhuravleva и др., 2023]. Аналогично ГА-сшитому коллагену, в структуре эластина присутствует положительно заряженное пиридиновое кольцо [Zhuravleva и др., 2023], которое является ядром десмозина — основной аминокислоты, обеспечивающей поперечные связи эластиновых волокон и их эластические свойства [Schröder и др., 2018]. Механизм связывания кальция в эластине схож с таковым в ГА-обработанном коллагене и основан на взаимодействии положительно заряженного пиридинового кольца с фосфат-анионом. В результате образуется комплекс, который привлекает ионы Ca^{2+} из

окружающей среды (Рисунок 1.4) [Zhuravleva и др., 2023]. Таким образом, наличие пиридиновых структур в эластине способствует формированию центров нуклеации минеральных кристаллов, что объясняет склонность эластиновых волокон к минерализации независимо от химической обработки.

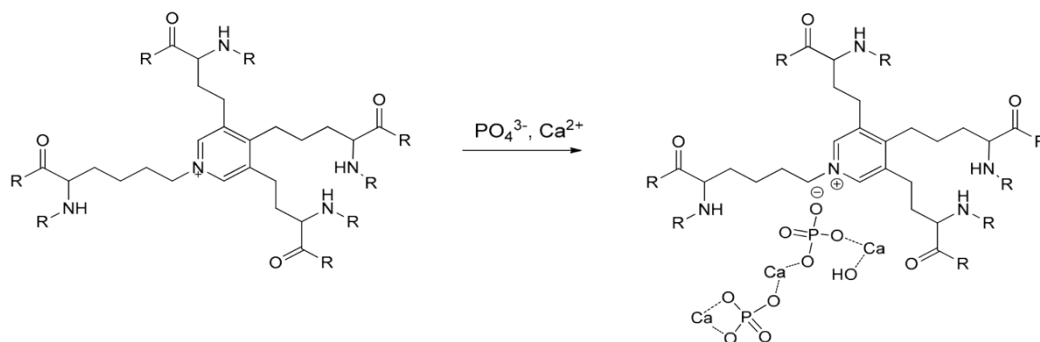


Рисунок 1.4 – Взаимодействие положительно заряженного азота в пиридинии эластина с Ca^{2+} [Zhuravleva I. Y. и др. Calcification of various bioprosthetic materials in rats: is it really different? // Int J Mol Sci. 2023. Т. 24. № 8. С. 7274]

Кроме того, эластиновые волокна содержат многочисленные сопутствующие белки, среди которых значительная часть обладает способностью связывать ионы кальция, включая фибриллины, тенасцины, витронектин и другие [Roumeliotis и др., 2020; Shin и др., 2020]. В частности, было выдвинуто предположение, что витронектин может выступать в роли промотора кальцификации. В экспериментальной модели было выявлено, что его локализация в стенках эластин-содержащих тканей совпадает с очагами начальной кальцификации [Zhuravleva и др., 2023].

Гликозаминогликаны, входящие в состав ВКМ, также не могут быть сшиты ГА и постепенно теряются во время подготовки, хранения и имплантации биопротеза [Leong и др., 2013]. Деградация гликозаминогликанов способствует нарушению целостности коллагена, что приводит к обнажению дополнительных зон трехмерной структуры и формированию пустот, благоприятствующих зарождению кристаллов фосфата кальция [Барбараш, 1995; Kim, Herrera, Battarbee, 1999; Wen и др., 2022].

Также химическое сшивание биоматериала приводит к девитализации клеток [Kim, Herrera, Battarbee, 1999; Parekh, 2015], что потенцирует минерализацию

трансплантата [Schoen, Levy, 2005; Wen и др., 2022; Zhuravleva и др., 2023]. Девитализированные ГМК и клеточный дебрис обладают многочисленными сайтами связывания Ca^{2+} и выступают в качестве активных нуклеаторов кристаллов фосфата кальция [Jorge-Herrero, Paez, Castillo-Olivares Ramos Del, 2005; Wen и др., 2022]. В нормальных физиологических условиях внутриклеточная концентрация кальция значительно ниже внеклеточной, что обеспечивается митохондриями через кальциевые насосы [Kiełbik и др., 2020]. Исследования *in vitro* продемонстрировали, что ГА-обработка вызывает гибель клеток и инактивацию кальциевых насосов, приводя к быстрому притоку Ca^{2+} из внеклеточного пространства в цитоплазму [Kim, Herrera, Battarbee, 1999; Koziarz и др., 2020]. Повышение внутриклеточной концентрации кальция увеличивает вероятность его связывания с фосфатами, локализованными в различных структурах клетки, таких как клеточные мембраны и ДНК, что способствует формированию критических ядер, необходимых для инициации минерализации [Badria, Koutsoukos, Mavrilas, 2020; Schoen, Levy, 1992; Wen и др., 2022]. Также повреждение клеток ассоциировано с увеличением цитозольного фосфата [Crago и др., 2023; Kim, 2002]. Отсутствие васкуляризации в имплантированных биопротезах препятствует своевременному удалению клеточного дебриса и девитализированных клеток макрофагами, вследствие чего они становятся центрами нуклеации кристаллов гидроксиапатита [Schoen, Levy, 1992; Wen и др., 2022]. Наличие в эксплантированных клапанах кальцинированных частиц, расположенных между фибриллами внеклеточного матрикса и не связанных с ними локально, подтверждает клеточное происхождение кальциевых депозитов [Tsolaki и др., 2023]. Электронная микроскопия выявила наличие мелких кальциевых депозитов, распространяющихся из клеток в прилегающий внеклеточный матрикс [Kim, 2002]. В некоторых случаях обнаруживались небольшие кальцинированные отложения, локализованные на поверхности митохондрий и клеточных ядер [Schoen, Levy, 2013].

Помимо усиления минерализации ткани биопротеза, одной из потенциальных проблем при ГА-фиксации является наличие свободных

альдегидных остатков в обработанных тканях или их высвобождение из полимерных поперечных связей [D'Alessandro и др., 2020; Jorge-Herrero, Paez, Castillo-Olivares Ramos Del, 2005; Kim, Herrera, Battarbee, 1999]. Как свободный ГА, выделяющийся из протезных тканей после имплантации, так и ковалентно связанные с белками альдегидные группы могут оказывать цитотоксическое воздействие на клетки реципиента и ингибировать процессы ремоделирования ткани [Lopez-Moya и др., 2018; Maizato и др., 2003; Parekh, 2015; Umashankar, Kumari, Mohanan, 2012].

1.2.1.3 Механические факторы

Циклическое механическое напряжение оказывает непосредственное влияние на процесс кальцификации биопротезов. Во время каждого сердечного цикла биопротезы подвергаются значительным механическим нагрузкам, при этом максимальные напряжения локализуются в зонах наибольшего изгиба створок. Створки протезного клапана испытывают высокие переходные напряжения в момент закрытия, а также циклические изгибающие и сжимающие напряжения в процессе открытия клапана [Jorge-Herrero, Paez, Castillo-Olivares Ramos Del, 2005]. Концентрация высоких напряжений способствует ускорению структурного усталостного повреждения ткани и может инициировать кальцификацию биоматериала, что в конечном итоге приводит к снижению функциональной устойчивости протеза.

Изучив 64 пары биопротезов Hancock I (Medtronic Inc, Миннеаполис, Миннесота, США), которые находились в системе притока и оттока устройства вспомогательного кровообращения левого желудочка HeartMate XVE (Thoratec, Калифорния, США), Liao К.К. с соавторами отметили более выраженную степень кальцификации приточных клапанов, по сравнению с отточными [Liao и др., 2008]. Такая разница объясняется значительно более высоким механическим давлением, которому подвергаются клапаны притока. В частности, различия в степени

кальцификации связывают с более высоким давлением закрытия и большим градиентом давления, испытываемым клапанами притока по сравнению с клапанами оттока [Liao и др., 2008].

Области комиссур и основания створок биопротезных клапанов подвергаются повышенным механическим нагрузкам в ходе каждого сердечного цикла [Badria, Koutsoukos, Mavrilas, 2020; Liao и др., 2008; Tsolaki и др., 2023], что способствует повреждению ВКМ [Parekh, 2015; Zareian и др., 2019; Zhang и др., 2021]. Микроповреждения коллагеновых волокон приводят к обнажению химически активных участков, которые служат зонами нуклеации кристаллов, формирующихся из ионов кальция и фосфата, диффундирующих в ткань [Badria, Koutsoukos, Mavrilas, 2020; D'Alessandro и др., 2020; Schoen, Levy, 2005; Whelan и др., 2021].

Zareian R. и соавторы [Zareian и др., 2019], в эксперименте с использованием кальцинирующего раствора оценивали влияние механического обжима стента на преждевременную минерализацию биоматериала. Результаты показали, что повреждение ВКМ вследствие механического воздействия способствует увеличению отложения солей кальция в ткани и приводит к распространению минерализации в более глубокие слои. В исследовании Vaesken A. и коллег [Vaesken и др., 2018] было установлено, что во время обжима транскатетерного клапана при его сборке биологический материал испытывает дополнительную механическую нагрузку и подвергается деградации ещё до момента имплантации. Ранее также было продемонстрировано, что сама по себе деформация ткани в зонах складок и изгибов усиливает процесс минерализации материала [Levy и др., 1983].

1.2.2 Патогенез минерализации биоматериала

Сходство механизмов патогенеза кальцификации, наблюдаемое в различных экспериментальных моделях и биопротезах, используемых в клинике, указывает на наличие общей патофизиологической основы, независимо от локализации имплантата [Schoen, Levy, 2013]. С физико-химической точки зрения процесс

кальцификации сердечных клапанов характеризуется формированием и распространением минеральных депозитов фосфата кальция как на поверхности, так и внутри тканей биологических клапанов [D'Alessandro и др., 2020]. Кальцификация развивается при наличии в биоматериале специфических сайтов связывания ионов кальция, а также при условии, что окружающая среда реципиента содержит ионы кальция и фосфата в концентрациях и соотношениях, достаточных для инициации образования нерастворимых форм фосфата кальция [Parashar и др., 2021; Zhuravleva и др., 2023]. Выполнение этих условий запускает процесс кальцификации биоматериала, который может инициироваться как внутри клеток, так и в ВКМ [Koziarz и др., 2020].

Как было описано выше, ГА-консервация биоматериала приводит к девитализации клеток ткани, вызывает изменение конформации коллагеновых волокон и способствует формированию в коллагеновой матрице центров кристаллизации гидроксиапатита (Рисунок 1.5) [Барбараш, 1995; Badria, Koutsoukos, Mavrilas, 2020; Kim, Herrera, Battarbee, 1999; Parekh, 2015]. Нарушение функции ГМК сопровождается внутриклеточным накоплением ионов Ca^{2+} и их последующей минерализацией [Jorge-Herrero, Paez, Castillo-Olivares Ramos Del, 2005; Schoen, Levy, 2005; Wen и др., 2022; Zhuravleva и др., 2023].

Кроме того, после ГА-фиксации наблюдается усиление кальций-связывающей способности биоматериала за счёт изменения баланса зарядов белков коллагена в сторону увеличения отрицательно заряженных групп [Badria, Koutsoukos, Mavrilas, 2020; Wen и др., 2022; Zhuravleva и др., 2023].

После имплантации и контакта с гемосредой на поверхности биоматериала происходит неспецифическая адсорбция плазменных белков [Sakaue и др., 2018; Wen и др., 2022], а также инфильтрация воспалительных клеток [Kostyunin и др., 2020a]. Адсорбция белков плазмы реципиента инициирует ряд последующих биологических процессов, включая активацию системы комплемента и тромбоцитов, запуск каскада коагуляции и адгезию клеток [Zhu и др., 2019].

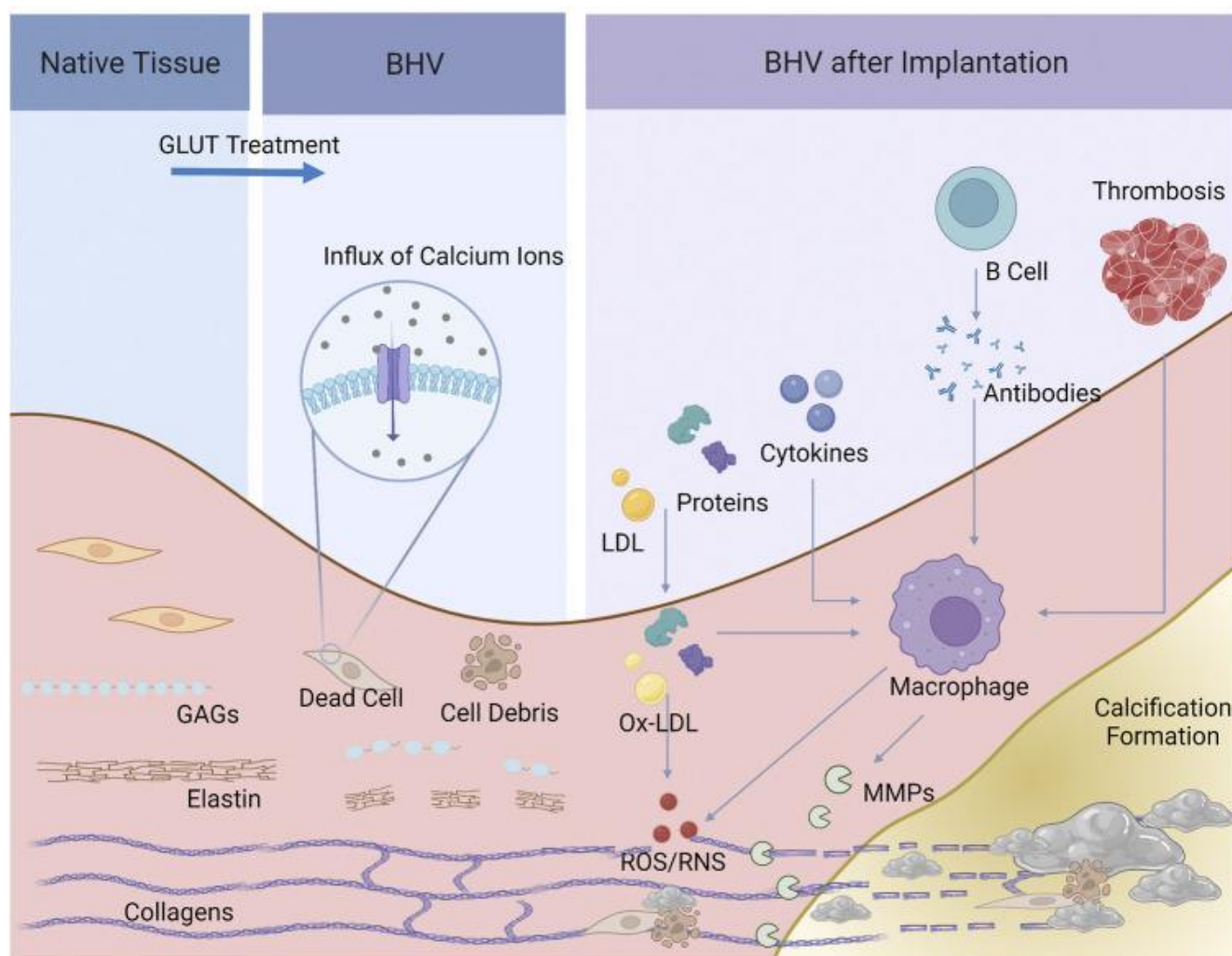


Рисунок 1.5 – Схематическое изображение процесса кальцификации биопротезной ткани.

Antibodies, антитела; B-Cell, В-клетки; BHV, bioprosthetic heart valve, биопротез клапана сердца; BHV after implantation, биопротез после имплантации; Calcification Formation, формирование кальцификатов; Cell Debris, клеточный дебрис; Cytokines, цитокины; Dead Cell, мертвые клетки; Collagens, коллаген; Elastin, эластин; GAGs, glycosaminoglycans, гликозаминогликаны; GLUT Treatment, обработка ГА; Influx of Calcium Ions, приток ионов кальция; Macrophage, макрофаг; MMPs, matrix metalloproteinases, матриксные металлопротеиназы; Native tissue, нативная ткань; Proteins, белки; ROS/RNS, reactive oxygen and nitrogen species, активные формы кислорода и азота; Thrombosis, тромбоз [Wen S. и др. Mechanisms and drug therapies of bioprosthetic heart valve calcification //Frontiers in Pharmacology. – 2022. – Т. 13. – С. 909801]

Затем моноциты и макрофаги привлекаются к поверхности биоматериала посредством слоя адсорбированных белков [Wen и др., 2022]. Инфильтрация воспалительных клеток сопровождается деградацией ВКМ. Моноциты и макрофаги адгезируются к поверхности биоматериала и разрывают белки ВКМ с помощью инвадоподий [Kostyunin и др., 2020a]. В процессе фагоцитоза эти клетки высвобождают протеолитические ферменты, такие как ММП, а также продуцируют активные формы кислорода и азота [Wen и др., 2022]. ММП-зависимый протеолиз, наряду с фибринолизом, приводит к расщеплению основных компонентов ВКМ, включая эластиновые волокна и фиксированный коллаген [Kostyunin и др., 2020b]. Активные формы кислорода и азота, образующиеся во время фагоцитоза, вызывают окислительное повреждение коллагена и разрушение поперечных связей, образованных ГА, что приводит к демаскировке ксеноэпитопов и повышению восприимчивости ВКМ к дальнейшей деградации [Harris и др., 2023; Human и др., 2022].

Механические нагрузки также способствуют повреждению и разрыву волокон ВКМ [Wen и др., 2022; Whelan и др., 2021]. Кроме того, под воздействием циклических нагрузок и гемодинамического давления снижается эффективность ГА-фиксации, что приводит к обнажению все большего числа ксеноантигенов и, как следствие, усиливает иммунный ответ на биоматериал [Harris и др., 2023].

Деградация и разрушение ВКМ создают пространственные условия, способствующие развитию кальцификации [Wen и др., 2022]. Ионы кальция и фосфаты, поступающие из окружающих тканей, а также присутствующие в большом количестве в самом ВКМ, формируют благоприятное микроокружение для патологической минерализации биоматериала [Kostyunin и др., 2023; Wen и др., 2022; Zhuravleva и др., 2023]. При этом активность ионов, составляющих соли в биологических жидкостях, контактирующих с тканями протезов, превышает растворимость образующихся минералов [D'Alessandro и др., 2020]. Кроме того, кальций-связывающие белки, продуцируемые макрофагами, усиливают нуклеацию гидроксиапатитов, способствуя прогрессированию кальцификации [Busch и др., 2000; Zhu и др., 2020].

Согласно классическим представлениям о процессе минерализации тканей, кальцификация биоматериала развивается в две стадии: инициирование фосфата кальция, характеризующееся образованием кристаллического ядра, и последующий рост кристалла, связанный с количественным увеличением массы минеральных структур [Schoen, Levy, 2020; Wang, Nancollas, 2008]. Считается, что вторая стадия кальцификации практически не поддается ингибированию. После завершения этапа зарождения фосфата кальция дальнейший рост минеральных кристаллов приобретает необратимый характер [Vidavsky, Kunitake, Estroff, 2021], что в конечном итоге приводит к структурному повреждению биоматериала [Zhuravleva и др., 2023].

1.3 Методы профилактики патологической кальцификации

Для профилактики патологической кальцификации биоматериалов были предложены три основные стратегии: системная терапия, направленная на подавление кальцификации; местное воздействие с использованием систем доставки лекарственных средств; а также модификация самого биоматериала [Schoen, Levy, 2013].

Экспериментальные исследования с использованием биопротезной ткани, имплантированной подкожно крысам, продемонстрировали, что адекватные дозы системных агентов, применяемых для лечения метаболических заболеваний костей, способны предотвращать кальцификацию имплантатов [Levy и др., 1986; Schoen, Levy, 2013]. Однако системная терапия противокальцинирующими препаратами, несмотря на эффективность, сопряжена с серьезными ограничениями в безопасности, поскольку данные препараты могут нарушать физиологический процесс формирования костей [Parekh, 2015]. В частности, у животных, получавших такие препараты, наблюдалась задержка роста. Таким образом, ключевым недостатком системного применения противокальцинирующих агентов является ингибирование нормального формирования костной ткани и роста организма.

Для преодоления этих ограничений был предложен альтернативный подход, основанный на использовании коимплантатов — систем доставки лекарственных средств, локализованных вблизи биопротеза. Такая стратегия позволяет поддерживать эффективную концентрацию препарата непосредственно в зоне имплантации, минимизируя системные побочные эффекты [Levy и др., 1985]. Исследования с применением этан гидроксибисфосфоната, иммобилизованного в неразлагаемых полимерах (этилинвинилацетат, полидиметилсилоксан, эластик, полиуретаны), показали эффективность данного подхода у молодых животных [Schoen, Levy, 2013]. Тем не менее, клиническая реализация этой методики сопряжена с рядом технических и биологических сложностей.

Наиболее перспективным и практически реализуемым представляется подход, основанный на модификации самого биоматериала, включающий изменение кальцифицируемого субстрата или иммобилизацию ингибиторов связывания ионов Ca^{2+} [Parekh, 2015].

1.3.1 Децеллюляризация ткани

Поскольку начальные участки минерализации локализуются в девитализированных ГМК биопротезной ткани, было выдвинуто предположение, что удаление этих клеток может снизить кальций-связывающую склонность материала [Courtman и др., 1994; Wilson и др., 1995; Zhuravleva и др., 2023]. С 1980-х годов активно исследовалась роль фосфолипидов клеточных мембран в инициировании нуклеации кальция [Li, 2019]. В качестве решения была предложена децеллюляризация биологических графтов, как перспективный подход к снижению кальцификации биопротезов.

Концепция децеллюляризации основана на удалении донорских клеток из ткани с использованием химических, ферментативных или физических методов, при этом сохраняется ВКМ, который служит каркасом для последующего заселения аутологичными клетками *in vivo* и регенерации ткани [García-Gareta и

др., 2020]. Несмотря на постоянное совершенствование методик децеллюляризации, полное удаление клеточных элементов и их фрагментов при одновременном сохранении структурного и биохимического состава ВКМ остаётся технически сложной задачей. Кроме того, иммуногенность децеллюляризованных трансплантатов не может быть полностью устранена, что обусловлено возможными иммунными реакциями на остаточные клеточные компоненты или следы детергентов, применяемых в процессе обработки [Badria, Koutsoukos, Mavrilas, 2020; Crago и др., 2023; Ebken и др., 2021; Harris и др., 2023].

Одними из сертифицированных и коммерчески доступных децеллюляризованных ксеногенных кондуитов для реконструкции ВОПЖ являются графты серии Matrix P (AutoTissue GmbH, Берлин, Германия). Они представлены в трёх вариантах: Matrix P — цельный свиной ЛА-корень; Matrix P Plus VR — свиной ЛА-корень, покрытый ГА-фиксированным конским перикардом; Matrix P Plus NVR — свиной ЛА-корень, покрытый децеллюляризованным конским перикардом. Доклинические исследования данных протезов продемонстрировали многообещающие результаты [Erdbrügger и др., 2006], а краткосрочные клинические наблюдения у взрослых пациентов подтвердили их функциональную эффективность [Weymann и др., 2010]. Тем не менее, средне-отдалённые результаты применения протезов Matrix P для реконструкции ВОПЖ оказались неудовлетворительными, характеризуясь высокой частотой повторных хирургических вмешательств [Christ и др., 2019]. Основными проявлениями дисфункции децеллюляризованных ксенографтов были клапанная регургитация, обусловленная разрушением створок, и стенозирование дистального отдела кондуита. Эти нарушения функции ассоциировались с иммуноопосредованной дегенерацией трансплантата, что подтверждалось гистологическими данными, включающими выраженный фиброз, тяжёлое воспаление и реакцию инородного тела [Böer и др., 2015; Voges и др., 2013]. Ретроспективный клинический анализ выявил связь между наличием тканеспецифических антител и частотой клапанной недостаточности [Böer и др., 2015]. В тоже время, у педиатрической популяции даже краткосрочные результаты применения Matrix P оказались

неудовлетворительными, с высокой частотой стенозов кондуита [Rüffer и др., 2010]. На основании полученных данных авторы не рекомендуют использование децеллюляризированных ксенографтов серии Matrix P для реконструкции ВОПЖ как у взрослых, так и у детей [Christ и др., 2019; Rüffer и др., 2010].

1.3.2 Смена основного сшивающего агента

Качественные и количественные характеристики поперечной сшивки зависят от химической структуры сшивающего агента и механизмов его взаимодействия с биоматериалом, оказывая при этом существенное влияние на широкий спектр биологических, механических и функциональных свойств биопротезов [Hendriks, Everaerts, Verhoeven, 2001; Soda и др., 2009; Sung, Hsu, Hsu, 1997]. Как было показано ранее, ГА-обработка способствует минерализации биоматериала за счёт увеличения количества кальций-связывающих сайтов. Кроме того, данный метод характеризуется выраженным цитотоксическим воздействием на клетки реципиента и провоцирует иммунный ответ на ткань протеза [Zheng, Yang, Wang, 2024]. Учитывая сохраняющееся недовольство негативными последствиями применения ГА-фиксации, актуальной представляется стратегия смены основного сшивающего агента на соединение, которое не только обеспечит эффективное укрепление компонентов ВКМ, но и будет обладать сниженной цитотоксичностью и иммуногенностью. Такая стратегия позволит замедлить процессы структурной деградации биопротезов и повысить их долговечность и биосовместимость.

В литературе описаны различные подходы к «не-глутаральдегидному» сшиванию биопротезной ткани [Zheng, Yang, Wang, 2024]. Обработка биоматериалов химическими агентами, такими как карбодиимиды, ацилазиды, генипин и другие, продемонстрировала снижение интенсивности минерализации в модели подкожной имплантации у мелких лабораторных животных [Myers и др., 1995; Xi и др., 1992; Zheng, Yang, Wang, 2024]. Аналогично, уменьшение степени кальцификации биопротезов было зафиксировано при применении триглицидиламина и

фотоокислительных консервантов в экспериментальных моделях на крупных лабораторных животных, таких как овцы [Jorge-Herrero, Paez, Castillo-Olivares Ramos Del, 2005; Moore, Phillips, 1997; Parekh, 2015].

Ряд исследователей предложили использование эпоксидных соединений в качестве основного консерванта биопротезной ткани [Ichikawa и др., 1994; Imamura и др., 1989; Noishiki и др., 1993; Zhuravleva и др., 2021a]. Интерес к данной группе химических агентов обусловлен, прежде всего, их меньшей склонностью к индуцированию кальцификации и биodeградации тканей, а также лучшей цитосовместимостью по сравнению с ГА-обработкой [Bre, McCarthy, Wang, 2014; Imamura и др., 1989; Rezvova, Kudryavceva, 2018; Sung и др., 1993; Xi и др., 1992]. Экспериментальные исследования показали, что консервация эпоксидными соединениями обеспечивает плотность поперечных сшивок в коллагенсодержащих биоматериалах, сопоставимую с таковой при использовании ГА [Sung и др., 1993]. Были изучены различные типы эпоксидных соединений [Noishiki и др., 1993; Zhuravleva и др., 2021a] при этом установлено, что их реакционная способность уменьшается с увеличением длины углеродной цепи [Nishi, Nakajima, Ikada, 1995].

Низкомолекулярным эпоксидным соединением, применяемым в протоколах химической обработки нового поколения, является диглицидиловый эфир этиленгликоля (диэпоксид, ДЭ) [Kostyunin и др., 2023]. Длина углеводной цепи диэпоксида лишь незначительно отличается от таковой у ГА. Кроме того, данное эпоксидное соединение содержит в своей структуре две реакционноспособные группы, необходимые для формирования поперечных сшивок коллагена [Барбараш, 1995]. В отличие от ГА, который при связывании с коллагеном делает биоматериал жестким и гидрофобным [Gott и др., 1992; Ichikawa и др., 1997; Levy и др., 1983], поперечные сшивки, образуемые с участием ДЭ, характеризуются гидрофильностью и повышенной химической подвижностью, обусловленной наличием двух атомов кислорода и отсутствием двойных связей в молекуле [Барбараш, 1995]. Эти особенности определяют ряд потенциально полезных свойств ДЭ-фиксированной ткани по сравнению с материалами, обработанными ГА.

Высокая гидрофильность биоматериалов, фиксированных эпоксидными соединениями, обуславливает их меньшую склонность к минерализации за счёт препятствования взаимодействию ионов кальция и фосфора в парафибриллярном пространстве коллагеновой матрицы [Барбараш, 1995]. В серии экспериментов с подкожной имплантацией у мелких лабораторных животных было продемонстрировано, что эпоксидные консерванты обеспечивают более эффективную антикальциевую защиту биопротезных тканей по сравнению с ГА-обработкой [Imamura и др., 1989; Xi и др., 1992; Zhuravleva и др., 2023]. В экспериментальных исследованиях на крупных лабораторных животных, включавших имплантацию эпокси-консервированной яремной вены быка собакам, признаки кальцификации не были выявлены ни через 5 месяцев, ни через 1 год после операции [Ichikawa и др., 1997; Noishiki и др., 1993]. Несмотря на полученные обнадеживающие результаты для коллагенсодержащих биоматериалов, эпоксидные соединения не демонстрируют эффективного ингибирующего действия на кальцификацию тканей, богатых эластином [Ding и др., 2022; Elagin и др., 2020; Guo и др., 2018; Guo и др., 2021; Zhuravleva и др., 2021a].

Еще одним преимуществом гидрофильных свойств эпокси-консервированных тканей является их тромборезистентность [Imamura и др., 1989]. Повышенная гидрофобность фиксированных биоматериалов ассоциируется с усилением иммунных реакций и повышенным риском тромбоза [Sperling и др., 2017]. В отличие от них, гидрофильные поверхности окружены слоем воды [Ichikawa и др., 1997], который формирует пассивный барьер, препятствующий инициации агрегации тромбоцитов и осаждению фибрина [Crago и др., 2023; Ichikawa и др., 1997; Maitz и др., 2019]. В результате обработки эпоксидными соединениями биоматериал приобретает нетромбогенные свойства [Ichikawa и др., 1997]. Экспериментальные данные, полученные на фрагментах аллогенной большой подкожной вены, продемонстрировали, что ДЭ-обработка способствует значительному снижению склонности к тромбообразованию даже без дополнительной иммобилизации гепарином [Барбараш, 1995]. Эти результаты подчеркивают потенциал эпоксидных агентов для улучшения гемосовместимости биопротезов.

Другим несомненным преимуществом обработки эпоксидными соединениями является их меньшая цитотоксичность по сравнению с ГА [Nishi, Nakajima, Ikada, 1995; Zheng, Yang, Wang, 2024]. В ряде *in vitro* исследований было продемонстрировано, что экстракты ксеноперикарда, консервированного ди- и пентаэпоксидными соединениями, не оказывают токсического воздействия на эндотелиальные клетки, мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки и фибробласты, в отличие от экстрактов ГА-обработанных образцов [Бондаренко и др., 2021]. В экспериментальных моделях на крупных лабораторных животных наблюдалась активная миграция фибробластов и ГМК в структуры эпокси-консервированных ЯВ-графтов, а также эндотелизация стенок кондуитов [Ichikawa и др., 1994]. В то же время для ГА-фиксированных клапанов характерно отсутствие рецеллюляризации и эндотелизации даже спустя 6 месяцев после ортотопической имплантации [Honge и др., 2011]. Эти данные свидетельствуют о более благоприятном биологическом профиле эпоксидных консервантов и их потенциале для улучшения интеграции биопротезов.

Как показано в предыдущих исследованиях, биоматериалы, обработанные эпоксидными соединениями, характеризуются сниженной иммуногенностью и менее выраженной воспалительной реакцией по сравнению с тканями, фиксированными ГА [Chang и др., 1997]. В эксперименте с подкожной имплантацией у крыс была продемонстрирована повышенная устойчивость эпокси-консервированных материалов к биodeградации [Elagin и др., 2020]. Ряд исследований показал, что эпокси-обработанные ткани не вызывают реакции инородного тела, выражающейся в миграции гигантских клеток, макрофагов или лимфоцитов, при ортотопической имплантации протезов у крупных лабораторных животных [Ichikawa и др., 1997; Nojiri, Noishiki, Koyanagi, 1987]. Кроме того, было выявлено, что образцы, обработанные ДЭ, обладают наибольшей протеолитической стабильностью по сравнению с другими консервирующими агентами, что делает данный метод обработки перспективным для применения в сердечно-сосудистой хирургии [Grebenik и др., 2019].

Помимо обеспечения биологической стабильности ткани, ДЭ-сшивка способствует улучшению механических характеристик биоматериала [Grebenik и др., 2019]. Сохранение гибкости и эластичности тканей при обработке эпоксидными соединениями выгодно отличает их от ГА и имеет существенное значение для функциональной эффективности имплантатов [Барбараш, 1995; Chang и др., 1997; Schoen, Levy, 2005; Zhuravleva и др., 2021a]. В исследовании Ichikawa Y. и соавторов было показано, что эпокси-консервированные ЯВ-графты сохраняли исходные механические свойства даже через 1 год после ортотопической имплантации в модели крупных лабораторных животных [Ichikawa и др., 1997]. При этом прочностные характеристики биоматериала, обработанного ДЭ, были сопоставимы с таковыми у ГА-фиксированных образцов [Барбараш, 1995; Imamura и др., 1989]. Вероятной причиной данного феномена являются гидрофильные свойства и повышенная химическая подвижность эпоксидной поперечной сшивки [Барбараш, 1995], в то время как ГА содержит непрерывную пятиуглеродную цепь, придающую фиксированным тканям жесткость и гидрофобность [Ichikawa и др., 1997].

Таким образом, существующие данные подтверждают потенциал применения диэпоксида для обработки биоматериалов при изготовлении ксеногенных кондуитов и их использовании в кардиохирургии. Улучшение эксплуатационных характеристик ДЭ-консервированных биоматериалов и, как следствие, повышение долговечности протезов по сравнению с ГА-обработанными трансплантатами особенно актуально для педиатрической группы пациентов, учитывая необходимость многократной замены ЛА-протезов у детей с ВПС.

1.3.3 Модификация консервированного биоматериала дополнительными химическими агентами

Модификация биоматериалов дополнительными химическими агентами направлена на улучшение функциональных характеристик и повышения

биосовместимости ткани. Этот процесс позволяет целенаправленно изменять химические и биологические свойства ткани, улучшая устойчивость биоматериала к биодеградации, кальцификации, а также снижая ее иммуно- и тромбогенность.

Кроме того, процесс модификации оказывает минимальное влияние на технологию изготовления протезов клапанов сердца. Он достаточно легко интегрируется в существующие протоколы консервации и производства биопротезов, не требуя значительных изменений конструкции или материалов.

Были предложены различные варианты химических соединений для модификации биопротезной ткани, направленной на предотвращение ее минерализации (Таблица 1.1) [Schoen, Levy, 2013].

Таблица 1.1 – Примеры модифицирующих агентов с антиминерализующим эффектом, обладающих потенциалом практического применения, и их механизмов действия [Schoen, Levy, 2013; Zheng, Yang, Wang, 2024]

Механизм	Химическое соединение
Ингибирование диффузии ионов кальция	2-α-аминоолеиновая кислота Альгинат натрия
Блокирование остаточной альдегидной группы	2-α-аминоолеиновая кислота Гепарин
Ингибирование роста кристаллов Са-Р; ингибирование щелочной фосфатазы; химическая модификация эластина	Хлорид железа/алюминия
Ингибирование образования гидроксиапатита	Этангидроксифосфонат
Экстракция фосфолипидов	Додецилсульфат натрия (SDS)
Экстракция фосфолипидов и модификация конформации коллагена	Этанол

Примечание: Са, кальций; Р, фосфор; SDS (sodium dodecyl sulfate), додецилсульфат натрия.

1.3.3.1 Аминоолеиновая кислота

Соединение 2-α-аминоолеиновая кислота содержит в своем составе как гидрофильные аминогруппы, так и гидрофобные жирные цепи [Chen и др., 1994; Chen,

Schoen, Levy, 1994]. Считалось, что, с одной стороны, благодаря ковалентному связыванию через amino-связь с остаточными альдегидными группами ГА в биопротезной ткани, она эффективно нейтрализует их токсический эффект [Chen и др., 1994; Chen, Schoen, Levy, 1994; Jorge-Herrero, Paez, Castillo-Olivares Ramos Del, 2005; Shang и др., 2017]. С другой стороны, наличие жирных цепей в молекуле α -аминоолеиновой кислоты способствует подавлению диффузии ионов кальция в коллагеновый матрикс биопротеза, что ингибирует начальный этап нуклеации кристаллов апатита и, как предполагалось, снижает риск патологической кальцификации в долгосрочной перспективе [Chen и др., 1994; Chen, Schoen, Levy, 1994; Jorge-Herrero, Paez, Castillo-Olivares Ramos Del, 2005; Zheng, Yang, Wang, 2024].

Тем не менее, первоначальные положительные ожидания от использования 2- α -аминоолеиновой кислоты были подорваны рядом выявленных недостатков. В частности, исследования показали образование гематом створок, структурное разрыхление коллагеновой матрицы и увеличение шероховатости поверхности. Нерастворимые частицы 2- α -аминоолеиновой кислоты, присутствующие в растворе для обработки, стали причиной механического истирания створок клапана в процессе производства биопротеза. Кроме того, эффективность данной химической обработки для предотвращения кальцификации оказалась недостаточной [Jorge-Herrero, Paez, Castillo-Olivares Ramos Del, 2005].

1.3.3.2 Додecilсульфат натрия

Инкубация биопротезной ткани с додecilсульфатом натрия приводит к извлечению большинства кислых фосфолипидов из клеточных мембран [Hirsch и др., 1993]. Исходя из этого эффекта, предполагалось, что обработка додecilсульфатом натрия будет способствовать снижению минерализации биопротезной ткани за счёт подавления первоначальной кальцификации, связанной с клеточной мембраной. Данная стратегия была применена к биопротезам, изготовленным на основе свиного аортального клапана [Bottio и др., 2003]. Однако

додецилсульфат натрия не продемонстрировал ожидаемого антиминерализующего действия: его использование не предотвращало кальцификацию створок биопротезов [Jorge-Herrero, Paez, Castillo-Olivares Ramos Del, 2005].

1.3.3.3 Модификация поверхности полисахаридами

Для модификации поверхности биопротезных материалов с целью защиты коллагеновой матрицы были предложены анионные полисахариды, такие как альгинат натрия, хондроитин сульфат, гепарин и гиалуроновая кислота [Zheng, Yang, Wang, 2024]. Иммобилизация этих гидрофильных, обладающих высокой гемосовместимостью полисахаридов препятствовала взаимодействию ионов кальция с минерализующимися участками биоматериала, а также эффективно снижала нежелательную адсорбцию плазменных белков. Эти эффекты способствовали улучшению поверхностной биосовместимости и усилению антитромботических свойств материала. Lopez-Moya M. с соавторами показали, что покрытие ГА-фиксированного перикарда гидрогелем хондроитин сульфата способствовало облегчению эндотелизации ткани и повышению её тромборезистентности [Lopez-Moya и др., 2018]. Гепарин, ковалентно иммобилизованный на ГА-обработанном биоматериале, снижал цитотоксичность и замедлял скорость минерализации ткани [Lee и др., 2000; Yang и др., 2017]. Адгезивный альгинат, при иммобилизации на биоматериале, выполнял функцию динамического защитного барьера, ограничивающего отложение ионов кальция на коллагеновом матриксе [Hu и др., 2019; Zheng, Yang, Wang, 2024]. Гиалуроновая кислота, взаимодействуя со свободными альдегидными группами, снижала кальцификацию ГА-фиксированного ксеноперикарда в экспериментальных условиях [Ohri и др., 2004]. Введение полисахаридов в схемы консервации биопротезной ткани способствовало улучшению биосовместимости, гемосовместимости и антикальцифицирующих свойств материала. Тем не менее,

долгосрочная эффективность этих подходов *in vivo* требует дальнейшего изучения и оценки.

1.3.3.4 Спирты

Ранее было продемонстрировано, что постфиксация ГА-обработанного биоматериала в спиртовом растворе способна подавлять минерализацию биопротезной ткани [Vyavahare и др., 1997; Vyavahare и др., 1998]. Механизм антикальцифицирующего эффекта спиртов обусловлен не только удалением фосфолипидов и холестерина, но и клеточного дебриса из фиксированного материала [Connolly и др., 2011; Pathak и др., 2004; Zheng, Yang, Wang, 2024]. Кроме того, спирты, особенно изопропанол, существенно воздействуют на конформацию коллагена [Vyavahare и др., 1998; Zheng, Yang, Wang, 2024], способствуя увеличению содержания случайных клубков, β -листов и боковых цепей, в то время как уровень антипараллельных β -листов и α -спиралей снижается [Zhuravleva и др., 2023]. Еще одним важным результатом спиртовой обработки является повышение устойчивости ткани к действию коллагеназы [Zheng, Yang, Wang, 2024]. Стоит отметить, что ни длинноцепочечные спирты, ни этанол не оказывают значительного влияния на механические свойства биоматериала [Pathak и др., 2004]. Снижение интенсивности кальцификации биоматериала после обработки спиртовыми растворами было подтверждено как в модели подкожной имплантации у крыс [Pathak и др., 2004], так и в исследованиях на крупных лабораторных животных [Park и др., 2017]. Антикальцифицирующий эффект был выявлен при использовании стратегии консервации, включающей сочетание триглицидного амина с этанолом [Connolly и др., 2011]. Уменьшение степени минерализации створок биопротезов было отмечено при консервации свиного аортального корня с применением этанола в комбинации с хлоридом алюминия в экспериментах на молодых овцах [Clark и др., 2005; Ogle и др., 2003].

На принципе спиртового удаления липидов разработаны технологии обработки ткани Lynx и XenoLogix [Li, 2019]. Раствор для хранения ксеновенозного кондуита Contegra содержит изопропиловый спирт, который выполняет функции стерилизации и сохранения ткани, а также может способствовать снижению скорости процесса минерализации биоматериала. Несмотря на эффективность этих подходов в замедлении накопления кальциевых отложений, они не способны полностью предотвратить процесс кальцификации биопротезов.

Костюнин А.Е. с соавторами предложили методику модификации фиксированного биоматериала с использованием раствора поливинилового спирта, основанную на свойствах криотропного гелеобразования [Костюнин и др., 2023а]. Авторы выдвинули гипотезу, что гель, заполняющий межфибрилярное пространство и образующий пленку на поверхности ткани, может препятствовать проникновению различных соединений, в том числе ионов кальция. Применение данной методики модификации биопротезной ткани продемонстрировало значимое замедление темпов кальцификации в модели подкожной имплантации у крыс [Костюнин и др., 2023а]. Однако на текущий момент отсутствуют данные о сохранении изолирующих свойств геля поливинилового спирта при циклических механических нагрузках и контакте с кровью.

1.3.3.5 Ионы трехвалентных металлов

В клинических наблюдениях у пациентов с почечной недостаточностью, находящихся на диализе, была выявлена ассоциация остеомалации с присутствием ионов Al^{3+} [Vick, Johnson, 1985; Wills, 1983]. Это послужило основанием для разработки стратегии применения солей Al^{3+} и Fe^{3+} с целью предотвращения кальцификации биопротезной ткани. В экспериментальных исследованиях с подкожной имплантацией у крыс было показано, что предварительная обработка ГА-фиксированных створок свиной аорты и перикарда растворами $FeCl_3$ или $AlCl_3$

ингибирует процесс кальцификации [Carpentier и др., 1995; Clark и др., 2005; Jin и др., 2018; Ogle и др., 2003; Webb и др., 1991]. Предполагается, что механизм действия данных соединений связан с образованием комплексов между катионами Fe^{3+} или Al^{3+} и фосфатными группами, что препятствует образованию фосфатов кальция. Кроме того, ионы трехвалентного железа и алюминия оказывают ингибирующее воздействие на активность ЩФ – ключевого фермента, участвующего в минерализации костной ткани. Дополнительно было продемонстрировано, что хлорид алюминия способен вызывать структурные изменения в молекулах эластина, что способствует снижению его склонности к кальцификации [Schoen, Levy, 2013]. Тем не менее, попытки иммобилизовать ионы Al^{3+} и Fe^{3+} непосредственно на поверхности имплантатов для длительного ингибирования отложения кальция оказались недостаточно эффективными [Schoen, Levy, 1992; Schoen, Levy, 2005]. Постоянно поддерживаемая концентрация ионов кальция в крови способствует вымыванию данных трёхвалентных ионов в краткосрочной и среднесрочной перспективе, приводя к образованию низкорастворимых солей кальция [Jorge-Herrero, Paez, Castillo-Olivares Ramos Del, 2005]. Данное обстоятельство указывает на существующие ограничения в использовании солей алюминия и железа для долговременной профилактики кальцификации биопротезных материалов.

1.3.3.6 Бисфосфонаты

Бисфосфонаты (Бф) представляют собой химически стабильные синтетические аналоги природных пирофосфатных соединений, в структуре которых присутствует характерная группа P-C-P, где центральный атом углерода связан с двумя радикалами R1 и R2 [Ebetino и др., 2011; Russell, 2011]. Интерес к биологическим эффектам этих соединений возник после публикации в журнале Science в 1969 году двух исследований, демонстрирующих влияние Бф, таких как этидронат и клодронат, на процессы образования и растворения кристаллов, а

также на сосудистую кальцификацию и резорбцию костной ткани [Fleisch и др., 1969; Francis и др., 1969]. В настоящее время Бф широко применяются как одна из основных групп лекарственных препаратов для терапии заболеваний, сопровождающихся гиперкальциемией и чрезмерной резорбцией костной ткани, а также для подавления патологической кальцификации мягких тканей [Russell, 2011]. Ряд последующих исследований подтвердил их фармакологический потенциал в ингибировании патологической минерализации мягких тканей и эффективности в лечении костных метастазов, остеопороза и других заболеваний костной системы [Li и др., 2016; Okamoto и др., 2014; Russell, 2011].

Химическая и биологическая активность бисфосфоновых кислот обусловлена их молекулярной структурой [Ebetino и др., 2011]. Характерная группа Р-С-Р определяет высокое сродство Бф к гидроксиапатитам [Russell, 2011]. Группа R1, связанная с центральным атомом углерода, чаще всего представлена гидроксильной функциональной группой, что усиливает взаимодействие с кристаллами гидроксиапатита и препятствует их росту. Наличие гидроксильной группы в положении R1 дополнительно повышает сродство бисфосфонатов к Ca^{2+} за счёт их способности хелатировать кальций [Тимченко, 2022].

Значительное влияние на свойства Бф оказывает наличие атома азота в боковой цепи R2 [Russell и др., 2008; Russell, 2015]. В аминокислотах азот способен ковалентно взаимодействовать с маскирующими группами бифункционального консерванта, остающимися после завершения процесса поперечной сшивки [Webb, Schoen, Levy, 1989]. Благодаря группе R2 азот-содержащие Бф могут ковалентно иммобилизоваться на биоматериалах [Nimni и др., 1990; Webb, Schoen, Levy, 1989]. В работе Russell R.G.G. с соавторами было высказано предположение, что некоторые молекулы Бф связываются с остаточными группами сшивающего агента, тогда как другие формируют водородные связи с белками, взаимодействуя с аминокислотами, способными усиливать кальцификацию [Russell и др., 2008]. При этом фосфонатные группы остаются свободными и продолжают влиять на минерализацию посредством прямого физико-химического взаимодействия с гидроксиапатитом [Тимченко, 2022].

Описанный механизм позволяет предполагать, что Бф могут ингибировать кальцификацию биопротезной ткани, препятствуя как преципитации фосфата кальция из насыщенных растворов, к числу которых относится сыворотка крови, так и кристаллизации и последующему росту кристаллов гидроксиапатита [Барбараш, 1995; Барбараш, Журавлева, 2012]. Кроме того, нековалентно связанные Бф, благодаря своим фосфонатным группам, способны конкурировать с неорганическими фосфатами биологических жидкостей за положительно заряженные азотсодержащие центры, временно блокируя процесс минерализации [Zhuravleva и др., 2021b]. Антикальцифицирующий эффект данной группы соединений был подтверждён серией экспериментов с коллаген-содержащими биоматериалами, обработанными ГА [Caffarelli и др., 2017; Nimni и др., 1990; Van Gelder и др., 1997; Webb, Schoen, Levy, 1989]. В работе Rapoport H.S. и соавторов [Rapoport и др., 2007] сообщается, что накопление кальция в стенке аорты может быть эффективно снижено при комплексной обработке эпоксидным сшивающим агентом триглицидиламином совместно с 2-меркаптоэтилиден-1,1-бисфосфоновой кислотой.

Таким образом, иммобилизация Бф на биоматериалах, на наш взгляд, представляет собой одну из наиболее перспективных стратегий для подавления кальцификации биопротезной ткани. Этот подход может позволить обеспечить локализованное и стабильное присутствие молекул Бф и тем самым способствовать эффективному ингибированию отложения солей кальция и роста их кристаллов. Также дифференцированный подход к иммобилизации с учётом химической структуры Бф и природы биопротезного материала открывает новые возможности для улучшения биосовместимости и долговечности имплантов. Однако в настоящее время в литературе отсутствуют систематические исследования эффективности данной антикальциевой защиты в гемоконтактной среде и при циклической гемодинамической нагрузке, что подчёркивает необходимость дальнейших комплексных экспериментов и испытаний для подтверждения потенциала этой стратегии.

1.4 Резюме

Несмотря на продолжающийся поиск оптимальных решений для реконструкции ВОПЖ у детей, на сегодняшний день не существует «идеального» клапаносодержащего кондуита для имплантации в легочную позицию [Crago и др., 2023; Harris и др., 2023; Herrmann и др., 2020; Singh и др., 2025]. Легочные гомографты продолжают считаться наиболее предпочтительными протезами для восстановления пути оттока из ПЖ в ЛА, однако их применение у педиатрических пациентов значительно ограничено из-за лимитированной доступности графтов малого диаметра [Bobylev и др., 2024; Hazekamp и др., 2021; Huyan, Chang, Song, 2021; Raja и др., 2021; Singh и др., 2025]. В то же время, коммерчески доступные ксеногенные клапаносодержащие кондуиты характеризуются рядом серьёзных недостатков, прежде всего ранней структурной дегенерацией и высокой частотой повторных хирургических вмешательств на клапане [Dave и др., 2011; Lee и др., 2011; Ong и др., 2013; Qian и др., 2021; Romeo и др., 2019; Tweddell и др., 2000].

Для уменьшения проявлений структурной дегенерации биопротезной ткани, в частности кальцификации, были предложены различные стратегии. Хотя эти методы были успешно протестированы на модели подкожной имплантации у крыс и продемонстрировали многообещающие результаты, их потенциальное клиническое применение остаётся далёким от оптимального [Jorge-Herrero, Paez, Castillo-Olivares Ramos Del, 2005]. В настоящее время отсутствует эффективный способ предотвращения структурной дегенерации биоматериала в условиях клинической практики [Костюнин и др., 2023а; Attia, Raja, 2021; Dvir и др., 2018].

Перспективным направлением являются технологии тканевой инженерии, которые, как предполагается, позволят преодолеть многие ограничения, присущие современным ксеногенным материалам [Singh и др., 2025]. Мы ожидаем, что будет разработан трансплантат с высокой биосовместимостью, способный расти пропорционально росту пациента и характеризующийся минимальными дегенеративными изменениями, что позволит значительно снизить необходимость повторных хирургических вмешательств по замене протезов.

Однако, учитывая специфику и высокую вариабельность анатомических особенностей сердца у пациентов с ВПС, сохраняются значительные трудности при проектировании и изготовлении тканно-инженерных графтов, обладающих механическими и прочностными характеристиками, сопоставимыми с нативными структурами легочного клапана. Дополнительной сложностью является воссоздание структурного цитоскелета артерий человека, состоящего из коллагена, эластина и других белков, ориентированных определённым образом [Ogden, 2003]. Появление технологий, таких как электроспиннинг и 3D-биопечать, позволило создавать более сложные конструкции, имитирующие клапанный аппарат [Paulsen и др., 2019]. Тем не менее, 3D-печать геометрически сложных структур с биологическими свойствами, сходным с нативными тканями, остаётся серьёзной проблемой. В настоящее время исследования по разработке каркасов для тканевой инженерии в основном ограничены доклиническими испытаниями [Bennink и др., 2018; Manavitehrani и др., 2019].

Технологии формирования клапана *in situ* на имплантированной биodeградируемой матрице сопряжены с существенными трудностями, связанными с индивидуальными особенностями клеточной реакции реципиента и невозможностью точного прогнозирования скорости деградации матрицы в каждом конкретном случае [Барбараш, Журавлева, 2012]. В настоящее время данные разработки остаются далекими от завершения.

Таким образом, поиск оптимального материала для клапаносодержащего легочного кондуита и эффективного метода его консервации по-прежнему остаётся актуальной задачей. Оптимизация характеристик консервированных ксеногенных тканей посредством модификации методов обработки является перспективным направлением для повышения долговечности биологических протезов клапанов сердца, включая легочные кондуиты [Singh и др., 2025]. Исследования, направленные на понимание механизмов, связывающих иммунный ответ и кальцификацию с неблагоприятным ремоделированием трансплантата, создадут основу для разработки новых методов консервации, нацеленных на предотвращение дисфункции трансплантата [Harris и др., 2023].

ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование было одобрено локальными Экспертным (протокол №25 от 19.12.2017) и Этическим (протокол №17 от 14.06.2018) комитетами.

2.1 Общий дизайн исследовательской работы

Дизайн диссертационной работы состоит из двух основных блоков (Рисунок 2.1):

(1) Клинический блок, направленный на оценку эффективности применения коммерческих кондуитов для протезирования легочной артерии (ЛА) у пациентов педиатрической группы;

(2) Экспериментальный блок, основанный на анализе биоматериалов и стратегий их консервации с целью повышения долговечности протезных конструкций.

Клиническая часть диссертационной работы основана на материале, накопленном на базе ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России за период 2000-2024г. Все пациенты были отобраны из проспективно поддерживаемой базы данных. Проведен ретроспективный когортный анализ результатов имплантации различных типов легочных кондуитов у 403 пациентов в возрасте от 0 до 18 лет. В зависимости от типа имплантированного кондуита, пациенты были распределены на пять групп для сравнительного анализа:

1. бычья яремная вена (ЯВ), обработанная глутаровым альдегидом (ГА);
2. клапаносодержащий ксеноперикардальный кондуит, консервированный ГА;
3. кондуит, содержащий свиной аортальный корень, фиксированный диглицидиловым эфиром этиленгликоля (диэпоксид, ДЭ);
4. клапаносодержащий ксеноперикардальный кондуит, обработанный ДЭ;
5. криосохраненный легочный гомографт.

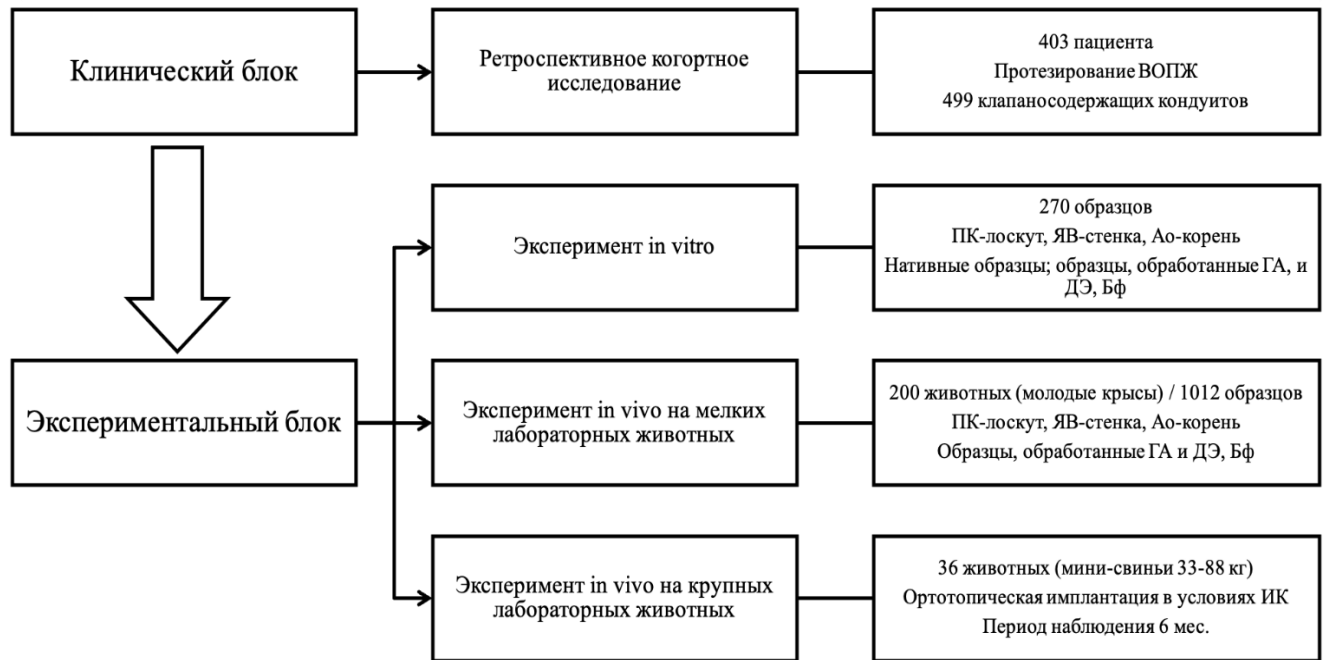


Рисунок 2.1 – Общий дизайн диссертационной работы.

Исследование включает два основных блока – клинический и экспериментальный.

На основании результатов клинического раздела сформированы вводные данные для экспериментального блока. Ао-корень, аортальный корень; Бф, бисфосфонат; ВОПЖ, выходной отдел правого желудочка; ГА, глутаровый альдегид; ДЭ, диэпоксид; ИК, искусственное кровообращение; ПК-лоскут, перикардиальный лоскут; ЯВ-стенка, стенка яремной вены

Подробное описание дизайна клинической части диссертационного исследования представлено в Главе 3, в разделе 3.1. На основании результатов анализа клинических данных сформированы вводные данные для экспериментальной части работы.

Экспериментальный блок диссертационного исследования включал несколько последовательных этапов:

- I. эксперимент in vitro;
- II. эксперимент in vivo на модели мелких лабораторных животных;
- III. эксперимент in vivo на модели крупных лабораторных животных.

Эксперимент in vitro был направлен на оценку изменений аминокислотного состава биоматериалов под воздействием сшивающих агентов, изучение механизмов взаимодействия бисфосфонатов (Бф) с консервирующими веществами

и фиксированными биоматериалами, а также анализ степени связывания Бф с тканями, консервированными ГА и ДЭ. В рамках данного этапа было исследовано 270 образцов биоматериалов, включающих необработанный бычий перикард (ПК), свиной аортальный корень (АоК) и стенку бычьей ЯВ, а также образцы, консервированные ГА или ДЭ и дополнительно модифицированные Бф. Описание дизайна исследования *in vitro* подробно приведено в Главе 4, разделе 4.1.

В экспериментальном исследовании *in vivo* с использованием модели мелких лабораторных животных проведена сравнительная оценка степени кальцификации ксеногенных тканей, обработанных различными методами, включая модификацию Бф. Данное скрининговое исследование было направлено на выявление потенциала антикальциевой защиты различных способов обработки биоматериалов. В исследование были включены 200 здоровых самцов крыс линии Wistar массой 70–100 г, которым подкожно имплантировали 1020 образцов биоматериалов, консервированных различными методами, включая модификацию Бф. Оценка степени кальцификации тканей проводилась на 10-й, 30-й и 60-й день. Детальное описание дизайна эксперимента *in vivo* с подкожной имплантацией у крыс представлено в Главе 5, разделе 5.1. По результатам данного этапа работы были отобраны наиболее перспективные биоматериалы и методы их обработки, обеспечивающие значительное снижение накопления фосфатов кальция или полное подавление процесса минерализации ткани.

Экспериментальная часть *in vivo* на крупных лабораторных животных была сфокусирована на оценке гемодинамических и структурных характеристик клапаносодержащих графтов. В рамках данного этапа исследования были проанализированы ДЭ-консервированные ксеноперикардальные и ксеновенозные кондуиты, в том числе дополнительно обработанные Бф. В качестве контрольных групп использовались графты, консервированные ГА, включая ксенокондуит Contegra (Contegra легочный клапанный кондуит; Medtronic, Миннеаполис, Миннесота, США). Протезы имплантировали в ортотопическую позицию молодым мини-свиньям (n=36). Период наблюдения составил 6 месяцев, в течение которых каждому животному выполняли три последовательных чреспищеводных

эхокардиографических исследования (ЧП-ЭХОКГ). По завершении периода наблюдения кондуиты были эксплантированы и подвергнуты комплексной оценке структурных изменений. Подробное описание дизайна данного этапа экспериментального исследования представлено в Главе 6, разделе 6.1.

2.2 Характеристика методов исследования

Для оценки гемодинамических характеристик имплантированного кондуита использовали трансторакальную эхокардиографию и ЧП-ЭХОКГ в соответствии с современными международными рекомендациями [McNamara и др., 2024; Nisoara и др., 2020; Zoghbi и др., 2024].

Аминокислотный анализ образцов биоматериала выполняли по стандартной методике [Trofimova и др., 2016] с использованием аминокислотного анализатора L-8800 (Hitachi Ltd., Япония). Для количественной оценки пиков, полученных после хроматографического разделения каждого экстракта, применяли программное обеспечение Multichrom 1.71a (ООО «Амперсанд», Россия).

Количественное определение фосфора и кальция в исследуемых образцах проводили с помощью атомно-абсорбционного спектрофотометра Thermo Solaar M6 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Этот спектрофотометр оснащён пламенным и электротермическим атомизаторами, что обеспечивает высокую точность элементного анализа.

Оценку взаимодействия Бф с сшивающими агентами исследовали методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Спектры ^1H ЯМР (400 МГц) регистрировали на спектрометре Bruker AV-400 (Bruker Inc., Карлсруэ, Германия).

Инфракрасные спектры (ИК-спектры) образцов регистрировали на Фурье-спектрометре Tensor 27 (Bruker Inc., Карлсруэ, Германия) в диапазоне $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$ с использованием гранул KBr (64 сканирования, разрешение 4 см^{-1}) и метода аттенуированного полного отражения (ATR) с кристаллом ZnSe (угол падения 45°). Спектры обрабатывали в программе OPUS 6.0: проводили коррекцию базовой

линии методом Rubberband, нормализацию по полосе 1655 см^{-1} (Амид I) и рассчитывали вторые производные методом Савицкого–Голея с сглаживанием по 13 точкам. ИК-спектры растворов Бф регистрировали с помощью ATR-ячеек.

Для выполнения сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) образцы предварительно покрывали углеродным слоем толщиной 25–30 нм с помощью установки GVC-3000 (KYKY TECHNOLOGY, Пекин, Китай). Анализ методом СЭМ, энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС) и элементное картирование проводили на микроскопе WIN SEM A6000LV с системой AzTec One EDX (Oxford Instruments, Абингдон, Великобритания). Исследования выполняли при ускоряющем напряжении 20 кэВ, силе пучка 150 мкА, диаметре пучка 8–9 нм и времени сбора спектра 20 с. Размер зоны рентгеновского излучения в кальциевых депозитах составлял 2–3 мкм.

Для микроскопического исследования образцы биоматериалов фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине, обезживали и заливали в парафин (MT Point, Санкт-Петербург, Россия). Срезы толщиной 6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином (H&E), по фон Коссу, трихромом по Маллори, пентахромом по Расселу-Мовату и иммуногистохимически (ИГХ) на белок S100 (Бiovитрум, Санкт-Петербург, Россия). Исследования проводили на световом микроскопе Axioskop 40 (Carl Zeiss, Йена, Германия).

Более детальное описание методов исследования, применённых в каждой конкретной части диссертационной работы, представлено в соответствующих разделах Главы 3, 4, 5 и 6.

2.3 Методы статистического анализа

Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения R Statistical Software (v4.4.1; R Core Team, 2025) [R Core Team, 2025].

Для проверки нормальности распределения непрерывных переменных применяли тест Шапиро–Уилка (Shapiro-Wilk W test). Непрерывные данные

представлены в виде медианы (median, Me) и межквартильного интервала (interquartile range, IQR), а категориальные — в виде абсолютных значений и процентов (%). Для оценки динамики изучаемого показателя использовали дисперсионный анализ Фридмана (Friedman ANOVA). Попарные сравнения выполнялись с помощью критериев Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test) и МакНемара (стандартный McNemar's test, 2x2). Сравнение групп проводили с использованием критерия χ^2 (или точного теста Фишера при ожидаемых частотах менее 5), U-критерия Манна–Уитни (Mann–Whitney U test) или критерия Краскела–Уоллиса (Kruskal–Wallis test). Свобода от исследуемого события представлена на графиках Каплана–Мейера (Kaplan–Meier) как для всей когорты, так и для отдельных групп. Для сравнения кривых выживаемости применялся лог-ранговый тест (Log-rank test). Регрессионный анализ Кокса (Cox regression) использовался для выявления факторов риска развития исследуемого события. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

Более подробное описание методов статистической обработки данных, применённых в каждой конкретной части диссертационного исследования, приведено в соответствующих разделах Главы 3, 4, 5 и 6.

2.4 Резюме

Диссертационная работа представляет собой клинико-экспериментальное исследование, включающее два ключевых блока: клинический анализ и экспериментальное обоснование. Такая структурная организация обеспечила комплексный подход к изучению проблемы дисфункции клапаносодержащих легочных кондуитов. Интеграция клинических данных с результатами экспериментального анализа позволила не только выявить ключевые факторы, влияющие на ухудшение функции кондуитов и их долговечности, но и обосновать эффективную стратегию создания протеза с улучшенными характеристиками. Использование высокоточных методов исследования в сочетании с корректным

применением статистического анализа гарантировало получение надежных и достоверных данных на всех этапах работы.

ГЛАВА 3. АНАЛИЗ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ЛЕГОЧНЫХ КЛАПАНОСОДЕРЖАЩИХ КОНДУИТОВ В ПЕДИАТРИЧЕСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Данная глава посвящена анализу клинического применения легочных кондуитов у детей. Существует ряд факторов, которые следует учитывать при сравнении различных вариантов графтов: долговечность протеза, склонность к дегенеративным изменениям, риск тромбообразования и восприимчивость к инфекциям [Stammnitz и др., 2022]. В связи с чем, целью данной части исследования была оценка результатов использования клапаносодержащих графтов для протезирования пути оттока в легочную артерию (ЛА) с выявлением наиболее специфических причин их дисфункции у пациентов педиатрической группы. В главе рассматриваются вопросы долговечности легочных кондуитов, частоты повторных оперативных вмешательств на протезах, включая их замену, а также анализируются причины несостоятельности графтов и предикторы их ранней дисфункции. Основное внимание уделено роли типа биоматериала и способа его обработки. Полученные данные позволили определить направления для оптимизации и усовершенствования легочных кондуитов с целью повышения их эффективности у детей с врожденными пороками сердца (ВПС).

3.1 Материалы и методы

Данная часть исследования была одобрена локальным Экспертным (протокол №25 от 19.12.2017) и Этическим (протокол №17 от 14.06.2018) комитетами. Все пациенты были выбраны из проспективно поддерживаемой базы данных, основанной на опыте ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России.

3.1.1 Дизайн исследования

В диссертационной работе использован клинический материал, накопленный на базе НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина за период с 2000 по 2024гг.

Проведено когортное ретроспективное исследование результатов имплантации клапаносодержащих кондуитов для протезирования пути оттока из правого желудочка (ПЖ) в ЛА у пациентов педиатрической группы с ВПС. В исследование включено 403 пациента в возрасте от 0 до 18 лет, которым была выполнена реконструкция пути оттока из ПЖ с использованием клапаносодержащего кондуита в ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина». Формально расчет объема выборки не проводился; в исследование включены все последовательные пациенты, соответствовавшие критериям включения и оперированные с января 2000 по декабрь 2016 года (Рисунок 3.1). Все отобранные случаи были включены в проспективно поддерживаемую базу данных. Пациенты, не соответствовавшие критериям включения, были исключены из данного исследования на этапе первичной обработки данных.

Критериями включения в исследование явились:

- Пациенты с ВПС, которым требовалась реконструкция выходного отдела правого желудочка (ВОПЖ);
- Педиатрическая группа пациентов (возраст от 0 до 18 лет);
- Протезирование/репротезирование пути оттока из ПЖ в ЛА клапаносодержащим графтом;
- Имплантированы легочные гомографты/аллографты и клапаносодержащие ксенокондуиты из бычьего перикарда (ПК), бычьей яремной вены (ЯВ), свиного аортального корня (АоК), зарегистрированные и используемые на территории РФ;
- Оперативное вмешательство выполнено в период с 01.01.2000 по 31.12.2016.

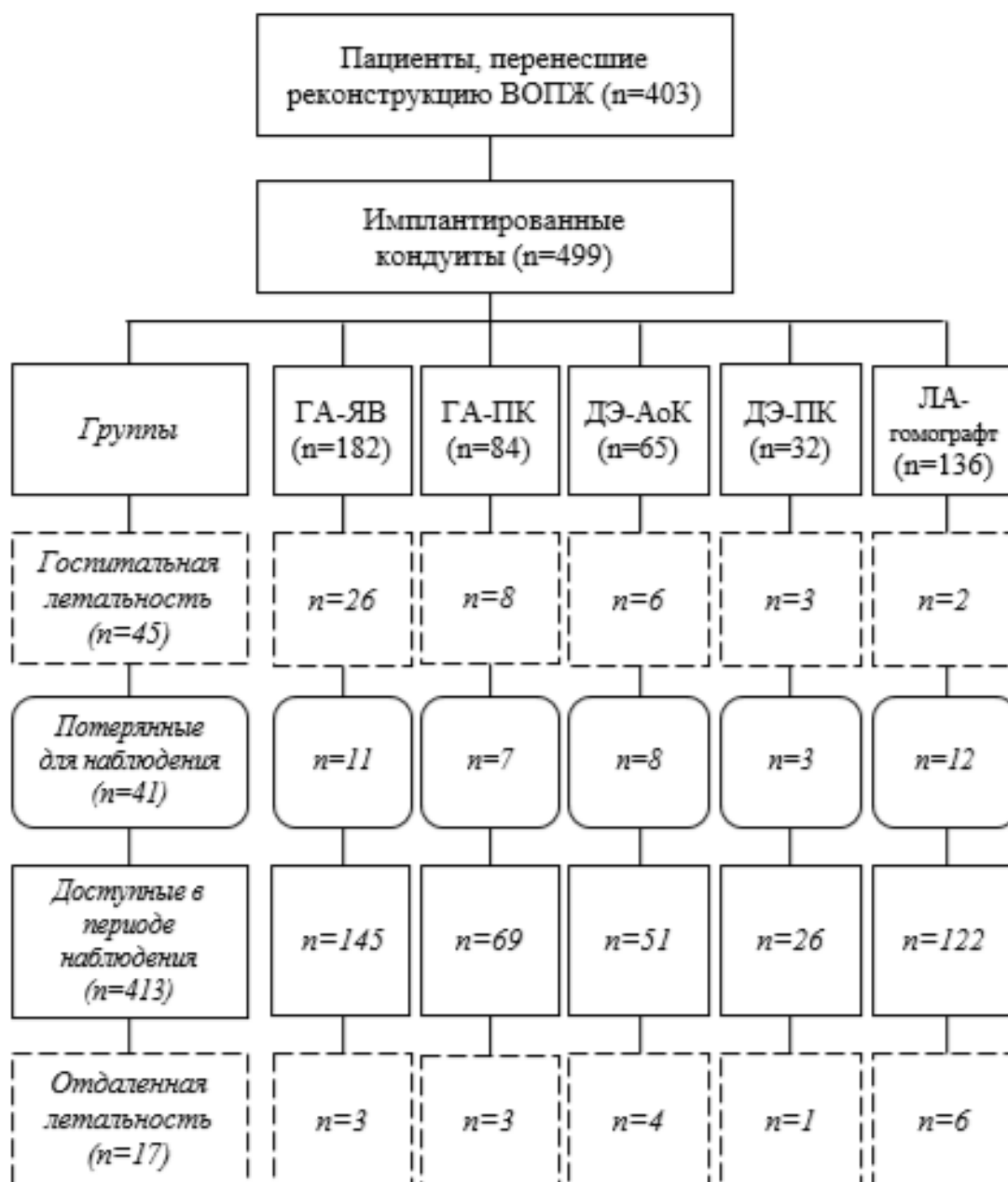


Рисунок 3.1 – Дизайн исследования.

ВОПЖ, выходной отдел правого желудочка; ГА-ПК, глутаральдегид-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный кондуит; ГА-ЯВ, глутаральдегид-обработанная бычья яремная вена; ДЭ-АоК, диэпокси-обработанный свиной аортальный корень; ДЭ-ПК, диэпокси-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный кондуит; ЛА, легочная артерия

Критериями не включения явились:

- Пациенты с ВПС, возраст которых на момент протезирования/репротезирования ВОПЖ был старше 18 лет;

- Оперативное вмешательство по поводу реконструкции ВОПЖ выполнено ранее 2000г или позже 2016г;

- Реконструкция пути оттока из ПЖ с использованием трансаннулярной пластики ВОПЖ и ствола ЛА тканями кондуита (с/без створчатого аппарата);

- Протезирование пути оттока в ЛА синтетическим клапаносодержащим протезом.

В зависимости от типа имплантированного кондуита все пациенты были разделены на следующие группы (рисунок 3.1):

1. бычья яремная вена, обработанная глутаровым альдегидом (ГА) и изопропиловым спиртом (ГА-ЯВ) (Contegra pulmonary valved conduit; Medtronic, Миннеаполис, Миннесота, США);

2. клапаносодержащий ксеноперикардальный кондуит, консервированный ГА с дополнительной антикальциевой обработкой додецилсульфатом натрия (ГА-ПК) (БиоЛАБ КК/Б, ФГБУ НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева МЗ РФ, Москва, Россия);

3. ксеноперикардальный кондуит, содержащий свиной аортальный корень и обработанный диглицидиловым эфиром этиленгликоля (диэпоксид, ДЭ) (ДЭ-АоК) (АБ-Композит, НеоКор, Кемерово, Россия);

4. клапаносодержащий ксеноперикардальный кондуит, обработанный ДЭ (ДЭ-ПК) (Пилон, НеоКор, Кемерово, Россия);

5. криосохраненный легочный гомографт (ЛА-гомографт) (криосохраненный легочный гомографт, ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» МЗ РФ, Новосибирск, Россия; криосохраненный легочный гомографт, «Кардиостар», Санкт-Петербург, Россия).

Выбор имплантированного кондуита зависел от предпочтений оперирующего хирурга.

Первичная конечная точка: дисфункция кондуита.

Вторичные конечные точки: кондуит-обусловленная летальность; кондуит-ассоциированные осложнения; реинтервенции по причине дисфункции графта; причины дисфункции кондуита.

Сбор данных: Демографические данные пациентов, а также информация, касающаяся хирургических вмешательств и раннего послеоперационного периода, были собраны ретроспективно, основываясь на медицинской документации [Nichay и др., 2018]. Данные в периоде наблюдения были получены как в результате повторных обследований в ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина», так и на основании записей лечащих кардиологов по месту жительства и телефонных интервью с пациентами и их семьями [Кулябин и др., 2025; Ничай и др., 2019; Ничай и др., 2024]. Сбор данных и описание результатов проводили в соответствии с «Guidelines for Reporting Mortality and Morbidity after Cardiac Valve Interventions» [Piazza и др., 2009].

Риск основного хирургического вмешательства, во время которого выполнена имплантация кондуита, был стратифицирован согласно СТАТ-категориям [Jacobs и др., 2013; O'Brien и др., 2009].

Z-score кондуита рассчитывался с использованием калькулятора «Z-Scores of Cardiac Structures/Detroit Data» [Pettersen и др., 2008].

Ранняя (госпитальная) летальность определена, как наступление летального исхода в течение 30 дней после реконструкции пути оттока из ПЖ.

Дисфункция кондуита включала любые структурные повреждения графта, неструктурные дисфункции, тромбоз кондуита и/или эндокардит, которые стали причиной реинтервенции на нем [Nichay и др., 2020]. Дисфункция кондуита была идентифицирована в соответствии действующими рекомендациями [Baumgartner и др., 2010; Piazza и др., 2009; Sarris и др., 2017; Stout и др., 2019; Warnes и др., 2008]: пиковый систолический градиент ≥ 50 мм рт.ст., наличие более чем умеренной недостаточности на клапане кондуита.

Конduit-обусловленная летальность включала любую смерть, вызванную дисфункцией или повреждением графта и их последствиями, тромбозом или эндокардитом протеза; смерть, связанную с прогрессирующей сердечной недостаточностью после имплантации кондуита или после повторного вмешательства на нём; а также любую внезапную сердечную смерть [Piazza и др., 2009].

Конduit-ассоциированные осложнения включали в себя любые осложнения в раннем и отдаленном послеоперационном периоде, вызванные структурной или

неструктурной дисфункцией кондуита; тромбоз и эндокардит графта; кровотечения из области имплантации кондуита; а также осложнения, обусловленные повторными вмешательствами на нем.

Реинтервенция на графте была определена как необходимость в хирургической замене кондуита, в транскатетерной установке в конduit протеза клапана ЛА (Melody transcatheter pulmonary valve; Medtronic, Миннеаполис, Миннесота, США) или в транскатетерных вмешательствах на ранее имплантированном графте (баллонная ангиопластика или стентирование протезированного участка). Изолированные вмешательства на ветвях ЛА рассматривались как реинтервенции только в том случае, если при имплантации протеза выполнялась их пластика тканями кондуита. Период времени до первой реинтервенции учитывался для оценки свободы от повторных хирургических вмешательств [Ничай и др., 2019; Ничай и др., 2024; Nichay и др., 2020].

Понятие **реимплантация кондуита** включало в себя необходимость в хирургической замене графта либо в имплантации транскатетерного клапана ЛА (Melody transcatheter pulmonary valve; Medtronic, Миннеаполис, Миннесота, США). Показания для повторного хирургического вмешательства были определены в соответствии с текущими рекомендациями [Baumgartner и др., 2010; Piazza и др., 2009; Sarris и др., 2017; Stout и др., 2019; Warnes и др., 2008].

Кальцификация протеза была определена как накопление солей кальция в стенке или створках графта, приведшее к его дисфункции, и была выявлена интраоперационно, по результатам клинического обследования (МСКТ, трансторакальное/чреспищеводное ЭхоКГ) или гистологического исследования [Nichay и др., 2018].

Гиперплазия неоинтимы, послужившая причиной дисфункции, была определена как утолщение неоинтимального слоя на уровне стенки кондуита, включая зоны анастомозов, которое приводило к гемодинамически значимой обструкции в данной области, и выявлялась интраоперационно и/или по данным гистологического исследования.

Инфекционный эндокардит определяли как возможный или окончательный на основании модифицированных критериев Дьюка [Fowler и др., 2023; Li и др., 2000].

3.1.2 Характеристика пациентов

В общей сложности 403 пациента в возрасте от 1 дня до 18 лет перенесли одну или несколько имплантаций клапаносодержащих кондуитов (n=499) (Таблица 3.1). Медиана веса на момент имплантации графта составила 18 кг (от 2,5 кг до 94 кг). Кондуиты чаще использовали для реконструкции пути оттока в ЛА при атрезии легочной артерии с дефектом межжелудочковой перегородки (14,9%) и общем артериальном стволе (14,1%). Ста сорока пациентам с патологией аортального клапана и левого выходного тракта выполнены операции Ross/Ross-Konno (34,7%).

Таблица 3.1 – Характеристика пациентов на момент имплантации клапаносодержащих кондуитов

Параметр	Всего (n=499)	ГА-ЯВ (n=182)	ГА-ПК (n=84)	ДЭ-АоК (n=65)	ДЭ-ПК (n=32)	ЛА- гомографт (n=136)	p
Пол, мужской/женский, n (%)	342/157 (68,5% /31,5%)	117/65 (64,3% /35,7%)	55/29 (65,5% /34,5%)	47/18 (72,3% /27,7%)	21/11 (65,6% /34,4%)	102/34 (75,0% /25,0%)	0,28
Вес, кг, Ме (IQR)	18 (8,4-42,0)	8,3 (5,6-12,0)	14,0 (8,3-28,2)	33,5 (19,0-46,0)	44,8 (12,8-60,0)	40,0 (24,5-57,0)	<0,001
BSA, м ² , Ме (IQR)	0,80 (0,40-1,40)	0,40 (0,30-0,60)	0,60 (0,40-1,00)	1,20 (0,80-1,40)	1,40 (0,50-1,70)	1,40 (1,00-1,70)	<0,001
Возраст на момент имплантации кондуита, мес., Ме (IQR)	67 (13-152)	12 (6-28)	50 (13-111)	138 (72-167)	172 (31-186)	150 (101-189)	<0,001
Диагноз, n (%):							<0,001
КТМА	15 (3,0%)	7 (3,9%)	6 (7,1%)	1 (1,5%)	0	1 (0,7%)	
ДОМС	9 (1,8%)	5 (2,7%)	1 (1,2%)	1 (1,5%)	2 (6,3%)	0	

Параметр	Всего (n=499)	ГА-ЯВ (n=182)	ГА-ПК (n=84)	ДЭ-АоК (n=65)	ДЭ-ПК (n=32)	ЛА- гомографт (n=136)	p
Патология ВОЛЖ и/или АоКл	140 (28,1%)	20 (11,0%)	20 (23,8%)	44 (67,7%)	15 (46,8%)	41 (30,1%)	
АЛА с ДМЖП	60 (12,0%)	44 (24,2%)	11 (13,1%)	2 (3,1%)	3 (9,4%)	0	
ТМА	35 (7,0%)	17 (9,3%)	10 (11,9%)	6 (9,2%)	2 (6,3%)	0	
Тетрада Фалло	31 (6,2%)	22 (12,1%)	3 (3,6%)	1 (1,5%)	4 (12,5%)	1 (0,7%)	
ОАС	57 (11,4%)	35 (19,2%)	14 (16,7%)	3 (4,6%)	1 (3,1%)	4 (2,9%)	
Дисфункция кондуита	110 (22,0%)	23 (12,6%)	14 (16,7%)	7 (10,8%)	3 (9,4%)	63 (46,3%)	
Другие	42 (8,4%)	9 (4,9%)	5 (5,9%)	0	2 (6,3%)	26 (19,1%)	
Предшествующие операции, n (%):							<0,001
Нет	211 (42,3%)	73 (40,1%)	44 (52,4%)	42 (64,6%)	16 (50,0%)	36 (26,5%)	
1	194 (38,9%)	78 (42,8%)	27 (32,1%)	21 (32,3%)	13 (40,6%)	55 (40,4%)	
2	71 (14,2%)	22 (12,1%)	11 (13,1%)	2 (3,1)	2 (6,3%)	34 (25,0%)	
>2	23 (4,7%)	9 (5,0%)	2 (2,4%)	0	1 (3,1%)	11 (8,1%)	
Тип предшествующей операции, n (%):	412	153	54	25	21	159	
Системно-легочный шунт	130 (31,5%)	71 (46,4%)	20 (37,0%)	8 (32,0%)	10 (47,6%)	21 (13,2)	<0,001
Паллиативный ГЖ-ЛА шунт	13 (3,2%)	5 (3,3%)	5 (9,3%)	0	1 (4,8%)	2 (1,3%)	0,05
Паллиативная ТА- пластика ВОПЖ	11 (2,7%)	2 (1,3%)	2 (3,7%)	0	1 (4,8%)	6 (3,8%)	0,54
Унифокализация БАЛК	10 (2,4%)	6 (3,9%)	3 (5,5%)	0	1 (4,8%)	0	0,07
Пластика АоКл	30 (7,3%)	11 (7,2%)	3 (5,5%)	4 (16,0%)	0	12 (7,5%)	0,32
Коррекция Ко Ао	11 (2,7%)	2 (1,3%)	1 (1,8%)	5 (20,0%)	1 (4,8%)	2 (1,3%)	<0,001
Протезирование ВОПЖ кондуитом	128 (31,1%)	31 (20,3%)	13 (24,1%)	6 (24,0%)	4 (19,0%)	74 (46,5%)	<0,001
Другие	79 (19,2%)	25 (16,3%)	7 (13,0%)	2 (8,0%)	3 (14,3%)	42 (26,4%)	0,04

Примечание: BSA (body surface area), площадь поверхности тела; IQR (interquartile range), межквартильный интервал; Me (median), медиана; АЛА, атрезия легочной артерии; Ао, аорта; АоКл, аортальный клапан; БАЛК, большая аорто-легочная коллатераль; ВОЛЖ, выходной отдел левого

желудочка; ВОПЖ, выходной отдел правого желудочка; ГА-ПК, глутаральдегид-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный конduit; ГА-ЯВ, глутаральдегид-обработанная бычья яремная вена; ДЭ-АоК, диэпокси-обработанный свиной аортальный корень; ДЭ-ПК, диэпокси-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный конduit; ДМЖП, дефект межжелудочковой перегородки; ДОМС, двойное отхождение магистральных сосудов от правого желудочка; ЛА, легочная артерия; Ко Ао, коарктация аорты; КТМА, корригированная транспозиция магистральных артерий; ОАС, общий артериальный ствол; ПЖ, правый желудочек; ТА-пластика, трансаннулярная пластика; ТМА, транспозиция магистральных артерий.

К другим ВПС, потребовавшим протезирования ЛА, отнесены выраженная недостаточность клапана ЛА после радикальной коррекции тетрады Фалло с использованием трансаннулярной пластики ВОПЖ и ствола ЛА ($n=25$; 5,0%), комбинированный стеноз ЛА с умеренной гипоплазией ПЖ ($n=8$; 1,6%), недостаточность клапана легочной артерии после баллонной ангиопластики ($n=4$; 0,8%), коррекция атрезии ЛА с интактной межжелудочковой перегородкой ($n=3$; 0,6%), стеноз пути оттока из ПЖ после операции Жатене у пациентов с транспозицией магистральных артерий ($n=2$; 0,4%).

Большинстве случаев, перед имплантацией кондуита, пациенты перенесли одно или более предшествующих оперативных вмешательств ($n=288$, 57,7%).

3.1.3 Хирургическая техника

Все пациенты были прооперированы из срединной стернотомии с использованием искусственного кровообращения (ИК) и бикавальной канюляции [Nichay и др., 2018]. Сопутствующая внутрисердечная коррекция была выполнена во время окклюзии аорты с применением холодовой кристаллоидной кардиopleгии в аортальный корень. В зависимости от предпочтения оперирующего хирурга и анатомических особенностей порока сердца реконструкцию пути оттока из ПЖ в ЛА выполняли или на работающем сердце в условиях параллельного ИК, или в условиях окклюзии аорты. При наличии стенозов правой и/или левой легочных артерий, пластика суженных участков осуществлялась тканями имплантированного графта

(n=114, 22,8%). Проксимальный и дистальный анастомозы с кондуитом формировали непрерывным обвивным швом нитью 5/0-6/0. Проксимальный конец кондуита моделировали для создания нерестриктивного оттока в ЛА. В большинстве случаев графт позиционировали слева от аорты, при необходимости, со смещением бифуркации в сторону левой легочной артерии. У 6 пациентов с корригированной транспозицией магистральных артерий (КТМА) и обструкцией пути оттока в ЛА, которым была выполнена конвенциональная коррекция, кондуит между подлегочным (анатомически левым) желудочком и ЛА позиционировали справа от аорты [Nichay и др., 2018].

3.1.4 Методы статистического анализа

Анализ данных выполняли с использованием R Statistical Software (v4.4.1; R Core Team, 2025) [R Core Team, 2025].

Для проверки нормальности распределения непрерывных переменных был использован Shapiro-Wilk W тест. Непрерывные данные описаны как медиана (median, Me) и межквартильный интервал (interquartile range, IQR), категориальные данные – как числовые значения и проценты (%). Группы сравнивали с использованием тестов χ^2 (или Fisher exact test для анализа при ожидаемых частотах <5) и критерия Краскела-Уоллиса (Kruskal-Wallis). Свобода от кондуит-обусловленной летальности, от реинтервенций на графте и репротезирования ВОПЖ, от дисфункции протеза по причине кальцификации и неоинтимальной гиперплазии, от протезного эндокардита представлены с помощью графиков Kaplan-Meier как для всей исследуемой когорты, так и для анализируемых групп. Для оценки свободы от реинтервенций в анализ включено только первое вмешательство на графте. Для сравнения между группами свободы от кондуит-обусловленной летальности, от реинтервенций на графте и репротезирования ВОПЖ, от дисфункции протеза по причине кальцификации и неоинтимальной гиперплазии, от протезного эндокардита был применен Log-rank тест. Влияние типа графта на риск повторного оперативного вмешательства, реинтервенций

по причине кальцификации и неоинтимальной гиперплазии, а также на риск развития инфекционного эндокардита оценивали с помощью регрессионного Соx-анализа. Чтобы нивелировать различия между группами, в многофакторную регрессионную модель были включены следующие кофакторы: пол, возраст и вес на момент имплантации кондуита, диагноз, STAT-категория оперативного вмешательства, первичная имплантация/замена графта, анатомическая/экстра-анатомическая позиция, размер и Z-score кондуита. При сравнении результатов различных типов имплантированных кондуитов в качестве референтной группы использовались ЛА-гомографты. Значения факторов риска выражены в виде отношения риска (ОР) и 95% доверительного интервала (95% ДИ). При летальном исходе время функционирования графта цензурировали в момент смерти пациента. Значение $p < 0,05$ считали статистически достоверным.

3.2 Результаты

За исследуемый период было имплантировано 499 клапаносодержащих кондуитов, включая 182 ГА-ЯВ (36,5%), 84 ГА-ПК (16,8%), 65 ДЭ-АоК (13,0%), 32 ДЭ-ПК (6,4%), 136 ЛА-гомографтов (27,3%). В общей сложности было выполнено 385 (77,2%) первичных и 114 (22,8%) повторных имплантаций графтов. Частота применения исследуемых кондуитов по годам представлена на рисунке 3.2. Операционные и послеоперационные данные по группам кондуитов описаны в Таблице 3.2.

Сорок один (9,0%) пациент был потерян для наблюдения, данные этих пациентов были исключены из оценки кондуит-обусловленной летальности, дисфункции графтов и свободы от реинтервенций и реопераций. Период наблюдения составил от 2,5 недель до 19,4 лет (Me 7,32 года, IQR 4,3-10,1 лет).

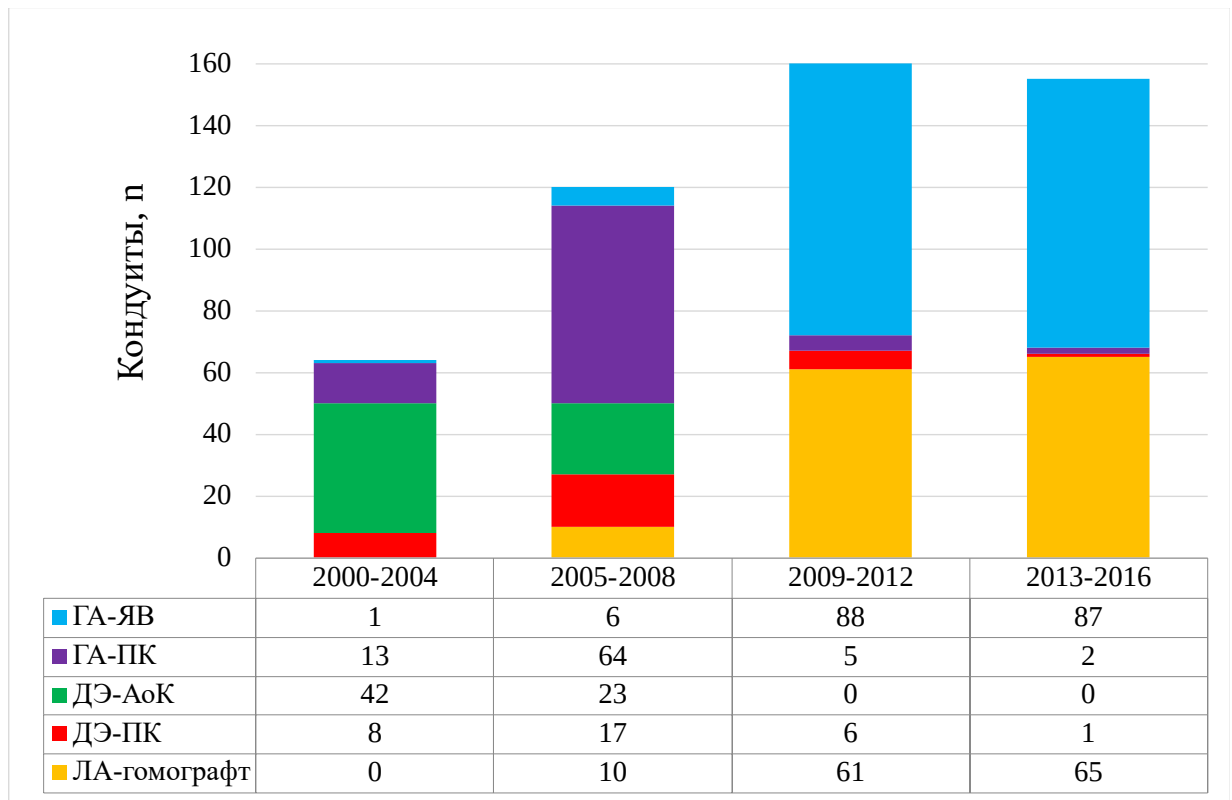


Рисунок 3.2 – Частота имплантаций кондуитов по годам.

ГА-ПК, глутаральдегид-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный кондуит; ГА-ЯВ, глутаральдегид-обработанная бычья яремная вена; ДЭ-АоК, диэпоксид-обработанный свиной аортальный корень; ДЭ-ПК, диэпоксид-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный кондуит; ЛА, легочная артерия

Таблица 3.2 – Операционные и послеоперационные данные в исследуемой когорте и по группам

Параметр	Всего (n=499)	ГА-ЯВ (n=182)	ГА-ПК (n=84)	ДЭ-АоК (n=65)	ДЭ-ПК (n=32)	ЛА-гомографт (n=136)	p
Имплантация графта, n (%):							<0,001
первичная	385 (77,2%)	158 (86,8%)	67 (79,8%)	58 (89,2%)	28 (87,5%)	74 (54,4%)	
повторная	114 (22,8%)	24 (13,2%)	17 (20,2%)	7 (10,8%)	4 (12,5%)	62 (45,6%)	
D кондуита, мм, Me (IQR)	20 (15-24)	14 (12-16)	19 (17-23)	25 (23-25)	25 (17-27)	23 (22-24)	<0,001

Параметр	Всего (n=499)	ГА-ЯВ (n=182)	ГА-ПК (n=84)	ДЭ-АоК (n=65)	ДЭ-ПК (n=32)	ЛА- гомографт (n=136)	p
Z-score кондуита, Ед., Ме (IQR)	1,21 (0,51-2,13)	1,63 (0,97-2,43)	2,04 (0,89-2,97)	1,24 (0,90-1,83)	0,83 (0,29-1,68)	0,59 (0,24-1,19)	<0,001
Позиция имплантации кондуита, n (%):							<0,001
Анатомическая	174 (34,9%)	23 (12,6%)	22 (26,2%)	46 (70,7%)	17 (53,1%)	66 (48,5%)	
Экстра- анатомическая	325 (65,1%)	159 (87,4%)	62 (73,8%)	19 (29,3%)	15 (46,9%)	70 (51,5%)	
STAT-категория процедуры, n (%):							<0,001
1	112 (22,4%)	24 (13,2%)	13 (15,5%)	5 (7,7%)	3 (9,4%)	67 (49,3%)	
2	198 (39,7%)	49 (26,9%)	25 (29,8%)	40 (61,5%)	22 (68,8%)	62 (45,6%)	
3	100 (20,0%)	61 (33,5%)	24 (28,6%)	9 (13,8%)	6 (18,7%)	0	
4	77 (15,4%)	40 (22,0%)	19 (22,6%)	10 (15,4%)	1 (3,1%)	7 (5,1%)	
5	12 (2,4%)	8 (4,4%)	3 (3,6%)	1 (1,5%)	0	0	
Время ИК, мин., Ме (IQR)	162 (120-210)	136 (105-179)	191 (158-228)	235 (184-294)	197 (164-217)	148 (95-185)	<0,001
Окклюзия Ао, n (%)	443 (88,8%)	168 (92,3%)	80 (95,2%)	63 (96,9%)	30 (93,7%)	102 (75,0%)	<0,001
Продолжительность окклюзии Ао, мин., Ме (IQR)	104 (71-141)	77 (60-102)	114 (83-154)	170 (129-208)	129 (115-151)	110 (65-135)	<0,001
Ранний послеоперационный период							
Пиковый градиент на кондуите, мм рт.ст., Ме (IQR)	14 (9,5-20)	12 (9-18)	17 (12-24)	17 (12-24,5)	12 (10-20)	12 (8-18)	<0,001
Регургитация на клапане, n (%):							<0,001
Нет/тривиальная	234 (46,9%)	64 (35,2%)	34 (40,5%)	33 (50,8%)	18 (56,2%)	86 (63,2%)	
Незначительная	239 (47,9%)	103 (56,6%)	47 (55,9%)	26 (40,0%)	14 (43,8%)	48 (35,3%)	
Умеренная	26 (5,2%)	15 (8,2%)	3 (3,6%)	6 (9,2%)	0	2 (1,5%)	

Параметр	Всего (n=499)	ГА-ЯВ (n=182)	ГА-ПК (n=84)	ДЭ-АоК (n=65)	ДЭ-ПК (n=32)	ЛА- гомографт (n=136)	p
Госпитальная летальность, n (%)	45 (9,0%)	26 (14,3%)	8 (9,5%)	6 (9,2%)	3 (9,3%)	2 (1,5%)	0,004
Период наблюдения							
Кондуиты, доступные для анализа в периоде наблюдения, n (%) [*]	413 (91,0%)	145 (92,9%)	69 (90,8%)	51 (86,4%)	26 (89,7%)	122 (91,0%)	0,684
Период наблюдения, мес., Me (IQR) [#]	88 (51-121)	93 (57-114)	71 (41-121)	75 (50-114)	79 (43-122)	94 (57-132)	0,031
Реинтервенции, n (%) [#] :	221 (53,5%)	85 (58,6%)	52 (75,4%)	36 (70,6%)	10 (38,5%)	38 (31,1%)	<0,001
1	185 (83,7%)	62 (72,9%)	49 (94,2%)	35 (97,2%)	9 (90,0%)	30 (78,9%)	
2	27 (12,2%)	17 (20,0%)	2 (3,9%)	1 (2,8%)	1 (10,0%)	6 (15,8%)	
>2	9 (4,1%)	6 (7,1%)	1 (1,9%)	0	0	2 (5,3%)	
Реимплантации, n (%) [#]	210 (50,8%)	77 (53,1%)	52 (75,4%)	36 (70,6%)	10 (38,5%)	35 (28,7%)	<0,001
Отдаленная летальность, n (%) [#]	17 (4,1%)	3 (2,1%)	3 (4,3%)	4 (7,8%)	1 (3,8%)	6 (4,9%)	0,289

Примечание: D, диаметр; IQR (interquartile range), межквартильный интервал; Me (median), медиана; Ao, аорта; ГА-ПК, глутаральдегид-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный кондуит; ГА-ЯВ, глутаральдегид-обработанная бычья яремная вена; ДЭ-АоК, диэпокси-обработанный свиной аортальный корень; ДЭ-ПК, диэпокси-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный кондуит; ИК, искусственное кровообращение; ЛА, легочная артерия. ^{*}- без учета госпитальной летальности. [#] - от количества кондуитов, доступных для анализа в периоде наблюдения.

У одного пациента, которому выполнено репротезирование ВОПЖ ксенокондуитом ГА-ЯВ 18 мм, в раннем послеоперационном периоде развился инфекционный эндокардит графта, что привело к его дисфункции и потребовало замены кондуита через 2,5 недели после имплантации.

3.2.1 Конduit-обусловленная летальность

За весь период наблюдения погибло 62 пациента, из них на госпитальном этапе – 45 пациентов. Ранняя летальность была обусловлена синдромом малого сердечного выброса (n=21), пневмонией/сепсисом с прогрессирующей полиорганной недостаточностью (n=15), протезным инфекционным эндокардитом (n=1); некротизирующим энтероколитом (n=3), острым нарушением мозгового кровообращения по ишемическому типу (n=3), послеоперационным кровотечением (n=2). Причиной отдаленной летальности послужили инфекционный эндокардит (n=6), пневмония/сепсис с полиорганной недостаточностью (n=1), прогрессирующая хроническая сердечная недостаточность (n=4), прогрессирующая хроническая почечная недостаточность (n=1), повреждение кондуита с развитием массивного кровотечения (n=1), легочное кровотечение на фоне высокой легочной гипертензии (n=1), внезапная сердечная смерть (n=3).

Согласно вышеприведённым критериям к conduit-обусловленной летальности отнесено 34 случая: протезный инфекционный эндокардит (n=7), кровотечение вследствие несостоятельности стенки кондуита (n=2) или её повреждения (n=1), острое нарушение мозгового кровообращения на фоне массивной кровопотери из мест имплантации графта (n=2), прогрессирующая правожелудочковая недостаточность (n=19) и внезапная сердечная смерть (n=3). В двух случаях причиной декомпенсации сердечной недостаточности была выраженная дегенеративная дисфункция графта; в четырёх — тромбоз графта, приведший к прогрессированию правожелудочковой недостаточности: в раннем послеоперационном периоде (n=2) и в периоде наблюдения (n=2).

Общая свобода от conduit-ассоциированного летального исхода составила 87,66% (95% ДИ 84,22 – 90,39%) и 84,18% (95% ДИ 80,95 – 88,53%) в 5- и 10-летние периоды наблюдения соответственно (Рисунок 3.3А). Свобода от conduit-обусловленного летального исхода в зависимости от типа имплантированного графта представлена на рисунке 3.3В и достоверно не различалась между группами (p=0,072).

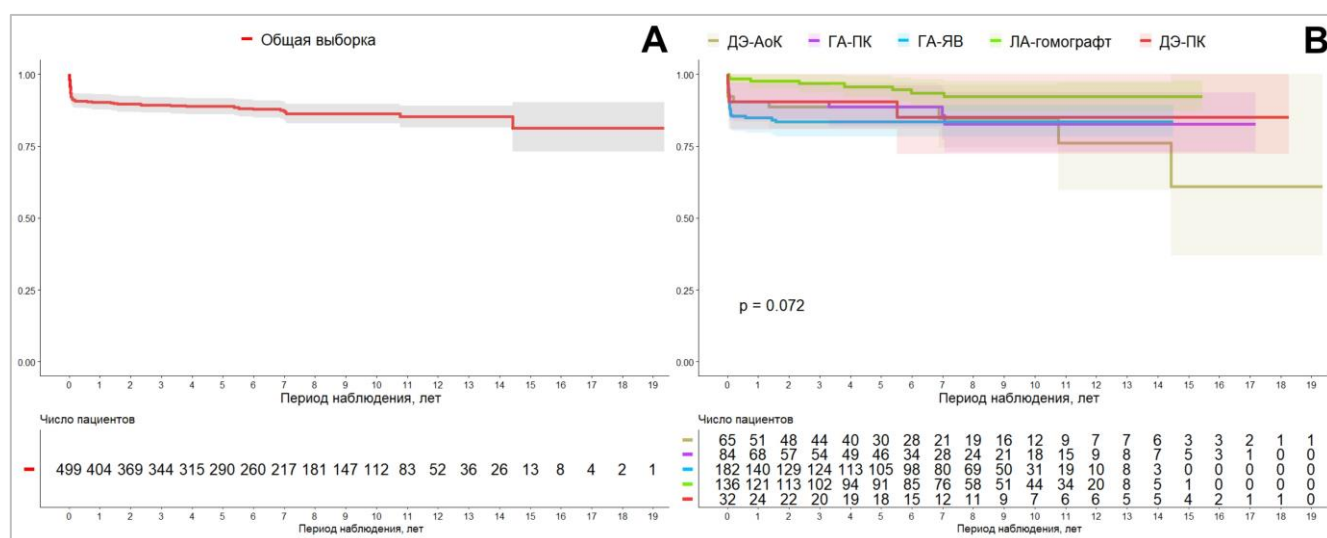


Рисунок 3.3 – Свобода от кондуит-обусловленной летальности

А – свобода от летального исхода в исследуемой когорте. В – свобода от летального исхода в группах. ГА-ПК, glutaraldehyde-treated valve-containing xenopericardial conduit; ГА-ЯВ, glutaraldehyde-treated bovine coronary vein; ДЭ-АоК, dioxepan-treated porcine aortic root; ДЭ-ПК, dioxepan-treated valve-containing xenopericardial conduit; ЛА, легочная артерия

3.2.2 Реинтервенции на клапаносодержащих кондуитах

В течение исследуемого периода в 221 случае потребовалась 1 или более повторных вмешательств на имплантированных графтах (Таблица 3.2). В общей сложности было выполнено 268 реинтервенций на кондуитах. Вмешательства включали в себя баллонную дилатацию ($n=51$; 19,0%) и стентирование графта ($n=7$; 2,6%), транскатетерную установку клапана ЛА ($n=4$; 1,5%) и хирургическую замену кондуита ($n=206$; 76,9%).

Общая свобода от реинтервенций составила 79,55% (95% ДИ 75,11-83,29%) и 43,36% (95% ДИ 37,70-48,89%) в течение 5- и 10-летнего периода наблюдения соответственно (Рисунок 3.4А). Группы достоверно отличались по величине свободы от реинтервенций на графте, $p<0,001$ (Рисунок 3.4В). Самая низкая

свобода от реинтервенций выявлена в группе ДЭ-АоК. В этой группе 5-летняя свобода от повторных вмешательств составила 63,14% (95% ДИ 47,56-75,23%), 10-летняя свобода от реинтервенций была лишь 29,00% (95% ДИ 16,53-42,68%). Для ГА-обработанных ксенокондуитов свобода от повторного вмешательства была схожей. В группе ГА-ПК свобода от реинтервенций составила 70,36% (95% ДИ 58,21-79,97%) и 30,05% (95% ДИ 19,21-41,63%) через 5 и 10 лет после имплантации соответственно. В группе ГА-ЯВ этот показатель составил 77,96% (95% ДИ 69,95-84,08%) и 32,25% (95% ДИ 23,21-41,61%) в тех же временных интервалах. Для ДЭ-ПК 5- и 10-летняя свобода от повторного вмешательства на кондуите была 88,20% (95% ДИ 67,12-96,12%) и 52,37% (95% ДИ 27,16-72,54%) соответственно. Наибольшая свобода от реинтервенций выявлена в группе ЛА-гомографтов. Пяти- и 10-летняя свобода от повторного вмешательства для данной группы составила 92,86% (95% ДИ 86,21-96,37%) и 72,40% (61,20-80,87%) соответственно.

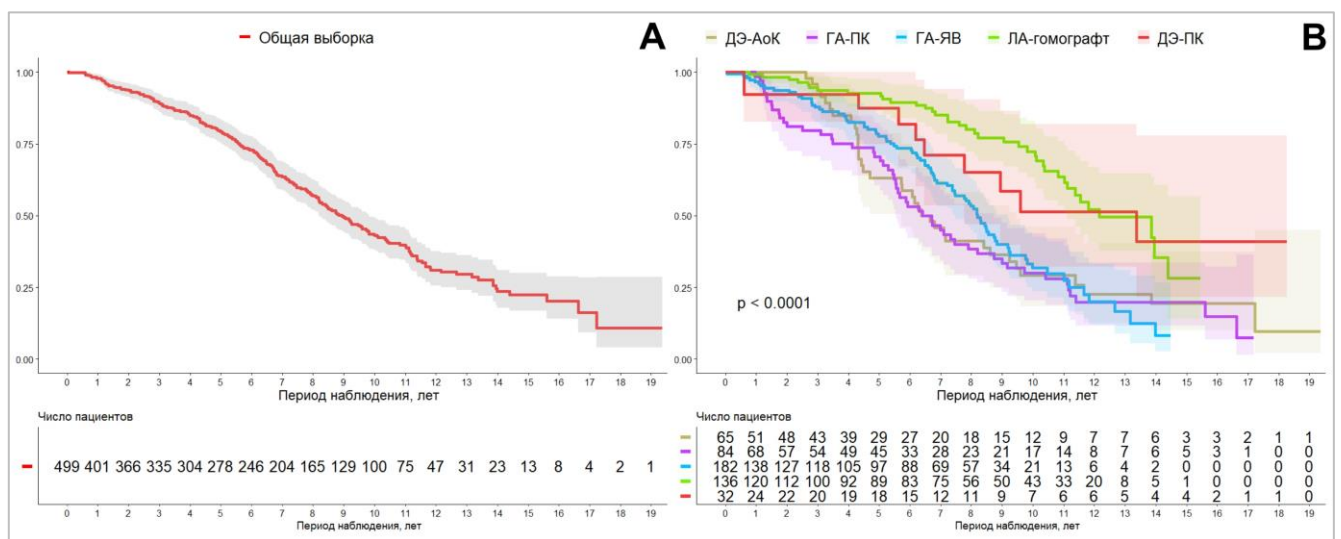


Рисунок 3.4 – Свобода от реинтервенций на графте в периоде наблюдения

А – свобода от реинтервенций в исследуемой когорте. В – свобода от реинтервенций на кондуите в группах. ГА-ПК, глутаральдегид-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный конduit; ГА-ЯВ, глутаральдегид-обработанная бычья яремная вена; ДЭ-АоК, диэпокси-обработанный свиной аортальный корень; ДЭ-ПК, диэпокси-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный конduit; ЛА, легочная артерия

При проведении однофакторного регрессионного анализа, риск реинтервенций на графте увеличивался в более молодом возрасте, при малом весе пациента, использовании малых размеров протезов, при выполнении сложных реконструктивных оперативных вмешательств, а также при имплантации графта в экстра-анатомическую позицию (Таблица 3.3). Имплантация кондуитов несоответственно большого размера (Z -score кондуита >2) увеличивала риск ранних реинтервенций в периоде наблюдения. Тип кондуита также был предиктором более раннего повторного вмешательства на графте. В многофакторной регрессионной модели только более младший возраст пациента на момент операции и тип кондуита достоверно увеличивали риск ранних реинтервенций. При сравнении разных вариантов графтов с поправкой на кофакторы (пол, возраст и вес на момент имплантации, диагноз, STAT-категория оперативного вмешательства, анатомическая/экстра-анатомическая позиция кондуита, его размер и Z -score, первичная имплантация/замена графта), ГА-ЯВ и ДЭ-ПК показали сопоставимые результаты с ЛА-гомографтами. В тоже время ГА-ПК и ДЭ-АОК продемонстрировали достоверно более высокий риск реинтервенций в периоде наблюдения (Таблица 3.3). Так для ГА-ПК риск повторного оперативного вмешательства на кондуите был в 2 раза выше, чем в группе ЛА-гомографтов. Риск реинтервенций в группе ДЭ-АОК был более чем в 2,5 раза выше по сравнению с ЛА-гомографтами.

Таблица 3.3 – Анализ предикторов повторного вмешательства на кондуите

Предиктор	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	ОР (95% ДИ)	p	ОР (95% ДИ)	p
Пол, мужской/женский	0,86 (0,65-1,16)	0,322	0,83 (0,61-1,12)	0,212
Возраст на момент имплантации кондуита, мес.	0,99 (0,99-0,99)	$<0,001$	0,99 (0,98-0,99)	0,003
Вес на момент имплантации кондуита, кг	0,98 (0,97-0,98)	$<0,001$	1,00 (0,98-1,02)	0,802
Диагноз	0,97 (0,91-1,02)	0,209	0,98 (0,90-1,06)	0,615
STAT-категория процедуры	1,22 (1,08-1,38)	0,001	1,04 (0,85-1,27)	0,704
Первичная/повторная имплантация графта	0,79 (0,58-1,07)	0,125	1,11 (0,70-1,76)	0,645
Анатомическая/экстра-анатомическая позиция имплантированного кондуита	1,36 (1,03-1,80)	0,032	0,92 (0,63-1,34)	0,660

Предиктор	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	ОР (95% ДИ)	p	ОР (95% ДИ)	p
D кондуита, мм	0,93 (0,90-0,96)	<0,001	1,06 (0,98-1,14)	0,141
Z-score кондуита	1,27 (1,12-1,43)	<0,001	0,90 (0,73-1,11)	0,330
Тип кондуита	0,80 (0,73-0,87)	<0,001	0,89 (0,80-0,99)	0,041
ЛА-гомографт	Рефер. значение		Рефер. значение	
ГА-ЯВ	2,31 (1,62-3,28)	<0,001	1,44 (0,90-2,29)*	0,127*
ГА-ПК	2,48 (1,72-3,57)	<0,001	2,29 (1,48-3,52)*	<0,001*
ДЭ-АоК	2,15 (1,46-3,16)	<0,001	2,56 (1,58-4,14)*	<0,001*
ДЭ-ПК	1,17 (0,69-1,97)	0,560	1,13 (0,61-2,10)*	0,706*

Примечание: D, диаметр; ГА-ПК, глутаральдегид-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный конduit; ГА-ЯВ, глутаральдегид-обработанная бычья яремная вена; ДЭ-АоК, диэпокси-обработанный свиной аортальный корень; ДЭ-ПК, диэпокси-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный конduit; ДИ, доверительный интервал; ЛА, легочная артерия; ОР, отношение риска. * – с учетом поправки на кофакторы.

За исследуемый период в 210 случаях была выполнена реимплантация кондуита: 206 открытых хирургических вмешательств, 4 – эндоваскулярных репротезирований пути оттока в ЛА. Заменена ранее имплантированного кондуита была проведена в интервале времени от 2,5 недель до 17,2 лет (Me 80,6 мес., IQR 51,9-111 мес.).

Свобода от репротезирования пути оттока в ЛА для всей когорты пациентов составила 82,86% [95% ДИ 78,64-86,31%] и 47,53% [95% ДИ 41,76-53,07%] через 5 и 10 лет после имплантации соответственно (Рисунок 3.5А). Группы достоверно отличались по величине свободы от замены графта в периоде наблюдения (Рисунок 3.5В). Наименьшую свободу от хирургической замены кондуита продемонстрировала группа ДЭ-АоК. Для этих кондуитов 5- и 10-летняя свобода от репротезирования ЛА составила 65,28% [95% ДИ 49,71-77,09%] и 28,83% [95% ДИ 16,39-42,52%] соответственно. Свобода от замены кондуита для ГА-ПК через 5 и 10 лет после имплантации была 72,18% [95% ДИ 59,88-81,28%] и 31,71% [95% ДИ 20,63-43,34%].

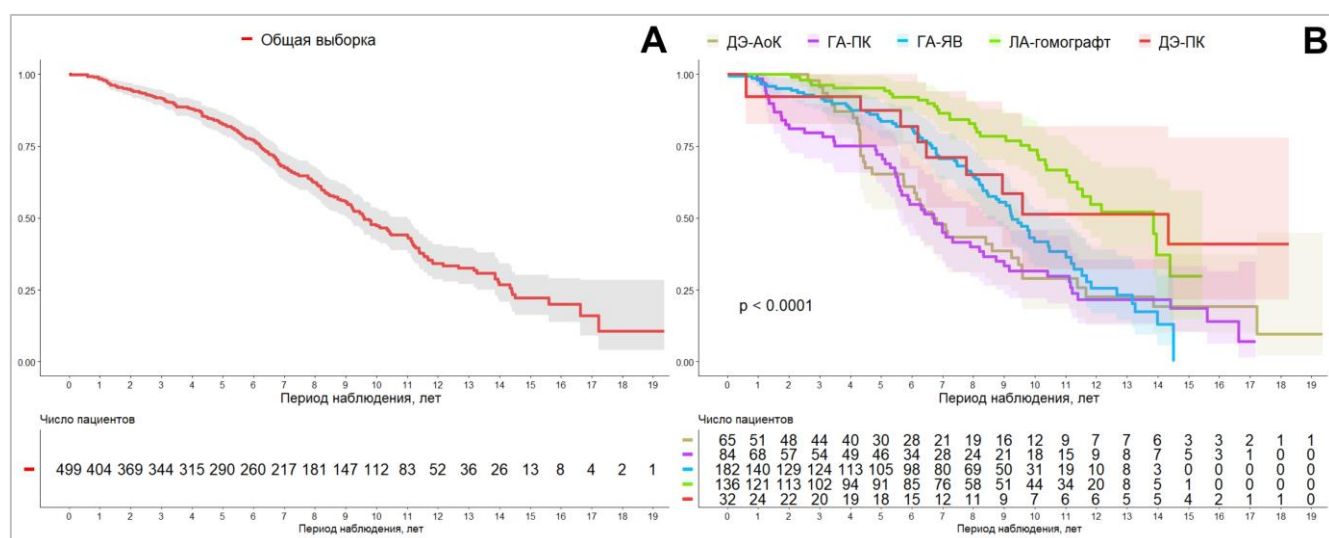


Рисунок 3.5 – Свобода от репротезирования пути оттока в ЛА в периоде наблюдения.

А – свобода от репротезирования ВОПЖ в исследуемой когорте. В – свобода от репротезирования ВОПЖ в группах. ГА-ПК, глутаральдегид-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный конduit; ГА-ЯВ, глутаральдегид-обработанная бычья яремная вена; ДЭ-АоК, диэпоксид-обработанный свиной аортальный корень; ДЭ-ПК, диэпоксид-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный конduit; ЛА, легочная артерия

В группах ГА-ЯВ и ДЭ-ПК свобода от репротезирования пути оттока в ЛА была схожей. Для ГА-ЯВ этот показатель составил 83,76% [95% ДИ 76,34-89,01%] и 42,29% [95% ДИ 32,43-51,79%] в 5- и 10-летнем временном интервале. Для ДЭ-ПК свобода от замены кондуита через 5 и 10 лет составила 88,20% [95% ДИ 67,12-96,12%] и 52,377% [95% ДИ 27,16-72,54%] соответственно. Наибольшая свобода от репротезирования пути оттока в ЛА была представлена в группе ЛА-гомографтов. Для этих кондуитов свобода от хирургической замены графта была 95,37% [95% ДИ 89,23-98,05%] и 73,59% [95% ДИ 62,28-81,99%] в 5- и 10-летнем периоде наблюдения соответственно.

3.2.3 Конduit-обусловленные осложнения

В общей сложности в раннем и отдаленном послеоперационных периодах у 48 пациентов были диагностированы conduit-обусловленные осложнения (9,6%).

В 18 случаях осложнение послужило причиной летального исхода (Рисунок 3.6А). На госпитальном этапе от осложнений, ассоциированных с имплантированным графтом, погибло 7 пациентов. В одном случае пусковым механизмом стал протезный инфекционный эндокардит, в двух – тромбоз имплантированного кондуита, в двух – послеоперационное кровотечение. Еще 2 пациента погибли по причине тяжелого гипоксического поражения головного мозга на фоне массивной кровопотери. В периоде наблюдения конduit-ассоциированные осложнения послужили причиной летального исхода в 11 случаях: инфекционный эндокардит (n=6); тромбоз кондуита (n=2); декомпенсированная сердечная недостаточность на фоне выраженной дегенеративной дисфункции графта (n=2); интраоперационный разрыв стенки кондуита с развитием массивного кровотечения во время репротезирования ВОПЖ (n=1). На рисунке 3.6В представлено распределение конduit-обусловленных осложнений в исследуемых группах. Не было выявлено достоверных различий по структуре и частоте встречаемости осложнений между группами ($p=0,853$).

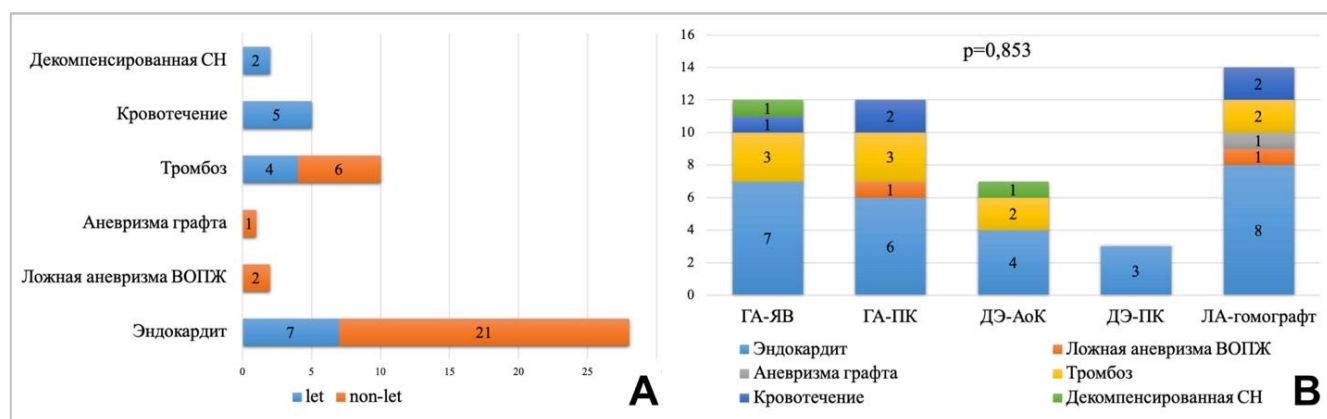


Рисунок 3.6 – Конduit-обусловленные осложнения в послеоперационном периоде. А – структура осложнений. В – распределение осложнений в группах.

Let, летальный исход; non-let, нелетальный исход; ВОПЖ, выходной отдел правого желудочка; ГА-ПК, глутаральдегид-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный конduit; ГА-ЯВ, глутаральдегид-обработанная бычья яремная вена; ДЭ-АоК, диэпокси-обработанный свиной аортальный корень; ДЭ-ПК, диэпокси-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный конduit; ЛА, легочная артерия; СН, сердечная недостаточность

3.2.4 Причины дисфункции кондуитов, потребовавшие выполнения реинтервенций

За период наблюдения в двухсот двадцати одном случае (53,5%) были выполнены повторные оперативные вмешательства на кондуитах в связи с их дисфункцией. Наиболее распространенной причиной повторного вмешательства был стеноз графта (Таблица 3.4). Двое пациентов были прооперированы в связи с диагностированной ложной аневризмой ВОПЖ, ограниченной левой париетальной плеврой. У одного пациента с протезным эндокардитом, инфекционный процесс также привел к формированию ложной аневризмы по заднелатеральной полуокружности графта, которая была ограничена прилегающими структурами левого предсердия. В одном случае конduit был реимплантирован при выполнении следующего этапа коррекции ВПС.

Таблица 3.4 – Характеристики кондуита во время первого повторного вмешательства по группам

Параметр	Всего (n=413) [#]	ГА-ЯВ (n=145) [#]	ГА-ПК (n=69) [#]	ДЭ-АоК (n=51) [#]	ДЭ-ПК (n=26) [#]	ЛА- гомографт (n=122) [#]	p
	n (%)						
Количество кондуитов, подвергшихся повторному вмешательству	221 (53,5%)	85 (58,6%)	52 (75,4%)	36 (70,6%)	10 (38,5%)	38 (31,1%)	<0,001
Тип дисфункции							<0,001
Протезный инфекционный эндокардит	12 (5,4%)	6 (7,1%)	3 (5,8%)	0	2 (20,0%)	1 (2,6%)	
Тромбоз кондуита	3 (1,4%)	0	1 (1,9%)	1 (2,8%)	0	1 (2,6%)	
Псевдоаневризма ВОПЖ	2 (0,9%)	0	1 (1,9%)	0	0	1 (2,6%)	

Параметр	Всего (n=413) [#]	ГА-ЯВ (n=145) [#]	ГА-ПК (n=69) [#]	ДЭ-АоК (n=51) [#]	ДЭ-ПК (n=26) [#]	ЛА- гомографт (n=122) [#]	p
	n (%)						
Аневризма графта	1 (0,5%)	0	0	0	0	1 (2,6%)	
Следующий этап коррекции	1 (0,5%)	1 (1,2%)	0	0	0	0	
Недостаточность на клапане графта	5 (2,3%)	2 (2,4%)	0	0	0	3 (7,9%)	
Стеноз и недостаточность	11 (5,0%)	5 (5,9%)	1 (1,9%)	0	0	5 (13,2%)	
Стеноз:	186 (84,2%)	71 (83,5%)	46 (88,5%)	35 (97,2%)	8 (80,0%)	26 (68,4%)	
проксимальный	64 (34,4%)	19 (26,8%)	13 (28,3%)	14 (40,0%)	4 (50,0%)	14 (53,8%)	
дистальный	36 (19,4%)	21 (29,6%)	13 (28,3%)	1 (2,9%)	0	1 (3,8%)	
сочетанный	86 (46,2%)	31 (43,7%)	20 (43,5%)	20 (57,1%)	4 (50,0%)	11 (42,3%)	
Структурные причины дисфункции							<0,001
Кальцификация графта:	148 (67,0%)	51 (60,0%)	32 (61,5%)	33 (91,7%)	8 (80,0%)	24 (63,2%)	<0,001
Створки	36 (24,3%)*	8 (15,7%)*	7 (21,9%)*	8 (24,2%)*	3 (37,5%)*	10 (41,7%)*	
Стенка	18 (12,2%)*	11(21,6%)*	4 (12,5%)*	0	1 (12,5%)*	2 (8,3%)*	
Диффузно	94 (63,5%)*	32 (62,7%)*	21 (65,6%)*	25 (75,8%)	4 (50,0%)*	12 (50,0%)*	
Гиперплазия неоинтимы	35 (15,8%)	18 (21,2%)	13 (25,0%)	2 (5,6%)	0	2 (5,3%)	<0,001
Mismatch	14 (6,3%)	5 (5,9%)	2 (3,8%)	0	0	7 (18,4%)	0,232
Инфекционный эндокардит	12 (5,4%)	6 (7,1%)	3 (5,8%)	0	2 (20,0%)	1 (2,6%)	0,175
Тромбоз кондуита	3 (1,4%)	0	1 (1,9%)	1 (2,8%)	0	1 (2,6%)	0,595
Другое	9 (4,1%)	5 (5,9%)	1 (1,9%)	0	0	3 (7,9%)	0,558

Примечание: Mismatch, несоответствие размеров протез-пациент; ВОПЖ, выходной отдел правого желудочка; ГА-ПК, глутаральдегид-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный конduit; ГА-ЯВ, глутаральдегид-обработанная бычья яремная вена; ДЭ-АОК, диэпоксид-обработанный свиной аортальный корень; ДЭ-ПК, диэпоксид-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный конduit; ЛА, легочная артерия; ПЖ, правый желудочек. [#] – от количества кондуитов, доступных для анализа в периоде наблюдения. * – от количества кальцинированных кондуитов.

Причинами дисфункции графтов, потребовавшими реинтервенций, были кальцификация ($n=148$; 67,0%), неоинтимальная гиперплазия ($n=35$; 15,8%), несоответствие размеров протез-пациент в связи с ростом ребенка ($n=14$; 6,3%), инфекционный эндокардит ($n=12$; 5,4%), тромбоз кондуита ($n=3$; 1,4%) и другие причины ($n=9$; 4,1%). Распределение причин дисфункции кондуитов в исследуемых группах по годам представлено на рисунке 3.7.

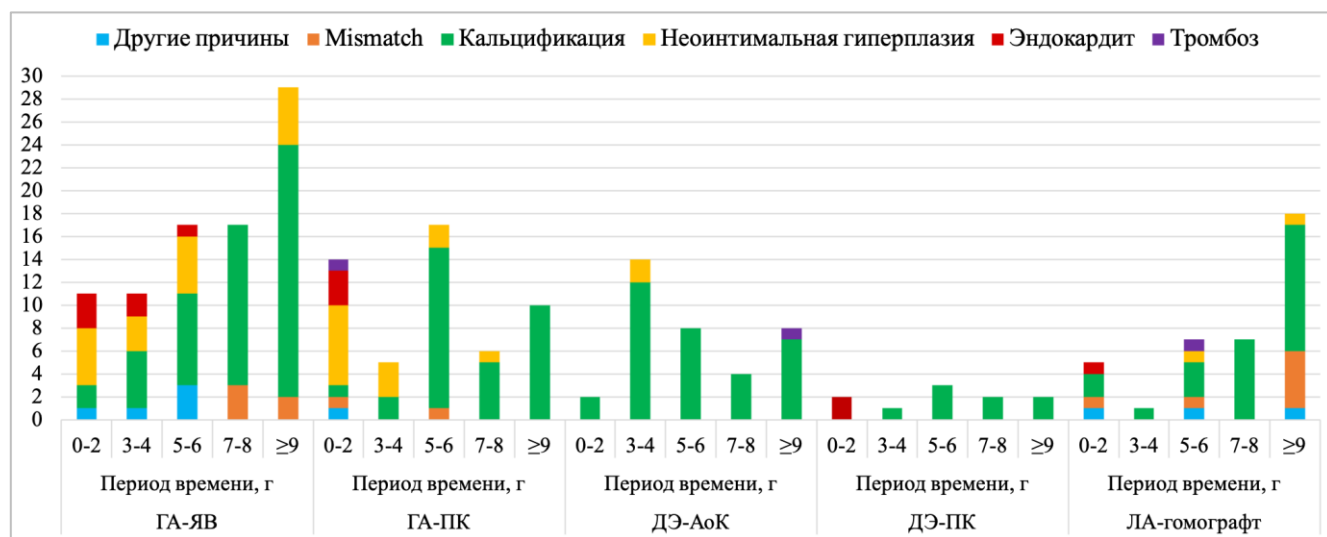


Рисунок 3.7 – Причины дисфункции имплантированных графтов по годам. Mismatch, несоответствие размеров протез-пациент; ГА-ПК, глутаральдегид-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный кондуит; ГА-ЯВ, глутаральдегид-обработанная бычья яремная вена; ДЭ-АоК, диэпокси-обработанный свиной аортальный корень; ДЭ-ПК, диэпокси-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный кондуит; ЛА, легочная артерия

Основной причиной нарушения функции имплантированного кондуита была кальцификация его структур ($p<0,001$). Обызвествление тканей протеза было характерно для всех типов кондуитов, при этом в большинстве случаев патологический процесс затрагивал как створки, так и стенку графта, обуславливая преимущественно стеноз проксимального участка кондуита (90,6% всех проксимальных стенозов; $p<0,001$). Дисфункция кондуита за счет неоинтимальной гиперплазии была свойственна преимущественно ГА-обработанным протезам (ГА-ЯВ, ГА-ПК). К другим причинам замены ранее имплантированного графта отнесены грубый фиброз створок, обусловивший ограничение их подвижности

(n=3), ложная аневризма ВОПЖ (n=2), аневризматическое расширение графта на фоне резидуального высокого давления в главных ветвях ЛА (n=1), отрыв одной из створок протеза (n=1), выполнение следующего этапа коррекции (n=1). В одном случае у пациента с КТМА выявлена гемодинамически значимая компрессия кондуита грудиной.

3.2.4.1 Кальцификация кондуитов

Кальцификация стенок и/или створок была выявлена у 67,0% всех кондуитов, подвергшихся повторным оперативным вмешательствам, и приводила к формированию стеноза преимущественно проксимального отдела (39,2%) или к диффузному поражению графта (47,3%), $p < 0,001$ (Таблица 3.4).

Группа ДЭ-АоК показала самый высокий уровень минерализации структур кондуита. В этой группе 91,7% случаев ксенографты были кальцинированы на момент повторного вмешательства. В большинстве кондуитов в патологический процесс были вовлечены и стенка, и створки свиного аортального корня (75,8%) (Рисунок 3.8С).

Изолированная минерализация стенки, без вовлечения в патологический процесс клапана протеза, была свойственна преимущественно ГА-ЯВ (Рисунок 3.8А). В тоже время, для этой группы кондуитов была характерна меньшая склонность к изолированной кальцификации створок, по сравнению с другими графтами (Таблица 3.4).

Для ксеноперикардальных кондуитов (ГА-ПК, ДЭ-ПК) изолированная минерализация стенки протеза была относительно редким явлением. В этих группах основной патологический процесс локализовался на уровне клапана кондуита, откуда распространялся на стенки графта (Рисунок 3.8В, 3.8D).

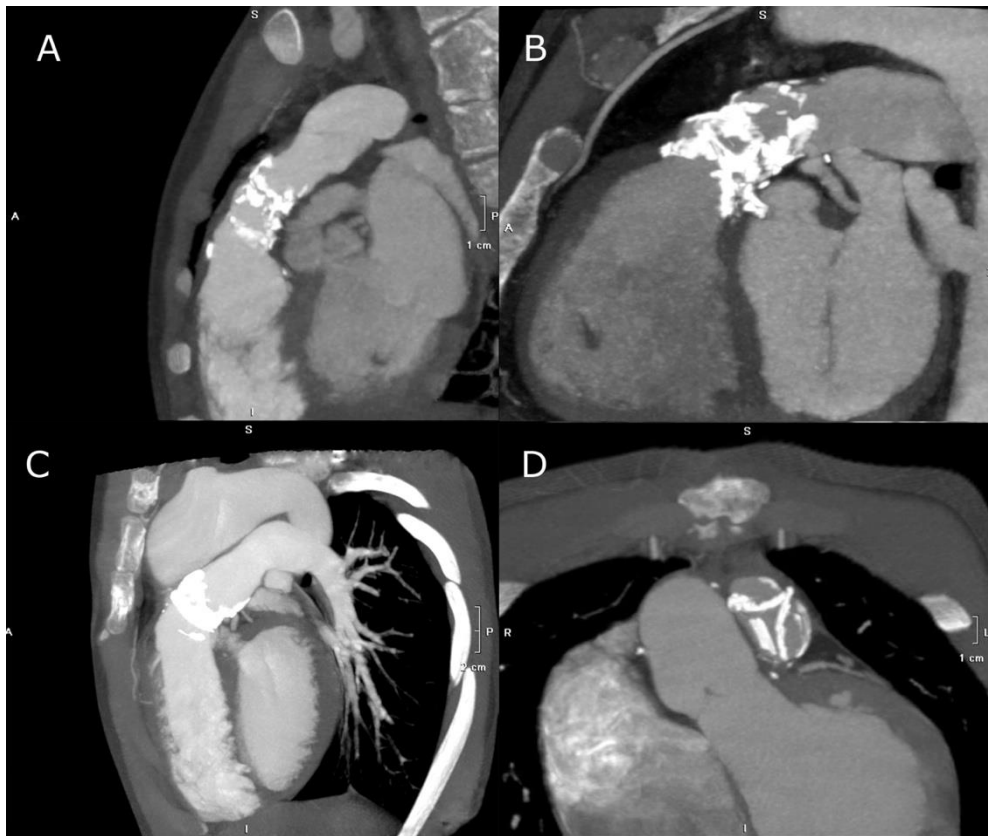


Рисунок 3.8 – Результаты компьютерной томографии пациентов с имплантированными ксенографтами в периоде наблюдения. А – 16-мм ГА-ЯВ через 8 лет после коррекции общего артериального ствола (возраст на момент исследования 8,1 год). В – 19-мм ГА-ПК через 6 лет после операции Росса–Конно (возраст на момент исследования 8 лет). С – 24-мм ДЭ-АоК, через 6,8 лет после операции Росса (возраст на момент исследования 10 лет). D – 27-мм ДЭ-ПК через 6,2 года после замены кондуита (возраст на момент исследования 20 лет). ГА-ПК, глутаральдегид-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный конduit; ГА-ЯВ, глутаральдегид-обработанная бычья яремная вена; ДЭ-АоК, диэпокси-обработанный свиной аортальный корень; ДЭ-ПК, диэпокси-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный конduit

Среди всех ЛА-гомографтов, подвергшихся реинтервенциям, минерализация структур кондуита была выявлена в 63,2% случаев. Кальциевые конгломераты локализовались преимущественно на уровне створок с распространением в 50% случаях на стенку графта (Рисунок 3.9).



Рисунок 3.9 – Результаты компьютерной томографии пациента с имплантированным легочным гомографтом в периоде наблюдения (возраст на момент исследования 10 лет). Минерализация стенки и створок АЛ-гомографта (22 мм) через 6 лет после репротезирования ВОПЖ. А – сагиттальная плоскость. В – корональная плоскость. С – аксиальная плоскость

Общая свобода от реинтервенций по причине кальцификации графта составила 84,70% [95% ДИ 80,28-88,20%] и 51,95% [95% ДИ 45,30-58,10%] через 5 и 10 лет после имплантации кондуита (Рисунок 3.10А).

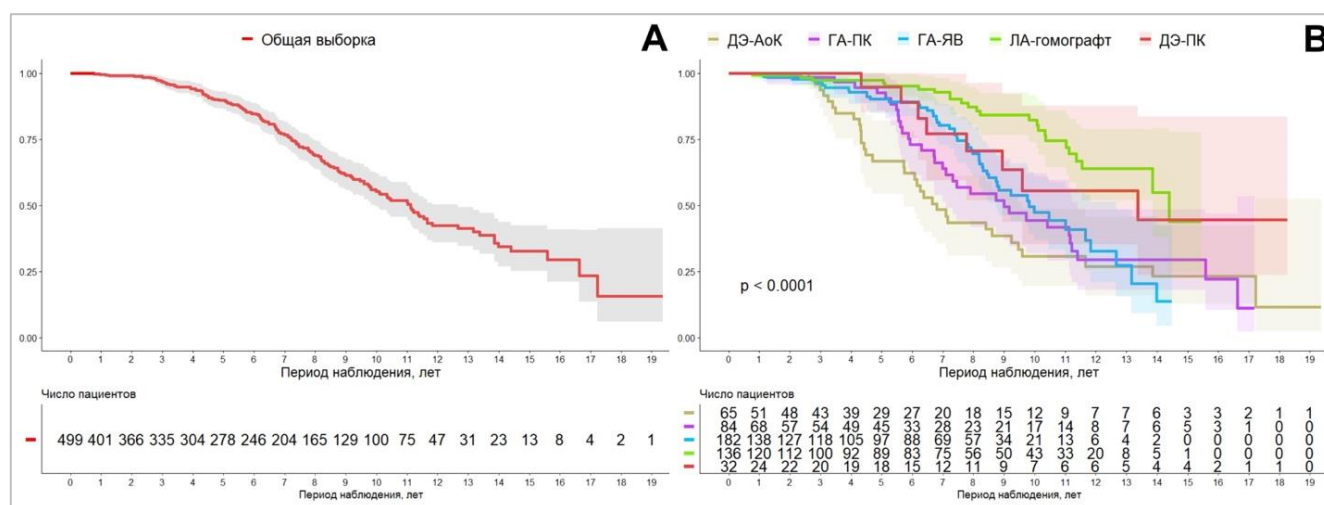


Рисунок 3.10 – Свобода от дисфункции кондуита по причине кальцификации в периоде наблюдения. А – свобода от дисфункции графта по причине кальцификации в исследуемой когорте. В – свобода от дисфункции графта по причине кальцификации в группах. ГА-ПК, glutaraldehyde-treated porcine aortic valve; ГА-ЯВ, glutaraldehyde-treated bovine aortic valve; ДЭ-АоК, dioxepan-treated porcine aortic valve

аортальный корень; ДЭ-ПК, диэпокси-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный конduit; ЛА, легочная артерия

Согласно результатам однофакторного регрессионного анализа, пол, возраст и вес на момент протезирования ВОПЖ, СТАТ-категория процедуры, размер и Z-score имплантированного графта были факторами риска дисфункции кондуита из-за его минерализации. Тип графта также был достоверно ассоциирован с риском повторного вмешательства по причине кальцификации структур кондуита. В многофакторной регрессионной модели, только мужской пол и младший возраст пациента послужили факторами риска кальцификации, потребовавшей повторного оперативного вмешательства на протезе.

При сравнении разных вариантов графтов с поправкой на кофакторы (пол, возраст и вес на момент имплантации, диагноз, СТАТ-категория оперативного вмешательства, анатомическая/экстра-анатомическая позиция кондуита, его размер и Z-score, первичная имплантация/замена графта), ГА-ЯВ и ДЭ-ПК показали схожие результаты с группой ЛА-гомографтов (Таблица 3.5).

Таблица 3.5 – Анализ факторов риска дисфункции кондуита по причине его кальцификации и неинтимальной гиперплазии

Предиктор	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	ОР (95% ДИ)	p	ОР (95% ДИ)	p
Кальцификация кондуита				
Пол, мужской/женский	0,67 (0,46-0,91)	0,038	0,66 (0,45-0,97)	0,034
Возраст на момент имплантации кондуита, мес.	0,99 (0,99-0,99)	<0,001	0,99 (0,98-0,99)	0,002
Вес на момент имплантации кондуита, кг	0,98 (0,97-0,99)	<0,001	1,00 (0,98-1,03)	0,823
Диагноз	0,96 (0,90-1,03)	0,236	0,94 (0,85-1,04)	0,207
СТАТ-категория процедуры	1,23 (1,06-1,43)	0,006	1,10 (0,86-1,41)	0,439
Первичная/повторная имплантация графта	0,91 (0,63-1,30)	0,597	1,59 (0,90-2,83)	0,110
Анатомическая/экстра-анатомическая позиция имплантированного кондуита	1,37 (0,98-1,93)	0,068	0,89 (0,57-1,41)	0,631
D кондуита, мм	0,94 (0,91-0,97)	<0,001	1,09 (0,99-1,19)	0,079
Z-score кондуита	1,4 (1,22-1,64)	<0,001	0,97 (0,74-1,27)	0,812
Тип кондуита	0,82 (0,74-0,91)	<0,001	0,93 (0,81-1,06)	0,264

Предиктор	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	ОР (95% ДИ)	p	ОР (95% ДИ)	p
ЛА-гомографт	Рефер. значение		Рефер. значение	
ГА-ЯВ	2,24 (1,46-3,44)	<0,001	1,42 (0,81-2,49)*	0,221*
ГА-ПК	2,36 (1,51-3,68)	<0,001	1,95 (1,15-3,28)*	0,013*
ДЭ-АоК	3,09 (1,97-4,86)	<0,001	4,47 (2,52-7,95)*	<0,001*
ДЭ-ПК	1,29 (0,70-2,37)	0,409	1,52 (0,73-3,17)*	0,260*
Неоинтимальная гиперплазия				
Пол, мужской/женский	1,50 (0,76-2,96)	0,238	1,29 (0,63-2,62)	0,485
Возраст на момент имплантации кондуита, мес.	0,99 (0,98-0,99)	<0,001	0,99 (0,97-1,01)	0,189
Вес на момент имплантации кондуита, кг	0,97 (0,94-0,99)	0,005	1,02 (0,97-1,08)	0,424
Диагноз	0,97 (0,84-1,11)	0,664	1,08 (0,88-1,31)	0,467
СТАТ-категория процедуры	1,32 (0,99-1,78)	0,063	0,85 (0,51-1,41)	0,536
Первичная/повторная имплантация графта	0,34 (0,12-0,99)	0,047	0,39 (0,10-1,46)	0,162
Анатомическая/экстра-анатомическая позиция имплантированного кондуита	1,66 (0,78-3,51)	0,189	0,86 (0,32-2,27)	0,758
D кондуита, мм	0,87 (0,80-0,94)	<0,001	1,02 (0,84-1,23)	0,853
Z-score кондуита	1,30 (0,95-1,78)	0,095	0,96 (0,60-1,56)	0,881
Тип кондуита	0,59 (0,45-0,79)	<0,001	0,69 (0,47-1,00)	0,054
ЛА-гомографт	Рефер. значение		Рефер. значение	
ГА-ЯВ	4,80 (1,76-13,06)	0,002	1,63 (0,41-6,47)*	0,491*
ГА-ПК	6,26 (2,55-15,37)	<0,001	11,07 (3,60-37,99)*	<0,001*
ДЭ-АоК	1,53 (0,54-4,32)	0,422	1,47 (0,34-6,28)*	0,604*
ДЭ-ПК	0,99 (0,23-4,30)	0,993	0,59 (0,06-5,06)*	0,594*

Примечание: D, диаметр; ГА-ПК, глутаральдегид-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный конduit; ГА-ЯВ, глутаральдегид-обработанная бычья яремная вена; ДИ, доверительный интервал; ДЭ-АоК, диэпоксид-обработанный свиной аортальный корень; ДЭ-ПК, диэпоксид-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный конduit; ЛА, легочная артерия; ОР, отношение риска. * – с учетом поправки на кофакторы.

Пяти- и десяти-летняя свобода от дисфункции кондуита, вызванной минерализацией его структур, составила: для группы ЛА-гомографт – 95,13% [95% ДИ 88,59-97,96%] и 74,01% [95% ДИ 61,12-83,20%]; для ГА-ЯВ – 89,16% [95% ДИ

82,00-93,59%] и 45,61% [95% ДИ 32,28-57,11%]; для ДЭ-ПК – 89,16% [95% ДИ 63,15-97,18%] и 56,25% [95% ДИ 28,91-76,59%] соответственно (Рисунок 3.10В).

В тоже время ГА-ПК и ДЭ-АоК продемонстрировали достоверно более высокий риск повторного оперативного вмешательства по причине кальцификации кондуита (Таблица 3.5). В группа ДЭ-АоК риск кальцификации ксенографта, потребовавшей реинтервенций, был почти в 4,5 раза выше по сравнению с ЛА-гомографтами. В этой группе свобода от дисфункции кондуита, вызванной его кальцификацией, была наименьшей (Рисунок 3.10В) и составила 62,41% [95% ДИ 46,63-74,73%] и 30,79% [95% ДИ 17,65-44,93%] через 5 и 10 лет после имплантации.

В группе ГА-ПК риск повторного оперативного вмешательства из-за минерализации протеза был на 95% выше по сравнению с референтной группой. Для данной группы ксенографтов 5- и 10-летняя свобода от развития дисфункции по причине кальцификации структур кондуита составила 73,36% [95% ДИ 58,48-83,62%] и 42,04% [95% ДИ 27,15-56,22%] соответственно.

3.2.4.2 Неинтимальная гиперплазия

Гиперплазия неоинтимы, явившаяся причиной дисфункции графта и повторного оперативного вмешательства на нем, была выявлена в 15,8% случаев (Таблица 3.4). Общая свобода от реинтервенций по причине неоинтимальной пролиферации составила 91,57% [95% ДИ 88,05-94,09%] и 88,36% [95% ДИ 83,82-91,69%] в течение 5- и 10-летнего периодов наблюдения (Рисунок 3.11А). Неинтимальная гиперплазия приводила преимущественно к развитию дистального стеноза на графте ($p < 0,001$) и достоверно чаще встречалась в группах ГА-обработанных ксенокондуитов (Таблица 3.4). Свобода от повторных вмешательств на ксенокондуите из-за пролиферации неоинтимы в группах представлена на рисунке 3.11В.

Согласно данным однофакторного регрессионного анализа, более младший возраст и меньший вес пациента, тип графта, его малый диаметр и первичная

имплантация кондуита для формирования пути оттока в ЛА были факторами риска гиперплазии неоинтимы в периоде наблюдения (Таблица 3.5).

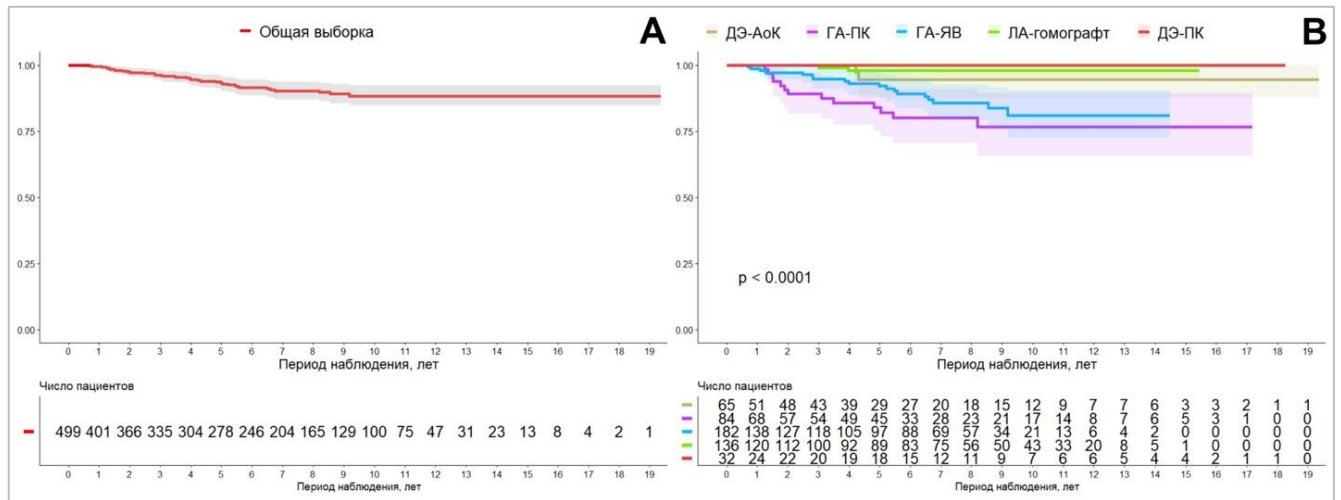


Рисунок 3.11 – Свобода от дисфункции кондуита по причине неоинтимальной гиперплазии в периоде наблюдения. А – свобода от дисфункции графта из-за гиперплазии неоинтимы в исследуемой когорте. В – свобода от дисфункции графта из-за гиперплазии неоинтимы в группах. ГА-ПК, глутаральдегид-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный кондуит; ГА-ЯВ, глутаральдегид-обработанная бычья яремная вена; ДЭ-АоК, диэпокси-обработанный свиной аортальный корень; ДЭ-ПК, диэпокси-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный кондуит; ЛА, легочная артерия

Однако в многофакторной регрессионной модели только вариант имплантированного графта был ассоциирован с риском дисфункции протеза по причине неоинтимальной пролиферации (Таблица 3.5). При сравнении разных групп с поправкой на кофакторы (пол, возраст и вес на момент имплантации, диагноз, STAT-категория оперативного вмешательства, анатомическая/экстра-анатомическая позиция кондуита, его размер и Z-score, первичная имплантация/замена графта), риск дисфункции протеза из-за гиперплазии неоинтимы для ГА-ПК был в 11 раз выше по сравнению с референтной группой. В этой группе 5- и 10-летняя свобода от реинтервенций из-за неоинтимальной гиперплазии была 79,81% [95% ДИ 66,96-88,09%] и 76,26% [95% ДИ 61,60-85,94%] соответственно (Рисунок 3.11В).

В тоже время ДЭ-АоК и ДЭ-ПК продемонстрировали схожие результаты с ЛА-гомографтами. В этих группах 5- и 10-летняя свобода от дисфункции кондуита за счет

гиперплазии неоинтимы составила: для группы ЛА-гомографт – 98,03% [95% ДИ 92,36-99,51%] в обоих временных промежутках; для ДЭ-АоК – 94,29% [95% ДИ 79,03-98,54%] в обоих временных промежутках; для ДЭ-ПК – 100%. Для ГА-ЯВ кондуитов данный показатель был ниже, чем в референтной группе, и составил 89,37% [95% ДИ 82,27-93,74%] и 81,15% [95% ДИ 69,90-88,52%] через 5 и 10 лет после имплантации. Однако при учете поправки на кофакторы, достоверной разницы между группами ГА-ЯВ и ЛА-гомографт получено не было ($p=0,491$).

3.2.4.3 Инфекционный эндокардит

В исследуемой когорте инфекционный эндокардит кондуита был выявлен в 28 случаях (5,6%) в интервале от 2 дней до 14 лет после имплантации (Me 11 мес.; IQR 0,5 мес. – 4 года).

На госпитальном этапе протезный инфекционный эндокардит был диагностирован у 10 пациентов, в периоде наблюдения – у 18 детей. Спектр выявленных микроорганизмов, вызвавший эндокардит легочных графтов в исследуемой когорте, представлен в таблице 3.6.

Таблица 3.6 – Спектр микроорганизмов, вызвавших инфекционный эндокардит легочного кондуита

Возбудитель	Хирургическое лечение (n=12)	Медикаментозная терапия (n=16)
<i>Acinetobacter baumannii</i>		1
<i>Bacillus spp.</i>	1	
<i>Enterococcus faecium</i>		1
<i>Priestia megaterium</i>		1
<i>Propionibacterium acnes</i>	1	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	
<i>Serratia marcescens</i>		1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>		1

Возбудитель	Хирургическое лечение (n=12)	Медикаментозная терапия (n=16)
<i>Staphylococcus hominis</i>		1
<i>Роста не получено</i>	6	3
<i>Нет данных</i>	2	6

В 8 случаях данные о возбудителе инфекционного процесса отсутствовали, поскольку пациенты получали лечение в стационаре по месту жительства, и соответствующая информация не была предоставлена. Удаление инфицированного графта и репротезирование ЛА выполнено 12 пациентам (42,8%). В остальных случаях (n=16, 57,1%) проводилась медикаментозная терапия.

Общая летальность от инфекционного эндокардита в исследуемой когорте составила 25,0% (n=7): один пациент погиб на госпитальном этапе, в 6 случаях – летальный исход наступил в периоде наблюдения.

Общая свобода от развития протезного инфекционного эндокардита в исследуемой когорте в течение 5- и 10-летнего периодов наблюдения составила 93,69% [95% ДИ 90,63-95,78%] и 91,71% [95% ДИ 87,54-94,52%] соответственно (Рисунок 3.12А).

Межгрупповая оценка свободы от инфекционного эндокардита легочного кондуита не выявила различий среди анализируемых клапаносодержащих графтов (Рисунок 3.12В). Для исследуемых групп 5- и 10-летняя свобода от развития протезного инфекционного эндокардита составила: для ГА-ЯВ – 93,88% [95% ДИ 87,47-97,06%] в обоих временных интервалах; для ГА-ПК – 91,40% [95% ДИ 81,77-96,06%] в обоих временных интервалах; для ДЭ-АоК – 96,58% [95% ДИ 87,01-99,13%] и 91,22% [95% ДИ 70,72-97,59%] соответственно; для ДЭ-ПК – 86,90% [95% ДИ 62,92-95,83%] в обоих временных интервалах; для группы ЛА-гомографтов – 95,17% [95% ДИ 89,54-97,07%] и 91,42% [95% ДИ 82,15-95,99%] соответственно.

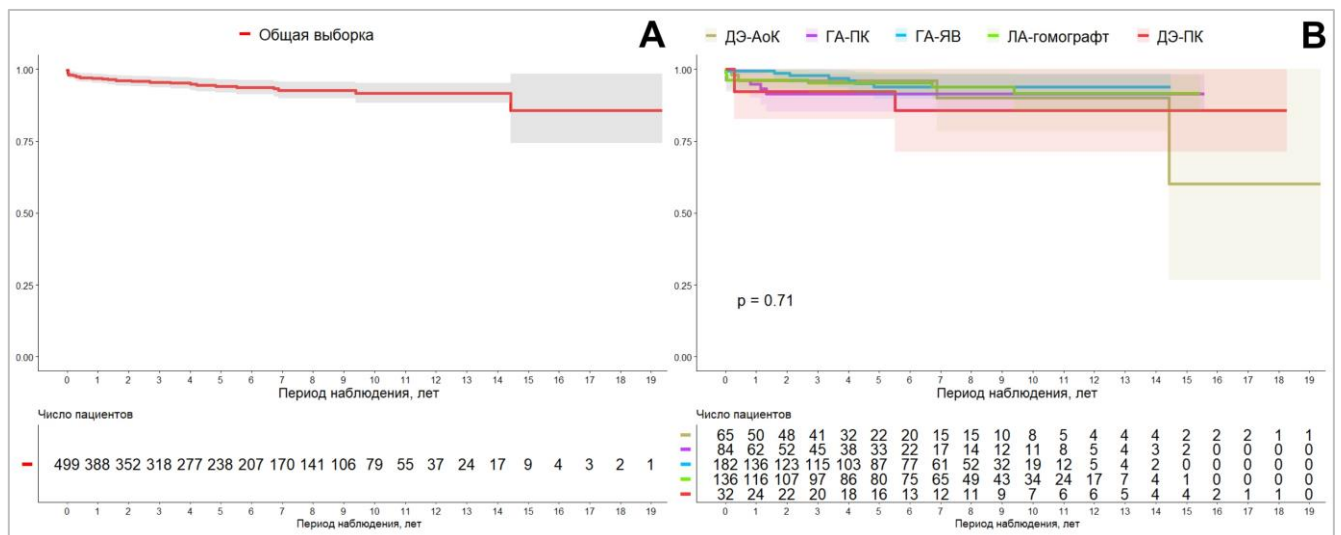


Рисунок 3.12 – Свобода от развития протезного инфекционного эндокардита в периоде наблюдения. А – свобода от развития протезного эндокардита в исследуемой когорте. В – свобода от развития протезного эндокардита в группах.

ГА-ПК, глутаральдегид-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный конduit; ГА-ЯВ, глутаральдегид-обработанная бычья яремная вена; ДЭ-АоК, диэпоксид-обработанный свиной аортальный корень; ДЭ-ПК, диэпоксид-обработанный клапаносодержащий ксеноперикардальный конduit; ЛА, легочная артерия

Однофакторный регрессионный анализ предикторов развития инфекционного эндокардита показал статистически достоверное влияние возраста и веса на момент имплантации, а также размера графта. Однако в многофакторной модели эти параметры не имели статистически значимой связи с частотой эндокардита легочного графта. В исследуемой когорте пациентов, такой фактор, как тип кондуита, не продемонстрировал достоверного влияния на риск развития протезного эндокардита ни при однофакторном анализе, ни в многофакторной регрессионной модели (Таблица 3.7).

Таблица 3.7 – Анализ предикторов развития протезного инфекционного эндокардита

Предиктор	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	ОР (95% ДИ)	p	ОР (95% ДИ)	p
Пол, мужской/женский	1,23 (0,57-2,67)	0,600	1,38 (0,62-3,09)	0,432
Вес на момент имплантации кондуита, кг	1,02 (1,00-1,04)	0,022	0,99 (0,95-1,04)	0,927

Предиктор	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	ОР (95% ДИ)	p	ОР (95% ДИ)	p
Возраст на момент имплантации кондуита, мес.	1,01 (1,00-1,01)	0,006	1,01 (0,99-1,03)	0,064
Диагноз	1,01 (0,86-1,18)	0,907	0,98 (0,76-1,26)	0,880
STAT-категория процедуры	0,85 (0,59-1,23)	0,394	0,83 (0,44-1,58)	0,578
Первичная/повторная имплантация графта	0,96 (0,41-2,25)	0,916	0,58 (0,17-1,95)	0,377
Анатомическая/экстра-анатомическая позиция имплантированного кондуита	0,88 (0,42-1,86)	0,737	2,58 (0,73-9,06)	0,139
D кондуита, мм	1,12 (1,03-1,23)	0,009	1,06 (0,87-1,29)	0,559
Z-score кондуита	0,97 (0,69-1,37)	0,882	1,46 (0,85-2,51)	0,175
Тип кондуита	1,07 (0,86-1,33)	0,566	0,77 (0,55-1,07)	0,115

Примечание: D, диаметр; ДИ, доверительный интервал; ОР, отношение риска.

3.3 Обсуждение полученных результатов

Основной целью данной части исследования была оценка результатов использования различных типов клапаносодержащих кондуитов для протезирования пути оттока в ЛА в педиатрической группе пациентов (0-18 лет) с выявлением наиболее специфических причин дисфункции.

Несмотря на проводимые исследовательские и поисковые работы в данной области, в настоящий момент не существует идеального клапаносодержащего кондуита для имплантации в легочную позицию [Crago и др., 2023; Harris и др., 2023; Herrmann и др., 2020; Singh и др., 2025]. Хотя легочный артериальный гомографт считается наиболее подходящим кондуитом для реконструкции ВОПЖ, его применение в педиатрической группе пациентов лимитировано из-за ограниченного наличия графтов малого диаметра [Bobylev и др., 2024; Hazekamp и др., 2021; Huayan, Chang, Song, 2021; Raja и др., 2021; Singh и др., 2025]. Доступной альтернативой ЛА-гомографтов являются кондуиты, изготовленные из ксеногенных биоматериалов. Именно по этой причине ксенокондуиты достаточно широко используются в хирургии ВПС.

Однако все клапаносодержащие легочные кондуиты неизбежно подвергаются дегенеративным изменениям, что приводит к потребности в повторных оперативных вмешательствах, особенно у детей более младшего возраста [Журавлева и др., 2016b; Dave и др., 2011; Lee и др., 2011; Ong и др., 2013; Qian и др., 2021; Romeo и др., 2019; Tweddell и др., 2000]. К основным причинам дисфункции кондуитов в педиатрической группе пациентов относят кальцификацию, неоинтимальную пролиферацию, инфекционный эндокардит и тромбоз кондуита [Alfieri и др., 2016; Flameng и др., 2011; Mery и др., 2016; Soor и др., 2009]. На анализе частоты развития этих осложнений, как правило, и основывается оценка того или иного типа графтов. Некоторые авторы в своих работах указывали на то, что каждому типу кондуитов свойственны различные причины дисфункции [Flameng и др., 2011; Gist и др., 2012; Mery и др., 2016; Urso и др., 2011]. Однако результаты, описанные в ранее опубликованных исследованиях, противоречивы [Lee и др., 2011; Mery и др., 2016]. Исследуемые когорты включали как детей, так и взрослых пациентов с ВПС, при этом возраст варьировал от 0 до 81 года [Cocomello и др., 2019; Dave и др., 2011; Gist и др., 2012; Gröning и др., 2019; Homann и др., 2000; Mery и др., 2016; Sandica и др., 2015; Skoglund и др., 2017; Stammnitz и др., 2022; Urso и др., 2011]. Наиболее релевантные данные описаны только для ГА-обработанных ксенокондуитов и ЛА-гомографтов [Alfieri и др., 2016; Homann и др., 2000; Lee и др., 2011; Lewis и др., 2023; Mery и др., 2016; Qian и др., 2021]. Эти факторы не позволяют провести чёткую сравнительную оценку результатов имплантации разных типов графтов у детей. В данной части исследовательской работы был проведен анализ клинических результатов протезирования ЛА исключительно в педиатрической группе, где возраст пациентов на момент имплантации не превышал 18 лет (Me 5,5 лет; IQR 1-12,5 лет). Более того, ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» обладает обширным опытом использования различных кондуитов для протезирования пути оттока из ПЖ в ЛА, в том числе ДЭ-обработанных клапаносодержащих ксенокондуитов, изготовленных как из свиного аортального корня, так и из бычьего перикарда [Ничай и др., 2019; Ничай и др., 2024; Karaskov и др., 2016a; Karaskov и др., 2016b; Nichay и др., 2018; Nichay и др., 2020].

Согласно проведенному анализу 5- и 10-летняя свобода от развития летального исхода составила 87,66% и 84,18% для всей исследуемой когорты, при этом тип имплантированного графта достоверно не влиял на величину свободы от кондуит-обусловленной летальности. Наши данные соотносятся с ранее описанными результатами [Bobylev и др., 2024; Junnil и др., 2021]. Однако стоит уточнить, что в своей работе мы анализировали результаты применения легочных кондуитов для всей когорты пациентов, перенесших протезирование ВОПЖ, не зависимо от анатомического варианта ВПС и типа выполненной хирургической процедуры. Так в работе представлен весь спектр врожденных сердечных аномалий (Таблица 3.1), требующий реконструкции пути оттока из ПЖ в ЛА. Более того, 37% хирургических вмешательств, включающих имплантацию клапаносодержащего кондуита в легочную позицию, находились в 3-5 STAT-категориях процедуры, которые имеют наибольшие показатели смертности, заболеваемости и тяжелых послеоперационных осложнений [Jacobs и др., 2013; O'Brien и др., 2009]. В связи с чем, параметр «свобода от развития летального исхода» не может в полной мере отражать выживаемость после протезирования ВОПЖ.

Как в раннем, так и в отдаленном периодах наблюдения осложнения, ассоциированные с имплантированным графтом, были диагностированы в 9,6% случаев. Частота встречаемости и структура кондуит-обусловленных осложнений также не зависели от типа имплантированного графта. В течение исследуемого периода большая часть кондуитов подверглась реинтервенциям по причине их дисфункции (53,5%). Общая свобода от повторного вмешательства на кондуите составила 79,55% и 43,36% через 5 и 10 лет после имплантации, что соответствует результатам других исследований [Brown и др., 2005; Dearani и др., 2003; Homann и др., 2000; Mery и др., 2016; Rodefeld и др., 2008; Stark и др., 1998; Tweddell и др., 2000; Zachariah и др., 2009]. В однофакторной регрессионной модели риск реинтервенций на графте увеличивался в более молодом возрасте, при малом весе пациента, использовании малых размеров протезов, при выполнении сложных реконструктивных оперативных вмешательств, а также при имплантации графта в экстра-анатомическую позицию. При проведении многофакторного регрессионного

анализа, возраст пациента на момент операции и тип кондуита были достоверными факторами риска повторных оперативных вмешательств на графте. Возраст пациента значимо влияет на долговечность графта, при этом более молодые пациенты находятся в группе риска ранней дисфункции кондуита [Mery и др., 2016; Meyns и др., 2005; Romeo и др., 2019]. Исследования показывают, что небольшие графты ($d \leq 16$ мм) имеют ограниченную долговечность и требуют частой замены, особенно у младенцев и детей раннего возраста [Qian и др., 2021; Tweddell и др., 2000]. Для гомографтов диаметром менее 12 мм замена кондуита требуется в течении первых 3 лет, а свобода от реоперации на нем составляет всего 10–30% через 5 лет [Qian и др., 2021; Tweddell и др., 2000]. С другой стороны, имплантация кондуитов несоответственно большого размера (Z-score кондуита >2) увеличивала риск ранних реинтервенций в периоде наблюдения. Кондуиты избыточного размера характеризуются большим «мертвым объемом», что существенно ухудшает гемодинамику и может привести к динамической обструкции главных ветвей ЛА за счет пульсации графта [Hazekamp и др., 2021]. Избыточно большие кондуиты также связаны с более высокой частотой перегиба протеза и его компрессии грудиной [Herrmann и др., 2020; Kadeetham, Samankatiwat, 2023]. Кроме того, необходимость имплантации кондуита в экстра-анатомическую позицию при большинстве ВПС отрицательно сказывается на долговечности протеза за счет формирования турбулентного потока и большой потери энергии [Huayan, Chang, Song, 2021; Marathe и др., 2019]. В тоже время ортотопическая позиция графта обеспечивает более длительную свободу от повторных операций за счет сохранения ламинарного потока крови [Patel и др., 2020; Romeo и др., 2019].

Межгрупповой анализ показал, что наибольшая свобода от реинтервенций на кондуите была характерна для ЛА-гомографтов. При сравнении групп с поправкой на кофакторы (пол, возраст и вес на момент имплантации, диагноз, СТАТ-категория оперативного вмешательства, анатомическая/экстра-анатомическая позиция кондуита, его размер и Z-score, первичная имплантация/замена графта), ГА-ЯВ и ДЭ-ПК показали сопоставимые результаты с ЛА-гомографтами. Конduit Contegra, изготовленный из ГА-обработанного клапаносодержащего фрагмента яремной вены

быка, широко применяется в мировой кардиохирургической практике для коррекции ВПС и считается достойной альтернативной гомографтам [Harris и др., 2023; Hazekamp и др., 2021; Herrmann и др., 2020]. Многие клинические исследования были направлены на сравнительную оценку эффективности этих кондуитов при использовании как у детей, так и у взрослых пациентов, однако описанные результаты противоречивы. Ряд работ указывает на преимущества гомографтов [Beckerman и др., 2018; Bobylev и др., 2024; Naas и др., 2018], в то время как другие авторы продемонстрировали сопоставимые с ними результаты имплантации ксенокондуита Contegra [Boshnakov и др., 2023; Christenson и др., 2010; Falchetti и др., 2019; Poinot и др., 2018]. А для протезов малого диаметра Contegra была ассоциирована с меньшим риском повторного вмешательства на кондуите по сравнению с ЛА-гомографтами [Herrmann и др., 2020; Mery и др., 2016; Sandica и др., 2015], в связи с чем ряд авторов рекомендует этот ксенографт для реконструкции ВОПЖ при ВПС [Buckley и др., 2019; Hazekamp и др., 2021]. В данном исследовании, свобода от реинтервенций была значительно ниже в группе ГА-ЯВ по сравнению с ЛА-гомографтами ($p < 0,001$). Однако при введении в регрессионную модель кофакторов, нивелирующих различия между группами по основным базовым характеристикам, не было получено достоверной разницы по риску повторного оперативного вмешательства между ГА-ЯВ и референтной группой.

Одной из отличительных черт данной работы, обуславливающих новизну исследования, является оценка работоспособности ДЭ-обработанных кондуитов в педиатрической популяции. Проведенный анализ выявил, что ДЭ-обработанные ксеноперикардальные кондуиты имеют сопоставимые риски дисфункции по сравнению с ЛА-гомографтами. Анализ результатов операции Росса для взрослой популяции продемонстрировал схожие данные [Karaskov и др., 2016b], что свидетельствует о перспективности этой группы кондуитов для протезирования ВОПЖ. В тоже время, группа ДЭ-АоК продемонстрировала самую низкую величину свободы от дисфункции в периоде наблюдения среди всех анализируемых кондуитов и имела риск повторного оперативного вмешательства в 2,5 раза выше по сравнению с ЛА-гомографтами.

В исследуемой педиатрической когорте для группы ГА-ПК также была свойственна неудовлетворительная свобода от реинтервенций на графте, риск повторного оперативного вмешательства на кондуите был в 2 раза выше, чем в референтной группе. Схожие результаты были описаны для данных типов кондуитов и во взрослой популяции [Караськов и др., 2013; Karaskov и др., 2016a].

Спектр используемых нами кондуитов (Рисунок 3.2) в течение последних лет сместился в сторону применения ГА-ЯВ и ЛА-гомографтов [Ничай и др., 2024; Nichay и др., 2018]. Вплоть до 2009 года для протезирования ВОПЖ у детей в Центре преимущественно использовались ДЭ-обработанные ксеноперикардальные кондуиты, содержащие свиной аортальный корень (ДЭ-АоК), а также клапаносодержащие графты, изготовленные из ГА- и ДЭ-обработанного бычьего перикарда. Начиная с 2009 года основным материалом для протезирования пути оттока из ПЖ стали ГА-ЯВ и ЛА-гомографт [Кулябин и др., 2025]. При этом ГА-ЯВ кондуиты нами применяются преимущественно у пациентов раннего и дошкольного возраста, в то время как, легочные гомографты мы имплантируем более старшим детям (Таблица 3.1). Это связано прежде всего с особенностями размерного ряда указанных протезов: отсутствие на российском рынке ГА-ЯВ большого диаметра и малых размеров легочных гомографтов.

Наиболее частой причиной повторного вмешательства на кондуите был его стеноз (84,2%), что соотносится с ранее опубликованными результатами, где обструкцию легочного кондуита наблюдали в 67-95% случаев [Alfieris и др., 2016; Dave и др., 2011; Junnil и др., 2021; Mery и др., 2016; Ong и др., 2013]. Soor G.S. с соавторами [Soor и др., 2009] описали наличие стеноза у 100% эксплантированных ксенографтов. Мы также продемонстрировали, что стеноз проксимального участка кондуита в большинстве случаев был обусловлен кальцификацией створок и стенок графта, в то время как изолированный дистальный стеноз кондуита был ассоциирован с неоинтимальной пролиферацией в этом отделе.

Несмотря на то, что распределение причин дисфункции было различным для исследуемых типов кондуитов ($p < 0,001$), кальцификация створок и стенки графтов встречалась во всех группах и явилась ведущим патологическим механизмом

нарушения функции протеза (67,0%). Однако частота минерализации и локализация кальциевых конгломератов варьировала среди исследуемых графтов. Группа ДЭ-АоК показала самый высокий уровень минерализации структур графта, очаги отложения солей кальция в тканях ксенокондуита выявлены в 91,7% случаев при повторном оперативном вмешательстве. Напротив, в группе ГА-ЯВ кальцификация структур кондуита диагностирована у 60% ксенографтов, подвергшихся реинтервенциям.

В большинстве случаев мы наблюдали диффузную кальцификацию как стенок, так и створок кондуита, что соотносится с данными, описанными другими авторами [Ong и др., 2013; Soor и др., 2009]. Однако вовлечение в патологический процесс структур кондуита различалось в исследуемых группах. В группе ДЭ-АоК был преимущественно кальцинирован весь свиной аортальный корень, в то время как для групп ГА-ПК, ДЭ-ПК и ЛА-гомографтов минерализация створок с последующим распространением патологического процесса на стенки кондуита была наиболее типичной. В группе ГА-ЯВ изолированное поражение солями кальция створчатого аппарата было диагностировано только в 8 случаях. Согласно данным литературы, изолированная патологическая кальцификация створок является относительно редкой для ксенографтов, изготовленных из яремной вены быка [Holmes и др., 2012].

Некоторые авторы ранее сообщали о высокой частоте повторных вмешательств и кальцификации у ГА-обработанных свиных аортальных клапаносодержащих кондуитов [Flameng и др., 2011; Lee и др., 2011; Soor и др., 2009]. Наши результаты показали, что, несмотря на смену консервирующего агента на диэпоксид, кондуиты, содержащие свиной аортальный корень, также демонстрируют неудовлетворительные результаты за счет высокой частоты кальцификации. Так для ДЭ-АоК риск повторного оперативного вмешательства из-за минерализации структур графта был почти в 4,5 раза выше по сравнению с референтной группой. Аналогичные результаты продемонстрированы и при протезировании пути оттока в ЛА с использованием ДЭ-обработанных кондуитов, содержащий свиной аортальный корень, во взрослой когорте пациентов [Karaskov и др., 2016a; Karaskov и др., 2016b]. Высокая скорость кальцификации данного типа графта обусловлена структурными особенностями аортальной стенки [Christian и др., 2015; Rapoport и др., 2007].

Большое количество эластиновых волокон и остаточных гладкомышечных клеток способствует высокой скорости отложения солей кальция в ткани [Bailey и др., 2003; Tod, Dove, 2016]. Учитывая особенности иммунной системы [Simon, Hollander, McMichael, 2015] и метаболических процессов у детей, способствующих более ранней кальцификации ткани трансплантата [Homann и др., 2000; Lee и др., 2011; Soor и др., 2009; Vásquez-Alvarez и др., 2021], использование в педиатрической группе кондуитов, содержащих ксеногенный аортальный корень, нежелательно.

Первые реинтервенции на ксенографте по причине его минерализации в группах ГА-ЯВ, ГА-ПК и ДЭ-АоК были выполнены уже через 1-2,5 года после имплантации, тогда как в группе ДЭ-ПК – через 4 года. Данное обстоятельство указывает на то, что использование ДЭ-обработанных ксеноперикардальных кондуитов может быть потенциально перспективным для протезирования ЛА у детей. Однако остается необходимым дальнейшее развитие дополнительных методов антикальциевой обработки для этого типа ксенографтов.

Другой наиболее частой причиной дисфункции кондуитов в представленном исследовании была неоинтимальная гиперплазия, которая приводила к формированию дистального стеноза графта ($p < 0,001$). Данный механизм дисфункции был характерен преимущественно для групп ксенографтов, обработанных ГА. Проведенный регрессионный анализ с поправкой на кофакторы подтвердил достоверно высокий риск развития неоинтимальной пролиферации, требующей проведения повторных оперативных вмешательств, в группе ГА-ПК по сравнению с ЛА-гомографтами. В группе ГА-ЯВ риск реинтервенций по причине неоинтимальной гиперплазии был достоверно выше по сравнению с референтной группой в однофакторной модели. При включении в регрессионную модель кофакторов для нивелирования межгрупповых различий по основным базовым характеристикам, риск развития неоинтимальной гиперплазии, приводящей к дисфункции кондуита, не отличался между ГА-ЯВ и ЛА-гомографтами. Согласно ряду исследований, выраженная неоинтимальная пролиферация является типичным осложнением для кондуитов, изготовленных из бычьей яремной вены [Журавлева и др., 2016b; Dave и др., 2011; Göber и др., 2005; Meyns и др., 2004; Schoenhoff и др., 2011]. Вероятно,

значимое разрастание неоинтимы обусловлено цитотоксическим эффектом ГА [Boudjemline и др., 2003; Eybl и др., 1989; Schoenhoff и др., 2011; Tod, Dove, 2016], который высвобождается из ткани кондуита в месте его разрезов при моделировании анастомозов [Harris и др., 2023; Meyns и др., 2004]. Другой причиной данного эффекта может служить асептическое воспаление тканей, развивающееся под воздействием ГА [Boudjemline и др., 2003; Göber и др., 2005; Schoenhoff и др., 2011; Umashankar, Kumari, Mohanan, 2012]. Согласно ранее опубликованным исследованиям, эпоксидные соединения характеризуются меньшим цитотоксическим воздействием на ткани, большей гидрофильностью и вызывают менее выраженный воспалительный процесс [Imamura и др., 1989; Nishi, Nakajima, Ikada, 1995; Sung и др., 1993], что соотносится с полученными результатами. В группе ДЭ-АоК выявлены единичные случаи разрастания неоинтимального шельфа, приводящего к дисфункции кондуита, в то время как в ДЭ-ПК группе гиперплазия неоинтимы не послужила причиной реинтервенций ни в одном случае.

Одной из причин дисфункции, свойственной группам ГА-ЯВ и ЛА-гомографт, была дилатация кондуита на уровне клапана с развитием гемодинамически значимой недостаточности, что потребовало выполнения повторных оперативных вмешательств. Для ГА-ЯВ данный патологический механизм несостоятельности графта может быть связан как с особенностями строения венозной стенки [Gist и др., 2012; Meyns и др., 2004], так и с конструктивными отличиями этого типа кондуита. Под действием давления, нагнетаемого ПЖ, венозная стенка перерастягивается [Dave и др., 2011; Gist и др., 2012], что может приводить к дилатации графта и некомпетентности его клапана. Консервированный ксеноперикард и аортальная стенка гораздо прочнее и в меньшей степени подвержены таким изменениям. Более того, кондуиты, изготовленные из аортального корня, имеют собственный фиброзный каркас, который не позволяет клапану дилатироваться [Lancellotti и др., 2022; Saremi и др., 2017]. Несмотря на то, что аортальный и легочный корни имеют схожую структуру [Anderson и др., 2024; Stradins, 2004], клапан легочной артерии имеет меньшую фиброзную поддержку [Lis и др., 2023; Saremi и др., 2017]. Это приводит к пассивному расширению легочного корня и уменьшению эффективной высоты

створок во время сердечного цикла, провоцируя легочную регургитацию [Jelenc и др., 2024]. Каркас же ксеноперикардальных кондуитов формируется за счет линии швов, фиксирующих створки и образующих комиссуры ксенографта.

В нашем исследовании, общим осложнением для всех графтов был кондуит-ассоциированный эндокардит. Дети, перенесшие имплантацию клапаносодержащих кондуитов, относятся к группе высокого риска развития данного осложнения [Delgado и др., 2023; Eleuan и др., 2021]. В настоящее время частота встречаемости эндокардита легочного клапана увеличивается, в связи с растущей популяцией пациентов, перенесших реконструктивные вмешательства на ВОПЖ [McElhinney и др., 2018; Van Dijk и др., 2015].

Описанная частота выявления инфекционного эндокардита легочных кондуитов колеблется от 2% до 21% в различных когортах [Albanesi и др., 2014; Armstrong и др., 2019; Cheatham и др., 2015; Lueth и др., 2019; Meyns и др., 2004; Patel и др., 2018; Robichaud и др., 2018; Stammnitz и др., 2022]. В исследуемой группе протезный инфекционный эндокардит был диагностирован в 5,6% случаев в интервале от 2 дней до 14 лет после имплантации. Общая свобода от развития эндокардита легочного кондуита в исследуемой когорте составила 93,69% и 91,71% в течение 5- и 10-летнего периодов наблюдения. Однофакторный анализ предикторов показал статистически достоверное влияние более старшего возраста, веса на момент имплантации и большего размера кондуита на риск развития протезного эндокардита. Однако эти факторы не продемонстрировали связи с риском инфекционного эндокардита в многофакторной модели. Наши данные соотносятся с ранее полученными результатами, описывающими более высокую частоту эндокардита у детей старшей возрастной группы [Patel и др., 2018; Ugaki и др., 2015]. Данная закономерность связана с большей свободой от репротезирования ЛА для старших детей и, следовательно, большим периодом эксплуатации протеза.

Были выдвинуты различные предположения относительно роли тех или иных патофизиологических механизмов, предрасполагающих к развитию инфекционного эндокардита легочных кондуитов. Однако эти процессы остаются до конца не изученными [Li и др., 2022]. К факторам риска развития инфекционного процесса

относят тип биоматериала, из которого изготовлен кондуит. Многие авторы выразили обеспокоенность высокой частотой развития инфекционного эндокардита у кондуитов, изготовленных из яремной вены быка (Contegra, Melody) [Beckerman и др., 2018; Gröning и др., 2019; Hascoet и др., 2017; Malekzadeh-Milani и др., 2014; Mery и др., 2016; Stammnitz и др., 2022; Ugaki и др., 2015]. В этой группе легочных протезов частота развития эндокардита достигает 9-21% [Albanesi и др., 2014; Armstrong и др., 2019; Ugaki и др., 2015] и существенно превышает данный показатель для гомографтов и других ксенокондуитов [Gröning и др., 2019; Mery и др., 2016; Sandica и др., 2015; Sharma и др., 2017]. Согласно результатам, описанным Mery С.М. и соавторами, кондуит из бычьей яремной вены связан с 9-кратным увеличением риска позднего эндокардита по сравнению с другими графтами, предназначенными для реконструкции ВОПЖ [Mery и др., 2016]. Gröning М. с коллегами сообщили, что по сравнению с гомографтами риск инфекционного эндокардита в группе Contegra был в 3 раза выше, в то время как для группы Melody – более чем в 11 раз [Gröning и др., 2019]. Согласно анализу данных Национального регистра врожденных пороков сердца Германии, включившему 1598 пациентов с протезированным легочным клапаном, риск протезного эндокардита был в 6,72 раза выше в группе Contegra и в 5,49 раз в группе Melody по сравнению с гомографтами, но достоверно не отличался между группами Contegra/Melody [Stammnitz и др., 2022]. В представленном исследовании тип кондуита не был ассоциирован с риском развития инфекционного эндокардита ни при однофакторном анализе, ни в многофакторной модели. Изучая склонность различных биоматериалов к инфицированию, Jalal Z. с коллегами продемонстрировали в эксперименте *in-vitro*, что внутренняя поверхность яремной вены быка была более восприимчива к бактериальной адгезии *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus sanguinis* по сравнению с бычьим и свиным перикардом [Jalal и др., 2015]. Однако данный эксперимент проводился в статичных условиях. В другом исследовании, направленном на оценку адгезии бактерий на биоматериале, авторы сравнили результаты как в статичной, так и в потоковой среде [Veloso и др., 2018]. В целом, одинаковое количество бактерий было обнаружено на поверхности исследуемых тканей (гомографт, бычий перикард и яремная вена быка) для всех

штаммов, особенно в условиях потока. Различия между указанными исследованиями, вероятно, объясняются использованием нативных диких штаммов микроорганизмов в исследовании Veloso T.R. с соавторами [Veloso и др., 2018] по сравнению с патогенными штаммами, выделенными от пациентов, в работе Jalal Z. с коллегами. Так же было отмечено, что шероховатая поверхность ткани и ее повреждение усиливают бактериальную адгезию [Hou и др., 2011; Jalal и др., 2015]. Более того, в своем следующем исследовании Veloso T.R. с коллегами показали, что ткань бычьей яремной вены продемонстрировала большую абсорбцию фибриногена, чем ткань криоконсервированного аллографта [Veloso и др., 2018]. Известно, что фибриноген совместно с фибронектином играют ключевую роль в адгезии эндокардит-ассоциированных патогенов к травмированному эндотелию или имплантированным медицинским устройствам [Crago и др., 2023; Liesenborghs, Verhamme, Vanassche, 2018]. Учитывая вышесказанное, становится очевидным влияние совокупности таких факторов как тип биоматериала, бактериальный штамм, а также циркулирующие факторы свертывания крови на риск реализации инфекционного эндокардита [Mery, 2018].

Не менее важными компонентами, способствующими развитию протезного эндокардита, являются механические и гидродинамические факторы. Было отмечено, что инфекционный эндокардит обычно развивается на приточной поверхности клапанов сердца в местах высокого пульсирующего напряжения сдвига, соседних с областями низкого потока [Butcher, Mahler, Hockaday, 2011]. Многие авторы указывают на роль турбулентных потоков в развитии инфекционного процесса на клапане [Beckerman и др., 2018; Malekzadeh-Milani и др., 2014; Mery, 2018]. Отмечен особенно высокий риск развития эндокардита у пациентов с патологией конотрункуса, где для реконструкции ВОПЖ клапаносодержащий кондуит имплантируется в экстра-анатомическую позицию [Lu и др., 2021; Snygg-Martin и др., 2021]. Для кондуитов, имеющих послеоперационные гемодинамические проблемы, риск инфекционного эндокардита остается высоким как в ближайшем послеоперационном периоде (первые 2 недели после имплантации), так и в периоде наблюдения [Morris, 1998]. В своем исследовании мы не получили статистически

значимой связи диагноза, экстра-анатомической позиции кондуита и СТАТ-категории процедуры с риском протезного эндокардита ни в однофакторной, ни в многофакторной моделях.

Высокоскоростные турбулентные потоки, формирующиеся вследствие стеноза или недостаточности клапана, а также сама процедура имплантации кондуита приводят к повреждению эндотелия. Скомпрометированный эндотелиальный слой и оголенная неэндотелизированная поверхность графта являются первоначальными местами колонизации патогенов [Baltimore и др., 2015]. Фибронектин и фибриноген покрывают неэндотелизированную поверхность протеза или участки поврежденного эндотелиального слоя, что приводит к формированию «небактериального тромботического эндокардита», который служит очагом последующей бактериальной или грибковой колонизации [Baltimore и др., 2015; Galar и др., 2019]. Патогенные микроорганизмы внедряются в фибрино-тромбоцитарный матрикс и, изолированные от иммунной системы, могут беспрепятственно расти, образуя постоянно растущий инфицированный тромб [Massel, Little, 2013; Werdan и др., 2014]. Следовательно, кондуиты, имеющие условия для более быстрой эндотелизации люминальной поверхности, будут характеризоваться меньшим риском развития инфекционного эндокардита в послеоперационном периоде. Одним из путей решения данной проблемы может быть снижение цитотоксического воздействия консервирующих агентов кондуитов на эндотелиальные клетки. Наиболее часто используемым консервантом для ксенографтов является ГА, который даже после стандартизированной процедуры промывания, высвобождается из тканей протеза, значительно ингибирует рост и метаболизм эндотелиальных клеток [Бондаренко и др., 2021; Grimm и др., 1991; Lopez-Moya и др., 2018]. Смена метода обработки биоматериала на менее цитотоксичные консерванты будет способствовать лучшей эндотелизации кондуита и, соответственно, снижать риск инфекционного эндокардита.

Период функционирования кондуита также был предложен в качестве фактора, предрасполагающего к развитию протезного эндокардита, при этом рост вероятности данного осложнения ассоциирован с увеличением временного промежутка [Meru и

др., 2016; Sharma и др., 2017; Ugaki и др., 2015]. В нашей исследуемой когорте было зарегистрировано 18 (64,3%) случаев инфекционного эндокардита легочного графта в периоде наблюдения – от 3,5 мес. до 14 лет после имплантации (Me 28 мес.; IQR 11-73 мес.). Среди них 9 пациентам (32,1%) успешно проведено медикаментозное лечение протезного эндокардита. Эти данные подтверждают, выводы, сделанные другими авторами, о том, что эндокардит легочного кондуита можно лечить медикаментозно, без необходимости немедленного вмешательства [Cheatham и др., 2015; Lueth и др., 2019; Patel и др., 2018]. Mery C.M. с соавторами описали успешное медикаментозное лечение графт-ассоциированного эндокардита в 30% случаев [Mery и др., 2016]. Ugaki S. и коллегами [Ugaki и др., 2015] сообщили о 38% пациентов с эндокардитом кондуитов, изготовленных из бычьей яремной вены, которым проводилось лечение без хирургической замены инфицированного графта.

В нашей когорте в периоде наблюдения по причине инфекционного эндокардита погибло 6 пациентов в интервале от 5 мес. до 14 лет после имплантации графта. Во всех случаях имели место несвоевременное обращение пациента за помощью и поздняя диагностика протезного эндокардита. Почти для 50% пациентов с инфекционным эндокардитом легочного кондуита характерно вялотекущее клиническое течение с проявлением неспецифических симптомов на протяжении нескольких месяцев до постановки диагноза [Mery и др., 2016], таких как субфебрильная лихорадка, недомогание, вялость, потливость, потеря веса, артралгии, миалгии и другие [Baltimore и др., 2015; Beckerman и др., 2018; Fowler и др., 2023]. Именно поэтому необходима настороженность специалистов, наблюдающих пациентов с протезированным ВОПЖ, на предмет возможного инфекционного эндокардита. Соблюдение мер профилактики и обучение пациентов и их родителей имеют особое значение в этой группе населения для ограничения риска протезного эндокардита [Демин и др., 2022; Delgado и др., 2023]. Фокус профилактических мероприятий на сегодняшний день сместился в сторону правильной гигиены полости рта, своевременной санации очагов инфекции, исключение процедур, связанных с нарушением целостности кожных покровов, таких как пирсинг или татуировки [Baltimore и др., 2015; Delgado и др., 2023; Vicent, Luna, Martínez-Sellés, 2022].

3.4 Ограничения исследования

Данная часть исследовательской работы имеет ряд ограничений, прежде всего связанных с ее ретроспективным дизайном, не смотря на использование проспективно поддерживаемой базы данных исследуемой когорты. В исследование включены гетерогенные группы с неодинаковым числом пациентов и исходными характеристиками, однако для нивелирования различий между группами в многофакторную регрессионную модель были введены такие кофакторы как пол, возраст и вес на момент имплантации кондуита, диагноз, STAT-категория оперативного вмешательства, первичная имплантация/замена, анатомическая/экстра-анатомическая позиция, размер графта и Z-score кондуита. Также данное исследование является одноцентровым, что в свою очередь несет под собой определенные ограничения репрезентативности выборки, не смотря на большой опыт ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России в данной области и широкий охват территории оказания кардиохирургической помощи.

3.5 Резюме

Проведенный анализ протезирования пути оттока из ПЖ в ЛА продемонстрировал удовлетворительные результаты данной процедуры при коррекции различных ВПС в педиатрической группе пациентов. Пяти и 10-летняя свобода от развития конduit-ассоциированного летального исхода составила 87,66% и 84,18% для всей исследуемой когорты. Тип имплантированного графта достоверно не влиял на величину свободы от конduit-обусловленной летальности ($p=0,072$). В общей сложности в 9,6% случаев были выявлены конduit-ассоциированные осложнения как в раннем, так и в отдаленном периодах наблюдения. Частота встречаемости и структура осложнений также не зависела от типа имплантированного графта ($p=0,853$).

За исследуемых период больше половины всех имплантированных кондуитов подверглись реинтервенциям по причине их дисфункции (53,5%). Общая свобода от повторного оперативного вмешательства на графте составила 79,55% и 43,36% через 5 и 10 лет после имплантации. При проведении многофакторного регрессионного анализа, возраст пациента на момент операции и тип кондуита были достоверными факторами риска повторных оперативных вмешательств на графте. Межгрупповой анализ показал, что наибольшая свобода от реинтервенций на кондуите была характерна для группы ЛА-гомографтов. При сравнении групп с поправкой на кофакторы (пол, возраст и вес на момент имплантации, диагноз, СТАТ-категория оперативного вмешательства, анатомическая/экстра-анатомическая позиция кондуита, его размер и Z-score, первичная имплантация/замена графта), ГА-ЯВ и ДЭ-ПК показали сопоставимые результаты с ЛА-гомографтами. В тоже время ГА-ПК и ДЭ-АоК продемонстрировали достоверно более высокий риск реинтервенций в периоде наблюдения. Группа ДЭ-АоК характеризовалась самой низкой величиной свободы от дисфункции кондуита, потребовавшей проведения повторного хирургического вмешательства. Для ДЭ-АоК риск реинтервенций был более чем в 2,5 раза выше по сравнению с ЛА-гомографтами. В группе ГА-ПК риск повторного оперативного вмешательства на кондуите был в 2 раза выше, чем в референтной группе.

Наиболее распространенной причиной повторного вмешательства был стеноз графта (84,2%). Несмотря на то, что распределение причин дисфункции было различным для исследуемых типов кондуитов ($p < 0,001$), кальцификация стенки и створок графтов встречалась во всех группах и явилась ведущим патологическим механизмом нарушения функции протеза (67,0%). Группа ДЭ-АоК показала самый высокий уровень минерализации структур графта. При анализе влияния типа кондуита с поправкой на кофакторы, риск кальцификации ДЭ-АоК, потребовавшей реинтервенций, был почти в 4,5 раза выше по сравнению с ЛА-гомографтами. В этой группе в большинстве случаев в патологический процесс были вовлечены как стенка, так и створки свиного аортального корня (75,8%). Для ГА-ПК риск повторного оперативного вмешательства из-за минерализации протеза

был на 95% выше по сравнению с референтной группой, при этом основной патологический процесс локализовался на уровне клапана кондуита, откуда распространялся на стенки графта. С учетом кофакторов, группы ГА-ЯВ и ДЭ-ПК показали схожие результаты с группой ЛА-гомографтов по величине риска минерализации структур кондуита. Однако для ГА-ЯВ была более характерна изолированная кальцификация стенки кондуита, в то время как в группах ДЭ-ПК и ЛА-гомографт патологический процесс локализовался на уровне створок протеза, откуда распространялся на стенки графта в 50% случаев.

Неоинтимальная пролиферация была свойственна преимущественно ГА-обработанным ксенокондуитам ($p < 0,001$) и приводила к формированию дистального стеноза графта ($p < 0,001$). Риск дисфункции протеза из-за гиперплазии неоинтимы для ГА-ПК был в 11 раз выше по сравнению с референтной группой. Несмотря на более низкие показатели свободы от дисфункции ГА-ЯВ, обусловленной неоинтимальной гиперплазией, по сравнению с ЛА-гомографтами, риск развития данного осложнения для этого типа кондуита с учетом поправки на кофакторы достоверно не отличался от референтной группы.

Инфекционный эндокардит легочного кондуита выявлен в 5,6% случаев, был свойственен для всех типов исследуемых графтов и характеризовался высокой летальностью (25,0%). Межгрупповая оценка свободы от протезного инфекционного эндокардита не выявила различий среди анализируемых клапаносодержащих кондуитов ($p = 0,71$).

Таким образом, проведённый анализ убедительно демонстрирует, что основной причиной дисфункции различных типов кондуитов в педиатрической популяции является кальцификация структур протеза. Ксенографты, фиксированные глутаровым альдегидом, характеризуются повышенной склонностью к кальцификации, а также развитием неоинтимальной гиперплазии, приводящей к дистальному стенозу графта. Неудовлетворительная свобода от структурной дегенерации ГА-обработанных ксенографтов обосновывает необходимость пересмотра стратегии консервации биоматериала путем замены основного сшивающего агента. Ксеноперикардальные кондуиты, обработанные

диэпоксидом, продемонстрировали клинические результаты, сопоставимые с ЛА-гомографтами, что свидетельствует о перспективности данного подхода для повышения долговечности протезов в педиатрической группе. Кондуиты на основе свиного аортального корня показали неудовлетворительные результаты при использовании в легочной позиции у детей и не могут быть рекомендованы для реконструкции ВОПЖ у данной группы пациентов.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ *in vitro* ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОНСЕРВАНТОВ С БИОМАТЕРИАЛОМ

Задачами данного раздела диссертационной работы являлись исследование молекулярных механизмов консервации биоматериалов, а также оценка взаимодействия бисфосфонатов (Бф) с сшивающими агентами и тканями, фиксированными различными методами.

Качественные и количественные характеристики поперечной сшивки, которые влияют на биологические, механические и функциональные свойства биопротезов [Hendriks, Everaerts, Verhoeven, 2001; Soda и др., 2009; Sung, Hsu, Hsu, 1997], в значительной мере зависят от химической структуры сшивающего агента и механизма его взаимодействия с биоматериалом. Эпоксидные соединения отличаются высокой реакционной способностью по отношению к нуклеофильным реагентам [Chanda, Fokin, 2009; Saddique и др., 2016]. Азот в Бф способен нуклеофильно присоединяться к свободным альдегидным и эпоксидным группам, которые остаются в биоматериале после сшивания. Это позволяет ковалентно фиксировать Бф на биоматериалах. Предполагается, что реакционная активность азота в первичных, вторичных и третичных аминогруппах к консервирующим агентам отличается. Кроме того, мы выдвинули гипотезу, что способность Бф к иммобилизации зависит не только от их молекулярной структуры, но и от белкового состава биоматериала, а также от структуры самого консерванта, применяемого при предварительной обработке ткани.

В данной главе представлены результаты анализа изменений аминокислотного состава ксеноматериалов под воздействием сшивающего агента, оценки взаимодействия консервантов с Бф, изучения молекулярных механизмов их взаимодействия с фиксированными тканями, а также количественного определения содержания иммобилизованных Бф в обработанных образцах.

4.1 Материалы и методы

Данная часть исследования представляет собой эксперимент *in vitro*, проведённый без использования живых животных или человека, что исключает необходимость оформления этического/биоэтического разрешения, связанного с применением биологических моделей. Представленный раздел полностью соответствует современным стандартам и требованиям по проведению научных исследований с использованием биоматериалов и химических веществ.

4.1.1 Дизайн исследования

В данную часть работы были включены образцы следующих биоматериалов:

- *лоскут бычьего перикарда* (ПК-лоскут),
- *стенка свиной аорты* (Ао-корень),
- *стенка яремной вены быка* (ЯВ-стенка).

Были изучены как нативные образцы, так и ткани, консервированные глутаровым альдегидом (ГА) или диглицидиловым эфиром этиленгликоля (диэпоксидом, ДЭ). Также был выполнен количественный анализ Бф, иммобилизованных на предварительно фиксированные ПК-лоскут, Ао-корень и ЯВ-стенку.

В исследование включены представители различных типов бисфосфоновых кислот (Рисунок 4.1) [Zhuravleva и др., 2020]:

→ *Бф типа 1* имеют гидроксильную группу R1 и первичную аминогруппу в структуре R2, но различаются по длине цепи R2: памидроновая кислота (памидронат, Пам), алендроновая кислота (Ален), неридоновая кислота (Нер);

→ *Бф типа 2* не имеют –ОН в качестве R1, а их R2 содержит вторичную аминогруппу и имеет разную длину цепи: 2-(2-карбоксиэтиламино)этилиден-1,1-бисфосфоновая кислота [2-(2 -carboxyethylamino)ethylidene-1,1-bisphosphonic acid];

СЕАВА] и 2-(5-карбоксипентиламино)этилиден-1,1-бисфосфоновая кислота [2-(5-carboxypentylamino)ethylidene-1,1-bisphosphonic acid; СРАВА];

→ **Бф типа 3** характеризуется наличием гидроксильной группы в качестве R1, а цепь R2 содержит имидазол с двумя атомами азота: золедроновая кислота (Зол).

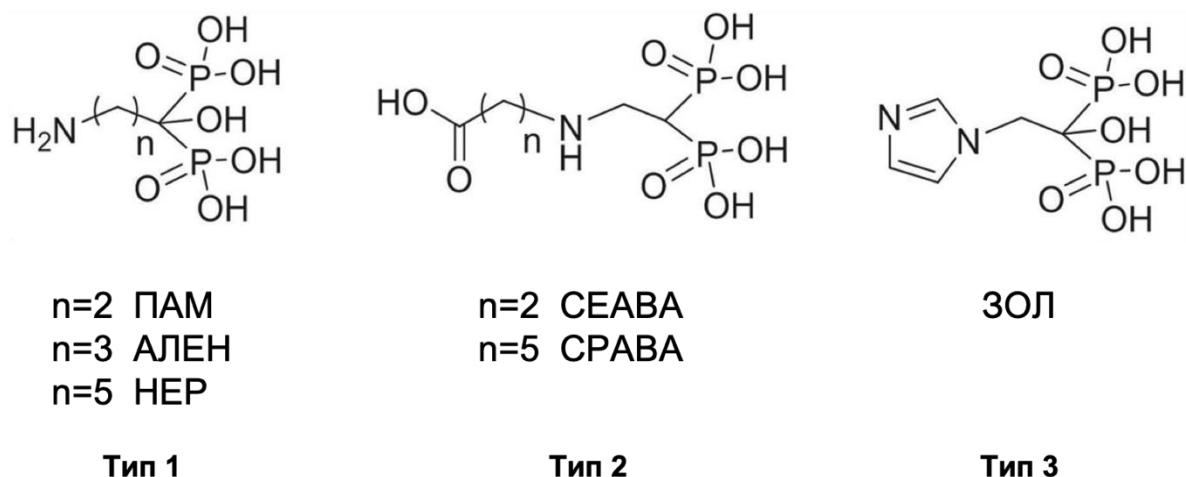


Рисунок 4.1 – Структура бисфосфоновых кислот. Алэн, алендроновая кислота (тип 1, n = 3); Зол, золедроновая кислота (тип 3); Нер, неридроновая кислота (тип 1, n = 5); Пам, памидроновая кислота (тип 1, n = 2); СЕАВА, 2-(2-карбоксиэтиламино)этилиден-1,1-бисфосфоновая кислота (тип 2, n = 2); СРАВА, 2-(5-карбоксипентиламино)этилиден-1,1-бисфосфоновая кислота (тип 2, n = 5)

Учитывая достаточную и всестороннюю изученность механизмов консервации ксеноперикарда с помощью ГА [Барбараш, 1995; Attia, Raja, 2021; Brasselet и др., 2005; Kong и др., 2021], мы не включили анализ данных образцов в работу, чтобы не перегружать ее дублирующимися данными.

Кроме того, предполагается, что молекулярные взаимодействия между сшивающими агентами, консервированными тканями и различными иммобилизованными Бф являются схожими внутри типовой группы соединений. Поэтому в данной части работы проверка взаимодействия Бф с консервантами и фиксированными биоматериалами была выполнена с использованием Пам, имеющей первичную аминогруппу, и СЕАВА, характеризующуюся наличием вторичной аминогруппы, в качестве представителей Бф типа 1 и типа 2.

Золедроновая кислота, как представитель 3 типа Бф, не была включена в данную часть работы, в связи с отсутствием эффективной антикальциевой протекции среди всех исследуемых Бф (см. Глава 5).

4.1.2 Подготовка биоматериалов

Для изготовления экспериментальных образцов в качестве основных консервантов использовали коммерческие растворы в соответствии с рекомендациями производителя: 97% ДЭ (Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, г. Новосибирск, Российская Федерация) и 25% ГА (каталожный номер 253857, Panreac Química SLU, Барселона, Испания). Бисфосфонаты были синтезированы в Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН согласно ранее описанным методикам для соединений Зол [Widler и др., 2002], Пам, Ален и Нер [Kieczykowski и др., 1995]. Такие Бф как СЕАВА и СРАВА получены по технологии, разработанной Алферьевым И.С. и Михалиным Н.В. [Alfer'ev, Mikhalin, 1992].

Свежие биоматериалы получали от здоровых животных непосредственно после убоя на местной скотобойне, тщательно очищали от окружающих тканей и неоднократно промывали в стерильном растворе 0,9% NaCl (Solopharm, Санкт-Петербург, Россия). Из каждого фрагмента отобранной ткани вырезали по 2 образца для аминокислотного анализа и инфракрасной спектроскопии. Оставшиеся фрагменты биоматериала консервировали в течение первых 6 часов после забора. Ткани обрабатывали с использованием следующих методов [Журавлева и др., 2017b, Zhuravleva и др., 2020; Zhuravleva и др., 2022]:

- (1) обработка 0,625% раствором ГА (0,1 М фосфатный буфер, pH 7,4, при комнатной температуре) в течение 21 суток, с заменой раствора на 2-й и 7-й дни;
- (2) обработка 5% раствором ДЭ (0,1М фосфатный буфер, pH 7,4, при комнатной температуре) в течение 14 суток, с заменой раствора на 3-й день.

Для иммобилизации бисфосфонатов консервированный биоматериал трижды промывали стерильным 0,9% раствором NaCl в течение 20 минут, затем обрабатывали 0,05 М водными растворами Бф в 0,1 М фосфатном буфере при pH 7,3 и температуре 37 °C в течение 8 часов, после чего проводили 4-часовую отмывку образцов [Zhuravleva и др., 2020]. Выбранный метод обработки основан на результатах исследований связывания Бф с биопротезным материалом [Zhuravleva и др., 2021b].

4.1.3 Аминокислотный анализ

Сформировано 8 групп образцов в зависимости от типа биоматериала (ПК-лоскут, Ао-корень, ЯВ-стенка) и способа его обработки (необработанный и консервированный одним из методов – ГА или ДЭ). Каждая группа включала 5 образцов для получения независимых проб.

Аминокислотный анализ ГА-обработанного ксеноперикарда в данной работе не проводился ввиду подробного описания механизмов его связывания в ранее опубликованных исследованиях; данные для сравнения были взяты из литературы [Барбараш, 1995; Attia, Raja, 2021; Brasselet и др., 2005; Kong и др., 2021].

Исследование выполняли по стандартной методике [Trofimova и др., 2016] с помощью аминокислотного анализатора L-8800 (Hitachi Ltd., Япония) в режиме, используемом для белковых гидролизатов, с катионо-обменным разделением и постколоночной нингидриновой дериватизацией. Для количественной оценки пиков, полученных после хроматографического разделения каждого экстракта, использовали программное обеспечение Multichrom 1.71a (ООО «Амперсанд», Россия). Результаты представлены как содержание каждой аминокислоты на 1000 свободных аминокислотных остатков [Журавлева и др., 2018; Zhuravleva и др., 2020; Zhuravleva и др., 2022].

4.1.4 Количественная оценка бисфосфоната в образцах

Содержание Бф (мкМ/г сухой ткани) рассчитывали по разнице между содержанием фосфора в модифицированных и немодифицированных биоматериалах:

$$[\text{Бф}] \text{ (мкМ/г сухой ткани)} = ([P]_m - [P]_n) / 62 \times 1000,$$

где $[P]_m$ и $[P]_n$ представляют содержание фосфора (мкг/мг) в модифицированных Бф и немодифицированных биоматериалах соответственно [Zhuravleva и др., 2020].

Содержание фосфора оценивали в неимплантированных тканях (n=155). Высушенные образцы, взвешивали и гидролизовали при 100 °С в 5 мл 14 М азотной кислоты, смешанной с 0,2 мл 17 М хлорной кислоты, а затем полностью высушивали в воздушной струе. Гидролизаты восстанавливали в 5 мл 10% азотной кислоты. Количественное определение фосфора проводилось с использованием атомно-эмиссионного спектрометра IRIS Advantage (Thermo Scientific «TJA Solution», Уолтем, Массачусетс, США) [Журавлева и др., 2017b; Zhuravleva и др., 2018].

4.1.5 In vitro исследование взаимодействия бисфосфоната и консерванта

Реакции Пам и СЕАВА с сшивающими агентами исследовали с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Был приготовлен раствор Бф (Пам и СЕАВА, 10 мг) в 0,1 М фосфатном буфере в D₂O (pH 7,4). Консервант (ГА или ДЭ, 25–30 мг) смешивали с 0,6 мл вышеуказанного раствора и инкубировали при 37 °С в течение 4 часов. Спектры ¹H ЯМР (400 МГц) регистрировали с помощью спектрометра Bruker AV-400 (Bruker Inc., Карлсруэ, Германия).

4.1.6 Инфракрасная спектроскопия

Была изучена двадцать одна группа биоматериалов: необработанные (свежие) ПК-лоскут, Ао-корень и ЯВ-стенка; ткани, консервированные ГА или ДЭ, и дополнительно модифицированные Пам или СЕАВА. Каждая группа включала 5 соответствующих образцов биоматериала.

Инфракрасные спектры (ИК-спектры) образцов регистрировали на Фурье-спектрометре Tensor 27 (Bruker Inc., Карлсруэ, Германия) [Zhuravleva и др., 2022]. Состав биоматериала был идентифицирован на основе спектров поглощения ($4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$), собранных в виде гранул KBr путем усреднения 64 сканирований с разрешением 4 см^{-1} . Один миллиграмм (1 мг) образца был диспергирован в 150 мг KBr, смесь помещали в 13-миллиметровую матрицу для гранул и спрессовывали. Спектры аттенуированного полного отражения (attenuated total reflection, ATR) были получены с использованием кристалла ZnSe (угол падения 45°). Каждый спектр является результатом 100 совместно добавленных интерферограмм в диапазоне $4000\text{--}860\text{ см}^{-1}$. Для создания фоновых спектров использовалась дистиллированная деионизированная вода. Полученные спектры обрабатывали с использованием программного обеспечения OPUS 6.0 (Bruker Inc., Карлсруэ, Германия): коррекцию базовой линии проводили методом Rubberband по 64 точкам, спектры нормализовали в режиме min – max по полосе 1655 см^{-1} (Амид I), исходя из предположения, что содержание амидных групп в белках одинаково до и после обработки. Вторые производные спектров рассчитывали по методу Савицкого–Голея при сглаживании по 13 точкам [Журавлева и др., 2018].

ИК-спектры растворов Бф регистрировали с использованием ATR-ячеек, заполненных $5 \times 10^{-2}\text{ М}$ растворами (pH 7,0; отрегулировано с помощью раствора гидроксида натрия).

4.1.7 Методы статистического анализа

Анализ данных выполняли с использованием R Statistical Software (v4.4.1; R Core Team, 2025) [R Core Team, 2025].

Непрерывные данные описаны как медиана (median, Me) и межквартильный интервал (interquartile range, IQR). Для сравнения 2 групп использовался критерий Манна–Уитни (Mann-Whitney U-test), для 3 или более групп – непараметрический дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса (Kruskal–Wallis non-parametric analysis). Для сравнения парных измерений применяли критерий Вилкоксона (Wilcoxon signed-rank test). Статистически значимым считали значение $p < 0,05$.

4.2 Результаты

Результаты проведенных анализов представлены в соответствующих подразделах главы.

4.2.1 Аминокислотный анализ

Были проанализированы изменения содержания 18 аминокислот в результате поперечной сшивки белков ПК-лоскута, ЯВ-стенки и Ао-корня: аланин (Ala), аргинин (Arg), аспарагиновая кислота (Asp), глутаминовая кислота (Glu), глицин (Gly), гистидин (His), изолейцин (Ile), лейцин (Leu), лизин (Lys), метионин (Met), гидроксилизин (OHLys), гидроксипролин (OHPro), фенилаланин (Phe), пролин (Pro), серин (Ser), треонин (Thr), тирозин (Tyr), валин (Val).

В необработанных образцах ПК-лоскута было выявлено высокое содержание Gly (около 30%), Lys, Pro и их гидроксильных производных (24-26%). Этот факт подтверждает, что коллаген преобладает в необработанном бычьем перикарде (Таблица 4.1).

Таблица 4.1 – Содержание аминокислот на 1000 аминокислотных остатков в нативном и ДЭ-фиксированном ксеноперикарде

Аминокислота	Нативные образцы	ДЭ-образцы	p
	Me (IQR)		
Ala	107,0 (105,7-113,9)	117,5 (117,2-117,7)	0,013
Arg*	48,2 (46,3-48,7)	33,4 (33,2-33,5)	<0,001
Asp	44,4 (44,1-44,9)	47,4 (47,0-47,5)	0,005
Glu	72,3 (71,4-73,2)	77,3 (74,8-77,6)	0,005
Gly	310,3 (303,8-315,7)	349,7 (349,2-349,8)	0,005
His *	6,6 (6,5-6,6)	0,3 (0,3-0,3)	<0,001
Ile	13,9 (13,6-14,5)	15,3 (15,2-15,3)	0,005
Leu	32,7 (32,0-33,8)	32,4 (31,8-32,8)	0,022
Lys *	24,8 (24,5-25,3)	0,3 (0,2-0,5)	<0,001
Met	4,7 (4,7-4,9)	5,0 (4,9-5,0)	0,005
OHLys *	9,3 (8,9-10,1)	0,8 (0,7-0,8)	<0,001
OHPro	117,9 (113,5-119,1)	116,6 (115,9-117,7)	0,799
Phe *	16,7 (16,3-17,4)	13,1 (13,0-13,2)	<0,001
Pro	110,7 (108,2-112,2)	116,8 (114,3-117,4)	0,005
Ser *	30,3 (29,0-30,4)	27,6 (27,4-27,7)	<0,001
Thr	18,2 (18,2-18,2)	18,4 (18,2-18,5)	0,036
Tyr *	6,9 (6,8-7,2)	0,5 (0,4-0,5)	<0,001
Val	25,6 (25,5-28,2)	27,6 (26,5-27,6)	0,169

Примечание: Ala, аланин; Arg, аргинин; Asp, аспарагиновая кислота; Glu, глутаминовая кислота; Gly, глицин; His, гистидин; Ile, изолейцин; IQR (interquartile range), межквартильный интервал; Leu, лейцин; Lys, лизин; Me (median), медиана; Met, метионин; OHLYs, гидроксизин; OHPro, гидроксипролин; Phe, фенилаланин; Pro, пролин; Ser, серин; Thr, треонин; Tyr, тирозин; Val, валин; ДЭ, диэпоксид (диглицидиловый эфир этиленгликоля); * – аминокислоты, содержание которых значимо убывало после консервации диэпоксидом.

В изучаемых ПК-образцах консервация биоматериала эпоксидным соединением изменяла содержание свободных Tyr, OHLYs, Lys и His в сравнении с нативными тканями. Данные аминокислоты активно реагировали с 5% раствором диэпоксида, что отражается в значимом снижении их уровня в ДЭ-

консервированных образцах ПК-лоскута. Кроме того, было выявлено достоверное снижение уровня Phe, Ser и Arg в ДЭ-фиксированном ксеноперикарде.

Состав аминокислот в необработанных эластин-содержащих биоматериалах отличался не только от ПК-лоскута, но и между собой. Различия в аминокислотном составе в Ао-корне и ЯВ-стенке отражают разницу в их белковом и клеточном наполнении. Стенка Ао-корня содержит гораздо меньше Gly, Pro и OHPro, которые являются основными аминокислотными структурами коллагена (Таблица 4.2).

Таблица 4.2 – Содержание аминокислот на 1000 аминокислотных остатков в нативных и фиксированных образцах Ао-корня

Аминокислота	Нативные образцы	ГА-образцы	p*	ДЭ-бразцы	p#
	Me (IQR)	Me (IQR)		Me (IQR)	
Glu	65,3 (63,8-66,5)	63,3 (59,7-68,3)	0,72	58,2 (56,9-59,4)	0,016
His	7,5 (7,4-7,9)	5,9 (5,0-6,6)	0,014	0,3 (0-0,3)	0,002
Lys	25,1 (24,8-25,3)	4,4 (4,2-5,6)	0,008	0,5 (0,5-0,6)	0,005
Met	6,6 (6,4-6,8)	6,1 (5,3-6,9)	0,44	1,9 (1,7-2,0)	0,014
OHLYs	3,7 (3,6-4,0)	2,1 (2,0-2,2)	0,018	0	0,009
Ser	28,4 (28,3-28,5)	27,0 (25,5-29,2)	0,76	25,0 (24,7-25,2)	0,025
Tyr	18,3 (18,0-18,8)	17,6 (17,3-18,4)	0,15	0,2 (0,1-0,5)	0,006

Примечание: Glu, глутаминовая кислота; His, гистидин; IQR (interquartile range), межквартильный интервал; Lys, лизин; Me (median), медиана; Met, метионин; OHLYs, гидроксизин; Ser, серин; Tyr, тирозин; ГА, глутаральдегид; ДЭ, диэпоксид (диглицидиловый эфир этиленгликоля). Сравнение содержания аминокислот между нативными и ГА-обработанными образцами – p*; между нативными и ДЭ-обработанными образцами – p#.

В то же время содержание маркеров эластина Ala и Val намного выше в Ао-корне, по сравнению с ЯВ-стенкой (Таблица 4.3). Как ДЭ, так и ГА реагировали с аминокислотами, имеющими боковые первичные аминогруппы (Lys и OHLYs) или имидазольное кольцо (His). Будучи более реактивным, чем ГА, диэпоксид также связывался со слабонуклеофильными боковыми группами Ser и Tyr (группы -OH) и Met (-S-CH₃). Кроме того, при ДЭ-обработке эластин-содержащих тканей отмечено снижение обнаруживаемого содержания Glu.

Вышеизложенные данные свидетельствуют о том, что диглицидиловый эфир этиленгликоля является сшивающим реагентом более широкого спектра действия

по сравнению с глутаровым альдегидом, поскольку он требует меньшей нуклеофильности боковых групп аминокислот.

Таблица 4.3 – Содержание аминокислот на 1000 аминокислотных остатков в нативных и фиксированных образцах ЯВ-стенки

Аминокислота	Нативные образцы	ГА-образцы	p*	ДЭ-образцы	p#
	Me (IQR)	Me (IQR)		Me (IQR)	
Glu	60,7 (59,8-60,7)	59,0 (57,8-61,0)	0,83	50,4 (49,3-52,6)	0,012
His	5,3 (5,2-5,3)	4,1 (3,8-4,2)	0,12	0,6 (0,6-0,6)	0,011
Lys	22,2 (21,8-22,6)	5,0 (5,0-5,2)	0,012	0,5 (0,3-0,6)	0,003
Met	4,2 (3,9-4,3)	4,3 (4,2-4,8)	0,88	2,6 (2,6-2,7)	0,012
OH ₂ Lys	5,8 (5,7-5,9)	1,6 (1,5-1,6)	0,012	0	0,008
Ser	27,6 (27,5-28,4)	27,0 (26,9-27,6)	0,16	23,8 (23,4-24,0)	0,012
Tyr	6,8 (6,7-7,0)	6,8 (6,7-6,9)	0,95	0	0,007

Примечание: Glu, глутаминовая кислота; His, гистидин; IQR (interquartile range), межквартильный интервал; Lys, лизин; Me (median), медиана; Met, метионин; OH₂Lys, гидроксизин; Ser, серин; Tyr, тирозин; ГА, глутаральдегид; ДЭ, диэпоксид (диглицидиловый эфир этиленгликоля). Сравнение содержания аминокислот между нативными и ГА-обработанными образцами – p*; между нативными и ДЭ-обработанными образцами – p#.

4.2.2 Взаимодействие бисфосфоната с консервантом

Исследование *in vitro* показало, что после инкубации Пам с ГА появились новые сигналы ¹H ЯМР – 5,86 и 8,58 м.д. (Рисунок 4.2), которые можно отнести к α,β-ненасыщенной иминогруппе, а не к α,β-ненасыщенному альдегиду [Кузнецова и др., 2003].

Инкубация ГА с СЕАВА не привела к каким-либо наблюдаемым изменениям в спектрах ЯМР, поэтому ГА, вероятно, не связывается со вторичной аминогруппой СЕАВА.

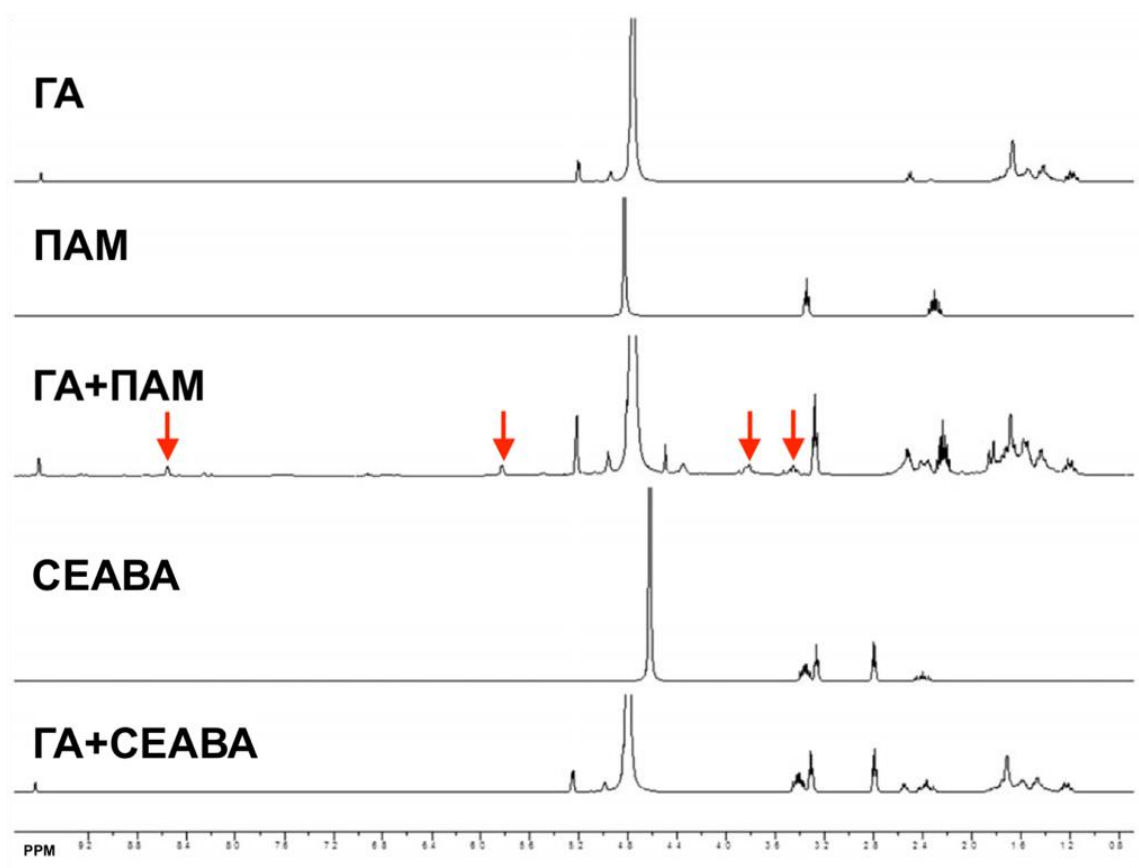


Рисунок 4.2 – Спектры ^1H ЯМР консерванта ГА, бисфосфонатов Пам и СЕАВА, инкубированных смесей ГА + Пам и ГА + СЕАВА. Сигналы продуктов реакции указаны красными стрелками. СЕАВА, 2-(2-карбоксиэтиламино)этилиден-1,1-бисфосфоновая кислота; ГА, глутаровый альдегид; Пам, памидроновая кислота

Инкубация ДЭ в 0,1 М фосфатном буфере не вызвала каких-либо изменений в спектрах ЯМР. Это указывает на то, что раскрытие оксиранового кольца диэпоксидов в отсутствие нуклеофильных агентов не происходит.

При инкубации ДЭ с Пам или СЕАВА было отмечено появление новых сигналов ЯМР – 3,51, 3,59 и 3,86 м.д., которые можно отнести к метиленовым и метиновым протонам 3-амино-2-гидроксипропильного фрагмента, образованного в результате расщепления оксиранового кольца посредством нуклеофильной атаки первичных или вторичных аминогрупп Бф (Рисунок 4.3).

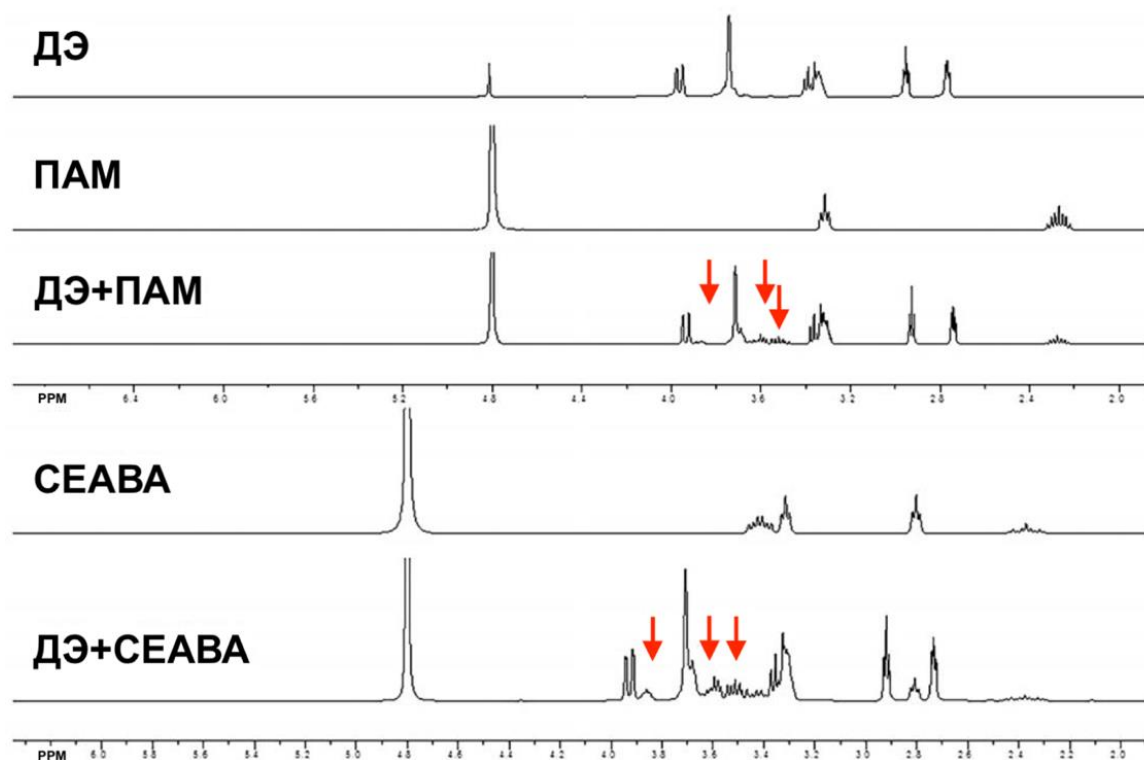


Рисунок 4.3 – Спектры ^1H ЯМР консерванта ДЭ, бисфосфонатов Пам и СЕАВА, инкубированных смесей ДЭ + Пам и ДЭ + СЕАВА. Сигналы продуктов реакции указаны красными стрелками. СЕАВА, 2-(2-карбоксиэтиламино)этилиден-1,1-бисфосфоновая кислота; ДЭ, диглицидиловый эфир этиленгликоля; Пам, памидроновая кислота

4.2.3 Инфракрасная спектроскопия

Основные отличия в спектрах ПК-лоскута (Рисунок 4.4), консервированного ДЭ, наблюдаются в областях валентных колебаний С–О связей в простых эфирах (1084 см^{-1}) и валентных колебаний С–Н связей метиленовых групп (2929 см^{-1} – асимметричные колебания, 2875 см^{-1} – симметричные колебания). Наблюдается смещение полосы 1531 см^{-1} (амид II + деформации аминогрупп) на 11 см^{-1} в сторону больших волновых чисел в ДЭ-фиксированных образцах по сравнению с нативными ПК-лоскутами.

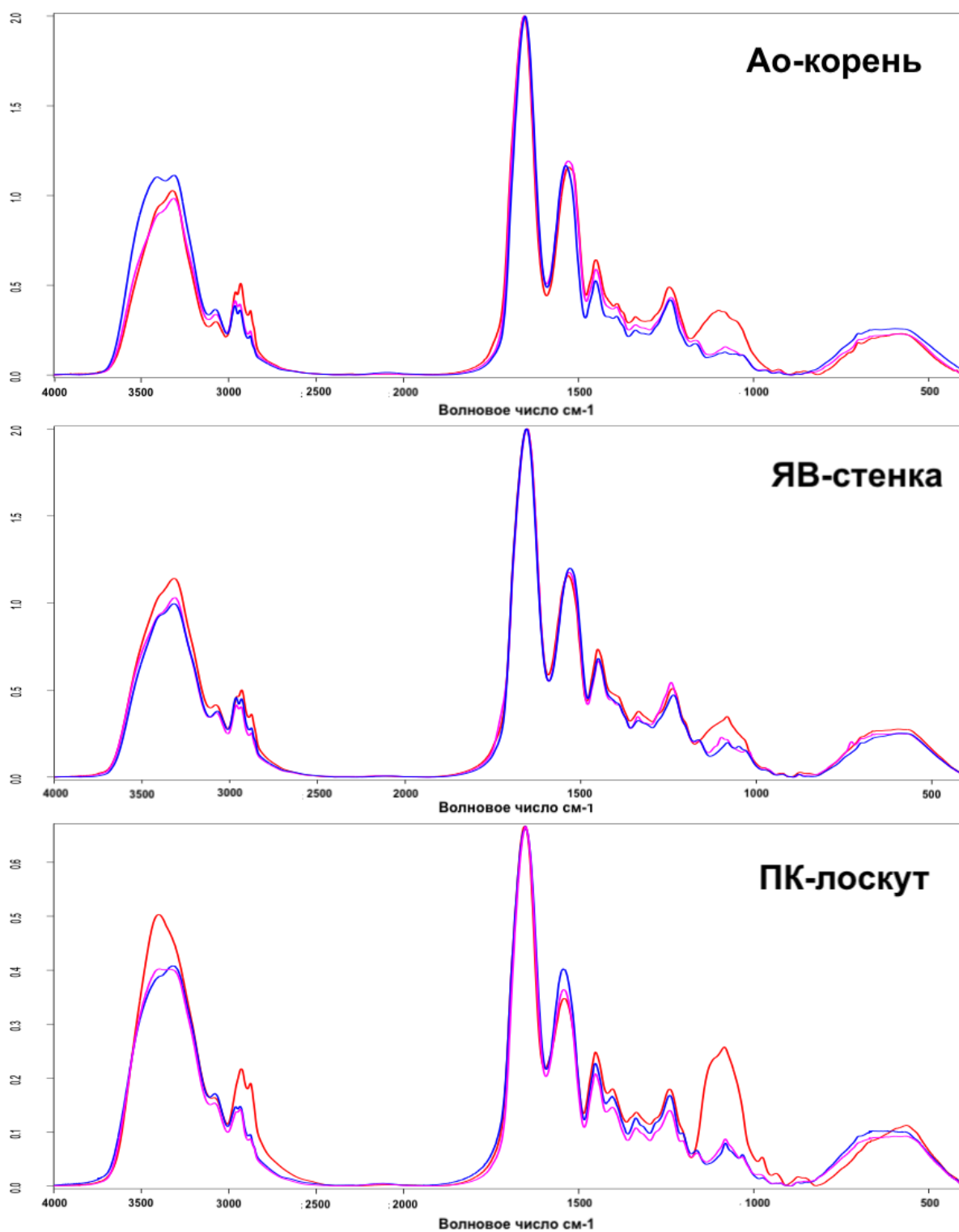


Рисунок 4.4 – ИК-спектры биоматериалов (ПК-лоскут, Ao-корень, ЯВ-стенка): необработанных (синие линии), фиксированные ГА (розовые линии) или ДЭ (красные линии). Ao-корень, аортальный корень; ПК-лоскут, лоскут перикарда; ЯВ-стенка, стенка яремной вены

Более тонкие различия в структуре образцов определяли по вторых производным ИК-спектров. Незначительное смещение полос 1451 см^{-1} и 1394 см^{-1} (деформация метиленовых C–H-связей) и усиление их интенсивностей обусловлены увеличением содержания метиленовых групп в ДЭ-обработанном ПК-лоскуте. Присоединение ДЭ к фенольной (присущей Tyr) и первичным спиртовым группам (присущим Ser) приводит к уменьшению интенсивности полос 1370 см^{-1} , 1160 см^{-1} , 1312 см^{-1} и 1027 см^{-1} . Наблюдаемое увеличение интенсивности полосы 1239 см^{-1} может быть связано с колебаниями вторичных спиртовых групп, появляющихся в процессе взаимодействия с консервантом, а также с валентными колебаниями C–O связей в нераскрывшихся эпоксидных циклах. Появление в спектре полос 1136 см^{-1} и 974 см^{-1} характеризует поглощение C–O и C–H связей в оксиэтиленовых фрагментах. Нераскрывшиеся эпоксидные циклы имеют поглощения 849 см^{-1} .

Обработка ГА тканей Ао-корня и ЯВ-стенки привела к небольшим изменениям в спектральном диапазоне $1000\text{--}1100\text{ см}^{-1}$ (Рисунок 4.4). Кроме того, полоса свободной альдегидной группы появилась около 1725 см^{-1} как плечо на полосе амида I. Она видна только в деконволюционных спектрах из-за низкой концентрации (Рисунок 4.5А).

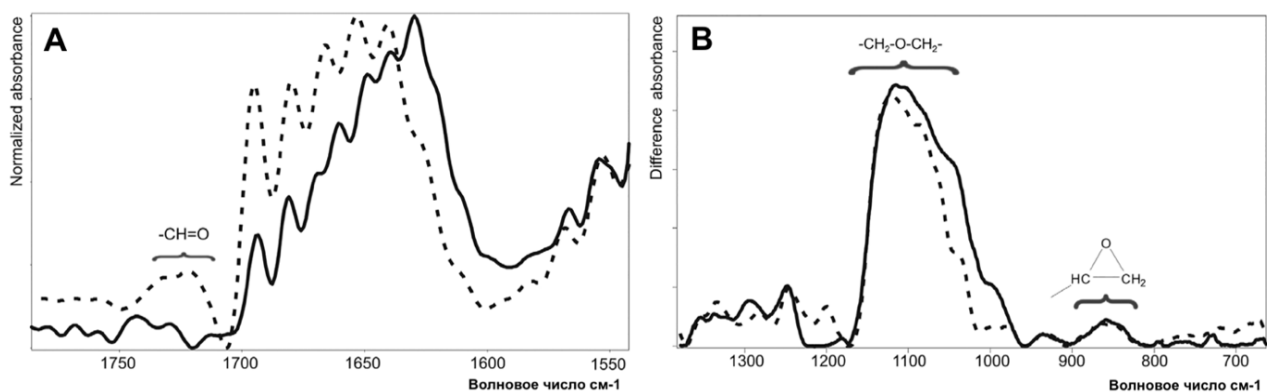


Рисунок 4.5 – Сравнение ИК-спектров Ао-корня и ЯВ-стенки.

А – деконволютированные ИК-спектры ткани Ао-корня (сплошная линия) и ЯВ-стенки (пунктирная линия), консервированных ГА. В – разница в ИК-спектрах Ао-корня (сплошная линия) и ЯВ-стенки (пунктирная линия), фиксированных ДЭ

Фиксация Ао-корня и ЯВ-стенки диэпоксидным соединением характеризовалась появлением новых полос колебаний эфирных связей при 1150–1050 см^{-1} и полосы колебаний монозамещенного эпоксидного кольца при 860 см^{-1} (Рисунок 4.5В).

ATR-ИК спектры растворов Бф наблюдались в диапазоне 1300–900 см^{-1} . Анионы Бф характеризовались двумя интенсивными широкими полосами 1158 см^{-1} и 1073 см^{-1} в спектре Пам и тремя интенсивными полосами 1173 см^{-1} , 1139 см^{-1} и 1062 см^{-1} в спектре СЕАВА (Рисунок 4.6).

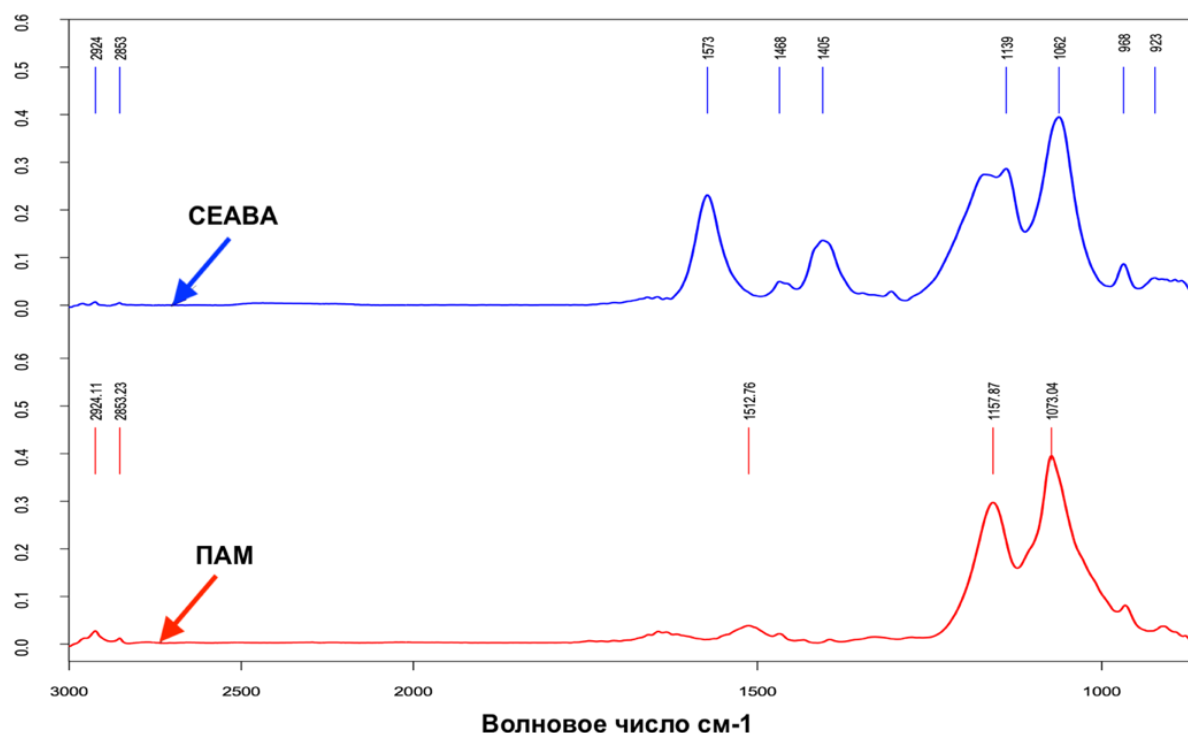


Рисунок 4.6 – ATR-ИК спектры растворов бисфосфоновых кислот при рН 7,0. СЕАВА, 2-(2-карбоксиэтиламино)этилиден-1,1-бисфосфоновая кислота; Пам, памидроновая кислота

Сравнение ATR-ИК спектров фиксированных и Бф-обработанных биоматериалов и спектров растворов Пам и СЕАВА (Рисунок 4.7) выявило появление полос в области 1170–1130 см^{-1} в спектрах исследованных биоматериалов. Полоса в области 1070–1060 см^{-1} связана с собственным поглощением белка и поглощением фрагментов ДЭ и ГА, включенных в структуру сшитого белка.

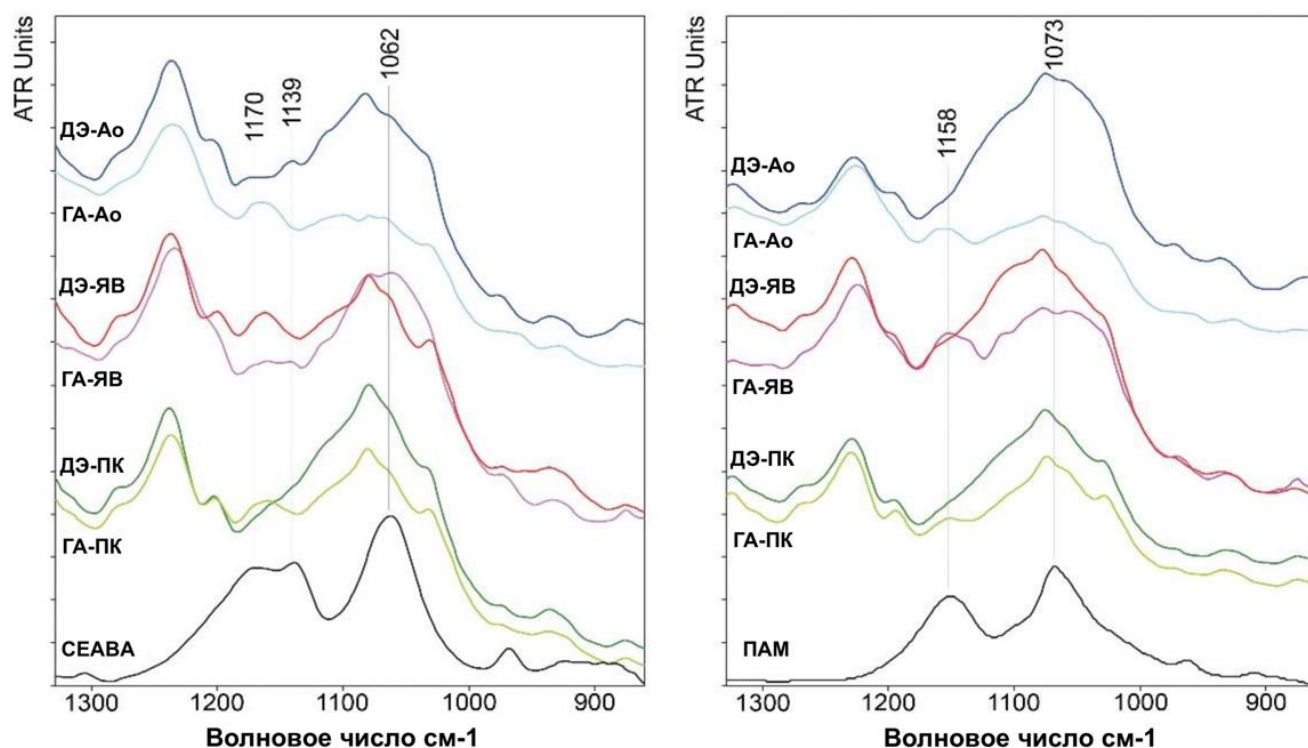


Рисунок 4.7 – АТР-ИК спектры растворов Бф при рН 7,0 и фиксированных биоматериалов, обработанных Пам и СЕАВА, в области 1340–860 см⁻¹.

ATR (attenuated total reflection), аттенуированное полное отражение; ATR Units, единицы ATR; СЕАВА, 2-(2-карбоксиэтиламино)этилиден-1,1-бисфосфоновая кислота; ГА, глутаровый альдегид; ГА-Ао, свиной аортальный корень, обработанный глутаровым альдегидом; ГА-ПК, бычий перикард, обработанный глутаровым альдегидом; ГА-ЯВ, яремная вена быка, обработанная глутаровым альдегидом; ДЭ, диэпоксид; ДЭ-Ао, свиной аортальный корень, обработанный диэпоксидом; ДЭ-ПК, бычий перикард, обработанный диэпоксидом; ДЭ-ЯВ, яремная вена быка, обработанная диэпоксидом; Пам, памидроновая кислота

В дифференциальных ИК-спектрах биоматериалов, обработанных Бф, по сравнению с образцами, подвергнутыми только поперечной сшивке, была выявлена сложная комплексная полоса (Рисунок 4.8). Образцы ДЭ- и ГА-консервированных эластин-содержащих тканей, с дополнительной иммобилизацией Пам и СЕАВА, имели широкую полосу на 1200–1000 см⁻¹. Эту полосу можно отнести к асимметричным и симметричным колебаниям $R(PO_3^{2-})_2$ на 1125–1000 см⁻¹ и 1000–960 см⁻¹, а также к валентным колебаниям связей Р-ОН на 1100–940 см⁻¹.

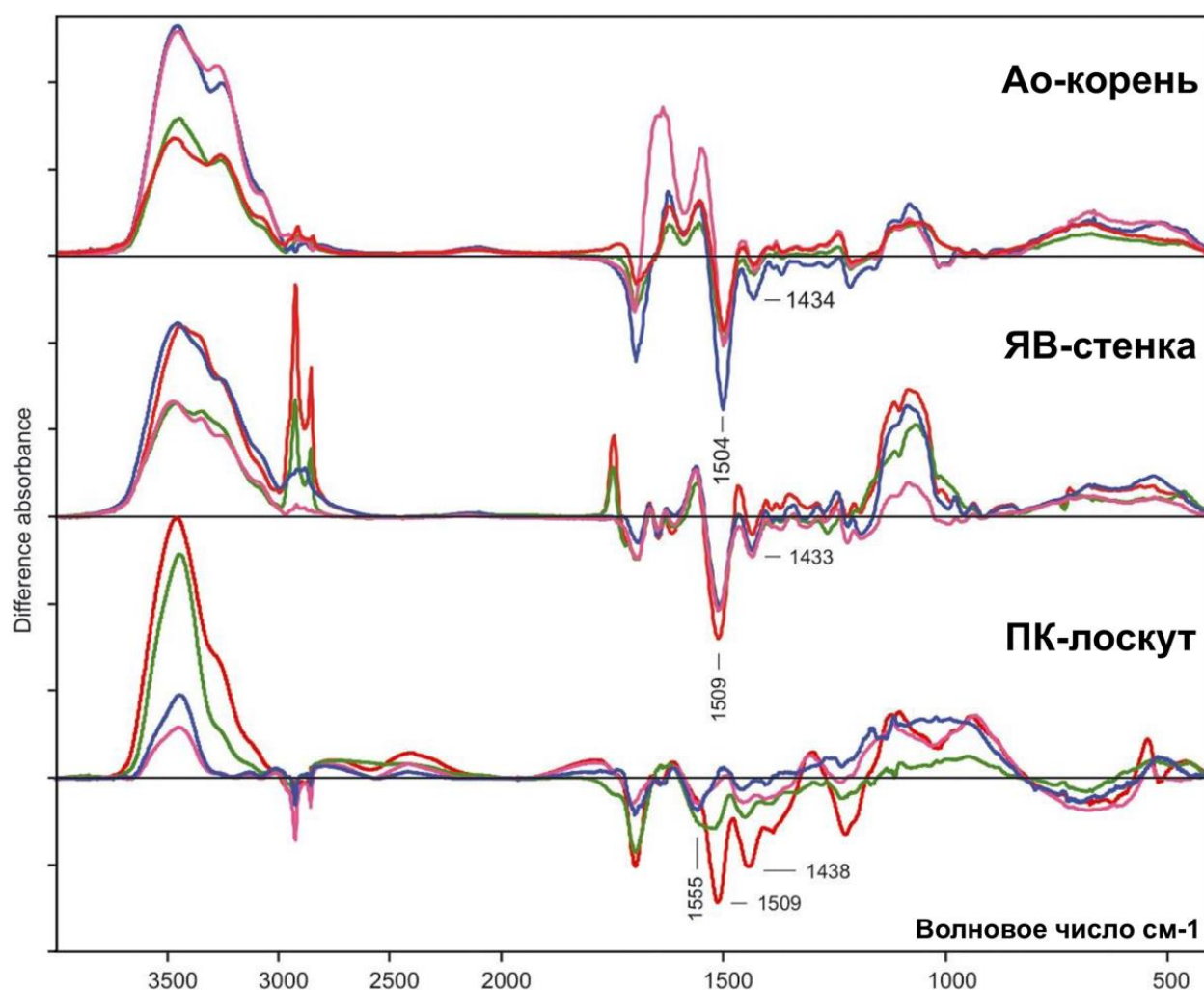


Рисунок 4.8 – ИК-спектры фиксированных биоматериалов, обработанных Пам и СЕАВА. ГА + Пам — красная линия; ГА + СЕАВА — зеленая линия; ДЭ + Пам — синяя линия; ДЭ + СЕАВА — розовая линия.

Difference absorbance, разница поглощения; Ао-корень, свиной аортальный корень; ПК-лоскут, лоскут бычьего перикарда; ЯВ-стенка, стенка яремной вены быка

Полоса на 1430 см^{-1} в отрицательной области дифференциальных ИК-спектров всех обработанных образцов Ао-корня и ЯВ-стенки может быть отнесена к колебаниям изгиба групп ОН. Это, вероятно, связано с изменениями энергии вследствие образования водородных связей между гидроксильными группами пептидных цепей и Бф. Вторая отрицательная полоса в диапазоне $1508\text{--}1503\text{ см}^{-1}$ (деформация NH_2) в тех же разностных ИК-спектрах указывает на уменьшение количества аминогрупп в образцах, обработанных Бф, за счёт их превращения в катионы $-\text{NH}_2^+$ (Рисунок 4.8).

Дифференциальные спектры фиксированных ПК-лоскутов, обработанных Бф, продемонстрировали несколько иные изменения структуры биоматериала. Полосы в отрицательной области, близкие к тем, что наблюдались в дифференциальных спектрах в модифицированных Ао-корне и ЯВ-стенке, присутствовали только в спектре образца ГА-консервированного ПК-лоскута, обработанного Пам. В дифференциальных спектрах остальных образцов отрицательные полосы сместились. Кроме того, появилась дополнительная отрицательная полоса на 1557 см^{-1} , совпадающая с полосой амид II. Значительные спектральные различия можно объяснить различным составом биоматериалов.

Интенсивность полос колебаний Бф была выше для всех биоматериалов, модифицированных Пам. Содержание иммобилизованных Бф в ГА-обработанной ЯВ-стенке было больше, чем в ткани Ао-корня, фиксированного ГА. Для ДЭ-консервированной стенки Ао-корня, обработанной Бф, полосы в области $1200\text{--}1000\text{ см}^{-1}$ были более интенсивными для Пам.

Таким образом, результаты атомно-эмиссионной спектроскопии и ИК-спектроскопии показали наличие как Пам, так и СЕАВА в фиксированных Ао-корне, ПК-лоскуте и ЯВ-стенке. В совокупности полученные данные свидетельствуют о том, что значительное количество Бф связывается с биоматериалами Ао-корня и ЯВ-стенки нековалентно, преимущественно за счёт взаимодействий Ван дер Ваальса.

4.2.4 Содержание бисфосфонатов в модифицированных биоматериалах

Содержание Бф, иммобилизованных в ткани, зависит от нескольких факторов: природы ткани, типа используемого сшивающего агента и химической структуры самого Бф.

Исходно каждый из консервированных биоматериалов содержал разное количество фосфора (Таблица 4.4). Наименьшее его содержание было выявлено в ПК-лоскуте, наибольшее — в стенке Ао-корня, что, по-видимому, обусловлено большим количеством гладкомышечных клеток (ГМК) в средней оболочке.

Таблица 4.4 – Содержание фосфора (мкг/мг сухой ткани) в немодифицированных ДЭ-образцах [Р]n

Содержание [P]	Биоматериал			p
	Me (IQR)			
	Ао-корень	ПК-лоскут	ЯВ-стенка	
[P]n (мкг/мг)	1,95 (1,87–1,99)	0,90 (0,80–1,00)	0,65 (0,52–0,71)	<0,001

Примечание: Me (median), медиана; IQR (interquartile range), межквартильный интервал; [Р], фосфор; [Р]n: содержание фосфора в немодифицированном биоматериале; Ао-корень, свиной аортальный корень; ПК-лоскут, бычий перикардальный лоскут; ЯВ-стенка, стенка яремной вены быка.

Наименьшее содержание Бф было обнаружено в образцах ПК-лоскута, при этом эффективность модификации не зависела ни от способа предварительной обработки, ни от структуры Бф (Таблица 4.5). Наибольшее содержание иммобилизованного Бф типа 1 было обнаружено в Ао-корне, в то время как Бф типа 2 – в ЯВ-стенке.

Таблица 4.5 – Рассчитанное содержание [Бф] (мкМ/г) в модифицированных образцах тканей, фиксированных ГА и ДЭ

Содержание [Бф]	Биоматериал			p
	Me (IQR)			
	Ао-корень	ПК-лоскут	ЯВ-стенка	
ГА-обработка				
[Пам] (мкМ/г)	20,80 (20,61-21,45)	5,01 (4,16-5,14)	18,23 (16,94-19,69)	0,043
[СЕАВА] (мкМ/г)	10,89 (10,65-11,45)	4,46 (4,02–4,99)	21,21 (17,26-25,16)	0,043
ДЭ-обработка				
[Пам] (мкМ/г)	19,11 (15,0-20,32)	4,38 (4,03-5,35)	17,90 (15,64-19,68)	0,165
[СЕАВА] (мкМ/г)	14,68 (13,55-15,81)	4,18 (3,61-6,11)	17,74 (16,13-20,97)	0,043

Примечание: Me (median), медиана; IQR (interquartile range), межквартильный интервал; [Бф], бисфосфоновая кислота; Ао-корень, аортальный корень; ГА, глутаральдегид, ДЭ, диэпоксид; ПК-лоскут, перикардальный лоскут; ЯВ-стенка, стенка яремной вены.

Для образцов Ао-корня и ЯВ-стенки, содержание иммобилизованных Бф типа 1 (Пам, Алел, Нер) и типа 2 (СЕАВА и СПАВА) значительно снижалось по мере увеличения длины боковых цепей (Рисунок 4.9).

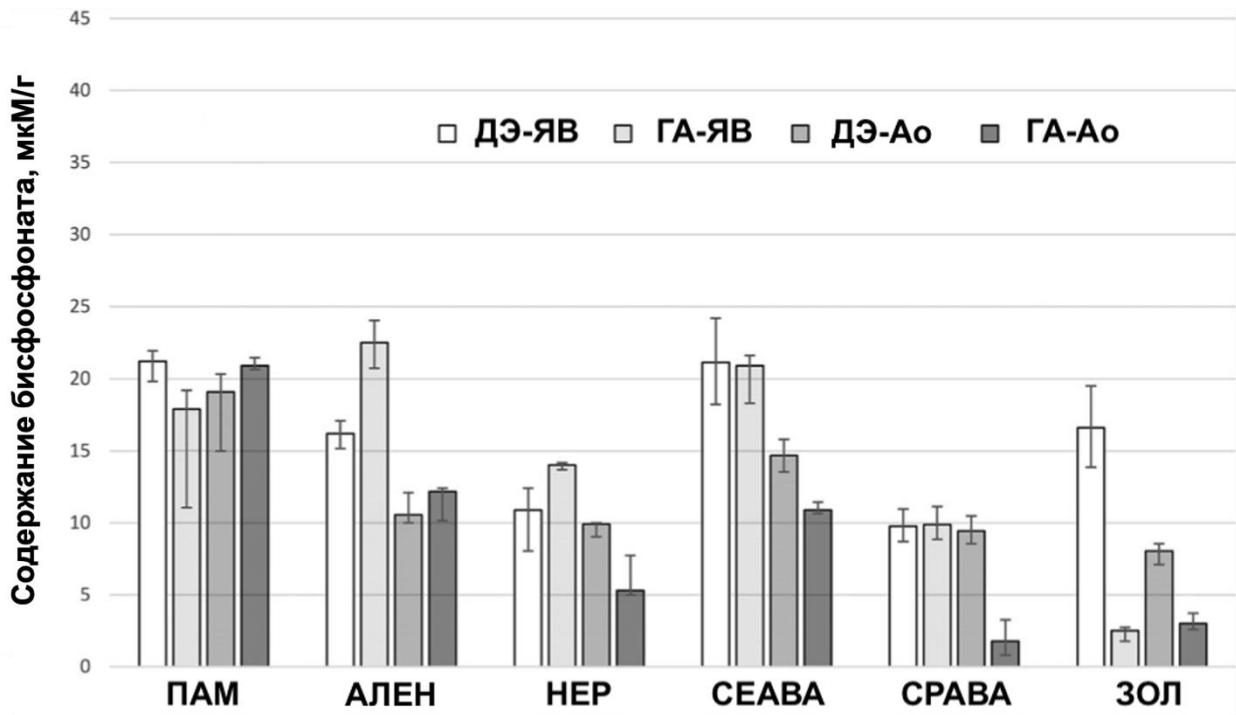


Рисунок 4.9 – Содержание иммобилизованных Бф в эластин-содержащих биоматериалах, предварительно обработанных ГА и ДЭ. СЕАВА, 2-(2-карбоксииэтиламино)этилиден-1,1-бисфосфоновая кислота; СРАВА, 2-(5-карбоксиипентиламино)этилиден-1,1-бисфосфоновая кислота; Ален, алендроновая кислота; Ао, стенка свиного аортального корня; ГА, глутаральдегид; ДЭ, диэпоксид; Зол, золедроновая кислота; Нер, неридроновая кислота; Пам, памидроновая кислота; ЯВ, стенка яремной вены быка

Бисфосфонаты 1 типа были обнаружены в наибольших количествах в ГА-обработанной ЯВ-стенке ($p < 0,001$). Бисфосфоновые кислоты типа 2 накапливались почти одинаково во всех материалах, за исключением ГА-консервированного Ао-корня, где они были выявлены в наименьшем количестве ($p = 0,001$). Зол (Бф типа 3) был иммобилизован в небольших количествах на ГА-консервированных Ао-корне и ЯВ-стенке, но его содержание в ДЭ-обработанных биоматериалах было значительно выше ($p < 0,001$). Предположительно, оксирановая группа диэпоксида достаточно реакционноспособна, чтобы связываться с имидазольным азотом Зол, тогда как альдегидная группа ГА – нет.

4.3 Обсуждение полученных результатов

В настоящей части работы основное внимание было уделено молекулярным механизмам сшивки биоматериалов, а также взаимодействию Бф с консервирующими агентами и обработанными тканями. Насколько нам известно, данное исследование является первым, направленным на верификацию биохимических процессов, лежащих в основе иммобилизации Бф на фиксированные ткани.

Как было показано в предыдущей главе (см. Глава 3), структурная дегенерация биопротеза зачастую приводит к нарушению функции кондуита значительно раньше, чем дети успевают перерасти ранее имплантированный графт [Crago и др., 2023; Hazekamp и др., 2021]. Многие исследователи выделяют химический состав обработанных биоматериалов в качестве одного из ключевых факторов, определяющих скорость дегенеративных изменений [Goldstone и др., 2017; Manji и др., 2014; Schoen, Levy, 2020; Wen и др., 2022]. Неудовлетворенность применением ГА в качестве основного фиксирующего агента стимулирует поиск новых стратегий консервации биоматериалов [Jorge-Herrero, Paez, Castillo-Olivares Ramos Del, 2005]. Протоколы химической обработки нового поколения включают ДЭ [Kostyunin и др., 2023]. Этот выбор основан на результатах исследований, подтверждающих преимущества эпоксидных соединений при консервации биоматериалов [Meuris, Flameng, 2008; Noishiki, Miyata, 2004; Okoshi и др., 1990; Zhou и др., 1997]. Тем не менее, молекулярные механизмы взаимодействия диэпоксида с компонентами внеклеточного матрикса (ВКМ) остаются недостаточно изученными, что затрудняет разработку эффективных стратегий предотвращения минерализации ткани.

В данной экспериментальной части работы качественную и количественную оценку поперечной сшивки ДЭ-фиксированных образцов проводили с помощью аминокислотного анализа и ИК-спектроскопии. Оба метода показали, что диэпоксид образует поперечные связи в биоматериалах посредством классической реакции с участием первичных и вторичных амино- и гидроксильных групп. Как было показано ранее [Tu и др., 1994], с эпоксидными соединениями наиболее активно взаимодействуют боковые ϵ -аминогруппы Lys и OH-Lys. Более того, ДЭ способен

реагировать с His и Arg. Вторичная аминогруппа гетероцикла His, скорее всего, тоже взаимодействует с ДЭ. Аргинин может вступать в реакцию за счет любого из трех азотов гуанидиновой группы, которая всегда протонирована в физиологических условиях. В то же время, OHPro, Ser и Tyr вступают в реакцию с эпоксидными соединениями за счет своих гидроксильных групп. Наиболее активна OH-группа Tyr, о чем свидетельствуют результаты ИК-спектроскопии и аминокислотного анализа. При использовании ДЭ-консервации содержание свободных остатков Tyr убывало на 93-99%, концентрация несвязанного Ser уменьшалась на 9-14%, а OHPro на ~1%. Эти данные подтверждают, что эпоксидные соединения реагируют не только с аминами, но и с гидроксильными группами [Sato и др., 2014]. Влияние ДЭ-обработки на содержание свободных остатков Met в ПК-лоскуте не было выявлено. В тоже время концентрация несвязанного Met в Ao-корне и ЯВ-стенке снижалась на 71% и 38% соответственно. Некоторые авторы ранее отмечали, что эпоксидные соединений могут вступать в реакцию с метилтио-группами [Alferiev и др., 2001; Tang, Yue, 1995]. Предполагаемый механизм взаимодействия этой группы веществ с биоматериалом включает образование сульфониевых соединений в результате реакции эпоксидных групп с остатками Met. Присутствие ионов сульфония в обработанной ткани будет способствовать увеличению механической прочности материала.

В тоже время ГА реагирует только с первичными аминогруппами Lys и OHLys, а также с N-концевыми остатками аминокислот коллагена [Барбараш, 1995; Attia, Raja, 2021]. Таким образом, ДЭ демонстрирует более широкий спектр сшивающего действия по сравнению с ГА, что обусловлено его способностью эффективно взаимодействовать с боковыми группами аминокислот, обладающими более низкой нуклеофильностью.

Эпоксидные соединения являются одними из наиболее реакционноспособных органических веществ по отношению к нуклеофильным реагентам [Chanda, Fokin, 2009; Saddique и др., 2016]. Поэтому ожидаемо взаимодействие диэпоксида со свободными функциональными группами коллагена (NH_2 , OH, SH и COOH), что делает возможным его использование в качестве консервирующего агента различных биоматериалов. Возможной причиной неудовлетворительной плотности ДЭ-сшивки

могут стать только конкурентные реакции, протекающие с участием других нуклеофилов и приводящие к раскрытию эпоксидного цикла.

Результаты исследований свидетельствуют об отсутствии реакционной способности эластина по отношению к таким сшивающим агентам как ГА и эпоксидные соединения [Brasselet и др., 2005; Tripi, Vyavahare, 2014]. В отличие от коллагена, который демонстрирует хорошую способность к формированию межмолекулярных связей с этими реагентами [Kong и др., 2021], эластин не образует стабильных ковалентных связей в аналогичных условиях обработки [Brasselet и др., 2005]. Это различие в реакционной активности может быть связано не только с особенностями аминокислотного состава, но и с пространственной организацией эластиновых волокон. В связи с этим, предотвращение кальцификации биоматериалов, богатых эластином, является наиболее трудной задачей по сравнению с коллаген-содержащими тканями [Bailey и др., 2003]. Было предложено множество стратегий для снижения кальцификации биопротезов, обработанных ГА [Jorge-Herrero, Paez, Castillo-Olivares Ramos Del, 2005]. В 1980–1990-х годах было опубликовано ряд исследований, посвящённых изучению антикальцификационного эффекта Бф, иммобилизованных на ГА-обработанных биоматериалах [Caffarelli и др., 2017; Nimni и др., 1990; Van Gelder и др., 1997; Webb, Schoen, Levy, 1989]. Первым Бф-препаратом была Пам, которая продемонстрировала кальций-протективный эффект для бычьего перикарда и створок аортального клапана [Nimni и др., 1990; Webb, Schoen, Levy, 1989].

В настоящее время существует много Бф-препаратов [Widler и др., 2002]. Все Бф имеют характерную группу Р-С-Р, где центральный углерод также связан с двумя другими группами R1 и R2. Группа R1 чаще всего является гидроксильной, но структура R2 может широко варьировать. В зависимости от присутствия азота в группе R2, Бф разделяют на азотсодержащие (N-Бф) и не содержащие азота (не-N-Бф) [Russell и др., 2008; Russell, 2015]. В N-Бф азот может подвергаться нуклеофильному присоединению к свободным альдегидным и эпоксидным группам, оставшимся в биоматериале после сшивания. Благодаря своей R2-группе N-Бф могут быть ковалентно иммобилизованы на биоматериалах [Nimni и др., 1990; Webb, Schoen, Levy, 1989]. Все N-Бф типа 1 характеризуются наличием гидроксильной группы в положении

R1 и первичной аминогруппы в структуре R2. Но длина цепи R2 варьирует у представителей Бф типа 1, что сказывается на химических свойствах соединений. Бисфосфонаты типа 2 не имеют –ОН в качестве R1, а их R2 содержит вторичную аминогруппу и имеет разную длину цепи. Третий тип БФ характеризуется наличием гидроксильной группы в качестве R1, а его цепь R2 содержит имидазол с двумя атомами азота. Однако азот первичных, вторичных и третичных аминогрупп имеет различную реакционную способность с ГА и ДЭ.

Анализ взаимодействия Бф типа 1 с консервантами показал, что связывание Пам с ГА происходит за счёт образования иминогрупп, тогда как с ДЭ – посредством расщепления оксиранового кольца. Аналогичный механизм связывания с ДЭ был выявлен и для СЕАВА. Предполагается, что Бф типов 1 и 2 расщепляют оксирановое кольцо ДЭ посредством нуклеофильной атаки первичных и вторичных аминогрупп. В то же время, в ходе исследования не было выявлено изменений в ^1H ЯМР-спектрах, которые могли бы свидетельствовать о взаимодействии ГА с вторичной аминогруппой СЕАВА. Отсутствие таких изменений указывает на низкую или полное отсутствие реакционной способности ГА по отношению к данной функциональной группе, что может быть обусловлено стерическими или электронными факторами, препятствующими формированию ковалентных связей. Эти данные подтверждают специфичность механизмов сшивки ГА и ДЭ, а также подчеркивают различия в реакционной активности сшивающих агентов в отношении различных аминогрупп Бф.

Мы выдвинули предположение, что эффективность иммобилизации Бф во многом определяется типом их химической связи с биологической тканью. В свою очередь, данный механизм зависит от структурных особенностей ткани, а именно от типа белкового состава ВКМ. ПК-лоскут имеет гомогенный ВКМ, который состоит исключительно из коллагена, и, следовательно, результаты для этой ткани предсказуемы, воспроизводимы и довольно однородны. Данное исследование доказало, что Пам и СЕАВА могут ковалентно связываться с реактивными группами ГА и ДЭ. Взаимодействуя с маскирующими группами, бисфосфонаты могут усиливать эффект эпоксидной сшивки или блокировать неблагоприятные свойства ГА-обработки. Однако в межмолекулярной и межфибриллярной сшивке коллагена не так много

маскирующих групп. В нашем исследовании ПК-лоскут связывает довольно небольшое количество Бф, в основном посредством ковалентных связей с маскирующими группами сшивающего агента. Анализ ИК-спектров показал, что взаимодействие Бф с аминоклуппами субстратов нетипично для ПК-лоскута. В то же время эти взаимодействия очевидны для аортальной и венозной ткани, обработанной различными способами. Их ВКМ содержит не только коллаген, но и большое количество эластина, который трудно сшивается [Bailey и др., 2003; Tripi, Vyavahare, 2014]. Присутствие неколлагеновых белков и их стерические преобразования во время консервации ответственны за снижение активности Бф, несмотря на их более высокое содержание после иммобилизации в богатых эластином тканях. Соотношение коллаген/эластин широко варьирует в зависимости от индивидуума, вида животного-донора и других характеристик. Кроме того, существует множество других белков, связанных с эластиновыми волокнами, таких как фибриллин, витронектин, фибулин и ламинин [Perrotta и др., 2011]. Любой из этих белков может содержать дополнительные сайты связывания для Бф посредством образования водородных связей. Известно, что Пам может таким образом взаимодействовать своей аминоклуппой с Thr [Tsoumpira и др., 2015]. Однако, основываясь на наших результатах ИК-спектроскопии, которые показали уменьшение аминоклупп в субстратах, содержащих эластин, наиболее вероятным является образование водородных связей между фосфатными группами Бф и аминоклуппами субстратов. Это могут быть аминоклуппы основной цепи белка и боковой цепи Arg, с участием кислорода Ser в образовании водородных связей [Gruber и др., 2014; Qi и др., 2018]. Это в некоторой степени объясняет, почему большее связывание Бф стенками Ао-корня и ЯВ сопровождается меньшим антикальциевым эффектом по сравнению с ПК-лоскутом (см. Главу 5).

4.4 Ограничения исследования

Данная часть исследования представляет собой первую попытку верификации молекулярных механизмов, лежащих в основе иммобилизации Бф. В работе были

проанализированы как нативные, так и обработанные цельные ткани, которые помимо основных белков ВКМ — коллагена и эластина — содержат множество других компонентов, включая гликопротеины, гликозаминогликаны и другие белки. Все эти компоненты могут оказывать влияние на процессы адсорбции и связывания Бф, что следует учитывать при интерпретации результатов [Zhuravleva и др., 2022]. Данный аспект представляет собой основное ограничение настоящего исследования. В связи с этим молекулярные механизмы связывания и взаимодействия Бф с фиксированными тканями были рассмотрены только на гипотетическом уровне. Для более детального и точного выяснения этих механизмов необходимы модельные эксперименты с использованием очищенных коллагена и эластина.

4.5 Резюме

Полученные в данной части исследования результаты выявили ряд закономерностей, демонстрирующих значимые различия в молекулярных механизмах консервации биоматериалов с использованием таких сшивающих агентов, как ДЭ и ГА, а также особенности биохимического взаимодействия обработанных тканей с разными типами N-Бф. По нашим данным, это первое исследование, направленное на верификацию молекулярных путей взаимодействия между фиксированными ксеногенными тканями, имеющими структурные отличия, и разными N-Бф.

ДЭ обеспечивает высокую плотность сшивки как коллаген-, так и эластин-содержащих биоматериалов благодаря способности взаимодействовать не только с аминогруппами остатков OH⁺Lys, Lys, His и Arg, но и с гидроксильными группами Ser и Tyr. Этот консервант обладает более широким спектром сшивающей активности по сравнению с ГА, из-за его способности эффективно реагировать с менее нуклеофильными боковыми группами аминокислот ВКМ.

Исследование взаимодействия Бф типа 1 с консервантами выявило, что Пам связывается с ГА посредством образования иминогрупп, тогда как с ДЭ

взаимодействие происходит через раскрытие оксиранового кольца. Аналогичный механизм связывания с диэпоксидом был установлен и для СЕАВА. Предполагается, что Бф типов 1 и 2 расщепляют оксирановое кольцо ДЭ посредством нуклеофильной атаки первичных и вторичных аминогрупп. В тоже время, ГА, по-видимому, не взаимодействует с вторичной аминогруппой СЕАВА, что подтверждается отсутствием изменений в ЯМР-спектрах.

Результаты анализа методом атомно-эмиссионной спектроскопии и ИК-спектроскопии подтвердили присутствие Пам и СЕАВА в фиксированных образцах ПК-лоскута, ЯВ-стенки и Ао-корня. При этом интенсивность полос колебаний, соответствующих Бф, была выше во всех биоматериалах, модифицированных Пам. Фиксированный ПК-лоскут связывает бисфосфонаты преимущественно за счёт образования ковалентных связей с маскирующими группами сшивающего агента, тогда как взаимодействие Бф с аминогруппами субстрата является нетипичным для данного биоматериала. В эластин-содержащих тканях (ЯВ-стенка, Ао-корень) наблюдалось явное связывание Бф с аминогруппами субстратов независимо от типа обработки. Кроме того, полученные данные свидетельствуют о том, что Бф типов 1 и 2 связываются с фиксированными тканями Ао-корня и ЯВ-стенки преимущественно нековалентно, в основном за счет взаимодействия Ван дер Ваальса. Такие межмолекулярные силы, характеризующиеся низкой энергией связи и обратимостью, обеспечивают слабое, но стабильное адсорбционное взаимодействие Бф с тканевыми субстратами, что имеет важное значение для понимания механизмов их фиксации и биологической активности в данных биоматериалах [Park и др., 2021; Yuan и др., 2020].

Количественный анализ содержания Бф, иммобилизованных в ткани, показал, что ПК-лоскут, не зависимо от варианта поперечной сшивки, накапливал наименьшее количество бисфосфонатов типов 1 и 2. Наибольшее количество иммобилизованного Бф было выявлено в ЯВ-стенке. Также для эластин-содержащих образцов (Ао-корень, ЯВ-стенка) было свойственно снижение уровня иммобилизации Бф типов 1 и 2 с увеличением длины их боковой цепи. Памидронат

продемонстрировал высокий уровень иммобилизации во всех фиксированных образцах ЯВ-стенки и Ао-корня.

Описанные закономерности указывают на то, что молекулярные взаимодействия между биоматериалом, сшивающим агентом и Бф зависят от химических и структурных особенностей каждого из перечисленных компонентов. Состав внеклеточного матрикса ткани, природа сшивающего агента и молекулярная структура Бф определяют биохимическую основу модифицированного биоматериала и, как следствие, его предрасположенность к кальцификации. Эти факторы влияют на формирование специфических химических связей и комплексов [Тимченко, 2022], которые ответственны за процессы минерализации и стабильность биоматериала в физиологических условиях.

Полученные данные свидетельствуют о том, что ДЭ-обработка биоматериалов способствует повышению биологической стабильности ксеноткани за счёт высокой плотности сшивки компонентов внеклеточного матрикса. Кроме того, данный консервант предоставляет субстрат для ковалентного связывания бисфосфонатов через взаимодействие как с первичными, так и со вторичными аминогруппами, что обеспечивает эффективную иммобилизацию различных типов бисфосфонатов. Результаты *in vitro* исследования механизмов взаимодействия биоматериала, сшивающего агента и бисфосфоната подтвердили перспективность стратегии, предусматривающей ДЭ-обработку с последующей иммобилизацией Бф, для повышения антикальциевой защиты ксеногенной ткани. Способность бисфосфонатов нековалентно связываться с аминогруппами эластин-содержащих тканей дополнительно поддерживает потенциал данной стратегии консервации для повышения антикальциевой устойчивости биоматериалов.

ГЛАВА 5. ЭКСПЕРИМЕНТ *in vivo* НА МОДЕЛИ МЕЛКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ (крысы)

Целью данной части исследования было сравнительное изучение степени кальцификации ксеногенных тканей, используемых для изготовления ЛА-кондуитов, а также оценка потенциала антикальциевой защиты различных методов обработки биоматериалов в экспериментальной модели подкожной имплантации у молодых крыс. Особое внимание было уделено анализу эффективности модификации бисфосфонатами (Бф) тканей, фиксированных глутаровым альдегидом (ГА) и диглицидиловым эфиром этиленгликоля (диэпоксидом, ДЭ).

Модель подкожной имплантации у крыс является признанным скрининговым методом для оценки кальцификации биоматериалов [Cramer и др., 2022; Waqanivavalagi и др., 2022; Zhuravleva и др., 2023]. Подкожная ткань крысы обеспечивает физиологически релевантную среду, позволяющую исследовать как процессы минерализации, так и тканевую реакцию на имплантат. Поэтому первичные испытания кальций-связывающих свойств биоматериалов традиционно проводят именно с использованием этой модели [Rapoport и др., 2007; Tam и др., 2015; Wang и др., 2015], так как она позволяет прогнозировать долгосрочную минерализацию и дегенерацию материалов. Установлено, что степень кальцификации образцов после 2–3 месяцев подкожной имплантации у молодых растущих крыс соответствует уровню минерализации биопротезов, эксплантированных у пациентов через 7–10 лет [Chabry и др., 2023; Kostyunin и др., 2020b; Schoen и др., 1985; Schoen, Tsao, Levy, 1986; Zhuravleva и др., 2023]. Следовательно, снижение кальцификации в подкожной модели служит индикатором эффективности антикальциевой обработки биоматериала и его перспектив для дальнейшего развития и клинического применения [Schoen и др., 1985; Schoen, Tsao, Levy, 1986]. Благодаря своей простоте, высокой воспроизводимости и возможности строгого контроля экспериментальных условий, эта модель позволяет достаточно быстро выявлять неэффективные методы консервации и считается оптимальной для первичного скрининга перед проведением более сложных и затратных исследований.

На основании данных, полученных в этой части диссертационной работы, были отобраны наиболее перспективные фиксированные ксеногенные ткани, обладающие наименьшей склонностью к минерализации и другим дегенеративным изменениям, для включения в следующий этап исследования.

5.1 Материалы и методы

Данная часть исследования была одобрена локальным Экспертным (протокол №25 от 19.12.2017) и Этическим (протокол №17 от 14.06.2018) комитетами. Все экспериментальные процедуры соответствуют этическим нормам, регламентирующим эксперименты на животных в соответствии с международными и российскими нормативно-правовыми документами [Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, 1986; «Об утверждении правил лабораторной практики» приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 267 от 19.06.2003 г., 2003; Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes, 2010; «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н от 01.04.2016 г., 2016; ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организация процедур» от 01.07.2016, 2016; ГОСТ 34088-2017 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за сельскохозяйственными животными» от 01.08.2018, 2018].

5.1.1 Дизайн исследования

В исследование включены следующие биоматериалы:

→ *лоскут бычьего перикарда* (ПК-лоскут),

- **стенка свиной аорты** (Ао-корень),
- **стенка яремной вены быка** (ЯВ-стенка).

Проведена микроструктурная оценка как нативных образцов, так и тканей, консервированных ГА или ДЭ. Кроме того, выполнен анализ влияния иммобилизованных Бф на степень минерализации консервированных образцов Ао-корня, ПК-лоскута и ЯВ-стенки.

В исследование включены представители различных типов Бф (см. Глава 4):

- **тип 1** – памидроновая кислота (Пам), алендроновая кислота (Ален), неридоновая кислота (Нер);
- **тип 2** – СЕАВА [2-(2-карбоксиэтиламино)этилиден-1,1-бисфосфоновая кислота]; СРАВА [2-(5-карбоксипентиламино)этилиден-1,1-бисфосфоновая кислота];
- **тип 3** – золедоновая кислота (Зол).

В общей сложности в модели подкожной имплантации у крыс было протестировано 35 группы биоматериалов, обработанных различными способами.

5.1.2 Подготовка имплантируемых образцов

В качестве основных сшивающих агентов использовали коммерческие растворы 97% ДЭ (Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, г. Новосибирск, Российская Федерация) и 25% ГА (каталожный номер 253857, Panreac Química SLU, Барселона, Испания). Бисфосфонаты были получены в Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН с использованием ранее описанных методик [Alfer'ev, Mikhalin, 1992; Kieczkowski и др., 1995; Widler и др., 2002].

Свежие биоматериалы (Ао-корень, ПК-лоскут, ЯВ-стенка) были изъяты у здоровых животных непосредственно после убоя и подготовлены к консервации в соответствии с методикой, описанной в Главе 4. Каждый биоматериал консервировали с использованием одного из способов [Журавлева и др., 2017b; Zhuravleva и др., 2018]:

- (1) обработка 0,625% раствором ГА (0,1 М HEPES буфер, pH 7,4, при комнатной температуре) в течение 21 суток, с заменой раствора на 2-й и 7-й дни;
- (2) обработка 5% раствором ДЭ (0,1М HEPES буфер, pH 7,4, при комнатной температуре) в течение 14 суток, с заменой раствора на 3-й день.

Иммобилизацию Бф проводили согласно технологии, описанной в Главе 4 [Журавлева и др., 2017b; Zhuravleva и др., 2020]. После завершения каждого метода консервации биоматериал хранили в биоцидном растворе оригинального состава [Журавлева, 2014].

Образцы стенки ксенокондуита Contegra (Contegra pulmonary valved conduit, Medtronic, Миннеаполис, Миннесота, США) использовались в качестве контрольной группы для сравнения с экспериментальными образцами ЯВ-стенки. Данный протез является наиболее широко применяемым в клинической практике, а его долгосрочные результаты, в частности скорость кальцификации, подробно освещены в научной литературе [Harris и др., 2023; Hazekamp и др., 2021; Herrmann, Brown, 2020; Singh и др., 2025].

Образцы для имплантации были подготовлены в виде фрагментов размером 6×6 мм.

5.2.3 Подкожная имплантации биоматериала мелким лабораторным животным (крысам)

Для исследований подкожной имплантации было отобрано 200 здоровых лабораторных животных – 4-недельные самцы крыс Wistar массой 70–100 г [Журавлева и др., 2016a; Журавлева и др., 2017b].

Перед проведением хирургического вмешательства животные были анестезированы с использованием севофлурана, после чего выполнена стандартная подготовка операционного поля. На дорсальной поверхности тела было сделано шесть надрезов и подготовлены подкожные карманы для имплантации образцов биоматериала. Шесть образцов разных типов были имплантированы одному

животному [Zhuravleva и др., 2018]. Каждый карман помещали только один образец, после чего подкожное ложе ушивали отдельным швом. Десять образцов каждой группы были экспантированы на 10-й, 30-й и 60-й дни эксперимента [Zhuravleva и др., 2020]. После промывки стерильным 0,9% NaCl, шесть из них помещали в 10% нейтральном забуференном растворе формалина для последующего гистологического анализа, а четыре – фиксировали в расплавленном состоянии и высушивали при комнатной температуре для проведения сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) в сочетании с энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией (ЭДС). Оставшиеся 60-дневные экспланты (n=175) были высушены при 60 °C для количественного анализа кальция.

5.1.4 Микроскопическое исследование образцов

Все образцы, как неимплантированные, так и экспантированные, фиксировали в 10% нейтральном забуференном растворе формалина. Для гистологического анализа ткани обезживали и заливали в парафин (MT Point, Санкт-Петербург, Россия). Срезы толщиной 6 мкм неимплантированных образцов были окрашены трихромом по Маллори с использованием набора Picro Mallory Trichrome Stain Kit (Bio-Optica Milano SpA, Милан, Италия) для визуализации коллагеновых и эластиновых волокон. Окрашивание по фон Коссу (Биовитрум, Санкт-Петербург, Россия) было применено для определения наличия фосфата кальция в экспантированных образцах. Исследование проводили с помощью светового микроскопа (Axioskop 40, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Геттинген, Германия).

5.1.5 Сканирующая электронная микроскопия

Все образцы были покрыты проводящим углеродным слоем толщиной 25–30 нм с использованием установки GVC-3000 Thermal Evaporation Carbon Plating Instrument

(KYKY TECHNOLOGY Co., Ltd., Пекин, Китай). Анализ образцов методом СЭМ и ЭДС, а также элементное картирование выбранных участков проводились с использованием сканирующего электронного микроскопа высокого разрешения WIN SEM A6000LV (KYKY TECHNOLOGY Co., Ltd., Пекин, Китай), оснащённого системой AzTec One EDX (Oxford Instruments, Абингдон, Великобритания). Наблюдение за образцами осуществляли с использованием детектора вторичных электронов при ускоряющем напряжении 20 кэВ, силе электронного пучка 150 мкА, диаметре электронного пучка 8–9 нм и время сбора спектра 20 с. Размер зоны генерации рентгеновского излучения в областях кальциевых депозитов составлял 2–3 мкм. Анализ выполнялся в точечном режиме либо путем сканирования областей размером до 10×10 мкм². На основании полученных спектров рассчитывали атомное отношение Ca/P для каждой группы образцов.

5.1.6 Количественная оценка накопления кальция

Эксплантированные 60-дневные образцы биоматериала дегидратировали, взвешивали и гидролизовали в 5 мл 14 М азотной кислоты при 100 °С, а затем полностью высушивали в струе воздуха. Гидролизаты восстанавливали в 1 мл 12 М соляной кислоты, смешанной с 0,1 мл 0,25% буферного хлорида лантана. Количественное определение кальция проводили с помощью атомно-абсорбционного спектрофотометра Thermo Solaar M6 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) [Zhuravleva и др., 2018].

5.1.7 Методы статистического анализа

Анализ данных выполняли с использованием R Statistical Software (v4.4.1; R Core Team, 2025) [R Core Team, 2025].

Непрерывные данные описаны как медиана (median, Me) и межквартильный интервал (interquartile range, IQR). Для сравнения 2 групп использовался критерий Манна–Уитни (Mann-Whitney U-test), для сравнения 3 или более групп применяли непараметрический дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса (Kruskal–Wallis non-parametric analysis). Значение $p < 0,05$ расценивали как статистически значимое.

5.2 Результаты

Все процедуры по имплантации и эксплантации образцов биоматериалов были успешно выполнены. Все животные пережили запланированный период наблюдения, при этом не было зарегистрировано ни одного случая непредвиденной смерти.

5.2.1 Анализ неимплантированных образцов

Методы консервации, использованные в этом исследовании, не повлияли на микроструктуру биоматериала. Все биоматериалы различались по соотношению коллагена и эластина, что наглядно видно при окрашивании по Маллори (Рисунок 5.1). Ткань перикарда в основном состояла из коллагена, и лишь небольшое количество клеток было обнаружено в межфибриллярном пространстве. Для ЯВ-стенки было характерно наличие как коллагеновых, так и эластиновых волокон. Толстые волокна эластина были направлены продольно и циркулярно к оси сосуда; их плотность была примерно одинаковой во всех образцах. Более того, структура ЯВ-стенки не зависела от территориального происхождения биоматериала; стенка вены с местной скотобойни была похожа по структуре на стенку Contegra. Аортальная стенка характеризовалась небольшим количеством коллагена и плотной сетью эластиновых волокон. В средней оболочке (медии) выявлено значительное количество гладкомышечных клеток (ГМК).

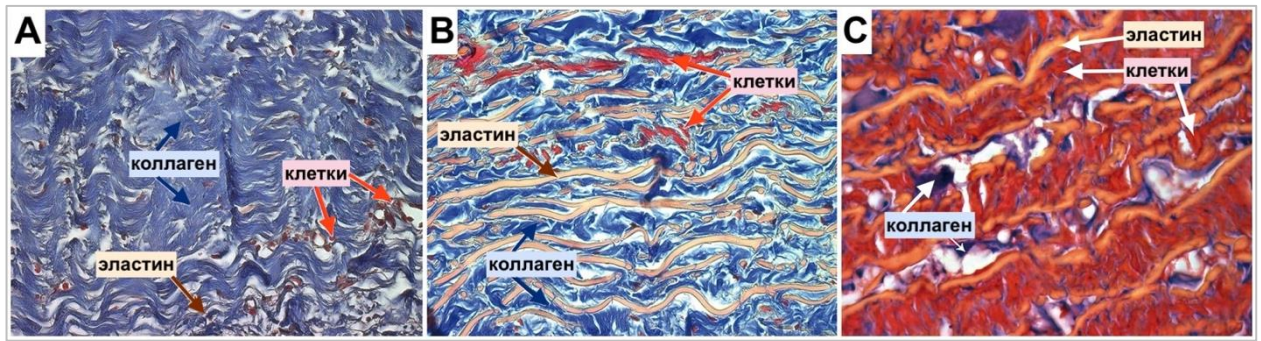


Рисунок 5.1 – Микроструктура консервированного биоматериала.

А – лоскут бычьего перикарда. В – стенка бычьей яремной вены. С – стенка свиного аортального корня (средняя оболочка). Окраска по Маллори. Волокна коллагена – синие; волокна эластина – желтые; гладкомышечные клетки и другие клеточные структуры – красные. Увеличение $\times 1000$

5.2.2 Микроструктурные изменения в образцах через 10, 30 и 60 дней подкожной имплантации

Согласно результатам гистологического анализа, образцы, обработанные ГА, демонстрировали наибольший уровень минерализации. Первичные очаги кальцификации были выявлены в глубоких слоях всех исследованных тканей, однако их локализация различалась: субэндотелиально и субадвентициально в Ао-корне; ближе к субинтимальной поверхности в ЯВ-стенке; а также в центральной части поперечных сечений ПК-лоскута. Из этих первичных очагов минерализация прогрессировала наружу во всех направлениях. Материалы, модифицированные Бф, также демонстрировали ускоренную кальцификацию, при этом кальциевые депозиты формировались во всех типах ГА-сшитых материалов уже к 10-му дню подкожной имплантации (Рисунок 5.2А, 5.2С).

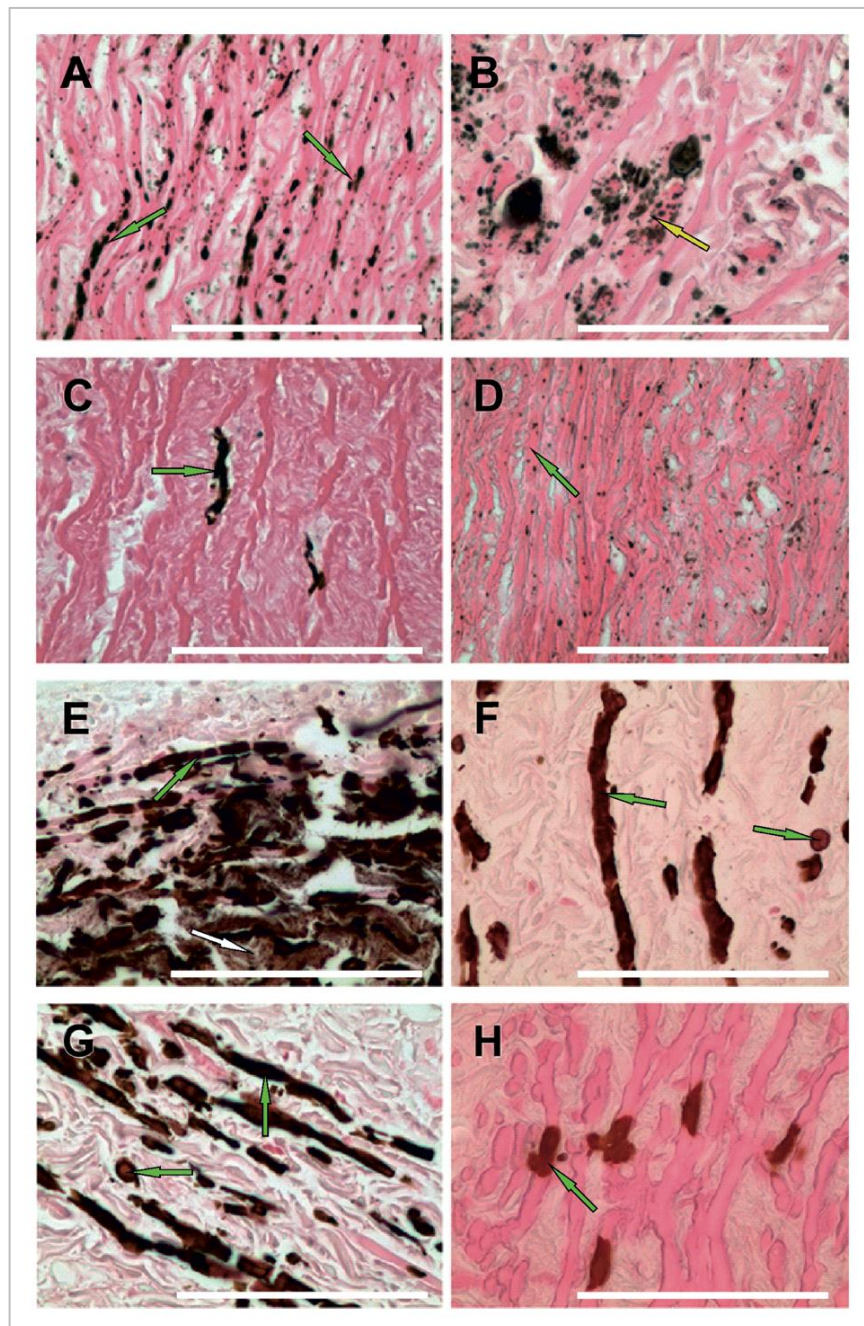


Рисунок 5.2 – Кальциевые депозиты в Ао-корне через 10 дней после подкожной имплантации (А-D) и в ЯВ-стенке через 30 дней эксперимента (Е-F). Окраска по фон Коссу. А – ГА-фиксированная стенка Ао-корня. В – ДЭ-консервированная стенка Ао-корня. С – ГА-обработанная стенка Ао-корня, модифицированная Пам. D – ДЭ-обработанная стенка Ао-корня, модифицированная СЕАВА. Е – ГА-фиксированная ЯВ-стенка. F – ДЭ-консервированная ЯВ-стенка. G – ГА-обработанная ЯВ-стенка, модифицированная Пам. H – ДЭ-обработанная ЯВ-стенка, модифицированная Ален.

Зелены стрелки указывают на отложения кальция в эластине, желтые стрелки – на гладкомышечных клетках, белые стрелки – на коллаген. Масштабная линейка – 100 мкм

В образцах Ао-корня, независимо от метода обработки, включая модификации Бф, фосфаты кальция были верифицированы уже на 10-й день имплантации (Рисунок 5.2, Рисунок 5.3А-С). В тканях, консервированных как ГА, так и ДЭ, начальные кальциевые отложения были ассоциированы с эластиновыми волокнами (Рисунок 5.2А, Рисунок 5.3А-С) и нежизнеспособными клеточными элементами – ГМК (Рисунок 5.2В).

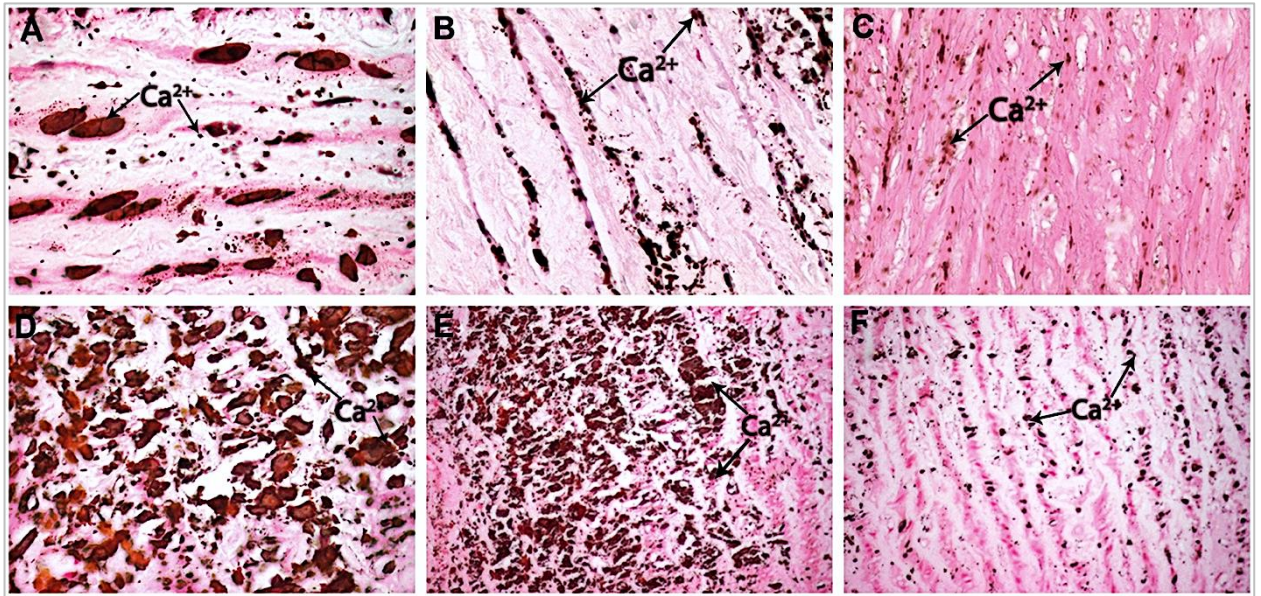


Рисунок 5.3 – Микрофотографии эксплантированных образцов стенки Ао-корня через 10 (А–С) и 60 дней подкожной имплантации (D–F). Окраска по фон Коссу. Увеличение $\times 1000$ (В, С, D) и $\times 400$ (А, Е, F). А, D – Образцы, фиксированные ГА.

В, Е – Образцы, консервированные ДЭ. С, F – ДЭ-фиксированные образцы, модифицированные СЕАВА. Ca^{2+} , кальций

Образцы Ао-корня, обработанные ГА, продемонстрировали наибольший уровень минерализации (Рисунок 5.3). На 10-й день после имплантации в стенке ГА-Ао-корня были выявлены кальциевые кристаллы, равномерно распределённые по всей ткани и связанные с эластином и ГМК (Рисунок 5.3А). К 30-му дню в образцах наблюдались значительные структурные изменения: выраженная минерализация нарушила архитектуру волокон и общую структуру ткани, сопровождаясь множественными разрывами и расщеплениями волокон по всему срезу. Обработка Бф способствовала снижению накопления кальция во всех временных точках. Модифицированные СЕАВА и Пам образцы ГА-

консервированного Ао-корня характеризовались наличием единичных кальциевых включений на 10-й день после имплантации (Рисунок 5.2С). К 30-му дню минерализация в ГА-Ао-корня, модифицированного Бф, усилилась, а кальциевые отложения характеризовались неправильной формой.

Диэпокси-обработанный Ао-корень также демонстрировал значимую минерализацию. Первичные кальциевые очаги были выявлены уже на 10-й день после имплантации (Рисунок 5.3В) и строго соответствовали расположению эластиновых волокон в ткани. На 30-й день подкожной имплантации были визуализированы крупные кластеры, вызывающие разрыв и расщепление волокон. Модификация Бф в образцах ДЭ-фиксированного Ао-корня позволила отсрочить начало процесса минерализации.

В образцах, модифицированных Пам и СЕАВА, на 10-й день отмечены пылевидные кальциевые отложения (Рисунок 5.2D, Рисунок 5.3С), которые к 30-му дню увеличивались в размере и были равномерно распределены по поверхности среза. Другие исследованные Бф практически не влияли на замедление кальцификации ДЭ-обработанного Ао-корня, и их микроскопические изображения были схожи с немодифицированными образцами.

К 60-му дню подкожной имплантации наблюдалось увеличение массы кристаллов фосфата кальция во всех исследованных образцах фиксированного Ао-корня (Рисунок 5.3D-F).

Образцы ЯВ-стенки, обработанные ГА и ДЭ, уже на 10-й день подкожной имплантации демонстрировали кальциевые депозиты, локализованные преимущественно в эластиновых волокнах (Рисунок 5.4А, 5.4В). При этом интенсивность минерализации была выше в ГА-консервированных образцах.

Кристаллы фосфата кальция, выявленные в волокнах эластина на 10-й день (Рисунок 5.5А), значительно увеличились к 30-му дню, что сопровождалось нарушением ориентации волокон и деструкцией ткани. В некоторых участках эластиновые волокна подвергались разрывам и были включены в крупные минеральные кластеры. Кроме того, в данных образцах наблюдалась кальцификация коллагеновых волокон (Рисунок 5.2Е). Обработка Бф подавляла

формирование кальциевых отложений, что приводило к снижению структурных повреждений как к 10-у, так и 30-у дню подкожной имплантации.

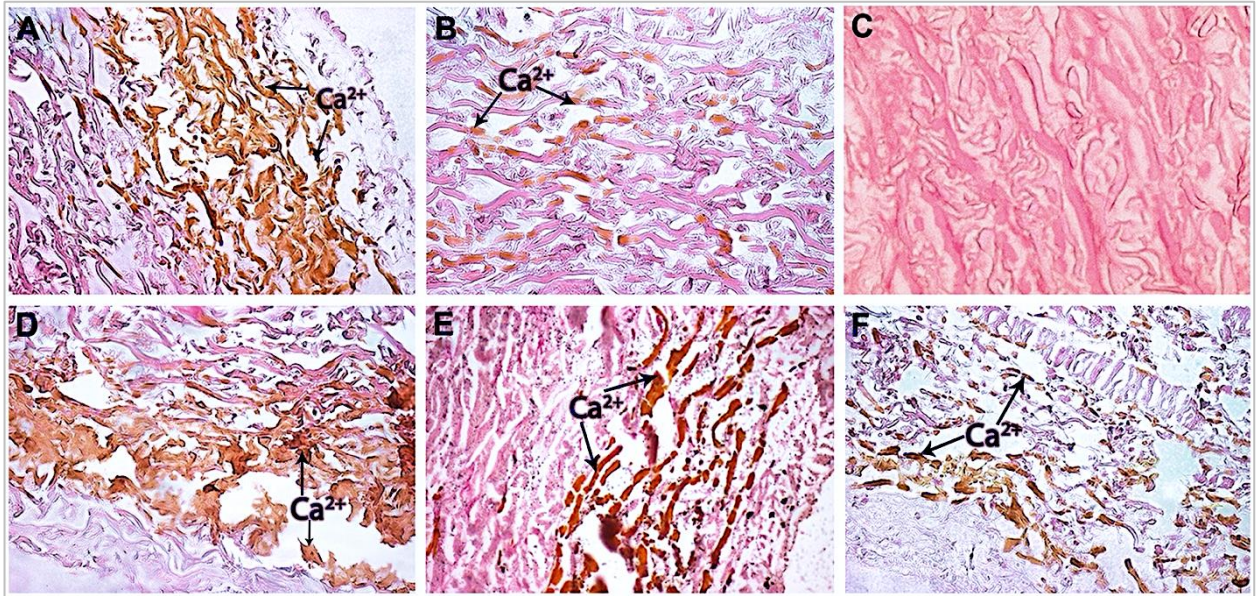


Рисунок 5.4 – Микрофотографии эксплантированных образцов ЯВ-стенки через 10 (А–С) и 60 дней подкожной имплантации (D–F). Окраска по фон Коссу.

Увеличение $\times 400$. А, D – Образцы, фиксированные ГА. В, Е – Образцы, консервированные ДЭ. С, F – ДЭ-фиксированные образцы, модифицированные СЕАВА. Ca^{2+} , кальций

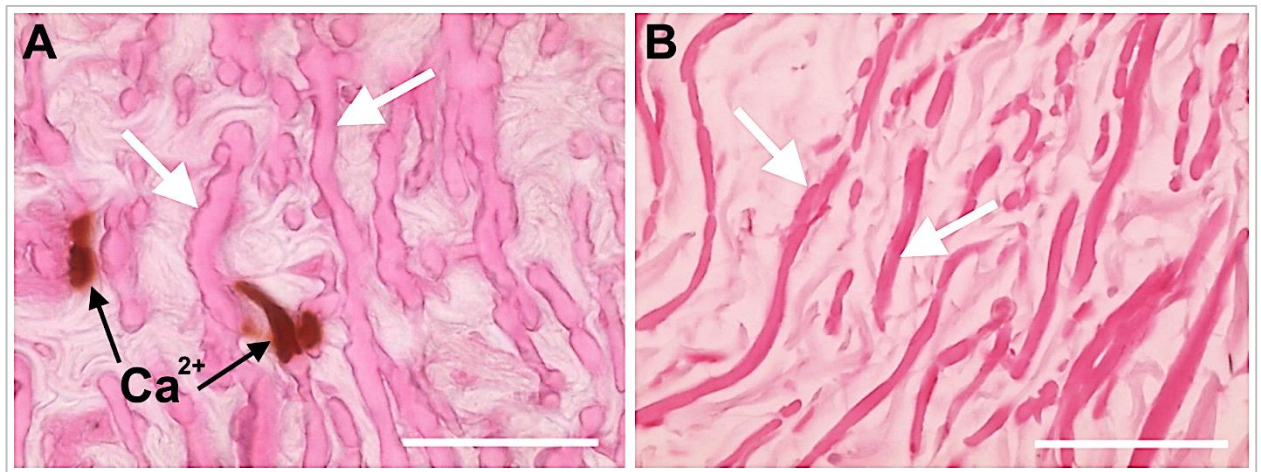


Рисунок 5.5 – Микроструктура ГА и ДЭ-фиксированных образцов ЯВ-стенки, модифицированных Бф, через 10 дней после подкожной имплантации. Окраска по фон Коссу. А – ГА-обработанная ЯВ-стенка, модифицированная СЕАВА. В – ДЭ-обработанная ЯВ-стенка, модифицированная Алел. Черные стрелки указывают на депозиты кальция, белые стрелки – на волокна эластина. Масштабная линейка – 50 мкм. Ca^{2+} , кальций

Образцы ДЭ-фиксированной ЯВ-стенки демонстрировали значительно меньшую склонность к минерализации, несмотря на наличие кальциевых отложений уже на 10-й день подкожной имплантации (Рисунок 5.4В). Ткани ДЭ-ЯВ, модифицированные Бф, оставались свободными от минеральных депозитов на 10-й день эксперимента (Рисунок 5.4С, Рисунок 5.5В), однако к 30-му дню в стенке данных образцов были выявлены очаги кальцификации, локализованные вдоль эластиновых волокон (Рисунок 5.2F). Кальцификация эластина присутствовала во всех образцах ЯВ-стенки, консервированных как ГА, так и ДЭ, независимо от типа примененного Бф (Рисунок 5.2G, Рисунок 5.2H).

К 60-му дню подкожной имплантации выявлено увеличение массы кальциевых депозитов во всех исследованных образцах консервированной ЯВ-стенки. Вместе с этим отмечена структурная деградация ткани, проявляющаяся в истончении эластиновых волокон, разволокнении и лизисе коллагена, а также инфильтрации клетками реципиента.

Такими образом, в биоматериалах Ао-корень и ЯВ-стенка процесс кальцификации преимущественно инициировался на волокнах эластина.

Фиксированные глутаровым альдегидом ПК-лоскуты характеризовались выраженной минерализацией (Рисунок 5.6). Уже на 10-й день после имплантации были отмечены массивные отложения фосфата кальция в коллагеновых волокнах, которые к 30-му дню формировали крупные кластеры. Высокий уровень депонирования фосфата кальция существенно ухудшал морфологическую структуру ткани. Дополнительная обработка Бф замедляла накопление кальция в ГА-ПК, однако к 30-му дню подкожной имплантации образцы содержали множественные кальциевые депозиты различных размеров (Рисунок 5.6).

К 60-му дню эксперимента присутствовал значительный рост минеральных отложений во всех исследованных образцах.

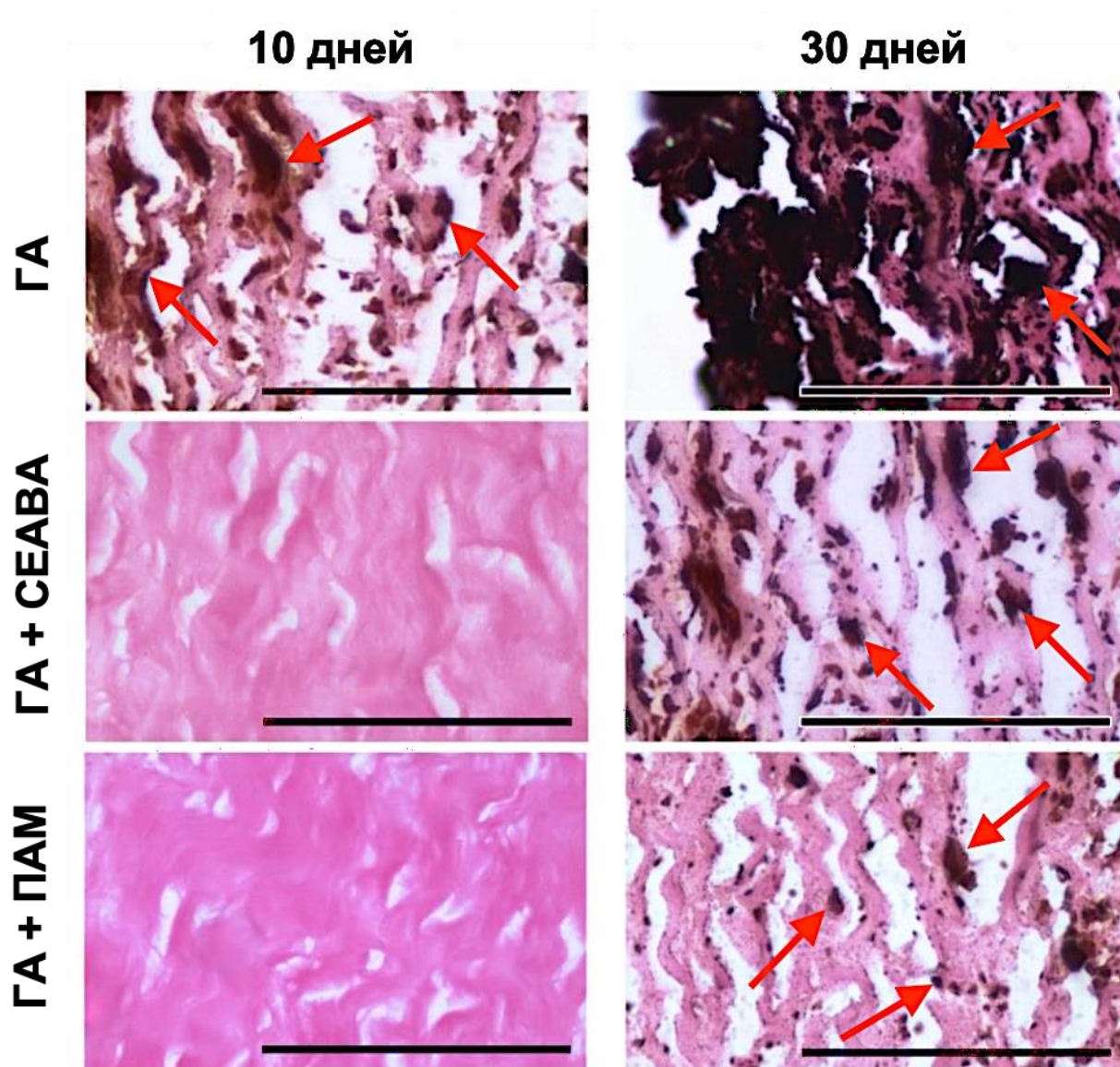


Рисунок 5.6 – Микрофотографии эксплантированных образцов ГА-консервированного ПК-лоскута. Окрашивание по фон Коссу. Красная стрелка указывает на кальциевые депозиты, фосфаты кальция были связаны с коллагеновыми волокнами. Масштабная линейка – 100 мкм. СЕАВА, 2-(2-карбоксиэтиламино)этилиден-1,1-бисфосфоновая кислота; ГА, глутаровый альдегид; Пам, памидроновая кислота

Диэпокси-обработанный ПК-лоскут не проявлял гистологических признаков минерализации к 30-му дню эксперимента (Рисунок 5.7). Кальциевые кластеры в ДЭ-фиксированном ПК-лоскуте не были выявлены даже через 60 дней подкожной имплантации, независимо от применения модификации Бф.

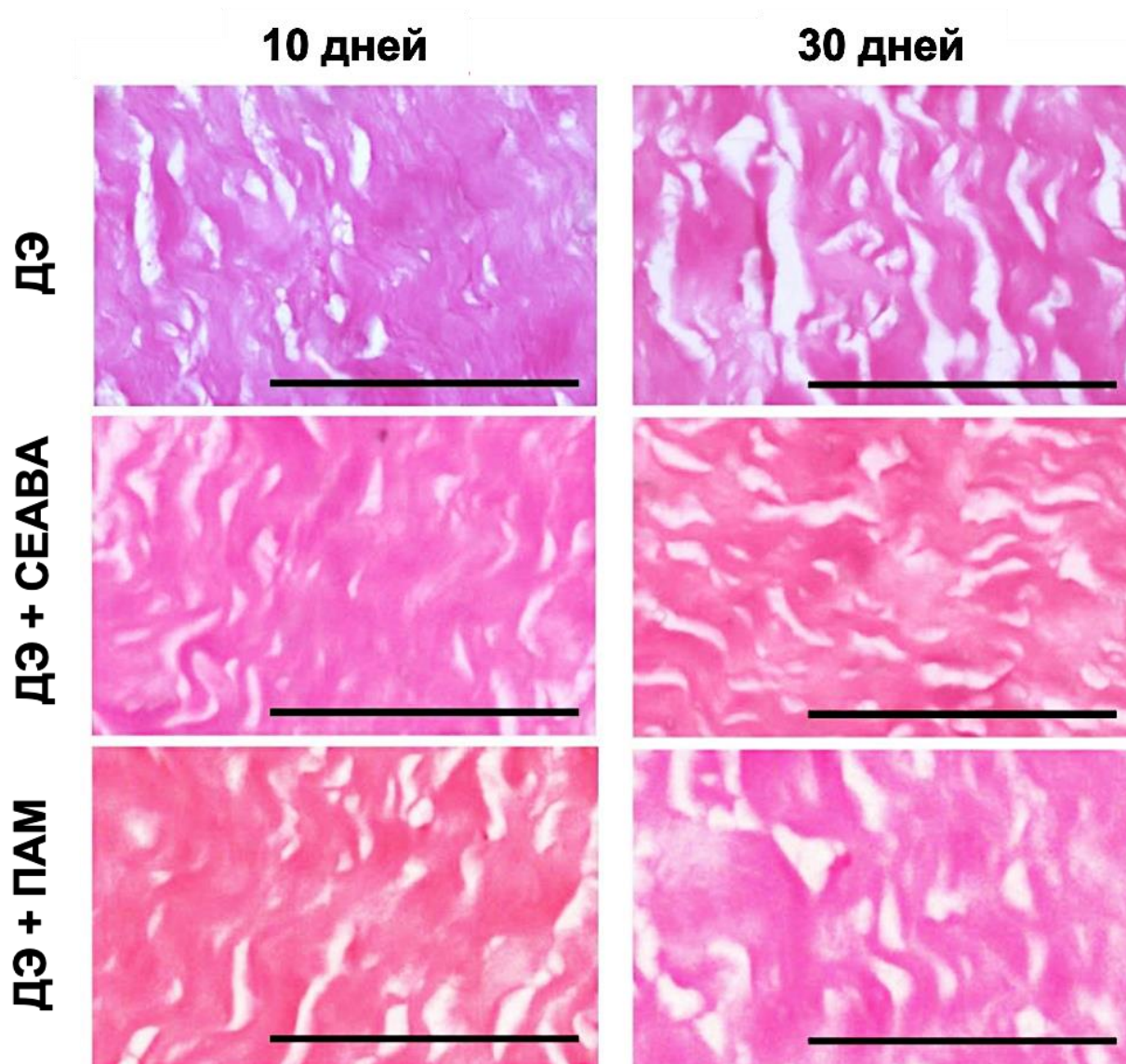


Рисунок 5.7 – Микрофотографии эксплантированных образцов ДЭ-консервированного ПК-лоскута, все образцы были свободны от отложений кальция в течение 10 и 30 дней после имплантации. Окрашивание по фон Коссу. Масштабная линейка – 100 мкм. СЕАВА, 2-(2-карбоксиэтиламино)этилиден-1,1-бисфосфоновая кислота; ДЭ, диэпоксид; Пам, памидроновая кислота

5.2.3 Сканирующая электронная микроскопия образцов через 10, 30 и 60 дней подкожной имплантации

На всех исследуемых образцах с признаками минерализации в каждый временной интервал (10-, 30- и 60 дней) были обнаружены электронно-плотные частицы с высоким содержанием кальция.

На 10-й день подкожной имплантации данные частицы были особенно многочисленны на поверхностях образцов ГА-Ао-корня и ГА-ПК, а также на Бф-модифицированных ДЭ-Ао-корня и ГА-ПК. В образцах ГА-Ао-корня кальциевые отложения, выявленные на 10-й день, представлены гидроксиапатитами с дефицитом кальция и отношением Са/Р, равным 1,34. Сопоставимые значения были зафиксированы для ГА-ПК (Са/Р = 1,51), тогда как в образцах ГА-ЯВ соотношение Са/Р было существенно ниже и составило 0,25. В течение первых десяти дней в частицах на поверхности Бф-модифицированных образцов ГА-Ао-корня преобладал фосфор (Са/Р = 0,2–0,4), тогда как в Бф-модифицированных образцах ГА-ПК доминировал кальций (Са/Р = 3,3–6,3). Такие частицы с высоким содержанием кальция, вероятно, представляют собой карбонаты или карбонатные апатиты. Электронно-плотные частицы, обнаруженные на поверхностях Бф-модифицированных образцов ГА-ЯВ, также характеризовались преобладанием кальция.

К 30-му дню значительные участки поверхности образцов ДЭ-Ао-корня (Рисунок 5.8) и ГА-ПК (Рисунок 5.9) были покрыты кальциевыми фосфатами, преимущественно гидроксиапатитами различной степени насыщения, при этом частицы с преобладанием кальция отсутствовали. В образцах ГА-Ао-корня соотношение Са/Р увеличилось до 1,4, тогда как для ГА-ПК наблюдалось прогрессивное повышение содержания фосфора и увеличение Са/Р до 1,7. В образцах ГА-ЯВ соотношение Са/Р возросло с 0,25 до 1,35, что свидетельствует о формировании ненасыщенного гидроксиапатита. На поверхностях Бф-модифицированных образцов ГА-Ао-корня и ГА-ПК, а также на поверхностях ДЭ-ПК и Бф-модифицированных ДЭ-ПК были выявлены отложения гиперкальция.

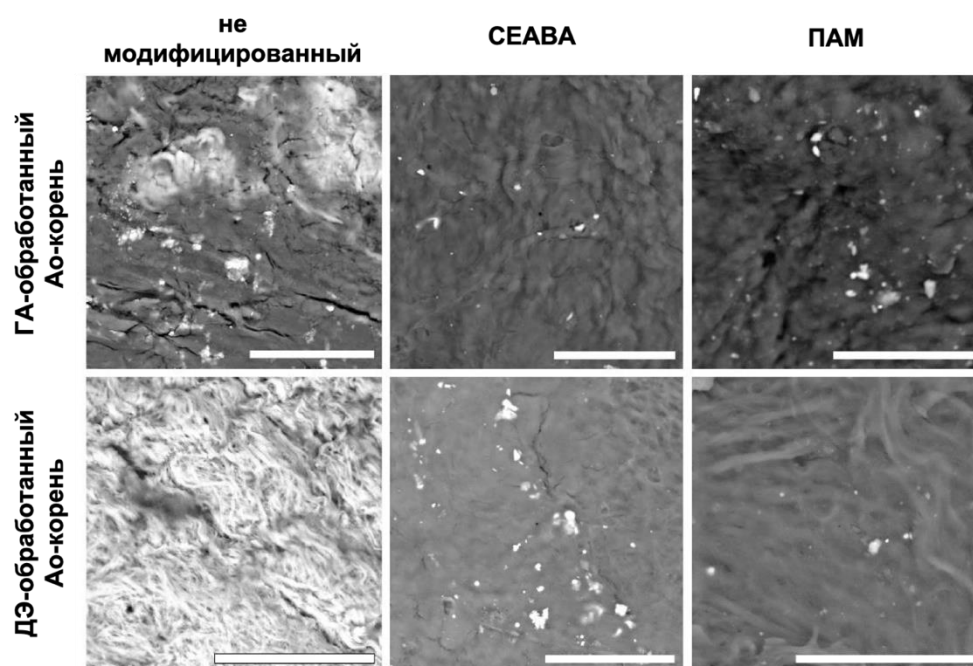


Рисунок 5.8 – СЭМ-снимки поверхности образцов Ао-корня через 30 дней после подкожной имплантации крысам. Масштабная линейка – 50 мкм. СЕАВА, 2-(2-карбоксиэтиламино)этилиден-1,1-бисфосфоновая кислота; Ао-корень, свиной аортальный корень; ГА, глутаровый альдегид; ДЭ, диэпоксид; Пам, памидронат

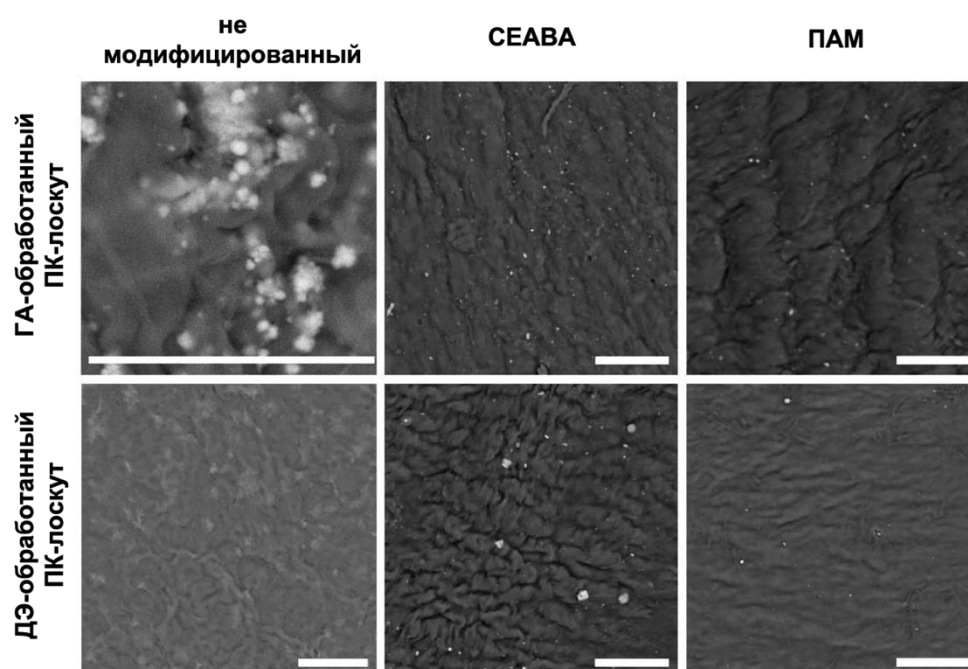


Рисунок 5.9 – СЭМ-снимки поверхности образцов ПК-лоскута через 30 дней после подкожной имплантации крысам. Масштабная линейка – 50 мкм. СЕАВА, 2-(2-карбоксиэтиламино)этилиден-1,1-бисфосфоновая кислота; ГА, глутаровый альдегид; ДЭ, диэпоксид; Пам, памидронат; ПК-лоскут, лоскут бычьего перикарда

В течение 30-дневного периода для немодифицированных и модифицированных образцов ДЭ-ПК отмечено увеличение соотношения Са/Р до значений 3,5–4,5. Аналогичная тенденция была зафиксирована для модифицированных и немодифицированных образцов ДЭ-ЯВ, в отличие от Бф-модифицированных образцов ГА-ЯВ.

К 30-му дню образцы ГА-ЯВ, обработанные СЕАВА и Пам, продемонстрировали заметные различия в соотношении кальция и фосфора (Рисунок 5.10). Образцы, модифицированные Пам, характеризовались значительно более низким значением Са/Р — 0,51, тогда как для образцов, обработанных СЕАВА, это соотношение составляло 1,46.

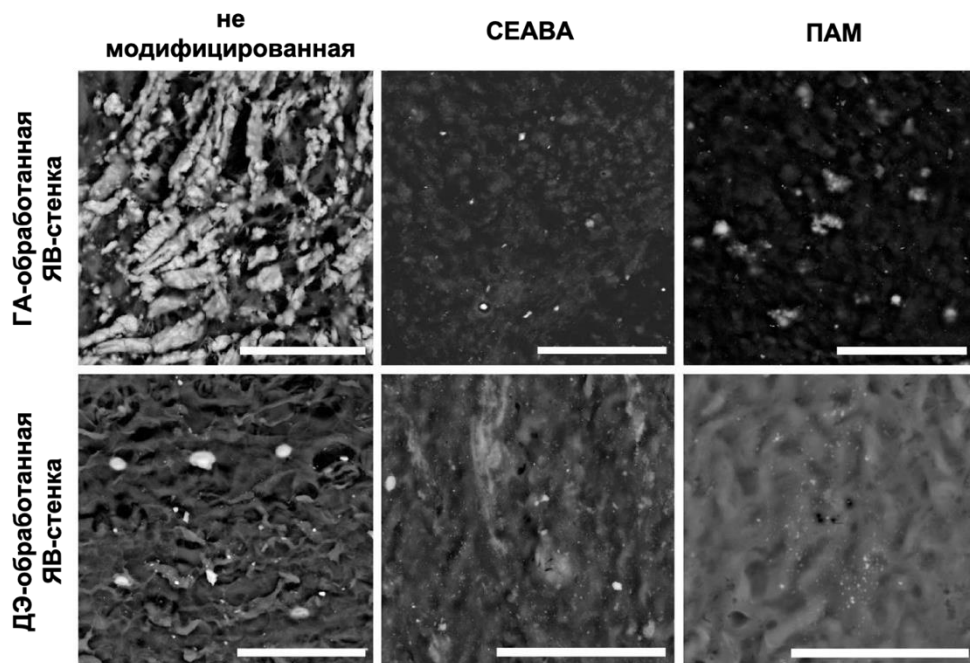


Рисунок 5.10 – СЭМ-снимки поверхности образцов ЯВ-стенки через 30 дней после подкожной имплантации крысам. Масштабная линейка – 50 мкм. СЕАВА, 2-(2-карбоксиэтиламино)этилиден-1,1-бисфосфоновая кислота; ГА, глутаровый альдегид; ДЭ, диэпоксид; Пам, памидроновая кислота; ЯВ-стенка, стенка яремной вены быка

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что модификация биоматериала бисфосфонатами существенно влияет на взаимодействия кальция и фосфора, а также на соотношение их накопления в различных образцах. Различия в минерализационных процессах преимущественно

обусловлены вариациями в химической структуре бисфосфонатов и их специфическим взаимодействием с консервированными тканями.

К 60-му дню подкожной имплантации не выявлено значимых изменений в соотношении Са/Р по сравнению с тенденциями, наблюдаемыми в 30-дневных образцах. При увеличении продолжительности эксперимента отмечался рост количества и массы электронно-плотных частиц в исследуемых образцах.

5.2.4 Количественная оценка кальцификации эксплантированных образцов через 60 дней подкожной имплантации

Все ГА-обработанные биоматериалы показали высокую активность связывания кальция. Наибольшее депонирование Са было отмечено в ПК-лоскуте (Рисунок 5.11).

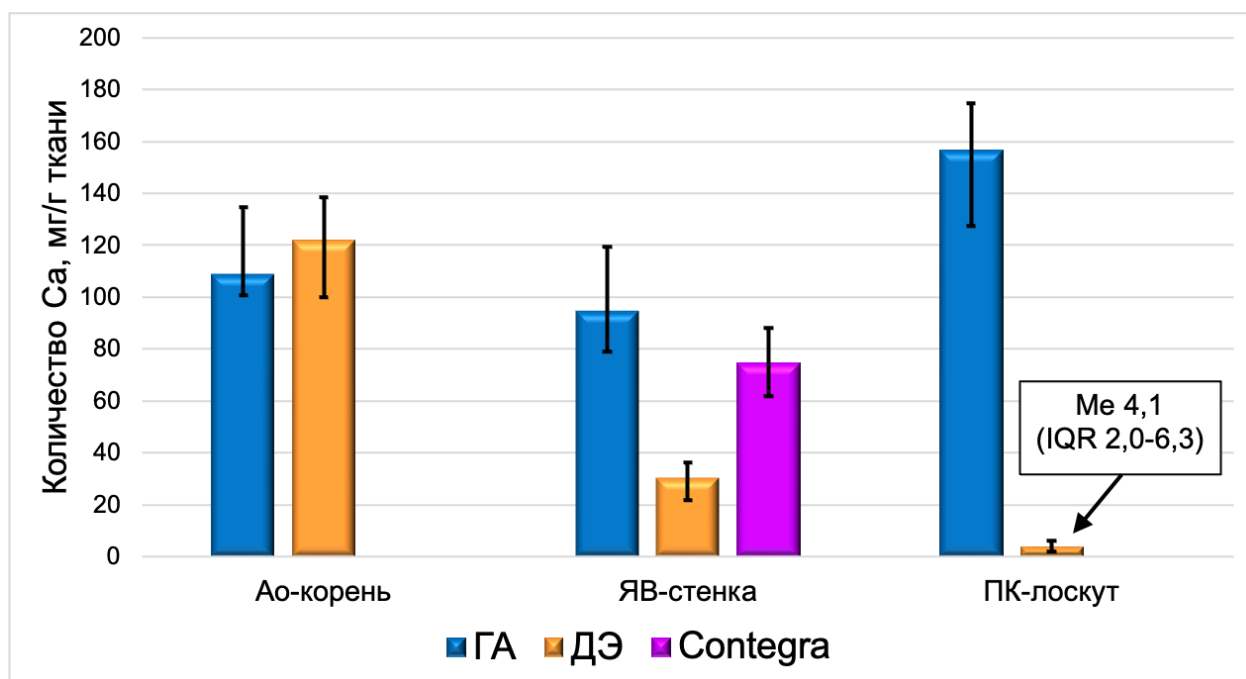


Рисунок 5.11 – Содержание кальция в ГА- и ДЭ-обработанных биоматериалах после 60 дней подкожной имплантации крысам. Са, кальций; IQR (interquartile range), межквартильный интервал; Me (median), медиана; Ао-корень, свиной аортальный корень; ГА, глутаральдегид; ДЭ, диэпоксид; ПК-лоскут, лоскут бычьего перикарда; ЯВ-стенка, стенка яремной вены быка

Количество кальция в стенке Ао-корня достоверно не менялось в зависимости от метода консервации. В то же время, накопление кальция в ЯВ-стенке, обработанной диэпоксидом, было в 3 раза ниже по сравнению с образцами, консервированными ГА, и в 2,4 раза ниже, чем в стенке кондуита Contegra. Кроме того, минерализация ЯВ-стенки, обработанной ДЭ, была в 3,5–4 раза ниже, чем Ао-корня, фиксированного как ГА, так и ДЭ. В отношении ПК-лоскута, содержание кальция в ДЭ-консервированных образцах оказалось в 40 раз ниже, чем в тканях, обработанных ГА.

Антикальцевая эффективность модификации Бф варьировала в зависимости от типа биоматериала (Рисунок 5.12).

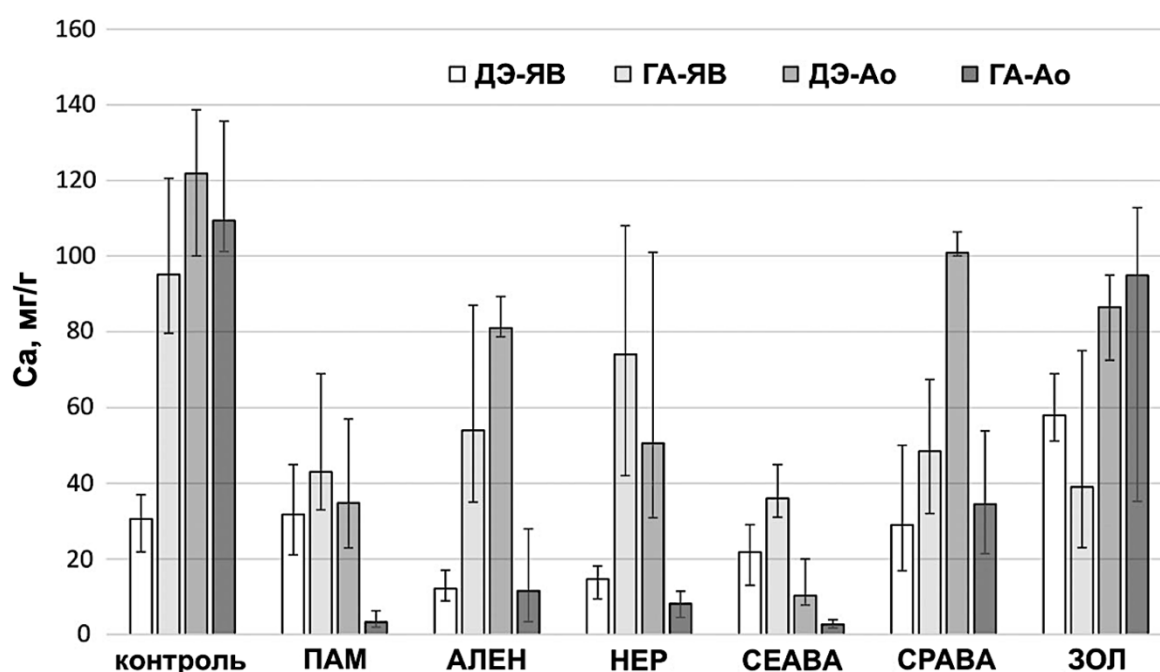


Рисунок 5.12 – Содержание кальция в ГА- и ДЭ-обработанных Ао-корне и ЯВ-стенке, модифицированных Бф, после 60 дней подкожной имплантации крысам.

Са, кальций; СЕАВА, 2-(2-карбоксиэтиламино)этилиден-1,1-бисфосфоновая кислота; СРАВА, 2-(5-карбоксипентиламино)этилиден-1,1-бисфосфоновая кислота; Аллен, аллендроновая кислота; ГА, глутаровый альдегид; ГА-Ао, свиной аортальный корень, обработанный глутаровым альдегидом; ГА-ЯВ, яремная вена быка, обработанная глутаровым альдегидом; ДЭ, диэпоксид; ДЭ-Ао, свиной аортальный корень, обработанный диэпоксидом; ДЭ-ЯВ, яремная вена быка,

обработанная диэпоксидом; Зол, золедроновая кислота; Нер, неридроновая кислота; Пам, памидроновая кислота

Образцы ЯВ-стенки, обработанные ГА, демонстрировали схожий уровень накопления кальция независимо от типа иммобилизованного Бф. Незначительное снижение кальцификации было достигнуто при иммобилизации Пам, СЕАВА и СРАВА ($p=0,003$, $p<0,001$ и $p=0,003$ соответственно). В образцах ДЭ-обработанной ЯВ-стенки более выраженное уменьшение минерализации ткани ($p<0,001$) отмечено при иммобилизации Ален и Нер.

Обработка Бф типов 1 и 2 оказалась наиболее эффективной для ГА-фиксированного Ао-корня, при этом максимальное снижение степени кальцификации в данном биоматериале достигалось посредством иммобилизации Пам и СЕАВА. Наименьшая эффективность в снижении кальцификации ГА-Ао наблюдалась при использовании СРАВА. Обработанный диэпоксидом Ао-корень показал низкую пригодность для последующей иммобилизации Бф, поскольку содержание кальция в этих образцах было преимущественно самым высоким. Значимое уменьшение накопления кальция ($p<0,001$) достигалось только при иммобилизации Пам и СЕАВА. Тем не менее, минерализация образцов ДЭ-Ао при дополнительной обработке как Пам, так и СЕАВА оставалась значительно выше, чем в соответствующих ГА-фиксированных группах ($p=0,007$ и $p=0,001$ соответственно).

Бисфосфонат типа 3 – Зол – продемонстрировал наименьшую эффективность среди исследованных Бф для эластин-содержащих биоматериалов, более того, способствовал увеличению кальцификации ЯВ-стенки, обработанной ДЭ.

Накопление кальция в ДЭ-консервированных ПК-лоскутах было минимальным как при модификации Пам, так и СЕАВА, и сопоставимо с образцами, обработанными изолированно ДЭ ($p=0,27$).

5.3 Обсуждение полученных результатов

Консервированные Ао-корень, ПК-лоскут и ЯВ-стенка, являющиеся наиболее часто применяемыми ксеногенными материалами для изготовления ЛА-кондуитов [Homann и др., 2000; Sandica и др., 2015], отличаются по микроструктуре, соотношению фибриллярных белков и аминокислотному составу (см. Глава 4). Эти различия обуславливают вариабельность кальций-связывающей активности при использовании одинаковой методики обработки биоматериала. Результаты, представленные в предыдущей главе (см. Глава 3), продемонстрировали, что обработанные ДЭ-ПК кондуиты имеют меньший риск дисфункции из-за кальцификации, в то время как минерализация Ао-корня остается высокой. Графты ГА-ЯВ также подвержены кальцификации, хотя и с меньшей интенсивностью [Lü и др., 2012]. Одной из стратегий снижения кальций-связывающей активности биоматериала является смена основного сшивающего агента. Согласно ряду исследований, обработка эпоксидными соединениями способствует значительному снижению степени минерализации тканей [Meuris, Flameng, 2008; Noishiki, Miyata, 2004; Okoshi и др., 1990; Zhou и др., 1997].

Результаты данного этапа диссертационного исследования демонстрируют, что процесс кальцификации тканей зависит от микроструктуры биоматериала, выбранного сшивающего агента и типа Бф, иммобилизованного на ткани.

Ранее было показано, что кондуиты, содержащие Ао-корень, характеризуются высокой частотой повторных вмешательств и повышенной склонностью к кальцификации, независимо от метода обработки ткани [Homann и др., 2000; Karaskov и др., 2016a; Ong и др., 2013; Wang и др., 2015]. Полученные в настоящем исследовании данные подтвердили высокую кальций-связывающую активность аортального корня. При этом данный показатель оставался высоким как при обработке ГА, так и при ДЭ-консервации. Аналогичные результаты были отмечены в предыдущих публикациях, включая исследования с использованием других эпоксидных соединений [Connolly и др., 2011; Rapoport и др., 2007]. Данный феномен связан с микроструктурными особенностями аортального биоматериала,

содержащего значительное количество эластиновых волокон и гладкомышечных клеток. Из-за своего аминокислотного профиля эластин имеет ограниченное количество реактивных групп, способных взаимодействовать с ГА или эпоксидными соединениями. Вместе с тем, эластиновые волокна характеризуются большим количеством кальций-связывающих участков. Девитализированные ГМК также обладают множеством сайтов для связывания ионов Ca^{2+} . Таким образом, увеличение скорости минерализации ткани, богатой эластиновыми волокнами и клеточными компонентами, является закономерным [Bailey и др., 2003; Paule и др., 1992; Perrotta и др., 2011; Tam и др., 2015]. Согласно нашим данным, в первые 10 дней подкожной имплантации кальций преимущественно накапливался именно на эластине. Кроме того, между эластиновыми волокнами выявлены мелкие пылевидные кристаллы фосфата кальция, которые, вероятно, формируются в остатках девитализированных ГМК, известных своей высокой нуклеационной активностью [Jorge-Herrero, Paez, Castillo-Olivares Ramos Del, 2005].

Фиксированная глутаровым альдегидом ЯВ-стенка демонстрировала тенденцию к интенсивному накоплению кальция. Гистологический анализ на 30-й день подкожной имплантации выявил крупные кальциевые депозиты как в эластиновых, так и в коллагеновых волокнах, которые с течением времени увеличивались в размерах. Через 60 дней эксперимента количество кальция в ЯВ-образцах было сопоставимо с таковым в Ао-корне. Примечательно, что стенка кондуита Contegra накапливала на 33% меньше кальция ($p=0,037$) по сравнению с ГА-фиксированными образцами ЯВ. Вероятной причиной этих различий является специфическое действие коммерческого раствора для хранения ксенокондуита Contegra. Этот раствор содержит 20% раствор изопропанола, что может способствовать снижению количества остаточных альдегидных групп, участвующих в кальцификации [Park и др., 2017; Singla, Lee, 2003]. Обработка диэпоксидом обеспечивала снижение степени минерализации ЯВ-стенки по сравнению с образцами ГА-ЯВ и Contegra, что, предположительно, обосновывается подавлением связывания кальция в участках, содержащих коллаген. Тем не менее,

очаговая минерализация эластина присутствовала в ДЭ-ЯВ уже на 10-й день подкожной имплантации.

Образцы ГА-консервированного бычьего перикарда характеризовались наиболее высокой кальций-связывающей активностью. Известно, что накопление кальция в ПК-лоскуте начинается в области между наружным серозным и средним фиброзным слоями, при этом центрами нуклеации служат не столько девитализированные клеточные элементы, сколько коллагеновые волокна [Liu и др., 2014]. Замена консервирующего агента с ГА на ДЭ продемонстрировала эффективное подавление минерализации перикардальной ткани: кальциевые кластеры не выявлялись даже спустя 60 дней подкожной имплантации, а уровень содержания кальция оказался в 40 раз ниже, чем в образцах, обработанных ГА. Коллаген, фиксированный ГА, а также ГМК выступают в роли сильных кальциевых нуклеаторов. Использование ДЭ в качестве сшивающего агента блокирует кальцификацию ПК-лоскута на ранней стадии, предотвращая образование кальций-связывающих сайтов [Барбараш, 1995]. ДЭ-консервированный перикард не проявил признаков минерализации при подкожной имплантации, тогда как ЯВ-стенка яремной вены, фиксированная диэпоксидом, демонстрировала значительно меньшую степень кальцификации по сравнению с ГА-фиксированными образцами и кальцинировалась преимущественно за счет эластиновых волокон.

Модификация ткани посредством ковалентной иммобилизации Бф на реактивные альдегидные или эпоксидные группы, остающиеся доступными после сшивания, может выступать дополнительным механизмом антикальциевой защиты. При этом бисфосфонаты, иммобилизованные на ткани, способны ингибировать образование и рост кристаллов фосфата кальция за счёт сильной хемоадсорбции на поверхности гидроксиапатита [Van Gelder и др., 1997].

Дополнительная обработка Бф значительно снижала минерализацию аортального корня, однако не обеспечивала её полного подавления, что подтверждается наличием кальциевых отложений в образцах после 10 дней подкожной имплантации. Мы предполагаем, что бифункциональный сшивающий

агент — ГА и ДЭ — интенсивно взаимодействует с белками аортальной стенки, а оставшиеся реактивные группы затем связываются с иммобилизованными Бф. Тем не менее, несвязанный эластин активно кальцифицируется за счёт большого количества кальций-связывающих участков, что приводит к раннему формированию минеральных депозитов. Более того, обработка Ао-корня диэпоксидом способствовала усилению минерализации, несмотря на модификацию бисфосфонатами. Полученные результаты 60-дневной подкожной имплантации свидетельствуют о недостаточной эффективности данной антикальциевой стратегии для аортального корня в долгосрочной перспективе.

Наши данные противоречат результатам более раннего исследования [Rapoport и др., 2007], в котором показано, что предварительная обработка эпоксидным соединением (триглицидиламином) в сочетании с модификацией бисфосфонатами (2-(2-меркаптоэтиламино)этилиден-1,1-бисфосфоновой кислотой) [Alferiev, Connolly, Levy, 2005] значительно ингибировала кальцификацию аортальной стенки по сравнению с ГА-фиксированными образцами, модифицированными теми же бисфосфонатами. В нашем исследовании применение бисфосфонатов типов 1 и 2 было значительно эффективнее для ГА-обработанного аортального корня, чем для ДЭ-обработанного.

Учитывая высокую степень накопления кальциевых фосфатов независимо от типа обработки и иммобилизации биологических факторов, мы приходим к выводу, что аортальный корень является неподходящим биоматериалом для детских кондуитов до разработки надёжных методов консервации, предотвращающих его минерализацию. Недавние исследования указывают на потенциал альтернативных подходов, таких как сшивание процианидином [Wang и др., 2015] или комбинация неомицина и пентагаллоилглюкозы [Tripi, Vyavahare, 2014], для снижения кальцификации Ао-корня.

Кальцификация модифицированных образцов ДЭ- и ГА-ЯВ, а также немодифицированных ДЭ-ЯВ была схожей между собой и, вероятно, связана с повышенным накоплением фосфатов в структуре ЯВ по сравнению с другими биоматериалами. Дополнительная модификация Бф типов 1 и 2 замедляла

связывание кальция, однако не обеспечивала полного ингибирования данного процесса. В частности, в образцах ДЭ-ЯВ с иммобилизованными Бф на 10-й день подкожной имплантации не было выявлено минеральных депозитов. Тем не менее, к 60-му дню содержание кальция в этих образцах отличалось лишь незначительно от такового в немодифицированных ДЭ-ЯВ. Таким образом, Бф типов 1 и 2 замедляют процесс минерализации эластина, воздействуя преимущественно на вторую стадию кальцификации — рост кристаллической массы, — но не обеспечивают полное подавление данного процесса.

Стратегия применения Бф в качестве дополнительной антикальциевой защиты оказалась наиболее эффективной для ДЭ-обработанного бычьего перикарда в течение 60 дней подкожной имплантации. Дополнительная модификация бисфосфонатами перикардального лоскута, обработанного диэпоксидом, позволила поддерживать величину содержания кальция в образцах на уровне, сопоставимом с неимплантированной тканью (0,95 мкг/мг) в течение всего периода наблюдения. Эффективность данного комбинированного подхода, включающего эпоксидное сшивание и последующую Бф-модификацию коллагенсодержащего биоматериала, подтверждена результатами других исследований [Jorge-Herrero, Paez, Castillo-Olivares Ramos Del, 2005; Rapoport и др., 2007].

Очевидно, что функциональная активность Бф существенно варьирует в зависимости от способа их применения. Механизм действия системно вводимых не-N-Бф связан с включением в метаболизм стабильных аналогов аденозинтрифосфата, что приводит к апоптозу остеокластов [Frith и др., 2001; Pazianas, van der Geest, Miller, 2014]. В то же время N-Бф обладают более сложным механизмом действия, включающим фарнезилпирофосфат, геранилгеранилпирофосфат и G-белки [Bando и др., 2020; Tsoumpra и др., 2015]. Азотсодержащие бисфосфонаты влияют не только на апоптоз остеокластов, но и на их дифференцировку и созревание [Dunford и др., 2008]. Механизм действия иммобилизованных N-Бф до настоящего времени остаётся недостаточно изученным. Мы предположили, что он включает прямые физико-химические эффекты, направленные на ингибирование нуклеации, то есть образования

кристаллического ядра фосфата кальция, и последующего роста кристаллов гидроксиапатита за счёт взаимодействия как с ионами кальция, так и с фосфатами [Van Gelder и др., 1997].

Фармакологическая активность N-Бф может существенно зависеть от молекулярной стереоконфигурации: угол N-H-O влияет на связывание с гидроксиапатитом [Lawson и др., 2010; Puljula и др., 2015], а положение азота в боковой цепи R2 — на взаимодействие с фарнезилпирофосфатсинтазой [Russell, 2015; Tsoumpra и др., 2015]. Кроме того, N-Бф способны непосредственно связываться с гидроксиапатитом посредством -O-P-C-P-O- фрагмента, однако их сродство определяется химической структурой боковых цепей R1 и R2 [Caffarelli и др., 2017; Lawson и др., 2010; Orriss, Arnett, Russell, 2016; Puljula и др., 2015; Russell и др., 2008; Russell, 2015; Tsoumpra и др., 2015]. Их фрагмент P-C-P является функциональным аналогом фрагмента P-O-P полифосфата — естественного регулятора кальцификации [Zhuravleva и др., 2021b]. Также считается, что наличие гидроксильной группы в положении R1 усиливает способность бисфосфонатов ингибировать кристаллизацию гидроксиапатита [Van Gelder и др., 1997].

Опираясь на ранее полученные результаты (см. Глава 4), мы выдвинули гипотезу, что Бф ковалентно связываются с остаточными альдегидными группами или оксирановыми кольцами сшивающих агентов. При этом нельзя исключать и прямое взаимодействие молекул N-Бф с белковым ядром посредством водородных связей, аналогичных тем, что образуются между Бф и Thr или Lys фарнезилпирофосфатсинтазы [Russell, 2015], а также их взаимодействие с аминокислотами, способствующими усилению кальциевой нуклеации [Bleek, Taubert, 2013; Russell и др., 2008].

Насколько нам известно, настоящее исследование является первым, посвящённым изучению механизмов воздействия иммобилизованных Бф на взаимодействие ионов кальция и фосфора с тканями биопротеза.

На поверхности образцов ГА-фиксированных Ао-корня и ПК-лоскута уже на 10-й день подкожной имплантации были выявлены многочисленные электронно-плотные частицы, соответствующие гидроксиапатиту по уровню атомного

соотношения Ca/P. Полученные результаты, свидетельствуют об активной нуклеации данного минерала в тканях ГА-Ао-корня и ГА-ПК. Степень накопления фосфатов кальция в этих образцах увеличивалась в течение 30 дней, что сопровождалось повышением содержания кальция и фосфора в электронно-плотных частицах и насыщением гидроксиапатита. Процесс кальцификации в ГА-фиксированной ЯВ-стенке имел некоторые отличия: на 10-й день в поверхностных частицах преобладали фосфаты, а последующее преимущественное накопление кальция к 30-му дню приводило к формированию минеральных депозитов, представляющих собой ненасыщенные гидроксиапатиты с соотношением Ca/P равным 1,35. Ненасыщенный характер выявленных кристаллов гидроксиапатита указывает не только на потенциал их дальнейшего роста, но и на возможность дополнительного поглощения кальция из окружающей среды. Эти данные согласуются с классическими представлениями о механизме тканевой минерализации [Van Gelder и др., 1997; Zhuravleva и др., 2021b], согласно которым первая фаза кальцификации, нуклеация, включает образование прочного ионного комплекса кальция и фосфора с формированием кристаллического ядра, а вторая фаза характеризуется ростом этого кристалла. Смена консервирующего агента на диэпоксид приводила к значительному снижению формирования минеральных кластеров в ЯВ-стенке и полностью подавляла кальцификацию ПК-лоскута за счёт ингибирования начальной фазы зарождения кальциевых кристаллов в коллагеновых волокнах. В то же время образцы Ао-корня, обработанные ДЭ, характеризовались интенсивным связыванием кальция и фосфора, при этом соотношение этих элементов в выявленных минеральных депозитах соответствовало гидроксиапатиту.

Иммобилизация Бф приводила к значительному снижению накопления фосфатов кальция на поверхности исследуемых тканей. Бисфосфонаты способны предотвращать отложение фосфатов из биологических жидкостей за счёт создания отрицательного градиента концентрации фосфатных групп. Их избыточное содержание на модифицированных тканях препятствует проникновению «внешних» фосфатов в поверхностные и глубокие слои имплантатов, что

затрудняет процесс нуклеации гидроксиапатита. Косвенным подтверждением данной гипотезы служит уменьшение содержания фосфатов в электронно-плотных частицах на поверхностях образцов с иммобилизованными Бф. Выявленные нами электронно-плотные частицы в модифицированных тканях характеризовались высоким содержанием кальция, при этом соотношение Ca/P превышало 3,5.

Вторым возможным механизмом является прочное связывание ядер гидроксиапатита с фосфонатными группами, что препятствует росту кристаллов [Lawson и др., 2010; Van Gelder и др., 1997; Zhuravleva и др., 2021b]. В данном контексте важную роль играет структура боковой цепи R1 бисфосфоновой кислоты, поскольку гидроксильная группа (-OH) усиливает связывание Бф с ионами Ca^{2+} , в отличие от аминогруппы ($-\text{H}_2$) [Lawson и др., 2010; Puljula и др., 2015; Zhuravleva и др., 2021b]. Наши результаты подтверждают это: бисфосфонат Пам, содержащий гидроксильную группу в положении R1, продемонстрировал большую эффективность по сравнению с СЕАВА, в которой в позиции R2 присутствует аминогруппа, что отражено в гистологических изображениях (Рисунок 5.8) и сканирующих электронных микрофотографиях поверхности образцов (Рисунок 5.10, Рисунок 5.11, Рисунок 5.12) на 30-й день эксперимента. Оба механизма, вероятно, действуют совместно. Маловероятно, что аминогруппа Пам вносит значительный вклад в ингибирующий кальцификацию эффект, поскольку она расходуется на ковалентное связывание с тканью при иммобилизации [Puljula и др., 2015; Van Gelder и др., 1997]. В случае СЕАВА реакционноспособной группой является вторичный амин, расположенный в центре алифатической цепи (см. Глава 4), а концевой карбоксильный фрагмент может участвовать в связывании ионов Ca^{2+} .

5.4 Ограничения исследования

Модель ускоренной подкожной кальцификации у мелких лабораторных животных, таких как крысы, имеет ряд ограничений, связанных с их анатомическими, физиологическими и метаболическими особенностями

[Zhuravleva и др., 2018]. Поскольку данная модель не является ортотопической, она не воспроизводит естественные условия кровотока и гемодинамической нагрузки, которые существенно влияют на процессы минерализации тканей. Кроме того, подкожная имплантация может не полностью отражать иммунный ответ организма на трансплантаты, а формирующаяся вокруг образцов фиброзная капсула способна исказить оценку степени накопления кальция и фосфора. Эти факторы ограничивают возможность прямого переноса полученных результатов на клиническую практику [Zhuravleva и др., 2018].

Несмотря на перечисленные ограничения крысы, как известно, являются наилучшей моделью для скрининга антикальциевых стратегий обработки биоматериала [Schoen и др., 1985; Schoen, Tsao, Levy, 1986]. Несмотря на то, что уменьшение депонирования кальция в модели грызунов не является однозначным предиктором резистентности биоматериала к минерализации, обратная закономерность – выраженная кальцификация в модели подкожной имплантации крысам – с высокой вероятностью указывает на аналогичную реакцию у человека.

5.5 Резюме

В ходе проведенного исследования консервированных биоматериалов в модели подкожной имплантации крысам были выявлены закономерности, связанные как с морфологией ткани, так и с использованными методами обработки.

Во-первых, в эластин-содержащих консервированных тканях (Ао-корень, ЯВ-стенка) кальцификация инициируется на эластиновых волокнах. При этом в фиксированной аортальной стенке значительное количество девитализированных ГМК способствует усилению накопления кальция за счет их минерализации. В фиксированном ПК-лоскуте кальциевые депозиты формируются преимущественно в коллагеновой матрице. В образцах ЯВ-стенки, содержащей как эластин, так и коллаген, процесс кальцификации начинается с образования кальциевых кластеров

на эластиновых волокнах, после чего распространяется на коллагеновые фибриллы.

Во-вторых, для консервированных образцов Ао-корня и ЯВ-стенки было характерно начало накопления фосфатов кальция в периферических областях (субинтимально и субадвентициально) с последующим распространением вглубь ткани. В то же время, в фиксированном перикарде минерализация происходила преимущественно в толще ткани с дальнейшим распространением к более поверхностным участкам.

Кроме того, образцы фиксированного Ао-корня продемонстрировали высокую степень кальцификации независимо от типа обработки и модификации Бф. Выявленные уже на 10-й день имплантации кристаллы фосфата кальция значительно увеличивались к 60-му дню, что приводило к структурной дегенерации ткани. Кроме того, консервация аортального корня диэпоксидом способствовала усилению минерализации, даже в случае модификации бисфосфонатами.

Обработка ГА продемонстрировала неудовлетворительные результаты: кальциевые отложения обнаруживались во всех типах ГА-сшитых материалов уже к 10-му дню подкожной имплантации. Через 60 дней подкожной имплантации для всех типов исследуемых ксеногенных тканей, обработанных глутаровым альдегидом, был свойственен высокий уровень содержания кальция. Эти данные подтверждаются результатами количественного анализа содержания кальция. ПК-лоскут, фиксированный ГА, показал самую высокую активность связывания кальция. Модификация ГА-образцов бисфосфонатами позволила замедлить процесс нуклеации и роста кальциевых депозитов, но не подавить его полностью.

В тоже время, замена основного сшивающего агента на ДЭ ингибировала минерализацию ЯВ-стенки и ПК-лоскута. Диэпоксидная обработка ЯВ-стенки снижала интенсивность минерализации ткани, а дополнительная иммобилизация бисфосфонатов типов 1 и 2 на ДЭ-фиксированные образцы значительно замедляла процесс нуклеации и последующего роста кальциевых кристаллов. Очаговая кальцификация эластиновых волокон отмечалась только к 30-му дню подкожной

имплантации. Эти результаты соотносятся с количественным анализом содержания кальция в исследуемых образцах. Диэпоксидная обработка ПК-лоскута эффективно подавляла кальцификацию коллагена независимо от использования Бф, что делает данный материал перспективным для создания биопротезов с повышенной антикальциевой защитой.

Выраженность антикальцифицирующего эффекта иммобилизованных Бф зависела не только от микроструктуры биоматериалов и метода базовой консервации, но и химической структуры бисфосфоната. Наиболее эффективной кальций-связывающей протекцией обладали Бф типов 1 и 2. Золедронат (тип 3) в меньшей степени снижал кальцификацию ГА- и ДЭ- фиксированного аортального корня, при этом способствовал увеличению минерализации ДЭ-обработанной ЯВ-стенки. Кроме того, Бф-модификация биоматериалов значительно влияла на соотношение Са/Р: для модифицированных тканей было характерно высокое содержание кальция ($\text{Са/Р} > 3,5$), тогда как в немодифицированных образцах это соотношение соответствовало значениям гидроксиапатита.

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о том, что наиболее перспективными биоматериалами для изготовления ЛА-кондуита являются ПК-лоскут и ЯВ-стенка. Кальцификацию данных материалов можно существенно снизить путем замены ГА на диэпоксид с последующей модификацией Бф типов 1 и 2. Эти биоматериалы (ПК-лоскут и клапаносодержащий фрагмент ЯВ), консервированные ДЭ, планируется изучать в модели крупных лабораторных животных при ортотопической имплантации ксенографтов с целью оценки эффективности биопротезов в условиях циклической гемодинамической нагрузки и контакта с кровью. В то же время стенка аортального корня продемонстрировала высокую склонность к минерализации независимо от применяемого фиксирующего агента и модификации Бф, что связано с особенностями структуры ткани. Учитывая неудовлетворительные клинические результаты (Глава 3) и данные, полученные в модели подкожной имплантации у крыс (Глава 5), свиной аортальный корень не рекомендуется для изготовления ксенографтов.

ГЛАВА 6. ЭКСПЕРИМЕНТ *in vivo* НА МОДЕЛИ КРУПНЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ (мини-свиньи)

Данная часть исследования направлена на оценку функциональных характеристик и структурных трансформаций кондуитов, изготовленных из клапаносодержащего сегмента яремной вены быка и бычьего перикарда, обработанных эпоксидным соединением и бисфосфоновой кислотой, в экспериментальной модели крупных лабораторных животных.

Для воссоздания условий, максимально приближенных к клиническому использованию легочных кондуитов, нами была выбрана свиная модель. Данная модель крупных лабораторных животных имеет ряд преимуществ, что позволяет рассматривать ее как наиболее подходящую для реализации задач исследования. Высокое анатомическое и гемодинамическое сходство свиного и человеческого сердец обеспечивает точное воспроизведение клинических условий и повышает релевантность получаемых данных [Гущин, 2021; Lunney и др., 2021; Shah и др., 2022]. Соответствующие размеры сердечных структур позволяют использовать ювенильных животных в экспериментальной модели для воссоздания условий растущего организма [Ayuso и др., 2020; Nunes и др., 2025; Rusakova и др., 2024]. Этот пункт особенно важен для трансляционных исследований в области детской кардиохирургии. Сходство метаболических процессов и системного иммунного ответа повышает прогностическую ценность результатов при экстраполяции на человека [Algieri и др., 2024; Helke и др., 2016; Lunney и др., 2021]. Кроме того, нелимитированная популяция свиней и способность производить большие пометы жизнеспособных новорожденных обеспечивают возможность использования однородного поголовья в серии экспериментов, что повышает стабильность и воспроизводимость данных [Bianco и др., 2013; Byrne, McGregor, 2025]. С этической точки зрения свиная модель предпочтительнее по сравнению с другими животными моделями, например приматами [George, 2024; Hawthorne, 2024]. Кроме того, экономическая доступность и относительная простота содержания, особенно мини-свиней, адаптированных к лабораторным условиям, снижают

затраты на исследования и способствуют широкому применению этой модели в доклинических испытаниях [Bianco и др., 2013; Kobayashi и др., 2012]. Некоторые авторы указывают на значимые отличия в системе гемостаза у свиней и человека, а также на непредсказуемую чувствительность каждого животного к антикоагулянтной терапии, поэтому рекомендуют использовать овец в качестве экспериментальной модели для анализа эффективности сердечно-сосудистых устройств [Bianco и др., 2013; Grehan и др., 2000]. Вместе с тем, в мировой практике зафиксированы случаи недооценки риска тромбогенности и выраженности иммунного ответа при исследовании протезов клапанов сердца в *in vivo* экспериментах на овцах [Bodnar, 1996; Modine, Ali Ben, Perrin, 2022; Simon, 2003; Van Hecke и др., 2024]. Таким образом, по нашему мнению, свиная модель является наиболее оптимальной для оценки клапаносодержащих легочных ксенокондуитов в ортотопической позиции [Honge и др., 2011; Jia, Chang, Song, 2024; Van Hecke и др., 2024].

6.1 Материалы и методы

Данная часть исследования была одобрена локальным Экспертным (протокол №25 от 19.12.2017) и Этическим (протокол №17 от 14.06.2018) комитетами. Все экспериментальные процедуры соответствуют этическим нормам, регламентирующим эксперименты на животных в соответствии с международными и российскими нормативно-правовыми документами [Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, 1986; «Об утверждении правил лабораторной практики» приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 267 от 19.06.2003 г., 2003; Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes, 2010; «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н

от 01.04.2016 г., 2016; ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организация процедур» от 01.07.2016, 2016; ГОСТ 34088-2017 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за сельскохозяйственными животными» от 01.08.2018, 2018].

6.1.1 Дизайн исследования

Экспериментальная модель включала в себя имплантацию клапаносодержащего кондуита крупным лабораторным животным (мини-свиньи) в позицию легочной артерии (ЛА) в условиях параллельного нормотермического искусственного кровообращения (ИК).

В исследование было включено 36 здоровых ювенильных экспериментальных животных из расчета: группы исследования – по 6 мини-свиней, группы контроля – по 4 мини-свиньи [International Organization for Standardization. (2005). Cardiovascular implants — Cardiac valve prostheses (ISO Standard No. 5840). Geneva, Switzerland: ISO., 2005; International Organization for Standardization. (2015). Cardiovascular implants — Cardiac valve prostheses — Part 2: Surgically implanted heart valve prostheses (ISO Standard No. 5840-2). Geneva, Switzerland: ISO., 2015; International Organization for Standardization. (2016). Cardiovascular implants and artificial organs — Tubular vascular prostheses (ISO Standard No. 7198:2016). Geneva, Switzerland: ISO., 2016]. Все животные были рандомизированы на группы с использованием метода конвертов (Рисунок 6.1А). Группы исследования включали диэпокси-обработанные (диглицидиловый эфир этиленгликоля, ДЭ) ксенокондуиты, изготовленные из клапаносодержащего фрагмента яремной вены быка (ЯВ) и бычьего перикарда (ПК). Шести животным протезирование ЛА было выполнено ксенографтом, изготовленным из ДЭ-обработанной яремной вены быка (ДЭ-ЯВ). Другим шести мини-свиньям был имплантирован ДЭ-ЯВ кондуит с дополнительной антикальциевой обработкой

бисфосфонатом (памидроновая кислота, Пам) – ДЭ+Пам-ЯВ. У шести животных для протезирования ЛА использовали ксеноперикардальный конduit, изолированно обработанный эпоксидным соединением (ДЭ-ПК). В других 6 случаях был применен ДЭ-ПК с дополнительной антикальциевой обработкой Пам (ДЭ+Пам-ПК). Группы контроля включали обработанные глутаровым альдегидом (ГА) кондуиты из яремной вены быка (ГА-ЯВ; n=4), ГА-обработанные ксеноперикардальные кондуиты (ГА-ПК; n=4). Так же референтной группой был конduit Contegra (n=4), как наиболее часто используемый в клинической практике коммерческий ксенографт [Harris и др., 2023; Hazekamp и др., 2021; Herrmann, Brown, 2020; Singh и др., 2025]. Поскольку биопротезы клапанов сердца, изготовленные из ГА-обработанных перикарда и яремной вены быка, имеют долгую историю применения в кардиохирургии и достаточно хорошо изучены, мы ограничили размер контрольных групп до 4 животных в каждой, в соответствии с этическими принципами ухода за лабораторными животными и принципами 3R экспериментальных биомедицинских исследований [Verderio и др., 2023].

Период наблюдения составил 6 месяцев. Всем животным была проведена чреспищеводная эхокардиография (ЧП-ЭХОКГ) трижды в течении обсервационного периода: интраоперационно/первые 7 дней после операции, через 3 и 6 месяцев после имплантации (Рисунок 6.1В). По завершении шестимесячного периода наблюдения животные были выведены из эксперимента, а все легочные кондуиты были эксплантированы для комплексного макроскопического и микроскопического исследования [International Organization for Standardization. (2005). Cardiovascular implants — Cardiac valve prostheses (ISO Standard No. 5840). Geneva, Switzerland: ISO., 2005; International Organization for Standardization. (2015). Cardiovascular implants — Cardiac valve prostheses — Part 2: Surgically implanted heart valve prostheses (ISO Standard No. 5840-2). Geneva, Switzerland: ISO., 2015; International Organization for Standardization. (2016). Cardiovascular implants and artificial organs — Tubular vascular prostheses (ISO Standard No. 7198:2016). Geneva, Switzerland: ISO., 2016].

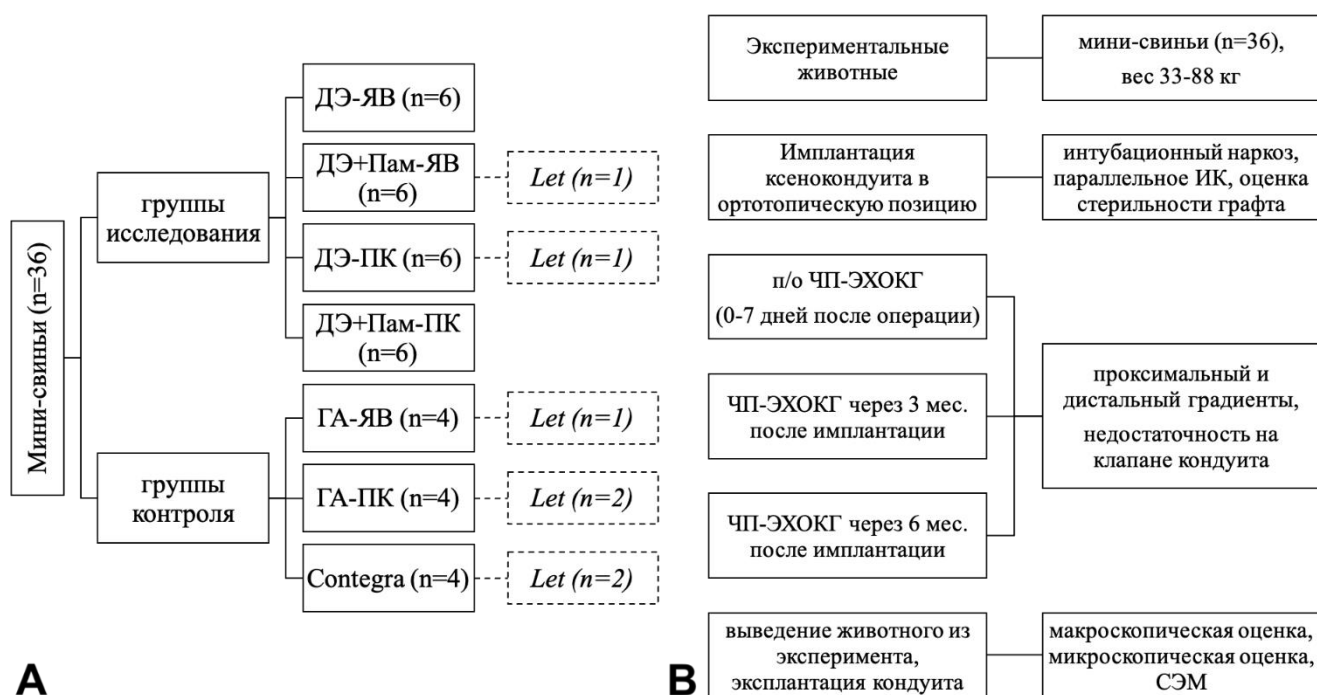


Рисунок 6.1 – Дизайн исследования.

А – формирование экспериментальных групп. В – этапы экспериментальной работы. Let, exitus lethalis, летальный исход; ГА-ПК, глутаральдегид-обработанный ксеноперикардальный кондуит; ГА-ЯВ, глутаральдегид-обработанный кондуит из яремной вены быка; ДЭ-ПК, диэпокси-обработанный ксеноперикардальный кондуит; ДЭ+Пам-ПК, диэпокси-обработанный ксеноперикардальный кондуит с дополнительной антикальциевой обработкой памидроновой кислотой; ДЭ-ЯВ, диэпокси-обработанный кондуит из яремной вены быка; ДЭ+Пам-ЯВ, диэпокси-обработанный кондуит из яремной вены быка с дополнительной антикальциевой обработкой памидроновой кислотой; Пам, памидроновая кислота; СЭМ, сканирующая электронная микроскопия; ЧП-ЭХОКГ, чреспищеводная эхокардиография

Первичные конечные точки – дисфункция клапанного ксенокондуита, кальцификация ксенокондуита.

Вторичные конечные точки – эндотелизация люминальной поверхности кондуита, воспалительный ответ и реакция на инородное тело, тромбоз и эндокардит ксенографта.

6.1.2 Описание имплантируемых кондуитов

Для изготовления ксенографтов в качестве основных сшивающих агентов использовали коммерческие растворы в соответствии с рекомендациями производителя: 97% ДЭ (Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, г. Новосибирск, Российская Федерация) и 25% ГА (каталожный номер 253857, Panreac Química SLU, Барселона, Испания). Бисфосфоновая кислота Пам была синтезирована в соответствии с ранее описанной технологией (Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН) [Kieczykowski и др., 1995].

6.1.2.1 Кондуиты из яремной вены быка

ЯВ-кондуиты изготавливали из клапаносодержащих сегментов яремной вены быка (Рисунок 6.2А, 6.2В), забранных у здоровых животных сразу после забоя. Перед консервацией фрагменты ЯВ тщательно очищали от окружающих тканей, несколько раз промывали стерильным раствором 0,9% NaCl (Solopharm, Санкт-Петербург, Россия). Для оценки компетенции венозного клапана применяли гидравлическую пробу, с дополнительным эндоскопическим контролем (эндоскоп Хопкинса; 30°; диаметр 4 мм, Karl Storz SE & Co. KG, Tuttlingen, Германия) (Рисунок 6.2С) [Журавлева и др., 2016а; Ничай и др., 2022].

Отобранные на этапе первичной селекции клапан-содержащие сегменты ЯВ обрабатывали двумя способами [Nichay и др., 2023]:

(1) в течение 14 суток при комнатной температуре в 5% буферном (0,05 М фосфатный буфер, pH 7,4) растворе ДЭ, с заменой раствора на 2-е сутки консервации;

(2) в течение 14 дней при комнатной температуре в 0,625% буферном (0,05 М фосфатный буфер, pH 7,4) растворе ГА, с заменой раствора на 2-й, 4-й и 8-й дни.

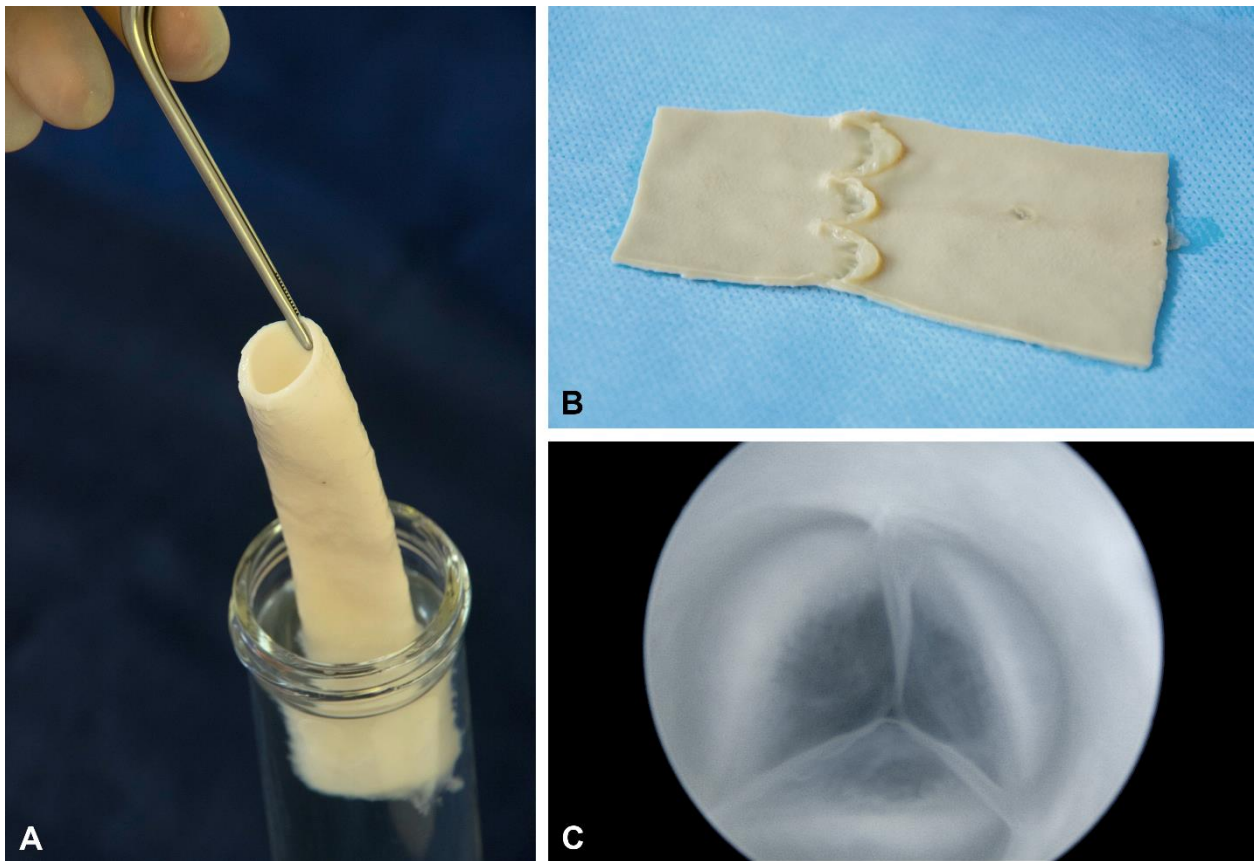


Рисунок 6.2 – Конduit из яремной вены быка.

А – внешний вид ксеновенозного кондуита. В – клапанный аппарат бычьей яремной вены. С – компетентный венозный клапан при проведении гидравлической пробы под эндоскопическим контролем

Далее часть ДЭ-консервированных фрагментов яремной вены дополнительно обрабатывали раствором бисфосфоновой кислоты. Предварительно каждый конduit 3-кратно отмывали в стерильном растворе 0,9% NaCl в течение 20 мин. После 3-й смены раствора отмывки ДЭ-обработанный ЯВ-конduit перекладывали в 0,15% раствор Пам (0,1 М фосфатный буфер, pH 7,3). Экспозиция в модифицирующем растворе Пам составляла 8 часов при температуре 37 °C, с последующей отмывкой от несвязанного бисфосфоната в стерильном 0,9% NaCl в течение 4 часов и двукратной сменой раствора.

После окончания консервации ксеновенозные кондуиты хранили в герметичной индивидуальной упаковке, в биоцидном растворе оригинального состава [Журавлева, 2014]. Перед имплантацией ксеновенозный графт отмывали от раствора хранения в стерильном растворе 0,9% NaCl, с трехкратной сменой раствора каждые 20 минут.

6.1.2.2 Ксеноперикардимальные кондуиты

Для изготовления ксеноперикардимальных графтов использовали свежий бычий перикард, забранный у здоровых животных сразу после убоя. Перед консервацией материал тщательно очищали от окружающих тканей и промывали несколько раз в стерильном растворе 0,9% NaCl. Бычий перикард консервировали двумя способами [Nichaу и др., 2025]:

(1) в течение 14 дней при комнатной температуре в 5% буферном (0,05 М фосфатный буфер, pH 7,4) растворе ДЭ, с заменой консервирующего раствора на 2-е сутки;

(2) в течение 21 дня при комнатной температуре в 0,625% буферном (0,05 М фосфатный буфер, pH 7,4) растворе ГА, с заменой консервирующего раствора на 2-е и 7-е сутки.

Часть ДЭ-консервированных ксеноперикардимальных лоскутов подвергли дополнительной антикальциевой обработке в 0,15% растворе Пам. Раствор Пам готовили на 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,3). Кондуиты предварительно трехкратно отмывали от консервирующего раствора в стерильном 0,9% NaCl в течение 20 минут. Экспозиция в модифицирующем растворе Пам составляла 8 часов при температуре 37 °С, с последующей отмывкой ткани от несвязанной бисфосфоновой кислоты в стерильном растворе 0,9% NaCl в течение 4 часов и двукратной сменой раствора.

После завершения процесса консервации был проведен тщательный отбор материала с оценкой его пригодности для создания кондуита.

Для каждого отобранного перикардимального лоскута была создана «топографическая карта» толщин (Рисунок 6.3А, 6.3В) с точностью измерения 10 мкм и шагом 2 мм (лазерный аппарат МЕЛАЗ-Кардио, ООО «Лазерус», Новосибирск, Россия). Составные компоненты кондуита были точно вырезаны из областей определенной толщины: 0,3–0,35 мм для створок и 0,7 мм для стенки ксенографта (Рисунок 6.3С). Эти части были сшиты непрерывным обвивным швом (Рисунок 6.3D, 6.3F) с использованием полиэстеровой плетеной нити Ethibond 5/0

(Ethicon Inc., Нью-Джерси, США) – технические швы, формирующие конduit [Nichay и др., 2025].

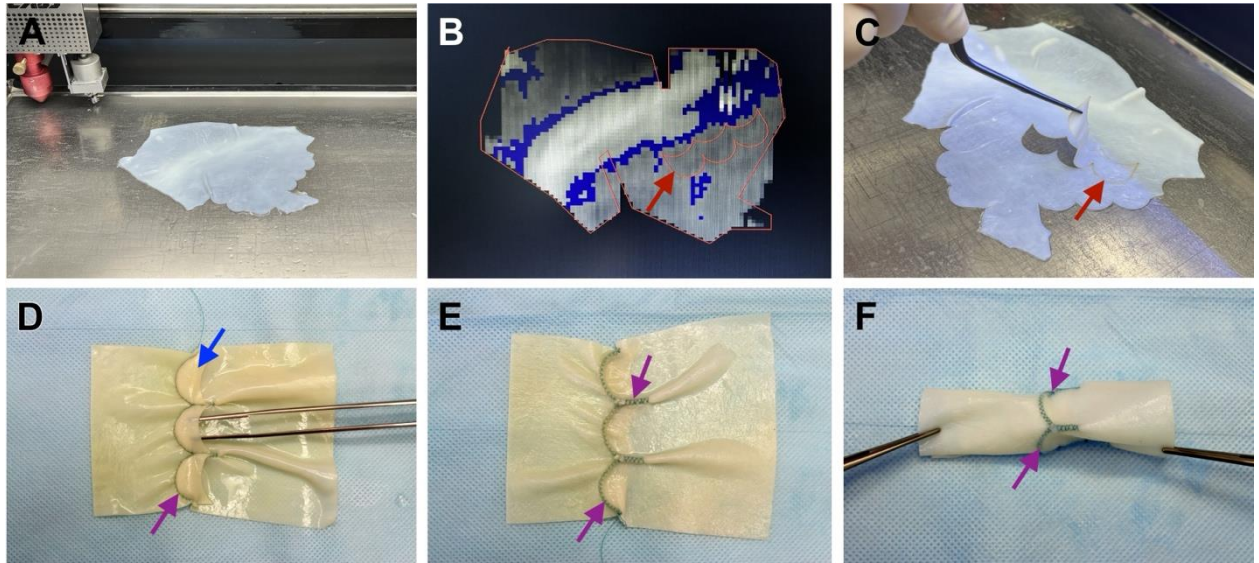


Рисунок 6.3 – Процесс изготовления ксеноперикардальных графтов. А – подготовка обработанного бычьего перикарда к раскрою. В – «топографическая карта» толщины лоскута; лазерная маркировка компонентов графта на необходимой толщине. С – выкроенные компоненты кондуита. D – внутренняя сторона кондуита со створками. Е – внешняя сторона кондуита с выведенными наружу швами. F – окончательный вид ксеноперикардального кондуита. Красная стрелка указывает на выкроенный компонент трансплантата (деталь створчатого аппарата), фиолетовая стрелка – на технические швы, формирующие конduit, синяя стрелка – на створку

Готовые ксеноперикардальные графты были помещены в индивидуальную герметичную упаковку и хранились в биоцидном растворе [Журавлева, 2014]. Перед имплантацией ксеноперикардальный конduit тщательно промывали в стерильном растворе 0,9% NaCl, с его трехкратной сменой каждые 20 минут.

6.1.2.3 Ксеноконduit Contegra

Контрольной группой был ксеноконduit Contegra (Contegra легочный клапанный конduit; Medtronic, Миннеаполис, Миннесота, США) – продукт, коммерчески доступный для клинического использования. Согласно инструкции

производителя, он состоит из ксеногенной (бычьей) яремной вены с трехстворчатым венозным клапаном и естественными синусами. Заключительный этап стерилизации проведен с использованием уникального патентованного стерилизационного раствора, содержащего 1% ГА и 20% изопропилового спирта. Этот же раствор используется для упаковки ксенографта и его хранения до момента использования. В соответствии с рекомендациями производителя перед имплантацией ксеноконduit Contegra промывали от раствора хранения в стерильном растворе 0,9% NaCl, с его трехкратной сменой каждые 5 минут.

6.1.3 Характеристика испытуемых животных

В исследование включено 36 здоровых ювенильных мини-свиней (мини-свиньи ИЦиГ [Никитин, Князев, Шатохин, 2014], Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия), весом 33-88 кг. Общая характеристика экспериментальных животных представлена в Таблице 6.1. Накануне или в день оперативного вмешательства каждое животное было случайным образом распределено в одну из групп.

Таблица 6.1 – Пред- и интраоперационные данные экспериментальных животных

Параметр	Me (IQR)
Пол животного, ♂/♀, n (%)	13/23 (36,11% / 63,89%)
Возраст на момент операции, год	1 (0,83-1,5)
Вес на момент операции, кг	52 (41-63)
BSA, м ²	1,12 (0,96-1,27)
D ксенографта, n (%):	
12 мм	1 (2,78%)
14 мм	16 (44,44%)
16 мм	13 (36,11%)
18 мм	6 (16,67%)
D/BSA, мм/м ²	14,39 (12,22-15,31)

Параметр	Me (IQR)
Тип канюляции, n (%):	
центральная	24 (66,67%)
периферическая	12 (33,33%)
Время ИК, мин	60 (45-72)
Общая продолжительность ИВЛ, ч	5,5 (4-6)
Инотропная поддержка, n (%):	
Не применялась	31 (86,11%)
Допамин (2-10 мкг/кг/мин)	5 (13,89%)

Примечание: BSA (body surface area), площадь поверхности тела; D, диаметр кондуита; Me (median), медиана; IQR (interquartile range), межквартильный интервал; ИВЛ, искусственная вентиляция легких; ИК, искусственное кровообращение.

6.1.4 Имплантация ксенокондуитов в ортотопическую позицию

Экспериментальные оперативные вмешательства и диагностические процедуры были выполнены в соответствии с международными и российскими нормативно-правовыми документами, регламентирующими эксперименты на животных.

6.1.4.1 Анестезиологическое обеспечение

Анестезиологическое обеспечение на всех этапах ведения животного проводилось совместно анестезиологом и ветеринарным врачом, имеющими квалификацию по GLP («Good Laboratory Practice» / «Надлежащая лабораторная практика» [ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», 2009]). Все анестезиологические манипуляции (установка сосудистых катетеров, мочевого катетера, интубация трахеи и т.д.) проводились в специализированной ветеринарной операционной в условиях общей комбинированной анестезии с соблюдением правил асептики и антисептики [Ничай и др., 2022; Nichay и др., 2023; Nichay и др., 2025].

Накануне операции животное осматривал ветеринарный врач. За 12 часов до оперативного вмешательства мини-свинье давали доступ только к воде, лишая корма. За 1 час до начала вмешательства, после подтверждения ветеринарным врачом удовлетворительного состояния животного, проводили премедикацию препаратом Золетил-100 (Zoletil-100, Virbac Sante Animale, Франция) в дозе 5-7 мг/кг внутримышечно в область у основания уха. С целью минимизации стресса, седацию мини-свиней выполняли в вольере постоянного содержания. При достижении целевого уровня седации (оценивали по снижению уровня рефлексов) животных транспортировали в помещение предоперационной подготовки, где проводили санитарно-гигиеническую обработку операционного поля. Для периферического венозного доступа катетеризировали подкожную вену на наружной поверхности уха. Затем животное на каталке транспортировали в операционную, фиксировали на операционном столе в положении лежа на спине (Рисунок 6.4А). На этапе индукции проводили ЭКГ-мониторинг и мониторинг сатурации (монитор IntelliVue MP40, Philips, Бёблинген, Германия), а также выполняли преоксигенацию 100% кислородом через адаптированную для животных лицевую маску. Индукцию анестезии проводили внутривенным (в/в) введением фентанила 0,005% (0,006-0,008 мг/кг), пропофола (4-6 мг/кг) и пипекурония бромидом (0,1-0,15 мг/кг). Оротрахеальную интубацию выполняли с помощью метода прямой ларингоскопии клинком Miller №4 (204 мм) эндотрахеальной трубкой диаметром 8 мм (Рисунок 6.4А). После интубации трахеи животное переводили на искусственную вентиляцию легких (ИВЛ) (аппарат JulianPlus, Draeger, Любек, Германия). Исходные параметры ИВЛ устанавливали с контролем по объему из расчета 6-8 мл/кг и положительным давлением в конце выдоха до 8 см водн.ст., с O₂ 50% об., поддерживая PaCO₂ на уровне 36–43 мм рт.ст. После перевода животного на ИВЛ анестезию поддерживали ингаляцией севофлурана 2-4 об.% и в/в введением фентанила 1–2 мкг/кг каждые 20 мин.

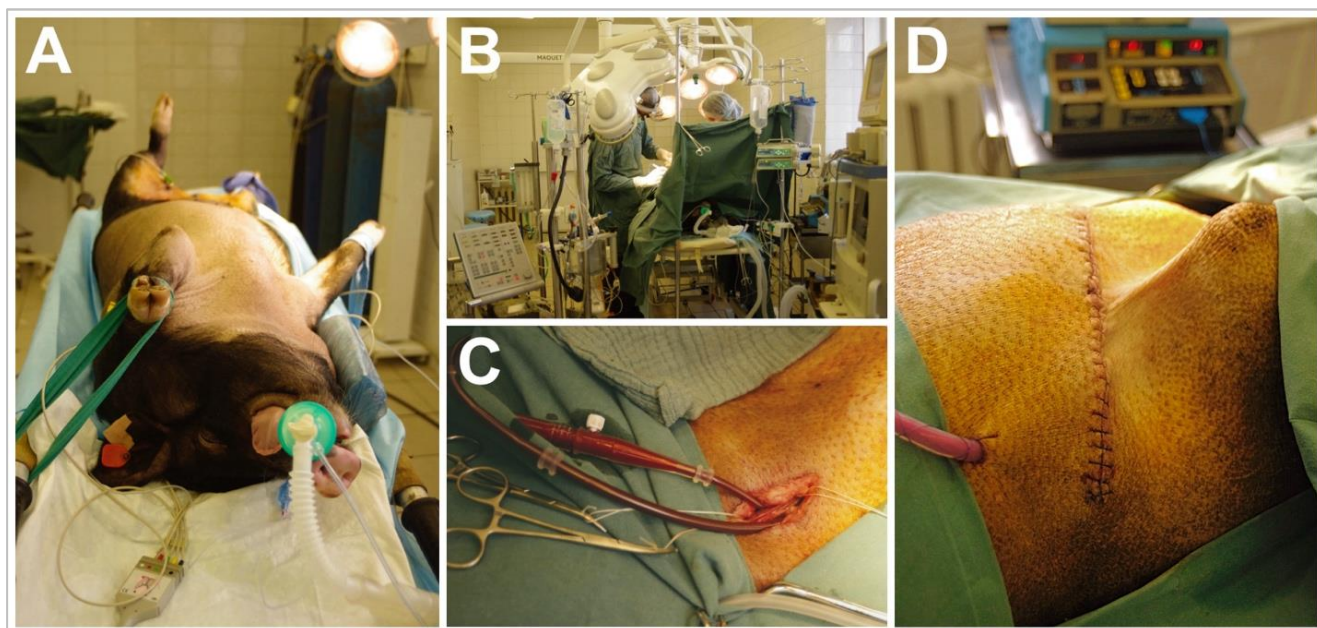


Рисунок 6.4 – Экспериментальное оперативное вмешательство. А – Подготовка к операции, животное интубировано и подключено к аппарату ИВЛ, укладка в положении лежа на спине. В – Общий вид операционной, этап подключение аппарата ИК. С – Периферическая канюляция магистральных сосудов. D – Кожный шов, дренаж установлен в левую плевральную полость

Для мониторинга прямого артериального давления (АД) и забора артериальной крови для контроля газового и электролитного состава инвазивную артериальную линию устанавливали в бедренную артерию. Для мониторинга центрального венозного давления (ЦВД) и внутривенной инфузии катетеризировали бедренную вену. Для контроля почасового диуреза устанавливали мочевой катетер.

На этапе ИК поддержание анестезии осуществляли постоянной в/в инфузией пропофола 6-10 мг/кг/час и болюсным введением фентанила 1–4 мкг/кг каждые 20–30 мин. В качестве антибиотикопрофилактики использовался цефазолин (2,0 г). В постперфузионном периоде при наличии признаков сердечной недостаточности подключали инотропную поддержку в виде инфузии допамина в малых и средних дозах (2-10 мкг/кг/мин).

На этапе окончания операции после наложения кожных швов прекращали подачу севофлурана в дыхательную смесь. На фоне восстановления самостоятельного дыхания, стабильной гемодинамики, при отсутствии признаков

сердечной недостаточности, удовлетворительной оксигенации (оценивали по показателям газового состава артериальной крови: сатурация $>90\%$, $P_{aO_2} >70$ мм рт.ст., P_{aCO_2} 33-45 мм рт.ст.) животное экстубировали. После экстубации проводили мониторинг показателей гемодинамики (АД, ЦВД, ЧСС, сатурация), электролитного и газового состава крови, ЭКГ-мониторинг в течение 30-60 минут, затем животное транспортировали в виварий в индивидуальный вольер.

6.1.4.2 Искусственное кровообращение

Перед канюляцией магистральных сосудов и началом ИК выполняли системную гепаринизацию из расчета 300 Ед/кг и вводили 5000 ЕД гепарина в первичный объем заполнения аппарата ИК. Во время ИК активированное время свертывания (АСТ) поддерживали на уровне 500-600 сек.

Способ канюляции магистральных сосудов зависел от предпочтения оперирующего хирурга и веса животного. В 12 случаях использовали канюли для периферической канюляции (Рисунок 6.4С). Размер канюль определяли в зависимости от массы тела, размеров собственных сосудов животного и расчетной скорости перфузии [Nichay и др., 2023; Nichay и др., 2025].

В эксперименте использовали ИК-аппарат MAQUET HL 20 (MAQUET Cardiopulmonary AG, Германия), терморегулятор HCU 30 (MAQUET Cardiopulmonary AG, Германия), оксигенаторы Quadrox (MAQUET Cardiopulmonary AG, Германия) (Рисунок 6.4В). При сборке контура ИК максимально укорачивали длину магистральных трубок, чтобы уменьшить первичный объем заполнения и гемодилюцию. Объемную скорость перфузии определяли исходя из расчета 60-70 мл/кг массы тела животного. Системное артериальное давление поддерживали на уровне 90-110 мм рт.ст. Для обеспечения адекватного венозного притока использовали вакуумный контроллер венозного оттока VAVD MAQUET HL 20 (MAQUET Cardiopulmonary AG, Германия) с отрицательным давлением 30-50 мм рт.ст. Во время перфузии температура тела в

пищеводе животного составляла 37-37,5 °С. Уровень гематокрита был в диапазоне 24-30%.

После завершения ИК, для инактивации действия гепарина, животному вводили раствор протамин сульфата 300 Ед/кг [Ничай и др., 2022].

6.1.4.3 Хирургическая техника

Все экспериментальные животные были прооперированы через боковую торакотомию в IV межреберье слева [Ничай и др., 2022]. Перикард широко вскрывали и фиксировали к краям раны. После системной гепаринизации канюлировали магистральные сосуды и начинали ИК. Двадцати четырем животным канюляцию выполняли через торакотомный доступ: аорту канюлировали ниже перешейка на 5-7 мм, венозные канюли устанавливались в ушко правого предсердия и каудальную полую вену (аналог нижней полый вены человека, НПВ) [Nichay и др., 2025]. В остальных случаях (n=12) установку венозной и артериальной канюль осуществляли через шейный доступ справа (Рисунок 6.4С) [Nichay и др., 2023]. Артериальную канюлю заводили через общую сонную артерию до уровня дуги аорты. Для обеспечения венозного оттока канюлю устанавливали через наружную яремную вену и проводили через краниальную полую вену (аналог верхней полый вены человека, ВПВ) и правое предсердие до устья НПВ. При необходимости устанавливали дренаж для опорожнения левых отделов сердца через ушко левого предсердия.

Основной этап оперативного вмешательства выполняли в условиях параллельного нормотермического ИК. После мобилизации ствола ЛА (Рисунок 6.5А), иссекали его участок размеров 1,5-2,0 см, дистальнее легочных синусов. Створки легочного клапана полностью резецировали.

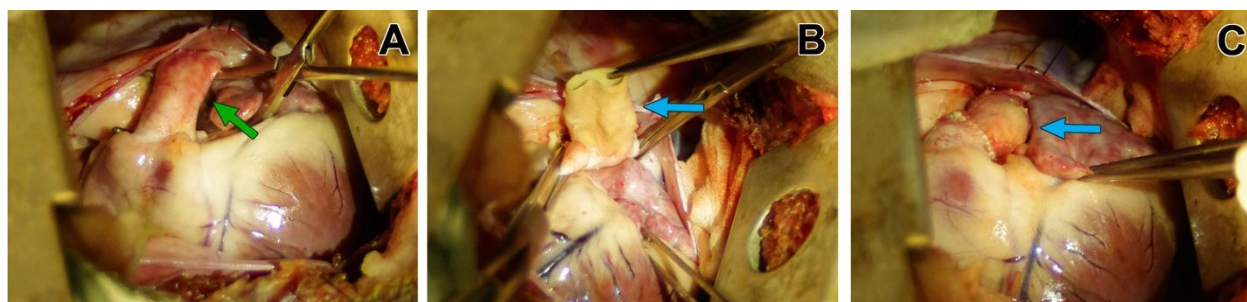


Рисунок 6.5 – Имплантация ксеновенозного кондуита в легочную позицию в эксперименте. А – левосторонняя торакотомия и мобилизация нативного ствола ЛА. В – имплантация трансплантата и создание проксимального анастомоза между легочной артерией и ксеновенозным кондуитом. С – окончательный вид операции, где конduit из яремной вены быка в легочной позиции. Зеленая стрелка указывает на нативный ствол ЛА, синяя стрелка – на ксеновенозный конduit

Размер имплантируемого ксенокондуита подбирали в соответствии с весом животного и диаметром нативного ствола ЛА. Перед имплантацией ксенографт (ксеновенозный и ксеноперикардальный) промывали в стерильном растворе 0,9% NaCl с его трехкратной сменой каждые 20 минут. Конduit Contegra отмывали от раствора хранения в соответствии с рекомендациями производителя: трехкратная смена стерильного раствора 0,9% NaCl каждые 5 мин. Во всех случаях перед имплантацией выполняли двукратный контроль стерильности кондуита [Nichay и др., 2023; Nichay и др., 2025].

Предварительно отмытый конduit моделировали до нужной длины, отсекая излишки ткани выше и ниже клапана (Рисунок 6.5В). Проксимальный и дистальный анастомозы формировали с использованием непрерывного обвивного шва нитью 6/0 (PremiCron, B. Braun Melsungen AG, Мельзунген, Германия) (Рисунок 6.5С). Сначала накладывали дистальный анастомоз между бифуркацией ЛА и кондуитом, следующим этапом формировали проксимальный анастомоз (Рисунок 6.6). После остановки ИК, деканюляции и проведения гемостаза, в левую плевральную полость устанавливали дренаж с вакуумным резервуаром и послойно ушивали торакотомную рану (Рисунок 6.4D).

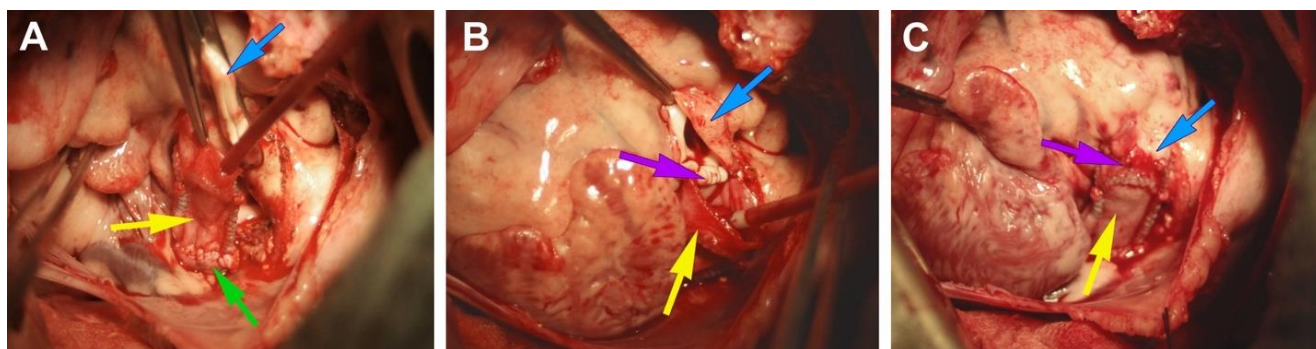


Рисунок 6.6 – Имплантация ксеноперикардального кондуита в легочную позицию в эксперименте. А – наложение дистального анастомоза между ЛА и ксенографтом. В – формирование проксимального анастомоза. С – общий вид имплантированного ксенокондуита. Желтая стрелка указывает на ксеноперикардальный конduit, синяя стрелка – на ЛА, фиолетовая стрелка – проксимальный анастомоз, зеленая стрелка – дистальный анастомоз

6.1.5 Послеоперационное ведение

При отсутствии признаков кровотечения у животного удаляли дренажную трубку из плевральной полости. Обезболивание в первые трое суток после операции проводили кетопрофеном (1,4 мг/кг в/м каждые 12 ч). Обработку швов выполняли 1 раз в сутки 10% раствором повидон-йода (Бетадин®, Mundipharma, Швейцария). На 14-й день, после заживления, снимали кожные швы.

В первые 7 суток послеоперационного периода мини-свиньи получали надропарин кальция (0,3 мл 2 раза в день), затем в течение всего периода наблюдения проводили антиагрегантную терапию (клопидогрель 75 мг 1 раз в день и ацетилсалициловая кислота 75 мг 1 раз в день). Для антибиотикопрофилактики использовали амоксициллина клавуланат (8,75 мг/кг; Synulox, Haupt Pharma Latina S.R.L., Борго-Сан-Микеле, Латина, Италия) [Nichay и др., 2023; Nichay и др., 2025].

6.1.6 Чреспищеводная эхокардиография

Всем животным в периоде наблюдения проводили ЧП-ЭХОКГ непосредственно после операции и через 3 и 6 месяцев после имплантации ксенокондуита. Визуализация выполнялась с помощью ультразвукового аппарата Vivid Q (GE Healthcare, Бостон, Массачусетс, США) с использованием чреспищеводного ультразвукового датчика 6TcRS (GE Healthcare, Бостон, Массачусетс, США). Перед каждым исследованием животных обязательно взвешивали и седировали препаратом Золетил-100 (5-7 мг/ кг) [Ничай и др., 2022].

Глубина установки датчика подбиралась индивидуально и зависела от размера животного. Для визуализации легочного кондуита угол датчика располагали на 0 °С или 160 °С. Для выведения поперечного сечения клапана ксенокондуита кончик датчика с линзой сгибали до угла в 70-80 °С [Sündermann и др., 2016]. Во время исследования оценивали величину пикового/среднего градиентов на уровне проксимального и дистального отделов кондуита (Рисунок 6.7).

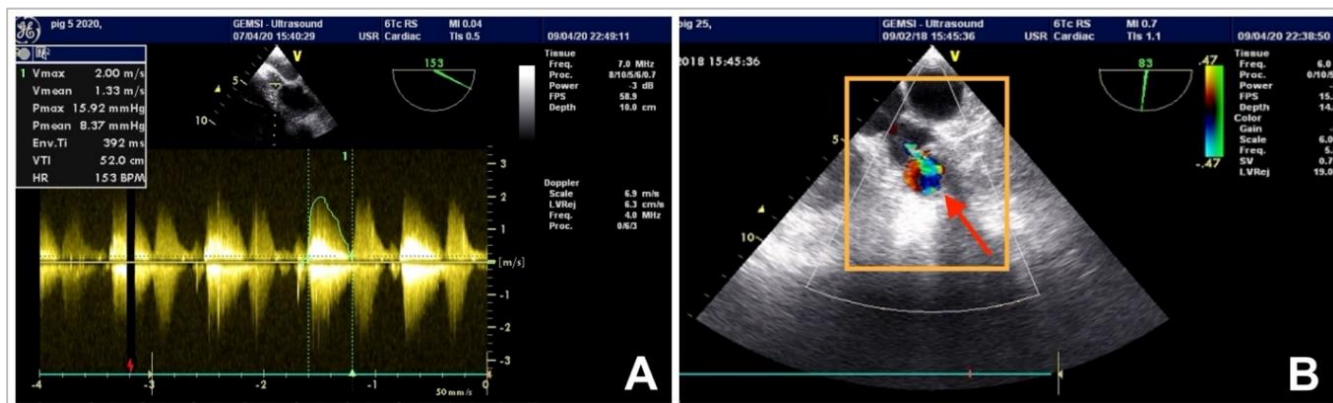


Рисунок 6.7 – Результаты ЧП-ЭХОКГ. А – Послеоперационное измерение величины градиента на уровне проксимального отдела имплантированного ГА-ЯВ кондуита. В – Оценка степени недостаточности на уровне клапана имплантированного ГА-ЯВ кондуита через 6 месяцев после операции. Оранжевый прямоугольник ограничивает область визуализации кондуита; красная стрелка указывает на обратную струю регургитации на клапане кондуита

Градиенты давления были получены из измерений скоростей потока. Недостаточность на клапане кондуита оценивали по шкале от 0 до 3, где 0 – нет или тривиальная, 1 – незначительная, 2 – умеренная, 3 – выраженная. Повышение пикового систолического градиента на ксенографте ≥ 50 мм рт.ст., наличие более чем умеренной недостаточности на клапане кондуита были расценены как его дисфункция [Baumgartner и др., 2021; Piazza и др., 2009; Sarris и др., 2017; Stout и др., 2019; Warnes и др., 2008].

6.1.7 Выведение животных из эксперимента

По окончании 6-месячного периода наблюдения животных выводили из эксперимента путем применения сверхтерапевтических доз тиопентала натрия после предварительной седации препаратом Золетил-100 (5-7 мг/кг) [Nichay и др., 2023; Nichay и др., 2025].

6.1.8 Макро- и микроскопическое исследования

После эвтаназии животного, конduit был хирургически иссечен вместе с прилегающими нативными тканями (дистальнее и проксимальнее линий анастомозов на 2,0-2,5 см). Эксплантированный ксеноконduit рассекали вдоль на всем протяжении. Макроскопическое исследование стенок кондуита, створок и окружающих тканей было проведено для оценки структурных аномалий, включая эндокардит, тромбоз, кальцификацию, деформацию, стеноз и аневризмы.

Все эксплантированные кондуиты были фиксированы в 10% нейтральном забуференном растворе формалина. Для гистологического анализа продольные образцы тканей кондуитов были иссечены по всей длине, включая створку и оба анастомоза. Затем ткани были дегидратированы и залиты в парафин (MT Point, Санкт-Петербург, Россия). Для гистологического анализа срезы тканей толщиной

6 мкм окрашивали с использованием наборов для окрашивания и в соответствии с протоколами производителей: гематоксилин и эозин (Н&Е; Бювитрум, Санкт-Петербург, Россия), по фон Коссу (Бювитрум, Санкт-Петербург, Россия), пентахром по Расселу-Мовату (Diapath, Мартиненго, Италия) и иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание на белки S 100 (Бювитрум, Санкт-Петербург, Россия).

6.1.9 Сканирующая электронная микроскопия

Срезы каждого образца 6 мкм высушивали при комнатной температуре, расправляли и фиксировали на подложке. Перед исследованием образцы покрывали слоем проводящего углерода толщиной 25–30 нм на приборе GVC-3000 Thermal Evaporation Carbon Plating Instrument (KYKY TECHNOLOGY Co., Ltd., Пекин, Китай). Сканирующую электронную микроскопию (СЭМ) и энергодисперсионную рентгеновскую спектроскопию (ЭДС) образцов, а также элементное картирование выбранных областей выполняли с использованием сканирующего электронного микроскопа WIN SEM A6000LV (KYKY TECHNOLOGY Co., Ltd., Пекин, Китай), оснащенного системой AzTec One EDX (Oxford Instruments, Хай-Викомб, Великобритания). Наблюдение за образцами проводилось с использованием детектора вторичных электронов при высоком напряжении электронов 20 кВ и с настройкой электронного пучка 120 мкА. Для каждого образца было выбрано десять полей наблюдения, которые были исследованы при увеличении 100×, 250×, 450× и 700×. Размеры наблюдаемых объектов измерялись с помощью программного обеспечения Microsoft KYKY SEM (версия 1.8.1.2) [Nichay и др., 2023].

6.1.10 Методы статистического анализа

Анализ данных выполняли с использованием R Statistical Software (v4.4.1; R Core Team, 2025) [R Core Team, 2025].

Непрерывные данные описаны как медиана (median, Me) и межквартильный интервал (interquartile range, IQR), категориальные данные – как числовые значения и проценты. Оценку динамики показателя в периоде наблюдения проводили с использованием дисперсионного анализа Фридмана (Friedman ANOVA). Для попарного сравнения использовали критерии Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test) и МакНемара (standart McNemar's test, 2x2). Для межгруппового сравнения применяли критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test) и точного критерия Фишера (Fisher's exact test). Значение $p < 0,05$ считали статистически достоверным.

Для оценки соотношения динамики градиента на кондуите к размеру имплантированного графта в периоде наблюдения использовали показатель D/BSA, где D – диаметр кондуита (мм), BSA (body surface area) – площадь поверхности животного (м^2). Площадь поверхности тела животного (BSA) была рассчитана по формуле: $100 \times \text{BSA} [\text{м}^2] = 7,98 \times \text{BW} [\text{кг}]^{2/3}$ [Itoh и др., 2016].

6.2 Результаты

Результаты проведенного экспериментального исследования представлены в соответствующих подразделах главы.

6.2.1 Послеоперационный период

Все исследуемые ксенографты были успешно имплантированы без каких-либо интраоперационных осложнений.

После операции все животные были экстубированы в течение 1,5–3 часов. На этапе отключения от ИК только пяти животным потребовалась инотропная поддержка (инфузия допамина в дозе от 2,5 до 10 мкг/кг/мин) (Таблица 6.1).

В течение периода наблюдения погибло семь животных (Рисунок 6.1А). В двух случаях смерть наступила по причинам, не связанным с кондуитом: одно животное из группы ДЭ-ПК погибло через 4,9 месяцев после операции; другое из группы Contegra – через 1,6 месяца после имплантации кондуита. У четырех животных в периоде наблюдения был диагностирован протезный эндокардит (ДЭ+Пам-ЯВ – 1; ГА-ЯВ – 1; ГА-ПК – 1; Contegra – 1), в связи с чем они были выведены из эксперимента через 5,6 мес., 3,2 мес., 2,5 мес. и 4,8 мес. соответственно. Одно животное из группы ГА-ПК было выведено из эксперимента через 4,9 месяца после операции из-за прогрессирующей сердечной недостаточности, связанной с дисфункцией протеза.

Все остальные животные (n=29) дожили до окончания 6-месячного периода наблюдения без развития каких-либо кондуит-ассоциированных осложнений. За это время мини-свиньи показали значительный прирост веса, Ме которого составила 19 кг (IQR 12-25 кг), $p < 0,001$.

6.2.2 Результаты имплантации диэпокси-обработанных ксеновенозных кондуитов и групп сравнения

В общей сложности 20 животным были имплантированы ксенокондуиты, изготовленные из клапаносодержащего сегмента бычей ЯВ (Рисунок 6.8). Группами исследования явились ДЭ-ЯВ (n=6) и ДЭ+Пам-ЯВ (n=6), группы контроля включали ГА-ЯВ (n=4) и кондуит Contegra (n=4).

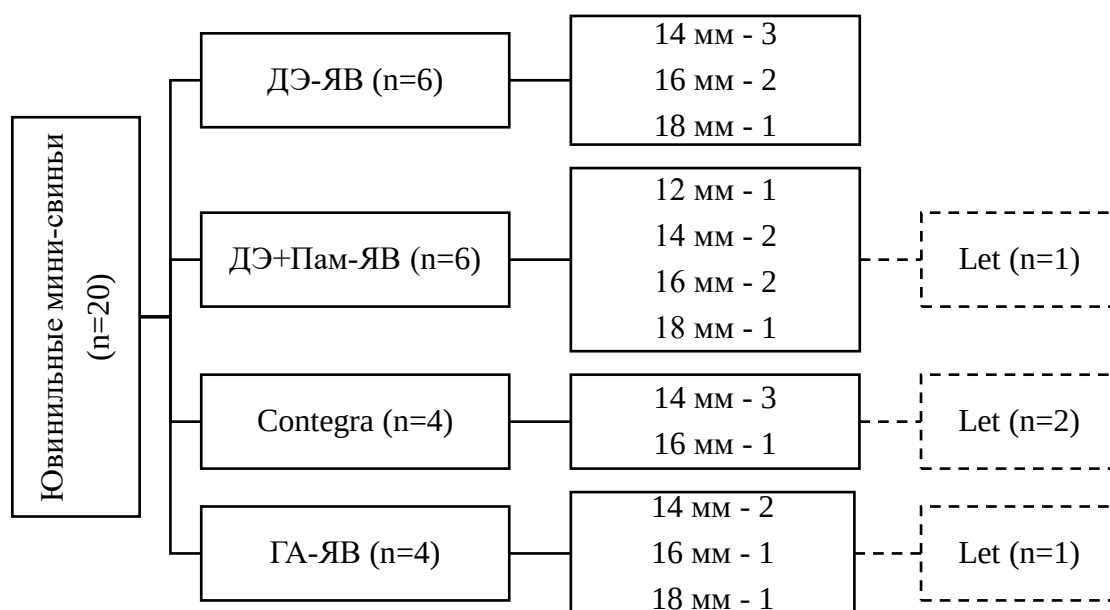


Рисунок 6.8 – Имплантированные ксеновенозные кондуиты. Let, exitus lethalis, летальный исход; ГА-ЯВ, глутаральдегид-обработанный кондуит из яремной вены быка; ДЭ-ЯВ, диэпокси-обработанный кондуит из яремной вены быка; ДЭ+Пам-ЯВ, диэпокси-обработанный кондуит из яремной вены быка с дополнительной антикальциевой обработкой памидроновой кислотой; Пам, памидроновая кислота

6.2.2.1 Чреспищеводная эхокардиография

В течение периода наблюдения, по мере роста животных и изменения отношения D/BSA (Таблица 6.2), отмечено увеличение градиентов как на проксимальном, так и на дистальном отделах ксеновенозных графтов.

Среди 16 мини-свиней, полностью завершивших 6-месячный период наблюдения, у семи животных (43,8%) выявлено увеличение пикового градиента на кондуите >50 мм рт.ст., среднего >30 мм рт.ст.: в группе ДЭ-ЯВ — одно животное (16,7%); в группе ДЭ+Пам-ЯВ — два животных (40%), в группе Contegra — одно животное (50%), в группе ГА-ЯВ — три животных (100%). Среди остальных 9 животных (ДЭ-ЯВ – 5; ДЭ+Пам-ЯВ – 3; Contegra – 1), завершивших эксперимент, пиковые/средние градиенты давления в проксимальной области

составили 20 мм рт.ст. (IQR 19–20 мм рт.ст.)/9 мм рт.ст. (IQR 8–11 мм рт.ст.). В дистальной области эти значения составили 28 мм рт.ст. (IQR 26–35 мм рт.ст.) и 16 мм рт.ст. (IQR 13–18 мм рт.ст.) соответственно.

Таблица 6.2 – Характеристика экспериментальных животных в послеоперационном периоде

Параметр	Ранний п/о период (n=36)	3 мес. п/о (n=34)	6 мес. п/о (n=29)	p
	Me (IQR)			
Вес, кг	52 (41-63)	63 (56-71)	72 (66-80)	<0,001
BSA, м²	1,12 (0,96-1,27)	1,26 (1,17-1,37)	1,38 (1,30-1,48)	<0,001
D/BSA, мм/м²	14,39 (12,22-15,31)	12,01 (11,55-13,70)	11,28 (10,48-12,15)	<0,001
Проксимальный градиент, мм рт.ст.:				
пиковый	12 (8-17)	14 (8-24)	21 (15-55)	<0,001
средний	6 (4-9)	9 (3-15)	12 (7-33)	<0,001
Дистальный градиент, мм рт.ст.:				
пиковый	18 (11-22)	31 (23-51)	37 (28-57)	<0,001
средний	10 (8-15)	19 (14-32)	22 (15-35)	<0,001
Регургитация на клапане кондуита, п (%):				0,002
0	23 (63,89%)	24 (70,59%)	9 (31,03%)	
1	12 (33,33%)	10 (29,41%)	14 (48,28%)	
2	1 (2,78%)	0	6 (20,69%)	

Примечание: BSA (body surface area), площадь поверхности тела; D, диаметр; Me (median), медиана; IQR (interquartile range), межквартильный интервал; п/о, после операции.

Изменение величин пикового и среднего градиентов в проксимальном и дистальном отделах графтов представлено на рисунке 6.9. Динамика отношения значения градиента к D/BSA за период наблюдения представлена на рисунке 6.10.

Тромбоза или гемодинамически значительной недостаточности на клапане ксеновенозных кондуитов не выявлено.

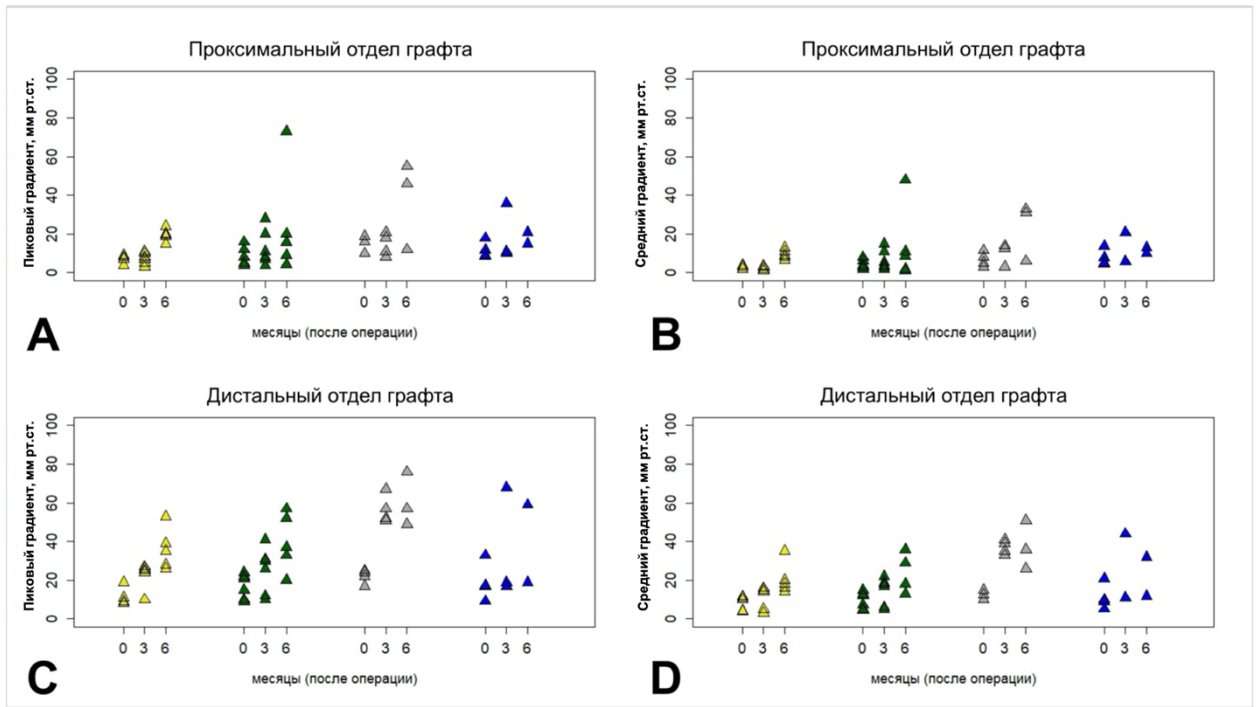


Рисунок 6.9 – Динамика изменения градиента на ксеновенозных кондуитах в периоде наблюдения. А – Пиковый проксимальный градиент. В – Средний проксимальный градиент. С – Пиковый дистальный градиент. D – Средний дистальный градиент. Желтый треугольник – ДЭ-ЯВ; зеленый треугольник – ДЭ+Пам-ЯВ; серый треугольник – конduit Contegra; синий треугольник – ГА-ПК

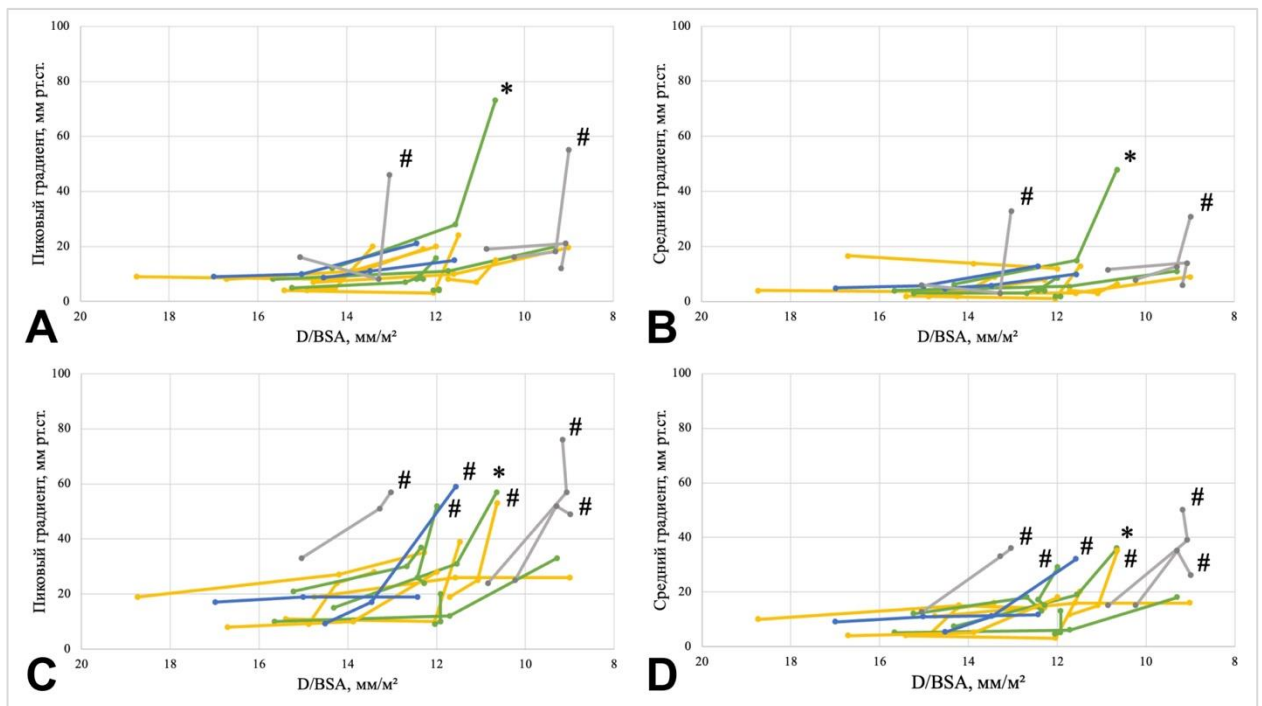


Рисунок 6.10 – Динамика изменения величины градиента в проксимальном и дистальном отделах кондуитов, изготовленных из яремной вены быка, при

уменьшении отношения D/BSA в периоде наблюдения (для животных, полностью завершивших 6-месячный период наблюдения). А – Пиковый проксимальный градиент. В – Средний проксимальный градиент. С – Пиковый дистальный градиент. D – Средний дистальный градиент. Желтая линия – ДЭ-ЯВ; зеленая линия – ДЭ+Пам-ЯВ; серая линия – кондуит Contegra; синяя линия – ГА-ПК.

Несоответствие размеров кондуит-пациент отмечено *, неоинтимальная гиперплазия – #. BSA (body surface area), площадь поверхности тела; D, диаметр

6.2.2.2 Макроскопическая оценка эксплантированных ксеновенозных кондуитов

Кондуиты ДЭ-ЯВ и ДЭ+Пам-ЯВ были хорошо интегрированы как в проксимальной, так и в дистальной областях, без деформаций или формирования аневризм. Все ДЭ-обработанные ксеновенозные кондуиты сохранили свою растяжимость, эластичность и мягкость. Люминальная поверхность протезов была чистой, гладкой, без кальцинированных участков и отложений тромботических масс (Рисунок 6.11А). На внутренней поверхности стенок кондуита наблюдался тонкий неоинтимальный слой. Повреждения створок отсутствовали, они были тонкие и подвижными, без кальцификации, фенестрации или разрывов.

В двух трансплантатах гиперплазия неоинтимы наблюдалась вдоль линии шва дистального анастомоза (Рисунок 6.11В): один из группы ДЭ-ЯВ, другой – из ДЭ+Пам-ЯВ. Пролиферация неоинтимы была наиболее выражена вдоль малой кривизны анастомоза. Один кондуит из группы ДЭ+Пам-ЯВ (12 мм) продемонстрировал значительное несоответствие размеров между ксенографтом и ЛА из-за быстрого роста животного в течение периода наблюдения.

Кондуиты Contegra имели более жесткие стенки; однако они продемонстрировали достаточную гибкость. Внутренний просвет ксенокондуитов был свободен, фиброзный слой покрывал люминальную поверхность стенки (Рисунок 6.11С).

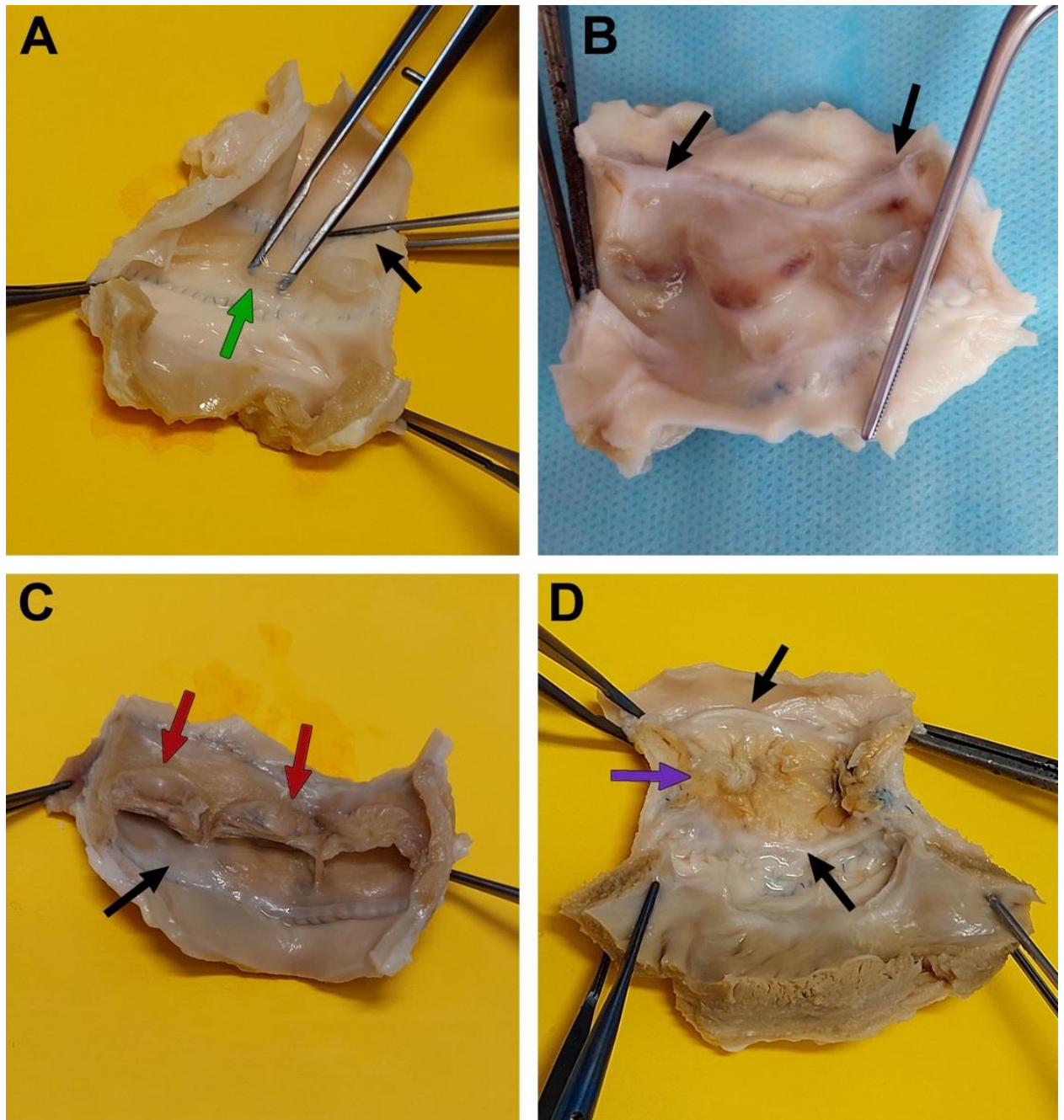


Рисунок 6.11 – Макрофотографии эксплантированных кондуитов через 6 месяцев наблюдения. А – ДЭ-ЯВ; черная стрелка указывает на тонкий слой неоинтимы, а зеленая стрелка – на сохраненные тонкие створки клапана. В – ДЭ+Пам-ЯВ; черная стрелка указывает на гиперплазию неоинтимы. С – кондуит Contegra; черная стрелка указывает на толстую неоинтиму, а красные стрелки – на фибрин и тромботические массы. D – ГА-ЯВ; черная стрелка указывает на значимую неоинтимальную гиперплазию, а фиолетовая стрелка – на деформированную створку, подпаянную к стенке кондуита

Два кондуита Contegra характеризовались наличием неоинтимальной гиперплазии в области дистального анастомоза с наибольшей толщиной вдоль малой кривизны (первый был экспантирован через 1,6 месяца, второй – по окончании 6-месячного периода наблюдения). Крупные кальциевые депозиты были обнаружены как в области дистального, так и проксимального анастомозов. Створки были достаточно тонкими, подвижными, без явных признаков минерализации. На внутренней поверхности створок и синусов двух графтов Contegra были обнаружены тромботические напластования и отложения фибрина.

Стенка ГА-ЯВ была жесткой и ригидной, а внутренняя поверхность кондуитов была покрыта достаточно грубой фиброзной тканью. В одном случае стенка была рыхлой, с гофрированной внутренней поверхностью и с частично отслоившимся неоинтимальным слоем. Два кондуита имели деформированные створки, которые были частично спаяны со стенкой ксенографта (Рисунок 6.11D). Неоинтимальная гиперплазия и кальциевые конгломераты были выявлены в области проксимального и дистального анастомозов.

При инфекционном эндокардите процесс локализовался строго на уровне ксенокондуита, не выходя за пределы линии швов (Рисунок 6.12).

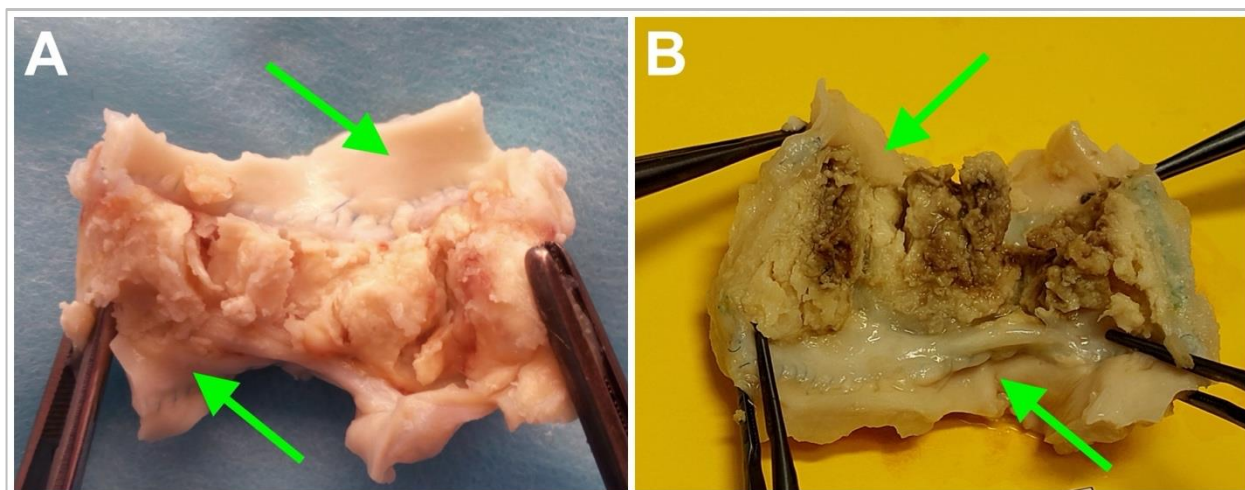


Рисунок 6.12 – Протезный инфекционный эндокардит. А – Инфекционный эндокардит ДЭ+Пам-ЯВ, животное выведено из эксперимента через 5,6 мес. после операции. В – Инфекционный эндокардит ГА-ПК, животное выведено из эксперимента через 2,5 мес. после имплантации кондуита. Зеленые стрелки указывают на свободную от инфекционного процесса ткань нативной ЛА

6.2.2.3 Микроскопическая оценка эксплантированных ксеновенозных кондуитов

Во всех эксплантированных ДЭ-обработанный ксеновенозных кондуитах, как в группе ДЭ-ЯВ, так и в ДЭ+Пам-ЯВ, структура стенки была сохранена (Рисунок 6.13А).

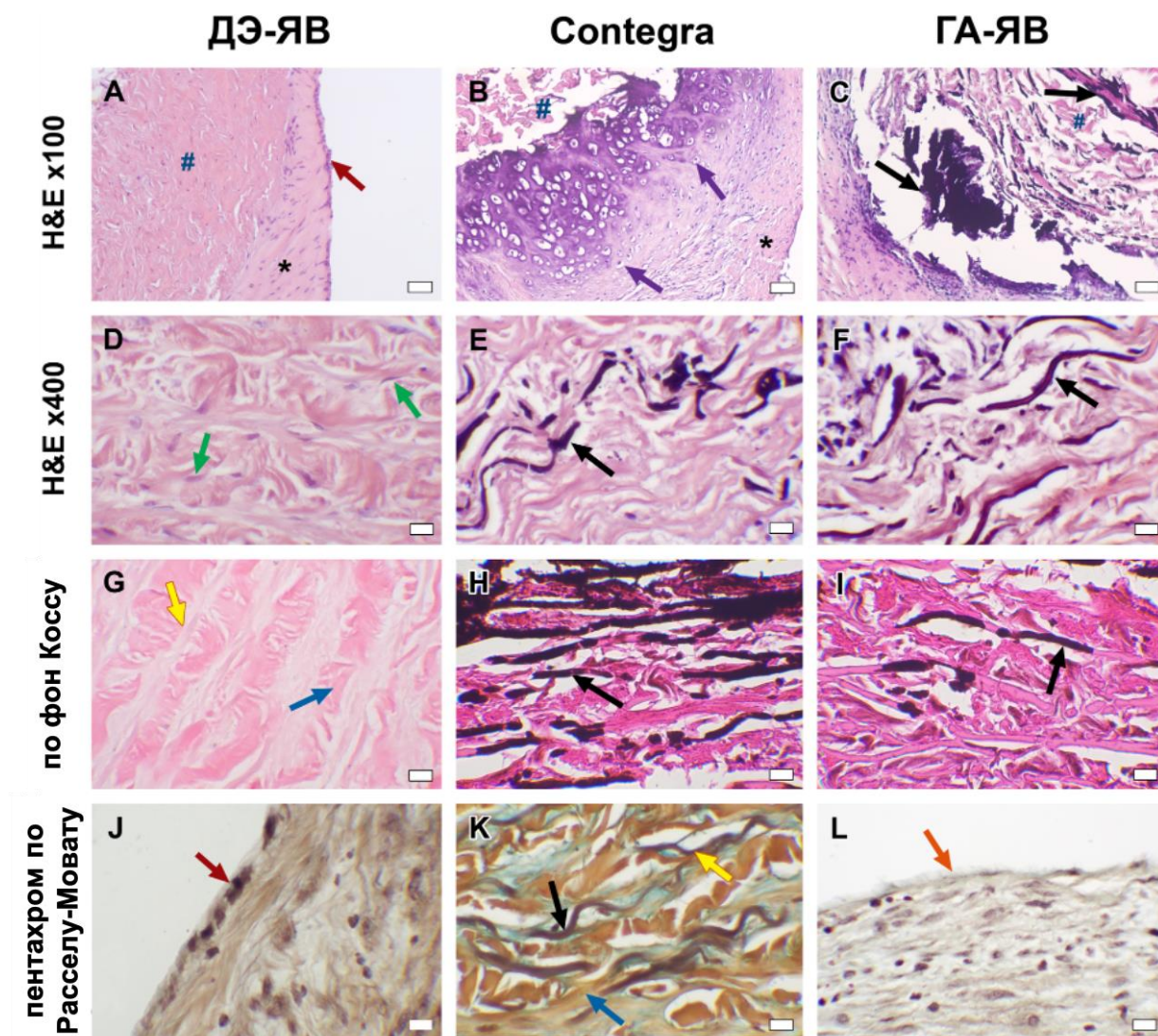


Рисунок 6.13 – Микрофотографии эксплантированных ксеновенозных кондуитов.

А–С – обзорные изображения, окрашивание Н&Е, $\times 100$, масштабная линейка – 50 мкм. D–F – структура стенки кондуита, окрашивание Н&Е, $\times 400$, масштабная линейка – 10 мкм. G–I – структура стенки графта, окрашивание по фон Коссу $\times 400$, масштабная линейка – 10 мкм. J–L – структура стенки ксенокондуита, окрашивание пентахромом по Расселу–Мовату, $\times 400$, масштабная линейка – 10 мкм. Черные стрелки указывают на участки минерализации; зеленые стрелки – на мигрирующие

фибробласты; желтые стрелки – на волокна эластина; синие стрелки – на волокна коллагена; фиолетовые стрелки – на гиалиноз и хондроидную метаплазию; красные стрелки – на монослой эндотелия; оранжевая стрелка – на отсутствие эндотелия на люминальной поверхности; * – неоинтима; # – ткань кондуита. Н&Е, окрашивание гематоксилином и эозином; ГА-ЯВ, яремная вена быка, обработанная глутаровым альдегидом; ДЭ-ЯВ, яремная вена быка, обработанная диэпоксидом

Волокна эластина и коллагена имели правильное направление (Рисунок 6.13D, 6.13G), лишь в некоторых участках наблюдалась мелкоочаговая фрагментация и дезорганизация коллагеновых волокон.

Были выявлены признаки ремоделирования ткани ДЭ-обработанных ксеновенозных кондуитов, не зависимо от обработки бисфосфонатом, в виде прорастания стенки клетками миофибробластного ряда с адвентициальной стороны в глубь меди, замещение коллагеновых волокон мягкой недеформирующей соединительной тканью и формирования участков неоангиогенеза (Рисунок 6.13А, 6.13D). Фибробласты, мигрировавшие в стенку ДЭ-ЯВ и ДЭ+Пам-ЯВ (Рисунок 6.14А, 6.14В), также были визуализированы при ИГХ-окрашивание на белки S 100 [Ермаков и др., 2022; Олейникова и др., 2020; Kalluri, Neilson, 2003].

В некоторых кондуитах наблюдались очаги инфильтрации воспалительных клеток (лимфоцитов; гранулоцитов). В большинстве эксплантированных графтов, как в группе ДЭ-ЯВ, так и в группе ДЭ+Пам-ЯВ, единичные гигантские клетки инородного тела были выявлены в адвентициальном слое.

Равномерный неоинтимальный слой, покрывавший внутреннюю поверхность ДЭ-ЯВ и ДЭ+Пам-ЯВ, распространялся со стороны как проксимального, так и дистального анастомозов и не переходил на створки протеза. Толщина неоинтимального слоя составила ~110–320 мкм в центральной части кондуита и ~130–620 мкм вблизи анастомозов. Фибробласты были равномерно распределены в неоинтимае. Хорошо развитый монослой эндотелия (Рисунок 6.13А, 6.13J) распространялся от нативной ЛА и полностью покрывал фиброзную ткань.

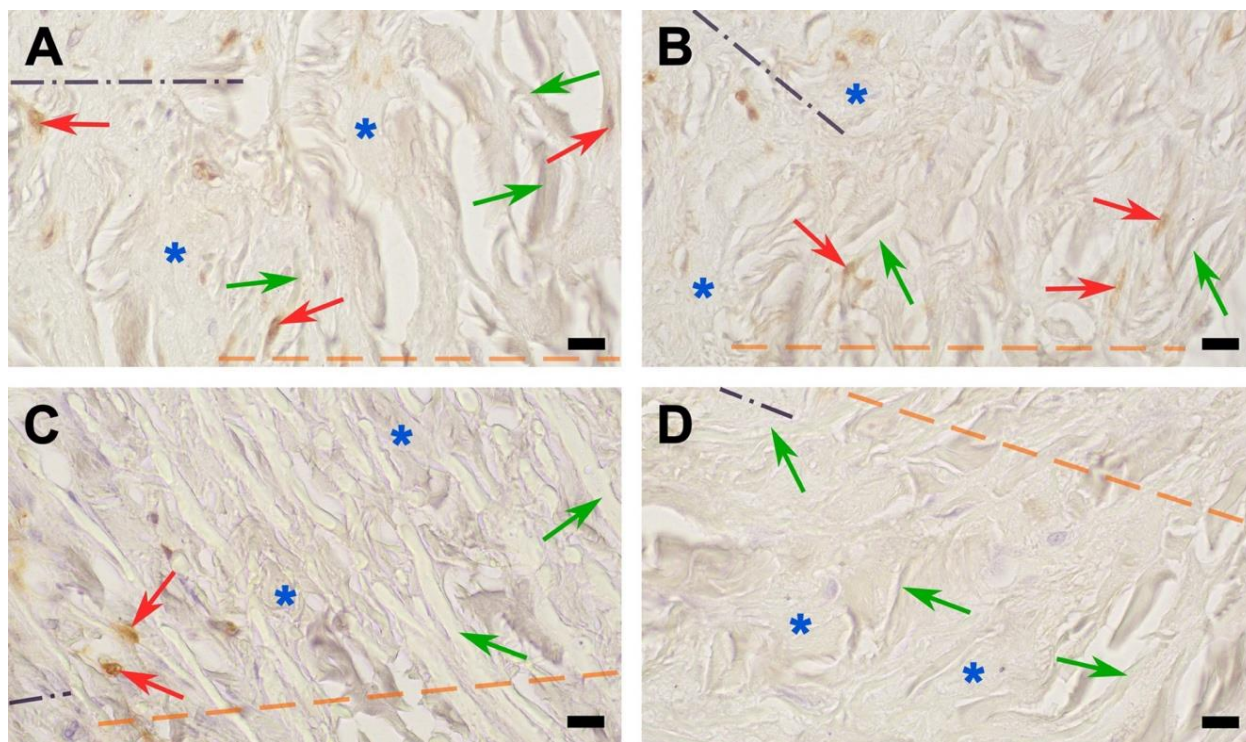


Рисунок 6.14 – Стенка кондуитов, изготовленных из яремной вены быка. ИГХ-окрашивание на белки S100. А – стенка ДЭ-ЯВ; $\times 100$. В – стенка ДЭ+Пам-ЯВ; $\times 400$. С – стенка кондуита Contegra; $\times 400$. D – стенка ГА-ЯВ; $\times 400$. Красные стрелки указывают на фибробласты, S100-позитивные клетки; зеленые стрелки – на волокна эластина; * – волокна коллагена; оранжевая пунктирная линия отражает область ткани ксенографта; черная пунктирная линия с точкой – адвентициальный слой. Масштабная линейка – 10 мкм

Не было выявлено признаков минерализации ткани или депонирования солей кальция в волокнах коллагена или эластина ни в группе ДЭ-ЯВ, ни в группе ДЭ+Пам-ЯВ (Рисунок 6.13G). В некоторых кондуитах ($n=5$) небольшие кластеры кальция присутствовали вдоль линии анастомоза вокруг отдельных стежков как в ткани трансплантата, так и в ткани нативной ЛА (Рисунок 6.15B).

Структура створок была сохранена во всех случаях, как в группе ДЭ-ЯВ, так и в группе ДЭ+Пам-ЯВ. Волокна коллагена и эластина были правильно ориентированы и хорошо сохранены. В некоторых клапанах присутствовала миграция миофиibroбластных клеток в ткань створки (Рисунок 6.15A). Не было выявлено кальцификации створок. Ни на приточной, ни на отточной поверхностях створок не обнаружено эндотелиальных клеток.

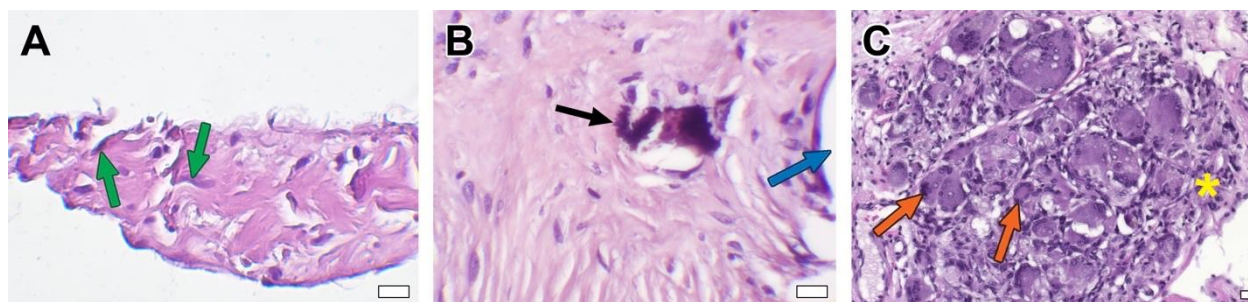


Рисунок 6.15 – Микрофотографии экспантированного ксенокондуита ДЭ+Пам-ЯВ, окрашивание Н&Е, $\times 400$; масштабная линейка – 10 мкм. А – створка клапана ксеновенозного графта; зеленые стрелки указывают на мигрировавшие фибробласты. В – небольшой кальциевый кластер в зоне анастомоза; черные стрелки указывают на область минерализации, синяя стрелка – на шовное отверстие. С – гигантоклеточная гранулема; оранжевые стрелки указывают на гигантские клетки, желтая * на гранулематозную ткань

В двух случаях (ДЭ-ЯВ – 1; ДЭ+Пам-ЯВ – 1) плотная гиперплазированная неоинтима была обнаружена вдоль линии шва дистального анастомоза (диапазон толщины $\sim 1250\text{--}1800$ мкм). Большое количество многоядерных макрофагов, образующих гигантоклеточные гранулемы, присутствовали в адвентициальном слое обоих графтов в области дистального анастомоза (Рисунок 6.15С). Вокруг гигантоклеточных гранул отмечена неоваскуляризация и плотная фиброзная ткань с воспалительными клетками, состоящими из лимфоцитов и гистиоцитов. В местах адвентициального фиброза деформация стенки кондуита происходила за счет формирования адвентициального рубца из плотной фиброзной ткани. Также наблюдалось скопление гигантоклеточных макрофагов в субнеоинтимальной области этих графтов.

Экспантированные кондуиты Contegra сохранили свою нативную структуру. Волокна коллагена и эластина были правильно ориентированы, однако местами отмечена очаговая фрагментация коллагеновых волокон. Крупные кальциевые депозиты были выявлены в зоне анастомозов. Значимое накопление кальция в волокнах эластина было обнаружено по всей стенке кондуита, с преобладанием в субинтимальном слое (Рисунок 6.13Н, 6.13К). Также кальцинированные волокна эластина в области основания створок были выявлены

в графте, эксплантированном через 1,6 месяца после операции (Рисунок 6.13Е). Три из четырех кондуитов Contegra продемонстрировали явления гиалиноза с признаками минерализации и субинтимальные участки хондройдной метаплазии в стенке графта (Рисунок 6.13В). Признаки хондройдной метаплазии и гиалиноза были выявлены в ткани нативной ЛА в области анастомоза. Клетки в очагах хондройдной метаплазии продемонстрировали положительное ИГХ-окрашивание на белки S 100 (Рисунок 6.16). Воспалительные клетки, в основном лимфоциты, нейтрофилы и единичные многоядерные макрофаги, присутствовали в адвентициальной оболочке кондуитов и субнеоинтимально. Инфильтрация воспалительными клетками стенки трансплантата также была обнаружена вблизи линий анастомозов. В некоторых областях отмечена миграция миофибробластов разной степени зрелости (Рисунок 6.14С) и прорастание тяжелой плотной фиброзной ткани со стороны адвентиции вглубь стенки кондуитов.

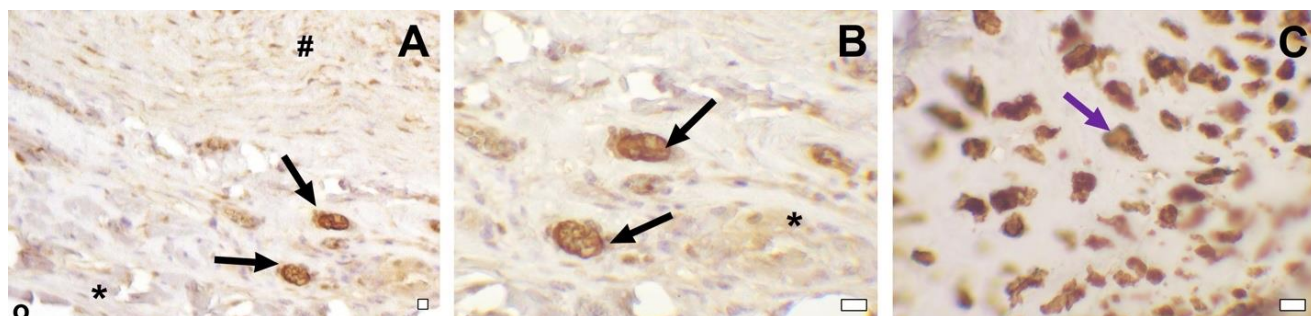


Рисунок 6.16 – Хондройдная метаплазия и гиалиноз в стенке кондуита Contegra.

ИГХ-окрашивание на белки S100. А – ксенокондуит Contegra, люминальная поверхность; $\times 100$. В – ксенокондуит Contegra, люминальная поверхность; $\times 400$.

С – гиалиноз в области анастомоза; $\times 400$. Черные стрелки указывают на субинтимально расположенные S100-позитивные клетки, демонстрирующие признаки хондройдной метаплазии; фиолетовая стрелка – на S100-позитивные клетки внутри очага гиалиноза; * – неоинтима; # – ткань ксенографта; ° – просвет кондуита. Масштабная линейка – 10 мкм

Люминальная поверхность кондуитов Contagra была покрыта неравномерным слоем неоинтимы, без перехода на створки протеза. Максимальная толщина неоинтимы была обнаружена в области дистального анастомоза (~ 1070 – 1740 мкм), а в других местах она находилась в диапазоне ~ 130 – 760 мкм. В кондуите,

эксплантированном через 1,6 месяца наблюдения (от свиньи, погибшей от причин, не связанных с кондуитом), было отмечено распространение неоинтимального слоя со стороны обоих анастомозов, при этом в центральной части кондуита стенка была лишена фиброзной ткани. Фибробласты присутствовали в неоинтимальном слое во всех графтах, преимущественно в зонах анастомозов. Монослой эндотелиальных клеток частично покрывал неоинтиму. Створки кондуитов Contegra выглядели сохранными, с правильным направлением волокон. В двух случаях отложения фибрина и тромбы были обнаружены как на приточной, так и на отточной поверхностях клапанов. Минерализации створок не наблюдалось.

Стенка ГА-ЯВ характеризовалась признаками отека с фрагментацией волокон коллагена и эластина и была инфильтрирована воспалительными клетками (лимфоцитами, нейтрофилами, гранулоцитами, многоядерными макрофагами и небольшим количеством эозинофилов). Наиболее выраженная воспалительная реакция локализовалась в зонах анастомозов и на границе с неоинтимой. Минерализация стенки была выявлена во всех ГА-ЯВ, при этом наиболее крупные кальциевые депозиты определялись вблизи линии швов (Рисунок 6.13С). Кальцификации была связана с волокнами эластина (Рисунок 6.13F, 6.13I). Неоинтимальная ткань покрывала внутреннюю поверхность ГА-ЯВ неравномерно; она отсутствовала в центральной части и была выражена в областях анастомозов (~770–1380 мкм). Фибробласты в неоинтимальном слое локализовались преимущественно вблизи люминальной поверхности и линий швов. На внутренней поверхности протезов ГА-ЯВ эндотелий либо отсутствовал (Рисунок 6.13L), либо частично покрывал неоинтиму в зоне дистального и проксимального анастомозов. Створки ГА-ЯВ характеризовались сохранной структурой, однако волокна были фрагментированы. У оснований створок клапана были выявлены крупные минеральные кластеры. В одном случае пристеночный тромб присутствовал в проксимальном отделе кондуита и распространялся на приточную поверхность створок. В адвентициальном слое имелись очаги разрешающегося воспаления с образованием фиброзной капсулы и неоангиогенезом. От внешней капсулы в глубь стенки кондуитов тянулись тяжи плотной фиброзной ткани. Отчетливой миграции фибробластов в толщу стенки ГА-ЯВ

выявлено не было (Рисунок 6.14D). Нативная ЛА была инфильтрирована воспалительными клетками, а в местах анастомозов присутствовали кальциевые конгломераты.

У трех животных с диагностированным протезным инфекционным эндокардитом были обнаружены многочисленные бактериальные или грибковые колонии (Рисунок 6.17). В стенке графтов отмечены дегенеративные изменения, характеризующиеся редукцией волокон коллагена и эластина и продуктивным воспалением с обилием нейтрофилов и макрофагов. В зонах анастомозов была выявлена грануляционная ткань с неоваскуляризацией, склерозом, лизисом, лимфоцитарной и гистиоцитарной инфильтрацией. К люминальной поверхности кондуитов и к створкам, как с приточной, так и с отточной поверхности, прилегали тромбы с выраженной воспалительной инфильтрацией и содержащие колонии бактерий или грибов. Матрикс створок клапана характеризовался дегенеративными изменениями и инфильтрацией лимфоцитарными клетками. Некротические очаги наблюдались у оснований створок.

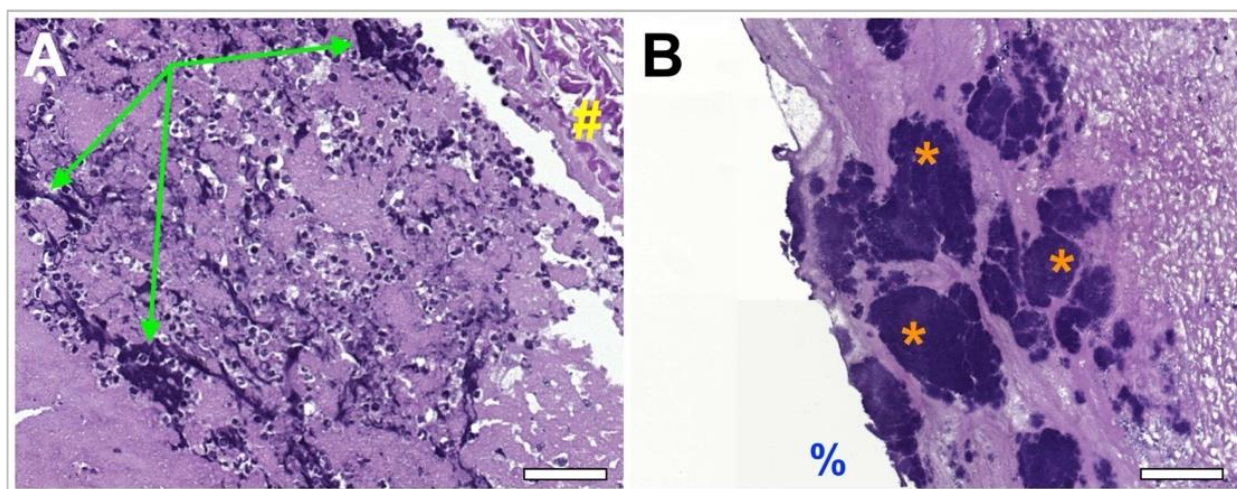


Рисунок 6.17 – Микрофотографии ксенокондуитов с протезным инфекционным эндокардитом. А – Грибковый протезный эндокардит, окрашивание Н&Е, $\times 400$; масштабная линейка – 50 мкм. В – Бактериальный протезный эндокардит, окрашивание Н&Е, $\times 400$; масштабная линейка – 100 мкм. Зеленые стрелки указывают на грибковые колонии, желтая # – ткань кондуита, оранжевая * – колонии бактерий, % – просвет графта

6.2.2.4 Сканирующая электронная микроскопия

СЭМ-изображения и элементное картирование наблюдаемых полей показали, что образцы, обработанные ДЭ, не содержали минеральных отложений по всему сечению. Обнаруженный уровень кальция соответствовал базовому уровню, тогда как сигнал, соответствующий уровням фосфора, был слишком слабым, чтобы быть точно отраженным на карте (Рисунок 6.18).

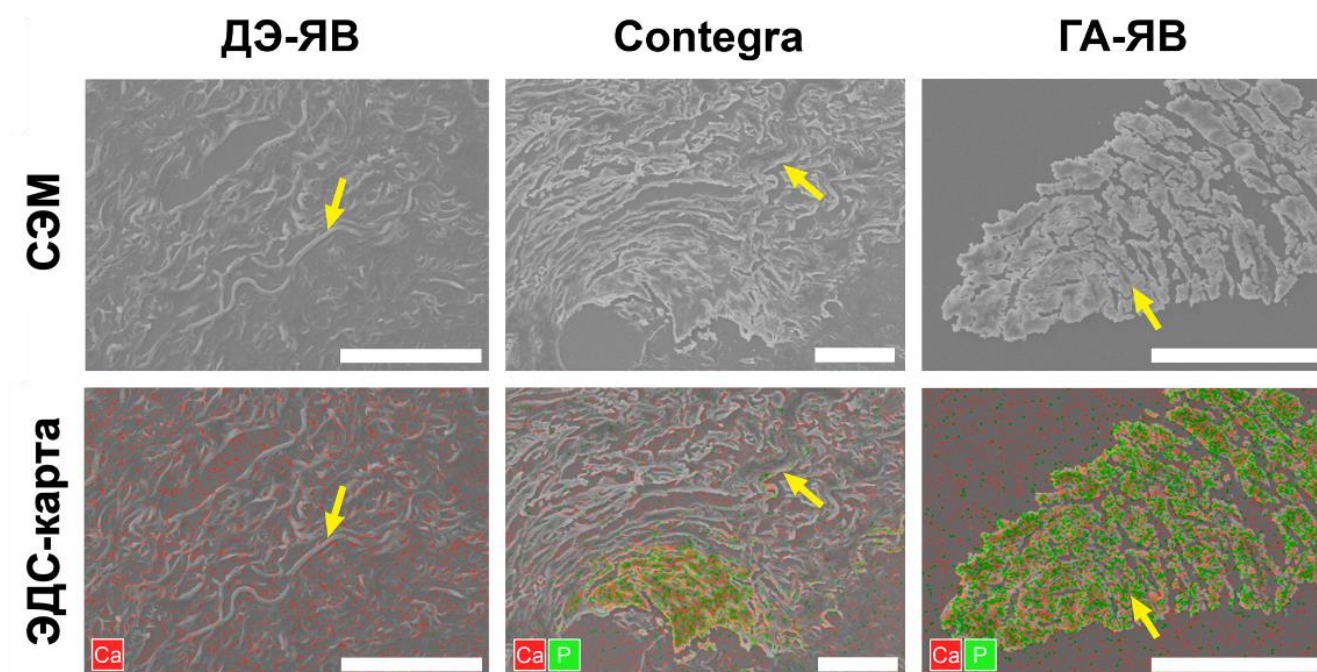


Рисунок 6.18 – СЭМ-снимки и ЭДС-карты высушенных срезов. Желтые стрелки указывают на волокна эластина. Масштабная линейка – 50 мкм. ГА-ЯВ, яремная вена быка, обработанная глутаровым альдегидом; ДЭ-ЯВ, яремная вена быка, обработанная диэпоксидом; СЭМ, сканирующая электронная микроскопия; ЭДС, энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия

В образцах, обработанных ГА, были обнаружены крупные кристаллические скопления с высоким содержанием кальция и фосфора. Хотя эти конгломераты имели твердые минеральные структуры, их формы напоминали направление волокон эластина в ткани графта (Рисунок 6.18).

Подобная картина наблюдалась и в кондуитах Contegra. Согласно картам ЭДС и контрольным сканирующим изображениям, участки минерализации были распределены вдоль волокон эластина (Рисунок 6.18). Значения соотношения

кальция к фосфору для кластеров в группе Contegra и ГА-ЯВ были $>1,5:1$, что определяет их как апатиты.

6.2.3 Результаты имплантации диэпокси-обработанных ксеновенозных кондуитов и группы сравнения

Шестнадцати здоровым животным были имплантированы ксенографты, изготовленные из бычьего перикарда (Рисунок 6.19). Группами исследования были ДЭ-ПК (n=6) и ДЭ+Пам-ПК (n=6), группа контроля – ГА-ПК (n=4).

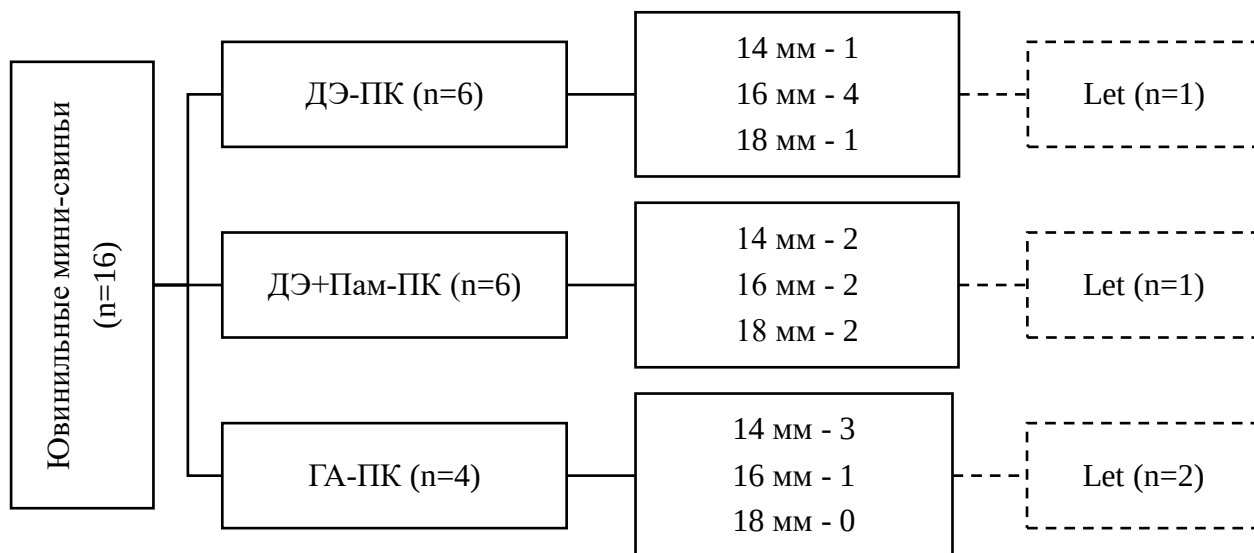


Рисунок 6.19 – Имплантированные ксеноперикардальные кондуиты.

Let, exitus lethalis, летальный исход; ГА-ПК, глутаральдегид-обработанный ксеноперикардальный кондуит; ДЭ-ПК, диэпокси-обработанный ксеноперикардальный кондуит; ДЭ+Пам-ПК, диэпокси-обработанный ксеноперикардальный кондуит с дополнительной обработкой памидроновой кислотой; Пам, памидроновая кислота

6.2.3.1 Чреспищеводная эхокардиография

За исследуемый период отмечен интенсивный рост экспериментальных животных, отражающийся увеличением массы тела и изменением соотношения D/BSA (Таблица 6.2), что соотносилось с ростом градиентов как в проксимальном, так и в дистальном отделах ксеноперикардальных графтов (Рисунок 6.20). Динамика отношения значения градиента к D/BSA за период наблюдения отображена на рисунке 6.21.

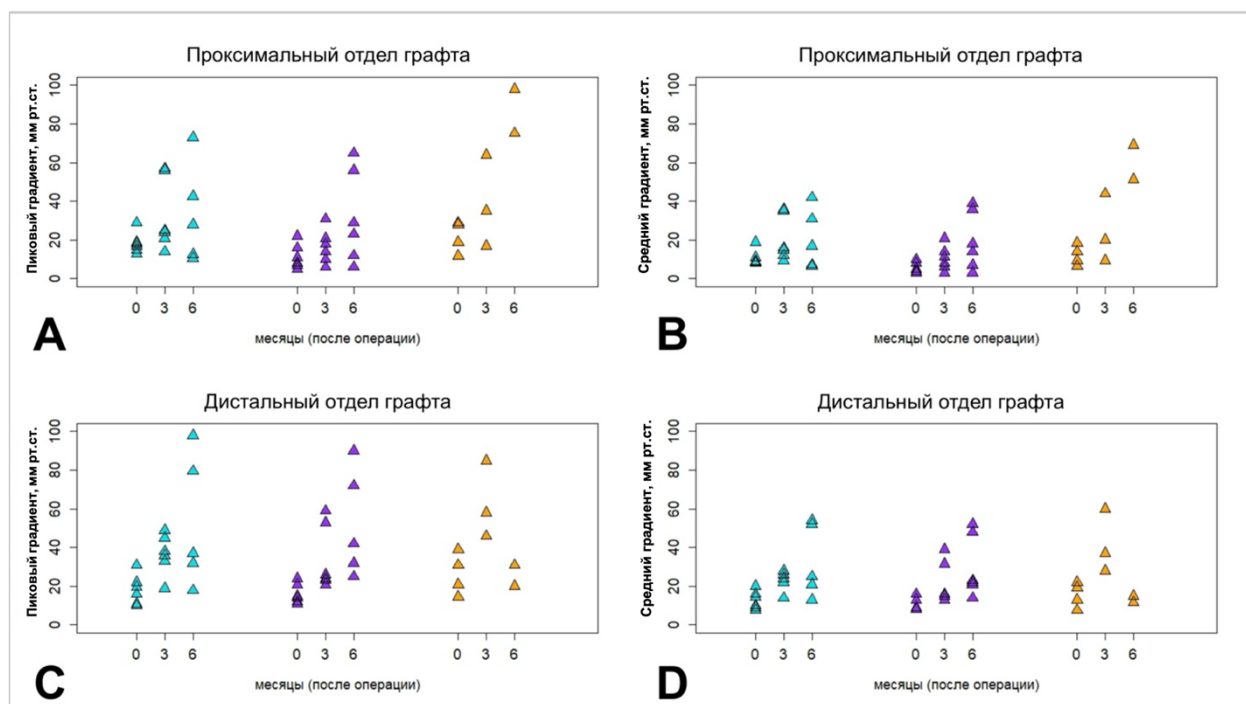


Рисунок 6.20 – Динамика изменения градиента на ксеноперикардальных кондуитах в периоде наблюдения. А – Пиковый проксимальный градиент. В – Средний проксимальный градиент. С – Пиковый дистальный градиент. D – Средний дистальный градиент. Голубой треугольник – ДЭ-ПК; фиолетовый треугольник – ДЭ+Пам-ПК; оранжевый треугольник – ГА-ПК

Из 13 мини-свиней, полностью завершивших 6-месячный период наблюдения, у шести животных (46,2%) наблюдалось увеличение пикового градиента на кондуите более чем 50 мм рт.ст., с соответствующим средним градиентом >30 мм рт.ст.: в группе ДЭ-ПК – 2 (40%); в группе ДЭ+Пам-ПК – 2 (40%); в группе ГА-ПК – 2 (100%). В остальных 7 случаях (ДЭ-ПК – 3; ДЭ+Пам-

ПК – 4), пиковые и средние градиенты в проксимальной области графта составили 12 мм рт.ст. (IQR 10–28 мм рт.ст.) и 7 мм рт.ст. (IQR 6,5–17 мм рт.ст.). В дистальной области эти значения были 32 мм рт.ст. (IQR 25–37 мм рт.ст.) и 21 мм рт.ст. (IQR 14–23 мм рт.ст.) соответственно. Гемодинамически значимых недостаточности или тромбоза клапана кондуита выявлено не было.

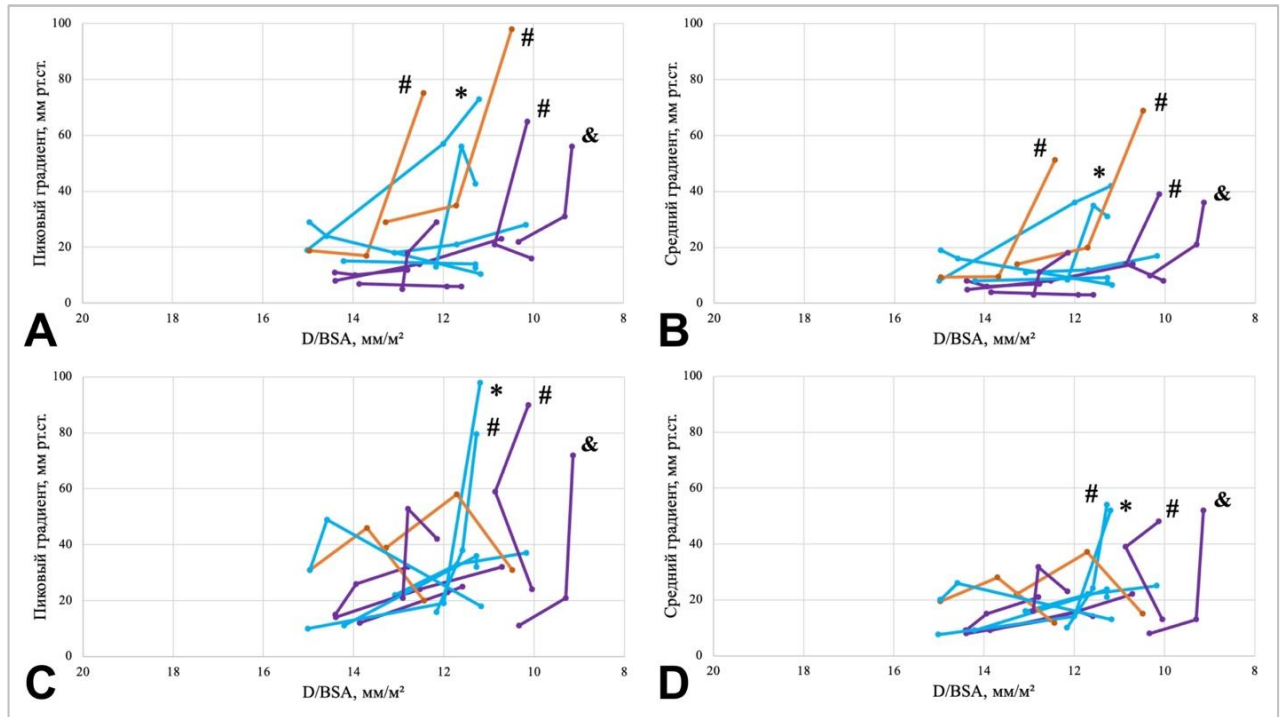


Рисунок 6.21 – Динамика изменения величины градиента в проксимальном и дистальном отделах кондуитов, изготовленных из ксеноперикарда, при уменьшении отношения D/BSA в периоде наблюдения (для животных, полностью завершивших 6-месячный период наблюдения). А – Пиковый проксимальный градиент. В – Средний проксимальный градиент. С – Пиковый дистальный градиент. D – Средний дистальный градиент. Голубая линия – ДЭ-ПК; фиолетовая линия – ДЭ+Пам-ПК; оранжевая линия – ГА-ПК. Несоответствие размеров конduit-пациент отмечено *, неоинтимальная гиперплазия – #, протезный эндокардит – &. BSA (body surface area), площадь поверхности тела; D, диаметр

6.2.3.2 Макроскопическая оценка эксплантированных ксеноперикардальных кондуитов

Все ДЭ-обработанные ксеноперикардальные кондуиты, как из группы ДЭ-ПК, так и из группы ДЭ+Пам-ПК, были свободными от деформации и перегибов и продемонстрировали удовлетворительную интеграцию в легочное русло, несмотря на умеренную жесткость стенки. Внутренняя поверхность ДЭ-обработанных графтов была чистой и гладкой, без признаков тромбоза и грубых кальциевых конгломератов (Рисунок 6.22А, 6.22В). В большинстве случаев ($n=7$; 60%) относительно тонкий слой неоинтимы покрывал люминальную поверхность стенки кондуитов с переходом на створки, как на приточную, так и на отточную поверхности (Рисунок 6.22А). Створки оставались подвижными и свободными от деформаций, фенестраций, разрывов или крупных очагов минерализации. В двух случаях (ДЭ-ПК – 1; ДЭ+Пам-ПК – 1) была выявлена гиперплазия неоинтимы вдоль дистального анастомоза, преимущественно по малой кривизне, что и привело к росту градиента на кондуите. В одном случае (ДЭ-ПК) было отмечено значительное несоответствие между протезом и нативной ЛА из-за активного роста мини-свиньи в периоде наблюдения. У другого животного при эксплантации кондуита был выявлен протезный инфекционный эндокардит (ДЭ+Пам-ПК).

ГА-ПК кондуиты отличались более жесткой стенкой с крупными очагами минерализации, обнаруженными как в стенке, так и на некоторых створках протезов. Внутренняя поверхность кондуитов была покрыта неровным слоем неоинтимы, который распространялся на створки (Рисунок 6.22С). Неоинтимальная гиперплазия была наиболее выражена в области проксимального и дистального анастомозов, что и явилось причиной высокого градиента на уровне протеза по окончании 6-месячного периода наблюдения. Створки ГА-ПК были утолщены, с кальцинированными участками. В одном случае было выявлено полное прилипание створки графта к его стенке (Рисунок 6.22D). У одного животного, погибшего в периоде наблюдения от прогрессирующей сердечной недостаточности, створки кондуита были покрыты жесткой гиперплазированной

неоинтимой, что привело к ограниченной подвижности и фиксации створок в полуоткрытом положении.

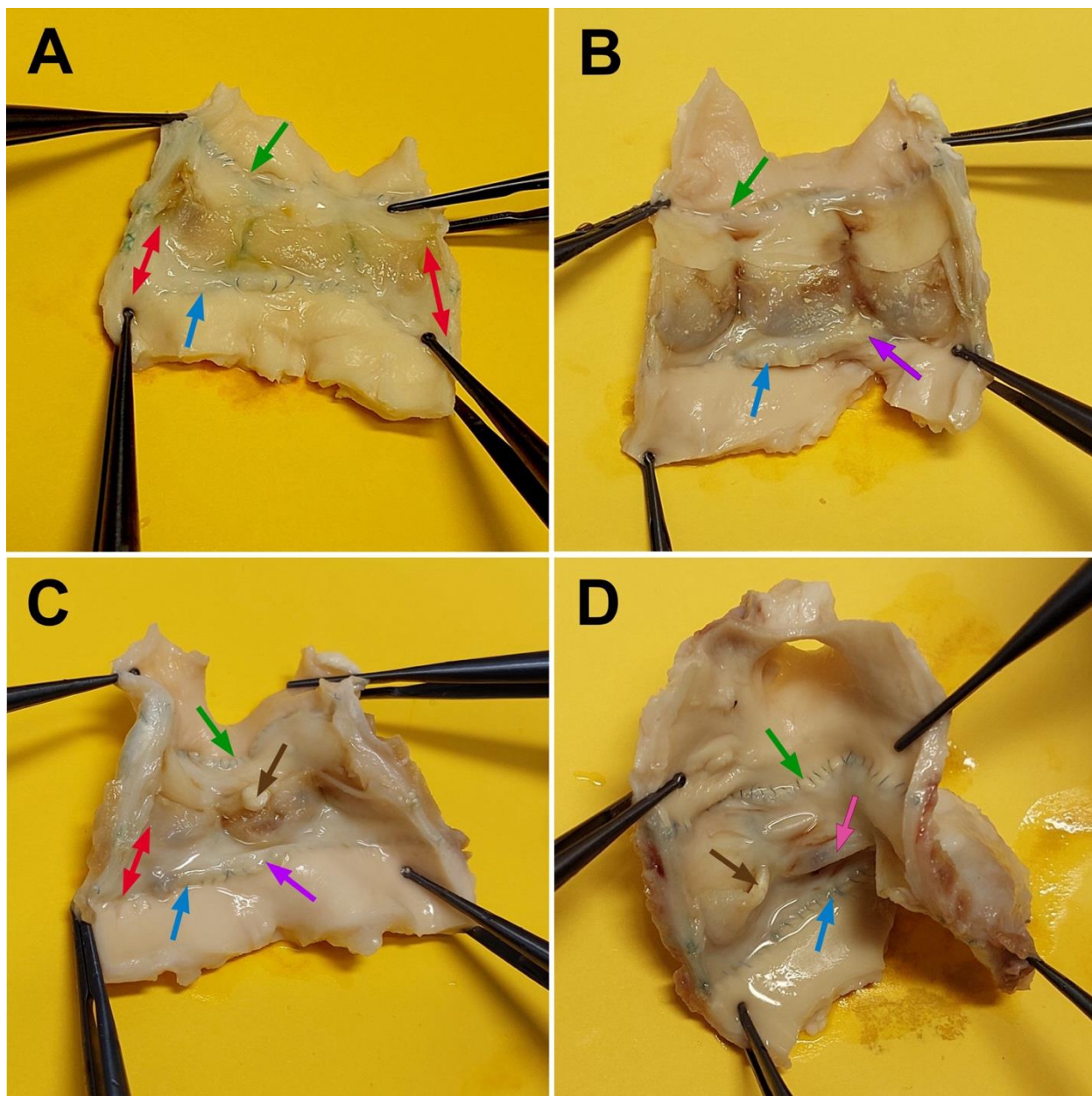


Рисунок 6.22 – Макрофотографии эксплантированных ксеноперикардиальных кондуитов. А – ДЭ-ПК. В – ДЭ+Пам-ПК. С–D – ГА-обработанные ксеноперикардиальные кондуиты. Двойная красная стрелка указывает на распространение неоинтимального слоя со стенки графта на створки. Зеленая стрелка указывает на дистальный анастомоз, синяя стрелка – на проксимальный анастомоз, фиолетовая стрелка – на неоинтимальную гиперплазию вдоль линии проксимального анастомоза, коричневая стрелка – на депозиты кальция, розовая стрелка – на подпаянную створку

В случае протезного эндокардита, инфекционный процесс локализовался строго на уровне кондуита и был ограничен в пределах проксимального и дистального анастомозов (Рисунок 6.12В).

6.2.3.3 Микроскопическая оценка эксплантированных ксеноперикардальных кондуитов

Стенка и створки как ДЭ-ПК, так и ДЭ+Пам-ПК, сохранили правильную ориентацию волокон (Рисунок 6.23С), несмотря на незначительную локализованную фрагментацию коллагена. Во всех случаях имплантации ДЭ-обработанных ксеноперикардальных графтов биоматериал был интегрирован в сосудистое русло. Внешняя поверхность кондуитов была окружена достаточно плотной соединительной тканью – неoadвентицией, от которой в глубь стенки протеза проросли фиброзные тяжи. Однако не было выявлено ни деформирующего фиброза стенки трансплантатов, ни формирования грубой внешней капсулы.

В большинстве эксплантированных ДЭ-обработанных ксеноперикардальных графтов (66,7%) отмечена миграция клеток миофибробластного ряда в стенку протеза (Рисунок 6.23С, 6.24А, 6.24В), а также выявлены зоны неоангиогенеза, происходящие из развивающейся неoadвентиции. В стенках некоторых кондуитов наблюдались небольшие изолированные очаги инфильтрации воспалительных клеток, состоящие из лимфоцитов и нейтрофилов. Однако гигантских клеток инородного тела ни у одного из животных обнаружено не было.

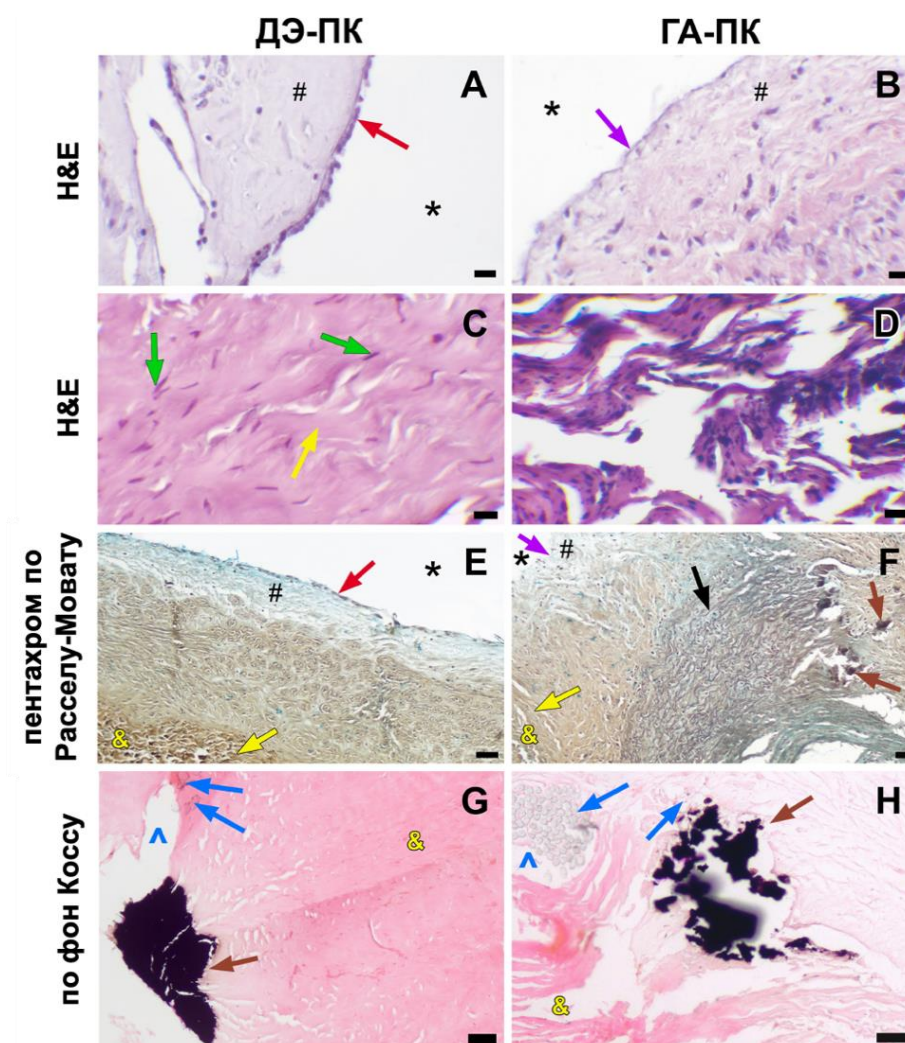


Рисунок 6.23 – Микрофотографии эксплантированных ксеноперикардальных кондуитов. А–В – люминальная поверхность графта, окрашивание Н&Е, $\times 400$, масштабная линейка – 10 мкм. С–Д – структура стенки кондуита, окрашивание Н&Е, $\times 400$, масштабная линейка – 10 мкм. Е–F – обзорные изображения, окрашивание пентахромом по Расселу–Мовату, $\times 40$, масштабная линейка – 50 мкм. G–H – кальцификация ксенокондуита, окрашивание по фон Коссу, $\times 100$, масштабная линейка – 50 мкм. Красная стрелка указывает на слой эндотелия, фиолетовая стрелка – на отсутствие эндотелия, зеленая стрелка – на мигрировавшие фибробласты, желтая стрелка – волокна коллагена, коричневая стрелка – очаг кальцификации, черная стрелка – нативная ЛА, синяя стрелка – полифиламентная нить, # – неоинтима, * – просвет кондуита, & – ткань ксенографта, ^ – шовное отверстие. Н&Е, окрашивание гематоксилином и эозином; ГА-ПК, глутаральдегид-обработанный ксеноперикардальный кондуит; ДЭ-ПК, диэпоксид-обработанный ксеноперикардальный кондуит

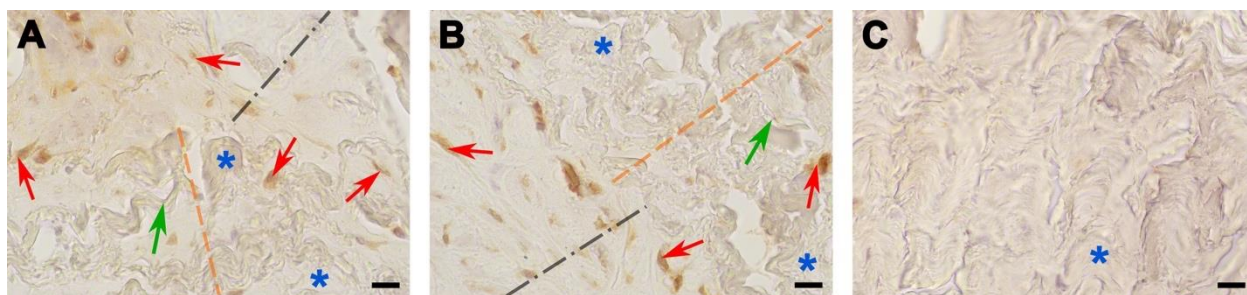


Рисунок 6.24 – Стенка ксеноперикардальных кондуитов, ИГХ-окрашивание на белки S100. А – стенка ДЭ-ПК; $\times 100$. В – стенка ДЭ+Пам-ПК; $\times 400$. С – стенка ГА-ПК; $\times 400$. Красные стрелки указывают на фибробласты, S100-позитивные клетки; зеленые стрелки – на волокна эластина; * – волокна коллагена; оранжевая пунктирная линия – область ткани ксенографта; черная пунктирная линия с точкой – адвентициальный слой. Масштабная линейка – 10 мкм

Внутренняя поверхность ДЭ-ПК и ДЭ+Пам-ПК была выстлана относительно однородным слоем неоинтимы, простирающимся от анастомозов и распространяющимся на приточную и отточную поверхности створок ксенокондуита. Толщина неоинтимы на стенке ДЭ-обработанных ксенографтов составляла ~ 220 - 410 мкм, а на створках — ~ 120 - 300 мкм. Во всех случаях фибробласты были равномерно распределены по всему слою неоинтимы. Хорошо развитый эндотелиальный слой полностью покрывал стенку кондуита и распространялся на створки (Рисунок 6.23А, 6.23Е). Синусы ДЭ-ПК и ДЭ+Пам-ПК были свободны от тромботических масс.

В трех случаях была выявлена неоинтимальная гиперплазия. Она была локализован в зонах проксимального и дистального анастомозов, с толщиной в диапазоне ~ 750 - 1010 мкм. У двух животных гиперплазированная неоинтима привела к формированию гемодинамически значимого градиента (ДЭ-ПК – 1; ДЭ+Пам-ПК – 1), в то время как в одном случае (ДЭ-ПК) она стала следствием несоответствия размеров протез-пациент. В этих кондуитах от неоинтимального слоя с глубь стенки прорастали фиброзные тяжи, а в зонах анастомозов были выявлены очаги деформирующего фиброза. Кроме того, в этих графтах в неоинтимальном слое присутствовал неоангиогенез.

Не было выявлено признаков минерализации ткани стенки и створок за пределами линий швов в группах ДЭ-ПК и ДЭ+Пам-ПК (Рисунок 6.23G, Рисунок 6.25A, 6.25C). Однако в большинстве случаев вдоль линии швов, фиксирующих створки и формирующих тело кондуита, были обнаружены крупные кальциевые конгломераты (Рисунок 6.25B, 6.25D).

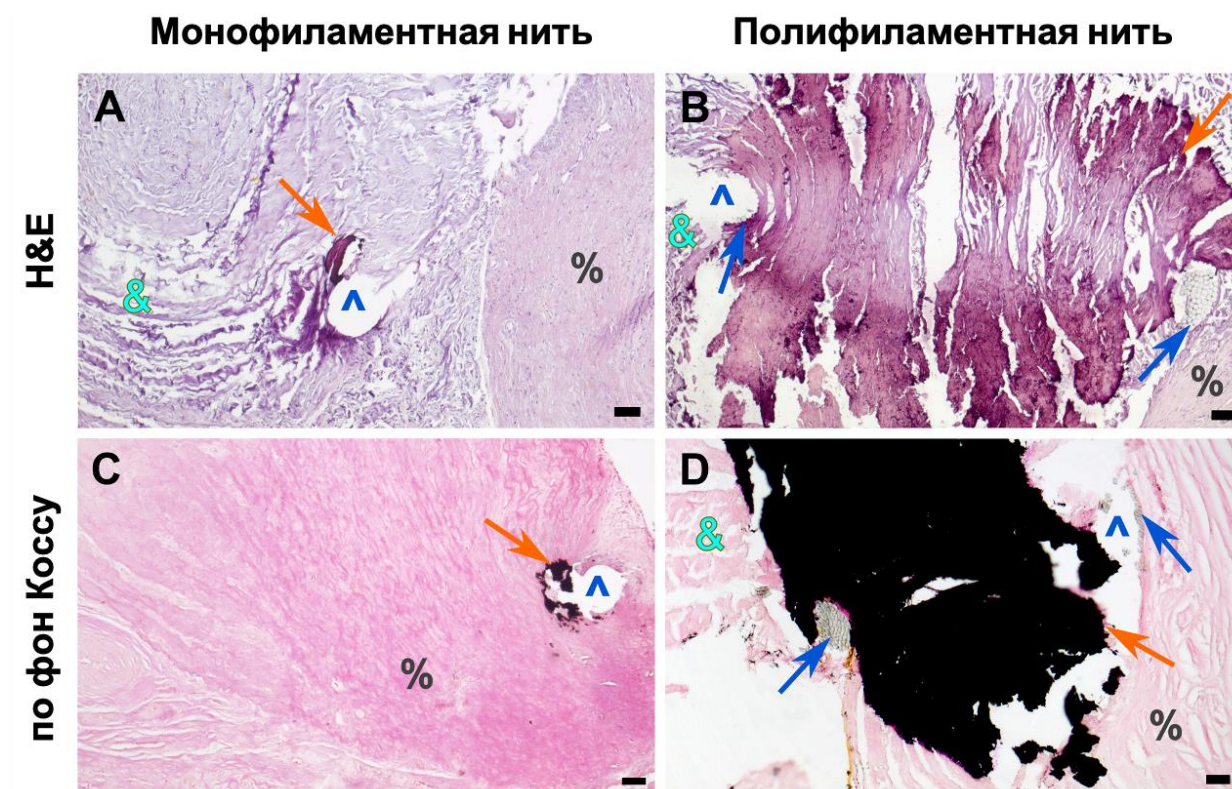


Рисунок 6.25 – Микрофотографии ДЭ-ПК, отражающие очаги кальцификации по линиям швов. (A, C) – область дистального анастомоза, прошитая монофиламентной нитью 6/0. (B, D) – область технического шва, формирующего кондуит, прошитая полифиламентной нитью 5/0. A-B – окрашивание H&E, $\times 40$, масштабная линейка – 50 мкм. C-D – окрашивание по фон Коссу, $\times 40$, масштабная линейка – 50 мкм.

Оранжевая стрелка указывает на области минерализации, синяя стрелка – на волокна полифиламентной нити, & – ткань кондуита, ^ – отверстие для шва, % – ткань легочной артерии. H&E, окрашивание гематоксилином и эозином

В группе ДЭ-ПК кальцификация зоны технических швов присутствовала во всех графтах ($n=6$), включая протез, эксплантированный через 4,9 мес. после операции из-за смерти животного по причинам, не связанным с кондуитом. В группе ДЭ+Пам-ПК половина кондуитов не обнаружила признаков накопления

солей кальция в области полифиламентных швов. Только в трех случаях выявлены зрелые кальциевые кластеры вдоль линии швов, формирующих кондуит. Плетеные нити были инкорпорированы в кальциевые кластеры, при этом полифиламентные волокна были инкрустированы минеральными кристаллами (Рисунок 6.26А). Напротив, небольшие отложения кальция были обнаружены вдоль монофиламентных швов как в стенке ДЭ-обработанных ксеноперикардальных графтов, так и в ткани нативной ЛА (Рисунок 6.25А, 6.25С).

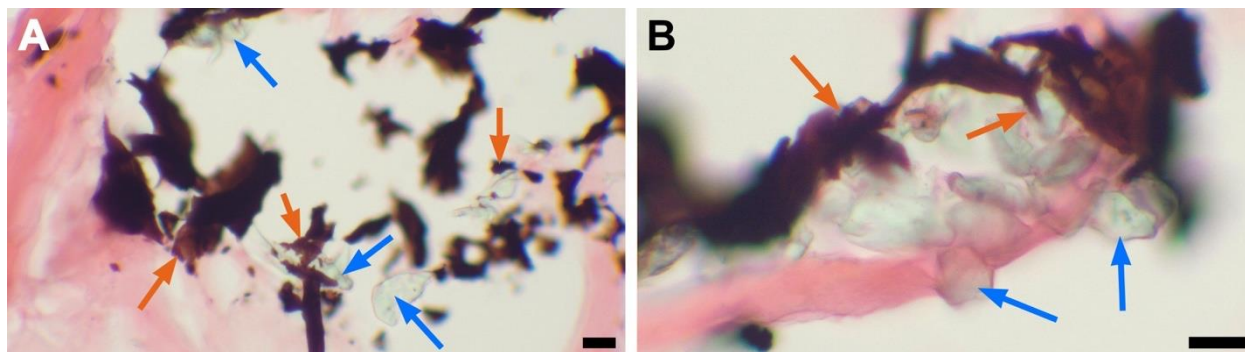


Рисунок 6.26 – Инкрустация волокон полифиламентных нитей минеральными кристаллами. А – ДЭ+Пам-ПК, окрашивание по фон Коссу, ×400, масштабная линейка – 10 мкм. В – ГА-ПК, окрашивание по фон Коссу, ×400, масштабная линейка – 10 мкм. Синие стрелки указывают на полифиламентные шовные волокна, оранжевые стрелки – на минеральные кристаллы

Эксплантированные ГА-ПК характеризовались толстой, жесткой внешней фиброзной капсулой, которая плотно прилегала к кондуиту. Фиброзная деформация наблюдалась в структурах ксенографтов, при этом нити фиброзной ткани простирались в стенку как от внешней фиброзной капсулы, так и от глубоких слоев неоинтимы. Примечательно, что эти образцы обычно демонстрировали фрагментацию и изнашивание коллагеновых волокон (Рисунок 6.23D). Миграция клеток фибробластного ряда была не выражена, на адвентициальной стороне стенки протезов были обнаружены только единичные миофибробластоподобные клетки. Также в тканях кондуитов присутствовали воспалительные клетки, включая лимфоциты и макрофаги, но не было обнаружено гигантских клеток инородного тела. Неоинтимальный слой имел неравномерную толщину, варьирующую от ~300 до ~850 мкм, и простирался как от проксимального, так и от

дистального анастомозов до основания створки (~220-500 мкм). Наибольшая толщина неоинтимы наблюдалась в области дистального анастомоза, превышая 1850 мкм. Кроме того, отмечено наложение гиперплазированной неоинтимы на нативную ткань ЛА (~150 мкм). В экспантированных ГА-ПК были выявлены участки хондроидной метаплазии с очагами кальцификации. Хондроидная ткань локализовалась субнеоинтимально, как в стенке трансплантата, так и в нативной ЛА в области анастомоза (Рисунок 6.27).

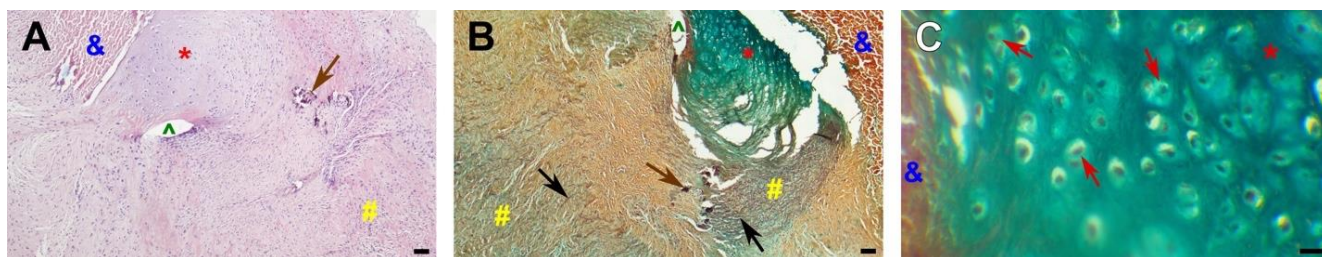


Рисунок 6.27 – Хондроидная метаплазия в стенке ГА-ПК. А – структура стенки ГА-ПК, обзорное изображение, окрашивание Н&Е, ×40, масштабная линейка – 50 мкм. В – структура стенки ГА-ПК, обзорное изображение, окрашивание пентахромом по Расселу-Мовату, ×40; масштабная линейка – 50 мкм. С – область хондроидной метаплазии в стенке ГА-ПК, окрашивание пентахромом по Расселу-Мовату, ×400; масштабная линейка – 10 мкм. Черные стрелки указывают на волокна эластина, коричневые стрелки – на депозиты кальция, красные стрелки – на хрящеподобные клетки, # – нативная ЛА, * – хондроидная метаплазия, & – ткань кондуита; ^ – шовное отверстие

Эндотелиальные клетки частично покрывали неоинтиму в области дистального и проксимального анастомозов. Однако эндотелиальный слой отсутствовал на большей части стенки тела кондуита и на створках (Рисунок 6.23В). Во всех случаях крупные отложения кальция обнаружены вдоль линии технических швов, формирующих кондуит (Рисунок 6.23Н). Кальциевые кластеры были связаны с волокнами полифиламентной шовной нити (Рисунок 6.26В). В толще стенки ГА-ПК были выявлены очаги минерализованных волокон коллагена (Рисунок 6.23Д, 6.23Н). Отложения солей кальция также обнаружены вдоль линий проксимального и дистального анастомозов как в стенке графтов, так и в ткани

нативной ЛА (Рисунок 6.23F). В синусах одного из ГА-ПК были выявлены пристеночные тромбы.

У животного с протезным инфекционным эндокардитом, тромботические массы, сопровождающиеся массивной воспалительной инфильтрацией и большим количеством бактериальных колоний, были выявлены как на приточной, так и на отточной поверхности створок и стенке кондуитов (Рисунок 6.17B). Стенки инфицированного графта характеризовались дегенеративными изменениями, включая редукцию коллагеновых волокон, очаговый некроз и продуктивное воспаление, характеризующееся большим количеством нейтрофилов и макрофагов. В зонах анастомозов наблюдалась грануляционная ткань с неоваскуляризацией, склерозом и инфильтрацией лимфоцитов и гистиоцитов. Воспалительная реакция привела к развитию очагов деформирующего склероза и формированию толстой фиброзной капсулы, изолирующей трансплантат от окружающих тканей.

6.2.3.4 Сканирующая электронная микроскопия

СЭМ-изображения и данные элементного картирования исследуемых полей подтвердили отсутствие минеральных отложений за пределами линии шва, формирующей ксеноперикардальный конduit, в образцах групп ДЭ-ПК и ДЭ+Пам-ПК. В области линий технических швов в шести графтах группы ДЭ-ПК и в трёх графтах группы ДЭ+Пам-ПК были выявлены кристаллы фосфата кальция с различными значениями соотношения Са/Р (Рисунок 6.28). В группе ДЭ-ПК в 19,7% исследованных полей (n=12) обнаружены участки с соотношением Са/Р $\geq 1,67$. В остальных полях данное соотношение соответствовало Me 1,43 (IQR 1,35–1,52). В группе ДЭ+Пам-ПК лишь в 8 исследованных полях (12,7%) были выявлены кристаллы с соотношением Са/Р $\geq 1,67$. В большинстве исследуемых областей минеральные кластеры характеризовались отношением атомной массы кальция и фосфора Me 1,46 (IQR 1,36–1,54).

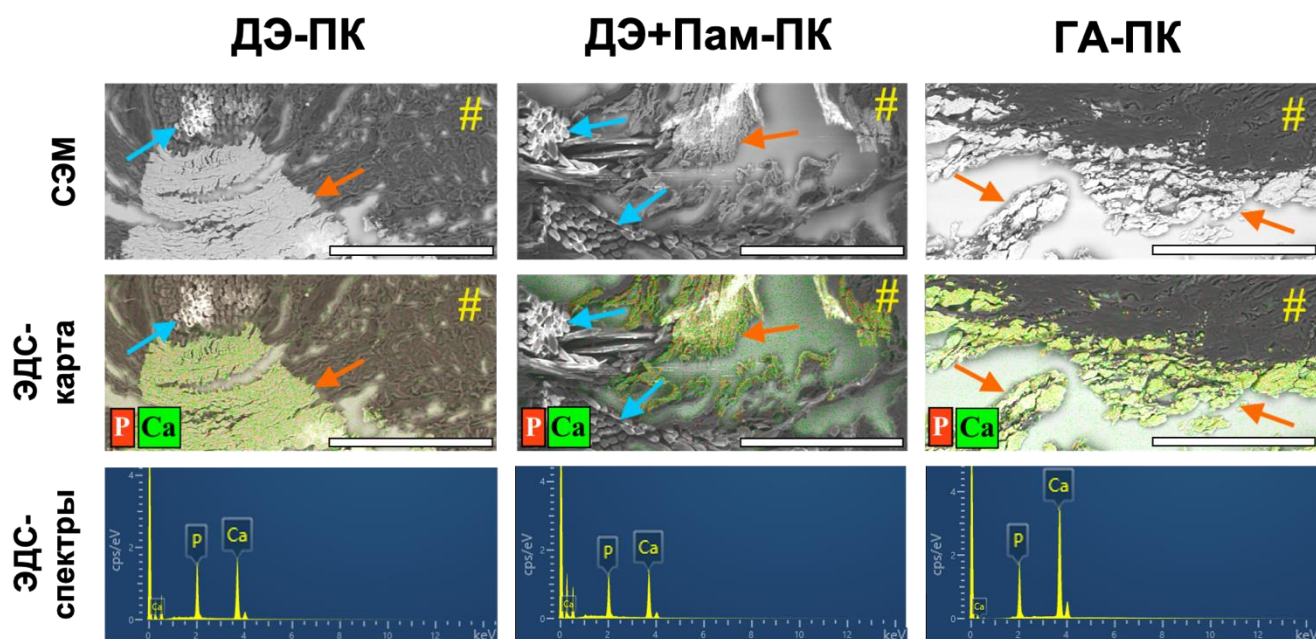


Рисунок 6.28 – СЭМ-снимки, ЭДС-карты и ЭДС-спектры высушенных срезов.

Голубые стрелки указывают на волокна полифиламентной нити, оранжевые стрелки – на минеральные депозиты, # – ткань графта. Масштабная линейка – 250 мкм. ГА-ПК, ксеноперикардальный конduit, обработанный глутаровым альдегидом; ДЭ-ПК, ксеноперикардальный конduit, обработанный диэпоксидом; ДЭ+Пам-ПК, ксеноперикардальный конduit, обработанный диэпоксидом и модифицированный памидроновой кислотой; Пам, памидроновая кислота; СЭМ, сканирующая электронная микроскопия; ЭДС, энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия

В образцах, консервированных ГА, были обнаружены крупные кристаллические депозиты как вдоль линий полифиламентных швов, так и в толще протезной ткани по ходу коллагеновых волокон (Рисунок 6.28). Значения соотношения Ca/P для этих минеральных кластеров преимущественно были $\geq 1,67$, что соответствует зрелым гидроксиапатитам.

Замедление созревания апатита в группах ДЭ-ПК и ДЭ+Пам-ПК может служить косвенным признаком снижения темпов минерализации биопротезной ткани.

6.3 Обсуждение полученных результатов

В этой части работы были исследованы структурные изменения в ксеновенозных и ксеноперикардимальных кондуитах, обработанных как изолированно диэпоксидом, так и ДЭ в сочетании с бисфосфонатом (Пам), в гемоконтактной среде. Группами сравнения были ГА-обработанные графты, изготовленные из ЯВ и ПК. Также референтной группой стали кондуиты Contegra, как наиболее часто используемые в клинической практике биопротезы ЛА [Harris и др., 2023; Hazekamp и др., 2021; Herrmann, Brown, 2020; Singh и др., 2025]. В этом экспериментальном исследовании мы смоделировали условия, наиболее приближенные к области фактического применения кондуита, в частности все графты были имплантированы в позицию ЛА крупным лабораторным животным со схожими с человеком анатомическими и гемодинамическими характеристиками сердечно-сосудистой системы [Lee и др., 2007; Lelovas, Kostomitsopoulos, Xanthos, 2014; Nisco De и др., 2021; Suzuki, Yeung, Ikeno, 2011; Xanthos и др., 2007].

Полученные нами данные показали обнадеживающие результаты использования ДЭ-обработанных кондуитов в легочной позиции в течение 6-месячного периода наблюдения. Эти кондуиты были свободны от деформаций, перегибов или аневризматических расширений. Они сохранили гладкую и чистую люминальную поверхность, без признаков тромбоза, значимой дегенерации или кальцификации стенок и створок. Однако стенка эксплантированных ксеноперикардимальных графтов была более жесткой в сравнении с ЯВ-стенкой. Кроме того, створки ДЭ-обработанных ЯВ, не зависимо от иммобилизации Пам, оставались тонкими, недеформированными и сохранили свои структурные характеристики. В тоже время для ДЭ-обработанных ксеноперикардимальных кондуитов было характерно распространение неоинтимального слоя на приточную и отточную поверхности створок, что приводило к их утолщению. Данное отличие между ДЭ-обработанными ксеновенозными и ксеноперикардимальными графтами отразилось на величине градиента в проксимальном отделе кондуита (Рисунок 6.9; Рисунок 6.20). В группах диэпокси-обработанных ксеноперикардимальных

кондуитов рост проксимального градиента встречался чаще (Рисунок 6.21), чем в группе ДЭ-обработанных ЯВ-графтов (Рисунок 6.10).

В этой экспериментальной серии графты из групп ДЭ-ЯВ и ДЭ+Пам-ЯВ показали хорошую интеграцию трансплантатов. Для всех ДЭ-обработанных ЯВ-кондуитов, не зависимо от иммобилизации Пам, было характерно ремоделирование ткани протеза с равномерным прорастанием стенки клетками миофибробластного ряда, замещением коллагеновых волокон мягкой недеформирующей соединительной тканью и активным ангиогенезом. Более того, в некоторых трансплантатах отмечалась миграция фибробластов в тело створки. Большинство диэпокси-обработанных ксеноперикардальных графтов также продемонстрировали признаки успешной интеграции трансплантата и ревитализации ткани. Это включало недеформирующую инфильтрацию соединительной ткани, миграцию миофибробластов в стенку трансплантата и периферический неоангиогенез. Данные находки имеют важное значение, поскольку бычий перикард характеризуется слабым клеточным наполнением, что делает наблюдаемую клеточную и сосудистую интеграцию особенно ценной [Noit, 2017; Rodriguez, Tan, 2017]. Мы пришли к выводу, что идентифицированная клеточная популяция является следствием миграции клеточных компонентов из тканей реципиента. В тоже время, ГА-обработанные ксенографты характеризовались значимо меньшей степенью витализации ткани трансплантата. Так, кондуиты Contegra продемонстрировали менее интенсивное прорастание миофибробластов со стороны адвентиции в глубь стенки по сравнению с ДЭ-ЯВ и ДЭ+Пам-ЯВ. В стенках как ГА-ЯВ, так и ГА-ПК были выявлены лишь единичные миофибробластоподобные клетки, локализованные преимущественно с внешней стороны трансплантата. Низкий уровень миграции клеток реципиента обусловлен цитотоксическими свойствами ГА [Grabenwöger и др., 1996; Nishi, Nakajima, Ikada, 1995; Sung и др., 1999; Umashankar, Kumari, Mohanan, 2012]. Кроме того, во всех случаях вокруг ГА-ЯВ и ГА-ПК мы выявили плотную ригидную фиброзную капсулу, что указывает на реакцию реципиента, направленную на изоляцию протезов от окружающих тканей. Из внешней капсулы и неоинтимального слоя

вглубь стенки ГА-обработанных кондуитов проникали тяжи грубой фиброзной ткани. Этот процесс в сочетании с минерализацией биоматериала привел к потере эластичности и формированию достаточно жесткой структуры кондуита. Фиброзная деформация является общей чертой ксеноматериалов, обработанных ГА, и наблюдается при их использовании как в зонах высокого, так и низкого давления [Bell и др., 2019; Gabbay и др., 1984]. Мы полагаем, что выявленные нами различия в степени ремоделирования тканей биопротезов были обусловлены значимо меньшей токсичностью диэпоксида по сравнению с ГА [Бондаренко и др., 2021; Chang и др., 1997; Nishi, Nakajima, Ikada, 1995].

Цитотоксическое влияние сшивающего агента будет отражаться и в степени эндотелизации люминальной поверхности трансплантата. В нашем исследовании хорошо развитый непрерывный эндотелиальный слой, полностью покрывавший неоинтиму, был выявлен во всех ДЭ-обработанных кондуитах, не зависимо от иммобилизации Пам, в отличии от графтов, обработанных ГА (Рисунок 6.13А; Рисунок 6.13J; Рисунок 6.23А; Рисунок 6.23Е). Эндотелиальные клетки дифференцировались с помощью окрашивания пентахромом по Расселу-Мовату. В кондуитах Contegra монослой эндотелиальных клеток фрагментарно присутствовал на неоинтиме, преимущественно в области проксимального и дистального анастомозов, что согласуется с ранее описанными результатами [Schoenhoff и др., 2011]. В группе ГА-ЯВ и ГА-ПК эндотелиальные клетки были обнаружены исключительно в зонах анастомозов, где слой неоинтимы был значительно толще. На большей части стенки ГА-кондуитов эндотелиальный монослой отсутствовал. Высвобождающийся из тканей протеза ГА может подавлять как рост, так и метаболизм клеток эндотелия [Eybl и др., 1989; Grimm и др., 1991; Lopez-Moya и др., 2018; Wiebe и др., 1988]. В то же время диэпоксид не оказывал цитотоксического действия на культуры эндотелиальных клеток, что подтверждает наши находки [Бондаренко и др., 2021]. Схожие результаты были продемонстрированы при исследовании биоматериалов, обработанных полиэпоксидными соединениями [Ichikawa и др., 1997; Noishiki и др., 1993]. Нормально развитый и эффективно функционирующий эндотелий играет

существенную роль в предотвращении неоинтимальной гиперплазии, подавляя её начальные триггеры и ингибируя пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток интимы. Кроме того, он значительно снижает воспалительную реакцию и образование тромбов [Patel и др., 2010]. Именно поэтому крайне важно применять консерванты, которые способствуют более быстрой и равномерной эндотелизации сосудистого трансплантата – это позволит существенно повысить долговечность протеза и улучшить исходы имплантации.

Еще одним преимуществом ДЭ-консервированных биопротезов была меньшая склонность к неоинтимальной гиперплазии в данной экспериментальной серии. Большинство кондуитов из ЯВ, обработанных диэпоксидом, не зависимо от иммобилизации бисфосфоната, имели ровный неоинтимальный слой с небольшим утолщением вдоль линии анастомозов. Только в двух случаях (ДЭ-ЯВ – 1; ДЭ+Пам-ЯВ – 1) была отмечена выраженная неоинтимальная гиперплазия в области дистального анастомоза. В обоих кондуитах вблизи линии дистального анастомоза мы наблюдали скопление гигантских клеток инородного тела субнеоинтимально и в адвентициальном слое. По нашему мнению, реакция на инородное тело в обоих кондуитах косвенно провоцировала неоинтимальную пролиферацию за счет деформации стенки в зонах гигантоклеточных гранул и плотной фиброзной ткани по их периферии. Мы полагаем, что признаки реакции на инородное тело, наблюдаемые в обоих случаях, являются следствием индивидуального иммунного ответа у этих конкретных мини-свиней. Более того, мы не наблюдали признаков такой выраженной реакции на инородное тело в других эксплантированных ДЭ-фиксированных ЯВ, независимо от дополнительной антикальциевой обработки. Все эти графты характеризовались наличием единичных гигантских клеток инородного тела в адвентициальном слое, что подтверждает влияние особенностей иммунного ответа каждого животного.

Большинство диэпокси-обработанных ПК-графтов также демонстрировали относительно тонкий и однородный слой неоинтимы. Среди этих кондуитов неоинтимальная гиперплазия наблюдалась только в трех случаях (ДЭ-ПК – 2; ДЭ+Пам-ПК – 1) и была связана с повышенной турбулентностью кровотока,

вызванной несоответствием размеров или фиброзной деформацией в области анастомозов. Схожий механизм разрастания неоинтимы в области как проксимальной, так и дистальной линии швов бы характерен для ДЭ+Пам-ЯВ с несоответствием размеров протез-пациент. Влияние механических и гидродинамических факторов может провоцировать неоинтимальную гиперплазию в области анастомозов между кондуитом и нативной ЛА [Berdajs и др., 2015; Lemson и др., 2000]. Геометрические изменения в линии шва и повышенная жесткость стенки кондуитов приводит к ускорению кровотока, что впоследствии стимулировало неоинтимальную пролиферацию [Berdajs и др., 2015; Lemson и др., 2000]. Peivandi A.D. с соавторами сообщили о связи между гиперплазией неоинтимального слоя и степенью деградации эластина, без какой-либо корреляции с продолжительностью имплантации кондуита Contegra в положение ЛА [Peivandi и др., 2019]. Авторы пришли к выводу, что усиливающаяся дегенерация сети эластиновых волокон приводит к прогрессирующей жесткости и ригидности трансплантата, тем самым способствуя неоинтимальной гиперплазии. Мы же отметили, что в нашей экспериментальной серии все кондуиты с выявленной неоинтимальной гиперплазией характеризовались фиброзно-измененной стенкой протеза в области анастомозов. Это явление было наиболее распространено в группах ГА-обработанных графтов. Также именно гидродинамическим влиянием потока крови можно объяснить неравномерность толщины неоинтимального гребня с наибольшим утолщением вдоль малой кривизны линии анастомозов [Berdajs и др., 2015].

Эксплантированные кондуиты Contegra характеризовались менее равномерным неоинтимальным слоем, деформирующим стенку кондуита, с его гиперплазией в области дистального анастомоза. Проявления неоинтимальной гиперплазии были выявлены уже через 1,6 месяца после имплантации кондуита Contegra. В графтах из группы ГА-ЯВ неоинтима частично присутствовала на внутренней поверхности протезов: была гиперплазирована в области как проксимального, так и дистального анастомозов и полностью отсутствовала в средней части тела кондуитов. Схожую картину демонстрировали ГА-ПК. Все

эксплантированные ГА-ПК характеризовались неравномерным слоем неоинтимы с наибольшей толщиной в области анастомозов. Но в отличие от ГА-обработанных ЯВ-кондуитов, в этой группе неоинтима распространялась как на створки протеза, так и на стенку нативной ЛА. Мы считаем, что неоинтимальная гиперплазия во всех перечисленных группах является еще одним следствием цитотоксического эффекта ГА. С одной стороны, более толстый интимальный слой, по-видимому, необходим для изоляции биоматериала, содержащего остатки ГА [Chang и др., 2004; Jorge-Herrero, Paez, Castillo-Olivares Ramos Del, 2005]. С другой стороны, цитотоксичность ГА значительно подавляет миграцию и жизнеспособность клеток [Sung и др., 1999; Umashankar, Kumari, Mohanan, 2012], что, вероятно, стало причиной отсутствия сплошного равномерного неоинтимального слоя в ГА-ЯВ в течение периода наблюдения.

Согласно предыдущим исследованиям, ткани, обработанные ГА, склонны к ранней кальцификации [Grabenwöger и др., 1996; Meyns и др., 2004]. Так в ГА-обработанных ЯВ-кондуитах значительная кальцификация венозной стенки была выявлена уже через 3 месяца после имплантации овцам [Attmann и др., 2007; Herijgers и др., 2002]. В клинической практике более 60% эксплантированных кондуитов Contegra имели выраженную минерализацию структур графта, включая диффузные поражения [Reivandi и др., 2019]. В тоже время, эпоксидные соединения значительно снижают степень накопления кальция в биоматериалах [Ichikawa и др., 1997; Imamura и др., 1989; Xi и др., 1992; Zhuravleva и др., 2023]. Как было описано в предыдущей главе, степень кальцификации ЯВ-стенки можно снизить, заменив ГА на диэпоксид. Данная экспериментальная серия подтвердила меньшую склонность к минерализации в кондуитах ДЭ-ЯВ и ДЭ+Пам-ЯВ по сравнению с трансплантатами Contegra и ГА-ЯВ. В нашей серии стенка как ДЭ-ЯВ, так и ДЭ+Пам-ЯВ была свободна от депозитов кальция, и только несколько протезов имели небольшие отложения солей кальция в области швов. Аналогичные минеральные кластеры были выявлены в стенке нативной ЛА вокруг шовных отверстий. Мы пришли к выводу, что шовный материал спровоцировал кальцификацию в этой области [Акентьева и др., 2020; Кудрявцева и др., 2013]. В

нашем *in vivo* исследовании, графты, обработанные ГА, характеризовались значительно более выраженной минерализацией. Кондуиты Contegra и ГА-ЯВ имели как крупные зрелые кальциевые кластеры, так и очаги кальцификации по ходу отдельных волокон эластина (Рисунок 6.13Е; Рисунок 6.13F; Рисунок 6.13Н; Рисунок 6.13I). Более того, кальцинированные волокна эластина были обнаружены и в кондуите Contegra, эксплантированном через 1,6 месяца после операции. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что минерализация стенки ГА-обработанной ЯВ начинается с волокон эластина. Этот вывод был дополнительно подтвержден изображениями СЭМ и элементным анализом. Элементные карты, собранные с поверхности высушенных образцов, показали, что места накопления кальция напоминают форму волокон эластина, которые можно было дифференцировать на сканированных изображениях. Анализ изображений СЭМ также выявил наличие большого количества фосфора в этих минеральных кластерах. Полученные данные позволяют предположить, что выявленные структуры являются кристаллами апатита (Рисунок 6.18). Кроме того, в данной экспериментальной серии минерализация ГА-ЯВ была более выражена по сравнению с кондуитами Contegra, что может отражать эффект уникального коммерческого раствора для хранения и стерилизации протеза, используемого производителем [Vyavahare и др., 1998].

В ранее описанном исследовании на модели подкожной имплантации крысам (Глава 5) было отмечено, что ДЭ-обработка подавляет кальцификацию коллагена в ксеновенозной стенке, однако не оказывает значимого влияния на минерализацию волокон эластина. В данной экспериментальной серии, в модели ортотопической имплантации ксенокондуитов, обработанных различными способами, мы не обнаружили признаков накопления кальция ни в коллагене, ни в эластине стенки ДЭ-обработанной ЯВ независимо от иммобилизации Пам в течение 6 месяцев наблюдения. Эта находка предполагает, что, все-таки, диэпоксид способствует замедлению темпов кальцификации эластина по сравнению с ГА. Расхождение между результатами вышеупомянутых исследований обусловлено различиями использованных экспериментальных моделей.

Кроме того, несмотря на весьма обнадеживающие данные, полученные в эксперименте на мелких лабораторных животных (Глава 5), где обработка диэпоксидом эффективно предотвращала минерализацию ксеноперикардальных лоскутов за счет сшивания коллагена [Zhuravleva и др., 2023], мы все же сталкиваемся в клинической практике с дисфункцией ДЭ-обработанных биопротезов клапанов сердца вследствие кальцификации [Kostyunin и др., 2023]. Как у детей (Глава 3), так и у взрослых пациентов [Karaskov и др., 2016b; Sharifulin и др., 2021a] минерализация стенок и створок ДЭ-ПК приводит к стенозу на уровне клапана кондуита и его дисфункции. Результаты, полученные в данной экспериментальной серии, подтвердили кальцификацию ксеноперикардальных кондуитов, но степень и распределение накопления кальция варьировали в зависимости от метода обработки ксеноперикарда. В большинстве ДЭ-консервированных ПК-кондуитов были выявлены крупные зрелые депозиты кальция вдоль линии технических швов, где полифиламентные волокна были инкрустированы кристаллами гидроксиапатита. Аналогичные микроструктурные изменения были обнаружены и во всех эксплантированных ГА-ПК. Эти находки свидетельствуют о том, что полифиламентный плетеный шовный материал инициирует накопление кальция, независимо от стратегии фиксации бычьего перикарда. Пустоты внутри оплетки полифиламентной плетеной нити создают капиллярные эффекты и потенциальные места для накопления клеток крови [Scott Taylor, Shalaby, 2013]. Пропитка нитей белками плазмы крови и осаждение форменных элементов в полостях, по-видимому, инициируют процесс зарождения кристаллов гидроксиапатита [Барбараш, 1995; Ferrans и др., 1980; Liu и др., 2014; Zhu и др., 2019].

В то же время, минерализация тканей вокруг монофиламентного шва была менее выраженной. Это объясняется тем, что монофиламентный шовный материал обладает преимуществом перед полифиламентными плетеными нитями благодаря меньшему числу потенциальных зон нуклеации [Vaesken и др., 2018]. В группах ДЭ-обработанных ПК-графтов линии как проксимальных, так и дистальных анастомозов были практически полностью свободны от кальциевых включений.

Лишь вокруг нескольких стежков, как в ткани трансплантата, так и в стенке ЛА, выявлены небольшие депозиты кальция.

Циклическое механическое напряжение является еще одной вероятной причиной выраженной кальцификации в области швов, которые фиксируют створки к телу ксеноперикардального кондуита. Зоны комиссур и основания створок испытывают повышенную механическую нагрузку [Liao и др., 2008; Tsolaki и др., 2023], что приводит к повреждению внеклеточного матрикса [Zareian и др., 2019; Zhang и др., 2021]. Микроповреждение коллагеновых волокон обнажает химически активные участки, которые становятся зонами нуклеации для ионов кальция и фосфата, диффундирующих в ткань [Badria, Koutsoukos, Mavrilas, 2020; D'Alessandro и др., 2020; Schoen, Levy, 2005; Whelan и др., 2021]. Zareian R. и соавторы [Zareian и др., 2019] сообщили о схожих результатах в своем экспериментальном исследовании. Они наблюдали отложения кальция вдоль линий швов всех клапанов, испытанных в условиях циклической механической нагрузки в кальцинирующем растворе. При оценке влияния обжима стента на преждевременную кальцификацию авторы обнаружили, что механическое повреждение внеклеточного матрикса усиливает отложение кальция в ткани и способствует распространению минерализации в более глубокие слои ткани. Кроме того, в ПК-графтах в области технического шва ксеноперикард формирует складку (Рисунок 6.3), что может способствовать минерализации тканей [Levy и др., 1983].

Также в пользу теории влияния циклического механического воздействия на процесс минерализации биопротезов указывают находки, полученные в группах ЯВ-кондуитов. Мы выявили кальциевые депозиты в области основания створок протезов в группах ГА-обработанных ЯВ-кондуитов. Особенно четко это прослеживается в графте Contegra, эксплантированном через 1,6 месяца после протезирования ЛА. В стенке этого кондуита выявлены очаги кальцинированных волокон эластина, располагающиеся в непосредственной близости от основания створок протеза. Механизм развития данного явления, видимо, схож с описанным

ранее и является следствием повреждения внеклеточного матрикса биопротеза под воздействием циклических нагрузок.

Мы не наблюдали признаков минерализации стенки и створок за пределами линий швов в группах ДЭ-ПК и ДЭ+Пам-ПК. Напротив, в толще стенки ГА-ПК были выявлены области кальцификации коллагеновых волокон. Данное наблюдение указывает на то, что в ГА-ПК накопление кальция происходит не только в области линии швов, но и инициируется внутри самой ткани вследствие кальцификации коллагена. Tsolaki E. с соавторами в своем анализе структурных изменений эксплантированных биопротезов клапанов сердца пришли к выводу, что процесс минерализации начинается в толще химически фиксированного бычьего перикарда [Tsolaki и др., 2023]. Результаты, полученные на модели подкожной имплантации крысам, также показали, что кальцификация ГА-обработанного ксеноперикарда распространяется «изнутри-наружу» [Zhuravleva и др., 2023]. Отложения фосфата кальция первоначально формировались в коллагеновых волокнах глубокого слоя ткани, а затем постепенно распространялись на внешние слои. Этот процесс сопровождался увеличением кристаллов гидроксиапатита с последующим повреждением ткани. Учитывая необратимый рост кальциевых кластеров [Vidavsky, Kunitake, Estroff, 2021], следует ожидать, что в краткосрочной перспективе в ткани ГА-ПК вне области линии швов будут образовываться крупные минеральные депозиты, что приведет к ранней дисфункции трансплантата.

Нами не были обнаружены отложения тромботических масса на структурах графтов, обработанных диэпоксидом. Как в группах ДЭ-ЯВ и ДЭ+Пам-ЯВ, так и в группах ДЭ-ПК и ДЭ+Пам-ПК не было выявлено признаков тромбоза кондуитов. В тоже время в ГА-ПК при микроскопическом исследовании нами обнаружены пристеночные тромбы в синусах одного из графтов. Кондуиты Contegra также характеризовались наличием тромботических отложений, но это не нарушало работу протеза. В экспериментальной серии, проведенной Scavo V.A.Jr. и коллегами, тромбоз ГА-ЯВ кондуитов был обнаружен у 18% подопытных животных через 8 месяцев после имплантации [Scavo и др., 1999]. Наши данные

подтверждают меньшую тромбогенность ДЭ-обработки. Эпоксидные соединения придают гидрофильность биоматериалам, что приводит к снижению тромбогенности тканей [Ichikawa и др., 1997; Imamura и др., 1989; Sung и др., 1993]. Кроме того, все ДЭ-обработанные ксеноперикардialьные и ксеновенозные кондуиты характеризовались хорошей эндотелизацией в нашей экспериментальной серии, что безусловно препятствовало тромбообразованию в этих группах [Patel и др., 2010]. Однако мы профилактически назначали антикоагулянтную и антиагрегантную терапию всем животным из-за тенденции свиней к гиперкоагуляции [Crisóstomo и др., 2016; Köstering и др., 1983; Sondeen и др., 2013].

В своей экспериментальной работе мы отметили повышенную склонность ГА-обработанных ксенографтов к формированию очагов хондронидной ткани. В группе ГА-ПК в двух эксплантированных графтах были выявлены очаги хондронидной метаплазии в областях наибольшей неоинтимальной пролиферации (Рисунок 6.27). Также мы отметили гиалиноз и субинтимальную хондронидную метаплазию с признаками минерализации в группе Contegra (Рисунок 6.16). Указанные изменения присутствовали не только в самих трансплантатах, но и в ткани нативной ЛА в области анастомоза. Эти трансформации были подтверждены с помощью окрашивания по фон Коссу и ИГХ-окрашивания на белок S100 [Nagase и др., 2020; Papatheodoridi и др., 2023; Sinha и др., 2023]. Наш клинический опыт подтверждает выявление гиалиноза гиперплазированного неоинтимального слоя в области дистального анастомоза кондуита Contegra уже через 9 месяцев после имплантации [Журавлева и др., 2016b]. Peivandi A.D. с коллегами описали очаги уже гетеротопической оссификации в ксенографтах Contegra через 9 лет после имплантации [Peivandi и др., 2019]. Хондронидная и костная метаплазии также были обнаружены в других биоматериалах, обработанных различными способами [Chang и др., 2004; Gabbay и др., 1984; Santibáñez-Salgado и др., 2010], в аортальных аллогraftах [Mathieu и др., 2003], стенозированных нативных клапанах сердца [Mohler и др., 2001; Steiner и др., 2007] и биodeградируемых полимерных

сосудистых трансплантатах [Dokuchaeva и др., 2022; Valence de и др., 2012; Yin и др., 2020; Zhao и др., 2021].

Миофибробласты, которые дифференцируются в хондроциты, могут играть ключевую роль в феномене хондронидной метаплазии и последующей гетеротопической оссификации [Chang и др., 2004; Mathieu и др., 2003; Steiner и др., 2007]. Однако причины такой дифференцировки остаются неясными. К провоцирующим факторам относят локальную гипоксемию, которая обуславливает повышенную стабильность индуцируемого гипоксией фактора-1 α , экспрессию костных морфогенетических белков, факторов роста эндотелия сосудов и нейропилина-1, а также воспаление с высвобождением цитокинов, способствующих пролиферации хряща, и механические сигналы, вызванные структурными несоответствиями между трансплантатом и нативной тканью [Chang и др., 2004; Fuery и др., 2018; Huang, Wang, Lin, 2020; Mohler и др., 2001; Valence de и др., 2012]. Наши результаты согласуются с описанной концепцией. Как в ГА-ПК, так в графтах Contegra, хондронидная метаплазия была локализована субинтимально в областях анастомозов между кондуитом и нативной ЛА. В этих графтах вдоль линии швов присутствовала выраженная неоинтимальная гиперплазия, которая распространялась и на нативную ЛА. Данные области характеризовались максимальной толщиной неоинтимального слоя и были лишены ангиогенеза. Впоследствии хрящевая ткань может стать местом патологической кальцификации и в конечном итоге быть заменена гетеротопической костью [Fuery и др., 2018; Huang, Wang, Lin, 2020; Mohler и др., 2001; Steiner и др., 2007], что усугубит процесс минерализации трансплантата.

Патогенез продукции гиалина включает инфильтрацию плазменных белков, таких как аполипопротеин E, Ig G, α 2-макроглобулин и фибриноген [Gychka и др., 2020], которые накапливаются в сосудистой стенке и вызывают образование фибриноидных конгломератов с последующей гиалинизацией. Эти процессы представляют собой следствие повышенной проницаемости сосудистой стенки. Наличие асептического воспаления, сопутствующего имплантации стерильного

ксеногенного трансплантата, увеличивает вероятность вышеупомянутого сценария.

Стоит еще раз отметить, что гиалиноз и хондронидная метаплазия были обнаружены только у животных с имплантированными ГА-обработанными графтами. Подобных изменений не наблюдалось в группах кондуитов, фиксированных диэпоксидом. Учитывая наши находки и результаты, предшествующих исследований, мы можем предположить косвенную роль ГА в этом патологическом процессе.

Таким образом, в проведенном экспериментальном исследовании мы наблюдали не только снижение минерализации, но и структурные преимущества в клапанах, фиксированных диэпоксидом. Наши данные свидетельствуют о том, что ДЭ-обработанные кондуиты могут превосходить протезы, фиксированные ГА, поскольку они демонстрируют лучшую интеграцию в легочное артериальное русло реципиента и большую витализацию трансплантата. Кроме того, менее выраженная склонность к неоинтимальной гиперплазии и лучшая эндотелизация люминальной поверхности, вероятно, будет способствовать пролонгированию их работоспособности по сравнению с ГА-трансплантатами.

Кроме того, данное экспериментальное исследование выявило несколько отличительных особенностей, общих для всех ксеноперикардальных кондуитов, независимо от типа использованного сшивающего агента. Как уже отмечалось, во всех эксплантированных ПК-графтах вдоль линии технического шва мы наблюдали крупные очаги минерализации ткани с включением в них полифиламентных шовных нитей.

Другой примечательной особенностью было распространение неоинтимального слоя на створки ксеноперикардальных трансплантатов. В каждом случае неоинтима покрывала и приточную, и отточную поверхности створок, что приводило к их утолщению и, как следствие, к увеличению градиента на клапане кондуита. Этот процесс был наиболее выражен в группе ГА-ПК и провоцировал полное прилипание створок графта к его стенке. Более того, в одном случае створки ГА-ПК были покрыты ригидным гиперплазированным

неоинтимальным слоем, что привело к ограничению их подвижности и фиксации в полуоткрытом положении. Дисфункция клапана кондуита в данном случае привела к прогрессирующей сердечной недостаточности, что потребовало выведения животного из эксперимента раньше заявленного срока. Напротив, в аналогичных экспериментальных условиях, створки графтов, изготовленные из бычьей яремной вены, были свободны от неоинтимального слоя. В отличие от ПК-кондуитов, для ЯВ-графтов не был характерен рост проксимального градиента в периоде наблюдения.

Еще одной находкой данного исследования стало отсутствие гигантских клеток инородного тела как в стенке ПК-графтов, так и в прилегающих тканях. Независимо от использованного сшивающего агента, бычий перикард показал себя инертным биоматериалом, который не провоцирует реакцию на инородное тело. Это наблюдение подчеркивает низкую иммуногенность обработанного бычьего перикарда в отличие от других биоматериалов, обычно используемых для реконструкции пути оттока из правого желудочка в легочную артерию [Vozso и др., 2021a; Findeisen и др., 2020; Kim и др., 2021]. В нашей экспериментальной серии исследуемые ЯВ-кондуиты характеризовались присутствием гигантских клеток инородного тела как со стороны адвентиции, так и субнеоинтимально, в ряде случаев формируя гигантоклеточные гранулемы.

6.4 Ограничения исследования

Данное *in vivo* исследование на модели крупных лабораторных животных имеет несколько ограничений. Во-первых, экспериментальный дизайн не позволяет напрямую экстраполировать полученные результаты на популяцию людей. Тем не менее, сходство в анатомии сердца и гемодинамике [Гущин, 2021; Lunney и др., 2021; Shah и др., 2022] дает представление о потенциальном функционировании исследуемых графтов у человека. Во-вторых, наши результаты не могут быть полностью применены к группам пациентов с высокой легочной

гипертензией или анатомическими аномалиями ЛА, поскольку все кондуиты были имплантированы здоровым животным с хорошо развитым легочным артериальным руслом. В-третьих, группы исследования и контроля отличались по количеству мини-свиней, включенных в эксперимент, что является еще одним ограничением работы. Однако мы намеренно пошли на уменьшение численности экспериментальных животных в контрольных группах. Поскольку биопротезы клапанов сердца, изготовленные из ГА-обработанного ксеноперикарда и ксеновены, включая коммерческий кондуит Contegra, имеют долгую историю использования в кардиохирургии и достаточно хорошо изучены, мы ограничили размер групп контроля в соответствии с этическими принципами ухода за лабораторными животными и принципами 3R экспериментальных биомедицинских исследований [Dowling, Levy, 2014].

Дополнительное ограничение обусловлено проблемами послеоперационного ухода за животными, что может оказывать непосредственное влияние на частоту инфекционных осложнений. В нашей экспериментальной серии у четырех мини-свиней из разных групп (ДЭ+Пам-ЯВ – 1; ГА-ЯВ – 1; ГА-ПК – 1; Contegra – 1) развился протезный инфекционный эндокардит, что привело к дисфункции имплантированного кондуита. Протезный эндокардит является распространенным осложнением, зарегистрированным в большинстве экспериментальных исследований, включающих имплантацию легочных графтов в моделях крупных лабораторных животных [Attmann и др., 2007; Flameng и др., 2015; Herijgers и др., 2002]. Развитие данного осложнения в нашем исследовании было в первую очередь связано с особенностями животной модели, трудностями в поддержании гигиены и уходе за ранами, а также необходимостью повторных инъекций в течение всего периода наблюдения. Следовательно, частота возникновения протезного инфекционного эндокардита, наблюдаемая в нашей экспериментальной серии, не может быть напрямую экстраполирована на популяцию людей.

6.5 Резюме

Данные, полученные в этой экспериментальной части работы, выявили принципиальные отличия между ксеновенозными и ксеноперикардальными кондуитами, которые могут оказывать непосредственное влияние на долговечность протезов. Во-первых, стенка ксеновенозных графтов была более мягкой в отличие от ксеноперикардальных протезов, где дополнительную жесткость структурам кондуита придавали технические швы. В абсолютном большинстве линии технических швов, формирующих конduit, содержали крупные депозиты кальция. При этом полифиламентная нить была инкорпорирована в минеральные кластеры, а ее волокна – инкрустированы кристаллами гидроксиапатита. Эта находка была свойственна всем ксеноперикардальным кондуитам, не зависимо от типа обработки.

Во-вторых, другой отличительной чертой ПК-графтов было распространение неоинтимального слоя на тело створок, что приводило к их утолщению и росту градиента в проксимальном отделе кондуита. В тоже время, створки ксеновенозных графтов были свободны от неоинтимы. И в отличие от ксеноперикардальных кондуитов, протезам из бычьей яремной вены не был свойственен рост градиента на уровне клапана.

Независимо от типа обработки, ПК-кондуиты продемонстрировали более низкую иммуногенность по сравнению с ЯВ-протезами, что стало еще одним характерным различием между исследуемыми ксенографтами. Гигантские клетки инородного тела не выявлены ни в структурах ПК-графтов, ни в прилежащих тканях. В стенке бычьей яремной вены были обнаружены многоядерные гигантские клетки, которые в ряде случаев формировали гигантоклеточные гранулемы и послужили пусковым механизмом неоинтимальной гиперплазии в местах их выявления.

Еще одним итогом данной части работы, стало подтверждение эффективности ДЭ-обработки по сравнению с ГА-фиксацией биоматериала. Результаты исследования кондуитов в ортотопической позиции

продемонстрировали преимущества ксеновенозных и ксеноперикардальных графтов, фиксированных ДЭ, независимо от применения дополнительной антикальциевой обработки. Для всех ДЭ-фиксированных ксеновенозных (ДЭ-ЯВ, ДЭ+Пам-ЯВ) и ксеноперикардальных (ДЭ-ПК, ДЭ+Пам-ПК) кондуитов были свойственны признаки ремоделирования и витализации графтов в виде миграции в стенку миофибробластов, замещения коллагеновых волокон мягкой недеформирующей соединительной тканью и активного неоангиогенеза. Люминальная поверхность ДЭ-протезов была чистой, гладкой, без участков минерализации и тромбоза. Равномерный неоинтимальный слой, покрытый хорошо развитым эндотелием, был свойственен этим группам. Признаки минерализации стенки в группах ДЭ-обработки отсутствовали вне линий анастомозов и технических швов (для ПК-кондуитов). Мы не выявили признаки минерализации волокон коллагена или эластина в стенке ДЭ-фиксированных кондуитов вне зон прохождения шовного материала. Створки сохранили свою структуру, не имели повреждений или очагов отложения кальция. Более того, в некоторых диэпокси-консервированных графтах была отмечена миграция фибробластов в тело створки.

В тоже время ГА-обработанные ксеноперикардальные (ГА-ПК) и ксеновенозные (ГА-ЯВ) протезы, включая кондуит Contegra, характеризовались повышенной жесткостью стенки, обусловленной формированием плотной внешней фиброзной капсулы, неоинтимальной гиперплазией, фиброзированием стенки и минерализацией структур графтов как в области линии швов, так и вне их – в глубине ткани. В ГА-фиксированных ксеновенозных кондуитах выявлены четкие признаки отложения солей кальция по ходу эластиновых волокон. В глубоких слоях ксеноперикардальных графтах, консервированных ГА, присутствовали кальцинированные волокна коллагена. Учитывая необратимый рост кальциевых кристаллов, в краткосрочной перспективе следует ожидать формирование крупных кальциевых депозитов в ткани ГА-протезов вне области швов, что приведет к более ранней дисфункции трансплантатов. В данных группах кондуитов (ГА-ЯВ, Contegra, ГА-ПК) признаки витализации были не выражены

или отсутствовали вовсе. Неравномерный неоинтимальный слой с гиперплазией в области дистального и проксимального анастомозов был свойственен для всех ГА-консервированных графтов. При этом эндотелизация люминальной поверхности ограничено присутствовала в участках наиболее утолщенного неоинтимального покрытия. Перечисленные структурные отличия являются следствием цитотоксического эффекта ГА, который высвобождается из тканей протезов даже после стандартной процедуры отмывки. Еще одной находкой, свойственной ГА-фиксированным протезам (Contegra, ГА-ПК), были очаги хондронидной метаплазии и гиалиноза с признаками минерализации.

Иммобилизация бисфосфоната усиливала антиминерализующие свойства диэпоксидной обработки. Наиболее наглядно этот эффект был отмечен при сравнении ПК-кондуитов. Во всех ДЭ-ПК протезах были выявлены минеральные кластеры по ходу швов, формирующих кондуит. В тоже время, половина графтов из группы ДЭ+Пам-ПК была свободна от кальциевых депозитов в данных областях. Только в трех случаях были выявлены минеральные кластеры по ходу полифиламентной нити. Соотношение Са/Ф в выявленных кальциевых депозитах в группах ДЭ-ПК и ДЭ+Пам-ПК преимущественно находилось в диапазоне 1,35–1,54, что соответствует незрелым гидроксиапатитам. Замедление созревания апатита в группах ДЭ-ПК и ДЭ+Пам-ПК может служить косвенным признаком снижения темпов минерализации биопротезной ткани, обработанной диэпоксидом в сочетании памидронатом. Данное наблюдение позволяет предположить подавление минерализации на более длительный период функционирования протеза при иммобилизации Бф. В группах диэпокси-обработанной ЯВ-стенки, как в ДЭ-ЯВ, так и в ДЭ+Пам-ЯВ, не были выявлены кальциевые кластеры в структурах графтов после окончания 6-месячного периода наблюдения.

Полученные результаты показывают перспективность применения диэпоксидной консервации для клапаносодержащих кондуитов, изготовленных из яремной вены быка (ЯВ). Отмеченные структурные изменения, в том числе сниженная склонность к минерализации, указывают на то, что данная стратегия консервации способствует повышению долговечности ЯВ-ксенографтов по

сравнению с кондуитами, фиксированными глутаровым альдегидом. Иммобилизация памидроновой кислоты дополнительно улучшает устойчивость диэпокси-консервированных тканей к кальцификации. На базе проведённого исследования разработан новый клапаносодержащий конduit для реконструкции ВОПЖ у пациентов педиатрической группы. Протез представляет собой клапаносодержащий фрагмент яремной вены быка, обработанный раствором диэпоксида с дополнительной иммобилизацией бисфосфоната, и защищен патентом на изобретение № 2633544 С1 [Журавлёва и др., 2017a].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе последовательно изложены этапы исследования, направленного на обоснование стратегии создания ксеногенных клапаносодержащих кондуитов, обладающих повышенной резистентностью к кальцификации и улучшенными структурными характеристиками. Использование клинико-экспериментального дизайна позволило комплексно подойти к изучению проблемы дисфункции легочных кондуитов в условиях повышенной активности метаболических процессов и иммунного ответа, характерных для детского возраста.

Результаты проведенного клинического исследования имеют важное значение для понимания причин дисфункции легочных графтов в педиатрической группе пациентов. Было выявлено, что кальцификация структур кондуитов является ключевым фактором их несостоятельности. Это подчеркивает необходимость разработки методов, направленных на предотвращение минерализации тканей графтов. Несмотря на то, что кальциевые отложения обнаруживаются во всех типах протезов, интенсивность их накопления и локализация существенно отличаются в различных группах, что свидетельствует о влиянии специфических свойств каждого типа биоматериала. Ключевую роль в патологической минерализации кондуитов играют структурные особенности ткани и изменения химического состава фиксированного ксеноматериала. Выявлено, что графты, содержащие Ао-корень и ГА-фиксированный ПК-лоскут демонстрируют наиболее высокую скорость дегенеративных изменений и раннее развитие дисфункции.

Предложенная в диссертационной работе стратегия консервации биоматериала, основанная на использовании эпоксидного соединения (диглицидиловый эфир этиленгликоля, диэпоксид), показала высокую эффективность для коллаген-содержащих тканей – ПК-лоскута и ЯВ-стенки. Полученные данные свидетельствуют, что, обладая более высокой реакционной активностью по сравнению с ГА, диэпоксид обеспечивает плотное сшивание тканей и способен ковалентно связывать различные типы бисфосфоновых кислот. Более того, диэпоксидная обработка ПК-лоскута и ЯВ-стенки самостоятельно снижала кальций-связывающую активность этих тканей.

Полученные в работе результаты убедительно демонстрируют, что эффективность Бф-модификации ткани напрямую зависит от структуры биоматериала, метода его базовой консервации и типа иммобилизованного бисфосфоната. Иммобилизованные бисфосфоновые кислоты (типы 1 и 2) уменьшают минерализацию материала, воздействуя на вторую стадию кальцификации – рост кристаллической массы. Кроме того, под их влиянием изменяется структура минеральных кластеров за счёт снижения накопления в них фосфора.

Кондуиты из ДЭ-обработанной ЯВ, как Бф-модифицированные, так и немодифицированные, демонстрируют структурные характеристики, способствующие значительному улучшению долговечности протеза. При этом иммобилизация бисфосфонатов усиливает антикальциевую протекцию, что подтверждает перспективность данного подхода. В то же время ксеноперикардialные кондуиты, независимо от типа сшивающего агента и наличия Бф-модификации, остаются склонными к кальцификации. Несмотря на обнадеживающие данные, полученные в модели подкожной имплантации у крыс, которые свидетельствуют об эффективном блокировании диэпоксидом начальной фазы минерализации коллаген-содержащей ткани, более сложные условия гемоконтактной среды и циклической нагрузки в эксперименте на крупных лабораторных животных выявили сохраняющуюся способность этих кондуитов к депонированию кальция. Минерализация начинается в области технических швов, где полифиламентная нить играет ключевую роль в инициации патологического процесса. Эти данные подчеркивают необходимость дальнейшего совершенствования конструктивных решений, что является критически важным для улучшения долговечности ксеноперикардialных протезов в клинической практике.

Свиной аортальный корень, характеризующийся высоким содержанием эластиновых волокон и ГМК, демонстрирует значительную кальций-связывающую активность, которая сохраняется независимо от варианта базовой обработки и модификации бисфосфонатами. Высокая склонность к накоплению кальция делает данный биоматериал неподходящим для использования при изготовлении

легочных кондуитов, предназначенных для имплантации у педиатрических пациентов.

Таким образом, результаты, полученные в рамках данного диссертационного исследования, убедительно подтвердили эффективность нового подхода к созданию легочного кондуита на основе ксеногенных тканей. Клапаносодержащий сегмент яремной вены быка, обработанный диэпоксидом с дополнительной иммобилизацией бисфосфоната, признан наиболее оптимальным биоматериалом для создания клапанного ксенокондуита, предназначенного для реконструкции пути оттока в легочную артерию у педиатрических пациентов. Эти графты продемонстрировали высокую степень интеграции в легочное русло, сопровождающейся ремоделированием и витализацией ткани, формированием хорошо развитого эндотелиального слоя, а также сниженной склонностью к кальцификации и неоинтимальной пролиферации. Полученные данные свидетельствуют о том, что кондуиты из ДЭ-ЯВ с дополнительной Бф-модификацией способны обеспечить пролонгированную работоспособность по сравнению с другими ксеногенными графтами. Улучшенная износостойкость графтов имеет особое значение для детей с ВПС, поскольку их соматический рост требует многократной замены легочных протезов, а повышение срока службы кондуитов существенно снизит количество повторных вмешательств и улучшит качество жизни пациентов.

Опираясь на полученные результаты, был разработан легочный кондуит, который представляет собой клапаносодержащий сегмент яремной вены быка, консервированный в растворе диэпоксида с дополнительной иммобилизацией бисфосфоновой кислоты. Преимуществами данного протеза являются широкий размерный ряд, наличие собственного клапанного аппарата и отсутствие швов в проекции створок, хорошие эластические и прочностные характеристики фиксированного материала, способность к ревитализации и равномерной эндотелизации ткани графта, а также значительно меньшая склонность к минерализации структур протеза. Данная разработка защищена патентом на

изобретение (№ 2633544 С1, 13.10.2017), что подтверждает её новизну и перспективы клинического применения.

Однако, учитывая описанные ограничения проведенных исследований, необходимы дополнительные работы для более точной оценки клинической значимости полученных результатов. В частности, проблема кальцификации стенки аортального корня и ксеноперикардальных графтов остается нерешенной и требует дальнейшего изучения и разработки инновационных подходов и стратегий антикальциевой защиты. Новые данные о механизмах поперечной сшивки ксеноматериала, влиянии иммобилизованных бисфосфоновых кислот и роли шовных нитей в депонировании кальция существенно расширяют наше понимание процессов минерализации биологических тканей. Эти знания могут стать основой для разработки других эффективных решений, направленных на снижение кальцификации биологических клапанов сердца. Таким образом, полученные результаты открывают перспективы для дальнейшей оптимизации легочных кондуитов.

ВЫВОДЫ

1. Анализ клинических данных выявил, что в педиатрической популяции общая свобода от повторных оперативных вмешательств на графте после реконструкции выходного отдела правого желудочка составляет 79,6% через 5 лет и 43,4% через 10 лет после имплантации.

2. Свобода от первой реинтервенции на легочном кондуите достоверно различалась между исследуемыми группами ($p < 0,001$): наибольшая свобода от повторного вмешательства в течение 5- и 10-летнего периода наблюдения была свойственна легочным гомографтам (92,9% и 72,4%), наименьшая – кондуитам, содержащим диэпокси-обработанный свиной аортальный корень (63,1% и 29,0%).

3. В педиатрической популяции пациентов основной причиной дисфункции легочного кондуита, характерной для всех исследуемых групп протезов, является стеноз графта (84,2%; $p < 0,001$).

4. Кальцификация стенки и створок протеза выступает ведущим патологическим механизмом нарушения функции клапаносодержащего кондуита (67,0%; $p < 0,001$) в детской популяции, независимо от типа биоматериала и варианта его обработки.

5. Основными факторами риска ранних реинтервенций на графте после реконструкции выходного отдела правого желудочка являются более ранний возраст пациента на момент операции (ОР 0,99; $p = 0,003$) и тип кондуита (ОР 0,89; $p = 0,041$).

6. Риск развития ранней дисфункции кондуита в группах яремной вены быка, консервированной глутаровым альдегидом, и диэпокси-обработанного ксеноперикардального протеза был сопоставим с показателями в группе легочных гомографтов (ОР 1,44, $p = 0,127$ и ОР 1,13, $p = 0,706$ соответственно).

7. Кондуиты, содержащие диэпокси-обработанный свиной аортальный корень, характеризуются наиболее высоким риском кальцификации структур графта (ОР 4,47; $p < 0,001$) и ранней дисфункции протеза, требующей реинтервенций (ОР 2,56; $p < 0,001$).

8. Реконструкция выходного отдела правого желудочка кондуитом из ксеноперикарда, фиксированного глутаровым альдегидом, сопровождается двукратным увеличением риска повторного оперативного вмешательства ($p < 0,001$). В данной группе протезов риск реинтервенций, обусловленных кальцификацией графта, возрастает на 95%, а вследствие неоинтимальной гиперплазии — увеличивается в 11 раз по сравнению с легочными гомографтами.

9. Частота инфекционного эндокардита при протезировании выходного отдела правого желудочка составляет 5,6%, и не зависит от типа имплантированного кондуита ($p = 0,115$). Основными предикторами данного осложнения являются более старший возраст пациента (ОР 1,01; $p = 0,006$), больший вес на момент операции (ОР 1,02; $p = 0,022$) и больший диаметр имплантированного протеза (ОР 1,12; $p = 0,009$).

10. Анализ экспериментальных данных показал, что замена основного сшивающего агента с глутарового альдегида на диэпоксид позволяет полностью ингибировать кальцификацию коллагена за счёт подавления нуклеации фосфата кальция и обеспечить более высокую плотность сшивки биоматериалов.

11. Эластин-содержащие ткани обладают высокой кальций-связывающей активностью и, независимо от типа сшивающего агента, подвержены значительной минерализации, которая инициируется на эластиновых волокнах.

12. Иммобилизация бисфосфонатов в фиксированном ксеноперикарде происходит преимущественно за счёт образования ковалентных связей с маскирующими группами сшивающего агента, тогда как для эластин-содержащих тканей (консервированный аортальный корень, стенка яремной вены) характерно взаимодействие бисфосфоновых кислот с аминоклуппами субстратов, а также их нековалентное связывание.

13. Аортальный корень, богатый как эластиновыми волокнами, так и нежизнеспособными гладкомышечными клетками, характеризуется высокой степенью накопления фосфата кальция независимо от способа базовой обработки и модификации бисфосфонатами.

14. Диэпоксидная обработка эффективно ингибирует минерализацию стенки яремной вены и бычьего перикарда, в сравнении с консервацией глутаровым альдегидом, а дополнительная иммобилизация бисфосфонатов типов 1 и 2 на данные биоматериалы значительно замедляет процесс нуклеации и последующего роста кальциевых кристаллов.

15. В экспериментальной модели на крупных лабораторных животных ксеновенозные и ксеноперикардальные кондуиты, обработанные диэпоксидом, демонстрируют витализацию ткани графтов, развитый эндотелиальный слой, а также меньшую склонность к кальцификации и неоинтимальной пролиферации по сравнению с протезами, обработанными глутаровым альдегидом.

16. Ксеноперикардальные графты, независимо от типа обработки и модификации бисфосфонатами, подвергаются кальцификации в области технических швов, где полифиламентная нить выступает инициатором минерализации. Для данной группы графтов характерно распространение неоинтимального слоя на приточную и отточную поверхности створок, что способствует увеличению градиента давления в проксимальном отделе кондуита.

17. Согласно экспериментальным данным, разработанный кондуит из яремной вены быка, обработанный диэпоксидом с дополнительной мобилизацией бисфосфоната, обладает хорошей интеграцией в легочное русло, улучшенными структурными характеристиками и низкой склонностью к кальцификации.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При протезировании ВОПЖ у пациентов педиатрической группы рекомендуется использовать ЛА-гомографты и кондуиты ГА-ЯВ. При наличии протеза соответствующего размера предпочтение следует отдавать ЛА-гомографтам как кондуиту выбора.

2. Для реконструкции пути оттока из ПЖ у детей не рекомендуется использовать кондуиты, содержащие диэпокси-обработанный свиной аортальный корень и перикард, фиксированный глутаровым альдегидом.

3. Размер планируемого к имплантации кондуита не должен превышать Z-score более чем на 2 единицы, при расчете на фактическую площадь поверхности тела ребенка.

4. Перед имплантацией кондуита необходимо тщательно промыть протез от раствора хранения в строгом соответствии с инструкциями производителя, что позволит минимизировать токсическое действие оставшихся на ткани консервантов. Не следует сокращать временной интервал отмывки или уменьшать кратность смены стерильного раствора 0,9% NaCl.

5. Во время имплантации графта следует избегать кистирования линий проксимального и дистального анастомозов, а также перекручивания или деформации кондуита, чтобы снизить риск ранней дисфункции протеза.

6. При возможности рекомендуется сохранять заднюю стенку нативной легочной артерии, что облегчит выделение ранее имплантированного кондуита при репротезировании ВОПЖ.

7. Рекомендуется выполнять одномоментную пластику ветвей легочной артерии во время протезирования ВОПЖ с использованием тканей имплантируемого кондуита за счёт моделирования дистального конца графта или с применением отдельных заплат. Не рекомендуется использовать ксеногенную аортальную стенку в качестве пластического материала.

8. При появлении признаков дисфункции кондуита первым этапом необходимо рассмотреть возможность выполнения эндоваскулярных процедур для устранения нарушения оттока в легочное артериальное русло.

9. Детям, перенесшим протезирование ВОПЖ, в обязательном порядке рекомендуется соблюдение принципов профилактики протезного инфекционного эндокардита. Контроль за выполнением этих рекомендаций должен осуществляться законными представителями ребенка.

10. При появлении субфебрильной/фебрильной лихорадки без явных проявлений локального инфекционного процесса рекомендуется выполнить ЭхоКГ для исключения протезного инфекционного эндокардита.

11. При подозрении/выявлении инфекционного эндокардита имплантированного кондуита рекомендуется своевременная консультация в специализированном медицинском учреждении.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АД – артериальное давление
- АЛА – атрезия легочной артерии
- Ален – алендроновая кислота
- Ао – аорта
- АоК – аортальный корень
- АоКл – аортальный клапан
- БАЛК – большая аорто-легочная коллатераль
- Бф – бисфосфоновая кислота, бисфосфонат
- ВКМ – внеклеточный матрикс
- ВОЛЖ – выходной отдел левого желудочка
- ВОПЖ – выходной отдел правого желудочка
- ВПВ – верхняя полая вена
- ВПС – врожденный порок сердца
- ГА – глутаровый альдегид
- ГА-ПК – ксеноперикардальный конduit, консервированный глутаровым альдегидом
- ГА-ЯВ – бычья яремная вена, обработанная глутаровым альдегидом
- ГМК – гладкомышечные клетки
- ДИ – доверительный интервал
- ДМЖП – дефект межжелудочковой перегородки
- ДОМС – двойное отхождение магистральных сосудов от правого желудочка
- ДЭ – диглицидиловый эфир этиленгликоля, диэпоксид
- ДЭ-АоК – свиной аортальный корень, обработанный диэпоксидом
- ДЭ-ПК – ксеноперикардальный конduit, фиксированный диэпоксидом
- Зол – золедроновая кислота
- ИВЛ – искусственная вентиляция легких
- ИГХ – иммуногистохимическое исследование
- ИК – искусственное кровообращение

ИК-спектр – инфракрасный спектр

КТМА – корригированная транспозиция магистральных сосудов

ЛА – легочная артерия

ЛА-гомографт – легочный артериальный гомографт

ММП – матриксные металлопротеиназы

Нер – неридроновая кислота

НПВ – нижняя полая вена

ОАС – общий артериальный ствол

ОР – отношение риска

Пам – памидроновая кислота

ПЖ – правый желудочек

ПК – перикард

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ТА-пластика – трансаннулярная пластика

ТМА – транспозиция магистральных артерий

ЦВД – центральное венозное давление

ЧП-ЭХОКГ – чреспищеводная эхокардиография

ЩФ – щелочная фосфатаза

ЭДС – энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия

ЯВ – яремная вена

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

АСТ – активированное время свертывания

Ala – аланин

Arg – аргинин

Asp – аспарагиновая кислота

ATR – аттенуированное полное отражение

BSA – площадь поверхности тела (body surface area)

СЕАВА – 2-(2-карбоксиэтиламино)этилиден-1,1-бисфосфоновая кислота

СПАВА – 2-(5-карбоксипентиламино)этилиден-1,1-бисфосфоновая кислота

D – диаметр кондуита

Glu – глутаминовая кислота

Gly – глицин

His – гистидин

H&E – окрашивание гематоксилином и эозином

Ile – изолейцин

IQR – межквартильный интервал (interquartile range)

Leu – лейцин

Let – летальный исход (exitus letalis)

Lys – лизин

Me – медиана (median)

Met – метионин

Mismatch – несоответствие размеров протез-пациент

ONLys – гидроксизин

ONPro – гидроксипролин

Phe – фенилаланин

Pro – пролин

Ser – серин

Thr – треонин

Tyr – тирозин

Val – валин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акентьева Т. Н. и др. Локальный воспалительный ответ на использование шовного материала в хирургической практике: экспериментальные данные // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2020. Т. 22. № 2. С. 151–157.
2. Барбараш Л. С., Барбараш Н. А., Журавлева И. Ю. Биопротезы клапанов сердца. Проблемы и перспективы. Кемерово: Кемеровский полиграфкомбинат, 1995. 400 с.
3. Барбараш Л. С., Журавлева И. Ю. Эволюция биопротезов клапанов сердца: достижения и проблемы двух десятилетий // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2012. Т. 1. С. 4–11.
4. Бондаренко Н. А. и др. Цитотоксичность ксеногенного перикарда, консервированного эпоксидными соединениями в качестве сшивающих агентов // Современные технологии в медицине. 2021. Т. 13. № 4. С. 27.
5. Гушин Я. А. Сравнительная анатомия сердца человека и экспериментальных животных // Лабораторные животные для научных исследований. 2021. № 1. С. 56–67.
6. Демин А. А. и др. Инфекционный эндокардит и инфекция внутрисердечных устройств у взрослых. Клинические рекомендации 2021 // Российский кардиологический журнал. 2022. Т. 27. № 10. С. 113–192.
7. Ермаков М. С. и др. Опухоль-ассоциированные фибробласты и их роль в опухолевой прогрессии // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022. Т. 26. № 1. С. 14–21.
8. Журавлева И. Ю. Биоцидная композиция для асептического хранения консервированного протезного материала из тканей животного происхождения : патент RU 2580621 C1. Заявл. 24.11.2014; опубл. 10.04.2016. — Режим доступа: <https://patents.google.com/patent/RU2580621C1/ru> (дата обращения: 13.05.2026).
9. Журавлева И. Ю. и др. Клапаносодержащий ксеновенозный конduit: terra incognita или tabula rasa? // Сибирский научный медицинский журнал. 2016а. Т. 36. № 2. С. 90-101.

10. Журавлева И. Ю. и др. Клинико-морфологический анализ дисфункции кондуита Contegra у пациентов первого года жизни // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2016b. Т. 20. № 1. С. 56–61.

11. Журавлёва И.Ю. и др. Способ изготовления клапансодержащего кондуита из яремной вены крупного рогатого скота : патент RU 2633544 C1. Заявл. 06.06.2016; опубл. 13.10.2017a. — Режим доступа: <https://patents.google.com/patent/RU2633544C1/ru> (дата обращения: 14.05.2026).

12. Журавлева И. Ю. и др. Кальцификация эластин-содержащих ксеногенных биоматериалов: влияние консервантов и бисфосфонатов // Сибирский научный медицинский журнал. 2017b. Т. 37. №. 6. С. 28-37.

13. Журавлева И. Ю. и др. Ксеноперикард, консервированный ди- и пентаэпоксидами: молекулярные механизмы сшивки и механические свойства биоматериала // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2018. Т. 22. №. 3. С. 56-68.

14. Караськов А. М. и др. Различные типы кондуитов для реконструкции пути оттока из правого желудочка при процедуре Росса у взрослых: сравнительный анализ // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2013. Т. 2. С. 23–27.

15. Костюнин А. Е. и др. Модификация поливиниловым спиртом эпоксиобработанного ксеноперикарда повышает его резистентность к кальцификации in vitro // Трансплантология. 2023a. Т. 15. № 1. С. 34–45.

16. Костюнин А. Е. и др. Современный взгляд на кальцификацию ксенобиопротезов клапанов сердца и стратегии их антикальцификационной защиты // Трансплантология. 2023b. Т. 15. № 4. С. 515–528.

17. Кудрявцева Ю. А. и др. Роль шовного материала в кальцификации кардиоваскулярных биопротезов // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2013. Т. 4. С. 22–27.

18. Кузнецова Н. П. и др. Термодинамика олигомеризации глутарового альдегида при взаимодействии с аминокислотами // Журнал прикладной химии. 2003. Т. 76. № 11. С. 1848–1852.

19. Кулябин Ю. Ю. и др. Сравнительный анализ кондуитов для протезирования легочной артерии у детей // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2025. Т. 13. №. 4. С. 25-34.
20. Никитин С. В., Князев С. П., Шатохин К. С. Миниатюрные свиньи ИЦиГ – модельный объект для изучения формообразовательного процесса // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014. Т. 18. № 2. С. 279–293.
21. Ничай Н. Р. и др. Правосторонние ксенокондуиты у детей: анализ причин дисфункции // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. 2019. Т. 12. №. 3. С. 173-182.
22. Ничай Н. Р. и др. Диэпокси-обработанный кондуит из яремной вены быка для протезирования легочной артерии // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2022. Т. 26. №. 4. С. 19-32.
23. Ничай Н. Р. и др. Инфекционный эндокардит легочных кондуитов в педиатрической группе пациентов // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. 2024. Т. 17. № 2. С. 139-151.
24. Олейникова Н. А. и др. Опухоль-ассоциированные фибробласты и их значение в прогрессии злокачественных новообразований // Архив патологии. 2020. Т. 82. № 1. С. 68–77.
25. Тимченко Т. П. Бисфосфонаты как потенциальные ингибиторы кальцификации биопротезов клапанов сердца (обзор) // Современные технологии в медицине. 2022. Т. 14. № 2. С. 68–79.
26. Albanesi F. и др. Incidence and risk factors for Contegra graft infection following right ventricular outflow tract reconstruction: long-term results // European Journal of Cardio-Thoracic Surgery. 2014. Т. 45. № 6. С. 1070–1074.
27. Alfer'ev I. S., Mikhailin N. V. Reactions of vinylidenediphosphonic acid with nucleophiles. 4. Addition of amino acids, diastereotopy of phosphorus atoms in the addition products // Bulletin of the Russian Academy of Sciences Division of Chemical Science. 1992. Т. 41. № 9. С. 1709–1711.

28. Alferiev I. S. и др. High reactivity of alkyl sulfides towards epoxides under conditions of collagen fixation - a convenient approach to 2-amino-4-butyrolactones. // *Biomaterials*. 2001. Т. 22. № 18. С. 2501–2506.
29. Alferiev I. S., Connolly J. M., Levy R. J. A novel mercapto-bisphosphonate as an efficient anticalcification agent for bioprosthetic tissues // *J Organomet Chem*. 2005. Т. 690. № 10. С. 2543–2547.
30. Alfieri G. M. и др. Long-term survival and freedom from reoperation after placement of a pulmonary xenograft valved conduit // *Ann Thorac Surg*. 2016. Т. 102. № 2. С. 602–607.
31. Algieri C. и др. A comparative study of bioenergetic metabolism on mammary epithelial cells from humans and Göttingen Minipigs // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2024. Т. 1868. № 12. С. 130728.
32. Anderson R. H. и др. Development of the arterial roots and ventricular outflow tracts // *J Anat*. 2024. Т. 244. № 3. С. 497–513.
33. Andreas M. и др. Comparable long-term results for porcine and pericardial prostheses after isolated aortic valve replacement // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2015. Т. 48. № 4. С. 557–561.
34. Armstrong A. K. и др. Association between patient age at implant and outcomes after transcatheter pulmonary valve replacement in the multicenter Melody valve trials // *Catheterization and Cardiovascular Interventions*. 2019. Т. 94. № 4. С. 607–617.
35. Attia R. Q., Raja S. G. Surgical pericardial heart valves: 50 years of evolution // *International Journal of Surgery*. 2021. Т. 94. С. 106121.
36. Attmann T. и др. Percutaneous heart valve replacement: histology and calcification characteristics of biological valved stents in juvenile sheep // *Cardiovascular Pathology*. 2007. Т. 16. № 3. С. 165–170.
37. Aulsebrook E. J. The european convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes // *Zeitschrift Fur Versuchstierkunde*. – 1986. – Т. 28. – №. 5. – С. 219.
38. Ayuso M. и др. The neonatal and juvenile pig in pediatric drug discovery and development // *Pharmaceutics*. 2020. Т. 13. № 1. С. 44.

39. Badria A. F., Koutsoukos P. G., Mavrilas D. Decellularized tissue-engineered heart valves calcification: what do animal and clinical studies tell us? // *J Mater Sci Mater Med*. 2020. T. 31. № 12. С. 132.
40. Bailey M. T. и др. Role of elastin in pathologic calcification of xenograft heart valves // *J Biomed Mater Res A*. 2003. T. 66A. № 1. С. 93–102.
41. Baltimore R. S. и др. Infective endocarditis in childhood: 2015 update // *Circulation*. 2015. T. 132. № 15. С. 1487–1515.
42. Bando K. и др. Nitrogen-containing bisphosphonates and lipopolysaccharide mutually augment inflammation via adenosine triphosphate (ATP)-mediated and interleukin 1 β (IL-1 β)-mediated production of neutrophil extracellular traps (NETs) // *Journal of Bone and Mineral Research*. 2020. T. 36. № 9. С. 1866–1878.
43. Barbarash O. и др. Impact of recipient-related factors on structural dysfunction of xenoaortic bioprosthetic heart valves // *Patient Prefer Adherence*. 2015. С. 389–399.
44. Bass J. K., Chan G. M. Calcium nutrition and metabolism during infancy // *Nutrition*. 2006. T. 22. № 10. С. 1057–1066.
45. Batlivala S. P. и др. Pulmonary valve replacement function in adolescents: a comparison of bioprosthetic valves and homograft conduits // *Ann Thorac Surg*. 2012. T. 93. № 6. С. 2007–2016.
46. Baumgartner H. и др. ESC Guidelines for the management of grown-up congenital heart disease (new version 2010): The task force on the management of grown-up congenital heart disease of the European Society of Cardiology (ESC) // *Eur Heart J*. 2010. T. 31. № 23. С. 2915–2957.
47. Baumgartner H. и др. 2020 ESC Guidelines for the management of adult congenital heart disease // *Eur Heart J*. 2021. T. 42. № 6. С. 563–645.
48. Beckerman Z. и др. High incidence of late infective endocarditis in bovine jugular vein valved conduits // *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2018. T. 156. № 2. С. 728–734.e2.
49. Bell D. и др. Durability of tissue-engineered bovine pericardium (CardioCel®) for a minimum of 24 months when used for the repair of congenital heart defects // *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2019. T. 28. № 2. С. 284–290.

50. Belli E. и др. The performance of Hancock porcine-valved dacron conduit for right ventricular outflow tract reconstruction // *Ann Thorac Surg*. 2010. Т. 89. № 1. С. 152–158.
51. Bennink G. и др. A novel restorative pulmonary valved conduit in a chronic sheep model: mid-term hemodynamic function and histologic assessment // *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2018. Т. 155. № 6. С. 2591- 2601.e3.
52. Berdajs D. и др. Fluid dynamics simulation of right ventricular outflow tract oversizing // *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2015. Т. 21. № 2. С. 176–182.
53. Bianco R.W. и др. Large animal models in cardiac and vascular biomaterials research and assessment // *Biomaterials Science: An Introduction to Materials*. 3rd ed. Amsterdam : Elsevier Inc., 2013. С. 653–676.
54. Bibevski S. и др. Performance of SynerGraft decellularized pulmonary allografts compared with standard cryopreserved allografts: results from multiinstitutional data // *Ann Thorac Surg*. 2017. Т. 103. № 3. С. 869–874.
55. Bleek K., Taubert A. New developments in polymer-controlled, bioinspired calcium phosphate mineralization from aqueous solution // *Acta Biomaterialia*. 2013. Т. 9. № 5. С. 6283–6321.
56. Bobylev D. и др. Matched comparison of decellularized homografts and bovine jugular vein conduits for pulmonary valve replacement in congenital heart disease // *Cell Tissue Bank*. 2024. Т. 25. № 1. С. 55–66.
57. Bodnar E. The Medtronic Parallel valve and the lessons learned // *J Heart Valve Dis*. 1996. Т. 5. № 6. С. 572–573.
58. Böer U. и др. The immune response to crosslinked tissue is reduced in decellularized xenogeneic and absent in decellularized allogeneic heart valves // *Int J Artif Organs*. 2015. Т. 38. № 4. С. 199–209.
59. Boethig D. и др. A European study on decellularized homografts for pulmonary valve replacement: initial results from the prospective ESPOIR Trial and ESPOIR Registry data // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2019. Т. 56. № 3. С. 503–509.
60. Boshnakov V. и др. Right ventricular outflow tract reconstruction in truncus arteriosus: a 30-year two-center comparison between homografts and bovine jugular vein // *Braz J Cardiovasc Surg*. 2023. Т. 38. № 5. С. e20220341.

61. Bottio T. и др. Hancock II bioprosthesis: a glance at the microscope in mid-long-term explants // *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003. Т. 126. № 1. С. 99–105.
62. Boudjemline Y. и др. Surprising outcome similarities between Contegra bovine jugular vein conduit and Shelhigh no-react porcine pulmonary valve conduit: role of immunologic reaction // *Eur J Cardiothorac Surg*. 2003. Т. 24. № 5. С. 850–851; author reply 851.
63. Bozso S. J. и др. A review of the immune response stimulated by xenogenic tissue heart valves // *Scand J Immunol*. 2021a. Т. 93. № 4. С. e13018.
64. Bozso S. J. и др. Structural valve deterioration is linked to increased immune infiltrate and chemokine expression // *J Cardiovasc Transl Res*. 2021b. Т. 14. № 3. С. 503–512.
65. Bramer S. и др. Long-term outcome of right ventricular outflow tract reconstruction with bicuspidalized homografts // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2011. Т. 40. № 6. С. 1392–1395.
66. Brasselet C. и др. Collagen and elastin cross-linking: a mechanism of constrictive remodeling after arterial injury // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2005. Т. 289. № 5. С. H2228–H2233.
67. Bre L. P., McCarthy R., Wang W. Prevention of bioprosthetic heart valve calcification: strategies and outcomes // *Curr Med Chem*. 2014. Т. 21. № 22. С. 2553–2564.
68. Brown J. W. и др. Right ventricular outflow tract reconstruction with an allograft conduit in non-Ross patients: risk factors for allograft dysfunction and failure // *Ann Thorac Surg*. 2005. Т. 80. № 2. С. 655–664.
69. Brown R. A. и др. Subclinical leaflet thrombosis post transcatheter aortic valve replacement – An update for 2020 // *Structural Heart*. 2020. Т. 4. № 5. С. 369–381.
70. Buckley J. R. и др. Multicenter analysis of early childhood outcomes after repair of truncus arteriosus // *Ann Thorac Surg*. 2019. Т. 107. № 2. С. 553–559.
71. Busch E. и др. Calcium affinity, cooperativity, and domain interactions of extracellular EF-hands present in BM-40 // *Journal of Biological Chemistry*. 2000. Т. 275. № 33. С. 25508–25515.

72. Butcher J. T., Mahler G. J., Hockaday L. A. Aortic valve disease and treatment: the need for naturally engineered solutions // *Adv Drug Deliv Rev.* 2011. T. 63. № 4–5. С. 242–268.
73. Byrne G. W., McGregor C. G. A. 2025: status of cardiac xenotransplantation including preclinical models // *Frontiers in Transplantation.* 2025. T. 4. С. 1568910.
74. Caballero A. и др. Evaluation of transcatheter heart valve biomaterials: biomechanical characterization of bovine and porcine pericardium // *J Mech Behav Biomed Mater.* 2017. T. 75. С. 486–494.
75. Caffarelli C. и др. Bisphosphonates, atherosclerosis and vascular calcification: update and systematic review of clinical studies // *Clin Interv Aging.* 2017. T. 12. С. 1819–1828.
76. Capodanno D. и др. 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) // *Eur Heart J.* 2017. T. 38. № 45. С. 3382–3390.
77. Carpentier S. M. и др. Calcium mitigation in bioprosthetic tissues by iron pretreatment: the challenge of iron leaching // *Ann Thorac Surg.* 1995. T. 60. С. S332–S338.
78. Carlidge T. R. G. и др. Detection and prediction of bioprosthetic aortic valve degeneration // *J Am Coll Cardiol.* 2019. T. 73. № 10. С. 1107–1119.
79. Casula M. и др. Subclinical leaflet thrombosis after transcatheter aortic valve replacement: a meaningless finding? A systematic review and meta-analysis // *Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes.* 2021. T. 7. № 1. С. 107–108.
80. Chabry Y. и др. Prevention by the CXCR2 antagonist SCH527123 of the calcification of porcine heart valve cusps implanted subcutaneously in rats // *Front Cardiovasc Med.* 2023. T. 10. С. 1227589.
81. Chanda A., Fokin V. V. Organic synthesis “on water” // *Chem Rev.* 2009. T. 109. № 2. С. 725–748.

82. Chang Y. и др. Assessment of an epoxy-fixed pericardial patch with or without ionically bound heparin in a canine model // *Int J Artif Organs*. 1997. Т. 20. № 6. С. 332–340.
83. Chang Y. и др. Tissue regeneration patterns in acellular bovine pericardia implanted in a canine model as a vascular patch // *J Biomed Mater Res A*. 2004. Т. 69A. № 2. С. 323–333.
84. Chauvette V. и др. Pulmonary homograft dysfunction after the Ross procedure using decellularized homografts—a multicenter study // *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2022. Т. 163. № 4. С. 1296–1305.e3.
85. Cheatham J. P. и др. Clinical and hemodynamic outcomes up to 7 years after transcatheter pulmonary valve replacement in the US Melody valve investigational device exemption trial // *Circulation*. 2015. Т. 131. № 22. С. 1960–1970.
86. Chen W. и др. Effect of 2-amino oleic acid exposure conditions on the inhibition of calcification of glutaraldehyde cross-linked porcine aortic valves // *J Biomed Mater Res*. 1994. Т. 28. № 12. С. 1485–1495.
87. Chen W., Schoen F. J., Levy R. J. Mechanism of efficacy of 2-amino oleic acid for inhibition of calcification of glutaraldehyde-pretreated porcine bioprosthetic heart valves // *Circulation*. 1994. Т. 90. № 1. С. 323–329.
88. Chen X.-J. и др. Bioprosthetic pulmonary valve replacement: Contemporary analysis of a large, single-center series of 170 cases // *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2013. Т. 146. № 6. С. 1461–1466.
89. Chong D. S. T. и др. Calcification of a synthetic renovascular graft in a child // *EJVES Short Rep*. 2016. Т. 33. С. 13–15.
90. Christ T. и др. Long-term results after the Ross procedure with the decellularized AutoTissue Matrix P® bioprosthesis used for pulmonary valve replacement // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2019. Т. 55. № 5. С. 885–892.
91. Christenson J. T. и др. Blood group incompatibility and accelerated homograft fibrocalcifications // *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004. Т. 127. № 1. С. 242–250.
92. Christenson J. T. и др. Homografts and xenografts for right ventricular outflow tract reconstruction: long-term results // *Ann Thorac Surg*. 2010. Т. 90. № 4. С. 1287–1293.

93. Christian A. J. и др. 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 // J Biomed Mater Res A. 2015. Т. 103. № 7. С. 2441–2448.
94. Clark J. N. и др. Prevention of calcification of bioprosthetic heart valve cusp and aortic wall with ethanol and aluminum chloride // Ann Thorac Surg. 2005. Т. 79. № 3. С. 897–904.
95. Cocomello L. и др. Long-term comparison between pulmonary homograft versus bioprosthesis for pulmonary valve replacement in tetralogy of Fallot // J Am Heart Assoc. 2019. Т. 8. № 24. С. e013654.
96. Cohen S. и др. Tissue processing techniques for fabrication of covered stents for small-diameter vascular intervention // Acta Biomater. 2018. Т. 65. С. 248–258.
97. Connolly J. M. и др. Triglycidyl amine crosslinking combined with ethanol inhibits bioprosthetic heart valve calcification // Ann Thorac Surg. 2011. Т. 92. № 3. С. 858–865.
98. Cooper D. K. C. Introduction: the present status of xenotransplantation research // Xenotransplantation: Methods and Protocols. 2020. С. 1–25.
99. Courtman D. W. и др. Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction // J Biomed Mater Res. 1994. Т. 28. № 6. С. 655–666.
100. Crago M. и др. Pediatric pulmonary valve replacements: clinical challenges and emerging technologies // Bioeng Transl Med. 2023. Т. 8. № 4. С. e10501.
101. Cramer M. и др. Tissue response, macrophage phenotype, and intrinsic calcification induced by cardiovascular biomaterials: can clinical regenerative potential be predicted in a rat subcutaneous implant model? // J Biomed Mater Res A. 2022. Т. 110. № 2. С. 245–256.
102. Crisóstomo V. и др. Common swine models of cardiovascular disease for research and training // Lab Anim (NY). 2016. Т. 45. № 2. С. 67–74.
103. D'Alessandro C. C. и др. Calcification assessment of bioprosthetic heart valve tissues using an improved *in vitro* model // IEEE Trans Biomed Eng. 2020. Т. 67. № 9. С. 2453–2461.

104. Dave H. и др. Risk factor analysis of 170 single-institutional Contegra implantations in pulmonary position // *Ann Thorac Surg*. 2011. Т. 91. № 1. С. 195–203.
105. Dearani J. A. и др. Late follow-up of 1095 patients undergoing operation for complex congenital heart disease utilizing pulmonary ventricle to pulmonary artery conduits // *Ann Thorac Surg*. 2003. Т. 75. № 2. С. 399–411.
106. Delgado V. и др. 2023 ESC Guidelines for the management of endocarditis // *Eur Heart J*. 2023. Т. 44. № 39. С. 3948–4042.
107. Ding K. и др. A PEGylation method of fabricating bioprosthetic heart valves based on glutaraldehyde and 2-amino-4-pentenoic acid co-crosslinking with improved antithrombogenicity and cytocompatibility // *Acta Biomater*. 2022. Т. 144. С. 279–291.
108. Dokuchaeva A. A. и др. In vivo evaluation of PCL vascular grafts implanted in rat abdominal aorta // *Polymers (Basel)*. 2022. Т. 14. № 16. С. 3313.
109. Dowling D. J., Levy O. Ontogeny of early life immunity // *Trends Immunol*. 2014. Т. 35. № 7. С. 299–310.
110. Dunford J. E. и др. Structure–activity relationships among the nitrogen containing bisphosphonates in clinical use and other analogues: time-dependent inhibition of human farnesyl pyrophosphate synthase // *J Med Chem*. 2008. Т. 51. № 7. С. 2187–2195.
111. Dunne B. и др. The Freestyle valve as a right ventricle to pulmonary artery conduit. A systematic review and meta-analysis // *Heart Lung Vessel*. 2015. Т. 7. № 4. С. 304–310.
112. Dunne B. и др. Medium-term outcomes after pulmonary valve replacement with the Freestyle valve for congenital heart disease: a case series // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2016. Т. 49. № 5. С. e105–e111.
113. Dvir D. и др. Standardized definition of structural valve degeneration for surgical and transcatheter bioprosthetic aortic valves // *Circulation*. 2018. Т. 137. № 4. С. 388–399.
114. Ebetino F. H. и др. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates // *Bone*. 2011. Т. 49. № 1. С. 20–33.
115. Ebken J. и др. Residual immune response towards decellularized homografts may be highly individual // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2021. Т. 59. № 4. С. 773–782.

116. Elagin V. и др. Multiparametric optical bioimaging reveals the fate of epoxy crosslinked biomeshes in the mouse subcutaneous implantation model // *Front Bioeng Biotechnol.* 2020. Т. 8. С. 107.
117. Eleyan L. и др. Infective endocarditis in paediatric population // *Eur J Pediatr.* 2021. Т. 180. № 10. С. 3089–3100.
118. Englum B. R. и др. Pseudoaneurysm formation after medtronic freestyle porcine aortic bioprosthesis implantation: a word of caution // *Ann Thorac Surg.* 2014. Т. 98. № 6. С. 2061–2067.
119. Erdbrügger W. и др. Decellularized xenogenic heart valves reveal remodeling and growth potential *in Vivo* // *Tissue Eng.* 2006. Т. 12. № 8. С. 2059–2068.
120. Eybl E. и др. Toxic effects of aldehydes released from fixed pericardium on bovine aortic endothelial cells // *J Biomed Mater Res.* 1989. Т. 23. № 11. С. 1355–1365.
121. Falchetti A. и др. Contegra versus pulmonary homograft for right ventricular outflow tract reconstruction in newborns // *Cardiol Young.* 2019. Т. 29. № 4. С. 505–510.
122. Ferrans V. J. и др. Calcific deposits in porcine bioprostheses: structure and pathogenesis // *Am J Cardiol.* 1980. Т. 46. № 5. С. 721–734.
123. Findeisen K. и др. Toward acellular xenogeneic heart valve prostheses: Histological and biomechanical characterization of decellularized and enzymatically deglycosylated porcine pulmonary heart valve matrices // *Xenotransplantation.* 2020. Т. 27. № 5. С. e12617.
124. Flameng W. и др. Calcification of allograft and stentless xenograft valves for right ventricular outflow tract reconstruction: an experimental study in adolescent sheep // *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011. Т. 141. № 6. С. 1513–1521.
125. Flameng W. и др. A randomized assessment of an advanced tissue preservation technology in the juvenile sheep model // *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2015. Т. 149. № 1. С. 340–345.
126. Fleisch H. и др. Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo // *Science.* 1969. Т. 165. № 3899. С. 1262–1264.

127. Forbess J. M. Conduit selection for right ventricular outflow tract reconstruction: contemporary options and outcomes // *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu.* 2004. T. 7. № 1. С. 115–124.
128. Fowler V. G. и др. The 2023 Duke-international society for cardiovascular infectious diseases criteria for infective endocarditis: updating the modified Duke criteria // *Clinical Infectious Diseases.* 2023. T. 77. № 4. С. 518–526.
129. Francis M. D. и др. Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo // *Science.* 1969. T. 165. № 3899. С. 1264–1266.
130. Frith J. C. и др. The molecular mechanism of action of the antiresorptive and antiinflammatory drug clodronate: evidence for the formation in vivo of a metabolite that inhibits bone resorption and causes osteoclast and macrophage apoptosis // *Arthritis Rheum.* 2001. T. 44. № 9. С. 2201–2210.
131. Fuery M. A. и др. Vascular ossification: pathology, mechanisms, and clinical implications // *Bone.* 2018. T. 109. С. 28–34.
132. Gabbay S. и др. Calcification of implanted xenograft pericardium // *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1984. T. 87. № 5. С. 782–787.
133. Galar A. и др. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic valve endocarditis: pathophysiology, epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and management // *Clin Microbiol Rev.* 2019. T. 32. № 2. С. e00041-18.
134. García-Gareta E. и др. Decellularised scaffolds: just a framework? Current knowledge and future directions // *J Tissue Eng.* 2020. T. 11. С. 2041731420942903.
135. van Geemen D. и др. Age-dependent changes in geometry, tissue composition and mechanical properties of fetal to adult cryopreserved human heart valves // *PLoS One.* 2016. T. 11. № 2. С. e0149020.
136. George A. J. Ethics, virtues and xenotransplantation // *Perfusion.* 2024. T. 39. № 2. С. 334–343.
137. Gersak B. Presence of calcium in the vessel walls after end-to-end arterial anastomoses with polydioxanone and polypropylene sutures in growing dogs // *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993. T. 106. № 4. С. 587–591.

138. Ghazy T. и др. Subclinical endocarditis might be a hidden trigger of early prosthetic valve calcification: a histological study // *Heart Surg Forum*. 2018. Т. 21. № 4. С. E300–E304.
139. Gist K. M. и др. Assessment of the relationship between Contegra conduit size and early valvar insufficiency // *Ann Thorac Surg*. 2012. Т. 93. № 3. С. 856–861.
140. Göber V. и др. Adverse mid-term outcome following RVOT reconstruction using the Contegra valved bovine jugular vein // *Ann Thorac Surg*. 2005. Т. 79. № 2. С. 625–631.
141. Goldstone A. B. и др. Mechanical or biologic prostheses for aortic-valve and mitral-valve replacement // *New England Journal of Medicine*. 2017. Т. 377. № 19. С. 1847–1857.
142. Gott J. P. и др. Calcification of porcine valves: a successful new method of antiminerallization // *Ann Thorac Surg*. 1992. Т. 53. № 2. С. 207–216.
143. Grabenwöger M. и др. Impact of glutaraldehyde on calcification of pericardial bioprosthetic heart valve material // *Ann Thorac Surg*. 1996. Т. 62. № 3. С. 772–777.
144. Grebenik E. A. и др. Chemical cross-linking of xenopericardial biomeshes: a bottom-up study of structural and functional correlations // *Xenotransplantation*. 2019. Т. 26. № 3. С. e12506.
145. Grehan J. F. и др. Development and evaluation of a swine model to assess the preclinical safety of mechanical heart valves // *J Heart Valve Dis*. 2000. Т. 9. № 5. С. 710–719; discussion 719-720.
146. Grimm M. и др. Biocompatibility of aldehyde-fixed bovine pericardium. An in vitro and in vivo approach toward improvement of bioprosthetic heart valves // *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1991. Т. 102. № 2. С. 195–201.
147. Gröning M. и др. Infective endocarditis in right ventricular outflow tract conduits: a register-based comparison of homografts, Contegra grafts and Melody transcatheter valves // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2019. Т. 56. № 1. С. 87–93.
148. Gruber M. и др. Phosphorus binding sites in proteins: structural preorganization and coordination // *J Phys Chem B*. 2014. Т. 118. № 5. С. 1207–1215.

149. Guo G. и др. Radical polymerization-crosslinking method for improving extracellular matrix stability in bioprosthetic heart valves with reduced potential for calcification and inflammatory response // *Acta Biomater.* 2018. Т. 82. С. 44–55.
150. Guo G. и др. A method for simultaneously crosslinking and functionalizing extracellular matrix-based biomaterials as bioprosthetic heart valves with enhanced endothelialization and reduced inflammation // *Acta Biomater.* 2021. Т. 119. С. 89–100.
151. Gychka S. G. и др. Vasa vasorum lumen narrowing in brain vascular hyalinosis in systemic hypertension patients who died of ischemic stroke // *Int J Mol Sci.* 2020. Т. 21. № 24. С. 9611.
152. Haas N. A. и др. The risk of bacterial endocarditis after percutaneous and surgical biological pulmonary valve implantation // *Int J Cardiol.* 2018. Т. 268. С. 55–60.
153. Harris A. G. и др. Graft rejection in paediatric congenital heart disease // *Transl Pediatr.* 2023. Т. 12. № 8. С. 1572–1591.
154. Hascoet S. и др. Infective endocarditis risk after percutaneous pulmonary valve implantation with the Melody and Sapien valves // *JACC Cardiovasc Interv.* 2017. Т. 10. № 5. С. 510–517.
155. Hawthorne W. J. Ethical and legislative advances in xenotransplantation for clinical translation: focusing on cardiac, kidney and islet cell xenotransplantation // *Front Immunol.* 2024. Т. 15. С. 1355609.
156. Hazekamp M. G. и др. Consensus document on optimal management of patients with common arterial trunk // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery.* 2021. Т. 60. № 1. С. 7–33.
157. Helke K. L. и др. Pigs in toxicology // *Toxicol Pathol.* 2016. Т. 44. № 4. С. 575–590.
158. Hendriks M., Everaerts F., Verhoeven M. Alternative fixation of bioprostheses // *J Long Term Eff Med Implants.* 2001. Т. 11. № 3–4. С. 163–183.
159. Herijgers P. и др. Valved jugular vein segments for right ventricular outflow tract reconstruction in young sheep // *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002. Т. 124. № 4. С. 798–805.
160. Herrmann J. L. и др. Right ventricular outflow tract reconstruction in infant truncus arteriosus: a 37-year experience // *Ann Thorac Surg.* 2020. Т. 110. № 2. С. 630–637.

161. Herrmann J. L., Brown J. W. Seven decades of valved right ventricular outflow tract reconstruction: the most common heart procedure in children // *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2020. T. 160. № 5. С. 1284–1288.
162. Hirsch D. и др. Inhibition of calcification of glutaraldehyde pretreated porcine aortic valve cusps with sodium dodecyl sulfate: preincubation and controlled release studies // *J Biomed Mater Res.* 1993. T. 27. № 12. С. 1477–1484.
163. Hoit B. D. Anatomy and physiology of the pericardium // *Cardiol Clin.* 2017. T. 35. № 4. С. 481–490.
164. Holmes A. и др. The Contegra conduit: late outcomes in right ventricular outflow tract reconstruction // *Ann Pediatr Cardiol.* 2012. T. 5. № 1. С. 27.
165. Homann M. и др. Reconstruction of the RVOT with valved biological conduits: 25 years experience with allografts and xenografts // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery.* 2000. T. 17. № 6. С. 624–630.
166. Hong J. L. и др. Degenerative processes in bioprosthetic mitral valves in juvenile pigs // *J Cardiothorac Surg.* 2011. T. 6. № 1. С. 72.
167. Hou S. и др. Microtopographic patterns affect *Escherichia coli* biofilm formation on poly(dimethylsiloxane) surfaces // *Langmuir.* 2011. T. 27. № 6. С. 2686–2691.
168. Hu Y. и др. A novel anti-calcification method for bioprosthetic heart valves using dopamine-modified alginate // *Polymer Bulletin.* 2019. T. 76. № 3. С. 1423–1434.
169. Huang Y., Wang X., Lin H. The hypoxic microenvironment: a driving force for heterotopic ossification progression // *Cell Communication and Signaling.* 2020. T. 18. № 1. С. 20.
170. Human P. и др. Residual bioprosthetic valve immunogenicity: forgotten, not lost // *Front Cardiovasc Med.* 2022. T. 8. С. 760635.
171. Huan Y., Chang Y., Song J. Application of homograft valved conduit in cardiac surgery // *Front Cardiovasc Med.* 2021. T. 8. С. 740871.
172. Ichikawa Y. и др. A new antithrombogenic RV-PA valved conduit // *ASAIO Journal.* 1994. T. 40. № 3. С. M714–M718.

173. Ichikawa Y. и др. Use of a bovine jugular vein graft with natural valve for right ventricular outflow tract reconstruction: a one-year animal study // J Thorac Cardiovasc Surg. 1997. T. 114. № 2. С. 224–233.

174. Imamura E. и др. Epoxy compounds as a new cross-linking agent for porcine aortic leaflets: subcutaneous implant studies in rats // J Card Surg. 1989. T. 4. № 1. С. 50–57.

175. Itoh T. и др. Body surface area measurement in laboratory miniature pigs using a computed tomography scanner // J Toxicol Sci. 2016. T. 41. № 5. С. 637–644.

176. Jacobs M. L. и др. An empirically based tool for analyzing morbidity associated with operations for congenital heart disease // J Thorac Cardiovasc Surg. 2013. T. 145. № 4. С. 1046–1057.e1.

177. Jalal Z. и др. Selective propensity of bovine jugular vein material to bacterial adhesions: an in-vitro study // Int J Cardiol. 2015. T. 198. С. 201–205.

178. Jelenc M. и др. Comparison of pulmonary and aortic root and cusp dimensions in normal adults using computed tomography: potential implications for Ross procedure planning // Interdisciplinary CardioVascular and Thoracic Surgery. 2024. T. 39. № 6. С. ivae206.

179. Jia H., Chang Y., Song J. The pig as an optimal animal model for cardiovascular research // Lab Anim (NY). 2024. T. 53. № 6. С. 136–147.

180. Jin W. и др. Elastin stabilization through polyphenol and ferric chloride combined treatment for the enhancement of bioprosthetic heart valve anticalcification // Artif Organs. 2018. T. 42. № 11. С. 1062–1069.

181. Jorge-Herrero E., Paez J., Castillo-Olivares Ramos J. L. Del. Tissue heart valve mineralization: review of calcification mechanisms and strategies for prevention // Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics. 2005. T. 3. № 2. С. 67–82.

182. Junnil P. и др. Long-term course after pediatric right ventricular outflow tract reconstruction // Asian Cardiovasc Thorac Ann. 2021. T. 29. № 6. С. 483–489.

183. Kadeetham K., Samankatiwat P. Heterotopically-placed right ventricle-to-pulmonary artery conduit does not negatively affect outcomes // J Cardiothorac Surg. 2023. T. 18. № 1. С. 259.

184. Kalluri R., Neilson E. G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis // *Journal of Clinical Investigation*. 2003. T. 112. № 12. С. 1776–1784.
185. Karaskov A. и др. Results of the Ross procedure in adults: a single-centre experience of 741 operations // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2016a. T. 49. № 5. С. e97–e104.
186. Karaskov A. и др. Right ventricular outflow tract replacement with xenografts in Ross patients older than 60 years // *Ann Thorac Surg*. 2016b. T. 101. № 6. С. 2252–2259.
187. Kieczkowski G. R. и др. Preparation of (4-amino-1-hydroxybutylidene)bisphosphonic acid sodium salt, MK-217 (alendronate sodium). An improved procedure for the preparation of 1-hydroxy-1,1-bisphosphonic acids // *J Org Chem*. 1995. T. 60. № 25. С. 8310–8312.
188. Kielbik A. и др. In vitro study of calcium microsecond electroporation of prostate adenocarcinoma cells // *Molecules*. 2020. T. 25. № 22. С. 5406.
189. Kim K. M. Cells, rather than extracellular matrix, nucleate apatite in glutaraldehyde-treated vascular tissue // *J Biomed Mater Res*. 2002. T. 59. № 4. С. 639–645.
190. Kim K. M., Herrera G. A., Battarbee H. D. Role of glutaraldehyde in calcification of porcine aortic valve fibroblasts // *Am J Pathol*. 1999. T. 154. № 3. С. 843–852.
191. Kim M. и др. A preclinical trial of periventricular pulmonary valve implantation: pericardial versus aortic porcine valves mounted on self-expandable stent // *Artif Organs*. 2021. T. 45. № 5. С. E89–E100.
192. Kirsch T. Determinants of pathologic mineralization // *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2008. T. 18. № 1. С. 1–9.
193. Kobayashi E. и др. The pig as a model for translational research: overview of porcine animal models at Jichi Medical University // *Transplant Res*. 2012. T. 1. № 1. С. 8.
194. Konertz W. и др. Hemodynamic characteristics of the Matrix P decellularized xenograft for pulmonary valve replacement during the Ross operation // *J Heart Valve Dis*. 2005. T. 14. № 1. С. 78–81.
195. Kong W. и др. Collagen crosslinking: effect on structure, mechanics and fibrosis progression // *Biomedical Materials*. 2021. T. 16. № 6. С. 062005.

196. Köstering H. и др. Blood coagulation studies in domestic pigs (Hanover breed) and minipigs (Goettingen breed) // *Lab Anim.* 1983. Т. 17. № 4. С. 346–349.
197. Kostyunin A. и др. Ultrastructural pathology of atherosclerosis, calcific aortic valve disease, and bioprosthetic heart valve degeneration: commonalities and differences // *Int J Mol Sci.* 2020a. Т. 21. № 20. С. 7434.
198. Kostyunin A. E. и др. Degeneration of bioprosthetic heart valves: update 2020 // *J Am Heart Assoc.* 2020b. Т. 9. № 19. С. e018506.
199. Kostyunin A. E. и др. Proteolytic degradation is a major contributor to bioprosthetic heart valve failure // *J Am Heart Assoc.* 2023. Т. 12. № 1. С. e028215.
200. Koziarz A. и др. Modes of bioprosthetic valve failure: a narrative review // *Curr Opin Cardiol.* 2020. Т. 35. № 2. С. 123–132.
201. Lancellotti P. и др. Multi-modality imaging assessment of native valvular regurgitation: an EACVI and ESC council of valvular heart disease position paper // *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2022. Т. 23. № 5. С. e171–e232.
202. Landis W. J., Silver F. H., Freeman J. W. Collagen as a scaffold for biomimetic mineralization of vertebrate tissues // *J. Mater. Chem.* 2006. Т. 16. № 16. С. 1495–1503.
203. Lawson M. A. и др. Differences between bisphosphonates in binding affinities for hydroxyapatite // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010. Т. 92B. № 1. С. 149–155.
204. Lee C. и др. Durability of bioprosthetic valves in the pulmonary position: long-term follow-up of 181 implants in patients with congenital heart disease // *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011. Т. 142. № 2. С. 351–358.
205. Lee M. Y. и др. Comparative analysis of heart functions in micropigs and conventional pigs using echocardiography and radiography // *J Vet Sci.* 2007. Т. 8. № 1. С. 7.
206. Lee W. K. и др. Heparinized bovine pericardium as a novel cardiovascular bioprosthesis // *Biomaterials.* 2000. Т. 21. № 22. С. 2323–2330.
207. Legare J. F., Lee T. D. G., Ross D. B. Cryopreservation of rat aortic valves results in increased structural failure // *Circulation.* 2000. Т. 102. Supplement 3. С. III-75–III-78.
208. Lejay A. и др. Calcification of synthetic vascular grafts: a systematic review // *EJVES Vasc Forum.* 2023. Т. 60. С. 1–7.

209. Lelovas P. P., Kostomitsopoulos N. G., Xanthos T. T. A comparative anatomic and physiologic overview of the porcine heart // *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2014. T. 53. № 5. С. 432–438.
210. Lemson M. S. и др. Intimal hyperplasia in vascular grafts // *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2000. T. 19. № 4. С. 336–350.
211. Leong J. и др. Neomycin and carbodiimide crosslinking as an alternative to glutaraldehyde for enhanced durability of bioprosthetic heart valves // *J Biomater Appl*. 2013. T. 27. № 8. С. 948–960.
212. Levy R. J. и др. Biologic determinants of dystrophic calcification and osteocalcin deposition in glutaraldehyde-preserved porcine aortic valve leaflets implanted subcutaneously in rats // *Am J Pathol*. 1983. T. 113. № 2. С. 143–155.
213. Levy R. J. и др. Inhibition of calcification of bioprosthetic heart valves by local controlled-release diphosphonate // *Science*. 1985. T. 228. № 4696. С. 190–192.
214. Levy R. J. и др. Calcification of subcutaneously implanted type I collagen sponges. Effects of formaldehyde and glutaraldehyde pretreatments // *Am J Pathol*. 1986. T. 122. № 1. С. 71–82.
215. Lewis M. J. и др. Long-term follow-up of right ventricle to pulmonary artery biologic valved conduits used in pediatric congenital heart surgery // *Pediatr Cardiol*. 2023. T. 44. № 1. С. 102–115.
216. Li C. и др. Current development of bovine jugular vein conduit for right ventricular outflow tract reconstruction // *Front Bioeng Biotechnol*. 2022. T. 10. С. 920152.
217. Li J. S. и др. Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis // *Clinical Infectious Diseases*. 2000. T. 30. № 4. С. 633–638.
218. Li K. Y. C. Bioprosthetic heart valves: upgrading a 50-year old technology // *Front Cardiovasc Med*. 2019. T. 6. С. 47.
219. Li Q. и др. Dual effects of bisphosphonates on ectopic skin and vascular soft tissue mineralization versus bone microarchitecture in a mouse model of generalized arterial calcification of infancy // *Journal of Investigative Dermatology*. 2016. T. 136. № 1. С. 275–283.

220. Liao K. K. и др. Mechanical stress: an independent determinant of early bioprosthetic calcification in humans // *Ann Thorac Surg*. 2008. Т. 86. № 2. С. 491–495.
221. Liesenborghs L., Verhamme P., Vanassche T. *Staphylococcus aureus*, master manipulator of the human hemostatic system // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2018. Т. 16. № 3. С. 441–454.
222. Lis M. и др. Pulmonary valve morphometry revisited: clinical implications for valvular and supra-valvular interventions // *Clinical Anatomy*. 2023. Т. 36. № 2. С. 234–241.
223. Liu J. и др. Mapping the calcification of bovine pericardium in rat model by enhanced micro-computed tomography // *Biomaterials*. 2014. Т. 35. № 29. С. 8305–8311.
224. Liu Y. и др. Global birth prevalence of congenital heart defects 1970–2017: updated systematic review and meta-analysis of 260 studies // *Int J Epidemiol*. 2019. Т. 48. № 2. С. 455–463.
225. Lockitch G. и др. Age- and sex-specific pediatric reference intervals for biochemistry analytes as measured with the Ektachem-700 analyzer // *Clin Chem*. 1988. Т. 34. № 8. С. 1622–1625.
226. Loor G. и др. The Carpentier-Edwards Perimount Magna mitral valve bioprosthesis: intermediate-term efficacy and durability // *J Cardiothorac Surg*. 2016. Т. 11. № 1. С. 20.
227. Lopez-Moya M. и др. Optimizing glutaraldehyde-fixed tissue heart valves with chondroitin sulfate hydrogel for endothelialization and shielding against deterioration // *Biomacromolecules*. 2018. Т. 19. № 4. С. 1234–1244.
228. Lü W. и др. Calcification resistance for photooxidatively crosslinked acellular bovine jugular vein conduits in right-side heart implantation // *J Biomed Mater Res A*. 2012. Т. 100A. № 10. С. 2644–2653.
229. Lueth E. T. и др. Retrospective comparison of the supported and unsupported bovine jugular vein conduit in children // *Ann Thorac Surg*. 2019. Т. 108. № 2. С. 567–573.
230. Lunney J. K. и др. Importance of the pig as a human biomedical model // *Sci Transl Med*. 2021. Т. 13. № 621. С. eabd5758.

231. Ly R. и др. Predictive factors of death associated with infective endocarditis in adult patients with congenital heart disease // *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. 2021. Т. 10. № 3. С. 320–328.
232. Maitz M. F. и др. The blood compatibility challenge. Part 4: Surface modification for hemocompatible materials: passive and active approaches to guide blood-material interactions // *Acta Biomater*. 2019. Т. 94. С. 33–43.
233. Maizato M. J. S. и др. Glutaraldehyde-treated bovine pericardium: effects of lyophilization on cytotoxicity and residual aldehydes // *Artif Organs*. 2003. Т. 27. № 8. С. 692–694.
234. Makkar R. R. и др. Subclinical leaflet thrombosis in transcatheter and surgical bioprosthetic valves // *J Am Coll Cardiol*. 2020. Т. 75. № 24. С. 3003–3015.
235. Malekzadeh-Milani S. и др. Incidence and outcomes of right-sided endocarditis in patients with congenital heart disease after surgical or transcatheter pulmonary valve implantation // *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014. Т. 148. № 5. С. 2253–2259.
236. Manavitehrani I. и др. Current challenges and emergent technologies for manufacturing artificial right ventricle to pulmonary artery (RV-PA) cardiac conduits // *Cardiovasc Eng Technol*. 2019. Т. 10. № 2. С. 205–215.
237. Manji R. A. и др. Glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve conduits calcify and fail from xenograft rejection // *Circulation*. 2006. Т. 114. № 4. С. 318–327.
238. Manji R. A. и др. Bioprosthetic heart valves of the future // *Xenotransplantation*. 2014. Т. 21. № 1. С. 1–10.
239. Manji R. A., Hara H., Cooper D. K. C. Characterization of the cellular infiltrate in bioprosthetic heart valves explanted from patients with structural valve deterioration // *Xenotransplantation*. 2015. Т. 22. № 5. С. 406–407.
240. Marathe S. P. и др. Homografts versus stentless bioprosthetic valves in the pulmonary position: a multicentre propensity-matched comparison in patients younger than 20 years // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2019. Т. 56. № 2. С. 377–384.
241. Massel D. R., Little S. H. Antiplatelet and anticoagulation for patients with prosthetic heart valves // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2013. № 7. С. CD003464.

242. Mathieu P. и др. Cartilaginous metaplasia and calcification in aortic allograft is associated with transforming growth factor β 1 expression // J Thorac Cardiovasc Surg. 2003. Т. 126. № 5. С. 1449–1454.

243. Matilla L. и др. A role for MMP-10 (matrix metalloproteinase-10) in calcific aortic valve stenosis // Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2020. Т. 40. № 5. С. 1370–1382.

244. Matsumoto Y. и др. Hemodynamic performance and durability of mosaic bioprostheses for aortic valve replacement, up to 13 years // Circulation Journal. 2015. Т. 79. № 5. С. 1044–1051.

245. Mattson J. M., Zhang Y. Structural and functional differences between porcine aorta and vena cava // J Biomech Eng. 2017. Т. 139. № 7. С. 0710071–0710078.

246. McElhinney D. B. и др. Endocarditis after transcatheter pulmonary valve replacement // J Am Coll Cardiol. 2018. Т. 72. № 22. С. 2717–2728.

247. McNamara P. J. и др. Guidelines and recommendations for targeted neonatal echocardiography and cardiac point-of-care ultrasound in the neonatal intensive care unit: an update from the American Society of Echocardiography // Journal of the American Society of Echocardiography. 2024. Т. 37. № 2. С. 171–215.

248. Mehta R. I. и др. Pathology of explanted polytetrafluoroethylene vascular grafts // Cardiovascular Pathology. 2011. Т. 20. № 4. С. 213–221.

249. Mery C. M. и др. Risk factors for development of endocarditis and reintervention in patients undergoing right ventricle to pulmonary artery valved conduit placement // J Thorac Cardiovasc Surg. 2016. Т. 151. № 2. Р. 432–441.e2.

250. Mery C. M. Elucidating the mechanisms of infective endocarditis in bovine jugular vein conduits: are we any closer? // J Thorac Cardiovasc Surg. 2018. Т. 156. № 2. С. 739–740.

251. Meuris B., Flameng W. Antimineralization treatment // Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering. 2nd ed. (Online Version) / ред. Wnek G. E., Bowlin G. L. — Boca Raton (FL): CRC Press, 2008. С. 71–84.

252. Meyns B. и др. The Contegra conduit in the right ventricular outflow tract induces supralvalvular stenosis // J Thorac Cardiovasc Surg. 2004. Т. 128. № 6. С. 834–840.

253. Meyns B. и др. Factors influencing the survival of cryopreserved homografts. The second homograft performs as well as the first // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2005. Т. 28. № 2. С. 211–216.
254. Modine T., Ben Ali W., Perrin N. Large animal models for transcatheter heart valve prosthesis development // *JACC Basic Transl Sci*. 2022. Т. 7. № 5. С. 496–497.
255. Mohler E. R. и др. Bone formation and inflammation in cardiac valves // *Circulation*. 2001. Т. 103. № 11. С. 1522–1528.
256. Moore M. A., Phillips R. E. Biocompatibility and immunologic properties of pericardial tissue stabilized by dye-mediated photooxidation // *J Heart Valve Dis*. 1997. Т. 6. № 3. С. 307–315.
257. Morris C. D. Thirty-year incidence of infective endocarditis after surgery for congenital heart defect // *JAMA*. 1998. Т. 279. № 8. С. 599.
258. Myers D. J. и др. A comparison between glutaraldehyde and diepoxide-fixed stentless porcine aortic valves: biochemical and mechanical characterization and resistance to mineralization // *J Heart Valve Dis*. 1995. Т. 4. Suppl. 1. С. S98–S101.
259. Nagase M. и др. Tenosynovial giant cell tumor, localized type with extensive chondroid metaplasia: a case report with immunohistochemical and molecular genetic analysis // *Int J Surg Pathol*. 2020. Т. 28. № 4. С. 447–453.
260. Nichay N. R. и др. In search of the best xenogeneic material for a paediatric conduit: an analysis of clinical data // *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*. 2018. Т. 27. №. 1. С. 34-41.
261. Nichay N. R. и др. Diepoxy-versus glutaraldehyde-treated xenografts: outcomes of right ventricular outflow tract reconstruction in children // *World Journal for Pediatric and Congenital Heart Surgery*. 2020. Т. 11. №. 1. С. 56-64.
262. Nichay N. R. и др. Epoxy-versus glutaraldehyde-treated bovine jugular vein conduit for pulmonary valve replacement: a comparison of morphological changes in a pig model // *Biomedicines*. 2023. Т. 11. №. 11. С. 3101.
263. Nichay N. R. и др. In Vivo Comparative Study of Calcification in Diepoxy-and Glutaraldehyde-Treated Bovine Pericardial Conduits for RVOT Reconstruction // *Prosthesis*. 2025. Т. 7. №. 3. С. 67.

264. Nicoara A. и др. Guidelines for the use of transesophageal echocardiography to assist with surgical decision-making in the operating room: a surgery-based approach // *Journal of the American Society of Echocardiography*. 2020. Т. 33. № 6. С. 692–734.

265. Nimni M. E. и др. Inhibition of ectopic calcification of glutaraldehyde crosslinked collagen and collagenous tissues by a covalently bound diphosphonate (APD) // *Am J Cardiovasc Pathol*. 1990. Т. 3. № 3. С. 237–245.

266. Nisco G. De и др. Comparison of swine and human computational hemodynamics models for the study of coronary atherosclerosis // *Front Bioeng Biotechnol*. 2021. Т. 9. С. 731924.

267. Nishi C., Nakajima N., Ikada Y. *In vitro* evaluation of cytotoxicity of diepoxy compounds used for biomaterial modification // *J Biomed Mater Res*. 1995. Т. 29. № 7. С. 829–834.

268. Noishiki Y. и др. Development and evaluation of a pliable biological valved conduit. Part I: preparation, biochemical properties, and histological findings // *Int J Artif Organs*. 1993. Т. 16. № 4. С. 192–198.

269. Noishiki Y., Miyata T. Polyepoxy compound fixation // *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering* / ред. G. Wnek, G. Bowlin. — New York: Marcel Dekker Inc., 2004. — Т. 1. — С. 1264–1273.

270. Nojiri C., Noishiki Y., Koyanagi H. Aorta-coronary bypass grafting with heparinized vascular grafts in dogs. A preliminary study // *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1987. Т. 93. № 6. С. 867–877.

271. Nunes R. S. и др. Innovative nitric oxide-releasing nanomaterials: current progress, trends, challenges, and perspectives in cardiovascular therapies // *Nitric Oxide*. 2025. Т. 156. С. 67–81.

272. O'Brien S. M. и др. An empirically based tool for analyzing mortality associated with congenital heart surgery // *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2009. Т. 138. № 5. С. 1139–1153.

273. Ogden R. W. Nonlinear elasticity, anisotropy, material stability and residual stresses in soft tissue // *Biomechanics of soft tissue in cardiovascular systems* / ред. R. W. Ogden. — Vienna: Springer Vienna, 2003. — С. 65–108.

274. Ogle M. F. и др. Calcification resistance with aluminum-ethanol treated porcine aortic valve bioprostheses in juvenile sheep // *Ann Thorac Surg.* 2003. Т. 75. № 4. С. 1267–1273.
275. Ohri R. и др. Hyaluronic acid grafting mitigates calcification of glutaraldehyde-fixed bovine pericardium // *J Biomed Mater Res A.* 2004. Т. 70A. № 2. С. 328–334.
276. Okamoto M. и др. Alendronate as an effective treatment for bone loss and vascular calcification in kidney transplant recipients // *J Transplant.* 2014. Т. 2014. С. 1–6.
277. Okoshi T. и др. A new bioprosthetic cardiac valve with reduced calcification // *ASAIO Trans.* 1990. Т. 36. № 3. С. M411–M414.
278. Ong K. и др. Right ventricle to pulmonary artery conduit reoperations in patients with tetralogy of Fallot or pulmonary atresia associated with ventricular septal defect // *Am J Cardiol.* 2013. Т. 111. № 11. С. 1638–1643.
279. Orriss I. R., Arnett T. R., Russell R. G. G. Pyrophosphate: a key inhibitor of mineralisation // *Curr Opin Pharmacol.* 2016. Т. 28. С. 57–68.
280. Papatheodoridi A. и др. Metaplastic carcinoma of the breast: case series of a single institute and review of the literature // *Medical Sciences.* 2023. Т. 11. № 2. С. 35.
281. Parashar A. и др. Elastin calcification in in vitro models and its prevention by MGP's N-terminal peptide // *J Struct Biol.* 2021. Т. 213. № 1. С. 107637.
282. Parekh A. Calcification of bovine pericardial aortic heart valves. — Canada : The University of Western Ontario, 2015. — С. 1–24.
283. Park C. S. и др. Anticalcification effect of a combination of decellularization, organic solvents and amino acid detoxification on glutaraldehyde-fixed xenopericardial heart valves in a large-animal long-term circulatory model // *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2017. Т. 25. № 3. С. 391–399.
284. Park J. и др. Phosphonate and bisphosphonate inhibitors of farnesyl pyrophosphate synthases: a structure-guided perspective // *Front Chem.* 2021. Т. 8. С. 612728.
285. Patel P. M. и др. Bovine jugular vein conduit: a mid- to long-term institutional review // *World J Pediatr Congenit Heart Surg.* 2018. Т. 9. № 5. С. 489–495.
286. Patel P. M. и др. Bovine jugular vein conduit versus pulmonary homograft in the Ross operation // *Cardiol Young.* 2020. Т. 30. № 3. С. 323–327.

287. Patel S. D. и др. The role of endothelial cells and their progenitors in intimal hyperplasia // *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2010. Т. 4. № 2. С. 129–141.
288. Pathak C. P. и др. Treatment of bioprosthetic heart valve tissue with long chain alcohol solution to lower calcification potential // *J Biomed Mater Res A*. 2004. Т. 69A. № 1. С. 140–144.
289. Paule W. J. и др. Calcification of implanted vascular tissues associated with elastin in an experimental animal model // *J Biomed Mater Res*. 1992. Т. 26. № 9. С. 1169–1177.
290. Paulsen M. J. и др. Modeling conduit choice for valve-sparing aortic root replacement on biomechanics with a 3-dimensional–printed heart simulator // *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2019. Т. 158. № 2. С. 392–403.
291. Pazianas M., van der Geest S., Miller P. Bisphosphonates and bone quality // *Bonekey Reports*. 2014. Т. 3. С. 529.
292. Peacock M. Calcium metabolism in health and disease // *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2010. Т. 5, suppl. 1. С. S23–S30.
293. Peivandi A. D. и др. Elastica degeneration and intimal hyperplasia lead to Contegra® conduit failure // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2019. Т. 56. № 6. С. 1154–1161.
294. Perrotta I. и др. New evidence for a critical role of elastin in calcification of native heart valves: immunohistochemical and ultrastructural study with literature review // *Histopathology*. 2011. Т. 59. № 3. С. 504–513.
295. Pettersen M. D. и др. Regression equations for calculation of Z scores of cardiac structures in a large cohort of healthy infants, children, and adolescents: an echocardiographic study // *Journal of the American Society of Echocardiography*. 2008. Т. 21. № 8. С. 922–934.
296. Piazza N. и др. Guidelines for reporting mortality and morbidity after cardiac valve interventions — need for a reappraisal? // *Ann Thorac Surg*. 2009. Т. 87. № 2. С. 357–358.
297. Poinot N. и др. Pulmonary valve replacement after right ventricular outflow tract reconstruction with homograft vs Contegra®: a case control comparison of mortality and morbidity // *J Cardiothorac Surg*. 2018. Т. 13. № 1. С. 8.

298. Puljula E. и др. Structural requirements for bisphosphonate binding on hydroxyapatite: NMR study of bisphosphonate partial esters // *ACS Med Chem Lett.* 2015. Т. 6. № 4. С. 397–401.
299. Qi R. и др. Elucidating the phosphate binding mode of phosphate-binding protein: the critical effect of buffer solution // *J Phys Chem B.* 2018. Т. 122. № 24. С. 6371–6376.
300. Qian T. и др. Conduits for right ventricular outflow tract reconstruction in infants and young children // *Front Surg.* 2021. Т. 8. С. 719840.
301. Raja J. и др. Midterm results of homografts in pulmonary position: a retrospective single-center study // *Indian J Thorac Cardiovasc Surg.* 2021. Т. 37. № 2. С. 129–137.
302. Rapoport H. S. и др. Mechanisms of the in vivo inhibition of calcification of bioprosthetic porcine aortic valve cusps and aortic wall with triglycidylamine/mercapto bisphosphonate // *Biomaterials.* 2007. Т. 28. № 4. С. 690–699.
303. Rezvova M. A., Kudryavceva Yu. A. Modern approaches to chemical modification of proteins in biological tissues: consequences and application // *Russ J Bioorg Chem.* 2018. Т. 44. № 1. С. 19–31.
304. Ritchie H., Mathieu E. Population Growth [Электронный ресурс] / H. Ritchie, E. Mathieu. — 2024. — Режим доступа: <https://ourworldindata.org/population-growth> (дата обращения: 14.05.2026).
305. Robichaud B. и др. Bioprosthetic pulmonary valve endocarditis: Incidence, risk factors, and clinical outcomes // *Congenit Heart Dis.* 2018. Т. 13. № 5. С. 734–739.
306. Rodefeld M. D. и др. Reoperative right ventricular outflow tract conduit reconstruction: risk analyses at follow up // *J Heart Valve Dis.* 2008. Т. 17. № 1. С. 119–126; discussion 126.
307. Rodriguez E. R., Tan C. D. Structure and anatomy of the human pericardium // *Prog Cardiovasc Dis.* 2017. Т. 59. № 4. С. 327–340.
308. Romeo J. L. R. и др. Long-term clinical outcome and echocardiographic function of homografts in the right ventricular outflow tract // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery.* 2019. Т. 55. № 3. С. 518–526.
309. Rotes A. S. и др. Long-term follow-up after pulmonary valve replacement in repaired tetralogy of Fallot // *Am J Cardiol.* 2014. Т. 114. № 6. С. 901–908.

310. Roumeliotis S. и др. Biomarkers of vascular calcification in serum // *Advances in clinical chemistry*. 2020. Т. 98. С. 91–147.
311. Rüffer A. и др. Early failure of xenogenous de-cellularised pulmonary valve conduits — a word of caution! // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2010. Т. 38. № 1. С. 78–85.
312. Rusakova Y. L. и др. Pigs as models to test cardiovascular devices // *Biomedicines*. 2024. Т. 12. № 6. С. 1245.
313. Russell R. G. G. и др. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy // *Osteoporosis International*. 2008. Т. 19. № 6. С. 733–759.
314. Russell R. G. G. Bisphosphonates: the first 40 years // *Bone*. 2011. Т. 49. № 1. С. 2–19.
315. Russell R. G. G. Pharmacological diversity among drugs that inhibit bone resorption // *Curr Opin Pharmacol*. 2015. Т. 22. С. 115–130.
316. Ruzmetov M., Geiss D. M., Fortuna R. S. Outcomes of pericardial bovine xenografts for right ventricular outflow tract reconstruction in children and young adults // *J Heart Valve Dis*. 2013. Т. 22. № 2. С. 209–214.
317. Saddique F. A. и др. Recent trends in ring opening of epoxides by amines as nucleophiles // *Synth Commun*. 2016. Т. 46. № 10. С. 831–868.
318. Sakaue T. и др. Biochemical and histological evidence of deteriorated bioprosthetic valve leaflets: the accumulation of fibrinogen and plasminogen // *Biol Open*. 2018. Т. 7. № 8. С. bio034009.
319. Salem A. M. Right ventricle to pulmonary artery connection: evolution and current alternatives // *Journal of the Egyptian Society of Cardio-Thoracic Surgery*. 2016. Т. 24. № 1. С. 47–57.
320. Sandica E. и др. Bovine jugular veins versus homografts in the pulmonary position: an analysis across two centers and 711 patients — conventional comparisons and time status graphs as a new approach // *Thorac Cardiovasc Surg*. 2015. Т. 64. № 1. С. 25–35.

321. Santibáñez-Salgado J. и др. Lyophilized glutaraldehyde-preserved bovine pericardium for experimental atrial septal defect closure // *Eur Cell Mater.* 2010. Т. 19. С. 158–165.
322. Saremi F. и др. Fibrous skeleton of the heart: anatomic overview and evaluation of pathologic conditions with CT and MR imaging // *RadioGraphics.* 2017. Т. 37. № 5. С. 1330–1351.
323. Sarris G. E. и др. Clinical guidelines for the management of patients with transposition of the great arteries with intact ventricular septum // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery.* 2017. Т. 51. № 1. С. e1–e32.
324. Sato M. и др. Shrinkage temperature and anti-calcification property of triglycidylamine-crosslinked autologous tissue // *Journal of Artificial Organs.* 2014. Т. 17. № 3. С. 265–271.
325. Saxena A. и др. Outcomes following heterotopic placement of right ventricle to pulmonary artery conduits // *World J Pediatr Congenit Heart Surg.* 2021. Т. 12. № 2. С. 220–229.
326. Scavo V. A. Jr. и др. Valved bovine jugular venous conduits for right ventricular to pulmonary artery reconstruction // *ASAIO Journal.* 1999. Т. 45. № 5. С. 482–487.
327. Schlömlischer M. и др. Aortic valve replacement with the Labcor TLPB Supra porcine bioprosthesis: intermediate clinical and echocardiographic outcomes // *J Heart Valve Dis.* 2017. Т. 26. № 1. С. 90–97.
328. Schoen F. J. и др. Onset and progression of experimental bioprosthetic heart valve calcification // *Lab Invest.* 1985. Т. 52. № 5. С. 523–532.
329. Schoen F. J., Levy R. J. Bioprosthetic heart valve calcification: membrane-mediated events and alkaline phosphatase // *Bone Miner.* 1992. Т. 17. № 2. С. 129–133.
330. Schoen F. J., Levy R. J. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention // *Ann Thorac Surg.* 2005. Т. 79. № 3. С. 1072–1080.
331. Schoen F. J., Levy R. J. Pathological calcification of biomaterials // *Biomaterials Science (Third Edition): An Introduction to Materials in Medicine.* — Amsterdam : Elsevier, Academic Press, 2013. — С. 739–754.

332. Schoen F. J., Levy R. J. Bioprosthetic heart valve calcification: clinicopathologic correlations, mechanisms, and prevention // *Cardiovascular Calcification and Bone Mineralization*. – Cham : Springer International Publishing, 2020. – С. 183–215.

333. Schoen F. J., Tsao J. W., Levy R. J. Calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. Implications for the mechanisms of bioprosthetic tissue mineralization // *Am J Pathol*. 1986. Т. 123. № 1. С. 134–145.

334. Schoenhoff F. S. и др. The Contegra bovine jugular vein graft versus the Shelhigh pulmonic porcine graft for reconstruction of the right ventricular outflow tract: a comparative study // *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2011. Т. 141. № 3. С. 654–661.

335. Schröder C. U. и др. Elastin is heterogeneously cross-linked // *Journal of Biological Chemistry*. 2018. Т. 293. № 39. С. 15107–15119.

336. Schubert S. A. и др. Early outcomes of pulmonary valve replacement with the Mitroflow bovine pericardial bioprosthesis // *Ann Thorac Surg*. 2015. Т. 99. № 5. С. 1692–1699.

337. Scott Taylor M., Shalaby S. W. Sutures // *Biomaterials Science*. — 3rd ed. — Amsterdam : Elsevier, 2013. — P. 1010–1024.

338. Senage T. и др. The role of antibody responses against glycans in bioprosthetic heart valve calcification and deterioration // *Nat Med*. 2022. Т. 28. № 2. С. 283–294.

339. Shah A. и др. Anatomical differences between human and pig hearts and their relevance for cardiac xenotransplantation surgical technique // *JACC Case Rep*. 2022. Т. 4. № 16. С. 1049–1052.

340. Shang H. и др. Aldehyde reduction in a novel pericardial tissue reduces calcification using rabbit intramuscular model // *J Mater Sci Mater Med*. 2017. Т. 28. № 1. С. 16.

341. Sharifulin R. и др. Allografts and xenografts for right ventricular outflow tract reconstruction in Ross patients // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2021a. Т. 59. № 1. С. 162–169.

342. Sharifulin R. и др. What are the alternatives to replace the pulmonary root in the absence of pulmonary homografts? // *Ann Cardiothorac Surg*. 2021b. Т. 10. № 4. С. 524–526.

343. Sharma A. и др. A systematic review of infective endocarditis in patients with bovine jugular vein valves compared with other valve types // JACC Cardiovasc Interv. 2017. Т. 10. № 14. С. 1449–1458.

344. Shebani S. и др. Right ventricular outflow tract reconstruction using Contegra® valved conduit: natural history and conduit performance under pressure // European Journal of Cardio-Thoracic Surgery. 2006. Т. 29. № 3. С. 397–405.

345. Shin K. и др. Calcium and hydroxyapatite binding site of human vitronectin provides insights to abnormal deposit formation // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2020. Т. 117. № 31. С. 18504–18510.

346. Shinkawa T. и др. Performance of bovine pericardial valves in the pulmonary position // Ann Thorac Surg. 2010. Т. 90. № 4. С. 1295–1300.

347. Sierra J. и др. Right ventricular outflow tract reconstruction: what conduit to use? Homograft or Contegra? // Ann Thorac Surg. 2007. Т. 84. № 2. С. 606–611.

348. Simon A. K., Hollander G. A., McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2015. Т. 282. № 1821. С. 20143085.

349. Simon P. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT™ in pediatric patients // European Journal of Cardio-Thoracic Surgery. 2003. Т. 23. № 6. С. 1002–1006.

350. Singh S. K. и др. Valved conduits for right ventricular outflow tract reconstruction: a review of current technologies and future directions // Pediatr Cardiol. 2025. Т. 46. № 1. С. 14–26.

351. Singla A., Lee C. H. Inhibition of CEM calcification by the sequential pretreatment with ethanol and EDTA // J Biomed Mater Res A. 2003. Т. 64A. № 4. С. 706–713.

352. Sinha R. и др. Primary ovarian lipoleiomyoma with chondroid metaplasia: an original case report with literature review // SN Comprehensive Clinical Medicine. 2023. Т. 5. С. 97.

353. Skoglund K. и др. Long-term outcome after right ventricle to pulmonary artery conduit surgery and reintervention // Scandinavian Cardiovascular Journal. 2017. Т. 51. № 5. С. 284–291.

354. Snygg-Martin U. и др. Cumulative incidence of infective endocarditis in patients with congenital heart disease: a nationwide, case-control study over nine decades // *Clinical Infectious Diseases*. 2021. Т. 73. № 8. С. 1469–1475.

355. Soda A. и др. Hydrodynamic characteristics of porcine aortic valves cross-linked with glutaraldehyde and polyepoxy compounds // *ASAIO Journal*. 2009. Т. 55. № 1. С. 13–18.

356. Sondeen J. L. и др. Comparison between human and porcine thromboelastograph parameters in response to ex-vivo changes to platelets, plasma, and red blood cells // *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2013. Т. 24. № 8. С. 818–829.

357. Soor G. S. и др. Pulmonary site bioprostheses: morphologic findings in 40 cases // *Arch Pathol Lab Med*. 2009. Т. 133. № 5. С. 797–802.

358. Sperling C. и др. A positively charged surface triggers coagulation activation through factor VII activating protease (FSAP) // *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017. Т. 9. № 46. С. 40107–40116.

359. Stammnitz C. и др. Nationwide registry-based analysis of infective endocarditis risk after pulmonary valve replacement // *J Am Heart Assoc*. 2022. Т. 11. № 5. С. e022231.

360. Stark J. и др. Fate of subpulmonary homograft conduits: determinants of late homograft failure // *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998. Т. 115. № 3. С. 506–516.

361. Steiner I. и др. Bone formation in cardiac valves: a histopathological study of 128 cases // *Virchows Archiv*. 2007. Т. 450. № 6. С. 653–657.

362. Stout K. K. и др. 2018 AHA/ACC guideline for the management of adults with congenital heart disease: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines // *Circulation*. 2019. Т. 139. № 14. С. 1494–1563.

363. Stradins P. Comparison of biomechanical and structural properties between human aortic and pulmonary valve // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2004. Т. 26. № 3. С. 634–639.

364. Sündermann S. H. и др. Two- and three-dimensional transoesophageal echocardiography in large swine used as model for transcatheter heart valve therapies: standard planes and values // *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2016. Т. 22. № 5. С. 580–586.

365. Sung H. W. и др. Comparison of the cross-linking characteristics of porcine heart valves fixed with glutaraldehyde or epoxy compounds // *ASAIO Journal*. 1993. Т. 39. № 3. С. M532–M536.

366. Sung H. W., Hsu H. L., Hsu C. S. Effects of various chemical sterilization methods on the crosslinking and enzymatic degradation characteristics of an epoxy-fixed biological tissue // *J Biomed Mater Res*. 1997. Т. 37. № 3. С. 376–383.

367. Sung H.W. и др. In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation // *J Biomater Sci Polym Ed*. 1999. Т. 10. № 1. С. 63–78.

368. Suzuki Y., Yeung A. C., Ikeno F. The representative porcine model for human cardiovascular disease // *Biomed Res Int*. 2011. Т. 2011. № 1. С. 195483.

369. Tam H. и др. A novel crosslinking method for improved tear resistance and biocompatibility of tissue based biomaterials // *Biomaterials*. 2015. Т. 66. С. 83–91.

370. Tang Z., Yue Y. Crosslinkage of collagen by polyglycidyl ethers // *ASAIO Journal*. 1995. Т. 41. № 1. С. 72–78.

371. Tod T. J., Dove J. S. The association of bound aldehyde content with bioprosthetic tissue calcification // *J Mater Sci Mater Med*. 2016. Т. 27. № 1. С. 8.

372. Tripi D. R., Vyavahare N. R. Neomycin and pentagalloyl glucose enhanced cross-linking for elastin and glycosaminoglycans preservation in bioprosthetic heart valves // *J Biomater Appl*. 2014. Т. 28. № 5. С. 757–766.

373. Trofimova L. и др. Quantification of rat brain amino acids: analysis of the data consistency // *Curr Anal Chem*. 2016. Т. 12. № 4. С. 349–356.

374. Tsolaki E. и др. Multiscale multimodal characterization and simulation of structural alterations in failed bioprosthetic heart valves // *Acta Biomaterialia*. 2023. Т. 169. С. 138–154.

375. Tsoumpra M. K. и др. The inhibition of human farnesyl pyrophosphate synthase by nitrogen-containing bisphosphonates. Elucidating the role of active site threonine 201 and tyrosine 204 residues using enzyme mutants // *Bone*. 2015. Т. 81. С. 478–486.

376. Tu R. и др. Fixation of bioprosthetic tissues with monofunctional and multifunctional polyepoxy compounds // *J Biomed Mater Res*. 1994. Т. 28. № 6. С. 677–684.

377. Turan S. и др. Serum alkaline phosphatase levels in healthy children and evaluation of alkaline phosphatase z-scores in different types of rickets // *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2011. Т. 3. № 1. С. 7–11.

378. Tweddell J. S. и др. Factors affecting longevity of homograft valves used in right ventricular outflow tract reconstruction for congenital heart disease // *Circulation*. 2000. Т. 102. № 19 Suppl 3. С. III130–III135.

379. Ugaki S. и др. An increased incidence of conduit endocarditis in patients receiving bovine jugular vein grafts compared to cryopreserved homograft for right ventricular outflow reconstruction // *Ann Thorac Surg*. 2015. Т. 99. № 1. С. 140–146.

380. Umashankar P., Kumari T., Mohanan P. Glutaraldehyde treatment elicits toxic response compared to decellularization in bovine pericardium // *Toxicol Int*. 2012. Т. 19. № 1. С. 51.

381. Urso S. и др. The Contegra conduit in the right ventricular outflow tract is an independent risk factor for graft replacement // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2011. Т. 40. № 3. С. 603–609.

382. Vaesken A. и др. Heart valves from polyester fibers: a preliminary 6-month in vivo study // *Biomed Tech (Berl)*. 2018. Т. 63. № 3. С. 271–278.

383. de Valence S. и др. Long term performance of polycaprolactone vascular grafts in a rat abdominal aorta replacement model // *Biomaterials*. 2012. Т. 33. № 1. С. 38–47.

384. Van Dijck I. и др. Infective endocarditis of a transcatheter pulmonary valve in comparison with surgical implants // *Heart*. 2015. Т. 101. № 10. С. 788–793.

385. Van Gelder J. M. и др. In vitro and in vivo effects of tetrakisphosphonates on bone resorption, tumor osteolysis, ectopic calcification, and macrophages // *J Pharm Sci*. 1997. Т. 86. № 3. С. 283–289.

386. Van Hecke M. и др. Validation of large animal models in mechanical valve research: a histologic comparison // *Interdisciplinary CardioVascular and Thoracic Surgery*. 2024. Т. 38. № 5. С. ivae070.

387. Vásquez-Alvarez S. и др. Metabolic age, an index based on basal metabolic rate, can predict individuals that are high risk of developing metabolic syndrome // *High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention*. 2021. Т. 28. № 3. С. 263–270.

388. Veloso T. R. и др. Bacterial adherence to graft tissues in static and flow conditions // J Thorac Cardiovasc Surg. 2018. Т. 155. № 1. С. 325- 332.
389. Verderio P. и др. 3Rs principle and legislative decrees to achieve high standard of animal research // Animals. 2023. Т. 13. № 2. С. 277.
390. Vicent L., Luna R., Martínez-Sellés M. Pediatric infective endocarditis: a literature review // J Clin Med. 2022. Т. 11. № 11. С. 3217.
391. Vick K. E., Johnson C. A. Aluminum-related osteomalacia in renal-failure patients // Clin Pharm. 1985. Т. 4. № 4. С. 434–439.
392. Vidavsky N., Kunitake J. A. M. R., Estroff L. A. Multiple pathways for pathological calcification in the human body // Adv Healthc Mater. 2021. Т. 10. № 4. С. 2001271.
393. Vitanova K. и др. Which type of conduit to choose for right ventricular outflow tract reconstruction in patients below 1 year of age? // European Journal of Cardio-Thoracic Surgery. 2014. Т. 46. № 6. С. 961–966.
394. Voges I. и др. Adverse results of a decellularized tissue-engineered pulmonary valve in humans assessed with magnetic resonance imaging // European Journal of Cardio-Thoracic Surgery. 2013. Т. 44. № 4. С. e272–e279.
395. Vyavahare N. и др. Prevention of bioprosthetic heart valve calcification by ethanol preincubation // Circulation. 1997. Т. 95. № 2. С. 479–488.
396. Vyavahare N. и др. Elastin calcification and its prevention with aluminum chloride pretreatment // Am J Pathol. 1999. Т. 155. № 3. С. 973–982.
397. Vyavahare N. R. и др. Prevention of calcification of glutaraldehyde-crosslinked porcine aortic cusps by ethanol preincubation: mechanistic studies of protein structure and water-biomaterial relationships // J Biomed Mater Res. 1998. Т. 40. № 4. С. 577–585.
398. Wang L., Nancollas G. H. Calcium orthophosphates: crystallization and dissolution // Chem Rev. 2008. Т. 108. № 11. С. 4628–4669.
399. Wang X. и др. Procyanidins-crosslinked aortic elastin scaffolds with distinctive anti-calcification and biological properties // Acta Biomater. 2015. Т. 16. С. 81–93.

400. Waqanivavalagi S. W. F. R. и др. Subcutaneous surgical rat models for the evaluation of decellularised heart valve immunogenicity: a systematic review // *Materialia* (Oxf). 2022. T. 21. С. 101298.
401. Ward W. K. A review of the foreign-body response to subcutaneously-implanted devices: the role of macrophages and cytokines in biofouling and fibrosis // *J Diabetes Sci Technol*. 2008. T. 2. № 5. С. 768–777.
402. Warnes C. A. и др. ACC/AHA 2008 guidelines for the management of adults with congenital heart disease: executive summary // *Circulation*. 2008. T. 118. № 23. С. 2395–2451.
403. Watanabe T. и др. Ectopic calcification in congenital heart surgery: a material-centric review // *Pediatr Cardiol*. 2024. T. 46. №. 7. С. 1771.
404. Webb C. L. и др. Inhibition of mineralization of glutaraldehyde-pretreated bovine pericardium by AlCl_3 . Mechanisms and comparisons with FeCl_3 , LaCl_3 , and $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ in rat subdermal model studies // *Am J Pathol*. 1991. T. 138. № 4. С. 971–981.
405. Webb C. L., Schoen F. J., Levy R. J. Covalent binding of aminopropanehydroxydiphosphonate to glutaraldehyde residues in pericardial bioprosthetic tissue: stability and calcification inhibition studies // *Exp Mol Pathol*. 1989. T. 50. № 3. С. 291–302.
406. Wen S. и др. Mechanisms and drug therapies of bioprosthetic heart valve calcification // *Front Pharmacol*. 2022. T. 13. С. 909801.
407. Werdan K. и др. Mechanisms of infective endocarditis: pathogen–host interaction and risk states // *Nat Rev Cardiol*. 2014. T. 11. № 1. С. 35–50.
408. Weymann A. и др. Clinical experience with expanded use of the Ross procedure: a paradigm shift? // *J Heart Valve Dis*. 2010. T. 19. № 3. С. 279–285.
409. Whelan A. и др. Collagen fibre-mediated mechanical damage increases calcification of bovine pericardium for use in bioprosthetic heart valves // *Acta Biomater*. 2021. T. 128. С. 384–392.
410. Widler L. и др. Highly potent geminal bisphosphonates. From pamidronate disodium (Aredia) to zoledronic acid (Zometa) // *J Med Chem*. 2002. T. 45. № 17. С. 3721–3738.

411. Wiebe D. и др. Glutaraldehyde release from vascular prostheses of biologic origin // *Surgery*. 1988. Т. 104. № 1. С. 26–33.
412. Wills M. R., Savory J. Aluminium poisoning: dialysis encephalopathy, osteomalacia, and anaemia // *The Lancet*. 1983. Т. 322, № 8340. С. 29–34.
413. Wilson G. J. и др. Acellular matrix: a biomaterials approach for coronary artery bypass and heart valve replacement // *Ann Thorac Surg*. 1995. Т. 60. С. S353–S358.
414. Xanthos T. и др. Baseline hemodynamics in anesthetized landrace-large white swine: reference values for research in cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation models // *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2007. Т. 46. № 5. С. 21–25.
415. Xi T. и др. Prevention of tissue calcification on bioprosthetic heart valve by using epoxy compounds: a study of calcification tests *in vitro* and *in vivo* // *J Biomed Mater Res*. 1992. Т. 26. № 9. С. 1241–1251.
416. Xue Y. и др. Age-related enhanced degeneration of bioprosthetic valves due to leaflet calcification, tissue crosslinking, and structural changes // *Cardiovasc Res*. 2023. Т. 119. № 1. С. 302–315.
417. Yang M. и др. Surface heparin treatment of the decellularized porcine heart valve: effect on tissue calcification // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017. Т. 105. № 2. С. 400–405.
418. Yin A. и др. Performance of PEGylated chitosan and poly (L-lactic acid-co- ϵ -caprolactone) bilayer vascular grafts in a canine femoral artery model // *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2020. Т. 188. С. 110806.
419. Yong M. S. и др. Medium-term outcomes of bovine jugular vein graft and homograft conduits in children // *ANZ J Surg*. 2015. Т. 85. № 5. С. 381–385.
420. Yuan S. M. и др. Right ventricular outflow tract reconstruction: valved conduit of choice and clinical outcomes // *Journal of Cardiovascular Medicine*. 2008. Т. 9. № 4. С. 327–337.
421. Yuan W. и др. Bisphosphonate-based nanocomposite hydrogels for biomedical applications // *Bioact Mater*. 2020. Т. 5. № 4. С. 819–831.

422. Zachariah J. P. V. и др. Right ventricle to pulmonary artery conduit augmentation compared with replacement in young children // *Ann Thorac Surg*. 2009. Т. 88. № 2. С. 574–580.
423. Zareian R. и др. Effect of stent crimping on calcification of transcatheter aortic valves // *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2019. Т. 29. № 1. С. 64–73.
424. Zhang W. и др. Simulating the time evolving geometry, mechanical properties, and fibrous structure of bioprosthetic heart valve leaflets under cyclic loading // *J Mech Behav Biomed Mater*. 2021. Т. 123. С. 104745.
425. Zhao L. и др. Evaluation of remodeling and regeneration of electrospun PCL/fibrin vascular grafts in vivo // *Materials Science and Engineering: C*. 2021. Т. 118. С. 111441.
426. Zheng C., Yang L., Wang Y. Recent progress in functional modification and crosslinking of bioprosthetic heart valves // *Regen Biomater*. 2024. Т. 11. С. rbad098.
427. Zhou J. и др. Porcine aortic wall flexibility. Fresh vs Denacol fixed vs glutaraldehyde fixed // *ASAIO J*. 1997. Т. 43. № 5. С. M470–M475.
428. Zhu F. и др. Role of dendritic cells in the host response to biomaterials and their signaling pathways // *Acta Biomater*. 2019. Т. 94. С. 132–144.
429. Zhu Y. и др. Osteonectin regulates the extracellular matrix mineralization of osteoblasts through P38 signaling pathway // *J Cell Physiol*. 2020. Т. 235. № 3. С. 2220–2231.
430. Zhuravleva I. Y. и др. In search of the best xenogeneic material for a paediatric conduit: an experimental study // *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*. 2018. Т. 26. №. 5. С. 738-744.
431. Zhuravleva I. Y. и др. Treatment with bisphosphonates to mitigate calcification of elastin-containing bioprosthetic materials // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2020. Т. 108. №. 7. С. 1579-1588.
432. Zhuravleva I. Y. и др. Cross-linking method using pentaepoxide for improving bovine and porcine bioprosthetic pericardia: a multiparametric assessment study // *Materials Science and Engineering: C*. 2021a. Т. 118. С. 111473.

433. Zhuravleva I. Y. и др. Immobilized bisphosphonates as potential inhibitors of bioprosthetic calcification: effects on various xenogeneic cardiovascular tissues // *Biomedicines*. 2021b. Т. 10. № 1. С. 65.

434. Zhuravleva I. Y. и др. Bovine jugular vein conduit: What affects its elastomechanical properties and thermostability? // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2022. Т. 110. № 2. С. 394-408.

435. Zhuravleva I. Y. и др. Calcification of various bioprosthetic materials in rats: is it really different? // *Int J Mol Sci*. 2023. Т. 24. № 8. С. 7274.

436. Zoghbi W. A. и др. Guidelines for the evaluation of prosthetic valve function with cardiovascular imaging: a report from the American Society of Echocardiography Developed in Collaboration With the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance and the Society of Cardiovascular Computed Tomography // *Journal of the American Society of Echocardiography*. 2024. Т. 37. № 1. С. 2–63.

437. Zubairi R. и др. Risk factors for prosthesis failure in pulmonary valve replacement // *Ann Thorac Surg*. 2011. Т. 91. № 2. С. 561–565.

438. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств» // Официальный интернет-портал правовой информации. 2016. № 11. Ст. 81. URL: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_207468/ (дата обращения: 12.05.2026).

439. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 1 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» (зарег. в Минюсте РФ 15 авг. 2016 г. № 43232) // Зарегистрировано в Минюсте РФ 15.08.2016 № 43232. — СПС «КонсультантПлюс».

440. ГОСТ Р 53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики. — М. : Стандартинформ, 2010. — 16 с.

441. ГОСТ 33215-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организация процедур. — М. : Стандартинформ, 2016. — 13 с.

442. ГОСТ 34088-2017. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за сельскохозяйственными животными. — М. : Стандартиформ, 2019. — 36 с.

443. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes // Official Journal of the European Union. 2010. L 276. P. 33–79

444. ISO 5840:2005. Cardiovascular implants. Cardiac valve prostheses / International Organization for Standardization. — Geneva : ISO, 2005. — 44 с.

445. ISO 5840-2:2015. Cardiovascular implants. Cardiac valve prostheses. Part 2. Surgically implanted heart valve prostheses / International Organization for Standardization. — Geneva : ISO, 2015. — 42 с.

446. ISO 7198:2016. Cardiovascular implants and artificial organs. Tubular vascular prostheses / International Organization for Standardization. — Geneva : ISO, 2016. — 52 с.

447. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. — Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2025. — URL: <https://www.R-project.org/>.