



УДК 616.126-77-003.84

DOI 10.17802/2306-1278-2021-10-2-16-24

СТРУКТУРА КАЛЬЦИФИКАТОВ В БИОПРОТЕЗАХ КЛАПАНОВ СЕРДЦА, КОНСЕРВИРОВАННЫХ ДИГЛИЦИДИЛОВЫМ ЭФИРОМ ЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ

Т.В. Глушкова, А.Е. Костюнин

Федеральное государственное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Сосновский бульвар, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Основные положения

• Морфология и элементный состав кальциевых депозитов, сформированных в тканях эпоксиобработанных биопротезов в аортальной и митральной позициях, не отличались от кальцификатов, выявленных в минерализованном матриксе створок стенозировавшегося аортального клапана человека. Элементный состав минеральных отложений в биопротезах «КемКор» и «ЮниЛайн» одинаковый, тогда как морфология кальцификатов различалась между рассматриваемыми моделями клапанных заменителей и, по-видимому, обусловлена специфичностью строения волокнистого матрикса биоткани, использованной при их изготовлении.

Цель

Сравнительный анализ морфологии и элементного состава минеральных отложений, образованных в створках эпоксиобработанных биопротезов, в зависимости от позиции имплантации (аортальной или митральной) и типа биоматериала (ксеноаортальный или ксеноперикардиальный); оценка кальциевых депозитов, сформированных в тканях протезных клапанов, относительно кальцификатов из пораженного клапана аорты человека.

Материалы и методы

В исследовании использованы створки клапанных биопротезов «КемКор» и «ЮниЛайн» (ЗАО «НеоКор», Кемерово, Россия), эксплантированных из митральной и аортальной позиций по причине дисфункций, а также створки кальцинированного аортального клапана (АК), удаленного при его протезировании. Морфологию кальцификатов изучали методом сканирующей электронной микроскопии с использованием микроскопа S-3400N (Hitachi, Япония), их элементный состав – методом электронно-зондового микроанализа с помощью энергодисперсионного спектрометра XFlash 4010 (Bruker, Германия), входящего в конструкцию указанного микроскопа.

Результаты

В изученных образцах обнаружены крупные внутренние кальцификаты, окруженные коллагеновыми волокнами, как правило, с признаками начала минерализации. В створках нативного клапана аорты и ксеноаортальных биопротезов «КемКор» кальциевые отложения располагались преимущественно в спонгиозном слое и имели рыхлую структуру, тогда как в створках перикардиальных протезов «ЮниЛайн» присутствовали плотные кальцификаты пластинчатой формы. Анализ элементного состава кальциевых депозитов показал присутствие Ca, P, O, Mg и Na в минерализованных участках и наличие S в областях с меньшей электронной плотностью. Соотношение Ca/P для кальцификатов в створках АК составило 1,81 (1,79–1,84; min – 1,48; max – 2,05), в створках биопротезов «ЮниЛайн» и «КемКор» – 1,78 (1,75–1,86; min – 1,52; max – 2,03) и 1,82 (1,81–1,88; min – 1,71; max – 2,06) соответственно. Достоверных различий в соотношении Ca/P между кальцификатами в исследованных группах не выявлено ($p > 0,05$).

Заключение

Кальциевые депозиты, выявленные в ткани эпоксиобработанных биопротезов и АК человека, по-видимому, образованы посредством дистрофической минерализации. Морфология кальцификатов в биопротезах зависит от типа биологической ткани, в которой они сформированы. Связь между морфологической структурой кальцификатов, обнаруженных в створках биопротезов, и позицией имплантации изделий не выявлена. Элементный состав минеральных отложений не различался во всех изученных образцах.

Для корреспонденции: Татьяна Владимировна Глушкова, bio.tv@gmail.ru; адрес: Сосновский бульвар, 6, Кемерово, Россия, 650002

Corresponding author: Tatyana V. Glushkova, bio.tv@gmail.ru; address: 6, Sosnoviy Blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

Ключевые слова Биопротезы клапанов сердца • Аортальный клапан • Кальцификация • Гидроксилапатит

Поступила в редакцию: 13.01.2021; поступила после доработки: 15.02.2021; принята к печати: 05.03.2021

CALCIFICATION OF BIOPROSTHETIC HEART VALVES TREATED WITH ETHYLENE GLYCOL DIGLYCIDYL ETHER

T.V. Glushkova, A.E. Kostyunin

Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", 6, Sosnoviy Blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

Highlights

- The morphology and elemental composition of calcium deposits formed in the tissues of epoxy-treated aortic and mitral bioprostheses do not differ from those in the mineralized matrix of stenotic human aortic valve leaflets. Despite similar elemental composition of mineral deposits in the KemCor and UniLine bioprostheses, the morphology of these calcifications differs between bioprosthetic heart valve substitutes and, apparently, is associated with the specific structure of the fibrous matrix of the biological tissues that are used for their manufacturing.

Aim	To analyze the morphology and elemental composition of mineral deposits formed in epoxy-treated aortic and mitral bioprosthetic heart valves made from xenoaortic or xenopericardial material and to compare the obtained findings with the data on calcified human aortic valve.
Methods	Leaflets of the mitral and aortic bioprosthetic heart valves KemCor and UniLine (NeoKor, L Russia, Kemerovo) that were explanted due to their failure, as well as leaflets of the calcified native aortic valve were evaluated. The morphology of calcifications was studied by scanning electron microscopy using an S-3400N microscope (Hitachi, Japan). The elemental composition of calcium deposits was studied by electron probe microanalysis using Hitachi S-3400N microscope with energy dispersive spectrometer Bruker XFlash 4010 (Bruker, Germany).
Results	Large calcifications located at the internal layers of samples were surrounded by collagen fibers commonly with evident signs of the onset of mineralization. Calcium deposits in the native aortic valve and xenoaortic bioprostheses KemCor were located mainly at the spongy layer and had a loose structure, while dense lamellar deposits were found at the leaflets of pericardial bioprostheses UniLine. The elemental composition of calcium deposits showed the presence of Ca, P, O, Mg, and Na in the mineralized regions and the presence of S in the regions of low electron density. The calcium to phosphorus ratio (Ca:P) in the calcifications of the aortic valve leaflets was 1.81 (1.79–1.84; min – 1.48; max – 2.05), whereas the Ca:P ratios in the UniLine and KemCor bioprostheses were 1.78 (1.75–1.86; min – 1.52; max – 2.03) and 1.82 (1.81–1.88; min – 1.71; max – 2.06), respectively. There were no significant differences in the Ca:P ratios between calcifications in the study groups ($p > 0.05$).
Conclusion	Calcium deposits detected in epoxy-treated bioprostheses and human aortic valve appeared to be formed under dystrophic calcification. The morphology of calcifications in bioprostheses depended on the type of biological tissue. None correlations between the morphological structure of calcifications and the implantation position were found in bioprosthetic leaflets. The elemental composition of mineral deposits was similar in all study samples.
Keywords	Bioprosthetic heart valves • Aortic valve • Calcification • Hydroxylapatite

Received: 13.01.2021; received in revised form: 15.02.2021; accepted: 05.03.2021

Список сокращений

АК – аортальный клапан ГАП – гидроксилапатит

Введение

Протезирование клапанов является золотым стандартом лечения пациентов с тяжелой формой приобретенной патологии сердца [1, 2]. Дегенеративные изменения аортального (АК) и митрального клапанов, обуславливающие необходимость их хирургической замены, имеют различную этиологию. Кальцинирующий аортальный стеноз является главной причиной протезирования АК [3], тогда как основными показаниями для вмешательства на митральном клапане выступают стеноз, как правило вызванный ревматическим поражением клапана, и пролапс, связанный с миксоматозной дегенерацией или фиброэластическим дефицитом [4].

Ежегодно в мире выполняют около 250–400 тыс. операций по протезированию клапанов сердца [5–7], причем до 60% имплантируемых клапанных заменителей приходится на биопротезы [7]. Важно отметить, что, хотя последние имеют значительное преимущество перед механическими, заключающееся в низкой частоте тромбоэмболических осложнений, биологические протезы подвержены структурной дегенерации, вследствие чего срок их функционирования ограничен [8, 9]. Одной из основных причин дисфункций биопротезов, как и в случае развития кальциноза АК, является эктопическая минерализация, способствующая повышению жесткости и уменьшению подвижности створки с последующей гемодинамической обструкцией из-за стеноза [9, 10]. Известно, что кальциевая дегенерация биопротезов вызвана в основном пассивным осаждением кальций-ионов на мертвых клетках донора и клеточном дебрисе, которые выступают основой для нуклеации фосфатов кальция [11], тогда как минерализация нативных АК может происходить через остеогенез [12].

Стоит подчеркнуть, что, несмотря на различия в этиологии дегенеративных заболеваний аортального и митрального клапанов, биопротезы в данных позициях, находясь в различных нагрузочных условиях, в равной степени подвержены кальцификации створчатого аппарата. Это явление все еще плохо охарактеризовано, а процессы, стоящие за минерализацией нативных и протезных клапанов, не до конца понятны. Одним из путей раскрытия механизмов образования кальциевых депозитов в тканях АК и биопротезов является изучение морфологии и элементного состава кальцификатов, что позволяет судить об условиях минерализации и вовлеченности клеток в процессы их формирования.

Цель исследования: сравнительный анализ морфологии и элементного состава минеральных отложений, образованных в створках эпоксиобработанных биопротезов, в зависимости от позиции имплантации (аортальной или митральной) и типа биоматериала (ксеноаортальный или ксено-

перикардальный); оценка кальциевых депозитов, сформированных в тканях биопротезов, относительно кальцификатов из пораженного нативного аортального клапана.

Материалы и методы

Объекты исследования

В настоящем исследовании использованы створки биопротезов моделей «КемКор» и «ЮниЛайн» (ЗАО «НеоКор», Кемерово, Россия), эксплантированных из митральной и аортальной позиций по причине дисфункций, а также створки АК, удаленного в связи с развитием кальцинирующего аортального стеноза при первичном протезировании. В исследовании использовали материал без признаков эндокардита. Изучены три образца каждого вида исследуемого материала. Средний возраст больных на момент первичной операции составил $61,9 \pm 8,5$ года, средний срок функционирования биопротезов – $7,3 \pm 4,0$ года. На исследование образцы передавали при наличии подписанного добровольного информированного согласия пациента на забор материала. До начала исследования образцы фиксировали в 4% растворе параформальдегида.

Сканирующая электронная микроскопия

Морфологию кальциевых депозитов изучали методом сканирующей электронной микроскопии с использованием микроскопа S-3400N (Hitachi, Япония). Оценку структуры кальцификатов производили в условиях высокого вакуума в режиме обратно-рассеянных электронов при ускоряющем напряжении 20 кВ. Для удаления несвязанного параформальдегида перед началом исследования образцы трехкратно промывали 0,9% раствором NaCl и однократно в дистиллированной воде, затем замораживали в жидком азоте и лиофилизировали в установке Freeze Dryer 2,5 (Labconco Corporation, США). Обезвоженные образцы монтировали на специальные столики с помощью двухстороннего углеродного скотча, после чего методом термоэмиссии в импульсном режиме и условиях вакуума на поверхности образцов формировали токопроводящее углеродное покрытие, используя установку EM ACE200 (Leica Mikrosysteme GmbH, Австрия).

Элементный анализ

Для оценки элементного состава кальцификатов в исследуемых образцах использован метод электронно-зондового микроанализа, осуществленный с помощью энергодисперсионного спектрометра XFlash 4010 (Bruker, Германия), входящего в конструкцию сканирующего электронного микроскопа S-3400N (Hitachi, Япония). Элементный анализ произведен в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 20 кВ в режиме обратно-рассеянных электронов без использования стандартных

образцов. Учитывая, что при напылении образцов применяли углерод, а при их монтаже – углеродный скотч, накопление спектров при анализе выполнено с поправкой на углерод. Подбор режимов для анализа произведен в соответствии с ГОСТ Р ИСО 22309-2011, в анализе учитывали К-спектр.

Статистический анализ

Количественные данные элементного анализа обработаны общепринятыми методами статистического анализа с использованием прикладной программы Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Характер распределения в выборках оценивали при помощи критерия Колмогорова – Смирнова. Данные представлены в виде медианы, 25-го и 75-го перцентилей, min и max. Статистическую значимость различий между двумя независимыми группами оценивали с помощью U-критерия Манна – Уитни, достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

В исследованных образцах отмечена преимущественно внутренняя кальцификация, подтвержденная как макроскопически, так и на микроструктурном уровне. В створках АК и ксеноаортальных свиных биопротезов «КемКор» крупные кальцификаты располагались в спонгиозном слое. Макроскопически отложения кальция в створках АК, а также ксеноаортальных и ксеноперикардиальных протезов можно было идентифицировать со стороны выводящего отдела вне зависимости от позиции (аортальной или митральной).

Во всех случаях крупные кальциевые депозиты окружены биологической тканью, которая, как правило, имела признаки начала кальцификации, локализованной внутри и на поверхности коллагеновых фибрилл. Крупные кальцификаты были неоднородны по плотности. В более рыхлых участках кальциатов различимы структуры минерализованных коллагеновых и эластических волокон с сохраненной извитостью, в более плотных участках эти структуры неразличимы. В пределах кальцинированных волокон также выявлены множественные не связанные между собой мелкие кальцификаты (рис. 1).

В структуре биопротезов «ЮниЛайн» отмечены плотные кальцификаты пластинчатой формы, в то время как в створках АК и биопротезов «КемКор» отложения кальция имели более рыхлую вегетация-подобную структуру и меньшие размеры с тонкими хаотично расположенными минерализованными волокнами. Кроме того, в створках АК и биопротезов «КемКор» кальциевые депозиты различной

морфологии (сферические, вытянутые, игольчатые, неправильной формы) определены и в межфибриллярном пространстве (рис. 2).

Структура и плотность крупных кальцификатов, как правило, неравномерны: присутствовали как более плотные сильно минерализованные области, так и участки некальцинированного биологического матрикса, что подтверждено элементным анализом. В составе минерализованных отложений с высокой электронной плотностью выявлено присутствие Ca, P, O, Mg и Na, в участках с меньшей электронной плотностью отмечено наличие S (рис. 3, 4).

Соотношение Ca/P для кальцификатов в створках нативного АК составило 1,81 (1,79–1,84; min – 1,48; max – 2,05), в створках биопротезов «ЮниЛайн» и «КемКор» – 1,78 (1,75–1,86; min – 1,52; max – 2,03)

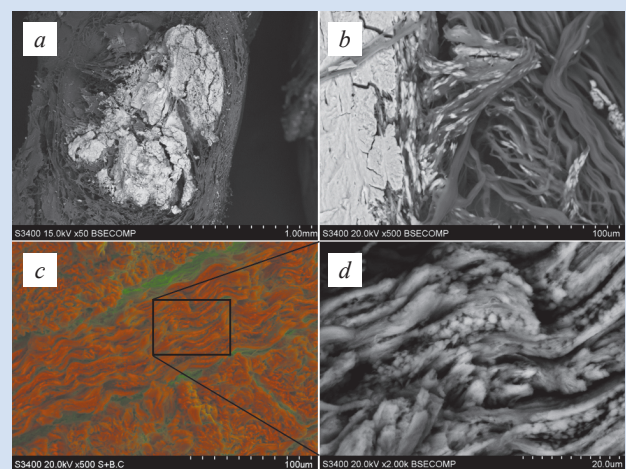


Рисунок 1. Внутренняя кальцификация: *a* – крупный кальцификат в створке нативного аортального клапана; *b* – коллагеновые волокна, окружающие крупный кальцификат, с признаками начала кальцификации («ЮниЛайн» в митральной позиции); *c, d* – кальцинированные коллагеновые волокна с сохраненной извитостью («ЮниЛайн» в аортальной позиции). Кристаллы фосфата кальция, как более электронно-плотный материал, являются более яркими (на цветном имидже – оранжевый) относительно биологического матрикса (на цветном имидже – зеленый)

Figure 1. Internal calcification: *a*) a large calcification in the leaflet of the native aortic valve; *b*) collagen fibers surrounding a large calcification with evident signs of the onset of mineralization (mitral UniLine valve); *c*) and *d*) calcified collagen fibers with preserved tortuosity (aortic UniLine valve). Calcium phosphate crystals being a more electronically dense material are brighter (orange) than the biological matrix (green)

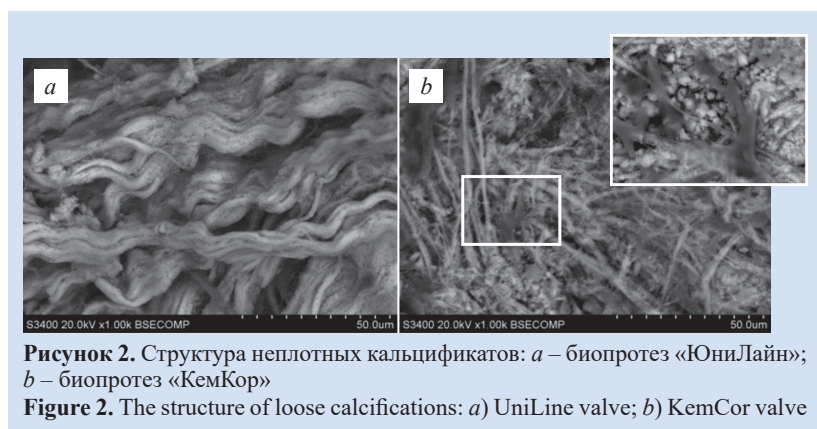


Рисунок 2. Структура неплотных кальцификатов: *a* – биопротез «ЮниЛайн»; *b* – биопротез «КемКор»

Figure 2. The structure of loose calcifications: *a*) UniLine valve; *b*) KemCor valve

и 1,82 (1,81–1,88; min – 1,71; max – 2,06) соответственно. Достоверных различий по значению соотношения Ca/P между группами образцов не обнаружено ($p > 0,05$).

Обсуждение

Согласно данным литературы, расположение кальциевых депозитов в тканях биопротезов, стабилизированных глутаровым альдегидом [13], сопоставимо с таковым в эпоксиобработанных

биопротезах, полученных в настоящем исследовании. Главной минеральной составляющей кальцификатов нативных клапанов сердца и биопротезов выступает гидроксилатит (ГАП, $C_{10}(PO_4)_6(OH)_2$). Последний является основным компонентом костного матрикса, где зачастую имеет соотношение Ca/P 1,67 [14]. В составе кости ГАП образует композит с коллагеном I типа – основой формирования костной ткани [15], который помимо этого преобладает среди волокнистых компонентов створок АК, а также ткани свиных клапанов и ксеноперикарда, используемых для производства биопротезов [16, 17]. В настоящем исследовании отмечен широкий спектр кальцификатов различной морфологии с соотношением Ca/P от 1,48 до 2,1, что указывает на присутствие ряда предшественников и/или кальций-дефицитного нестехиометрического ГАП [18, 19]. Также разброс данных показателей может быть связан с неравномерным распределением в пределах биологического матрикса коллагеновых и эластических волокон, обладающих различной активностью по отношению к минерализации [18].

Полученные в настоящем исследовании EDX-спектры сопоставимы со спектрами стандартного кристаллического ГАП [13], а также данными ранее проведенных исследований нативных АК [20–22] и стабилизированных глутаровым альдегидом биопротезов [13]. Не отмечено присутствие таких предшественников ГАП, как октакальцийфосфат ($Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$) и дикальцийфосфат дигидрат ($CaHPO_4 \cdot 2H_2O$) с соотношением Ca/P 1,33 и 1,0 соответственно. Также не обнаружен Si, который участвует в физиологической костной минерализации [13], что косвенно указывает на дистрофический тип кальцификации изученных образцов. Кроме Ca и P в составе кальцификатов идентифицированы Mg и Na, которые могут заменять кальций в кристаллической решетке ГАП. Как известно, на ранних стадиях кальцификации Mg стабилизирует аморфный фосфат кальция [13]. Присутствие композитов с более высоким, чем у кристаллического

ГАП, содержанием кальция также можно объяснить наличием в его структуре CO_3^{2-} , однако для идентификации данного домена необходимы дополнительные исследования с использованием метода инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье.

Различий в составе кальцификатов, сформированных в створках АК и биопротезов из аортальной и митральной позиций, не выявлено. Основные отличия кальцификатов заключались в их морфологии,

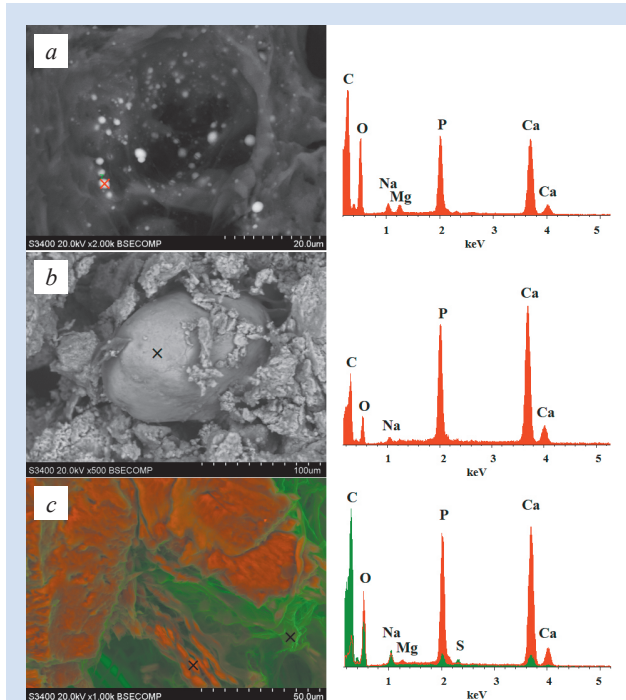


Рисунок 4. Кальцинированные створки исследуемого материала: *a* – сферические кальцификаты в ткани аортального клапана; *b*, *c* – кальцификаты в биоматериале протезов «ЮниЛайн», эксплантированных по причине дисфункции из аортальной и митральной позиций соответственно. Оранжевый цвет идентифицирует минерал с высокой электронной плотностью, зеленый – органические компоненты биоткани

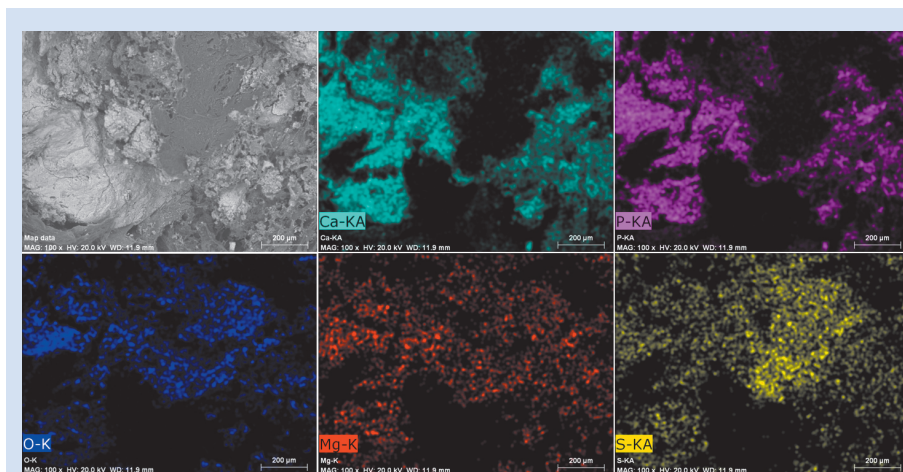


Рисунок 3. Карта распределения Ca, P, O, Mg и S в пределах крупного кальцификата

Figure 3. The distribution of Ca, P, O, Mg, and S within a large calcification

что, вероятнее всего, связано со структурными особенностями матрикса, в котором они сформированы. В изученных створках АК и ксеноаортальных биопротезов «КемКор» кальцификация присутствовала преимущественно в рыхлом спонгиозном слое, при этом кальцификаты имели более рыхлую структуру в сравнении с таковыми в перикардиальных биопротезах. Также помимо кальцификации коллагеновых и эластических волокон в створках АК и ксеноаортальных биопротезов «КемКор» наблюдали многочисленные мелкие кальцификаты в межфибрилярном пространстве. В то же время в створках перикардиального протеза «ЮниЛайн» независимо от позиции имплантации кальцификации в основном был подвержен коллаген, внутри и на поверхности которого определены фосфаты кальция. В данных протезах отмечены более плотные пластинчатые кальцификаты. Важно понимать, что присутствие в составе крупных кальцификатов нескольких электронно-плотных областей, указывающих на более зрелые минерализованные структуры, а также участков некальцинированного матрикса, сигнализирующих о наличии S, свидетельствует о формировании кальциевых конгломератов за счет роста нескольких более мелких кальцификатов, образовавшихся независимо друг от друга.

Кальцинирующий аортальный стеноз представляет собой сложный многоступенчатый процесс, включающий разрушение эндотелиального слоя АК и накопление липидов, миграцию иммунных клеток и высвобождение провоспалительных медиаторов, активацию резидентных клапанных фибробластов и их остео- и миофибробластовую дифференцировку, что в конечном итоге приводит к накоплению фиброзной ткани и ее последующей минерализации [3]. Важно отметить, что кальцификация тканей АК может происходить двумя путями: посредством дистрофической минерализации, не требующей участия остеобластов и/или остеобластоподобных клеток, и через активное костное ремоделирование, контролируемое данными клетками [12]. При этом АК зачастую кальцинируются пассивно, тогда как оссификация, вероятно, является редким явлением. Показано, что только лишь в 13% стенозированных АК присутствует костная метаплазия [23]. Поскольку используемая при изготовлении биопротезов «ЮниЛайн» и «КемКор» технология консервации биологического материала диглицидиловым эфиром этиленгликоля не подразумевает децеллюляризацию матрикса, протезный материал данных изделий имеет клеточный дебрис в виде ядер и фрагментов мембран [24]. Примечательно, что после эксплантации биопротезов клетки донора в толще биоматериала, как правило, не идентифицированы, что, вероятно, связано с их минерализацией и/или разрушением и вымыванием в процессе функционирования изделия. Таким

образом, предполагается, что лишённые жизнеспособных клеток, а следовательно, и регуляторов кальциевого обмена биопротезы могут кальцинироваться исключительно через пассивные механизмы, причем минерализацию протезной биоткани, как считают, провоцируют прежде всего фосфолипиды, присутствующие в составе мертвых клеток донора [11]. Полученные в настоящем исследовании данные элементного состава кальцификатов косвенно указывают на то, что минерализация изученных образцов носила дистрофический характер. Доказательств остеогенной минерализации биопротезов в литературе почти не представлено, однако в недавней работе продемонстрировано присутствие в тканях стабилизированных глутаровым альдегидом биопротезов живых остеобластоподобных клеток, продуцирующих остеокальцин, остеокальцин, костный сиалопротеин и щелочную фосфатазу [25, 26]. Авторы предположили, что клетки реципиента могут ускорять процессы кальцификации протезной биоткани [25], однако указанное наблюдение требует изучения.

Для выявления возможного вклада остеогенных механизмов кальцификации тканей эпоксиобработанных биопротезов, а также нативных АК требуется расширение выборки образцов и привлечение дополнительных методов исследования, таких как иммуногистохимия и иммунофлуоресценция.

Заключение

Кальциевые депозиты, выявленные в ткани эпоксиобработанных биопротезов клапанов сердца и АК человека, по-видимому, образованы посредством дистрофической минерализации. Морфология кальцификатов в биопротезах зависит от типа биологической ткани, в которой они сформированы. Не выявлена взаимосвязь морфологической структуры кальцификатов, обнаруженных в створках биопротезов, и позиции имплантации устройств. Элементный состав минеральных отложений не различался во всех изученных образцах.

Конфликт интересов

Т.В. Глушкова заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Е. Костюнин заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Работа выполнена в рамках комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН по фундаментальной теме НИИ КПССЗ № 0546-2015-0011 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

Информация об авторах

Глушкова Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук старший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-4890-0393

Костюнин Александр Евгеньевич, кандидат биологических наук научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-6099-0315

Author Information Form

Glushkova Tatyana V., PhD, senior researcher at the Laboratory of New Biomaterials, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution «Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases», Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-4890-0393

Kostyunin Alexander E., PhD, researcher at the Laboratory of New Biomaterials, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution «Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases», Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-6099-0315

Вклад авторов в статью

ГТВ – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение, анализ и интерпретация данных, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

КАЕ – анализ и интерпретация данных, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

Author Contribution Statement

GTV – contribution to the concept and design of the study, data collection, analysis and interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

KAE – data analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Baumgartner H., Falk V., Bax J.J., De Bonis M., Hamm C., Holm P.J., Jung B., Lancellotti P., Lansac E., Rodriguez Muñoz D., Rosenhek R., Sjögren J., Tornos Mas P., Vahanian A., Walther T., Wendler O., Windecker S., Zamorano J.L., ESC Scientific Document Group. 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur. Heart J.* 2017; 38(36):2739-2791. doi:10.1093/eurheartj/ehx391.
- Nishimura R.A., Otto C.M., Bonow R.O., Carabello B.A., Erwin J.P. 3rd., Fleisher L.A., Jneid H., Mack M.J., McLeod C.J., O'Gara P.T., Rigolin V.H., Sundt T.M. 3rd., Thompson A. 2017 AHA/ACC focused update of the 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology American Heart Association task force on clinical practice guidelines. *Circulation.* 2017; 135(25):e1159-e1195. doi:10.1161/CIR.0000000000000503.
- Lindman B.R., Clavel M.A., Mathieu P., Jung B., Lancellotti P., Otto C.M., Pibarot P. Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2016; 2:16006. doi:10.1038/nrdp.2016.6.
- Harb S.C., Griffin B.P. Mitral valve disease: a comprehensive review. *Curr Cardiol Rep.* 2017; 19(8):73. doi:10.1007/s11886-017-0883-5.
- Fiedler A.G., Tolis G.Jr. Surgical treatment of valvular heart disease: overview of mechanical and tissue prostheses, advantages, disadvantages, and implications for clinical use. *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.* 2018; 20(1):7. doi:10.1007/s11936-018-0601-7.
- Pibarot P., Dumesnil J.G. Prosthetic heart valves: selection of the optimal prosthesis and long-term management. *Circulation.* 2009; 119(7):1034-1048. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.778886.
- Li K.Y.C. Bioprosthetic heart valves: upgrading a 50-year old technology. *Front. Cardiovasc. Med.* 2019; 6:47. doi:10.3389/fcvm.2019.00047.
- Capodanno D., Petronio A.S., Prendergast B., Eltchaninoff H., Vahanian A., Modine T., Lancellotti P., Sondergaard L., Ludman P.F., Tamburino C., Piazza N., Hancock J., Mehilli J., Byrne R.A., Baumbach A., Kappetein A.P., Windecker S., Bax J., Haude M. 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; 38(45):3382-3390. doi:10.1093/eurheartj/ehx303.
- Dvir D., Bourguignon T., Otto C.M., Hahn R.T., Rosenhek R., Webb J.G., Treede H., Sarano M.E., Feldman T., Wijeyundera H.C., Topilsky Y., Aupart M., Reardon M.J., Mackensen G.B., Szeto W.Y., Kornowski R., Gammie J.S., Yoganathan A.P., Arbel Y., Borger M.A., Simonato M., Reisman M., Makkar R.R., Abizaid A., McCabe J.M., Dahle G., Aldea G.S., Leipsic J., Pibarot P., Moat N.E., Mack M.J., Kappetein A.P., Leon M.B.; VIVID (Valve in Valve International Data) Investigators. Standardized definition of structural valve degeneration for surgical and transcatheter bioprosthetic aortic valves. *Circulation.* 2018; 137(4):388-399. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030729.
- Bonetti A., Marchini M., Ortolani F. Ectopic mineralization in heart valves: new insights from in vivo and in vitro procalcific models and promising perspectives on noncalcifiable bioengineered valves. *J. Thorac. Dis.* 2019; 11(5):2126-2143. doi:10.21037/jtd.2019.04.78.
- Schoen F.J., Levy R.J. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *Ann. Thorac. Surg.* 2005; 79(3):1072-1080. doi:10.1016/j.athoracsur.2004.06.033.
- Chen J., Peacock J.R., Branch J., David Merryman W. Biophysical analysis of dystrophic and osteogenic models of valvular calcification. *J. Biomech. Eng.* 2015; 137(2):020903. doi:10.1115/1.4029115.
- Delogne C., Lawford P.V., Habesch S.M., Carolan V.A. Characterization of the calcification of cardiac valve bioprostheses by environmental scanning electron microscopy and vibrational spectroscopy. *Journal of Microscopy* 2007; 228(1):62-77. doi:10.1111/j.1365-2818.2007.01824.x.

14. Chen J., Peacock J.R., Branch J., David Merryman W. Biophysical analysis of dystrophic and osteogenic models of valvular calcification. *J. Biomech. Eng.* 2015; 137(2):020903. doi:10.1115/1.4029115.
15. Wang Y., Azaïs T., Robin M., Vallee A., Catania C., Legriel P., Pehau-Arnaudet G., Babonneau F., Giraud-Guille M.M., Nassif N. The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite. *Nat Mater.* 2012; 11(8):724-733. doi:10.1038/nmat3362.
16. Aguiari P., Fiorese M., Iop L., Gerosa G., Bagno A. Mechanical testing of pericardium for manufacturing prosthetic heart valves. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 2016; 22(1):72-84. doi:10.1093/icvts/ivv282.
17. Soares J.S., Feaver K.R., Zhang W., Kamensky D., Aggarwal A., Sacks M.S. Biomechanical behavior of bioprosthetic heart valve heterograft tissues: characterization, simulation, and performance. *Cardiovasc. Eng. Technol.* 2016; 7(4):309-351. doi:10.1007/s13239-016-0276-8.
18. Richards J.M., Kunitake J.A.M.R., Hunt H.B., Wnorowski A.N., Lin D.W., Boskey A.L., Donnelly E., Estroff L.A., Butcher J.T. Crystallinity of hydroxyapatite drives myofibroblastic activation and calcification in aortic valves. *Acta Biomater.* 2018; 71:24-36. doi:10.1016/j.actbio.2018.02.024.
19. Weska R.F., Aimoli C.G., Nogueira G.M., Leirner A.A., Maizato M.J., Higa O.Z., Polakievicz B., Pitombo R.N., Beppu M.M. Natural and prosthetic heart valve calcification: morphology and chemical composition characterization. *Artif. Organs.* 2010; 34(4):311-318. doi:10.1111/j.1525-1594.2009.00858.x.
20. Cottignoli V., Cavarretta E., Salvador L., Valfre C., Maras A. Morphological and chemical study of pathological deposits in human aortic and mitral valve stenosis: a biomineralogical contribution. *Patholog. Res. Int.* 2015; 2015:342984. doi:10.1155/2015/342984.
21. Bertazzo S., Gentleman E. Aortic valve calcification: a bone of contention. *Eur. Heart J.* 2017; 38(16):1189-1193. doi:10.1093/eurheartj/ehw071.
22. Bertazzo S., Gentleman E., Cloyd K.L., Chester A.H., Yacoub M.H., Stevens M.M. Nano-analytical electron microscopy reveals fundamental insights into human cardiovascular tissue calcification. *Nat. Mater.* 2013; 12(6):576-583. doi:10.1038/nmat3627.
23. Mohler E.R. 3rd., Gannon F., Reynolds C., Zimmerman R., Keane M.G., Kaplan F.S. Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation.* 2001; 103(11):1522-1528. doi:10.1161/01.cir.103.11.1522.
24. Ovcharenko EA, KU Klyshnikov, AE Yuzhalin, GV Savrasov, TV Glushkova, GU Vasukov, DV Nushtaev, YuA Kudryavtsev, LS Barbarash. Comparison of xenopericardial patches of different origin and type of fixation implemented for TAVI. *International Journal of Biomedical Engineering and Technology.* 2017; 25(1):44-59. doi: 10.1504/IJBET.2017.086551
25. Барбараш Л.С., Рогулина Н.В., Рутковская Н.В., Овчаренко Е.А. Механизмы развития дисфункций биологических протезов клапанов сердца. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2018;7(2):10-24. <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2018-7-2-10-24>
26. Lu F., Wu H., Bai Y., Gong D., Xia C., Li Q., Lu F., Xu Z. Evidence of osteogenic regulation in calcific porcine aortic valves. *Heart Surg Forum.* 2018; 21(5):E375-E381. doi:10.1532/hsf.2033.

REFERENCES

1. Baumgartner H., Falk V., Bax J.J., De Bonis M., Hamm C., Holm P.J., Jung B., Lancellotti P., Lansac E., Rodriguez Muñoz D., Rosenhek R., Sjögren J., Tornos Mas P., Vahanian A., Walther T., Wendler O., Windecker S., Zamorano J.L., ESC Scientific Document Group. 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur. Heart J.* 2017; 38(36):2739-2791. doi:10.1093/eurheartj/ehx391.
2. Nishimura R.A., Otto C.M., Bonow R.O., Carabello B.A., Erwin J.P. 3rd., Fleisher L.A., Jneid H., Mack M.J., McLeod C.J., O'Gara P.T., Rigolin V.H., Sundt T.M. 3rd., Thompson A. 2017 AHA/ACC focused update of the 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology American Heart Association task force on clinical practice guidelines. *Circulation.* 2017, 135(25):e1159-e1195. doi:10.1161/CIR.0000000000000503.
3. Lindman B.R., Clavel M.A., Mathieu P., Jung B., Lancellotti P., Otto C.M., Pibarot P. Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2016; 2:16006. doi:10.1038/nrdp.2016.6.
4. Harb S.C., Griffin B.P. Mitral valve disease: a comprehensive review. *Curr Cardiol Rep.* 2017; 19(8):73. doi:10.1007/s11886-017-0883-5.
5. Fiedler A.G., Tolis G.Jr. Surgical treatment of valvular heart disease: overview of mechanical and tissue prostheses, advantages, disadvantages, and implications for clinical use. *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.* 2018; 20(1):7. doi:10.1007/s11936-018-0601-7.
6. Pibarot P., Dumesnil J.G. Prosthetic heart valves: selection of the optimal prosthesis and long-term management. *Circulation.* 2009; 119(7):1034-1048. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.778886.
7. Li K.Y.C. Bioprosthetic heart valves: upgrading a 50-year old technology. *Front. Cardiovasc. Med.* 2019; 6:47. doi:10.3389/fcvm.2019.00047.
8. Capodanno D., Petronio A.S., Prendergast B., Eltchaninoff H., Vahanian A., Modine T., Lancellotti P., Sondergaard L., Ludman P.F., Tamburino C., Piazza N., Hancock J., Mehilli J., Byrne R.A., Baumbach A., Kappetein A.P., Windecker S., Bax J., Haude M. 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; 38(45):3382-3390. doi:10.1093/eurheartj/ehx303.
9. Dvir D., Bourguignon T., Otto C.M., Hahn R.T., Rosenhek R., Webb J.G., Treede H., Sarano M.E., Feldman T., Wijeyesundara H.C., Topilsky Y., Aupart M., Reardon M.J., Mackensen G.B., Szeto W.Y., Kornowski R., Gammie J.S., Yoganathan A.P., Arbel Y., Borger M.A., Simonato M., Reisman M., Makkar R.R., Abizaid A., McCabe J.M., Dahle G., Aldea G.S., Leipsic J., Pibarot P., Moat N.E., Mack M.J., Kappetein A.P., Leon M.B.; VIVID (Valve in Valve International Data) Investigators. Standardized definition of structural valve degeneration for surgical and transcatheter bioprosthetic aortic valves. *Circulation.* 2018; 137(4):388-399. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030729.
10. Bonetti A., Marchini M., Ortolani F. Ectopic mineralization in heart valves: new insights from in vivo and in vitro procalcific models and promising perspectives on noncalcifiable bioengineered valves. *J. Thorac. Dis.* 2019; 11(5):2126-2143. doi:10.21037/jtd.2019.04.78.
11. Schoen F.J., Levy R.J. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *Ann. Thorac. Surg.* 2005; 79(3):1072-1080. doi:10.1016/j.athoracsur.2004.06.033.
12. Chen J., Peacock J.R., Branch J., David Merryman W. Biophysical analysis of dystrophic and osteogenic models of valvular calcification. *J. Biomech. Eng.* 2015; 137(2):020903. doi:10.1115/1.4029115.

13. Delogne C., Lawford P.V., Habesch S.M., Carolan V.A. Characterization of the calcification of cardiac valve bioprostheses by environmental scanning electron microscopy and vibrational spectroscopy. *Journal of Microscopy* 2007; 228(1):62-77. doi:10.1111/j.1365-2818.2007.01824.x.
14. Chen J., Peacock J.R., Branch J., David Merryman W. Biophysical analysis of dystrophic and osteogenic models of valvular calcification. *J. Biomech. Eng.* 2015; 137(2):020903. doi:10.1115/1.4029115.
15. Wang Y., Azaïs T., Robin M., Vallee A., Catania C., Legriel P., Pehau-Arnaudet G., Babonneau F., Giraud-Guille M.M., Nassif N. The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite. *Nat Mater.* 2012; 11(8):724-733. doi:10.1038/nmat3362.
16. Aguiari P., Fiorese M., Iop L., Gerosa G., Bagno A. Mechanical testing of pericardium for manufacturing prosthetic heart valves. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 2016; 22(1):72-84. doi:10.1093/icvts/ivv282.
17. Soares J.S., Feaver K.R., Zhang W., Kamensky D., Aggarwal A., Sacks M.S. Biomechanical behavior of bioprosthetic heart valve heterograft tissues: characterization, simulation, and performance. *Cardiovasc. Eng. Technol.* 2016; 7(4):309-351. doi:10.1007/s13239-016-0276-8.
18. Richards J.M., Kunitake J.A.M.R., Hunt H.B., Wnorowski A.N., Lin D.W., Boskey A.L., Donnelly E., Estroff L.A., Butcher J.T. Crystallinity of hydroxyapatite drives myofibroblastic activation and calcification in aortic valves. *Acta Biomater.* 2018; 71:24-36. doi:10.1016/j.actbio.2018.02.024.
19. Weska R.F., Aimoli C.G., Nogueira G.M., Leirner A.A., Maizato M.J., Higa O.Z., Polakievicz B., Pitombo R.N., Beppu M.M. Natural and prosthetic heart valve calcification: morphology and chemical composition characterization. *Artif. Organs.* 2010; 34(4):311-318. doi:10.1111/j.1525-1594.2009.00858.x.
20. Cottignoli V., Cavarretta E., Salvador L., Valfre C., Maras A. Morphological and chemical study of pathological deposits in human aortic and mitral valve stenosis: a biomineralogical contribution. *Patholog. Res. Int.* 2015; 2015:342984. doi:10.1155/2015/342984.
21. Bertazzo S., Gentleman E. Aortic valve calcification: a bone of contention. *Eur. Heart J.* 2017; 38(16):1189-1193. doi:10.1093/eurheartj/ehw071.
22. Bertazzo S., Gentleman E., Cloyd K.L., Chester A.H., Yacoub M.H., Stevens M.M. Nano-analytical electron microscopy reveals fundamental insights into human cardiovascular tissue calcification. *Nat. Mater.* 2013; 12(6):576-583. doi:10.1038/nmat3627.
23. Mohler E.R. 3rd., Gannon F., Reynolds C., Zimmerman R., Keane M.G., Kaplan F.S. Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation.* 2001; 103(11):1522-1528. doi:10.1161/01.cir.103.11.1522.
24. Ovcharenko EA, KU Klyshnikov, AE Yuzhalin, GV Savrasov, TV Glushkova, GU Vasukov, DV Nushtaev, YuA Kudryavtsev, LS Barbarash. Comparison of xenopericardial patches of different origin and type of fixation implemented for TAVI. *International Journal of Biomedical Engineering and Technology.* 2017; 25(1):44-59. doi: 10.1504/IJBET.2017.086551
25. Барбараш Л.С., Рогулина Н.В., Рутковская Н.В., Овчаренко Е.А. Механизмы развития дисфункций биологических протезов клапанов сердца. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2018;7(2):10-24. [Barbarash L.S., Rogulina N.V., Rutkovskaya N.V., Ovcharenko E.A. Mechanisms underlying bioprosthetic heart valve dysfunctions. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2018;7(2):10-24. (In Russian)] <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2018-7-2-10-24>
26. Lu F., Wu H., Bai Y., Gong D., Xia C., Li Q., Lu F., Xu Z. Evidence of osteogenic regulation in calcific porcine aortic valves. *Heart Surg Forum.* 2018; 21(5):E375-E381. doi:10.1532/hsf.2033.

Для цитирования: Глушкова Т.В., Костюнин А.Е. Структура кальцификатов в биопротезах клапанов сердца, консервированных диглицидиловым эфиром этиленгликоля. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2021;10(2): 16-24. DOI: 10.17802/2306-1278-2021-10-2-16-24

To cite: Glushkova T.V., Kostyunin A.E. Calcification of bioprosthetic heart valves treated with ethylene glycol diglycidyl ether. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2021;10(2): 16-24. DOI: 10.17802/2306-1278-2021-10-2-16-24
