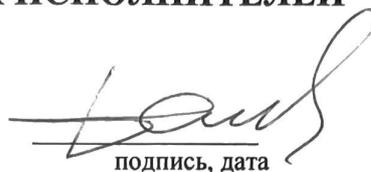




## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

### Руководитель темы:

Академик РАН



подпись, дата

Л.С. Барбараш  
(Введение, заключение)

### Ответственные исполнители:

Зав. отделом,

докт. биол. наук

Зав. лабораторией,

докт. мед. наук

Зав. лабораторией,

докт. мед. наук

Зав. лабораторией,

канд. мед. наук

Зав. лабораторией,

канд. техн. наук

Зав. лабораторией,

канд. мед. наук



подпись, дата

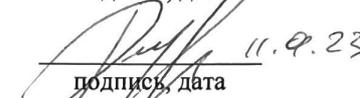
Ю.А. Кудрявцева  
(раздел 2.2, введение,  
заключение)

Л.В. Антонова  
(раздел 2.4, 2.5)



подпись, дата

А.В. Евтушенко  
(раздел 1.1, 1.2)



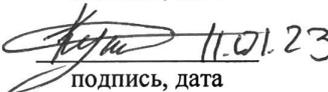
подпись, дата

А.В. Понасенко  
(раздел 1.5, 1.6, 1.7)



подпись, дата

Е.А. Овчаренко  
(раздел 1.4, 2.1, 2.2, 2.3)

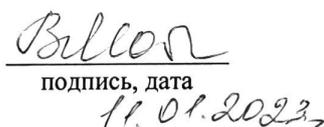


подпись, дата

А.Г. Кутихин  
(раздел 3)

### Исполнители темы:

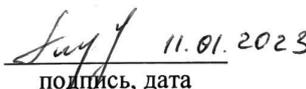
С.н.с. лаборатории клеточных технологий, канд. мед. наук



подпись, дата

В.Г. Матвеева  
(раздел 2.4)

С.н.с. лаборатории новых биоматериалов, канд. биол. наук



подпись, дата

Т.В. Глушкова  
(раздел 2.1)

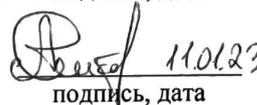
С.н.с. лаборатории геномной медицины, канд. биол. наук



подпись, дата

М.Ю. Сеницкий  
(раздел 1.6, 1.8)

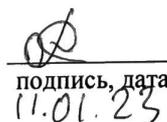
С.н.с. лаборатории пороков сердца, канд. мед. наук



подпись, дата

А.Н. Стасев  
(раздел 1.2, 1.4)

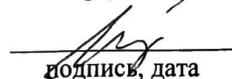
С.н.с. лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины, канд. биол. наук



подпись, дата

Р.А. Мухамадияров  
(раздел 3.2)

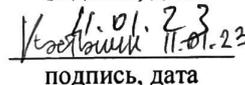
В.н.с. лаборатории пороков сердца, докт. мед. наук



подпись, дата

А.В. Шабалдин  
(раздел 1.2)

Н.с. лаборатории новых биоматериалов, канд. биол. наук



подпись, дата

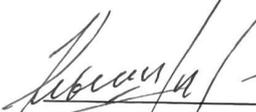
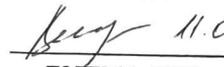
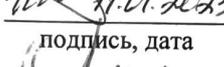
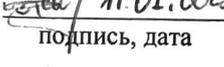
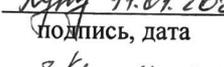
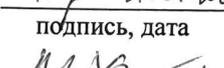
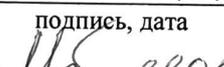
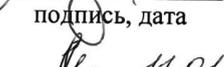
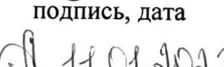
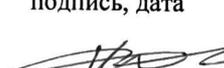
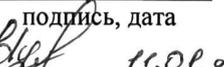
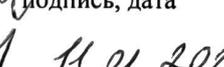
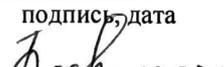
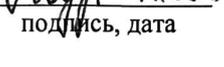
А.Е. Костюнин  
(раздел 2.1)

Н.с. лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины, канд. биол. наук



подпись, дата

Д.К. Шишкова  
(раздел 3.1)

Н.с. лаборатории <b>НОВЫХ</b> биоматериалов, канд. биол. наук	 подпись, дата 11.01.2023	К.Ю. Клышников (раздел 1.4; 2.2)
Н.с. лаборатории клеточных технологий, канд. биол. наук	 подпись, дата 11.01.2023	Е.А. Великанова (раздел 2.4.4, 2.5)
Н.с. лаборатории клеточных технологий, канд. биол. наук	 подпись, дата 11.01.2023	Е.А. Сеноносова (раздел 2.4.2)
Н.с. лаборатории клеточных технологий, канд. биол. наук	 подпись, дата	В.В. Севостьянова (раздел 2.4.1)
Н.с. лаборатории геномной медицины, канд. биол. наук	 подпись, дата 11.01.2023	А.В. Синицкая (раздел 1.5)
Н.с. лаборатории пороков сердца	 подпись, дата 11.01.2023	Д.И. Лебедев (раздел 1.1, 1.3)
М.н.с. лаборатории геномной медицины, канд. биол. наук	 подпись, дата 11.01.2023	О.Н. Хрячкова (раздел 1.6)
М.н.с. лаборатории геномной медицины	 подпись, дата 11.01.2023	М.А. Асанов (раздел 1.8)
М.н.с. лаборатории геномной медицины	 подпись, дата 11.01.2023	М.В. Хуторная (раздел 1.6)
М.н.с. лаборатории клеточных технологий	 подпись, дата 11.01.2023	Е.О. Кривкина (раздел 2.4.3, 2.5)
М.н.с. лаборатории клеточных технологий	 подпись, дата 11.01.2023	М.Ю. Ханова (раздел 2.4.1, 2.4.2, 2.4.4.)
М.н.с. лаборатории клеточных технологий	 подпись, дата 11.01.2023	А.В. Миронов (раздел 2.5)
М.н.с. лаборатории <b>НОВЫХ</b> биоматериалов	 подпись, дата 11.01.2023	М.А. Резвова (раздел 2.3)
М.н.с. лаборатории <b>НОВЫХ</b> биоматериалов	 подпись, дата 11.01.2023	Т.Н. Акентьева (раздел 2.1)
М.н.с. лаборатории <b>НОВЫХ</b> биоматериалов	 подпись, дата 11.01.2023	П.С. Онищенко (раздел 2.2)
Зав. виварием	 подпись, дата 11.01.2023	Дюжев В.И. (раздел 2.5)
Зоолаборант вивария	 подпись, дата 11.01.2023	Краснобаева Ю.С. (раздел 2.5)
Инженер-исследователь лаборатории <b>НОВЫХ</b> биоматериалов	 подпись, дата 11.01.2023	Пузиков Е.П. (раздел 2.2)
Лаборант-исследователь лаборатории геномной медицины	 подпись, дата 11.01.2023	Поддубняк А.О. (раздел 1.6, 1.7)

## РЕФЕРАТ

Отчет 138 с., 1 кн., 33 рис., 21 таб., 77 источн., 1 прил.

**Ключевые слова:** аннулопластика митрального клапана, аортальный клапан, биоактивные молекулы, биodeградируемые сосудистые заплаты, биологические протезы клапанов сердца, гелеобразование, гидрогели, glutаровый альдегид, дегенеративные заболевания митрального клапана, деформация, дисфункции протеза клапана сердца, длительно персистирующая форма фибрилляции предсердий, иммуногенность, иммунное отторжение, кальцификация, легочная гипертензия, MAZE IV, метод конечных элементов, митральная недостаточность, модифицирующее покрытие напряжение по Мизесу, опорное кольцо, поливиниловый спирт, полимеризация, полиморфизм генов, полукаркасный биопротез ТиАра, приобретенные пороки сердца, процедура «клапан-в-клапан», реоперация, сосудистые протезы, тетраборат натрия, тромбин, фибрин, физико-механическое испытание, N-гликолилнейраминная кислота, XIII фактор, RGD-пептиды.

### **Объекты исследования:**

- аортальные клапаны человека, удалённые при первичном протезировании по причине кальцинирующего аортального стеноза;
- белок фибрин;
- биodeградируемые сосудистые заплаты;
- биологические протезы клапанов сердца различных моделей;
- биопротезы клапана сердца, удаленные в ходе операции по причине дисфункции;
- гидрогели поливинилового спирта, полученные методами химического и физического структурирования.
- гидрогели поливинилового спирта, полученные методом замораживания/оттаивания;

- ДНК здоровых людей и пациентов, страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями;
- интактный эпоксиобработанный бычий перикард;
- кольца для аннулопластики митрального клапана, коммерческие, различных моделей;
- кольца для аннулопластики митрального клапана, экспериментальные;
- культуры эукариотических клеток различных линий, включая первичные эндотелиальные клетки коронарной и внутренней грудной артерии человека, первичные эндотелиальные клетки пупочной вены человека, первичные гладкомышечные клетки коронарной артерии человека и иммортализованные эндотелиальные клетки пупочной вены человека;
- лабораторные животные (овцы);
- линейный поливиниловый спирт;
- нативный бычий перикард;
- образцы крови (плазма, сыворотка, различные клеточные популяции);
- пациенты с имплантированными протезами клапана сердца в митральную позицию;
- пациенты с приобретённым пороком митрального клапана и/или с легочной гипертензией.
- пациенты с фибрилляцией предсердий
- периферическая кровь пациентов с ССЗ;
- полимерные материалы;
- трехмерные модели коронарного стента;
- эндогенный и экзогенный тромбин;

**Цель исследования:** Изучить молекулярные, клеточные и биомеханические механизмы патогенеза сердечно-сосудистой системы с целью разработки новых способов их диагностики и лечения заболеваний сердца и сосудов на основе современных клеточных технологий и

трансляции результатов в разработку, доклиническое и клиническое тестирование новых высокотехнологичных прототипов тканеинженерных имплантатов на основе биосовместимых композитных биоматериалов для замещения пораженных элементов сердечно-сосудистой системы и разработанных на основании компьютерного моделирования и глубокого машинного обучения медицинских изделий для малоинвазивной сердечно-сосудистой хирургии.

### **Задачи:**

1. Модификация фенотипа легочной гипертензии II группы после хирургической коррекции митральных пороков.
2. Отработать технологию применения сверхэластичных опорных колец для митральной позиции.
3. Модификация операции "Лабиринт 4" при лечении длительно персистирующей фибрилляции предсердий на «открытом» сердце.
4. Сравнительный анализ ближайших первичной имплантации каркасного ксеноперикардального биопротеза в митральную позицию с процедурой "клапан-в-клапан» при помощи баллон-расширяемого бесшовного биопротеза.
5. Определить присутствие ксеноантигенов в биоматериале, консервированном диглицидиловым эфиром этиленгликоля.
6. Разработать концепт коронарного стент-графта с биодеградируемой оболочкой.
7. Оптимизировать условия синтеза биосовместимых гидрогелей на основе поливинилового спирта.
8. Поиск новых биосовместимых полимеров для создания клеточных конструкторов на их основе.
9. В экспериментах с использованием различных клеточных линий оценить биосовместимость фибринового покрытия в сравнительном аспекте с другими подходами модифицирования полимерной поверхности.

10. Разработать окончательный протокол получения фибрина с целью дальнейшего использования в качестве модифицирующего аутологичного покрытия поверхности биodeградируемых сосудистых протезов малого диаметра.

11. Установить отдельные геномные и постгеномные механизмы приобретенных патологий нативных клапанов сердца.

12. Завершить разработку патофизиологического обоснования эффективности артериальных кондуитов для коронарного шунтирования с идентификацией ответственных за поддержание послеоперационного гомеостаза механизмов, включая роль паракринных эффектов эндотелиальных клеток коронарной артерии и кондуита.

13. Определить роль различных типов сосудов микроциркуляторного русла (артериолы, венулы и капилляры) в формировании неоинтимы и развитии адвентициального и периваскулярного воспаления.

#### **Методы исследования:**

1. Ультрацентрифугирование (до 250,000 x g).
2. Гомогенизация тканей.
3. Выделение ДНК, РНК и белка.
4. Спектрофотометрия.
5. Гибридизация ДНК и РНК *in situ* (оценка хромосомных нарушений и измерение генной экспрессии в гистологических препаратах).
6. Качественная полимеразная цепная реакция с электрофоретической схемой детекции результата (определение генных полиморфизмов).
7. Количественная полимеразная цепная реакция с флуоресцентной схемой детекции результата в режиме реального времени (измерение генной экспрессии).
8. Капиллярное секвенирование последовательностей ДНК и РНК (длиной до 1000 нуклеотидов).

9. Вестерн-блоттинг/иммуноблоттинг (измерение экспрессии и оценка посттрансляционных модификаций белков).
10. Проточная цитометрия (иммунофенотипирование).
11. Иммуноферментный анализ (измерение концентрации белков в культуральной среде или биологических жидкостях).
12. Пробоподготовка тканей для микроскопического анализа (гистологическая проводка и резка, химическая обработка и напыление для сканирующей электронной микроскопии, заливка в эпоксидную смолу с шлифовкой и полировкой).
13. Рутинное гистологическое, иммуногистохимическое и иммунофлюоресцентное окрашивание.
14. Световая, фазово-контрастная, эпифлюоресцентная и конфокальная микроскопия.
15. Сканирующая электронная микроскопия с элементным анализом.
16. Культивирование эукариотических клеток, включая эндотелиальные и сосудистые гладкомышечные клетки, в том числе в условиях проточного биореактора.
17. Проведение операций по имплантации прототипов медицинских изделий и микрохирургических операций на лабораторных животных (мыши, крысы, овцы).
18. Изготовление полимерных сосудистых графтов и мембран, в том числе методом электроспиннинга.
19. Физико-механические испытания биоматериалов с использованием универсальной разрывной машины.
20. Гидродинамические испытания прототипов биопротезов клапанов сердца в стенде пульсирующего потока.
21. Численное моделирование методом конечных элементов.
22. Термическое криоструктурирование.

23. Проведение операций реимплантация протеза у пациентов с дисфункцией биопротеза в митральной позиции.

24. Проведение операций имплантация опорных колец у пациентов с трикуспидальной недостаточностью.

25. Проведение хирургической имплантации биопротеза у пациентов с приобретенным пороком аортального клапана.

#### **Использованная аппаратура:**

1. Ультрацентрифуга Optima MAX-XP (Beckman Coulter)
2. Гомогенизатор с адаптером охлаждения FastPrep-24 (MP Biomedicals)
3. Центрифуга с охлаждением для выделения РНК Microfuge 20R (Beckman Coulter)
4. Спектрофотометр для измерения концентраций веществ в микрообъемах NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific)
5. Система для автоматической денатурации и гибридизации нуклеиновых кислот in situ ThermoBrite (Abbott Molecular)
6. ПЦР-боксы UVC/T-M-AR (BioSan)
7. Амплификатор для проведения ПЦР Veriti (Applied Biosystems)
8. Система для геледокументации Gel Doc XR+ (Bio-Rad)
9. Амплификаторы для проведения ПЦР с флуоресцентной схемой детекции результата в режиме реального времени CFX96 Touch (Bio-Rad) и ViiA7 (Applied Biosystems)
10. Капиллярный секвенатор 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
11. Система для сухого переноса белка при блоттинге iBlot 2 (Invitrogen)
12. Система для гибридизации блотов iBind Flex (Invitrogen)
13. Цифровой сканер хемилюминесцентных блотов C-DiGit (LI-COR Biosciences)

14. Проточный цитометр CytoFLEX (Beckman Coulter)
15. Термошейкер для иммунопланшет Titramax 1000 (Heidolph)
16. Вошер для иммунопланшет Wellwash Versa (Thermo Scientific)
17. Микропланшетный спектрофотометр Multiskan Sky (Thermo Scientific)
18. Ротационный микротом Microm HM 325 (Thermo Scientific)
19. Полуавтоматические криотомы Microm HM 525 и NX50 (Thermo Scientific)
20. Прямой эпифлюоресцентный микроскоп AxioImager.A1 (Carl Zeiss)
21. Инвертированный эпифлюоресцентный микроскоп AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss)
22. Конфокальный микроскоп LSM 700 (Carl Zeiss)
23. Операционный микроскоп OPMI pico (Carl Zeiss)
24. Сканирующий электронный микроскоп Hitachi S-3400N (Hitachi) с модулем для проведения элементного анализа энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии XFlash 4010 (Bruker) и вакуумным постом для напыления EM ACE200 (Leica Microsystems)
25. Система для культивирования клеток в условиях потока ibidi Pump System Quad (Ibidi)
26. Анализатор биоимпеданса в реальном времени при культивировании клеток xCELLigence (ACEA Biosciences)
27. CO<sub>2</sub>-инкубаторы с кислородным редуктором для культивирования клеток MCO-18AIC (Sanyo)
28. Ламинарные боксы абактериальной воздушной среды для культивирования клеток (Lamsystems)
29. Гидродинамический стенд SD2001-1 (ViVidro Labs)
30. Стенд многоциклового испытания протезов клапанов сердца человека HiCycle (ViVidro Labs)

31. Универсальная машина для тестирования механических свойств с термокамерой (Zwick/Roell)
32. Шлифовально-полировальная машина для подготовки эпоксидных блоков к микроскопии TegraPol-11 (Struers)
33. Аппарат для электроспиннинга NANON-01A (MECC)
34. Аппарат для лиофильного высушивания FreeZone (Labconco)
35. Аппарат для обеспечения общей анестезии у лабораторных животных E-Z Anesthesia Complete System (E-Z Systems)
36. Автоматический биохимический анализатор Konelab 30i (Thermo Scientific)

### **Полученные результаты и научная новизна:**

Доказан факт влияния ритма фибрилляции предсердий на уровень исходного давления в легочной артерии; а также вклад таких факторов, как женский пол, III-IV функциональный класс хронической сердечной недостаточности и ожирение в отсутствие регресса ЛГ после коррекции порока у пациентов с ЛГ и ППС митрального клапана.

Использование для аннулопластики МК полужестких колец типа NeoRing при выполнении клапансохраняющих операций при дисплазии соединительной ткани является предпочтительным вариантом. Это доказано статистически значимыми различиями в сравниваемых группах. Показано, что в группе с аннулопластикой МК полужесткими кольцами типа NeoRing была ниже вероятность достижения комбинированной конечной точки, были низкие госпитальные и отдаленные показатели трансмитрального диастолического градиента и высокая степень обратного ремоделирования камер сердца.

Разработана модификация стандартной методики MAZE IV, которая позволяет достоверно снизить длительность искусственного кровообращения во время операции, упростить методику выполнения хирургического лечения фибрилляции предсердий на «открытом сердце», позволяет осуществить

эффективную электрическую изоляцию анатомических структур правого и левого предсердий, что позволяет достигнуть свободы от ФП у 92% пациентов, а также достоверно снизить шансы развития инцизионных тахикардий в послеоперационном периоде в 7,1 раза.

Произведена оценка влияния ритма фибрилляции предсердий на уровень исходного давления в легочной артерии, что позволит снизить бремя легочной гипертензии путем использования модифицированной методики Лабиринт 4. Также использование для анулопластики митрального клапана полужестких колец типа NeoRing при выполнении клапаносохраняющих операций при диспластическом поражении клапаном позволит более эффективно лечить пациентов с митральной недостаточностью, длительно персистирующей фибрилляцией предсердий и легочной гипертензией. Преклиническая апробация разрабатываемого баллон-расширяемого бесшовного биопротеза показала удовлетворительные результаты на крупных животных, что позволяет продолжить дальнейшую оценку эффективности и безопасности его применения.

В связи с увеличением заболеваемости за последнее десятилетие, показана значимость изучения патофизиологических механизмов развития клапанной патологии различного генеза, в том числе и с точки определения видовой принадлежности возбудителей инфекционного эндокардита как ключевого патогенетического фактора во взаимодействии патоген-хозяин и установлении предрасполагающих факторов индивидуальной чувствительности к микроорганизмам различных родов. Уменьшение частоты развития ИЭ и других клапанных патологий, невозможно без внедрения персонализированной медицины, которая будет включать в себя комплекс лабораторных методов, включающих иммунохимические и молекулярно – биологические исследования, а также точное определение этиологического фактора заболевания.

Впервые получены данные о том, что стабилизация ксенобиоматериала диглицидиловым эфиром этиленгликоля не экранирует ГНК. Данный

сахарид сохраняется в структуре биоматериала функционирующих эпоксиобработанных биопротезов около 2,5 лет после имплантации и может являться триггером их иммунного отторжения.

Впервые проанализирована численно конструкция коронарного стент-графта, предназначенного для лечения перфораций коронарных артерий, оценены ее напряженно-деформированное состояние, подобран наиболее перспективный материал для реализации.

Впервые получены гидрогели на основе высокомолекулярного поливинилового спирта комбинированным способом. Добавление глутарового альдегида к водному раствору поливинилового спирта позволило увеличить прочность конечных криогелей.

Фибрин представляет собой конечный продукт свертывания крови. Его полимеризация происходит под действием тромбина в присутствии ионов кальция. В большинстве протоколов для получения тканеинженерных продуктов, полимеризацию фибриногена выполняют путем внесения экзогенного тромбина, выделенного из плазмы крови животных или человека. Несмотря на принимаемые производителем меры по снижению риска вирусного заражения препаратов из компонентов крови, опасность переноса инфекций сохраняется. Кроме того, введенный в организм реципиента чужеродный тромбин способен вызывать иммунную реакцию, формирование аутореактивных антител к собственному тромбину, а также сенсibilизацию и аллергические реакции. Нами предложен способ получения аутологичного фибрина без использования экзогенного тромбина, который исключает указанные недостатки. В этом случае полимеризация фибриногена происходит путем активации эндогенного тромбина, который присутствует в преципитате.

Используемые на сегодняшний день заплаты не могут в полной степени удовлетворить потребности сосудистой хирургии, в том числе, из-за отсутствия функциональной активности в плане формирования новообразованной сосудистой ткани на своей основе. Поэтому вопрос

выбора заплаты, которая отвечала бы всем требованиям, необходимым для снижения риска развития осложнений в раннем и отдаленном послеоперационных периодах, остается по-прежнему актуальным.

Показано, что эндотелиальные клетки коронарной артерии более активны в отношении организации базальной мембраны, биосинтеза и формирования коллагена, а также организации межклеточных взаимодействий, в то время как эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии обладают более выраженным провоспалительным сигналингом, более активным синтезом макромолекул и соединений азота, более активной регуляцией метаболизма РНК, биогенезом рибосом и более выраженной рибосомальной активностью. В то же время, несмотря на некоторые особенности и различия между эндотелиальными клетками коронарной артерии и внутренней грудной артерии, оба вида клеток активно синтезируют коллаген, формируют прочные соединения с базальной мембраной, характеризуются явно выраженными межклеточными взаимодействиями и активной секрецией внеклеточных везикул, что определяет их конгруэнтность в составе артерио-артериального континуума. На основании особенностей строения мышечной оболочки внутренней грудной артерии выделены стадии развития ее возрастной дегенерации: 1) ранняя стадия, на которой наблюдается гипертрофия сосудистых гладкомышечных клеток, которые тем не менее сохраняют свою ориентацию и не характеризуются избыточным синтезом внеклеточного матрикса; 2) поздняя стадия, на которой отмечается преобладание фибробластов и фиброцитов, а также присутствие значительного количества коллагеновых волокон различной ориентации. В процессе ремоделирования внутренней грудной артерии также происходит повреждение интимы, нарушение целостности внутренней эластической мембраны, увеличение количества и площади просвета *vasa vasorum*, а также миграция лейкоцитов в адвентицию и околосоудистую жировую ткань.

Продemonстрировано, что основную роль в формировании неоинтимы, а также в развитии адвентициального и околососудистого воспаления в различных патофизиологических сценариях (баллонное повреждение интимы брюшной аорты крыс, внутривенное введение кальципротеиновых частиц при интактной интимае, гетеротопическая имплантация кровеносных сосудов) из всех типов сосудов микроциркуляторного русла (артериолы, венулы и капилляры) играют именно капилляры, составляющие до 75% от общего количества этих сосудов, поскольку они наиболее подвержены вазоспазму и изменению сосудистого просвета.

### **Степень внедрения**

Научные положения и практические рекомендации, полученные в результате оценки исходов имплантации колец биологического происхождения для пластики митрального клапана сердца, внедрены в клиническую практику отделений сердечно-сосудистой хирургии, нейрохирургии, кардиологии, неврологии ФГБНУ «НИИ КПССЗ». Полученные результаты используются при обучении студентов, ординаторов, врачей на кафедре кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России.

**Область применения:** гистология, патологическая анатомия, патофизиология, сосудистая биология, сердечно-сосудистая хирургия, трансплантология и искусственные органы, гемостазиология, кардиология.

### **Экономическая эффективность**

Полученные в ходе исследований данные позволят более эффективно лечить пациентов с клапанной болезнью сердца, фибрилляцией предсердий и вторичной легочной гипертензией, уменьшая количество

послеоперационных осложнений, снижая число повторных госпитализаций и сокращая риски развития осложнений в отдаленном после операции периоде

Разработка новых конструкций медицинских изделий и биоматериалов, с учетом их последующего внедрения в клиническую практику, является экономически эффективной с позиции дорогостоящих медицинских изделий.

Способ получения и полимеризации фибрина с помощью эндогенного тромбина позволит получать полностью аутологичный материал, который обладает лучшими физико-механическими свойствами, стойкостью к протеолитической деградации и низкой тромбогенностью, что позволит изготавливать персонализированные изделия для нужд сердечно-сосудистой хирургии.

Разработанные биodeградируемые сосудистые заплаты PNBV/PCL/VEGF могут явиться хорошей альтернативой существующим на рынке биологическим и синтетическим заплатам для артериальной реконструкции, в особенности при атеросклерозе внутренней сонной артерии, приводящей к каротидному стенозу и последующему инсульту.

## СОДЕРЖАНИЕ

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	19
НОРМАТИВНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ.....	21
ВВЕДЕНИЕ.....	22
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	
1. Хирургическое лечение врожденных и приобретенных пороков клапанов сердца.....	34
1.1. Модификация фенотипа легочной гипертензии II группы после хирургической коррекции митральных пороков .....	34
1.2. Разработка технологии имплантации сверхэластичных опорных колец для митральной позиции .....	36
1.3. Модификация операции "Лабиринт 4" при лечении длительно персистирующей фибрилляции предсердий на "открытом" сердце.....	39
1.4. Сравнительный анализ ближайших и отдаленных результатов первичной имплантации каркасного ксеноперикардального биопротеза в митральную позицию с процедурой "клапан-в-клапан" при помощи баллон-расширяемого бесшовного биопротеза.....	43
1.5. Уровень экспрессии генов в нативных клапанах сердца, полученных от пациентов с приобретенными пороками сердца, перенесших кардиохирургическое вмешательство.....	44
1.6 Сравнение бактериальной флоры, выделенной из периферической крови и клапанных структур сердца пациентов с инфекционным эндокардитом .....	48
1.7. Определение значения вариабельности генов воспалительного ответа в предрасположенности к развитию ревматической болезни сердца.....	52
1.8. Поиск ассоциаций генов иммунного ответа и метаболизма липидов с рисками развития ожирения и липидного обмена у пациентов среднего и пожилого возраста .....	55
2. Разработка медицинских изделий для сердечно-сосудистой хирургии.....	60

2.1. Изучение ксеноантигенов в биоматериале, консервированном диглицидиловым эфиром этиленгликоля .....	60
2.2. Разработка концепта коронарного стент-графта с биodeградируемой оболочкой .....	65
2.3 Оптимизация условий синтеза биосовместимых гидрогелей на основе поливинилового спирта .....	73
2.4. Фибрин – перспективный биосовместимый полимер для создания клеточных конструкторов .....	78
2.4.1. Механические и структурные характеристики фибриновых матриц.....	79
2.4.2. Деградации фибриновых матриц.....	81
2.4.3. Тромбогенность фибриновых матриц.....	82
2.4.4. Биологические свойства фибриновых матриц. Жизнедеятельность эндотелиальных клеток на поверхности фибриновых матриц.....	83
2.5. Результаты имплантации сосудистых заплат в сонную артерию овец ..	85
3. Патofизиологические аспекты в сердечно-сосудистой хирургии.....	92
3.1. Патofизиологическое обоснование эффективности артериальных кондуитов для коронарного шунтирования .....	92
3.2. Исследование дегенерации внутренней грудной артерии при ее возрастном ремоделировании .....	112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	124
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	126
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	135

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время

ВГА – внутренняя грудная артерия

ГА – глутаровый альдегид

ГМК – гладкомышечные клетки

ГПа – гигапаскаль

ГНК – N-гликолилнейраминовая кислота

ДИ – доверительный интервал

ДЛА – давление в легочной артерии

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДЭЭ – диглицидиловый эфир этиленгликоля

ИМ – инфаркт миокарда

ИМТ – индекс массы тела

ИЭ – инфекционный эндокардит

КА – коронарная артерия

КПОС – катетеризация правых отделов сердца

КШ – коронарное шунтирование

КЭЭ – каротидная эндартерэктомия

ЛГ -легочная гипертензия

ЛЖ – левый желудочек

ЛП – левое предсердие

МК – митральный клапан

МН - митральная недостаточность

ОНМК – острые нарушения мозгового кровообращения

ОШ – отношение шансов

ПВС – поливиниловый спирт

ПЖ – правый желудочек

ППС – приобретенные пороки сердца

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РБС – ревматическая болезнь сердца

РНК – рибонуклеиновая кислота  
РЧА – радиочастотная абляция  
СДЛА – систолическое давление в легочной артерии  
ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания  
ТБН – тетраборат натрия  
ФВ – фракция выброса  
ФК – функциональный класс  
ФП - фибрилляция предсердий  
ФЭкТр – фибрин, полимеризованный экзогенным тромбином  
ФЭнТр – фибрин, полимеризованный активацией эндогенным тромбином  
ХСН – хроническая сердечная недостаточность  
ЭДТА – натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты  
ЭКС – электрокардиостимулятор  
ЭкТр – экзогенный тромбин  
ЭнТр – эндогенный тромбин  
ЭЦМ – экстрацеллюлярный матрикс  
ЭхоКГ – эхокардиография  
EACTS – Европейская ассоциация кардио-торакальных хирургов  
EAPCI – European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions  
ESC – Европейское общество кардиологов  
ММР – матриксная металлопротеиназа  
PTFE – политетрафторэтилен  
P max – максимальный градиент давления  
P ср. – средний градиент давления  
PCL – поликапролактон  
PHBV – полигидроксибутират/оксивалерат  
RGD – аргинин-глицин-аспарагиновая кислота  
SDGF-1a – хемоаттрактантная молекула  
TLR – Толл-подобные рецепторы  
VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста

## НОРМАТИВНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ:

1. ГОСТ Р ИСО 22309-2015 Государственная система обеспечения единства измерений (ГСИ). Микроанализ электронно-зондовый. Количественный анализ с использованием энергодисперсионной спектроскопии для элементов с атомным номером от 11 (Na) и выше.
2. МУ 1.3.1888-04 «Эпидемиология. Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности.
3. ГОСТ ISO 37–2020. Резина и термоэластопласты. Определение упругопрочностных свойств при растяжении
4. МУ 3.5.5. 1034-01 «Дезинфекционные средства и технологии. Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I-IV групп при работе методом ПЦР»
5. ГОСТ Р ISO 10993-4:2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий». Часть 4. Исследования изделий, взаимодействующих с кровью.
6. ГОСТ 31616-2012 «Протезы фиброзных колец для аннулопластики. Технические требования и методы испытаний».
7. ГОСТ 31618.1-2012 Протезы клапанов сердца. Часть 1. Общие технические требования и методы испытаний.
8. Приказ №267 МЗ РФ от 19.06.2003 г. «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

## ВВЕДЕНИЕ

По оценкам глобального эпидемиологического исследования, во всем мире в 2017г. было зарегистрировано 35 700 смертей от дегенеративного поражения митрального клапана (МК). Увеличение продолжительности жизни и численности населения привели к росту смертности от неревматических заболеваний клапанов сердца на 112% с 1990 г. [38]. Дегенеративные заболевания МК, являясь распространенной патологией, поражающей 2–3% населения, обусловлены дефектом развития соединительной ткани и преимущественно относятся ко II типу митральной недостаточности (МН) по классификации А. Carpentier [21]. В настоящее время общепризнанно, что реконструктивные методики при диспластической МН дают лучшие результаты, чем протезирование МК [11]. Аннулопластика МК является «эссенциальным компонентом» лечения МН в сочетании с вмешательством на створчатом аппарате и подклапанных структурах, восстанавливая нормальный размер и форму фиброзного кольца МК, а в долгосрочной перспективе снижает риск прогрессирующей дилатации фиброзного кольца МК [72]. У пациентов с приобретенными пороками клапанов левых отделов сердца (ППС) и легочной гипертензией (ЛГ) зачастую характер ЛГ ограничивается посткапиллярным компонентом, однако у ряда таких пациентов после хирургической коррекции порока может не наблюдаться регресса ЛГ. Предполагается, что у таких пациентов особый вклад в характер течения ЛГ и отсутствие ее регресса послеоперационно может вносить длительность порока и выраженность ремоделирования сердца и легочного сосудистого русла, коморбидный статус, демографические характеристики, наличие дополнительно неverified прекапиллярного компонента ЛГ. Сохранение резидуальной ЛГ в послеоперационном периоде сказывается на качестве жизни и уровне выживаемости пациентов. Поэтому перспективным представляется поиск предикторов отсутствия регресса ЛГ в

послеоперационном периоде и предикторов прогноза и эффективности кардиохирургического вмешательства.

Фибрилляция предсердий (ФП) является наиболее часто встречающейся в клинической практике наджелудочковой аритмией, которая значимо влияет на качество жизни, заболеваемость и смертность [75]. Гемодинамически значимое поражение митрального клапана в естественном своем течении приводит к структурным изменениям левого предсердия (ЛП) как компенсирующей камеры. Происходит электрофизиологическое и структурное ремоделирование предсердного миокарда. Электрофизиологическое ремоделирование заключается в постепенном укорочении эффективного рефрактерного периода миокарда [10]. Изменение электрофизиологических свойств влечет за собой нарушение сократительной функции предсердий. Структурное ремоделирование, гистологически проявляющееся фиброзом и потерей массы миокарда предсердий, необратимо и ведет к формированию блоков проведения, что служит прямым фактором развития re-entry [11]. Возникновение ФП является закономерной стадией естественного течения митрального порока сердца [54] и встречается в 30–84% случаев у пациентов, которым требуется хирургическое лечение клапанного порока [23]. Несколько мультицентровых проспективных рандомизированных исследований показали, что свобода от фибрилляции предсердий при открытых операциях на сердце выше в группах пациентов, которым выполнено хирургическое лечение ФП, чем в контрольных группах [66]. Учитывая тот факт, что доля реконструктивных операций при коррекции клапанных пороков существенно возросла, становится еще более актуальным восстановление синусового ритма, которое позволяет избежать пожизненного применения оральных антикоагулянтов [11]. Особая роль отдается в этом вопросе возможностям клапансохраняющих операций совместно с хирургическим лечением фибрилляции предсердий. На сегодняшний день в арсенале кардиохирурга имеется более 40 видов различных устройств для аннулопластики МК, разделенных по жесткости на

три основные группы: жесткие, полужесткие и гибкие. Однако отсутствует доказательная база, подтверждающая влияние различных видов (групп) колец на выживаемость и функциональный класс хронической сердечной недостаточности (ФК ХСН) в долгосрочном периоде наблюдения [51]. В современных условиях хирурги в праве выбирать кольцо для аннулопластики по своему усмотрению, основываясь на личном опыте, в соответствии с потребностями пациента [70].

Инфекционный эндокардит (ИЭ) определяется как инфекция нативного или протезированного клапана сердца, поверхности эндокарда или постоянного аппарата для сердца. В настоящее время определение микроорганизмов, индуцирующих заболевание или вовлечённых в процесс патогенеза, методом ПЦР является одним из современных и быстрых тестов [19]. В настоящее время определение микроорганизмов, индуцирующих заболевание или вовлечённых в процесс патогенеза, методом полимеразной цепной реакции в реальном времени является одним из современных и быстрых тестов [33]. Чаще всего для посева и для ПЦР используются образцы крови пациента с ИЭ, однако они не дают точных результатов по ряду причин [52].

Ревматическая болезнь сердца (РБС) остается одной из причин дисфункции нативных клапанов сердца. Ежегодно во всем мире регистрируется 250 тысяч смертей, вызванных данной патологией, главным образом среди молодого населения [60]. Однако, эпидемиологические исследования показывают, что в большей степени от РБС страдает население в возрасте от 65 лет, однако в развивающихся странах наблюдается сдвиг в сторону более молодых людей [37].

В исследованиях последнего десятилетия подчеркивается роль генетической предрасположенности в развитии РБС [53]. Исследователями установлен ряд генов-кандидатов, которые ассоциированы с предрасположенностью к развитию данной патологии [26,53,64]. Однако следует отметить, что имеющиеся на сегодняшний день результаты

противоречивы, а также имеют ряд ограничений, которые касаются размера выборки (в среднем в исследования включаются не более 100 пациентов).

При протезировании несостоятельных клапанов сердца в современной хирургии широко применяют ксеногенные биологические протезы, изготовленные из химически стабилизированных тканей животного происхождения (бычьего перикарда или аортального комплекса свиньи) [8]. Биопротезы характеризуются низкой тромбогенностью и оптимальными гидродинамическими параметрами транспротезного тока крови, приближенными к таковым естественных клапанов сердца [40]. Вместе с тем биопротезы относительно недолговечны: сроки функционирования большинства моделей этих медицинских изделий составляют в среднем 10-15 лет [32]. В качестве основной причины протезных дисфункций выступает структурная дегенерация биологического компонента имплантатов [62]. Последняя представляет собой постепенный необратимый процесс ухудшения свойств биоматериала, обусловленный повреждением и кальцификацией его волокнистой основы. Вследствие накопления дегенеративных изменений в створчатом аппарате имплантатов формируются перфорации и крупные кальцификаты, что приводит к недостаточности и/или стенозированию протезных клапанов.

Одним из ведущих факторов развития структурной дегенерации является хроническое иммунное отторжение биопротезов [63], главными триггерами которого служат остаточные антигены животных, в том числе N-гликолилнейраминная кислота (ГНК) [13]. ГНК принадлежит к классу сиаловых кислот, она выступает в качестве терминального звена полисахаридов, конъюгированных с белками и липидами клеточных мембран и внеклеточного матрикса. ГНК обильно синтезируется в тканях большинства млекопитающих, включая свиней и крупный рогатый скот, однако отсутствует в организме человека, вследствие чего люди лишены иммунной толерантности к ней [39]. Ранее было показано, что ГНК не разрушается и не экранируется при химической стабилизации биоматериала

растворами на основе глутарового альдегида [22]. Следует подчеркнуть, что глутаральдегид является главным консервантом, используемым при производстве подавляющего большинства коммерческих марок биопротезов по всему миру [2]. В то же время в Российской Федерации применяют уникальную технологию обработки имплантатов диглицидиловым эфиром этиленгликоля. Согласно теоретическим представлениям фиксация биоматериала диэпоксидными соединениями может экранировать ГНК и другие ксеногликаны, препятствуя развитию антительного и клеточного иммунного ответа против эпоксиобработанных биопротезов. Впрочем, до настоящего времени это предположение не проверяли экспериментально.

Альтернативным подходом к решению проблемы ограниченного функционирования биопротезов клапанов сердца является поиск синтетических материалов, обладающих лучшими в сравнении с ксеноперикардом свойствами. Несмотря на широкое разнообразие доступных материалов и технологий изготовления, изученных с целью разработки полимерного протеза клапана сердца, данное направление развивается относительно медленно, ввиду жестких требований к механическим и биологическим свойствам, а также сложной и анизотропной геометрии клапанов и отсутствия возможности к самовосстановлению искусственных материалов. Однако, в свете недавних достижений в области химии высокомолекулярных соединений и материаловедения, особенно в области разработки различных гидрогелей и других синтетических эластичных полимеров, появилась возможность создания персонализированных сердечных клапанов с близкими к нативным тканям свойствами [50].

Одним из направлений поиска пригодного для протезирования клапана сердца полимерного материала может стать получение гидрогелей на основе поливинилового спирта (ПВС) [49]. ПВС-гидрогели синтезируют путем трехмерного сшивания линейного полимера химическими или физическими способами. К преимуществам таких материалов относят их высокую гидрофильность и, как следствие, высокую биосовместимость, а также

физические параметры – в частности, микроструктуру и упруго-деформационные свойства, сопоставимые с биологическими тканями [27]. В то же время относительно низкие показатели механической прочности ПВС-гидрогелей требуют оптимизации условий синтеза, с целью снижения риска разрыва створок искусственного клапана при высоком динамическом напряжении изгиба в долгосрочной перспективе. Улучшения механических свойств ПВС-гидрогелей можно добиться различными способами, включая увеличение молекулярной массы и/или концентрации исходного линейного полимера, увеличение числа циклов замораживания/оттаивания (для криоструктурирования), а также комбинацию химических и физических способов синтеза с целью образования большего числа устойчивых к деградации связей.

Другой важной проблемой современной кардиохирургии (интервенционной кардиологии) с позиции разработки новых медицинских изделий является проблема перфораций коронарной артерии при проведении чрескожных коронарных вмешательств. Перфорация коронарной артерии является редким (до 0,002%), но опасным осложнением проведения интервенционных процедур на сосудистом русле сердца – коронарографий, чрескожных коронарных вмешательств. Данное осложнение способно привести к формированию объемного перикардального выпота, часто сопровождающегося тампонадой, с последующим высоким риском летального исхода. В связи с увеличением объема процедур на коронарном русле во всем мире в последние десятилетия наблюдается быстрый рост числа случаев перфораций [20,29].

Предикторами данного осложнения являются:

- (1) клинико-демографические факторы: пожилой возраст, женский пол, нарушение функции почек и инфаркт миокарда без подъема сегмента ST;
- (2) ангиографические факторы: хроническая тотальная окклюзия, кальцификация коронарных артерий, извилистые сосуды, целевые поражения в огибающей и правой коронарных артериях, протяженные (> 20 мм) и

эксцентрические поражения;

(3) факторы, связанные с методикой: использование гидрофильных/сверхжестких проводников, устройств для атерэктомии, увеличенное соотношения «баллон-артерия», проведение процедуры под контролем внутрисосудистого ультразвука и постдилатация стента под высоким давлением [25,44,57].

Чаще всего перфорации возникают из-за дистальной миграции проводника и/или его перелома или случайного расположения проводника за пределами хода коронарной артерии. «Традиционное» лечение такого осложнения заключается в длительном надувании баллона (проксимально или в месте перфорации для предотвращения тампонады) и отмене антикоагулянтной терапии. Более перспективной технологией лечения перфораций является имплантация коронарного стент-графта – конструкции на основе «классического» стента, покрытого оболочкой. Именно данная оболочка и формирует герметизирующий слой, благодаря чему, перфорация устраняется. Ряд исследователей считает, что стент-графты для экстренной имплантации должны быть в обязательном порядке на складе профильных подразделений, выполняющий чрескожные коронарные вмешательства [65].

Сердечно-сосудистые заболевания сохраняют лидирующие позиции среди основных причин смертей во всем мире [7, 41]. При этом на рынке медицинских изделий отсутствуют эффективные протезов сосудов малого диаметра. Это актуализирует поиск решений данной проблемы и делает их чрезвычайно важными для сердечно-сосудистой хирургии. Среди обилия материалов и подходов наиболее успешными являются разработки, связанные с имитацией структуры и функции нативной сосудистой стенки [34]. Данный подход позволяет поддерживать физиологические реакции, стимулировать интеграцию сосудистого протеза с окружающими тканями, снижая риск осложнений после имплантации.

К сосудистым протезам предъявляется ряд требований, которые включают биосовместимость и биоактивность, соответствие физико-

механическим характеристикам, низкую тромбогенность, отсутствие воспалительной и иммунной реакции организма на имплантат, а также потенциальную возможность передачи инфекции [77]. Синтетические полимеры в составе протезов (биоразлагаемые полиэфирные, полисложноэфирные амиды, полиуретаны) позволяют в большей степени управлять механическими свойствами скаффолда [55]. Однако, биосовместимость этих материалов довольно низкая, поскольку на поверхности отсутствуют сайты для адгезии клеток. Кроме того, при деградации возможно образование токсичных продуктов, вызывающих воспалительные и иммунные реакции [18].

Для нивелирования указанных недостатков предлагаются различные способы модификации полимерной матрицы, в том числе создание на поверхности изолирующего биоактивного слоя. Модифицирующее покрытие или пропитывание каркасов биополимерами формирует сайты клеточной адгезии и придает биомиметические свойства материалу. Наиболее популярными вариантами биополимеров для сосудистой инженерии, являются коллаген, фибронектин, эластин, желатин, фибрин [36]. Фибрин обладает рядом преимуществ, которые связаны не только с его уникальными биологическими характеристиками, но и его биодоступностью [74]. Аутологичный фибрин методологически просто, в короткие сроки и в достаточном количестве можно получать из собственной крови пациента. Такой материал лишен риска переноса вирусных инфекций и иммунологических реакций организма. Волокна фибрина содержат сайты, необходимые для адгезии, миграции и пролиферации клеток, создают условия для формирования полноценной ткани [74]. Кроме того, фибрин отличается высоким сродством к различным биологическим поверхностям, способен повышать устойчивость клеток к смыванию потоком жидкости [16].

Фибрин представляет собой конечный продукт свертывания крови. Его полимеризация происходит под действием тромбина в присутствии ионов

кальция. В большинстве протоколов для получения тканеинженерных продуктов, полимеризацию фибриногена выполняют путем внесения экзогенного тромбина, выделенного из плазмы крови животных или человека. Несмотря на принимаемые производителем меры по снижению риска вирусного заражения препаратов из компонентов крови, опасность переноса инфекций сохраняется. Кроме того, введенный в организм реципиента чужеродный тромбин способен вызывать иммунную реакцию, формирование аутореактивных антител к собственному тромбину, а также сенсбилизацию и аллергические реакции [28,30,47].

Основными способами хирургического лечения стеноза сонной артерии являются каротидная эндартерэктомия (КЭА) и стентирование [68]. В свою очередь, КЭА является «золотым стандартом» хирургического лечения и профилактики острого нарушения мозгового кровообращения, демонстрируя существенное преимущество у асимптомных и симптомных больных с высокой степенью стеноза [68]. Однако наличие пролонгированных бляшек затрудняет выполнение данной процедуры стандартным и наиболее часто применяемым на практике эверсионным способом каротидной эндартерэктомии. В связи с этим хирурги вынуждены прибегать к закрытию артериотомного доступа с помощью заплаты [4,69].

На сегодняшний день опубликовано большое количество работ со сравнительными результатами реконструкции сонной артерии с использованием биологических и синтетических заплат. Ren S. с коллегами не выявили разницы по частоте смертности, инсульта и рестеноза при использовании аутовены, PTFE и Dacron [69]. Однако среднее время оперативного вмешательства было значительно больше при использовании PTFE или Dacron за счет длительного гемостаза при кровотечениях из проколов иглы, тогда как в случае ангиопластики сонной артерии биологическим материалом (ксеноперикардом) отмечено значительное снижение кровотечений через проколы иглы. При этом, использование

искусственных заплат ассоциировано с инфицированием и тромбозом, а ксеноперикарда – с высоким риском кальцификации [4].

В недавнем метаанализе восьми рандомизированных контролируемых исследований по оценке эффективности использования заплат PTFE, Dacron и бычьего перикарда не обнаружено достоверных различий по широкому спектру осложнений, включая стеноз в отдаленном периоде [12].

По данным отечественных авторов частота периоперационных инсультов в группе с пластикой артерии ксеноперикардом составила 1,5%, а ишемических инсультов в ранний послеоперационный период – 0,26%, при этом данные осложнения не выявлены в группе с заплатами PTFE [6]. В отдаленные сроки наблюдения частота развития гемодинамически значимых рестенозов ВСА более 70% была выше при использовании заплат из PTFE (31,2%), чем при применении ксеноперикардальных лоскутов (9,8%).

Тканеинженерные сосудистые заплаты помогут избежать проблем, возникающих при использовании существующих материалов, благодаря восстановлению собственных тканей в месте имплантации. Для достижения такого результата биodeградируемый матрикс должен обладать высокой биосовместимостью, обеспечивать миграцию клеток в толщу материала, их пролиферацию и дифференцировку. При этом, необходимость быстрого формирования из аутологичных клеток эндотелиального монослоя на внутренней поверхности заплат потребовала поиска способов стимуляции этого процесса. В ряде работ было показано, что большой потенциал в стимуляции эндотелизации и регенерации сосудистой стенки на основе тканеинженерного матрикса имеет фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) [42, 43]. Являясь основным ангиогенным фактором роста, VEGF стимулирует миграцию и выживание эндотелиальных клеток, а также – привлечение прогениторных клеток из тока крови [46, 48].

Пептиды с последовательностью аргинил-глицил-аспарагиновая кислота (RGD) присутствует в составе большинства белков внеклеточного матрикса. RGD-последовательность можно считать общим интегрин-

связывающим мотивом [73]. Тем не менее, тропность к эндотелиальным клеткам делает RGD идеальными агентами для модифицирования тканеинженерных конструкций, контактирующих с кровью и требующих скорейшей эндотелизации поверхности. При этом для модифицирования можно использовать как пептидные последовательности, полученные в ходе процедуры экстракции из природного материала, так и искусственно синтезированные. Последние имеют ряд преимуществ: снижен риск иммунного ответа и инфекции, который может быть связан с недостаточной степенью очистки природного материала. При сравнении функциональных свойств естественных RGD-содержащих белков и их искусственных аналогов, последние оказались более эффективны [71].

Таким образом, используемые на сегодняшний день заплаты не могут в полной степени удовлетворить потребности сосудистой хирургии, в том числе, из-за отсутствия функциональной активности в плане формирования новообразованной сосудистой ткани на своей основе. Поэтому вопрос выбора заплаты, которая отвечала бы всем требованиям, необходимым для снижения риска развития осложнений в раннем и отдаленном послеоперационных периодах, остается по-прежнему актуальным.

Основным ангиокринным слоем сосудистой стенки является её внутренняя выстилка, которая представлена монослоем эндотелиальных клеток (ЭК). Их структура и функция характеризуются общими закономерностями для любого типа сосудов, начиная от мелких – артериол, венул и капилляров, и заканчивая крупными – венами и артериями. Вместе с тем в силу различной функции данных сосудов физиологический профиль их ЭК, включающий совокупность экспрессируемых в них генов и белков, существенно различается между артериальным и венозным руслом. Это имеет не только фундаментальное значение, но и позволяет объяснять различия в клинических проявлениях после различных видов коронарного шунтирования (КШ). В частности, структурно-функциональные особенности используемых в КШ кондуитов напрямую определяют длительность их

функционирования, а значит, и эффективность самой операции как в краткосрочном, так и в отдалённых периодах наблюдения.

Любой коронарный анастомоз с точки зрения своей анатомии может быть условно представлен в виде двух вариантов морфофункциональной системы «конduit-артерия», которая подразумевает соединение выбранного кондуита и коронарной артерии (КА) и их тесное взаимное влияние друг на друга, а именно венозно-артериальным и артерио-артериальным континуумами, при этом считается, что последний более эффективен и имеет большую функциональную устойчивость. Преимуществами аутоартериальных кондуитов для КШ по сравнению с аутовенозными являются более высокая продукция артериальными ЭК таких вазодилататоров, как монооксид азота (NO) и простаглицлин, а также гистологическая близость к шунтируемой КА. Под гистологической близостью следует понимать наличие внутренней и внешней эластических мембран, более выраженный по сравнению с венами гладкомышечный слой и сходный диаметр сосуда. Так, в одном из морфометрических исследований было доказано, что внутренняя грудная артерия (ВГА) имеет переходный тип строения, то есть проксимальная её часть может быть ближе к эластическому типу, а более дистальная – к мышечному. В этой связи важно отметить, что КА, которая и анастомозирует с мышечным сегментом ВГА, также относится к мышечному типу артерий. В настоящее время до конца неясно, что, кроме морфологического единства, делает артерии разных сосудистых бассейнов в коронарном артерио-артериальном континууме биологически конгруэнтными, то есть способными максимально соответствовать друг другу, реализуясь в едином искусственно созданном неоартериальном русле. Несмотря на указанные данные и имеющиеся доказательства превосходства аутоартериальных кондуитов, требуются дальнейшие фундаментальные исследования, раскрывающие механизмы структурно-функциональной близости на уровне артерио-артериального континуума.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### 1. ХИРУРГИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ ПРИОБРЕТЕННЫХ ПОРОКОВ КЛАПАНОВ СЕРДЦА

#### 1.1. Модификация фенотипа легочной гипертензии II группы после хирургической коррекции митральных пороков

Было обследовано 80 пациентов (медиана возраста 60,0 лет [51,0; 65,0]), госпитализированных в кардиохирургическое отделение для плановой хирургической коррекции приобретенного порока сердца (ППС). Всем пациентам выполнено комплексное обследование с эхокардиографической (ЭхоКГ) оценкой. Также была выполнена дополненная оценка структуры и функции правого желудочка (исходно, на 7 сутки и через 1 месяц после оперативного вмешательства).

Среди всей когорты обследованных у 63 пациентов (78,75%) была диагностирована легочная гипертензия (ЛГ), при которой систолическое давление в легочной артерии (СДЛА) по данным ЭхоКГ было равно или выше 37 мм рт.ст. (Me 55,0 [45,0; 65,0] мм рт.ст.). Пациентам с ЛГ проводилась катетеризация правых отделов сердца (КПОС). По данным КПОС в группе больных с ЛГ медиана давления в легочной артерии (ДЛА) составила 37,0 [27,0; 44,0] мм рт.ст.; медиана давления заклинивания легочной артерии была равна 22,0 [17,5; 39,5] мм рт.ст.; а легочное сосудистое сопротивление равнялось 4 [2,0; 6,2] Ед. Вуда.

Поражение клапанного аппарата у пациентов с ЛГ было представлено в виде стеноза митрального клапана (n=25, 39; 68%), у 24 пациентов выявлена митральная недостаточность (38,1%), 14 пациентов имели сочетанный порок (22,22%). Среди пациентов с ППС и ЛГ наиболее распространенной этиологией ППС была ревматическая болезнь сердца (n=33; 52,4 %). У больных без ЛГ синдром соединительно-тканной дисплазии отмечен

превалирующей этиологией клапанной болезни сердца ( $n=9$ ; 52,9 %; против  $n=15$ ; 23,8 %;  $p=0,02$ ).

Всем пациентам выполнено кардиохирургическое лечение ППС митрального клапана. Пораженный клапан подвергался либо пластике, либо иссечению с последующей имплантацией биологического или механического протеза.

По данным логистического регрессионного анализа пациенты с ППС и ритмом фибрилляции предсердий (ФП) на момент коррекции порока наиболее часто характеризовались наличием ЛГ (ОШ = 3,55 [0,95% ДИ 1,09; 11,56],  $p=0,03$ ), при этом факт сохранения ФП в течение первой недели после операции ассоциировался с увеличением уровня СДЛА на В-коэффициент = 9,06;  $p=0,04$ . Регресс ЛГ через 1 месяц после успешного лечения ППС реже наблюдался у пациентов женского пола (ОШ = 0,05 [0,95% ДИ 0,005; 0,5]  $p=0,009$ ), сохранение ЛГ также чаще наблюдалось у пациентов с ожирением (ОШ=15,29 [0,95% ДИ 1,61; 145,51]  $p=0,02$ ) и более тяжелым III-IV функциональным классом хронической сердечной недостаточности в предоперационном периоде (ОШ = 8,57 [0,95% ДИ 1,32; 55,52]  $p=0,02$ ).

По данным трансторакальной эхокардиографии спустя месяц после операции у пациентов с ЛГ отмечалось значимое улучшение сердечно-сосудистого сопряжения, представленного в виде соотношения TAPSE/СДЛА с 0,011 [0,00; 0,027] до 0,033 [0,00; 0,4] см/мм рт.ст.,  $p<0,001$ .

При оценке функционального состояния миокарда, методом speckle tracking с анализом глобальной продольной деформации миокарда левого желудочка (ЛЖ, GLS LV), в группе пациентов с ЛГ выявлено улучшение показателей через месяц после хирургической коррекции ППС. Так, ЛГ изменилась с 10,55% [-14,0; 4,15] до -12,15% [-17,25; 2,15], а деформация свободной стенки правого желудочка (GLPS RV) – с 16,65% [-23,6; -8,7] до 18,0% [-20,3; -12,3]. Однако у большинства пациентов деформация миокарда ЛЖ и ПЖ все еще осталась сниженной.



Рисунок 1 - Эхокардиографическая оценка левых отделов сердца

Таким образом, доказан факт влияния ритма фибрилляции предсердий на уровень исходного давления в легочной артерии; а также вклад таких факторов, как женский пол, III-IV функциональный класс хронической сердечной недостаточности и ожирение в отсутствие регресса ЛГ после коррекции порока у пациентов с ЛГ и ППС митрального клапана.

## **1.2. Разработка технологии имплантации сверхэластичных опорных колец для митральной позиции**

Было проведено проспективное рандомизированное исследование, сравнивающее результаты имплантации двух типов колец в митральную позицию у 62 пациентов с выраженной митральной недостаточностью (МН) на фоне дисплазии митрального клапана (МК). Все пациенты были

случайным образом распределены на 2 группы посредством проведения процедуры адаптивной рандомизации: группа I (n=31) - с имплантацией биологического полужесткого седловидного замкнутого кольца NeoRing (ЗАО «НеоКор», Кемерово, Россия) и группа II (n=31) - с имплантацией жесткого разомкнутого кольца RIGID (ЗАО НПП «МедИнж», Пенза, Россия). В исследование включались пациенты в возрасте 18 лет и старше с тяжелой диспластической МН 2 типа по А. Carpentier, а также наличием показаний к хирургической коррекции в соответствии с рекомендациями Европейского общества кардиологов (ЕОК, ESC) и Европейской ассоциации кардиоторакальной хирургии (EACTS) 2017г. Критериями исключения были предшествующие открытые операции на сердце, показания к сопутствующей замене аортального клапана или коронарному шунтированию, выраженное снижение сократительной способности левого желудочка (ЛЖ) (фракция выброса <40%). Анализ данных производился в трех контрольных точках: до операции, через 30 дней и 12 месяцев после оперативного вмешательства.

Анализ полученных результатов показал следующее (Таблица 1). Зарегистрировано два летальных случая в госпитальном периоде в группе RIGID. Оба устройства показали удовлетворительный клинический эффект на госпитальном этапе в виде восстановления запирающей функции МК ( $p < 0,001$ ) и частоте выявленной максимальной резидуальной митральной недостаточности (МН) до 1 степени в группе NeoRing (9,7%) и в группе RIGID (29%), соответственно, статистически значимых межгрупповых различий выявлено не было ( $p = 0,292$ ). Через 12 месяцев свобода от МН  $\geq 2$  степени в группе NeoRing составила 93,5%, а в группе RIGID - 77,4% ( $p = 0,147$ ). У пациентов с RIGID отмечены более высокие показатели трансклапанного диастолического градиента на МК -  $P_{ср}$  3,70 [3,00 – 4,40] мм рт.ст. против NeoRing 2,3 [2,05 – 2,85] мм рт.ст. ( $p < 0,001$ ), а также более высокая скорость трансклапанного потока –  $V_{ср}$  79 [71 – 94] см/сек против 70 [64 – 79] см/сек ( $p = 0,017$ ). Проведен анализ достижения комбинированной первичной конечной точки в зависимости от имплантируемого устройства,

шансы достижения по суммируемым критериям (рецидив митральной регургитации  $\geq 2$  степени, MACCE, впервые зарегистрированные нарушения ритма, реоперации) в группе RIGID были в 3,067 раза выше, чем в группе NeoRing; различия шансов статистически значимы ( $p=0,037$ , 95% ДИ: 1,053 – 8,934).

Таблица 1 - Анализ частоты достижения комбинированной конечной точки в сравниваемых группах

Показатель / Index	NeoRing	RIGID	P - value
Достижение комбинированной конечной точки, n (%) / Reaching the combined endpoint, n (%)	8 (25,8)	16 (51,6)	0,037
Частота достижения первичных конечных точек / Frequency of reaching primary endpoints			
Рецидив МН $\geq 2$ степени, n (%) / Recurrent MR $\geq 2$ degree, n (%)	2 (6,5)	7 (22,6)	0,147
ИМ, n (%) / MI, n (%)	0 (0,0)	1 (3,2)	0,982
ОНМК, n (%) / ACCI, n (%)	2 (6,5)	3 (9,7)	0,895
Смерть от всех причин, n (%) / Death from all causes, n (%)	0 (0,0)	2 (6,5)	0,492
Реоперации, n (%) / Reoperations, n (%)	0 (0,0)	2 (6,5)	0,492

Примечание: МН – митральная недостаточность; ИМ – инфаркт миокарда; ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения

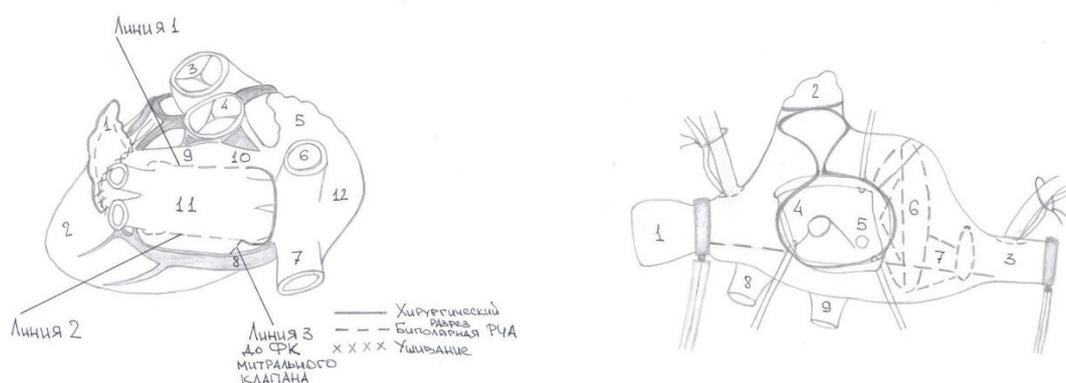
Полученные результаты показали, что использование для аннулопластики МК полужестких колец типа NeoRing при выполнении клапансохраняющих операций при дисплазии соединительной ткани

является предпочтительным вариантом. Это доказано статистически значимыми различиями в сравниваемых группах. Показано, что в группе с аннулопластикой МК полужесткими кольцами типа NeoRing была ниже вероятность достижения комбинированной конечной точки, были низкие госпитальные и отдаленные показатели трансмитрального диастолического градиента и высокая степень обратного ремоделирования камер сердца.

### **1.3. Модификация операции "лабиринт 4" при лечении длительно персистирующей фибрилляции предсердий на "открытом" сердце**

В исследование было включено 120 пациентов с показаниями для коррекции клапанной болезни сердца и наличием длительно персистирующей фибрилляции предсердий, более 30 месяцев (Me 34 [32; 38] месяцев). Возраст пациентов на момент поступления в стационар составил от 55 до 65 лет (Me 60 [59;61] лет), 78 женщин (65%). Всем пациентам выполнено комплексное обследование с эхокардиографической (ЭхоКГ) оценкой. Поражение клапанного аппарата было представлено в виде стеноза митрального клапана у 75 (62,5%) исследуемых, у 24 пациентов выявлена митральная недостаточность (20 %), у 21 диагностирован сочетанный порок (17,5%). Фракция выброса левого желудочка составляла 60 [59;61]%, размер левого предсердия 45 [43;47] мм. У всех пациентов были показания к хирургической коррекции в соответствии с рекомендациями Европейского общества кардиологов (ЕОК, ESC) и Европейской ассоциации кардиоторакальной хирургии (ЕАСТS) 2017г. Всем пациентам выполнялось оперативное вмешательство в объеме протезирования митрального клапана механическим протезом, хирургического лечения фибрилляции предсердий и ушивания ушка левого предсердия. По типу хирургического лечения фибрилляции предсердий пациенты разделились на 2 группы: в первую вошло 70 (58%) исследуемых, которым выполняли процедуру MAZE IV по стандартной методике; во вторую 50 (42%), которым выполняли

модифицированную процедуру MAZE IV. Сущность модификации заключается в уменьшении времени левопредсердного этапа путем выполнения линии Вох одновременно с осуществлением деструкции миокарда ушка левого предсердия (рис. 2а), а также уменьшения времени правопредсердного этапа за счет биполярной РЧА правого предсердия от медиального угла разреза правого предсердия до фиброзного кольца трикуспидального клапана (рис. 2б). Таким образом уменьшается количество линий повреждения эндокарда. Анализ данных производился в трех контрольных точках: в послеоперационном периоде на 9 сутки, через 12 и 24 месяцев после оперативного вмешательства. Эффективность восстановления и удержания синусового ритма оценивалась посредством 3-х суточного мониторинга ЭКГ.



а

б

Рисунок 2 - Модификация MAZE IV: а) левопредсердный этап; б) правопредсердный этап

Анализ полученных результатов показал следующее. Во-первых сравнивая группы по длительности проводимого искусственного кровообращения во время операции у пациентов, которым проводилась модифицированная процедура MAZE IV была достоверно меньше ( $p < 0,001$ ), в среднем 100 [98;110] минут, тогда как в группе хирургического лечения фибрилляции по стандартной методике в среднем 149 [148;152] минут. В первой группе на 9 сутки после оперативного лечения: синусовый ритм регистрировался у 35 пациентов (50%), АВ-узловой у 10 (14,29%),

фибрилляция предсердий у 25 (35,71%). Через 12 месяцев: синусовый ритм у 32 (45,7%), фибрилляция предсердий у 26 (37,14%), из них у 16 пациентов развилась левопредсердная инцизионная тахикардия, потребовавшая электрической кардиоверзии, 2(2,86%) исследуемым потребовалась имплантация постоянного ЭКС по поводу брадисистолической формы фибрилляции предсердий. Через 24 месяца у 52 (74,3 %) сохранялся синусовый ритм, фибрилляция предсердий у 17 (24,28%), 1 (1,42%) потребовалась имплантация ЭКС по поводу развившейся брадисистолической формы фибрилляции предсердий. Во второй группе восстановление синусового ритма на 9 сутки регистрировалось у 35 пациентов (70 %), АВ-узловой ритм у 10 (20%), фибрилляция предсердий сохранялась у 5 (10%). Через 12 месяцев: СР у 42 исследуемых (84 %), фибрилляция предсердий у 6 (12 %) из них у двоих пациентов развилась инцизионная тахикардия, потребовавшая электрической кардиоверзии, имплантация постоянного ЭКС потребовалась 2 (4%). Через 24 месяца: синусовый ритм сохранялся у 44 пациентов (88%), фибрилляция предсердий у 4 (8%), у 2 больных, которым при выписке были имплантированы ЭКС в предсердиях восстановился синусовый ритм.

Сравнивая обе группы было выявлено, что через 24 месяца у 92% пациентов второй группы достоверно ( $p < 0,001$ ) сохранялся синусовый ритм, тогда как у пациентов первой только в 74,3% случаев. Оценивая развитие инцизионной тахикардии в послеоперационном периоде в зависимости от вида хирургического лечения фибрилляции были установлены статистически значимые различия ( $p = 0,004$ ) между первой и второй группой. Шансы развития инцизионной тахикардии в группе модифицированной процедуры MAZE IV были ниже в 7,11 раза (Таблица 2; рис. 3), по сравнению с группой MAZE IV по стандартной методике, различия шансов были статистически значимыми (ОШ = 0,141; 95% ДИ: 0,031 – 0,643).

Таблица 2 – Анализ левопредсердной тахикардии в зависимости от показателя "Вид лечения ФП"

Показатель	Категории	Вид лечения ФП		p
		MazeIV	MAZE IV мод	
Левопредсердная тахикардия	Синусовый ритм	54 (77,1)	48 (96,0)	0,004*
	Инцизионная тахикардия	16 (22,9)	2 (4,0)	

\* – различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ )

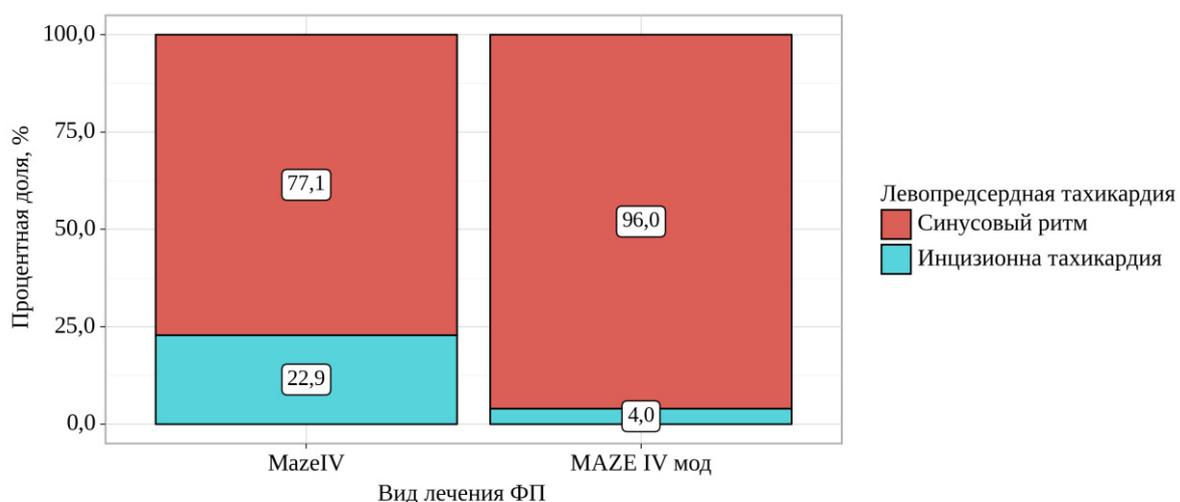


Рисунок 3 – Анализ левопредсердной тахикардии в зависимости от показателя "Вид лечения ФП"

В рамках проведения данного исследования разработана модификация стандартной методики MAZE IV, которая позволяет достоверно снизить длительность искусственного кровообращения во время операции, упростить методику выполнения хирургического лечения фибрилляции предсердий на «открытом сердце», позволяет осуществить эффективную электрическую изоляцию анатомических структур правого и левого предсердий, что позволяет достигнуть свободы от ФП у 92% пациентов, а также достоверно снизить шансы развития инцизионных тахикардий в послеоперационном периоде в 7,11 раза.

#### **1.4. Сравнительный анализ ближайших и отдаленных результатов первичной имплантации каркасного ксеноперикардального биопротеза в митральную позицию с процедурой "клапан-в-клапан" при помощи баллон-расширяемого бесшовного биопротеза**

Проведен сравнительный анализ ближайших результатов экспериментальной первичной имплантации каркасного ксеноперикардального биопротеза «Юнилайн» в митральную позицию с процедурой "клапан-в-клапан" при помощи баллон-расширяемого бесшовного биопротеза на 3 крупных животных (овцах).

В качестве модельного животного для проведения вмешательства была использована беспородная здоровая овца весом до 45 кг. У двух овец эксперимент был проведен в два последовательных этапа: 1) Первичное протезирование митрального клапана с использованием клинического атриовентрикулярного биопротеза «ЮниЛайн»-26 мм. Имплантацию биопротеза «ЮниЛайн» с посадочным диаметром 26 мм провели в условиях эндотрахеального газового наркоза и нормотермического искусственного кровообращения по схеме «правое предсердие-аорта» и кровяной кардиopleгии. Хирургическим доступом явилась левосторонняя торакотомия в 4-м межреберье. 2) Второй этап, проведен через четыре недели - повторное протезирование по типу «протез-в-протез» с использованием разрабатываемого баллон-расширяемого бесшовного биопротеза. У одной овцы эксперимент был проведен за 1 этап: первичное протезирование митрального клапана с использованием клинического атриовентрикулярного биопротеза «ЮниЛайн» размером 28 мм с последующей немедленной имплантацией баллон-расширяемого бесшовного биопротеза. После операции животные находились под наблюдением ветеринара. В контрольные сроки 1,3, и 7 суток овцам проводилась трансторакальная эхокардиография (ЭхоКГ) на аппарате ESAOTE (S.p.A., Италия) с секторным датчиком 2-4 МГц, поддерживающим режимы цветового доплеровского

картирования, импульсно-волнового и непрерывно-волнового доплера для оценки ремоделирования ЛЖ и характеристик трансмитрального потока.

По результатам исследований показано, что в результате репротезирования на 7 сутки после операции наблюдали незначительное изменение гемодинамики протезов: площади митрального клапана с 2,8-2,9 см<sup>2</sup> для каркасного «ЮниЛайн» до 2,30-2,9 см<sup>2</sup> для системы «протез-в-протез»; максимальный транспротезный градиент вырос от 0,5-1,8 до 5,9-18,8 мм рт. ст.; средний транспротезный градиент от 0,2-0,9 до 2,9-7,5 мм рт. ст. Снижение гемодинамических показателей после повторного протезирования, однако данное снижение вполне ожидаемо и обусловлено, прежде всего, снижением диаметра проходного отверстия, т.к. каркас, стенка и створчатый аппарат экспериментального протеза имеют суммарную толщину 1,1-1,5 мм, что вызывает геометрическое сужение просвета. Такое искусственное стенозирование составляет до 15% от геометрической площади проходного отверстия протеза «ЮниЛайн-26/28»

Проведенное исследование показало клиническую безопасность разрабатываемого баллон-расширяемого бесшовного биопротеза с приемлемыми гемодинамическими характеристиками, несмотря на реимплантацию заведомо меньшего диаметра протеза.

### **1.5. Уровень экспрессии генов в нативных клапанах сердца, полученных от пациентов с приобретенными пороками сердца, перенесших кардиохирургическое вмешательство**

С целью оценки уровня экспрессии отдельных генов в нативных клапанах сердца было отобрано 25 биоптатов клапанов сердца, с признаками бактериальной инвазии (средний возраст пациентов 55 лет) и 12 биоптатов клапана сердца без таковых признаков. Все пациенты проходили лечение на базе НИИ КПССЗ, исследование одобрено локальным этическим комитетом. Все участники подписывали добровольное информированное согласие на

участие в исследовании. Тотальная РНК была выделена из гомогенизированных в 900 мкл лизирующего реагента TRIzol («Invitrogen», США) образцов клапанов сердца с использованием коммерческого набора RNeasy® Plus Universal Mini Kit («Qiagen», Германия) в соответствии со стандартным протоколом, рекомендуемым производителем. Количественную и качественную оценку выделенной РНК была выполнена на спектрофотометре NanoDrop™ 2000 («ThermoScientific», США). Целостность РНК определяли с помощью спектрофотометра Qubit 4 Fluorometer («Invitrogen»), оценивая RIQ (RNA Integrity and Quality) индекс. Выделенные образцы РНК хранили при температуре -80°C.

При помощи количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени с флуоресцентным красителем SYBR Green, в трех повторах для каждого образца, была оценена экспрессия генов интереса на амплификаторе ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США).

Результаты кПЦР нормировали с помощью трех референсных генов *ACTB*, *GAPDH*, *B2M* в соответствии с имеющимися рекомендациями. Экспрессию изучаемых генов рассчитывали по методу  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программы GraphPad Prism 8 (Graph Pad Software,). Нормальность распределения оценивали при помощи теста Колмогорова-Смирнова, Шапиро-Уилка. В случае если распределение отклонялось от нормального, сравнение двух групп проводили при помощи критерия Манна-Уитни. Сравнение более двух групп проводили с помощью теста Краскела – Уоллисса. Результаты считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

В проведенном исследовании выделены образцы РНК (диапазон концентраций от 168,7 нг/мкл до 247,1 нг/мкл) с высоким уровнем чистоты ( $A_{260}/_{230} > 1,90$ ;  $A_{260}/_{280} > 2,00$ ; RIQ индекс  $> 9,5$ ). На основе полученных образцов РНК синтезировано более 1500 нг/мкл кДНК ( $A_{260}/_{230} > 1,90$  и  $A_{260}/_{280} > 1,80$ ).

Выявлено, что клапаны с признаками бактериальной инвазии характеризовались более низкими уровнями мРНК генов *vWF*, *CDH5*, *CDH2*, *COL1A2*, *COL4A1* (рисунок 4,5). Для генов *MMP2*, *MMP9*, *COL1A1*, *COL2A1*, не показано различий по уровню экспрессии.

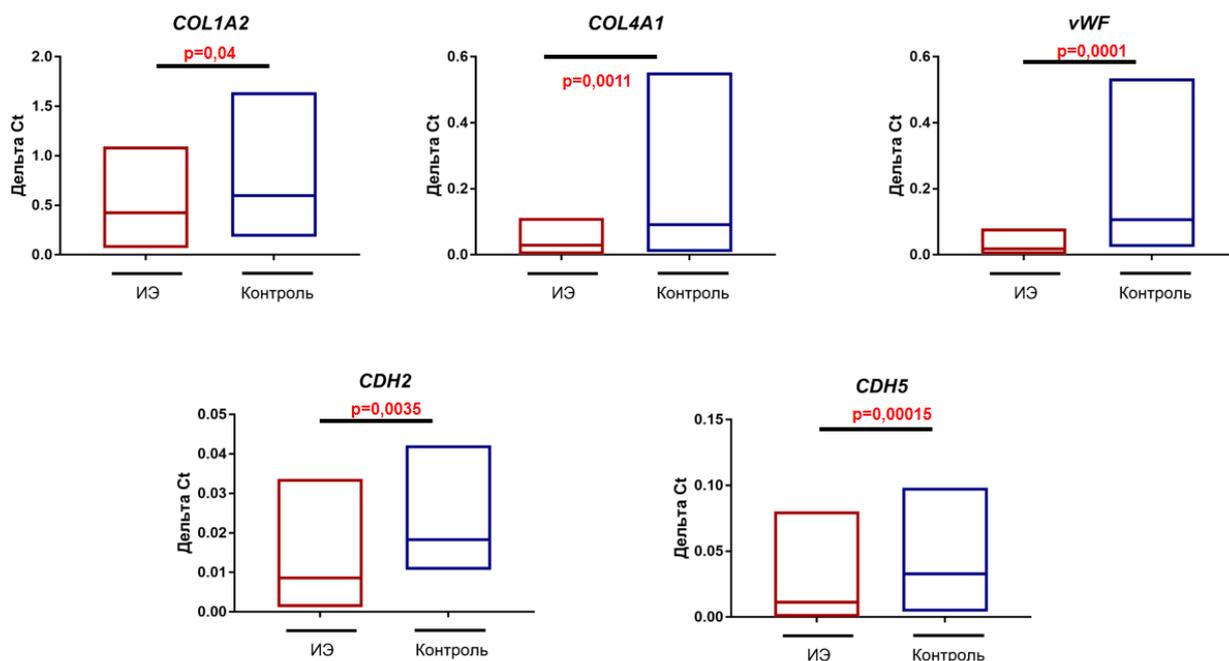


Рисунок 4 - Уровень мРНК исследуемых генов. *vWF* – Фактор фон Виллебранда, *CDH2* – N-кадгерин, *CDH5* – VE-кадгерин, *COL1A2* – коллаген I типа

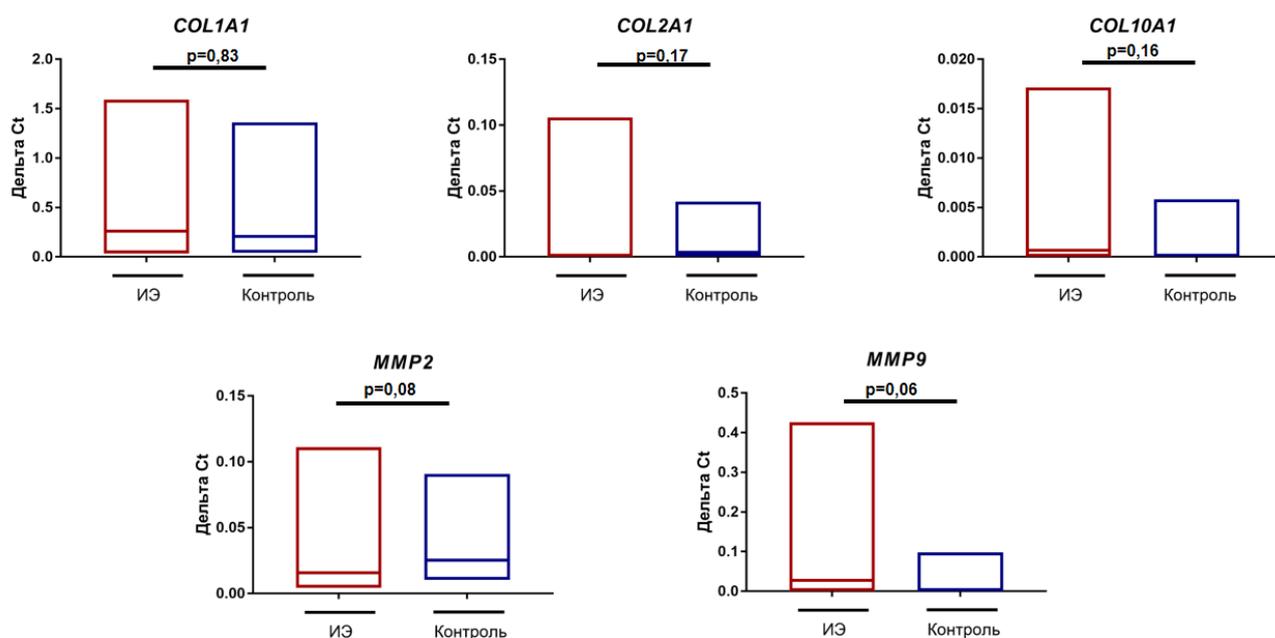


Рисунок 5 - Профилирование генной экспрессии в биоптатах нативных клапанов сердца. *MMP 2* – матриксная металлопротеиназа 2, *MMP9* – матриксная металлопротеиназа 9, *COL1A1* – коллаген I типа, *COL2A1* – коллаген II типа, *COL10A1* – коллаген X типа

Несмотря на значительные успехи в области кардиологии и кардиохирургии, ежегодно количество дисфункций как нативных, так и биопротезов клапанов продолжает неуклонно расти. Стоит отметить, что на сегодняшний день значительное внимание уделяется изучению нарушений функций биопротезов клапанов сердца [5], в тоже время механизмы дисфункции нативных клапанов не до конца изучены. Учитывая тяжесть заболевания и рост заболеваемости ИЭ особое значение приобретает изучение патофизиологических путей развития данного состояния. Одним из важнейших звеньев патогенеза ИЭ является повреждение эндотелия клапана сердца или пристеночного эндокарда, возникающее вследствие дегенеративных и воспалительных изменений. Повреждение эндотелиального слоя провоцирует каскад патологических процессов с участием про- и противовоспалительных факторов. Кроме того, прогрессирует тканевая гипоксия, а также происходит нарушение в системе гемостаза [31]. Также отмечается роль окислительного стресса и хронического воспаления на начальных этапах развития клапанной патологии [15].

## **1.6. Сравнение бактериальной флоры, выделенной из периферической крови и клапанных структур сердца пациентов с инфекционным эндокардитом**

В целях сравнительного анализа эффективности диагностики бактериемии, связанной с возбудителем инфекционного эндокардита, молекулярно-генетическим методом полимеразно-цепной реакции и посева на питательные среды провели определение спектра инфекционных возбудителей в образцах гомогената нативных клапанов сердца и крови пациентов с ИЭ

В процессе исследования обследовано 20 пациентов с подтверждённым диагностированным ИЭ, поступивших на госпитализацию с целью хирургической коррекции приобретенного порока клапана сердца в ФГБНУ «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (г. Кемерово, Россия) в 2019 г. Средний возраст пациентов составил  $58 \pm 2$  года. Материалом исследования служили образцы нативных клапанов сердца и венозной крови пациентов с ИЭ. Образцы крови для анализа микрофлоры у всех участников исследования собирали из локтевой вены в вакутейнер с ЭДТА. Фрагмент поврежденного клапана помещался в физ. раствор для дальнейшей гомогенизации.

Лабораторные методы включали в себя гомогенизацию материала тканей удаленных створок клапана сердца, выделение ДНК и типирование методом ПЦР в реальном времени.

Выделение ДНК из цельной крови проводилось с использованием наборов «ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА» (ООО ДНК-Технология, г. Москва, Россия). Вакутейнеры с цельной кровью размораживались и отстаивались в течение 1 ч при температуре  $4^{\circ}\text{C}$ , затем бережно перемешивались. Цельную кровь переносили в заранее приготовленную пробирку типа Эппендорф объемом 1,5 мл и использовали для выделения ДНК по стандартному

протоколу производителя наборов «ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА». Выделенную ДНК хранили при температуре -20°C.

Гомогенизация клапана проводилась в гомогенизаторе «FastPrep-24 5G» (MP Biomedicals, Индия). Для этого фрагменты клапана 5 мг помещались в пробирки «Metal Bead Lysing Matrix D». Выделение ДНК из гомогената клапана было проведено с помощью наборов «ДНК-СОРБЕНТ» (ООО НПФ «Литех», г. Москва, Россия). Гомогенат переносили в отдельную пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл и использовали для выделения ДНК по стандартному протоколу производителя наборов «ДНК-СОРБЕНТ». Выделенную ДНК хранили при температуре -20°C.

Детекция инфекционных микроорганизмов проводилась методом ПЦР-РВ с использованием ПЦР-тестов ООО НПФ «Литех» (г. Москва, Россия). Спектр тестов, использованных в исследовании: «СТРЕПТОПОЛ-А-РВ» (*Streptococcus pyogenes*), «СТРЕПТОПОЛ-В-РВ» (*Streptococcus agalacticae*), «ЭНТЕРОПОЛ-РВ» (*Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*), «СТАФИПОЛ-species-РВ» (*Staphylococcus spp.*), «СТРЕПТОПОЛ-species-РВ» (*Streptococcus spp.*), «БАКТОПОЛ-4-РВ» (*Bacteroides fragilis*, *vulgatus*, *thetaiomicron*, *ovatus*). ПЦР-тесты для определения микрофлоры представляют собой пробирки типа Эппендорф объемом 200 мкл с заранее внесенной в них готовой амплификационной смесью. Пробирки заранее размораживались, затем следует добавить 7 мкл ДНК с концентрацией 10нг/мкл. Отрицательный (разбавитель) и положительный контрольные образцы ДНК входят в состав ПЦР-теста. Определение микрофлоры, амплификацию проводили на амплификаторе Real-time CFX96 Touch («Bio-Rad Laboratories», США) в течение 40 циклов по следующему протоколу: денатурация – 15 с при 95°C, отжиг – 30 с при 60°C, элонгация – 40 с при 72°C, специфический сигнал – FAM, сигнал внутреннего контроля - HEX. Анализ результатов исследования проводили с помощью программы Bio-Rad CFX Manager 3.1. («Bio-Rad Laboratories», США).

Статистический анализ проводили с использованием программного

обеспечения StatSoft Statistica 10.0. Статистическая значимость различий между относительными показателями рассчитывалась с помощью критерия  $\chi$ -квадрат Пирсона. Для уменьшения вероятности ошибки первого типа в случаях, когда ожидаемые явления принимали значения от 10 до 5, использовали критерий  $\chi$ -квадрат с поправкой Йейтса; менее 5 - точный критерий Фишера. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

Исследование выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинской декларации. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБНУ НИИ КПССЗ. До включения в исследование у всех участников получено добровольное письменное информированное согласие.

При анализе полученных данных исследовании установлено, что почти все образцы клапанов сердца пациентов с ИЭ инфицированы *Streptococcus spp.* (95% случаев, что составляет 19 человек из числа обследованных), при этом *Streptococcus agalacticae* обнаружен у двух пациентов. Также довольно часто встречается *Staphylococcus spp.*, возбудитель обнаружен в 16 образцах гомогената клапана. При детекции других возбудителей выявлены только два случая *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.* (без идентификации вида в связи с ограниченностью наборов для молекулярного типирования), *Streptococcus pyogenes*, *Bacteroides fragilis*, *vulgatus*, *thetaitomicron*, *ovatus* не показали положительных результатов. При анализе образцов нуклеиновых кислот, выделенных из периферической крови пациентов с ИЭ, не было выявлено ни одного инфекционного возбудителя (Таблица 3).

Таким образом, в подострой фазе течения ИЭ молекулярно-генетическое исследование с использованием технологий ПЦР так же неэффективно в отношении обнаружения возбудителя в циркулирующем кровотоке, как и посев крови. Отсутствие молекулярных маркеров возбудителей в периферической крови показывает бесперспективность проведения рутинных микробиологических исследований на данном этапе

течения заболевания. При отсутствии данных о возбудителе, полученных на момент острого развития процесса и лихорадки, исследование гомогенизированных биоптатов клапанных структур сердца, удалённых во время операции, может позволить скорректировать антимикробную тактику в раннем послеоперационном периоде протезирования.

Таблица 3 - Бактериальный спектр, определенный в образцах крови и биоптата

	<i>Streptococcus pyogenes</i> (Гомогенат)	<i>Streptococcus pyogenes</i> (Кровь)	<i>Streptococcus agalactiae</i> (Гомогенат)	<i>Streptococcus agalactiae</i> (Кровь)	<i>Энтерокол (Enterobacter spp, Klebsiella spp)</i> (Гомогенат)	<i>Энтерокол (Enterobacter spp, Klebsiella spp)</i> (Кровь)	<i>Staphylococcus spp</i> (Гомогенат)	<i>Staphylococcus spp</i> (Кровь)	<i>Стрептокол (Streptococcus spp.)</i> (Гомогенат)	<i>Стрептокол (Streptococcus spp.)</i> (Кровь)	бактопол-4 (Гомогенат)	бактопол-4 (Кровь)
1	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
2	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
8	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-

Полученные данные свидетельствуют о сочетанном поражении клапанов, когда в одной вегетации присутствуют микроорганизмы разной родовой принадлежности, что ставит перед исследователями,

кардиохирургами, кардиологами и клиническими фармакологами новые задачи по определению тактики ведения таких пациентов, та как даже молекулярно-генетические тесты не являются информативными при определении микробного спектра в общем кровотоке при подостром инфекционном эндокардите

### **1.7. Определение значения вариабельности генов воспалительного ответа в предрасположенности к развитию ревматической болезни сердца**

Для определения значения вариабельности генов воспалительного ответа в предрасположенности к развитию ревматической болезни сердца у 251 пациента (187 женщин и 61 мужчина) с установленным диагнозом «ревматическая болезнь сердца» и у 300 условно-здоровых доноров (190 женщин и 110 мужчин) был проведен забор венозной крови из локтевой вены, для последующего выделения геномной ДНК. Средний возраст индивидуумов, включенных в исследуемую и контрольную группы составил 57 (29;77) и 53 (21;80) лет, соответственно. Исследование было одобрено Локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ, все участники подписали информированное согласие на участие в исследовании. Методом ПЦР в режиме реального времени с использованием TaqMan зондов проанализировано 18 полиморфных вариантов, располагающихся в генах, белковые продукты которых вовлечены в воспалительный ответ *IL1B* (rs1143634, rs16944), *IL6R* (rs2228145, rs2229238), *IL6* (rs1800796, rs1554606, rs2069827), *IL10* (rs1800871, rs1800872, rs1800896), *IL12RB1* (rs375947), *IL12B* (rs3212227), *TNF* (rs1799964, rs361525, rs1800629), *CRP* (rs3093077, rs1800947, rs1130864, rs1205).

Для статистической обработки данных использовали следующее программное обеспечение: SNPstats и GraphPad Prism. Расчёт нормальности распределения выборки осуществляли методом Краскела-Уоллиса. Анализ

ассоциаций генотипов с риском развития РБС проводили с использованием хи-квадрата Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность или точного критерия Фишера между индивидуумами контрольной и исследуемой групп. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

Сравнительный анализ показал, что с риском развития РБС ассоциированы генотипы Т/Т гена *IL10* (rs1800871) ( $p=0.02$ ) и Т/Т гена *IL10* (rs1800872) ( $p=0.027$ ) по кодоминантной модели наследования, а также генотипы Т/Т гена *CRP* (rs1205) ( $p=0.015$ ) и G/G гена *IL12RB* (rs375947) ( $p=0.037$ ) – по рецессивной модели наследования (Рис. 6). С другими полиморфными вариантами статистически значимых результатов не получено.

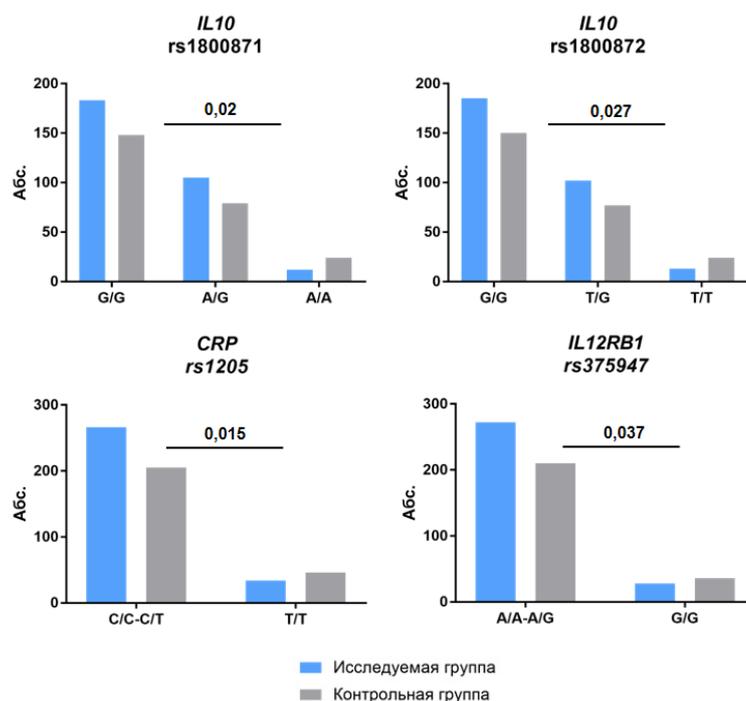


Рисунок 6 - Распределение генотипов генов воспалительного ответа в исследуемой и контрольной группах

Разделение исследуемой выборки по признаку поло-возрастной принадлежности не показало статистически значимых различий при разделении по полу, однако выявлены некоторые закономерности при стратификации групп по возрасту. Так, показано, что с риском развития РБС

в группе пациентов до 60 лет ассоциированы генотипы А/А полиморфного варианта rs1800871 *IL10* (ОШ=2.88 95%ДИ 1.18-7.04), Т/Т полиморфного варианта rs1800872 *IL10* (ОШ=2.83 95%ДИ 1.20-6.68) и Т/Т полиморфного варианта rs1205 *CRP* (ОШ=2.30 95%ДИ 1.17-4.53) (Рис.7).

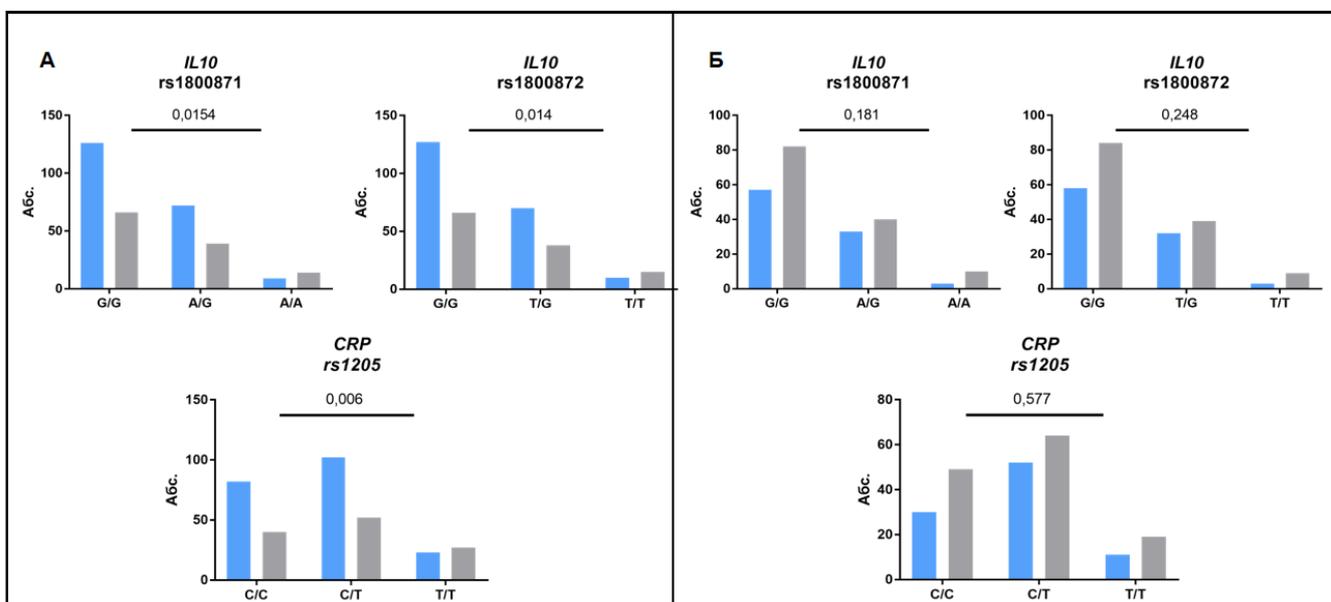


Рисунок 7 - Ассоциации генотипов с предрасположенностью к развитию РБС в зависимости от возраста: А – пациенты до 60 лет, Б – пациенты старше 60 лет

Полиморфные варианты генов *IL10* (rs1800871 и rs1800872), *IL12RB1* (rs2375947) и *CRP* (rs1205) могут являться важным звеном патогенеза РБС и в дальнейшем использованы как биологические маркеры для персонифицированной оценки риска развития данного патологического состояния. Однако необходимо дальнейшее изучение не только образцов геномной ДНК пациентов, но и иссечённых нативных клапанов сердца, для более детальной расшифровки молекулярно-генетических механизмов развития РБС.

### 1.8. Поиск ассоциаций генов иммунного ответа и метаболизма липидов с рисками развития ожирения и липидного обмена у пациентов среднего и пожилого возраста

Для исследования отобрано 560 индивидуумов средний возраст которых составил 59 лет (44;75), проживающих на территории Западной Сибири и проходящих скрининговое обследование на базе НИИ КПССЗ. Характеристика исследуемых представлена в Таблице 4.

Таблица 4 - Характеристика пациентов, включенных в исследование

Показатель	N (%)
Мужчины	319 (57)
Женщины	241 (43)
Возраст $\leq$ 60 лет (средневозрастные пациенты)	382 (68)
Возраст $>$ 60 лет (пожилые пациенты)	178 (32)
ИМТ $\geq$ 30 kg/m <sup>2</sup>	220 (39)
ИМТ $\geq$ 30 kg/m <sup>2</sup> у средневозрастных пациентов	156 (41)
ИМТ $\geq$ 30 kg/m <sup>2</sup> у пожилых пациентов	64 (36)

Выделение ДНК проводили методом фенол-хлороформной экстракции из цельной венозной крови, забор которой проводился у пациентов из локтевой вены в пробирку КЗЕДТА. Оценку качества и количество выделенной геномной ДНК проводили на спектрофотометре NanoDrop™ 2000 («ThermoScientific», США). Методом ПЦР в режиме реального времени проведено генотипирование 52 полиморфных вариантов 20 генов иммунного ответа и метаболизма липидов. Амплификацию проводили при помощи прибора ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA).

Статистический анализ выполнен с использованием программного обеспечения STATISTICA 10.0 (StatSoft, США). Количественные данные

были проверены критерием хи-квадрат Йейтса или точным критерием Фишера. Результаты генотипирования проанализированы при помощи онлайн программы SNPStats (Sole et al. 2006). Наиболее вероятная модель наследования для каждого конкретного полиморфизма гена определялась с использованием информационного критерия Акаике (AIC). Различия были статистически значимыми с  $p < 0,05$ .

Установлено, что с риском развития ожирения ассоциированы следующие полиморфные варианты генов иммунного ответа *IL6R* rs2229238, ОШ = 1,92, 95% ДИ = 1,36-2,7,  $p = 0,0002$  по доминантной модели; *IL18* rs1946518, ОШ = 1,45, 95%ДИ = 1,03-2,04,  $p = 0,033$  по сверхдоминантной модели, а также два варианта генов липидного обмена *LPA* rs10455872, ОШ = 1,86, 95%ДИ = 1,07-3,21,  $p = 0,026$  по лог-аддитивной модели; *LEPR* rs1137100, ОШ = 2,88, 95% ДИ = 1,52-5,46,  $p = 0,001$  по рецессивной модели. Кроме того, показан протективный эффект в отношении развития ожирения для полиморфных вариантов rs4073 и rs2227306 гена *CXCL8* (ОШ = 0,56, 95% ДИ = 0,37-0,86,  $p = 0,0065$  и ОШ = 0,49, 95% ДИ = 0,31-0,79,  $p = 0,0025$ , соответственно). (Рис.8)

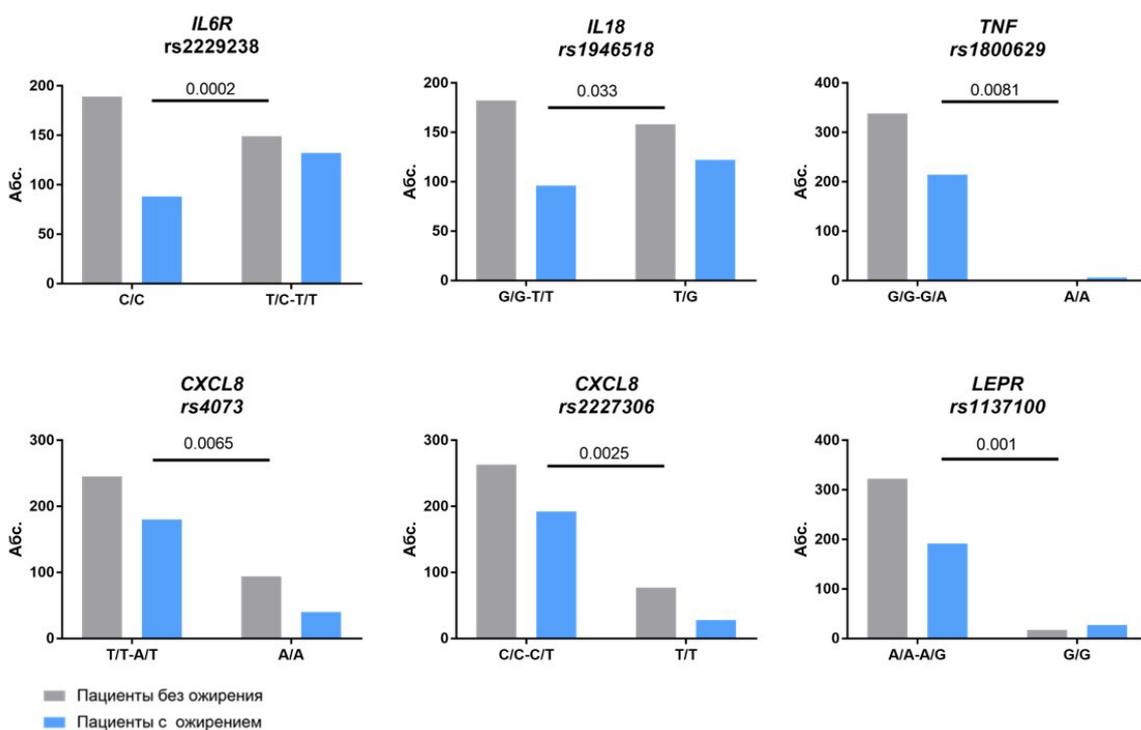


Рисунок 8 - Распределение генотипов генов иммунного ответа и метаболизма липидов в исследуемых группах

Сравнительный анализ частоты встречаемости генотипов у мужчин и женщин позволил выявить следующие закономерности: генотип T/C полиморфного варианта rs2229238 гена *IL6R* и генотип G/G варианта rs1137100 в гене *LEPR* связаны с повышенным риском ожирения только у мужчин (ОШ = 2,27, 95% ДИ = 1,40-3,70,  $p = 0,0003$  и ОШ = 2,80, 95% ДИ = 1,27-6,17,  $p = 0,028$  соответственно), а генотип T/G rs1946518 гена *IL18* – у женщин (ОШ = 2,02, 95% ДИ = 1,07–3,83,  $p = 0,03$ ). Протективный эффект показан для генотипа T/T rs2227306 гена *CXCL8* у женщин (ОШ = 0,44, 95% ДИ = 0,20-0,95,  $p = 0,04$ ) и генотипа G/G rs11685424 *IL1RL1* у мужчин (ОШ = 0,46, 95% ДИ = 0,23-0,94,  $p = 0,023$ ) (таблица 5).

Таблица 5 - Ассоциации генотипов с риском развития ожирения в зависимости от возраста

Ген	Пол	Генотип	Без ожирения, N	Ожирение, N	ОШ (95%ДИ)	p
<i>IL6R</i> rs2229238	Мужчины	C/C	112	43	1.00	0.002
		T/C	73	64	<b>2.27 (1.40-3.70)</b>	
		T/T	15	10	1.74 (0.73-4.17)	
	Женщины	C/C	77	45	1.00	0.08
		T/C	50	48	1.65 (0.96-2.83)	
		T/T	11	10	1.57 (0.62-4.00)	
<i>CXCL8</i> rs2227306	Мужчины	C/C	66	42	1.00	0.5
		C/T	92	61	1.04 (0.63-1.72)	
		T/T	44	14	0.51 (0.25-1.04)	
	Женщины	C/C	37	35	1.00	0.04
		C/T	68	54	0.83 (0.46-1.49)	
		T/T	33	14	<b>0.44 (0.20-0.95)</b>	
<i>IL1RL1</i> rs11685424	Мужчины	A/A	58	37	1.00	0.023
		G/A	91	65	1.12 (0.67-1.89)	
		G/G	51	15	<b>0.46 (0.23-0.94)</b>	
	Женщины	A/A	45	30	1.00	0.43
		G/A	67	49	1.11 (0.61-2.01)	
		G/G	26	24	1.39 (0.68-2.87)	
<i>IL18</i> rs1946518	Мужчины	G/G	70	43	1.00	0.48
		T/G	94	59	1.01 (0.61-1.66)	
		T/T	38	15	0.63 (0.31-1.28)	
	Женщины	G/G	41	20	1.00	0.03
		T/G	64	63	<b>2.02 (1.07-3.83)</b>	
		T/T	33	18	1.10 (0.50-2.41)	
<i>LEPR</i> rs1137100	Мужчины	A/A	105	53	1.00	0.028
		A/G	83	45	1.07 (0.66-1.75)	
		G/G	13	18	<b>2.80 (1.27-6.17)</b>	
	Женщины	A/A	76	44	1.00	0.004
		A/G	58	49	1.48 (0.87-2.53)	
		G/G	4	9	4.04 (1.17-13.94)	

Кроме того, получены ассоциации для средневозрастных и пожилых пациентов (Таблица 6). Так, для пациентов среднего возраста (возраст  $\leq 60$  лет) показано, что генотип G/G полиморфного варианта rs1137100 *LEPR* ассоциирован с четырехкратным увеличением риска ожирения (ОШ = 4,23, 95% ДИ = 1,74-10,28,  $p = 0,03$ ). Такая же тенденция была показана для аллеля T rs2229238 *IL6R*.

Таблица 6 - Ассоциации полиморфных вариантов генов с риском развития ожирения в зависимости от возраста

Ген	Возраст	Генотип	Без ожирения, N	Ожирение, N	ОШ (95%ДИ)	p
<i>IL6R</i> rs22281454	≤ 60 лет	A/A	94	88	1.00	0.004
		A/C	107	59	<b>0.58 (0.38-0.90)</b>	
		C/C	24	9	<b>0.40 (0.18-0.90)</b>	
	> 60 лет	A/A	63	25	1.00	0.027
		A/C	40	32	<b>2.03 (1.05-3.91)</b>	
		C/C	10	7	1.70 (0.58-4.98)	
<i>IL6R</i> rs2229238	≤ 60 лет	C/C	130	59	1.00	0.015
		T/C	82	81	<b>2.21 (1.43-3.41)</b>	
		T/T	14	16	<b>2.53 (1.16-5.53)</b>	
	> 60 лет	C/C	59	29	1.00	0.49
		T/C	41	31	1.54 (0.80-2.93)	
		T/T	12	4	0.67 (0.20-2.25)	
<i>CXCL8</i> rs4073	≤ 60 лет	T/T	59	50	1.00	0.027
		A/T	100	79	0.93 (0.58-1.51)	
		A/A	67	27	<b>0.46 (0.26-0.83)</b>	
	> 60 лет	T/T	32	21	1.00	0.07
		A/T	54	30	0.84 (0.41-1.71)	
		A/A	27	13	0.74 (0.31-1.75)	
<i>CXCL8</i> rs2227306	≤ 60 лет	C/C	65	54	1.00	0.04
		C/T	110	82	0.89 (0.56-1.40)	
		T/T	51	20	<b>0.45 (0.24-0.86)</b>	
	> 60 лет	C/C	38	23	1.00	0.05
		C/T	50	33	1.08 (0.55-2.14)	
		T/T	26	8	0.52 (0.20-1.36)	
<i>CRP</i> rs1130864	≤ 60 лет	G/G	115	79	1.00	0.19
		G/A	98	62	0.91 (0.59-1.39)	
		A/A	13	15	1.70 (0.77-3.78)	
	> 60 лет	G/G	55	22	1.00	0.01
		G/A	47	37	<b>1.98 (1.03-3.83)</b>	
		A/A	12	5	1.04 (0.33-3.29)	
<i>LEPR</i> rs1137100	≤ 60 лет	A/A	125	70	1.00	0,03
		A/G	93	67	1.29 (0.84-1.98)	
		G/G	8	18	<b>4.23 (1.74-10.28)</b>	
	> 60 лет	A/A	56	27	1.00	0.15
		A/G	48	27	1.14 (0.59-2.20)	
		G/G	9	9	2.12 (0.75-5.98)	
<i>TLR2</i> rs3804099	≤ 60 лет	T/T	86	64	1.00	0.36
		T/C	106	68	0.86 (0.55-1.34)	
		C/C	34	24	0.95 (0.52-1.77)	
	> 60 лет	T/T	56	16	1.00	0.01
		T/C	41	30	<b>2.55 (1.23-5.28)</b>	
		C/C	17	17	<b>3.35 (1.39-8.04)</b>	

Среди пациентов пожилого возраста (возраст > 60 лет) рискованный эффект продемонстрирован для генотипа G/A rs1130864 гена *CRP* (ОШ = 1,98, 95% ДИ = 1,03-3,83,  $p = 0,01$ ) и для аллеля С rs3804099 гена *TLR2*. В то же время у пациентов среднего возраста с генотипами A/A и T/T в гене *CXCL8* (rs4073 и rs2227306 соответственно) риск ожирения снижен в 2 раза (таблица 6). Стоит отметить, что аллель С полиморфного варианта rs2228145 гена *IL6R* для ассоциирован со сниженным риском ожирения у пациентов среднего возраста, тогда как у пациентов пожилого возраста этот аллель приобретает повышенный риск развития ожирения.

Таким образом, полиморфизм генов воспалительного ответа может быть связан как с увеличением, так и с уменьшением рисков развития ожирения у лиц европеоидной расы, проживающих на территории Западной Сибири (Россия). Отдельные полиморфные варианты генов липидного обмена ассоциированы с увеличением риска развития ожирения

## **2. РАЗРАБОТКА МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ ДЛЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ХИРУРГИИ**

### **2.1. Изучение ксеноантигенов в биоматериале, консервированном диглицидиловым эфиром этиленгликоля**

Исследование биоматериала, консервированного диглицидиловым эфиром этиленгликоля, на предмет остаточного содержания ксеноантигенов состояло из двух последовательных этапов. В ходе реализации первого этапа мы оценивали способность обработки диэпоксидными соединениями разрушать или маскировать содержащуюся в биоматериале ГНК. С этой целью мы использовали фрагменты 5 лоскутов эпоксиобработанного бычьего перикарда «КемПерипласНео» (ЗАО «НеоКор», Россия), применяемого в производстве биопротезов. В качестве положительного контроля мы использовали нефиксированный бычий перикард, любезно предоставленный

ЗАО «НеоКор» (Россия). В качестве отрицательного контроля выступали створки трёх аортальных клапанов человека, удалённых в ходе операций протезирования по причине кальцинирующего аортального стеноза.

Образцы использовали для изготовления криосрезов толщиной 6 мкм, которые в дальнейшем окрашивали антителами курицы к ГНК (146903, BioLegend, США). Для осуществления иммуногистохимической реакции использовали противокуриные козы антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (ab97135, Abcam, Великобритания), раствор человеческого сывороточного альбумина (A1653-5G, Sigma-Aldrich, США), а также некоторые реактивы (пероксидазный блок, 0,087% раствор диаминобензидина и гематоксилин для докрасивания срезов) из набора NovoLink Polimer Detection System (RE7150-CE, Leica Biosystems, США). В качестве отрицательного контроля антител использовали срезы, окрашиваемые без добавления первичного или вторичного антител. Анализ срезов с иммуногистохимическими окрасками осуществляли посредством светового микроскопа AxioImager.A1 (Zeiss, Германия), обработку изображений производили с помощью программы AxioVision (Zeiss, Германия).

По результатам изучения срезов необработанного бычьего перикарда, инкубированных с антителом к ГНК, было выявлено интенсивное положительное окрашивание, солокализованное с присутствующими в биоткани остаточными клетками донора (рис.9). Также окрашивание на ГНК наблюдали вдоль коллагеновых волокон ксеноперикарда. Аналогичная картина отмечена и при анализе срезов интактного эпоксиобработанного бычьего перикарда. Створки аортальных клапанов человека (отрицательный контроль) не показали признаков присутствия ГНК. На основе этих данных сделан вывод, что стабилизация биоматериала с применением диглицидилового эфира этиленгликоля не даёт дополнительных преимуществ в снижении ГНК-обусловленной иммуногенности ксенобиоматериала относительно более распространённой обработки

глутаровым альдегидом.

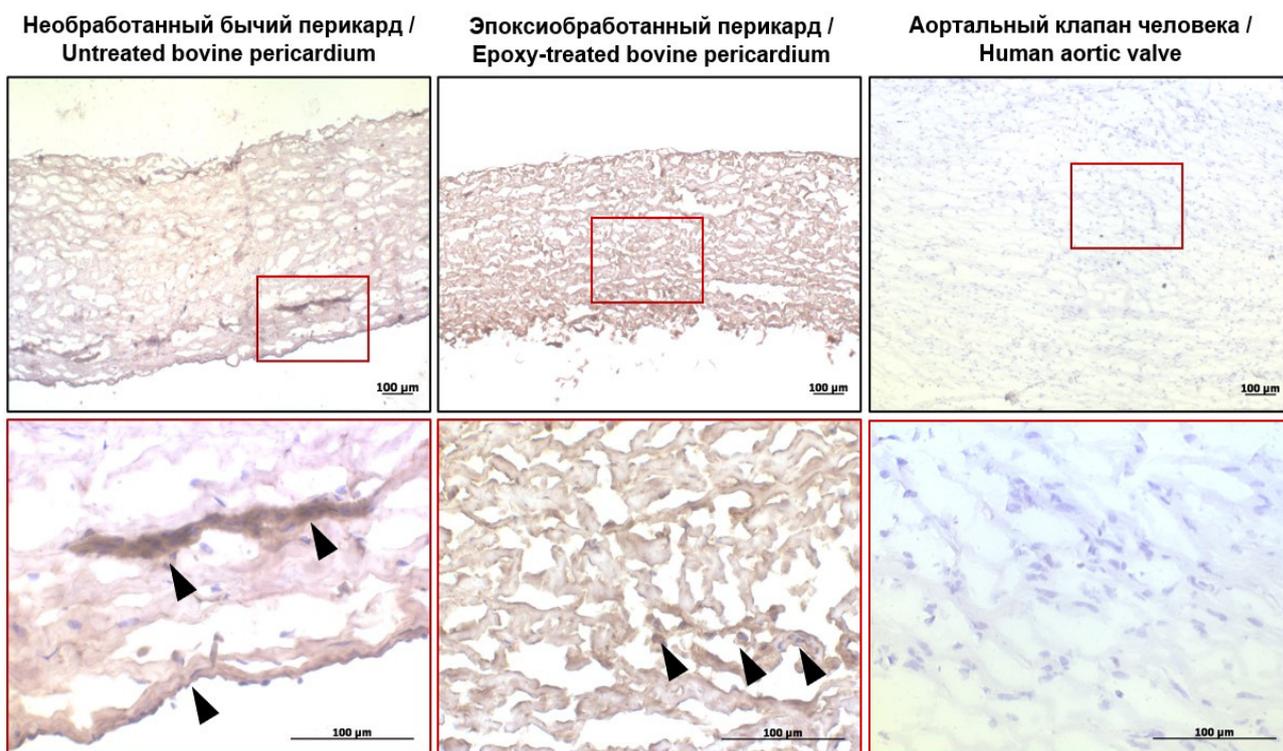


Рисунок 9 - Результаты иммуногистохимического окрашивания исследуемых биологических тканей антителом к N-гликолилнейраминной кислоте. Стрелки указывают на клеточный компонент ксеноперикарда. Обратите внимание на отсутствие положительного окрашивания, ассоциированного с клетками или волокнистым компонентом ткани в нативных аортальных клапанах человека (отрицательный контроль)

Целью второго этапа исследования стало определение временных рамок, в течение которых ГНК сохраняется в биоматериале имплантированных пациентам эпоксиобработанных биопротезов. Для этого нами были изучены фрагменты створок 8 ксеноперикардиальных биопротезов моделей ЮниЛайн (n=5) и ТиАра (n=3) (ЗАО НеоКор, Кемерово, Россия), иссечённых соответственно из митральной и аортальной позиций в ходе операций репротезирования у 8 реципиентов. Сроки функционирования полученных имплантатов составили от 1 дня до 68 месяцев (таблица 7). Причины дисфункций протезных клапанов в раннем послеоперационном периоде (2-42 дня) включали острый тромбоз и деформацию проволочного каркаса, приведшие соответственно к стенозированию и недостаточности имплантатов. Эксплантация биопротезов,

функционировавшего 1 день, не была связана с его дисфункцией и выполнена в ходе экстренного хирургического вмешательства по причине разрыва задней стенки левого желудочка. Причиной дисфункции биопротезов, удалённых через 30-68 месяцев, стала структурная дегенерация их биологического компонента.

Таблица 7 - Характеристика изученных биопротезов клапанов сердца и их реципиентов

Случай	Пол пациента	Возраст пациента (лет)	Время функционирования биопротеза	Причина дисфункции
1	Женщина	71	1 день	Эксплантация не связана с дисфункцией
2	Женщина	72	2 дня	Острый тромбоз
3	Женщина	72	20 дней	Деформация каркаса
4	Мужчина	75	42 дня	Деформация каркаса
5	Женщина	68	30 месяцев	Структурная дегенерация
6	Мужчина	72	34 месяцев	Структурная дегенерация
7	Женщина	77	63 месяца	Структурная дегенерация
8	Мужчина	66	68 месяцев	Структурная дегенерация

Подготовку срезов створчатого аппарата иссечённых биопротезов, окрашивание антителами к ГНК и последующий анализ производили в соответствии с вышеописанной методикой.

Обработка антителами к ГНК створок иссечённых эпоксиобработанных биопротезов продемонстрировала значительную разницу в интенсивности окрашивания, зависящую от времени функционирования имплантатов (рис. 10). В частности, характер окрашивания функционировавших до полутора

месяцев имплантатов не различался между собой и не отличался от такового нативного и интактного эпоксиобработанного бычьего перикарда.

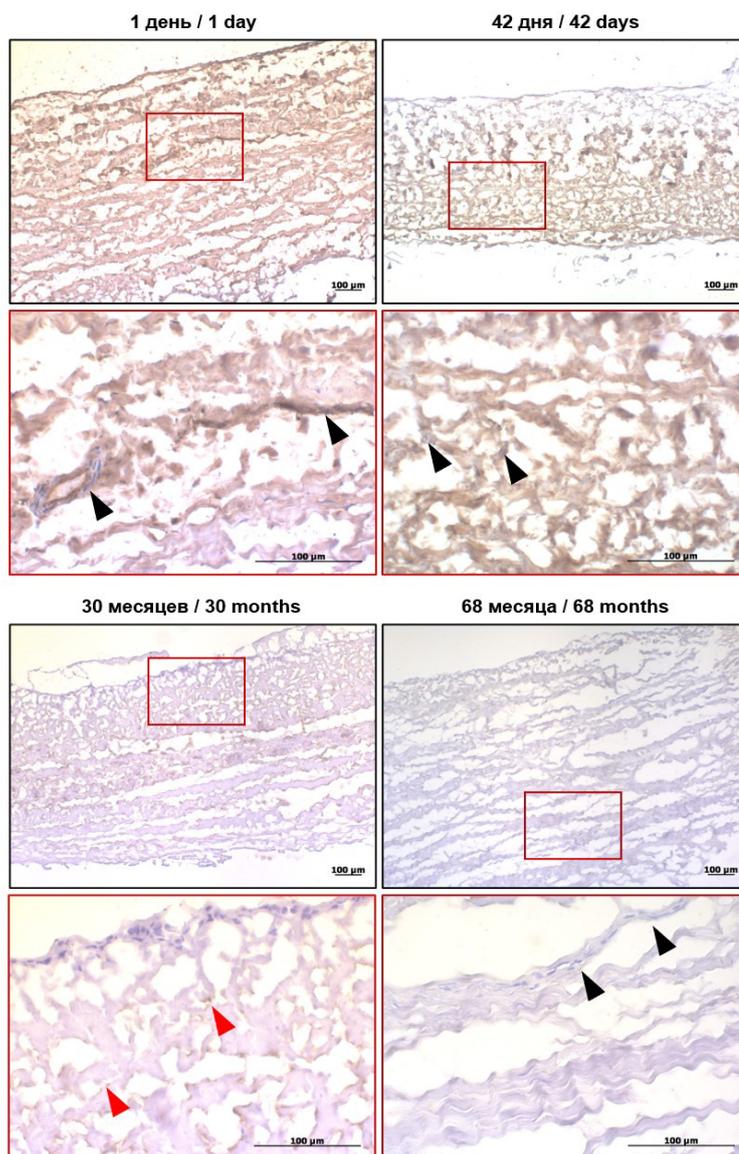


Рисунок 10 - Результаты иммуногистохимического окрашивания створок эпоксиобработанных ксеноперикардальных биопротезов клапанов сердца антителом к ГНК. Чёрные стрелки - остаточные клетки донора и клеточный дебрис. Красные стрелки - слабое положительное окрашивание, свидетельствующее о следовом присутствии ГНК

Окрашивание створок биопротезов, иссечённого через 30 месяцев после имплантации, показало следовое присутствие ГНК во внеклеточном матриксе, при этом слабое положительное окрашивание наблюдалось как вдоль коллагеновых волокон, так и на поверхности остаточных клеток донора. Наконец, эксплантированные через 34, 63 и 68 месяцев протезные клапаны не демонстрировали положительного окрашивания на ГНК.

Таким образом, важнейшей составляющей нашего исследования следует назвать выявление сроков, в течение которых ГНК присутствующая в структуре эпоксиобработанных биопротезов и остаётся доступной для связывания с антителами. Они составляют не более 2,5 лет. Эти данные свидетельствуют о том, что ГНК может выступать в качестве триггера хронического воспалительного поражения имплантатов, возникающего после протезирования. Также ГНК может быть одним из главных триггеров раннего отторжения биопротезов.

## **2.2. Разработка концепта коронарного стент-графта с биodeградируемой оболочкой**

Исследование концепта коронарного стент-графта проводили в две последовательные стадии: натурная оценка физико-механических свойств материалов-кандидатов для формирования оболочки и численное моделирование биомеханики конструкции в сборе.

Для первого этапа – *in vitro* оценки свойств материалов для изготовления мембраны, отбирали биodeградируемые полимеры, широко представленные в исследовательских работах: поликапролактон [24], сополимер полилактид-со-капролактон [59] и полидиоксанон [58]. Исследования проводили в условиях одноосного теста растяжения на универсальной испытательной машине «Zwick/Roell»-2.5Н. В качестве образцов для испытания использовали лоскуты из описанных полимерных материалов на электроспиннинге Nanon-01А. Данная технология является одним из вариантов создания покрытий для стент-графтов благодаря возможности формировать полимерный слой на сложных поверхностях, в частности, стенте.

Всего было изготовлено три образца мембран толщиной 350 (290-410) мкм площадью 39 см кв. (листы 7,8x5 см), из которых изготавливали по 7 образцов гантелеобразной формы, согласно требованиям ГОСТ ISO 37–2020, тип 4. Каждый образец фиксировали в удерживающих устройствах испытательной машины и растягивали в продольном направлении таким

образом, чтобы обеспечить разрыв образца. В процессе фиксировали кривые «напряжение-деформация» и итоговые количественные характеристики: предел прочности по напряжению и деформации, максимальную силу, возникающую при растяжении образцов.

В ходе исследования показано, что наилучшими механическими характеристиками с позиции разработки стент-графта обладает материал №2 – сополимер полилактид-со-капролактон (таблица 8), продемонстрировавший наивысшее напряжение и наибольшую деформацию при разрыве. Важнейшей характеристикой мембраны стент-графта должна явиться способность материала растягиваться до больших состояний, т.к. конструкция в процессе своей имплантации способна претерпевать значительные изменения диаметров. Мембрана должна следовать за расширением стента и, при этом, сохранять свою целостность, чтобы обеспечить надежную герметизацию места перфорации. Из анализа (таблица 9) видно, что материалы №1 и №3 уступают данному критерию. Деформация для них составила значительно меньшие значения, чем для сополимера полилактид-со-капролактон.

Таблица 9 - Физико-механические характеристики полимерных материалов-кандидатов для изготовления мембран стент-графта

№	Полимер	Напряжение разрыва, МПа	Деформация разрыва, %	Модуль упругости при разрыве, МПа
1	Поликапролактон	0,49 [0,43; 0,53]	194,3 [149,9; 211,5]	0,25 [0,25; 0,86]
2	Сополимер полилактид-со-капролактон	6,56 [5,31; 8,18]	1492,1 [1010,2; 1619,1]	0,43 [0,31; 0,53]
3	Полидиоксанон	4,81 [4,10; 5,11]	238,1 [199,1; 318,5]	2,42 [1,25; 3,86]

*Примечание: все данные представлены как медиана и [25,75]-центили*

Модуль упругости, как характеристика жесткости материала, различался значимо. Так, наиболее жестким оказался материал №3, что закономерно: высокое напряжение разрыва сочетается с низкой максимальной деформацией (медиана 238,1%). Такой материал, потенциально, малопригоден для реализации проектируемой конструкции – для растяжения мембраны из полидиоксанона потребуются дополнительное значительное усилие при имплантации, однако данный аспект будет исследован более детально далее. Обратную ситуацию демонстрируют поликапролактон и сополимер полилактид-со-капролактон – умеренно «мягкие» материалы, которые, кроме того, обладают значительной растяжимостью.

Вторым этапом настоящего исследования стало численное моделирование биомеханики коронарного стент-графта, основной целью которого явилась оценка напряженно-деформированного состояния всех компонентов конструкции в ходе придания устройству рабочего диаметра. Исходная геометрия стента имеет наружный диаметр 1,8 мм, а нанесенная сверху мембрана формирует дополнительный слой 0,1 мм. Таким образом, итоговый наружный диаметр конструкции составляет 2,0 мм. Предполагается, что данный стент-графт должен быть деформирован до 3,0 мм, т.е. на 50% от исходного. Именно такое деформирование и будет смоделировано в настоящем исследовании (рис. 11. А-Г).

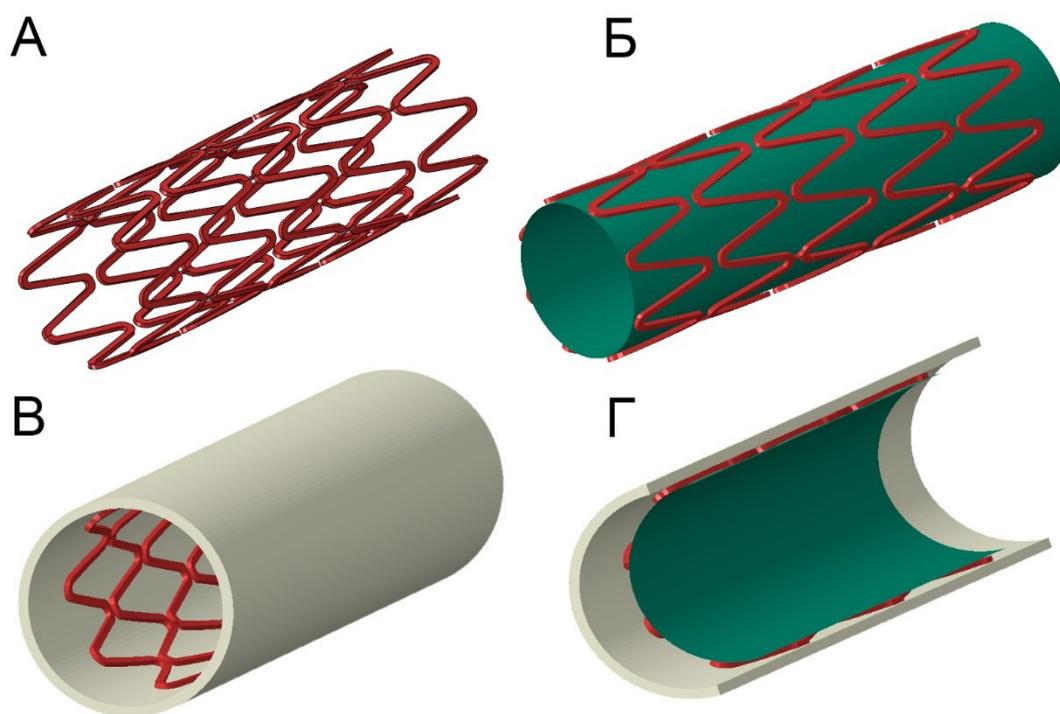


Рисунок 11 - Этапы моделирования биомеханики коронарного стент-графта: А – исходное состояние стента; Б – стент и поверхность, имитирующая баллон; В – модель стент-графта в сборе; Г – продольный разрез модели стент-графта и модели баллона

Численное моделирование процесса придания рабочего диаметра стент-графта проводили в среде инженерного анализа Abaqus/CAE (Dassault systemes, Франция). Трехмерную модель прототипа коронарного стента импортировали в данное программное обеспечение, после чего создавали сетку конечных элементов на основе гексаэдров типа C3D8 (12825 элементов и 25740 узлов). В качестве мембраны стент-графта использовали объемное цилиндрическое тело. Придание рабочего диаметра (3 мм) осуществляли путем взаимодействия модели стента с цилиндрической поверхностью, имитирующей дилатационный баллон (Рис. 11 Б и Г).

Моделью материала для стента стало линейное описание нержавеющей стали согласно литературным данным: модуль упругости 196 ГПа; 0.2% предел текучести 592 МПа; предел прочности 884 МПа. Моделью материала для мембраны стали линейные описания трех исследованных на первом этапе материалов: поликапролактон, сополимер полилактид-со-капролактон и

полидиоксанон (согласно табл. 9). Баллон описан поверхностью без придания свойств.

Контакт между телами описывали моделью Колумба, попарно определяя объекты, вступающие во взаимодействие: баллон-стент; стент-мембрана. В качестве решателя выступил Abaqus Explicit, реализующий явную интеграцию по времени и учет динамических явлений при оценке биомеханики стент-графта.

Учитывая комплексную биомеханику работы устройств, результаты моделирования его поведения необходимо рассматривать сперва отдельно – анализируя стент и мембрану, а затем – в целом, как конструкцию сборки. При придании рабочего диаметру стенту в отдельных его узлах происходит переход эластической деформации в пластическую, благодаря чему закрепляется итоговая форма (Рис. 12 Б).

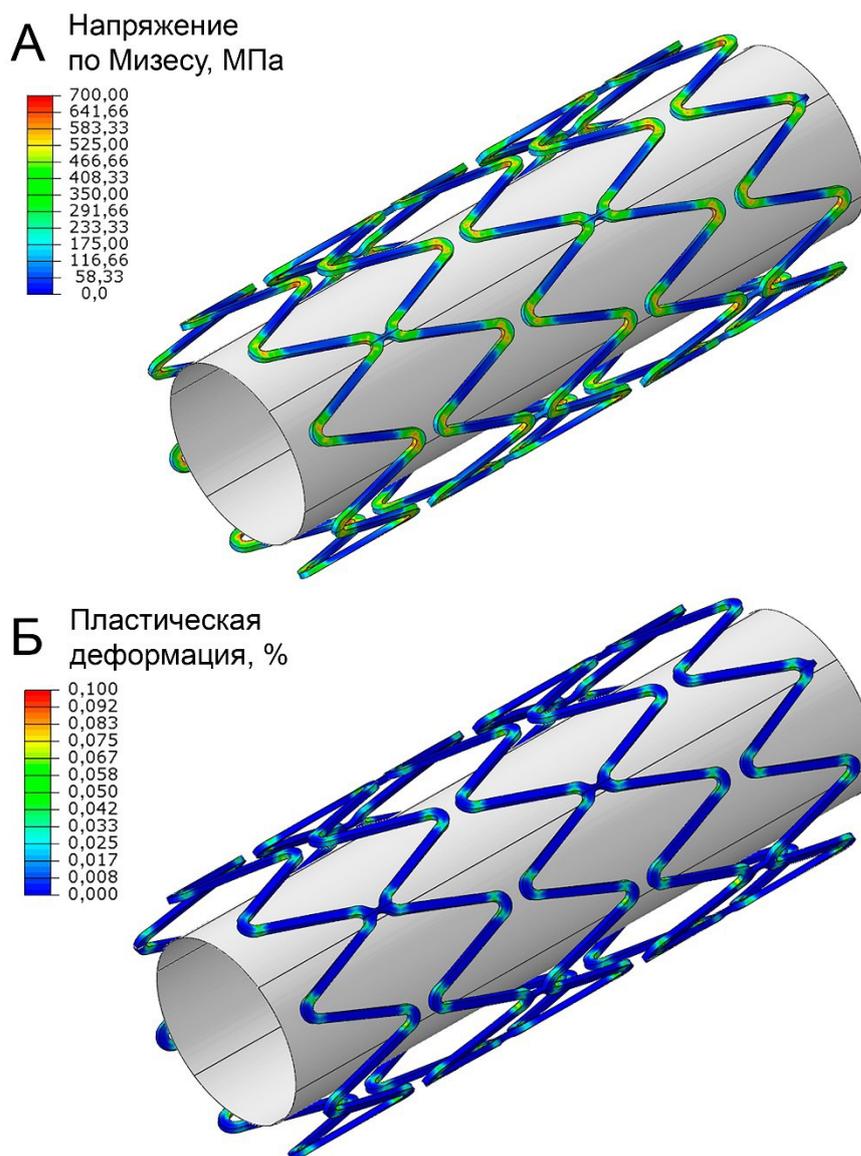


Рисунок 12 - Визуализация напряженно-деформированного состояния стента после придания рабочего диаметра: А – напряжение по Мизесу; Б – пластическая деформация

Количественно этот эффект продемонстрирован в виде амплитуды напряжения по Мизесу, которая достигает 621,0-676,2 МПа (Рис. 12 А). С одной стороны, данные напряжения ожидаемо превышают предел текучести (592 МПа), и, таким образом, модель материала стента реализует свою функцию сохранения формы после раздувания баллона за счет пластической (необратимой деформации). С другой стороны, напряжения не достигают предела прочности (884 МПа), т.е. не сопровождаются разрушением элементов. Отдельно стоит отметить эластический «отскок» – рекойл,

который приводит к падению диаметра стента после сдувания баллона. Такое поведение ожидаемо и обусловлено релаксацией эластической компоненты материала к нулевым значениям. В данном случае рекойл составил 4%, что, в целом, является приемлемой долей, сравнимой с аналогичными изделиями для лечения сердечно-сосудистых заболеваний на основе стентовых конструкций.

Поведение второго компонента стент-графта – мембраны, значительно различалось в зависимости от материала, что обусловлено, прежде всего, различиями физико-механических характеристик. На основе количественно оценки модуля упругости (согласно Табл. 2), материалы можно ранжировать по росту данного показателя в последовательности: поликапролактон (0,25МПа) >> сополимер полилактид-со-капролактон (0,43 МПа) >> полидиоксанон (2,42 МПа). Именно в такой последовательности наблюдали и распределение напряжений по Мизесу между материалами при моделировании. Минимальное напряжение продемонстрировал самый «мягкий» материал поликапролактон: 0,269 МПа; максимальное – самый «жесткий» материал полидиоксанон, достигший 2,842 МПа. Сополимер полилактид-со-капролактон достигал промежуточных значений – 0,481 МПа. Данный результат вполне ожидаем: всем материалам необходимо растянуться до одинакового рабочего диаметра стента (3 мм), поэтому чем выше их модуль упругости, тем выше возникающие напряжения, т.к. деформация одинакова. Качественный анализ эпюр распределения данного показателя в модели мембраны продемонстрировал неравномерно распределение напряжения, связанное с местами контакта стента и мембраны (рис. 12). Однако, даже при такой неравномерности мы не наблюдали критических напряжения (выше предела прочности материалов), что свидетельствует о применимости данных полимеров в качестве мембран.

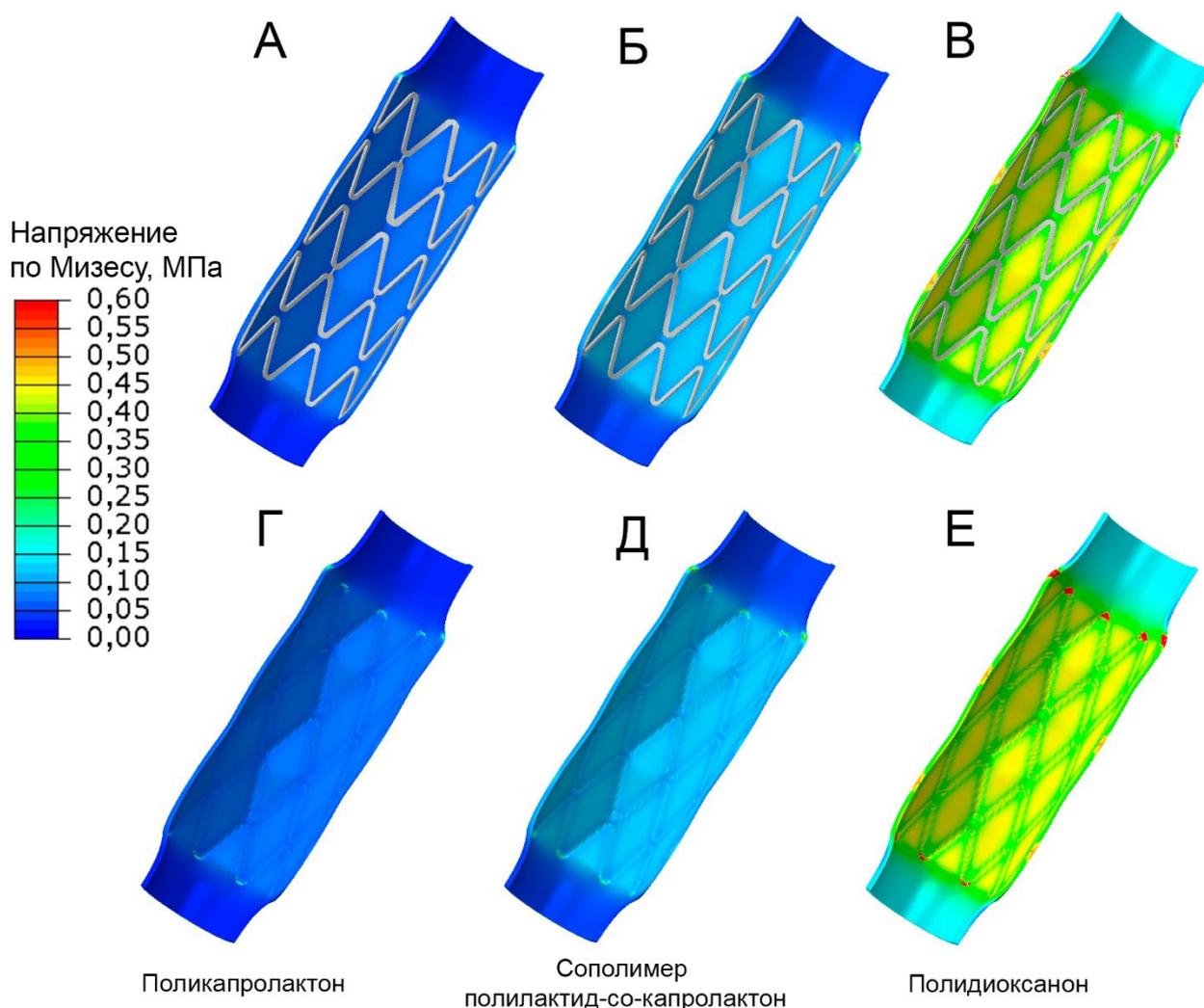


Рисунок 13 - Сравнение эпюр напряжения по Мизесу, сформированное в мембране стент-графта (стент исключен из визуализации): А – для мембраны из поликапролактона, Б – из сополимера полилактид-со-капролактон, В – из полидиоксанона. Все изображения представлены в единой шкале напряжений 0,00-0,60 Мпа

В заключении анализа необходимо оценить всю систему «стент-мембрана» комплексно. Ключевой особенностью биомеханики каждого стент-графта стали различия в силах, необходимых для придания конечной (имплантированной) формы изделию. Ожидается, показано, что более жесткий материал полидиоксанон требует значительно больших усилий во время имплантации. Так, суммарная сила, требующаяся для раскрытия только стента составила 10Н. Для раскрытия стент-графта с мембраной из поликапролактона или сополимера полилактид-со-капролактон – 11Н или 12Н, соответственно. А для случая исполнения мембраны из полидиоксанона

– 15Н. Что в 1,5 раз больше, чем для раскрытия стента. Стоит обсудить данный аспект более детально. Имплантацию коронарного стента осуществляют с помощью баллона высокого давления, придавая воздействие в 13-20 атм. [3.]. Большинство расходных материалов, применяемых для имплантации стентов – прежде всего, специальные шприцы-индефляторы, создающие такое давление, рассчитаны именно на данные диапазоны нагрузок. Необходимость применения давления, в 1,5 больше расчетного, безусловно, может стать существенным ограничением для прикладного применения такого стент-графта.

### **2.3. Оптимизация условий синтеза биосовместимых гидрогелей на основе поливинилового спирта**

В настоящем исследовании с целью улучшения механических свойств гидрогелей ПВС был разработан комбинированный способ гелеобразования. В качестве одного из этапов сшивания выбран метод термического гелеобразования (криоструктурирования) – формирования трехмерных связей в результате замораживания и оттаивания раствора полимера. Криоструктурирование комбинировали с химическим сшиванием глутаровым альдегидом (ГА) или тетраборатом натрия (ТБН) в разной последовательности. Изучено несколько подходов к синтезу гидрогелей ПВС:

1. К раствору ПВС (Sigma Aldrich, США,  $M_w=146,000-186,000$ ) в бидистиллированной воде при перемешивании добавляли каталитические количества соляной кислоты и раствор ГА (Sigma Aldrich, США, 25%). До значительного повышения вязкости смеси с помощью двух стекол формировали пленки толщиной около 1 мм и выдерживали их в течение 2х часов при комнатной температуре. После чего полученные образцы замораживали при  $-40^{\circ}\text{C}$  и постепенно оттаивали до комнатной температуры. Готовые гидрогели отмывали от остатков линейного полимера, катализатора

и ГА в течение суток в бидистиллированной воде и обозначали как ПВС-ГА-Крио.

2. Второй способ отличался от первого дополнительным этапом, в ходе которого сформированные пленки перед выдерживанием в течение 2х часов при комнатной температуре нагревали в течение 3 минут до 90°C. Полученные образцы обозначали как ПВС-ГА-Т-Крио.

3. К раствору ПВС (пт. 1) добавляли раствор тетрабората натрия (ТБН,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , Sigma Aldrich, США) (1-5%), концентрация ТБН была определена как молярное соотношение ТБН и виниловым спиртом в ПВС. Пленки из полученной смеси формировали аналогично пт. 1. Выдерживали в течение 2 часов при комнатной температуре и подвергали одному циклу криоструктурирования (пт. 1). Полученные образцы обозначали как ПВС-ТБН-Крио.

4. Кроме того, меняли порядок действий: приготовленные методом замораживания/оттаивания гидрогели ПВС (ПВС-Крио) подвергали последующей химической стабилизации в растворе ГА в течение 24 часов. Образцы отмывали и обозначали как ПВС-Крио-ГА.

5. Аналогично проводили модификацию готовых криогелей ТБН в течение 24 часов с последующей отмывкой. Образцы обозначали как ПВС-Крио-ТБН.

Отдельно оценивали влияние количества циклов замораживания/оттаивания, молекулярной массы и концентрации полимера на механические свойства полученного материала. Для синтеза гидрогелей комбинированным способом во всех случаях использовали раствор ПВС с концентрацией 12%.

Для анализа механических свойств образцы полимерных пленок подвергали одноосному растяжению в соответствии с ISO 37: 2017. Прочность оценивали по максимальному напряжению (МПа) с учетом площади поперечного сечения образцов, деформационные свойства – по относительному удлинению, скорректированному с учетом характера

разрушения образцов (%) и модулю Юнга (МПа) (n=7). В результате проведенных испытаний обнаружили увеличение прочности на разрыв образцов гидрогелей предварительно сшитых ГА с последующим криоструктурированием (ПВС-ГА-Крио) в 4.5 раза по сравнению с контрольной группой (ПВС-Крио) (2.71 и 0.59 МПа соответственно) (рис. 1А), что обусловлено образованием полуацеталей в результате взаимодействия гидроксильных групп ПВС и альдегидных групп ГА. Проведение реакции химического модифицирования ГА при 90°C не показало статистически значимого улучшения прочности по сравнению с ПВС-Крио образцами (рис. 6 А). Сшивка уже готовых криогелей ПВС глутаральдегидом в течение 24 также не привела к улучшению механических свойств гидрогелей. Отсутствие достоверных изменений относительного удлинения (293%) и жесткости (0.12МПа) при добавлении глутарового альдегида к смеси (385% и 0.12МПа) (рис. 14 Б,В) можно рассматривать как положительный эффект, поскольку жесткость нативных тканей сопоставима с данными, полученными для контрольных образцов ПВС-Крио. Химическое модифицирование ТБН привело к неограниченному набуханию в случае предварительной обработки и к значительному снижению механических свойств при постобработке, что стало препятствием для выполнения теста на растяжение с использованием испытательной разрывной машины.

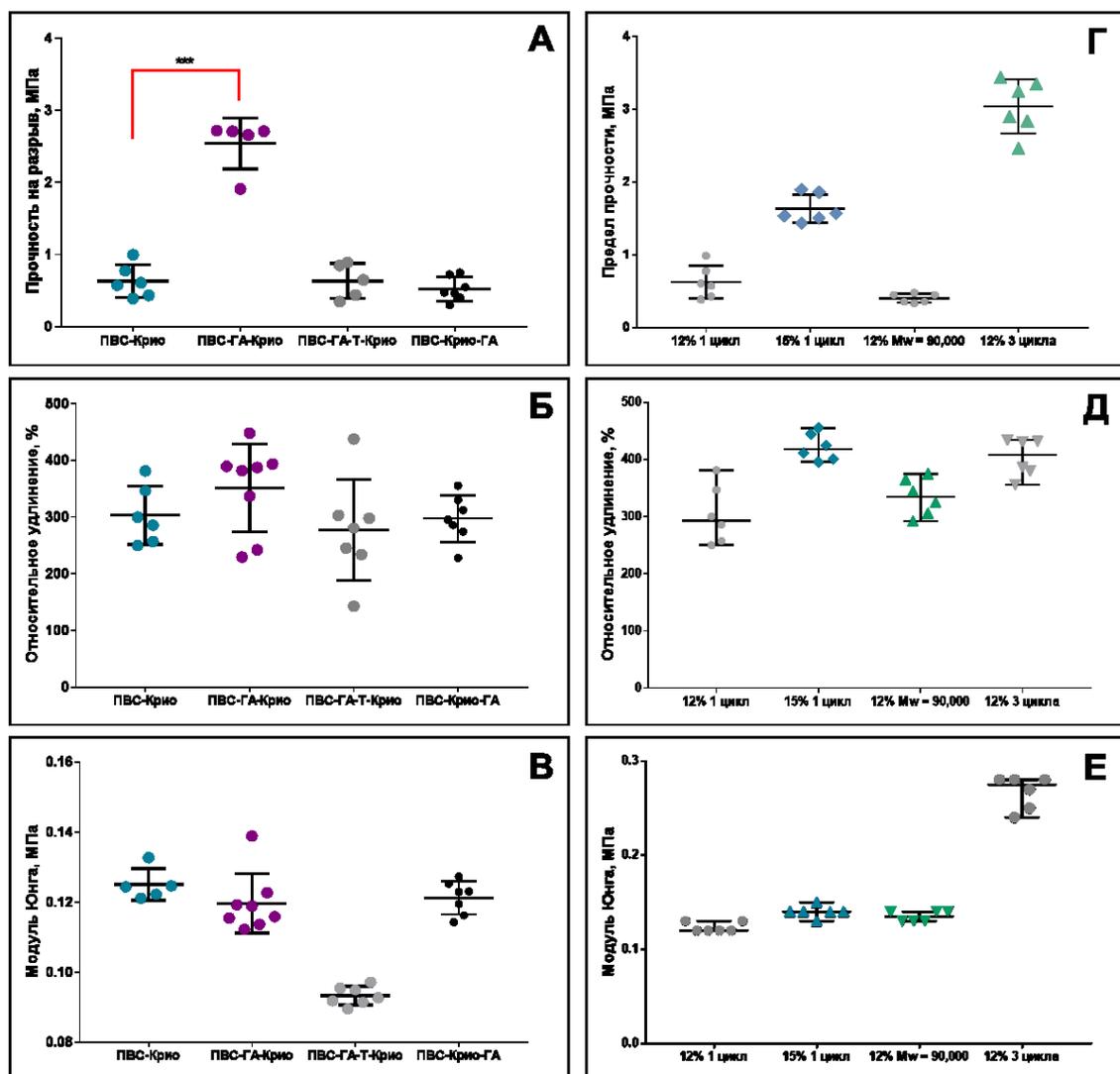


Рисунок 14 - Механические свойства гидрогелей ПВС, полученных разными способами. А,Г – прочность на разрыв, МПа; Б,Д – относительное удлинение, %; В,Е – модуль Юнга, МПа

Стоит отметить, что рост концентрации, молекулярной массы и числа циклов замораживания/оттаивания приводят к статистически значимому увеличению механической прочности материалов, что обусловлено ростом числа образующихся трехмерных сшивок (рис. 14 Г). Жесткость образцов достоверно растет только при увеличении числа циклов криоструктурирования (рис. 14 Е).

Оценку структуры поверхности и разлома полученных гидрогелей осуществляли методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Для проведения исследования образцы криогелей предварительно замораживали и высушивали лиофильно. Рельеф поверхности и внутренняя структура

гидрогелей различались в зависимости от способа получения (криоструктурирование или комбинированный способ) (Рис. 15). Образцы, приготовленные из растворов, содержащих ГА, имели более мелкие поры в разломе по сравнению с контрольными ПВС-Крио. Паттерн структуры поверхности также отличался от необработанных химическим способом материалов, демонстрируя более хаотичный рисунок, что обусловлено химическим взаимодействием между молекулами ПВС и ГА (Рис. 15).

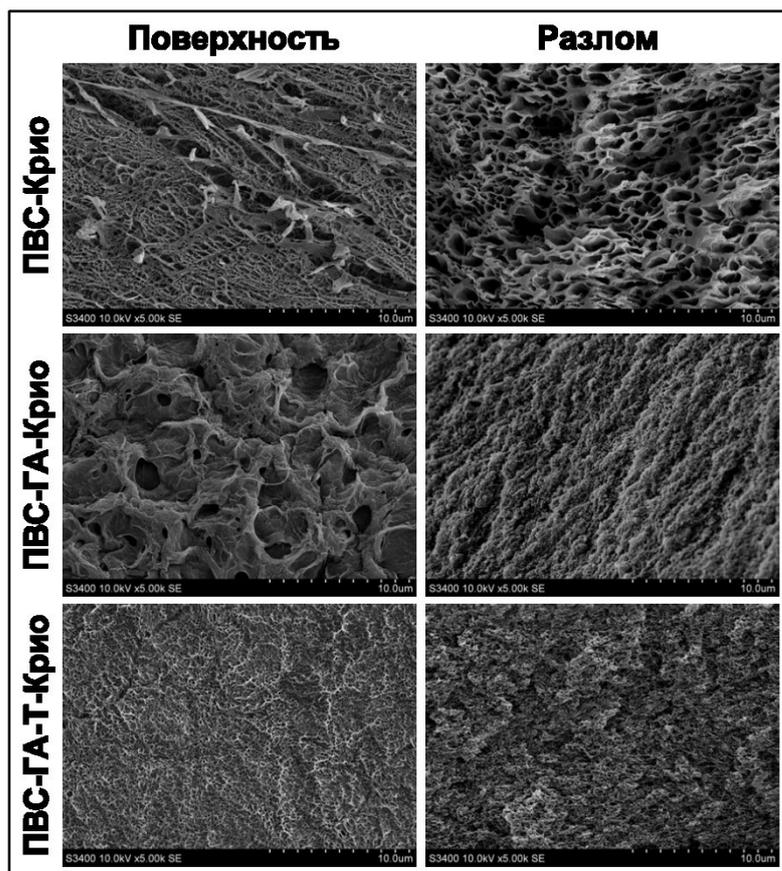


Рисунок 15 - Изображения структуры поверхности и разлома полученных гидрогелей ПВС, полученные методом сканирующей электронной микроскопии

Водосодержание гидрогелей, приготовленных различными способами, оценивали по потере массы образцов при высушивании ( $n=7$ ). В результате было обнаружено снижение содержания влаги в образцах, сшитых предварительно химическим способом ГА с 87.3% для образца ПВС-Крио до 86.1% для образца ПВС-ГА-Крио, что может свидетельствовать об уплотнении структуры материала. Повышение температуры химического

модифицирования, напротив, привело к увеличению содержания влаги в образцах (Рис. 16).

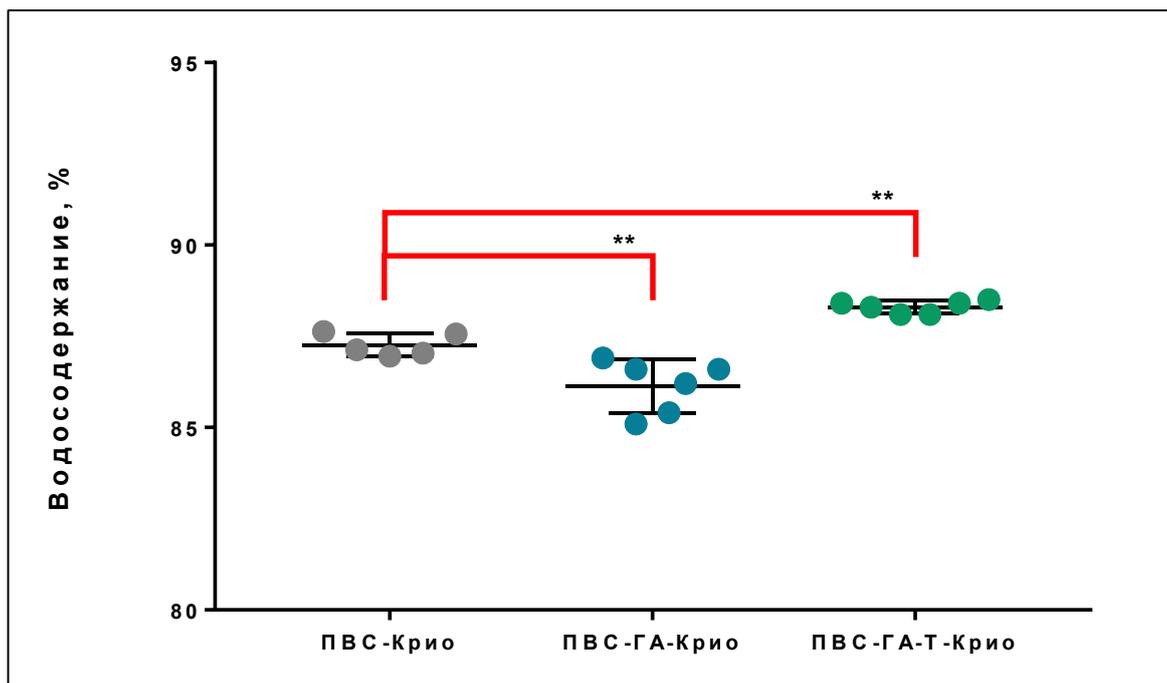


Рисунок 16 - Водосодержание гидрогелей, оцененное по потере массы образцов

#### 2.4. Фибрин – перспективный биосовместимый полимер для создания клеточных конструкторов

Фибрин представляет собой конечный продукт свертывания крови. Его полимеризация происходит под действием тромбина в присутствии ионов кальция. В большинстве протоколов для получения тканеинженерных продуктов, полимеризацию фибриногена выполняют путем внесения экзогенного тромбина, выделенного из плазмы крови животных или человека. Несмотря на принимаемые производителем меры по снижению риска вирусного заражения препаратов из компонентов крови, опасность переноса инфекций сохраняется. Кроме того, введенный в организм реципиента чужеродный тромбин способен вызывать иммунную реакцию, формирование аутореактивных антител к собственному тромбину, а также сенсibilизацию и аллергические реакции [28,30,47]. Нами предложен

способ получения аутологичного фибрина без использования экзогенного тромбина (ЭкТр), который исключает указанные недостатки [1]. В данном способе получают преципитат фибриногена с помощью этанолового метода с низким содержанием этанола. Полимеризация фибриногена происходит при внесении кальция хлорида за счет активации эндогенного тромбина (ЭнТр), который присутствует в преципитате.

Данный способ представляет интерес для реализации персонафицированного подхода в тканевой инженерии, позволяет получить полностью аутологичный материал, не имеющий риска переноса инфекций, не вызывающий иммунной реакции и сенсбилизации в организме реципиента. Учитывая, что различия в способе получения фибрина могут отразиться на свойствах материала, мы исследовали и сравнили свойства фибрина, полимеризованного традиционным способом с использованием экзогенного тромбина (ФЭкТр) и запатентованного способа получения фибрина, полимеризованного путем активации эндогенного тромбина (ФЭнТр). С учетом возможности использования фибрина в качестве модифицирующего покрытия сосудистых протезов, были изучены структурные и прочностные характеристики, биологические свойства, особенности деградации и влияние материала на гемостаз.

#### **2.4.1. Механические и структурные характеристики фибриновых матриц**

Предел прочности при растяжении, модуль Юнга (жесткость) и относительное удлинение при разрыве для любого из вариантов фибриновых матриц значительно отличались от *a. mammaria* (таблица 10). Тем не менее, предел прочности и модуль Юнга для матриц ФЭнТр были выше по сравнению с ФЭкТр. Большей пластичностью обладали образцы ФЭнТр, поскольку относительное удлинение при разрыве для образцов ФЭнТр было

выше, чем для ФЭнТр. Описанные различия могут быть связаны со структурными особенностями матриц.

Таблица 10 - Показатели прочности образцов различных групп фибрина и *a. mammaria*

Показатели	<i>a. mammaria</i> (n = 8)	ФЭнТр (n = 6)	ФЭкТр (n = 6)
Предел прочности (МПа)	2,13 (0,14; 2,66)	0,99 (0,91; 1,08) *	0,17 (0,14; 0,23) * #
Модуль Юнга (МПа)	2,685 (1,943; 3,243)	0,214 (0,203; 0,218) *	0,063 (0,056; 0,073) * #
Относительное удлинение (%)	29,79 (24,01; 42,07)	251,2 (241,9; 262,8) *	174,6 (161,7; 180,1) * #

*Примечания:* \* –  $p < 0,05$  по сравнению с *a. mammaria*; # –  $p < 0,05$  по сравнению с ФЭнТр

Все образцы фибрина имели волокнисто-пористую структуру (рис. 17 А, Б) сформированную сетью разветвленных, переплетающихся волокон. Однако, отмечались микроструктурные различия сетей ФЭкТр и ФЭнТр. Фибриновая сеть ЭнТр состояла из более тонких волокон (123 (101;148,3) нм) и мелких пор (528 (387;793) нм) по сравнению с ЭкТр ((151 (123; 190,3) нм и 626,5 (493,8; 873) нм соответственно) (рис.17 А–Г).

На механическую прочность и жесткость фибриновых образцов значимо влияет количество сшивок между волокнами фибрина, что отражает показатель плотности точек ветвления волокон фибрина в образцах. Действительно, плотность точек ветвления в структуре ФЭнТр была выше (8,39 (7,19; 8,68) точек/мкм<sup>2</sup>), чем в образцах ФЭкТр (5,54 (5,64; 6,51) точек/мкм<sup>2</sup>) (рис 17 Д–Ж).

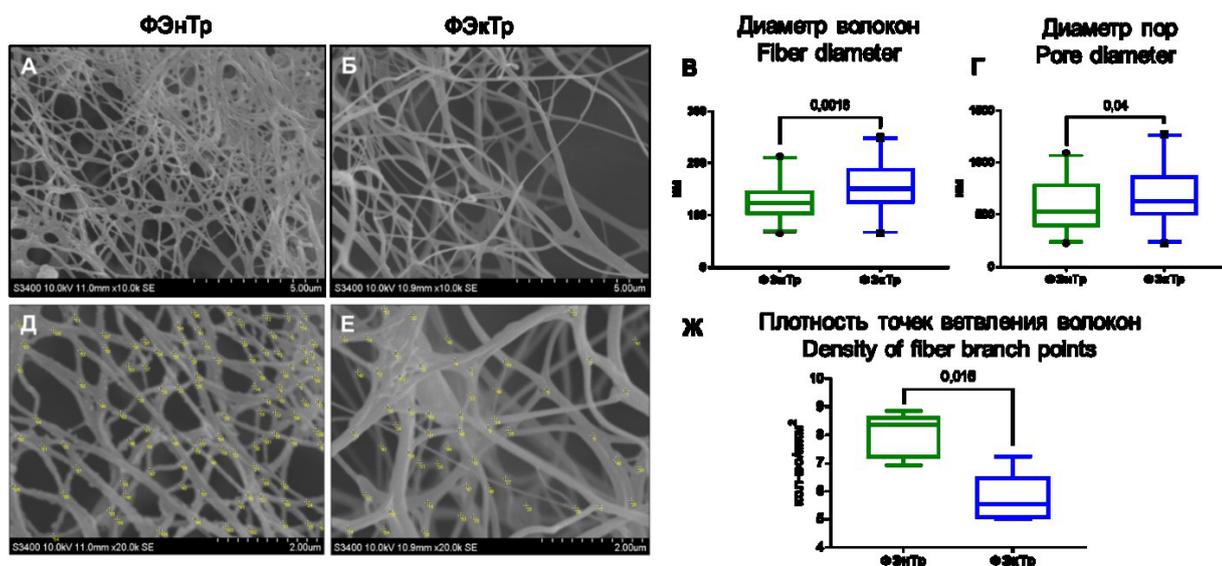


Рисунок 17 - Типичные снимки со СЭМ (А, Д – ФЭнТр, Б, Е – ФЭкТр). А, Б – микроструктура фибрина (ув. 10 000). Д, Е – точки ветвления фибриновых волокон (ув. 20 000). В, Г, Ж – количественный анализ структурных показателей у различных вариантов фибрина

#### 2.4.2. Деградации фибриновых матриц

Для изучения скорости деградации были залиты образцы фибрина без использования ингибитора протеаз апротинина. Фибринолитическую деградацию фибрина стимулировали с помощью плазмина (рис. 18 А), протеолитическую – под действием трипсина (рис. 18 Б). Под действием 0,1 Е/мл плазмина деградация фибрина происходила интенсивнее, чем при воздействии трипсина и полностью завершилась через 48 часов (рис. 18 А). Мы не зарегистрировали различий в устойчивости к плазмину образцов ФЭнТр и ФЭкТр. Иная ситуация наблюдалась в отношении трипсиновой деградации. 0,1% трипсину понадобилось 64 часа для полной деградации ФЭкТр и 86 часов для ФЭнТр (рис. 18 Б). Таким образом, образцы ФЭнТр демонстрировали большую устойчивость к протеолитической деградации чем ФЭкТр.

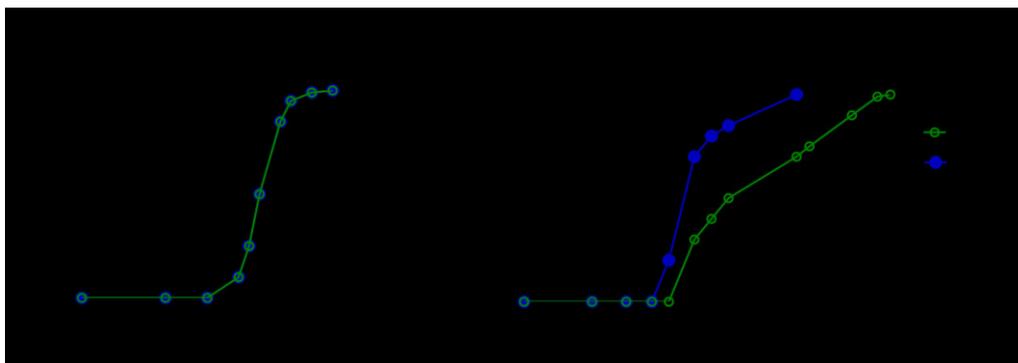


Рисунок 18 - Деградация фибрина под воздействием: А. плазмينا 0,1Е/мл, Б. трипсина 0,1%

### 2.4.3. Тромбогенность фибриновых матриц

Изучена способность различных вариантов фибрина к контактной активации коагуляционного и тромбоцитарного звена гемостаза в условиях *in vitro*. Укорочение АЧТВ (сек) после контакта с образцами ФЭнТр и ФЭкТр по сравнению с контролем (таблица 11) свидетельствует об активации ими коагуляционного звена гемостаза. При этом значимых различий показателей АЧТВ между группами ФЭнТр и ФЭкТр не выявлено.

Таблица 11- Показатели контактной активации коагуляционного и тромбоцитарного звена гемостаза образцами различных групп фибрина

Показатели	Контроль	ФЭнТр	ФЭкТр
АЧТВ (сек), n = 7	33,8 (33,5; 34,0)	27,3 (26,6; 28,0) *	26,2 (25,8; 26,5) *
Максимальная агрегация тромбоцитов (%), n = 6	76,8 (75,6; 78,6)	76,81 (70,7; 80,7)	89,9 (84,4; 92,1) *#
Площадь под кривой агрегации тромбоцитов (%), n = 6	54,1 (51,9; 56,8)	55,8 (45,2; 63,3)	66,9 (62,4; 69,8) *#

*Примечание: \* – p<0,05 по сравнению с контролем; # - p<0,05 по сравнению с ФЭнТр*

Что касается влияния на тромбоцитарный гемостаз, то образцы ФЭнТр практически не активировал тромбоцитарную агрегацию. Об этом свидетельствует отсутствие различий максимальной агрегации и площади

под кривой по сравнению с контрольной группой (интактная тромбоцитарная плазма) (табл. 11). При этом, матрицы ФЭКТр демонстрировали значимую контактную активацию тромбоцитов по сравнению с ФЭНТр и контролем.

#### **2.4.4. Биологические свойства фибриновых матриц**

##### **Жизнедеятельность эндотелиальных клеток на поверхности фибриновых матриц**

Отмечены высокие показатели жизнеспособности (94 – 100%) и метаболической активности эндотелиальных клеток через 7 суток культивирования на поверхности фибриновых матриц ЭкТр и ЭнТр (рис. 19 А, Б). При этом различий между ЭкТр и ЭнТр не зарегистрировано. Подтверждает высокую адгезионную и биомиметическую активность фибрина высокая плотности заселения поверхности эндотелиальными клетками, сравнимая с культуральным пластиком. Активация интегриновых рецепторов и формированием очагов фокальной адгезии демонстрирует механизмы адгезионности и привлекательности материала для клеток. Этот механизм показан на примере каркасного белка паксиллина, который обеспечивает закрепление интегрин в цитоскелете, участвует в регуляции сборки комплекса фокальной адгезии [56]. Площадь, занимаемая паксиллином при культивировании эндотелиальных клеток на поверхности фибрина ЭнТр и ЭкТр не различалась (рис. 19 Г) и была значительно больше, чем на стекле (контроль).

Сохранение жизнеспособности клеток в толще фибриновых матриц при длительном культивировании обусловлено способностью фибрина поддерживать баланс в поступлении питательных веществ внутрь матрицы и отведение продуктов жизнедеятельности клеток. Выполнены эксперименты с заливкой фибробластов в толщу фибрина и последующим культивированием в течении 14 суток.

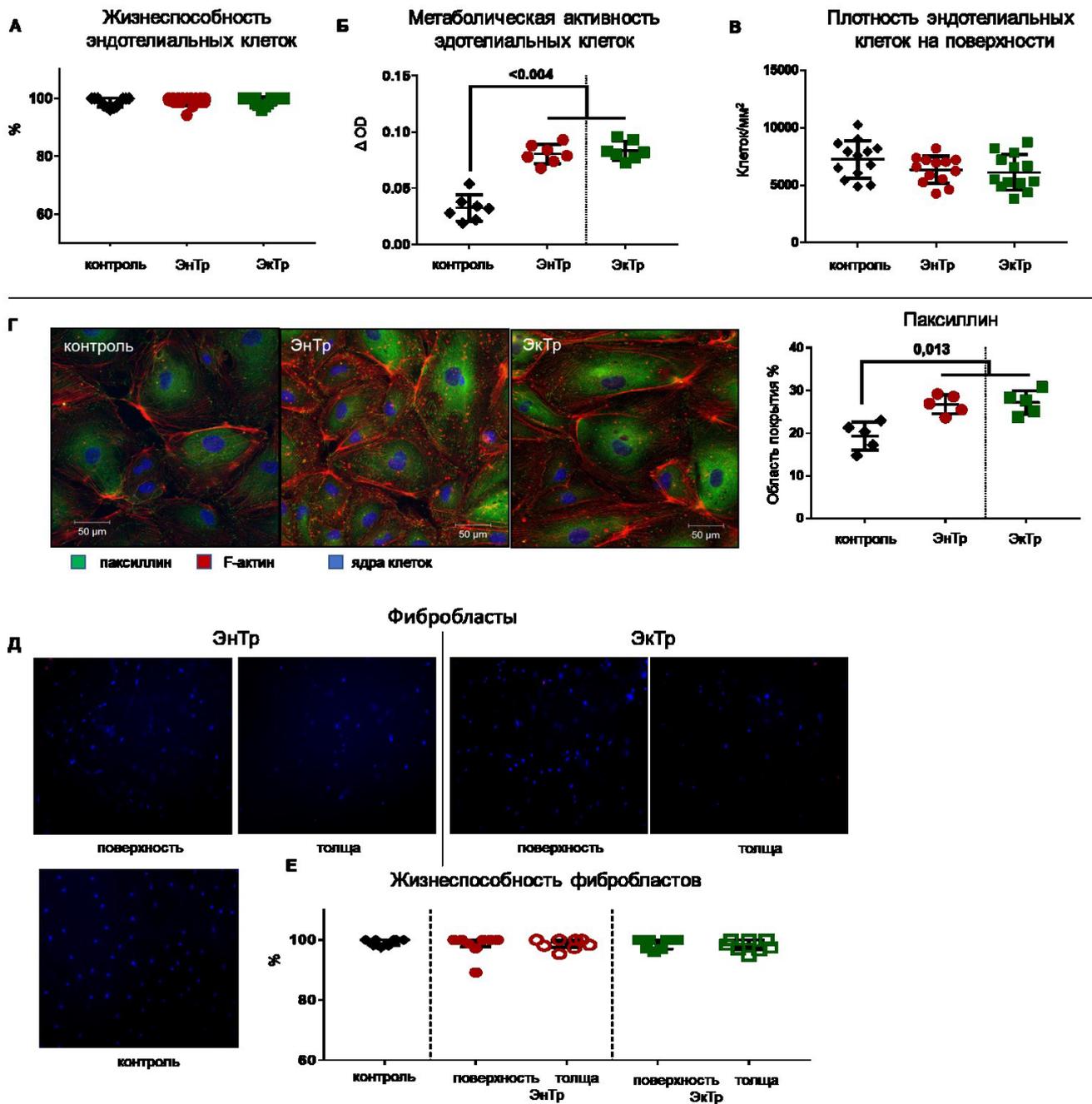


Рисунок 19 - Биологические свойства различных фибриновых матриц. А. Жизнеспособность эндотелиальных клеток на поверхности фибриновых матриц на 7 сутки культивирования. Б. Метаболическая активность эндотелиальных клеток на поверхности фибриновых матриц на 3 сутки культивирования. В. Плотность заселения поверхности эндотелиальными клетками на 7 сутки Г. Фотография поверхности образцов, заселенных эндотелиальными клетками на 3 сутки культивирования (контроль – стекло). Жизнеспособность фибробластов на поверхности и в толще фибриновых матриц на 14 сутки культивирования (фотографии Д (об. × 10) и количественные данные Е)

Клетки на 89 – 100 % оставались жизнеспособными, при этом не отмечено различий в зависимости от локализации (поверхность или толща), а также в сравнении с контролем на культуральном пластике (рис. 19 Д, Е).

Данные результаты свидетельствуют, что 1) имитация срединного слоя в протезах возможна на этапе *in vitro* путем заливки клеток непосредственно в матрицу фибрина, 2) имплантированные протезы на основе фибрина, будут поддерживать хорошую интеграцию в организме и подвергаться ремоделированию.

## **2.5. Результаты имплантации сосудистых заплат в сонную артерию овец**

Полимерные заплаты из полигидроксибутирата/валерата и поликапролактона (PHBV/PCL), содержащие сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), изготавливали методом эмульсионного электроспиннинга на установке Nanon-01A (MECC CO, Япония) по ранее описанному протоколу [9].

Полимерные заплаты с RGD изготавливали из PHBV/PCL методом электроспиннинга и далее в соответствии с ранее описанной методикой проводили первичную модификацию поверхности заплат аминокетонами, используя в качестве линкерной группы амин 4,7,10-триокса-1,13-тридекандиамин (Sigma-Aldrich, США), [17]. Дальнейшую модификацию поверхности заплат PHBV/PCL осуществляли RGD содержащими пептидами производства НаноТех-С (Россия): RGDK (P1), AhRGD (P2), c[RGDFK] (P3) [17]. Таким образом, было получено 3 разновидности RGD-модифицированных заплат: PHBV/PCL/P1, PHBV/PCL/P2, PHBV/PCL/P3.

В качестве группы сравнения использовали ксеноперикардальный лоскут «КемПериплас-Нео» (ЗАО «НеоКор», Россия), который в настоящее время активно используется в клинике при проведении каротидной эндартерэктомии в качестве сосудистой заплаты.

Для имплантации разработанных сосудистых заплат использовали овечью модель, которая является оптимальной для тестирования сердечно-сосудистых имплантатов *in vivo*, так как пригодна для «моделирования наихудшего случая» вследствие повышенной склонности их сосудов к кальцификации, а крови – к гиперкоагуляции. Поэтому использование овечьей модели позволяет провести максимально строгое тестирование сосудистых протезов, в том числе, на предмет их дегенерации *in vivo* [14, 17,35, 61, 67, 76]. Помимо этого, овцы считаются оптимальной животной моделью для оценки роста, проходимости, эндотелизации, тромборезистентности и постимплантационной визуализации изделий для нужд сердечно-сосудистой хирургии.

Серия экспериментов проведена на овцах эдильбаевской породы, массой 42-45 кг, все животные – несущие самки. Животные оперированы последовательно. При выполнении экспериментальных исследований руководствовались требованиями приказов №1179 МЗ СССР от 10.10.1983 г., №267 МЗ РФ от 19.06.2003 г., «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», принципами Европейской конвенции (г. Страсбург, 1986) и Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996). Работа одобрена локальным этическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (протокол № 15 от 11.09.2018 г.).

Была проведена имплантация в сонную артерию овец биodeградируемых сосудистых заплат PNBV/PCL/VEGF (n=3), PNBV/PCL/P1 (n=3), PNBV/PCL/P2 (n=3) и PNBV/PCL/P1 (n=3). Размер заплат 40,0 x 4,0 мм. Продолжительность наблюдения после имплантации составила 6 месяцев.

Две овцы (с имплантированными заплатами PNBV/PCL/P1 и PNBV/PCL/P2) не дожили до предполагаемого срока вывода из эксперимента, погибнув спустя 14 дней из-за образования массивных

паравазальных гематом вокруг оперированных сосудов. Скорее всего, это было связано с микроповреждениями стенки заплат, возникшими в ответ на пульсовую волну после имплантации, так как сразу после имплантации кровотечения из зон наложенных швов не наблюдали и гемостаз был достигнут в течение 2 минут.

Все овцы с имплантированными заплатами PNBV/PCL/VEGF и PNBV/PCL/P3 дожили до предполагаемого срока вывода из эксперимента. На протяжении шести месяцев наблюдения сосуды с имплантированными заплатами сохраняли свою проходимость. Аневризматического расширения сосудов в зоне имплантированных заплат не обнаружено. Однако во всех сосудах с заплатами, содержащими RGD, выявлено повышение скорости кровотока, что может быть косвенным отображением сужения просвета сосуда.

По результатам морфологического исследования (гистологическое исследование и сканирующая электронная микроскопия) заплат с сосудистым эндотелиальным фактором роста видно, что спустя 6 месяцев имплантации в сонную артерию овец на основе данных заплат сформировалась полноценная трехслойная новообразованная сосудистая ткань (рис. 20).

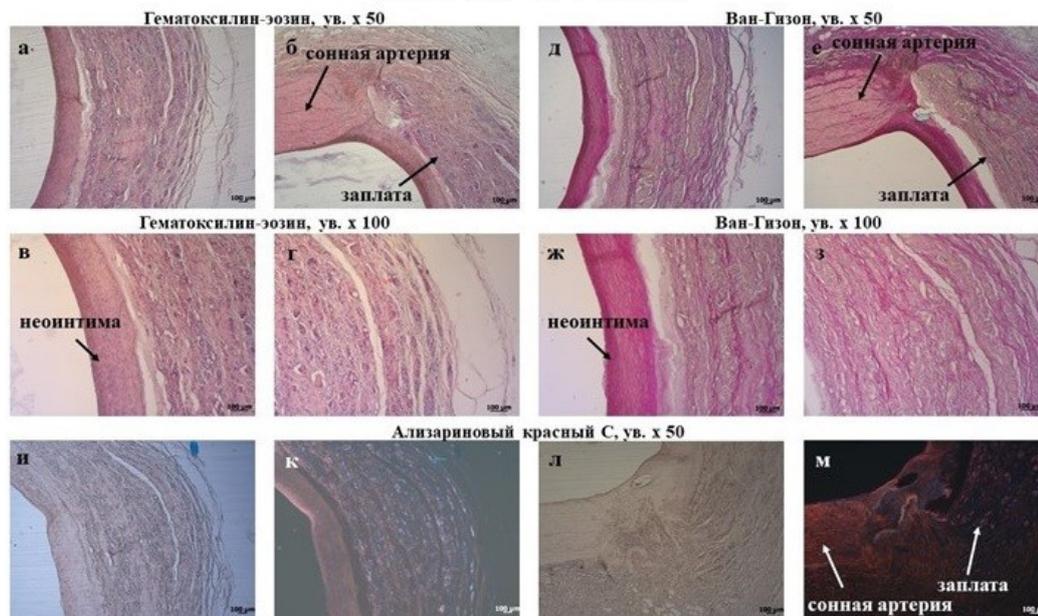
Тонкая неоинтима, покрытая слоем эндотелиоподобных клеток со стороны просвета сосуда, выстилала всю внутреннюю поверхность заплат. Основную толщу неоинтимы составили гладкомышечные клетки. Далее следовала собственно заплата. Отмечены процессы видимой биодegradации полимерного матрикса, сопровождавшиеся нарушением его целостности, видимой только при микроскопии образцов. Заплата PNBV/PCL/VEGF была заполнена клеточными элементами (макрофагами, фибробластоподобными и гладкомышечными клетками, немногочисленными гигантскими клетками инородного тела), пронизана пучками коллагеновых волокон. В толще заплат встречались *vasa vasorum*. Внешний слой заплат содержал все структурные элементы, свойственные естественному адвентициальному

слою: волокна коллагена, фибробласты и фиброциты, единичные гигантские клетки инородного тела, лимфоидные фолликулы и vasa vasorum. Признаки кальцификации отсутствовали (рис. 20).

При изучении гистологической картины эксплантированных образцов заплат PHBV/PCL/RGD получена однотипная картина - во всех образцах присутствовала гиперплазия неоинтимы (рис. 20). Толщина неоинтимы при этом соответствовала толщине стенки самой заплат. Поверхность неоинтимы, обращенная в просвет сосуда, была покрыта монослоем клеток. Стенки заплат были частично резорбированы и содержали умеренное количество гигантских многоядерных клеток инородного тела. Также в стенках заплат присутствовали макрофаги, гладкомышечные и фибробластоподобные клетки, пучки коллагеновых волокон, формировались vasa vasorum (рис. 20).

Гистологическое исследование с окраской ализариновым красным С показало, что отложение кальция в эксплантированных заплатах PHBV/PCL/RGD отсутствовало (рис. 20).

## PHBV/PCL/VEGF



## PHBV/PCL/RGD

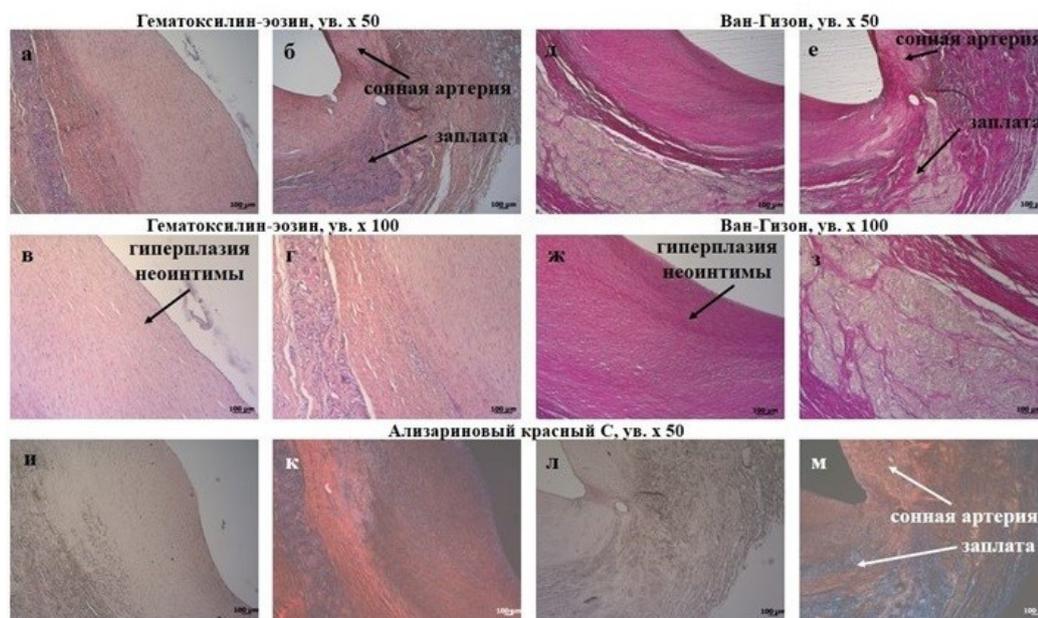


Рисунок 20 - Результаты гистологического исследования сосудистых заплат PHBV/PCL/VEGF и PHBV/PCL/RGD спустя 6 месяцев имплантации в сонную артерию овец: а-г – окраска гематоксилином-эозином; д-з – окраска по Ван-Гизон; и-м – окраска ализариновым красным С (и, л – световая микроскопия; к, м – флуоресцентная микроскопия). А, д, и, к – центральная часть заплата; б, е, л, м – стык заплата и сонной артерии в зоне анастомоза; в, ж – внутренний и средний слой стенки заплата; г, з – средний и наружный слой стенки заплата. Увеличение x 100

Большая протяженность имплантированных заплат позволила при проведении иммунофлуоресцентного исследования выполнить срезы таким образом, чтобы напротив заплата находилась стенка сонной артерии, в которую имплантировали заплата (рис. 21). Данное расположение привело к лучшей визуализации сходства новообразованной сосудистой ткани, сформированной на основе заплата за 6 месяцев их имплантации, с нативной сонной артерией овцы. Доказано, что неоинтима, сформировавшаяся на внутренней поверхности заплата PHBV/PCL/VEGF, состояла из гладкомышечных клеток, о чем свидетельствовало присутствие в клетках  $\alpha$ -актина (рис. 21).

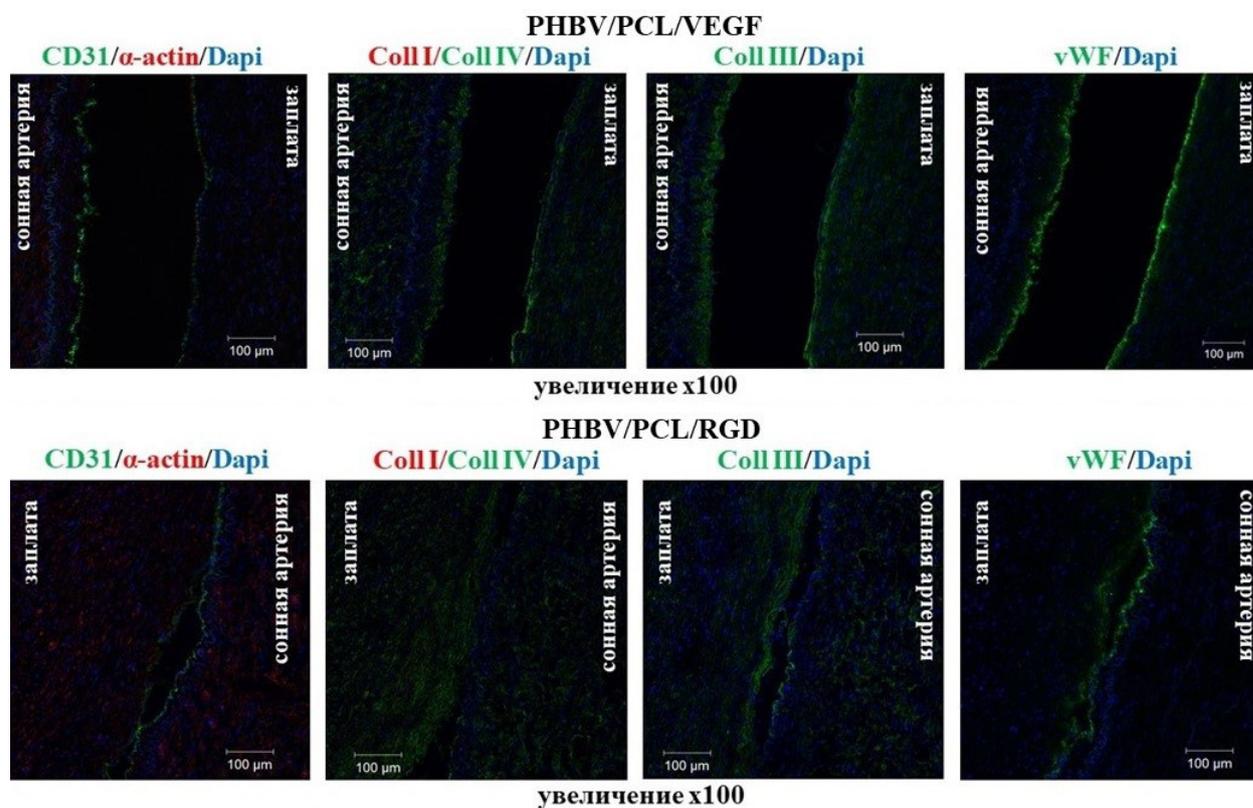


Рисунок 21 - Результаты иммунофлуоресцентного исследования эксплантированных заплата PHBV/PCL/VEGF и PHBV/PCL/RGD с прилегающими участками сонной артерии овцы: панель CD31/ $\alpha$ -actin/Dapi: зрелые эндотелиальные клетки (зеленое свечение), гладкомышечные и прочие клетки, содержащие  $\alpha$ -actin (красное свечение); панель Coll I/Coll IV/Dapi: коллаген I типа (красное свечение), коллаген IV типа (зеленое свечение); панель Coll III/Dapi: коллаген III типа (зеленое свечение); панель vWF/Dapi: фактор фон Виллебранда (зеленое свечение). Ядра всех клеток окрашены ядерным красителем Dapi (синее свечение)

Со стороны просвета сосуда неоинтима на всем своем протяжении была выстлана зрелыми эндотелиальными клетками CD31+, секретирующими фактор фон Виллебранда vWF+ (рис. 21). Коллаген IV типа формировал базальную мембрану, на которой располагались эндотелиальные клетки, и в большом количестве определялся как в толще стенки заплаты, так и в стенке сонной артерии овцы. Коллаген III типа формировался во всей толще заплат с преимущественной концентрацией у базальной мембраны и в неоинтимае (рис. 21).

Таким образом, на основе биodeградируемой заплаты VEGF спустя 6 месяцев ее имплантации в сонную артерию овцы формировалась полноценная новообразованная сосудистая ткань. Исключение составил эластин, который не определялся ни после имплантации заплат в аорту крыс, ни после имплантации заплат в сонную артерию овец. Тем не менее, инкорпорированный VEGF способствовал гармонизации процессов формирования ткани *in situ* без признаков развития хронического гранулематозного воспаления, гиперплазии неоинтима и кальцификации.

При проведении иммунофлуоресцентного исследования эксплантированных заплат PNBV/PCL/RGD выявлены те же структурные элементы новообразованной сосудистой ткани, что и в заплатах PNBV/PCL/VEGF: эндотелиальный монослой, состоявший из зрелых эндотелиальных клеток CD31+vWF+; коллаген I, III и IV типа (рис. 21). Однако обращает на себя внимание большее количество гладкомышечных клеток в неоинтимае и высокая общая клеточность стенки заплат, обусловленная наличием хронического гранулематозного воспаления, а также меньшее количество коллагена III типа относительно заплат PNBV/PCL/VEGF (рис. 21).

### **3. ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ В СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ХИРУРГИИ**

#### **3.1. Патолофизиологическое обоснование эффективности артериальных кондуитов для коронарного шунтирования**

Для эксперимента были использованы коммерческие культуры первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии (ЭК КА) человека (НСАЕС, 300К-05а, Cell Applications) и первичных эндотелиальных клеток внутренней грудной артерии (ЭК ВГА) человека (НИТАЕС, 308К-05а, Cell Applications), которые культивировали строго параллельно для обеспечения воспроизводимости и достоверности полученных результатов. Согласно информации поставщика, ЭК КА и ЭК ВГА были получены из здоровых артерий доноров с криоконсервацией на втором пассаже (500,000 клеток в базальной среде MesoEndo Cell Basal Medium (212К-500, Cell Applications), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки и 10% диметилсульфоксида. Для проведения экспериментов ЭК КА и ЭК ВГА размораживали и культивировали во флаконах T-75 (90076, Techno Plastic Products) согласно рекомендациям производителя, в среде для роста клеток Human MesoEndo Growth Medium (212-500, Cell Applications). Пересев производили по достижении 80-90% конфлюэнтности. После 2-3 пассажей ЭК КА и ЭК ВГА рассеивали в проточные культуральные камеры (80126, Ibidi) или культуральные флаконы T-75 (90076, Techno Plastic Products) в зависимости от эксперимента в соответствии с инструкциями производителя. Для моделирования воздействия пульсирующего потока ЭК КА и ЭК ВГА, предварительно рассеянные в проточные камеры до 90% конфлюэнтности (80126, Ibidi,  $\approx$  350,000 клеток на проточную камеру) культивировали в течение ночи и прекондиционировали ламинарным потоком (15 дин/см<sup>2</sup>) при помощи соответствующего набора коннекторов для перфузии (Perfusion Set Yellow/Green, 10964, Ibidi) в системе пульсирующего потока Ibidi Pump

System Quad (Ibidi) в течение 48 часов. Инкубацию ЭК КА и ЭК ВГА в статических условиях также проводили в течение 48 часов после формирования монослоя. Все эксперименты с ЭК КА и ЭК ВГА проводили в стерильных условиях при 37°C, поддержании атмосферы 95% воздуха: 5% CO<sub>2</sub> и высокой влажности (МСО-18AIC, Sanyo).

Для полнотранскриптомного секвенирования (RNA-seq) использовали ЭК КА и ЭК ВГА в количестве приблизительно 10 млн клеток для каждой культуры, выращенные либо в условиях потока, либо в статических условиях. Каждая группа состояла из трех биологических повторностей. После окончания инкубации и отмывки в ледяном фосфатно-солевом буфере (pH 7,4, 10010023, Thermo Fisher Scientific) клетки лизировали в тризоле (15596018, Thermo Fisher Scientific) с последующим выделением тотальной РНК при помощи набора Purelink RNA Micro Scale Kit (12183016, Invitrogen) с сопутствующей обработкой ДНКазой (DNASE70, Sigma-Aldrich) в соответствии с инструкциями производителей. Качество РНК контролировалось с помощью набора RNA 6000 Pico Kit (5067-1513, Agilent) на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent) по индексу целостности РНК (RNA integrity number, RIN). Оценка количества выделенной РНК проводилась на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) и флуорометре Qubit 4 (Invitrogen). Для 1 мкг выделенной РНК проводилась деплеция рРНК посредством набора RiboCop rRNA Depletion Kit V1.2 (037.96, Lexogen) с дальнейшим конструированием ДНК-библиотек при помощи набора MGIEasy RNA Directional Library Prep Set (MGI Tech). Качество полученных ДНК-библиотек анализировалось с помощью набора High Sensitivity DNA Kit (5067-4626, Agilent) на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent). Секвенирование библиотек проводилось на платформе MGISEQ-2000 с использованием набора 2x100 PE (FCL PE100) в ЦКП “Геномика” (ИХБФМ СО РАН). При анализе различий между клеточными культурами ЭК КА и ЭК ВГА в расчет брались ДЭГ, для которых уровень экспрессии изменялся более чем в два раза, с уровнем значимости FDR (false discovery rate)-скорректированного значения

$P < 0,05$  . Для ДЭГ проводился анализ обогащения генных онтологий (GO) с использованием баз данных Gene Ontology (категории cellular component, molecular function и biological process), Reactome (категория Reactome pathways), UniProtKB (категории cellular component, molecular function и biological process) и Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, категория KEGG pathways). Данные RNA-seq были депонированы на электронный ресурс Sequence Read Archive с идентификатором массива данных PRJNA891895.

Для выделения общего белка ( $n = 3$  проточных камеры на группу для экспериментов в условиях потока;  $n = 3$  культуральных флакона Т-75 для экспериментов в статических условиях) ЭК КА и ЭК ВГА отмывали в ледяном фосфатно-солевом буфере (рН 7,4, 10010023, Thermo Fisher Scientific) и лизировали RIPA-буфером (89901, Thermo Fisher Scientific) с коктейлем ингибиторов протеаз и фосфатаз (78444, Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Количественный анализ общего белка проводили с использованием набора BCA Protein Assay Kit (23227, Thermo Fisher Scientific) и микропланшетного спектрофотометра Multiskan Sky (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколами производителя. Протеомное профилирование ЭК КА и ЭК ВГА осуществляли посредством жидкостной хроматографии, совмещенной с тандемной масс-спектрометрией с ионной подвижностью (timsTOF Pro) на базе ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет».

Для очистки от компонентов лизирующего буфера проводили осаждение белка. Пробы инкубировали в течение часа при  $-20^{\circ}\text{C}$  в 4 объёмах ледяного высокочистого ацетона (650501, Sigma-Aldrich), после чего центрифугировали при  $13\ 000 \times g$  в течение 15 минут при  $4^{\circ}\text{C}$  (Microfuge 20R, Beckman Coulter). Осадок ресуспендировали в 250 мкл ледяного ацетона и инкубировали в течение 15 минут при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Далее проводили повторное

центрифугирование ( $13\ 000 \times g$  в течение 15 минут при  $4^{\circ}\text{C}$ ) с последующим удалением надосадка. Для полного удаления ацетона пробирки сушили на воздухе в течение 5-10 минут. Осажденный белок растворяли в ресуспендирующем растворе (8М мочевины, U5128, Sigma-Aldrich / 0,05М аммоний-бикарбонатный буфер, 09830, Sigma-Aldrich) и инкубировали в течение 20 минут на льду, после чего образцы подвергали ультразвуковой обработке в ледяной ванне в течение 15 минут и инкубировали еще 10 минут на льду при периодическом перемешивании.

Для исследований образцы выравнивали по общему количеству белка. Измерение концентрации белка проводили набором QuDye Protein Quantification Kit (25102, Lumiprobe) на флюориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу производителя. Далее к аликвоте каждого образца, содержащей 15 мкг белка, добавляли 1/10 объема десятикратного раствора для восстановления (0,05М дитиотреитол (D0632, Sigma-Aldrich), 8М мочевины / 0,05М аммоний-бикарбонатный буфер) и инкубировали в течение 1 часа при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ . Затем к пробам добавляли 1/10 объема раствора 0,15М йодацетамида (I6125, Sigma-Aldrich) и инкубировали в течение 30 минут в темноте при комнатной температуре. После этого добавляли 7 объемов 0,05М аммоний-бикарбонатного буфера и трипсин (300 нг трипсина на 15 мкг белка, соотношение 1 к 50; V5280, Promega) с последующей инкубацией при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение ночи (16 часов).

По завершении трипсинолиза образцы инкубировали в течение 40 минут при  $-80^{\circ}\text{C}$  и обессоливали с использованием колонок Pierce C18 Spin Tips (84850, Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Надосадок с триптических пептидами переносили в новые пробирки и высушивали в вакуумном концентраторе при температуре  $30^{\circ}\text{C}$  (CentriVar, Labconco) в течение ночи. Высушенные пептиды далее растворяли в воде для хроматографии (1153334000, Sigma-Aldrich) с 0,1% муравьиной кислотой (33015, Sigma-Aldrich). Растворенные пептиды анализировали при помощи безметочного (label-free) протеомного

профилирования, выполняемого посредством жидкостной хроматографии, совмещенной с тандемной масс-спектрометрией с ионной подвижностью (timsTOF Pro, Bruker).

Масс-спектрометрические данные обрабатывали с использованием программного обеспечения PEAKS Studio Xpro (Bioinformatics Solutions). Идентификацию и количественный анализ белков проводили по базе данных SwissProt (Uniprot), отфильтрованной по белкам человека. Для идентификации использовали спектры с качеством сборки *de novo* (*de novo score*) не менее 50%. Достоверными считали идентификации белков и пептидов с FDR < 1%, расчёт FDR проводили при помощи поиска по обратной базе данных (*decoy*). Затем из анализа были исключены белки, имеющие менее 2 уникальных пептидов. После получения информации о площади пиков (*area under the curve*) обнаруженных в разных образцах белков проводили анализ полученных данных.

Статистический анализ и визуализацию масс-спектрометрических данных проводили в программной среде R. Многомерный анализ данных для выявления различий между образцами проводили с использованием неметрического многомерного шкалирования с использованием пакета *Vegan*, а также посредством дискриминантного анализа методом частных наименьших квадратов с использованием пакета *MixOmix*. Визуализацию проводили при помощи пакета *ggplot2*. Для выявления дифференциально экспрессируемых белков использовали модерированный t-тест при помощи пакета *limma*. Белки считали дифференциально экспрессируемыми при логарифмической кратности изменения  $\geq 1$  и значения P с FDR-поправкой на множественные сравнения < 0,05. Для дифференциально экспрессированных белков проводился анализ обогащения сигнальных путей с использованием баз данных Gene Ontology (категории *cellular component*, *molecular function* и *biological process*), Reactome (категория *Reactome pathways*), UniProtKB Keywords (категории *cellular component*, *molecular function* и *biological process*) и KEGG (категория *KEGG pathways*). Масс-спектрометрические

данные протеомного анализа были депонированы на электронный ресурс ProteomeXchange Consortium через репозиторий PRIDE с идентификатором массива данных PXD037861.

С целью демонстрации общего количества дифференциально экспрессированных белков по результатам протеомного профилирования были построены диаграммы Венна, а также диаграммы рассеивания (volcano plot), демонстрирующие 244 белка, гиперэкспрессированных в ЭК КА и 287 белка, гиперэкспрессированных в ЭК ВГА, тогда как 2794 белка не показали дифференциальной экспрессии между двумя данными клеточными линиями (рис. 22, рис. 23).

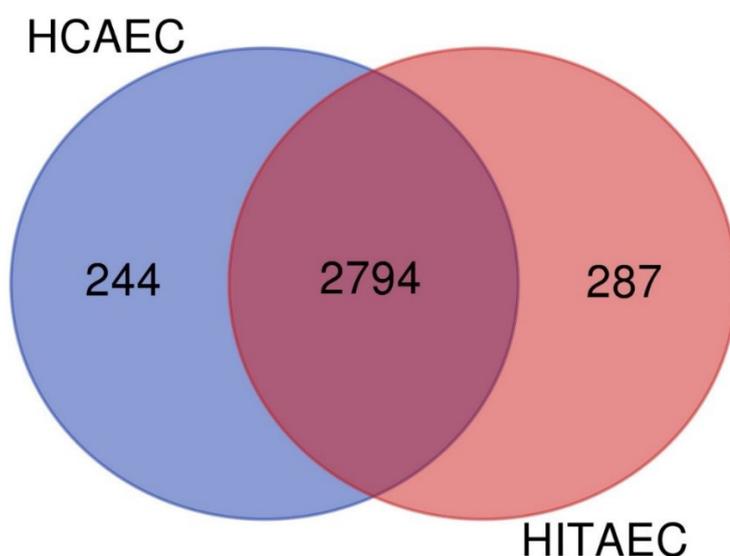


Рисунок 22 – Диаграмма Венна, показывающая количество дифференциально экспрессированных белков в протеоме эндотелиальных клеток коронарной артерии и внутренней грудной артерии. HCAEC – эндотелиальные клетки коронарной артерии; HIAEC – эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии



и метаболизм соединений азота, регуляцию мРНК и синтеза макромолекул, а также формирование эластических волокон (таблица 14).

Таблица 12 – Анализ обогащения категорий GO, общих для ЭК КА и ЭК ВГА, по результатам протеомного профилирования

Категория GO	Общее количество белков	Количество дифференциально экспрессированных белков	Кратность изменения	Значение P после FDR-коррекции
<b>Первичные эндотелиальные клетки коронарной артерии</b>				
Очаговая адгезия	423	18	3,6	$2,25 \cdot 10^{-4}$
Связывание молекул межклеточной адгезии	552	24	3,7	$4,77 \cdot 10^{-5}$
Связывание кадгерина	325	16	4,2	$1,13 \cdot 10^{-3}$
Биогенез или организация клеточных компонентов	5727	100	1,5	$4,84 \cdot 10^{-3}$
Митохондрии	1671	52	2,7	$1,57 \cdot 10^{-8}$
Внеклеточные везикулы	2123	79	3,2	$4,25 \cdot 10^{-18}$
<b>Первичные эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии</b>				
Очаговая адгезия	423	21	3,6	$4,30 \cdot 10^{-5}$
Связывание молекул межклеточной адгезии	552	27	3,6	$2,08 \cdot 10^{-5}$
Связывание кадгерина	325	15	3,4	$1,55 \cdot 10^{-2}$
Биогенез или организация клеточных компонентов	5727	119	1,5	$3,02 \cdot 10^{-4}$
Митохондрии	1671	51	2,2	$6,10 \cdot 10^{-6}$
Внеклеточные везикулы	2123	79	2,7	$1,21 \cdot 10^{-13}$

Таблица 13 – Анализ обогащения категорий GO, специфичных для ЭК КА, по результатам протеомного профилирования

<b>Категория GO</b>	<b>Общее количество белков</b>	<b>Количество дифференциально экспрессированных белков</b>	<b>Кратность изменения</b>	<b>Значение P после FDR-коррекции</b>
Организация базальной мембраны	30	5	14,2	$2,31 \cdot 10^{-2}$
Коллаген внеклеточного матрикса	434	15	3,0	$9,61 \cdot 10^{-3}$
Метаболизм липидов	736	29	3,4	$1,32 \cdot 10^{-5}$
Метаболизм жирных кислот	328	15	3,9	$8,20 \cdot 10^{-3}$
Метаболизм органических кислот	857	30	3,0	$2,86 \cdot 10^{-4}$
Метаболизм витаминов и их кофакторов	186	11	5,0	$3,26 \cdot 10^{-3}$
Метаболизм углеводов	475	17	3,1	$2,80 \cdot 10^{-2}$
СОРП-покрытые внеклеточные везикулы для транспорта из эндоплазматической сети в комплекс Гольджи	94	6	5,4	$3,26 \cdot 10^{-2}$
Лизосомы	749	27	3,1	$2,53 \cdot 10^{-5}$
Пероксисомы	146	8	4,7	$1,49 \cdot 10^{-2}$

Таблица 14 – Анализ обогащения категорий GO, специфичных для ЭК ВГА, по результатам протеомного профилирования

Категория GO	Общее количество белков	Количество дифференциально экспрессированных белков	Кратность изменения	Значение P после FDR-коррекции
Митохондриальные рибосомы	90	16	13,0	$1,36 \cdot 10^{-10}$
Малые рибосомальные митохондриальные субъединицы	32	7	16,0	$4,36 \cdot 10^{-5}$
Большие рибосомальные митохондриальные субъединицы	56	9	11,7	$1,39 \cdot 10^{-5}$
Митохондриальная экспрессия генов	141	18	9,3	$3,01 \cdot 10^{-8}$
Митохондриальная трансляция	110	17	11,2	$2,27 \cdot 10^{-8}$
Сплайсинг мРНК через сплайсосомы	243	14	4,2	$5,15 \cdot 10^{-3}$
Сплайсинг РНК	368	20	4,0	$3,02 \cdot 10^{-4}$
Трансляция	379	24	4,6	$3,24 \cdot 10^{-6}$
Биосинтетические процессы	2603	65	1,8	$1,32 \cdot 10^{-3}$
Клеточный метаболизм азота	3573	98	2,0	$3,25 \cdot 10^{-8}$
Биосинтез органических соединений азота	1333	40	2,2	$2,45 \cdot 10^{-3}$
Процессинг мРНК	451	21	3,4	$1,26 \cdot 10^{-3}$
Биосинтез макромолекул	1487	42	2,1	$5,91 \cdot 10^{-3}$
Формирование эластических волокон	45	6	9,7	$7,77 \cdot 10^{-3}$

В отличие от протеомного профилирования, транскриптомное было проведено сразу на двух *in vitro* моделях: в физиологических условиях пульсирующего потока и в статических условиях. В условиях пульсирующего потока общее количество гиперэкспрессированных генов

(логарифмическая кратность изменения  $\geq 1$  и скорректированное с FDR-поправкой значение  $P < 0,05$ ) в ЭК КА составило 1014, гиперэкспрессированных в ЭК ВГА – 849, не экспрессированных дифференциально – 19228 (рис. 24, рис. 25). Существенно большее количество ДЭГ в сравнении с дифференциально экспрессированными белками закономерно и отражает значительно более глубокое покрытие транскриптомного анализа, а также редукцию биологического шума от транскрипции, то есть уровня транскриптомного анализа, к трансляции, то есть уровня изучения белков, почти в 3-5 раз.

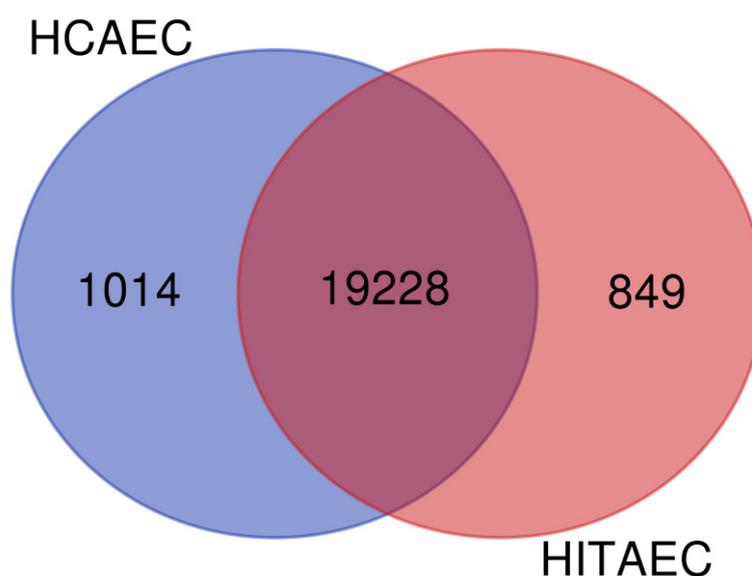


Рисунок 24 – Диаграмма Венна, показывающая количество дифференциально экспрессированных генов в эндотелиальных клетках коронарной артерии и внутренней грудной артерии в условиях пульсирующего потока. HCAEC – эндотелиальные клетки коронарной артерии; HIAEC – эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии



соединений, присоединение интегринов к коллагену и протеогликанам, а также сборку эластических волокон (таблица 16). В экспрессионном профиле ЭК ВГА преобладали транскрипты, ответственные за организацию цитоскелета, синтез гликозаминогликанов, выделение внеклеточных везикул, а также провоспалительный сигналинг (таблица 17).

Таблица 15 – Анализ обогащения категорий GO, характерных одновременно для ЭК КА и ЭК ВГА в условиях потока, по результатам транскриптомного профилирования

Категория GO	Общее количество белков	Количество дифференциально экспрессированных белков	Кратность изменения	Значение P после FDR-коррекции
<b>Первичные эндотелиальные клетки коронарной артерии</b>				
Коллаген внеклеточного матрикса	434	43	2,4	$2,99 \cdot 10^{-5}$
Внеклеточный матрикс	575	54	2,3	$7,38 \cdot 10^{-6}$
Адгезия к внеклеточному матриксу	135	15	2,7	$4,38 \cdot 10^{-2}$
Связывание с гликозаминогликанами	242	28	2,8	$1,07 \cdot 10^{-3}$
Кальций-зависимый сигналинг	25	2,6	2,4	$3,5 \cdot 10^{-3}$
Межклеточные соединения	82	8,5	2,3	$1,7 \cdot 10^{-10}$
Процессы секреции	123	12,8	1,4	$4,9 \cdot 10^{-4}$
Репарация ДНК	508	7	0,3	$3,98 \cdot 10^{-2}$
Процессинг РНК	868	9	0,25	$4,30 \cdot 10^{-5}$
Убиквитинирование белка	684	11	0,4	$2,66 \cdot 10^{-2}$
Макроаутофагия	189	0	0,01	$4,64 \cdot 10^{-2}$
<b>Первичные эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии</b>				
Коллаген внеклеточного матрикса	434	43	2,8	$1,35 \cdot 10^{-6}$
Внеклеточный матрикс	575	63	3,1	$1,72 \cdot 10^{-11}$
Адгезия к внеклеточному матриксу	194	19	2,8	$1,01 \cdot 10^{-2}$
Связывание с	242	25	2,9	$3,77 \cdot 10^{-3}$

гликозаминогликанами				
Кальций-зависимый сигналинг	22	2,7	2,4	$2,3 \cdot 10^{-2}$
Межклеточные соединения	53	6,6	1,7	$2,7 \cdot 10^{-3}$
Процессы секреции	137	17,1	1,8	$4,0 \cdot 10^{-10}$
Репарация ДНК	508	3	0,17	$3,83 \cdot 10^{-3}$
Процессинг РНК	868	3	0,10	$2,92 \cdot 10^{-7}$
Убиквитин-зависимый процесс катаболизма белков	575	6	0,3	$2,55 \cdot 10^{-2}$
Аутофагия	303	1	0,10	$3,39 \cdot 10^{-2}$

Таблица 16 – Анализ обогащения категорий GO, специфичных для ЭК КА в условиях потока, по результатам транскриптомного профилирования

<b>Категория GO</b>	<b>Общее количество белков</b>	<b>Количество дифференциально экспрессированных белков</b>	<b>Кратность изменения</b>	<b>Значение P после FDR-коррекции</b>
Коллагеновый тример	88	13	3,6	$4,77 \cdot 10^{-3}$
Коллаген внеклеточного матрикса	434	43	2,4	$2,99 \cdot 10^{-5}$
Биосинтез коллагена и модифицирование ферментов	67	12	4,3	$1,41 \cdot 10^{-2}$
Образование коллагена	89	13	3,5	$3,49 \cdot 10^{-2}$
Связывание с коллагеном	70	15	5,2	$6,19 \cdot 10^{-4}$
Базальная часть плазматической мембраны	256	28	2,6	$3,84 \cdot 10^{-4}$
Межклеточные соединения	508	43	2,0	$9,83 \cdot 10^{-4}$
Связывание с протеогликанами	37	10	6,5	$2,29 \cdot 10^{-3}$
Связывание с интегринами	159	23	3,5	$7,84 \cdot 10^{-4}$
Сборка эластических волокон	12	5	10,1	$2,30 \cdot 10^{-2}$

Таблица 17 – Анализ обогащения категорий GO, специфичных для ЭК ВГА в условиях потока, по результатам транскриптомного профилирования

Категория GO	Общее количество белков	Количество дифференциально экспрессированных белков	Кратность изменения	Значение P после FDR-коррекции
Кортикальный цитоскелет	111	13	3,3	$1,30 \cdot 10^{-2}$
Актиновый цитоскелет	510	34	1,9	$2,49 \cdot 10^{-2}$
Организация актинового цитоскелета	549	40	2,1	$4,26 \cdot 10^{-3}$
Биосинтез гликозаминогликанов	70	10	4,0	$2,26 \cdot 10^{-2}$
Метаболизм гликозаминогликанов	123	16	3,7	$1,07 \cdot 10^{-2}$
Внеклеточные везикулы	2123	107	1,4	$1,08 \cdot 10^{-2}$
Положительная регуляция продукции хемокинов	71	10	4,0	$2,50 \cdot 10^{-2}$
Положительная регуляция продукции моноцитарного хемоаттрактантного белка-1	10	4	11,3	$4,92 \cdot 10^{-2}$
Положительная регуляция продукции интерлейкина-6	98	13	3,8	$8,50 \cdot 10^{-3}$
Положительная регуляция продукции цитокинов	481	37	2,2	$2,74 \cdot 10^{-3}$

В статических условиях общее количество гиперэкспрессированных в ЭК КА генов при пороге отсечения логарифмической кратности изменения  $\geq 1$  и скорректированном с FDR-поправкой значении  $P < 0,05$  составило 729, гиперэкспрессированных в ЭК ВГА – 926, не экспрессированных дифференциально – 17789 (рис. 26, рис. 27). Приблизительно схожее суммарное количество дифференциально экспрессированных в ЭК КА и ЭК ВГА генов, выявленное в двух различных экспериментах (1863 в условиях

потока и 1655 в статических условиях) и паттерн их дифференциальной экспрессии свидетельствовал о конкордантности между данными экспериментами и большей чувствительности, но меньшей специфичности транскриптомного профилирования в сравнении с протеомным.

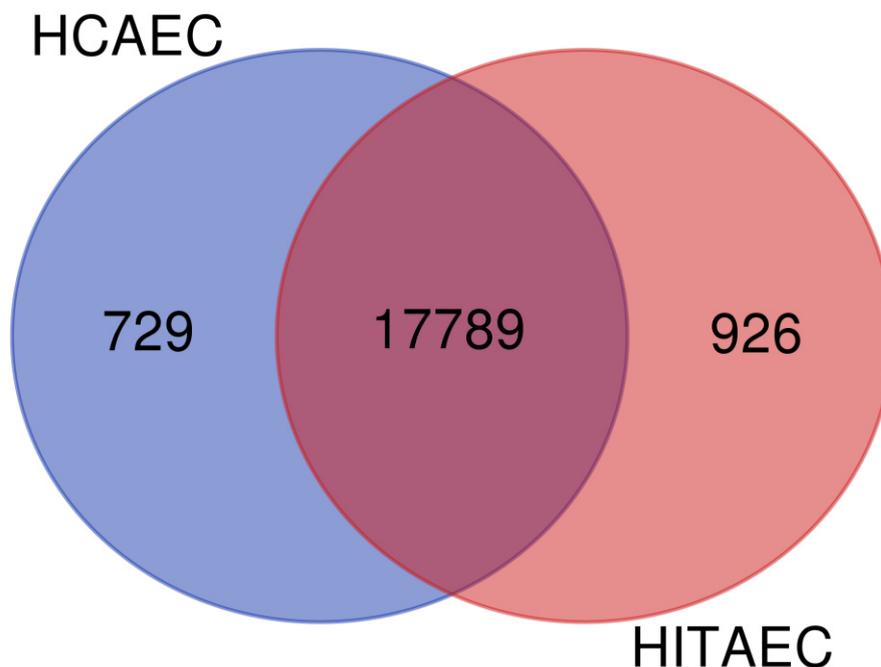


Рисунок 26 – Диаграмма Венна, показывающая количество дифференциально экспрессированных генов в эндотелиальных клетках коронарной артерии и внутренней грудной артерии в статических условиях. HCAEC – эндотелиальные клетки коронарной артерии; HITAEC – эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии

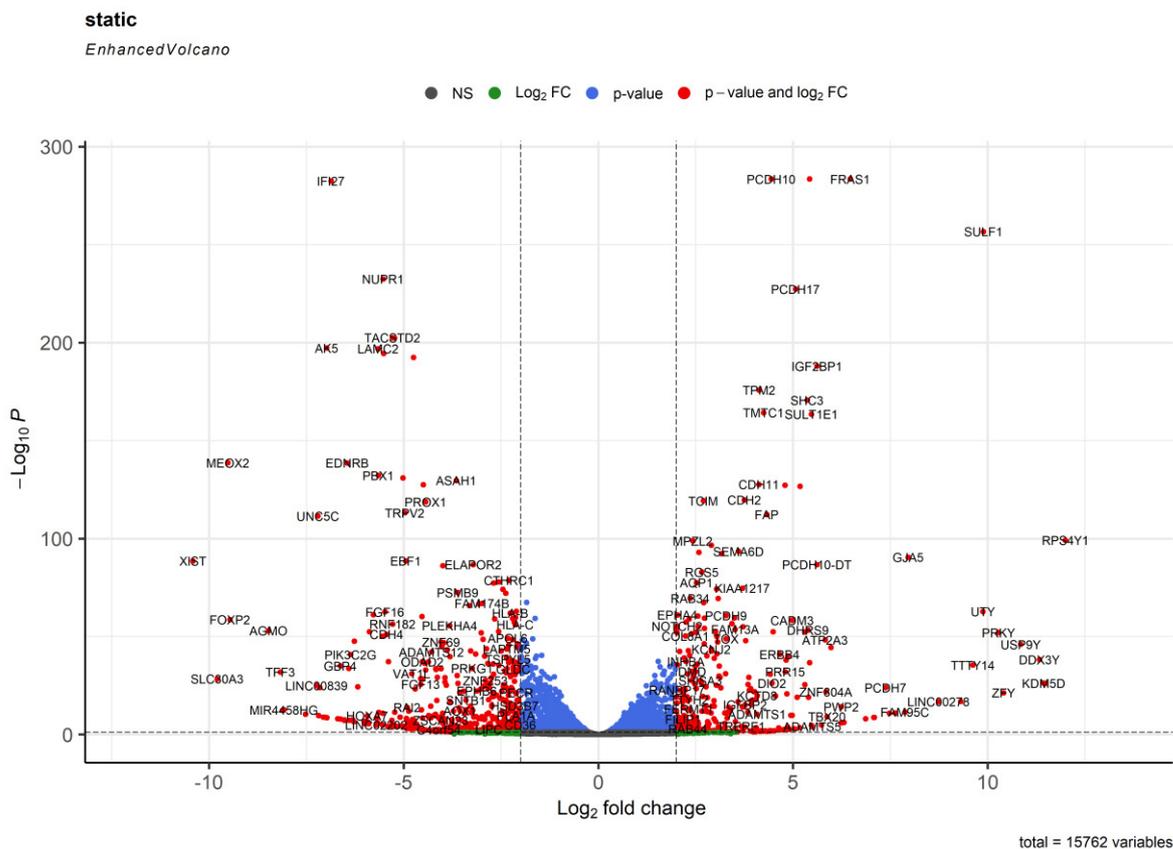


Рисунок 27 – Диаграмма рассеивания, показывающая распределение экспрессированных генов в эндотелиальных клетках коронарной артерии и внутренней грудной артерии в статических условиях. Серые точки – гены с  $\log_2$  fold change < 1 и скорректированным с поправкой FDR P-value > 0,05. Зеленые точки – гены с  $\log_2$  fold change > 1 и скорректированным с поправкой FDR P-value > 0,05. Голубые точки – гены с  $\log_2$  fold change < 1 и скорректированным с поправкой FDR P-value < 0,05. Красные точки – гены с  $\log_2$  fold change > 1 и скорректированным с поправкой FDR P-value < 0,05

При анализе категорий, к которым относились найденные ДЭГ, в условиях потока было продемонстрировано сходствоЭК КА иЭК ВГА в таких физиологических категориях, как синтез коллагена и других компонентов внеклеточного матрикса, прикреплениеЭК к внеклеточному матриксу, организация межклеточных взаимодействий и выделение внеклеточных везикул (таблица 18). В экспрессионном профилеЭК КА была выше доля транскриптов, ассоциированных с развитием сосудов в целом и артерий, синтезом соединений азота и протеолизом (таблица 19). В экспрессионном профилеЭК ВГА преобладали транскрипты, ассоциированные с эндосомально-лизосомальным компартментом,

провоспалительным ответом, синтезом макромолекул, репарацией ДНК, процессингом и сплайсингом РНК, биогенезом рибосом и трансляцией (таблица 20).

Таблица 18 – Анализ обогащения категорий GO, характерных одновременно для ЭК КА и ЭК ВГА в статических условиях, по результатам транскриптомного профилирования

Категория GO	Общее количество белков	Количество дифференциально экспрессированных белков	Кратность изменения	Значение P после FDR-коррекции
<b>Первичные эндотелиальные клетки коронарной артерии</b>				
Коллаген внеклеточного матрикса	434	32	2,4	$2,51 \cdot 10^{-3}$
Внеклеточный матрикс	575	35	2,0	$3,30 \cdot 10^{-2}$
Сборка межклеточных соединений	276	21	2,5	$1,59 \cdot 10^{-2}$
Межклеточные соединения	50	7,2	1,9	$6,1 \cdot 10^{-4}$
Внеклеточные везикулы	2123	92	1,4	$4,87 \cdot 10^{-2}$
Процессы секреции	91	13,1	1,4	$3,8 \cdot 10^{-3}$
<b>Первичные эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии</b>				
Коллаген внеклеточного матрикса	434	32	1,9	$3,14 \cdot 10^{-2}$
Внеклеточный матрикс	575	42	1,9	$1,13 \cdot 10^{-2}$
Адгезия к внеклеточному матриксу	135	15	2,8	$4,51 \cdot 10^{-2}$
Межклеточные соединения	56	6,3	1,6	$5,2 \cdot 10^{-3}$
Секреция везикул	1051	64	1,5	$2,50 \cdot 10^{-2}$
Процессы секреции	127	14,2	1,5	$1,3 \cdot 10^{-4}$

Таблица 19 – Анализ обогащения категорий GO, специфичных для ЭК КА в статических условиях, по результатам транскриптомного профилирования

Категория GO	Общее количество белков	Количество дифференциально экспрессированных белков	Кратность изменения	Значение P после FDR-коррекции
Развитие артерий	95	11	3,9	$2,19 \cdot 10^{-2}$
Развитие сосудов	532	41	2,6	$7,67 \cdot 10^{-5}$
Клеточный биосинтез соединений азота	1588	26	0,5	$4,30 \cdot 10^{-2}$
Протеолиз в ходе катаболизма белков	647	6	0,3	$4,92 \cdot 10^{-2}$

Таблица 20 – Анализ обогащения категорий GO, специфичных для ЭК ВГА в статических условиях, по результатам транскриптомного профилирования

Категория GO	Общее количество белков	Количество дифференциально экспрессированных белков	Кратность изменения	Значение P после FDR-коррекции
Ранние эндосомы	415	32	2,0	$1,85 \cdot 10^{-2}$
Эндосомы	1036	69	1,7	$3,38 \cdot 10^{-3}$
Лизосомы	749	53	1,8	$5,70 \cdot 10^{-3}$
Провоспалительный ответ	540	40	1,9	$2,32 \cdot 10^{-2}$
Процесс биосинтеза макромолекул	1487	31	0,5	$1,11 \cdot 10^{-2}$
Репарация ДНК	508	5	0,25	$1,64 \cdot 10^{-2}$
Процессинг РНК	868	4	0,12	$8,31 \cdot 10^{-7}$
Сплайсинг РНК	368	1	0,07	$4,40 \cdot 10^{-3}$
Биогенез рибосом	303	1	0,08	$2,01 \cdot 10^{-2}$
Трансляция	379	2	0,13	$1,29 \cdot 10^{-2}$

Таким образом, и для ЭК КА, и для ЭК ВГА были характерны экспрессия генов и белков, ответственных за синтез коллагена и других компонентов внеклеточного матрикса, прикрепление к компонентам

внуклеточного матрикса и конкретно базальной мембраны, организацию межклеточных соединений, секрецию внуклеточных везикул, а также метаболизм макромолекул (ДНК, РНК и белков). Вместе с тем, ЭК КА были более активны в отношении организации базальной мембраны, биосинтеза и формирования коллагена, а также организации межклеточных взаимодействий, в то время как ЭК ВГА обладали более выраженным провоспалительным сигналингом, более активным синтезом макромолекул и соединений азота (NO), более активной регуляцией метаболизма РНК, биогенезом рибосом и более выраженной рибосомальной активностью.

В целом, полученные в ходе настоящего исследования данные позволили сделать следующие выводы:

1. Выявлена определенная степень гетерогенности ЭК КА и ЭК ВГА (выражающаяся в 244 белках и 729-1014 генах, гиперэкспрессированных в ЭК КА, а также 287 белках и 849-926 генах, гиперэкспрессированных в ЭК ВГА). Вместе с тем, не идентифицировано ни одного белка или транскрипта, которые были бы даже теоретически (по величине изменения экспрессии) пригодны выступить в качестве отличительного маркера того или иного типа артериальных ЭК. Поэтому представляется разумным сделать вывод о том, что некоторые различия в биохимии процессов, протекающих в ЭК КА и ЭК ВГА, не являются критичными для их паракринного взаимодействия и говорят в пользу теории их биологической конгруэнтности в условиях искусственного анастомоза (морфофункциональная система «конduit-артерия») при КШ.

2. Принципиальных различий в степени гетерогенности ЭК КА и ЭК ВГА в различных биомеханических условиях (физиологический пульсирующий поток и имитирующие осцилляторное течение статические условия) нет, однако при прочих равных условиях анализ физиологии эндотелия все равно представляется более правильным проводить в состоянии пульсирующего потока, являющегося естественным для эндотелия.

3. Сопоставление транскриптомных и протеомных данных продемонстрировало, что при одинаковом пороге отсечения количество ДЭГ получается больше. По мере реализации в клетке посттранскрипционных и трансляционных процессов, по данным протеомного профилирования, количество дифференциально экспрессированных белков сокращается в 3-5 раз в сравнении с дифференциально экспрессированными генами.

### **3.2. Исследование дегенерации внутренней грудной артерии при ее возрастном ремоделировании**

В работе использовали разработанный нашей исследовательской группой оригинальный вариант сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах (EM-BSEM) который позволяет получать микрофотографии высокого разрешения, визуально сходные с получаемыми при просвечивающей электронной микроскопии. Для исследования использовали участки внутренней грудной артерии человека (ВГА), используемой в качестве кондуитов для коронарного шунтирования. Общее количество пациентов составляло 30, из них 17 мужчин и 13 женщин. Средний возраст пациентов составил  $62 \pm 9$  лет.

Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice), принципами Хельсинкской декларации (2013). Протокол исследования был одобрен Локальным этическим комитетом Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний». До включения в работу от всех пациентов было получено письменное информированное согласие.

Сегменты ВГА длиной 5-7 мм помещали в забуференный (рН 7,4) 10% водный раствор формалина (BioVitrum, Россия). После суточной фиксации в формалине (2 смены раствора формалина по 12 часов каждая) биоматериал

постфиксировали 1% тетраоксидом осмия в 0,1М фосфатном буфере в течение 12 часов, затем окрашивали 2% тетраоксидом осмия в бидистиллированной воде в течение 48 часов. Далее образцы обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации (50, 60, 70, 80 и 95% этанол, все по две смены, каждая смена по 15 минут), окрашивали 2% уранилацетатом (Electron Microscopy Sciences, США) в 95% этаноле (5 часов), обезвоживали 99,7% изопропанолом (BioVitrum, Россия) в течение 5 часов и ацетоном (Реахим, Россия) в течение 3 часа, пропитывали смесью ацетона с эпоксидной смолой Epon (Electron Microscopy Sciences, США) в соотношении 1:1 (6 часов), после чего переносили в свежую порцию эпоксидной смолы (на 24 часа) и далее проводили ее полимеризацию в емкостях FixiForm (Electron Microscopy Sciences, США) при 60°C. После этого образцы в эпоксидных блоках подвергали шлифовке и полировке на установке TegraPol-11 (Struers, США). Контрастирование цитратом свинца проводили по Рейнольдсу в течение 7 минут путем нанесения раствора на поверхность шлифованного образца с последующей его отмывкой бидистиллированной водой. Далее проводили напыление на полированную поверхность эпоксидных блоков углерода (толщина покрытия 10-15 нм) с помощью вакуумного напылительного поста (EM ACE200, Leica). Визуализацию структуры образцов при помощи сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах проводили на электронном микроскопе Hitachi-S-3400N (Hitachi, Япония) в режиме BSECOMP при ускоряющем напряжении 15 кВ.

При исследованиях в структуре стенки сосуда идентифицировали элементы внеклеточного матрикса и клеточный состав. Дополнительно выполняли полуколичественную оценку сохранности эндотелия, степени покрытия поверхности просвета сосудов фибрином, сохранность эластиновых волокон в составе меди. При оценке сохранности эндотелия 3 балла назначали сосудам с полностью сохранным слоем, 0 баллов – сосудам с полностью нарушенным эндотелием или при наличии только отдельных

эндотелиоцитов с нарушенной структурой. Степень покрытия фибрином оценивали в баллах, назначая 3 балла артериям с полным покрытием всей поверхности просвета сосуда фибрином и 0 баллов сосудам свободным от фибринового слоя. Кроме того, рассчитывали процент сосудов в меди и в которых наблюдали наличие макрофагов и пенных клеток.

При высокой сохранности исходной структуры стенки ВГА (рис. 28) ее внутренняя оболочка (интима) преимущественно состояла из сплошного слоя эндотелиальных клеток и базальной мембраны с тонким субэндотелиальным слоем рыхлой соединительной ткани (рис. 28А-Б). Внутренняя эластическая мембрана состояла из фенестрированного слоя эластических волокон. Мышечная оболочка (медия) состояла в основном из расположенных по окружности гладкомышечных клеток, среди которых находились эластические волокна. Максимальное количество эластических волокон находилось на внешней и внутренней границах меди, образуя хорошо различимые внешнюю и внутреннюю эластические мембраны (рис. 28А-В). В центральной части меди эластин был представлен только отдельными разреженными разнонаправленными волокнами, находящимися среди сосудистых гладкомышечных клеток. Внешняя оболочка сосуда (адвентиция) состояла из коллагеновых волокон и связанных с ними фибробластов и фиброцитов. В составе этой оболочки встречались мелкие кровеносные сосуды – *vasa vasorum* (рис. 28В). В целом общая структура ВГА на ранней стадии возрастной дегенерации отличалась от интактных наличием в слое интимы фибрина и гипертрофии сосудистых гладкомышечных клеток в меди (рис. 28А-В).

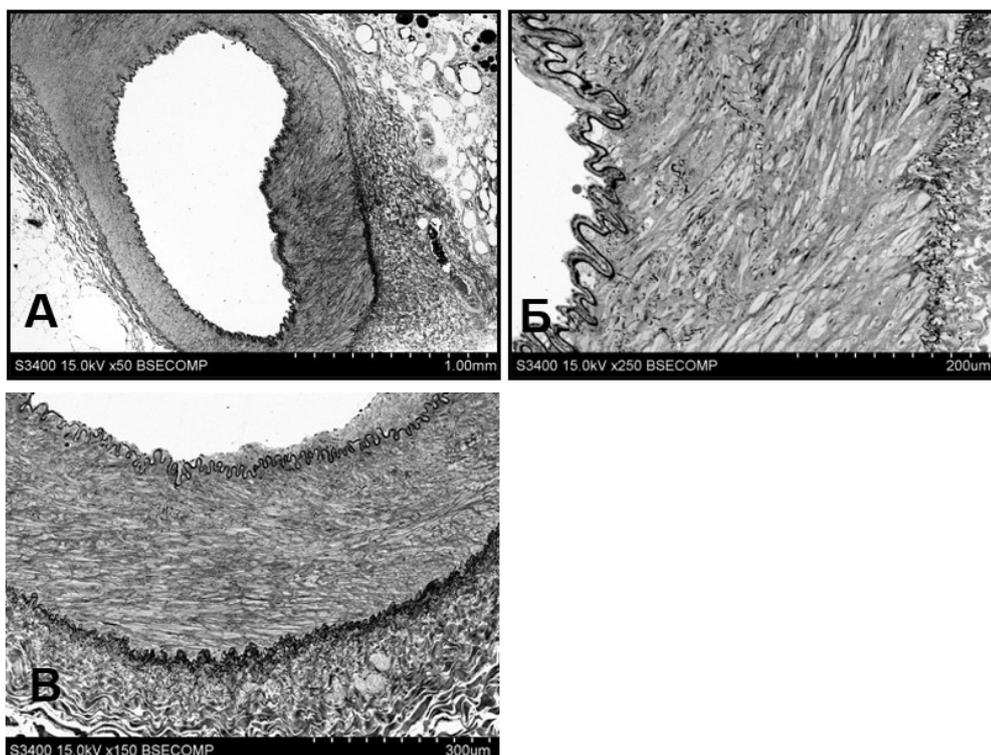


Рисунок 28 – Общая структура сосудистой стенки ВГА с высокой сохранностью тканей. А – ВГА с окружающими тканями. Б – строение медиального слоя с гладкомышечными клетками, В – трехслойная структура стенки ВГА

На ранней стадии возрастной дегенерации ВГА основную массу клеток составляли именно сосудистые гладкомышечные клетки, которые имели упорядоченное расположение в виде ориентированных тяжей, имеющих различную ориентацию относительно стенки просвета сосуда (рис. 29А-В). Между сосудистыми гладкомышечными клетками встречались разволокненные эластические структуры (рис. 29В-Г). В цитоплазме сосудистых гладкомышечных клеток отмечали присутствие мышечных волокон, что указывает на их принадлежность к сократительному фенотипу (рис. 29В-Г). Между собой сосудистые гладкомышечные клетки образовывали расширенные, взаимопроникающие контакты, обладающие повышенной электронной плотностью (рис. 29Г-Д). На границе между медией и адвентицией присутствовали рыхло расположенные эластические волокна в сопровождении коллагеновых волокон (рис. 29Е). Кроме сосудистых гладкомышечных клеток, в составе медики наблюдали наличие

единичных клеток фибробластического ряда. В большом количестве эти клетки присутствовали вблизи наружной эластической мембраны (рис 29В, Е). На границе между медией и адвентицией отмечали наличие большого количества рыхло расположенных, частично фрагментированных эластических волокон (рис. 29Е).

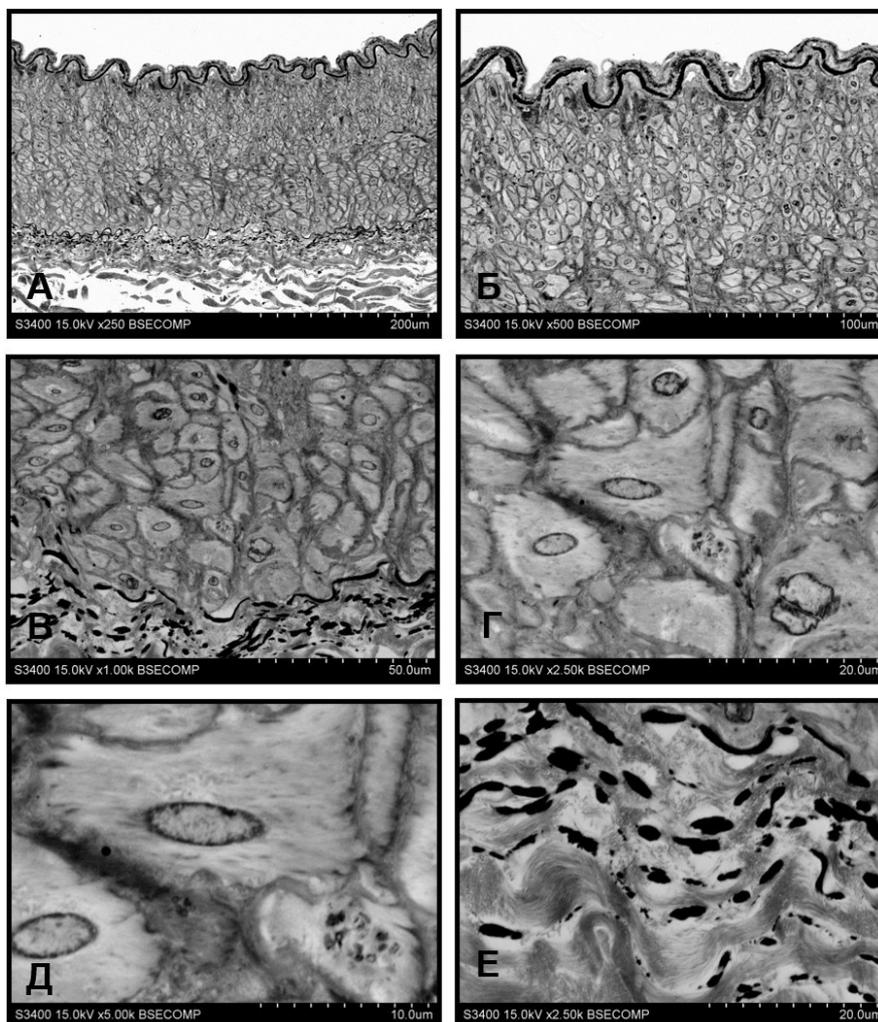


Рисунок 29 – Структура мышечного типа сосудистой стенки ВГА. А-В – преобладание сосудистых гладкомышечных клеток в структуре меди, Г-Д – сосудистые гладкомышечные клетки с сократительными волокнами в цитоплазме и расширенные межклеточные контакты между сосудистыми гладкомышечными клетками с электронноплотным содержимым, Е – эластические и коллагеновые волокна на границе меди и адвентиции

На поздней стадии возрастной дегенерации в стенке ВГА в структуре меди преобладали коллагеновые волокна и клетки фибробластического дифферона (рис. 30). Вблизи внутренней эластической мембраны фибробласты и соединительнотканые волокна образовывали извилистые

структуры с параллельным мембране расположением клеток (рис. 30А-В). Ближе к срединной части меди и в некоторых участках ориентация фибробластоподобных клеток и коллагеновых волокон была перпендикулярной поверхности стенки сосуда (рис. 30Г-Д). Ближе к адвентиции ориентация фибробластов клеток становилась параллельной этому слою и отделялась от него внешней эластической мембраной (рис. 30Е). В толще меди наблюдали наличие останков эластических волокон, которые обычно не имели плотного контакта с другими структурными элементами меди (рис. 30Ж). В отличие от ранних стадий возрастной дегенерации ВГА, на ее поздней стадии, кроме сосудистых гладкомышечных клеток и клеток фибробластического ряда, наблюдали наличие пенистых клеток (рис. 30Ж-И).

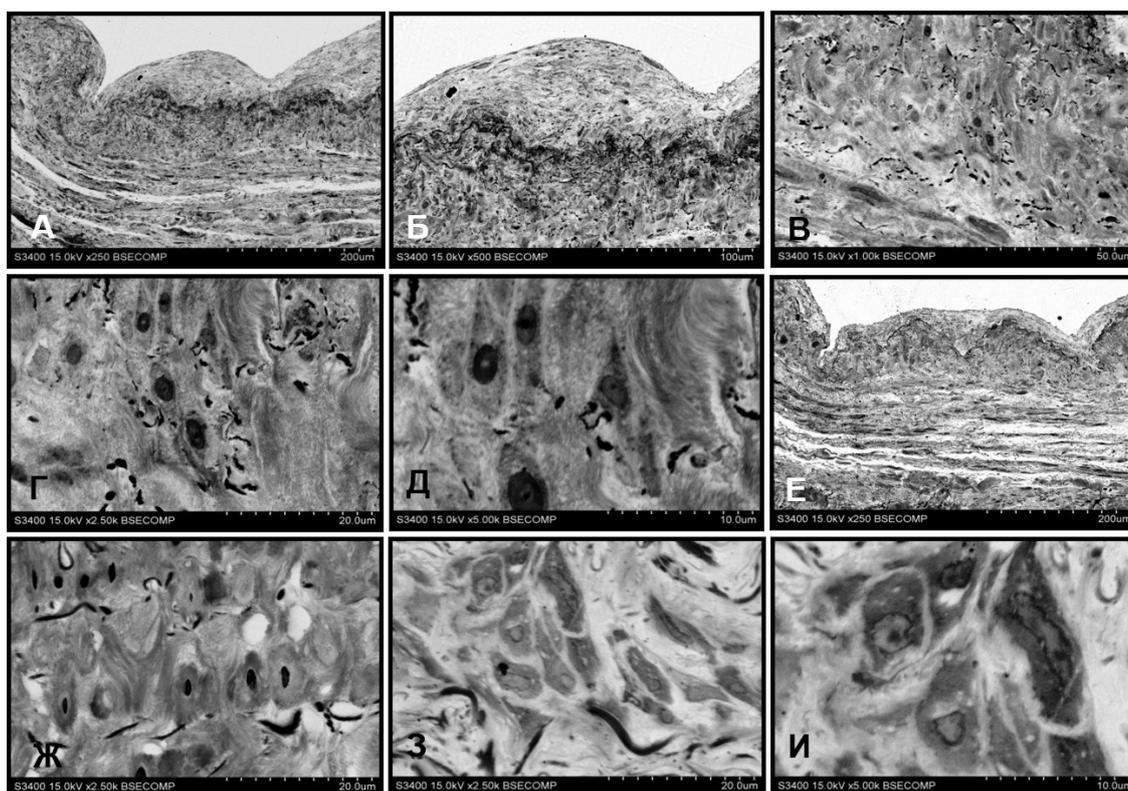


Рисунок 30 – Строение стенки ВГА на поздней стадии возрастной дегенерации. А-В – общий вид, Г-Д – перпендикулярная ориентация фибробластов и коллагеновых волокон в структуре сосудистой стеки, Е – параллельная ориентация фибробластов и коллагеновых волокон в структуре сосудистой стеки, Ж – фрагментированные эластиновые волокна в составе меди и стенки сосуда, З-И – макрофаги и пенистые клетки в структуре сосудистой стенки

На обеих стадиях ремоделирования в ВГА наблюдали структурные нарушения с различной степенью выраженности (рис. 31). Как правило, в слое сосудистой стенки, прилежащем к просвету сосуда, присутствовал слой эластической мембраны, однако встречались варианты и с двумя сближенными мембранами (рис. 31А, Б). Иногда между внутренней эластической мембраной и просветом сосуда наблюдали наличие мембраноподобных ламелл, образованных гранулярными структурами и клетками (рис. 31В).

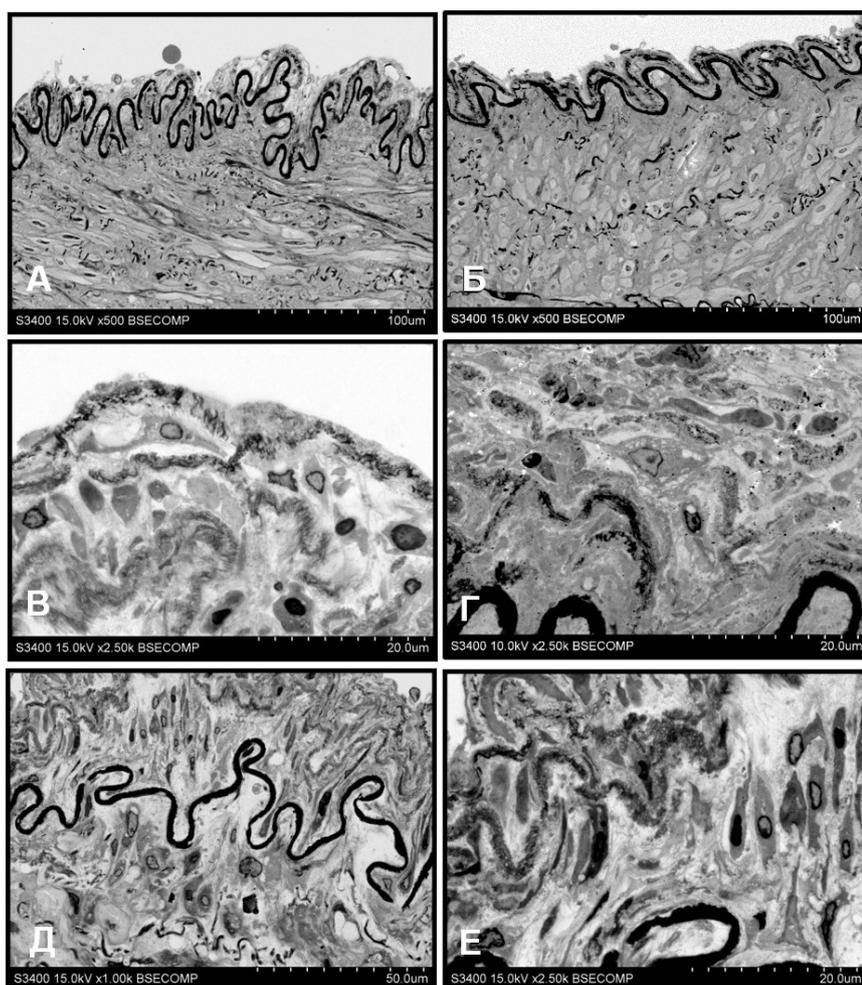


Рисунок 31 – Структура внутренней эластической мембраны сосудистой стенки ВГА вблизи границы с просветом сосуда. А-Г – относительно сохранная внешняя эластическая мембрана, Г-Е – полностью фрагментированная эластическая мембрана, Д – клеточное окружение фрагментированных эластических волокон

Вблизи внутренней эластической мембраны обычно отмечали наличие большого количества различных клеток. Среди них чаще всего

идентифицировали сосудистые гладкомышечные клетки, фибробласты и фиброциты, а также макрофаги (рис. 31В-Е). При наличии нескольких близко расположенных эластических слоев максимальную деструкцию отмечали в слое, обращенном в сторону просвета сосуда (рис. 31Б). Часто этот слой был сильно фрагментирован (рис. 31Г).

В участках ВГА с высокой гистологической сохранностью слоя меди части, обращенная к просвету сосуда, была представлена типичной интимой (рис. 32А-Б).

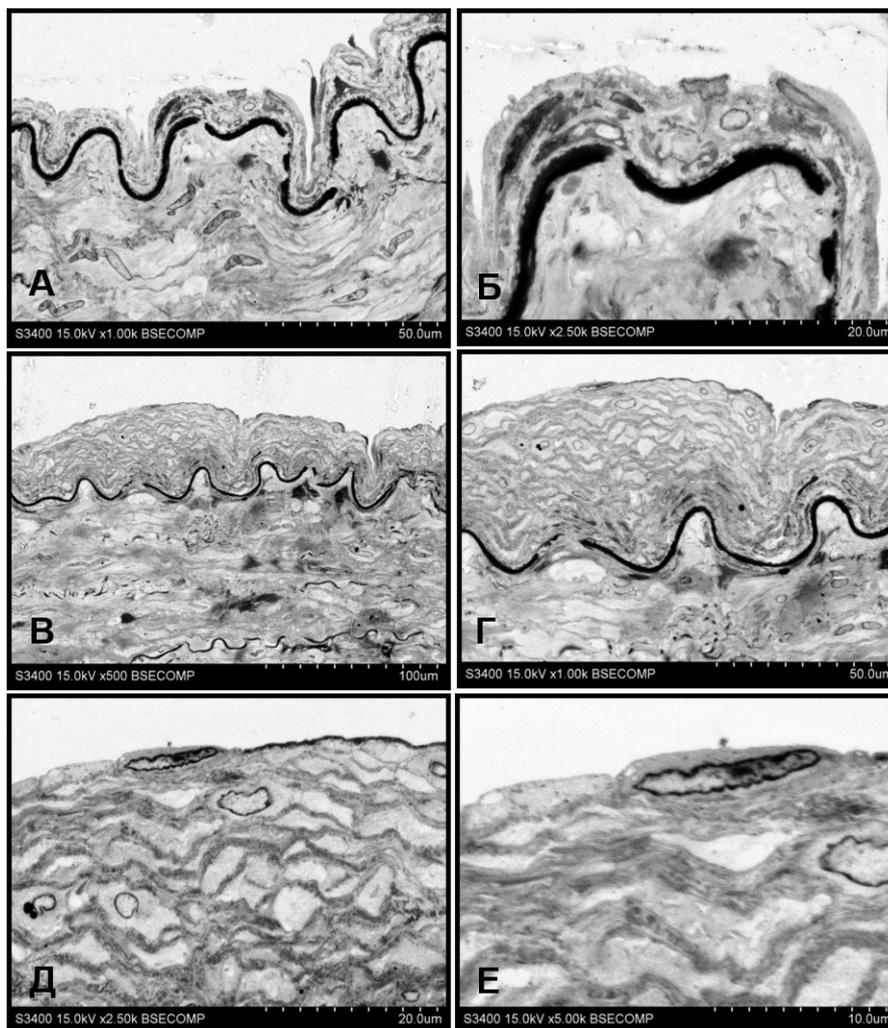


Рисунок 32 – Структурированный фибрин на поверхности эластинового слоя. А-Б – поверхность без выраженного фибринового слоя, В-Е хорошо выраженный фибриновый слой с эндотелием

Вместе с тем, часть поверхности была покрыта структурированным фибриновым слоем (рис. 32В-Е). Фибриновые волокна плотно примыкали к внутренней эластической мембране, и ориентация волокон в этом слое была

параллельной поверхности просвета сосуда (рис. 32В-Г). В составе фибринового слоя присутствовали отдельные клетки, преимущественно сосудистые гладкомышечные клетки (рис. 32В). Слои фибрина имели различную толщину. Толстый фибриновый слой обычно был покрыт сплошным слоем эндотелия (рис. 32В-Е).

Некоторые участки просвета сосуда не имели сплошной эндотелиальной выстилки или слоя фибрина (рис. 33). Часть такой поверхности оставалась обнаженной (рис. 33А), часть была покрыта остатками эндотелия в виде отдельных клеток и моноцитами (рис. 33Б-Е). В таких участках наблюдали интенсивное разрушение эластической мембраны и миграцию моноцитов в толщу сосудистой стенки (рис. 33В-Е).

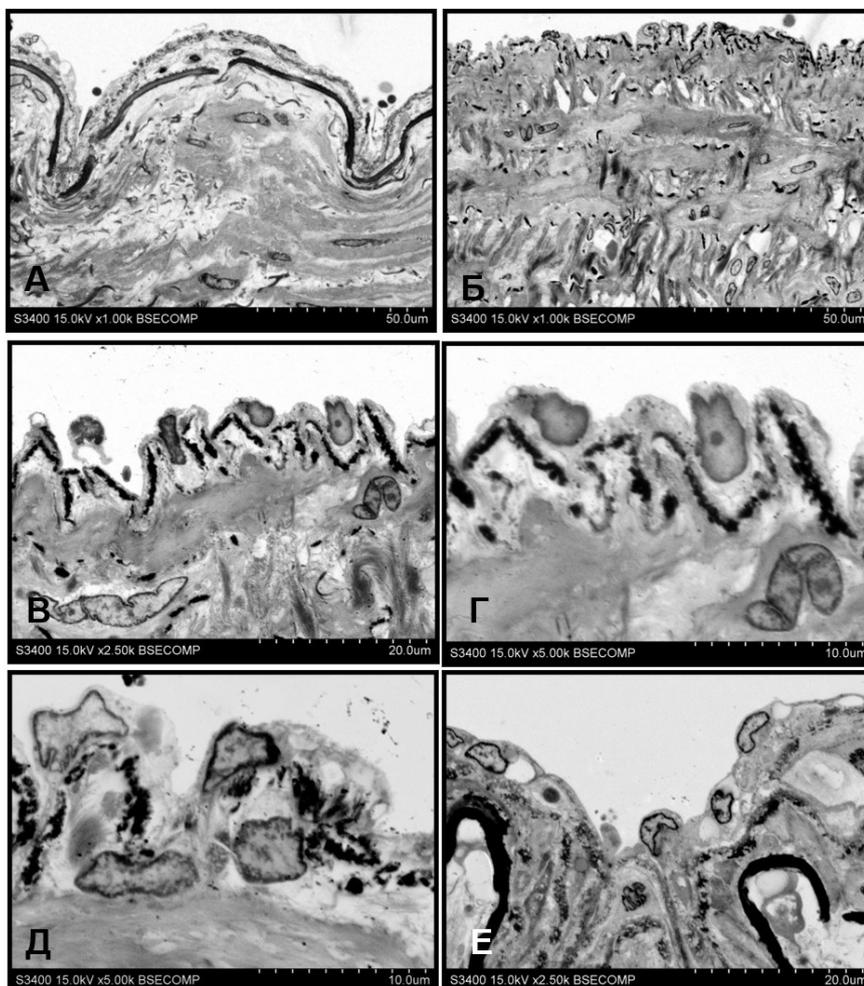


Рисунок 33 – Структура внутреннего слоя эластической пластины без сплошного эндотелиального слоя. А – базальная мембрана на границе с просветом сосуда, Б-Е – различные типы клеток на границе с просветом сосуда

В обобщенном виде полученные данные представлены в таблице 21.

Таблица 21 – Особенности структуры ВГА на различных стадиях возрастного ремоделирования

<b>ПОКАЗАТЕЛЬ</b>	<b>Ранняя стадия возрастного ремоделирования</b>	<b>Поздняя стадия возрастного ремоделирования</b>
Количество, %	30	33,3
Сохранность эндотелия, баллы	1,9	1,3
Количество слоев эластина в интима и во внутренней мембране, среднее	1,2	1,1
Выраженность структурированного фибринового слоя на поверхности просвета сосуда, баллы	1,7	1,2
Сохранность эластиновых мембран в медии, баллы	1,7	1,2
% сосудов с макрофагами	0	50
% сосудов с пенистыми клетками	0	30
% сосудов с нарушением ориентации волокон в медии	67	30

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полиморфные варианты генов *IL10* (rs1800871 и rs1800872), *IL12RB1* (rs2375947) и *CRP* (rs1205) могут являться важным звеном патогенеза РБС и в дальнейшем использованы как биологические маркеры для персонифицированной оценки риска развития данного патологического состояния. Однако необходимо дальнейшее изучение не только образцов геномной ДНК пациентов, но и иссечённых нативных клапанов сердца, для более детальной расшифровки молекулярно-генетических механизмов развития РБС.

Проведенные исследования показали, что створки нативных клапанов сердца, пораженных инфекционным эндокардитом, характеризуются сниженной экспрессией генов *vWF*, *CDH5*, *CDH2*, *COL1A2*, *COL4A1*. Полученные данные свидетельствуют о сочетанном поражении клапанов, когда в одной вегетации присутствуют микроорганизмы разной родовой принадлежности, что ставит перед исследователями, кардиохирургами, кардиологами и клиническими фармакологами новые задачи по определению тактики ведения таких пациентов, та как даже молекулярно-генетические тесты не являются информативными при определении микробного спектра в общем кровотоке при подостром инфекционном эндокардите

Полиморфизм генов воспалительного ответа может быть связан как с увеличением, так и с уменьшением рисков развития ожирения у лиц европеоидной расы, проживающих на территории Западной Сибири (Россия). Отдельные полиморфные варианты генов липидного обмена ассоциированы с увеличением риска развития ожирения.

Результаты исследования ксеноантигенов в биоматериале, консервированном диглицидиловым эфиром этиленгликоля демонстрируют наличие неэкранированной ГНК в эпоксиобработанных ксеноперикардальных биопротезах клапанов сердца, сохраняющейся в периоде до 2,5 лет после имплантации. Исходя из этого, следует заключить, что широко применяемый в России метод стабилизации ксенобиоматериала

диглицидиловым эфиром этиленгликоля не имеет преимуществ перед консервацией глутаровым альдегидом в отношении экранирования или разрушения ГНК – одного из наиболее иммунореактивных гликановых ксеноантигенов. С учетом этого, ГНК может быть ответственна за раннюю кальцификацию или иммунное отторжение имплантатов. Необходима разработка подходов к дополнительной модификации эпоксиобработанного биоматериала, позволяющих устранять или маскировать гликановые ксеноантигены.

По результатам проведенных научно-исследовательских работ был предложен концепт коронарного стент-графта с биodeградируемой оболочкой, предназначенный для лечения перфораций коронарных артерий. В проведенных численных экспериментах было показано, что поликапролактон или сополимер полилактид-со-капролактон продемонстрировали возможность значительного механического растяжения без разрушения, при этом обладая умеренным модулем упругости.

Проведенные исследования способов оптимизации условий синтеза биосовместимых гидрогелей на основе поливинилового спирта продемонстрировали, что увеличение концентрации, молекулярной массы и числа циклов замораживания и оттаивания приводят к росту механической прочности гидрогелей поливинилового спирта. Образование дополнительных химических связей – полуацеталей – в результате взаимодействия между гидроксильными группами ПВС и альдегидными группами ГА приводит к росту прочности на разрыв криогелей ПВС, уплотнению структуры и снижению водосодержания, в то время как ТБН не образует устойчивых химических связей с молекулами ПВС и, встраиваясь в структуру геля, приводит к ухудшению механических свойств материалов и неограниченному набуханию материала.

Способ получения аутологичного фибрина без использования экзогенного тромбина позволяет исключить возможность переноса инфекционных заболеваний, снизить риск сенсибилизации, активации

иммунного и воспалительного ответа у реципиента. Кроме этих очевидных преимуществ, полученный фибрин приобретает большую прочность и жесткость, устойчивость к деградации и характеризуется меньшей тромбогенностью при сохранении положительных биологических свойств. Учитывая вышесказанное, данный способ полимеризации может являться альтернативой традиционному при создании персонифицированных сосудистых протезов и других медицинских изделий, контактирующих с кровью.

Эффективность использования проангиогенного ростового фактора VEGF и различных конфигураций RGD-пептидов, а также различных подходов к модифицированию изделия была оценена в сравнительном аспекте *in vitro* и в преκлинических испытаниях на модели овцы.

Выявленное преимущество биodeградируемых заплат PNBV/PCL/VEGF заключалось в том, что инкорпорирование VEGF в состав заплаты в процессе ее изготовления методом эмульсионного электроспиннинга и отсутствие последующих манипуляций по модифицированию поверхности с использованием агрессивных поверхностно-активных веществ привело к сохранению физико-механических характеристик заплат, на снижая прочность и не увеличивая жесткость конечного изделия, что наблюдали после модифицирования RGD-пептидами поверхности биodeградируемых заплат. Гемосовместимость заплат PNBV/PCL/VEGF оказалась самой высокой даже в сравнении с ксеноперикардальным лоскутом, который активно используется в клинике.

На овечьей модели заплаты с RGD вне зависимости от конфигурации пептида способствовали эндотелизации, однако провоцировали гиперплазию неоинтимы и гранулематозное воспаление, тогда как заплаты PNBV/PCL/VEGF на модели овцы продемонстрировали оптимальную способность формировать на своей основе здоровую новообразованную сосудистую ткань с формированием тонкой неоинтимы, выстланной эндотелием, среднего гладкомышечного слоя и адвентиции, содержащей все

основные структурные элементы, свойственные данному слою: пучки коллагеновых волокон, фибробластоподобные клетки и *vasa vasorum*. Все это свидетельствует о высокой эффективности инкорпорированного в состав заплат сосудистого эндотелиального фактора роста.

Проведённый биоинформатический анализ показал, что молекулярный профиль ЭК двух артерий имеет много общего как со стороны клеточной и межклеточной структуры, так и функционально. Вероятно, это и объясняет биологическую конгруэнтность ВГА в качестве кондуита и целевой КА при КШ за счёт схожести их эндотелиального слоя и, следовательно, определяет долгосрочность функционирования морфофункциональной системы «конduit-артерия», обуславливая хорошие отдалённые результаты после операции. Несмотря на имеющиеся особенности ЭК КА и ВГА, в настоящем исследовании доказано, что степень их гетерогенности незначительна, а высокое сродство в значительной мере характеризует артерио-артериальный континуум как оптимальный с точки зрения биологической конгруэнтности ЭК входящих в его состав сосудов.

Продемонстрировано, что основную роль в формировании неоинтимы, а также в развитии адвентициального и околосоудистого воспаления в различных патофизиологических сценариях (баллонное повреждение интимы брюшной аорты крыс, внутривенное введение кальципротеиновых частиц при интактной интиме, гетеротопическая имплантация кровеносных сосудов) из всех типов сосудов микроциркуляторного русла (артериолы, венулы и капилляры) играют именно капилляры, составляющие до 75% от общего количества этих сосудов, поскольку они наиболее подвержены вазоспазму и изменению сосудистого просвета.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Антонова Л.В., Матвеева В.Г., Ханова М.Ю., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С. Способ изготовления аутологичного фибрина с регулируемым содержанием фибриногена без использования экзогенного тромбина // Патент России № 2758260 С1 Дата государственной регистрации: 27.10.2021.
2. Барбараш Л.С. Эволюция биопротезов клапанов сердца: достижения и проблемы двух десятилетий / Л.С. Барбараш, И.Ю. Журавлева // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2012. – Т.1. – С.4-11.
3. Влияние давления имплантации стента в коронарных артериях на ранние и отдаленные результаты чрескожных коронарных вмешательств / А.Н. Федорченко [и др.] // Международный журнал интервенционной кардиологии. – 2008. – Т.14. – С. 86-87.
4. Гавриленко А.В. Классическая и эверсионная каротидная эндартерэктомия у пациентов со стенозом внутренней сонной артерии / А.В. Гавриленко, А.В. Куклин, В.В. Фомина // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2018. – №2. – С.87-92.
5. Глушкова Т.В. Структура кальцификатов в биопротезах клапанов сердца, консервированных диглицидиловым эфиром этиленгликоля / Т.В. Глушкова, А.Е. Костюнин // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2021. – Т.10, №2. – С.16-24.
6. Непосредственные и отдаленные результаты различных методов реконструкции каротидной бифуркации / А.А. Карпенко [и др.] // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2013. – Т.17, №1. – С.21-24.
7. Семёнов В.Ю. Динамика числа реваскуляризаций миокарда в России и мире в 2000-2018 годах / В.Ю. Семёнов, И.В. Самородская // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2021. – Т.10. №4. – С.68-78.

8. Тимченко Т.П. Бисфосфонаты как потенциальные ингибиторы кальцификации биопротезов клапанов сердца // Современные технологии в медицине. – 2022. – Т.14, №2. – С.68-79.
9. Тканеинженерная заплатка, модифицированная фактором роста эндотелия сосудов, для реконструкции сосудистой стенки / В.В. Севостьянова [и др.] // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2020. – Т.24, №4. – С.114-128.
10. Электрофизиологический субстрат при фибрилляции предсердий / С.А. Ковалев [и др.] // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2012. – Т.5, №3. – 528-530.
11. 2014 AHA/ACC/HRS guideline for the management of patients with atrial fibrillation: executive summary: a report of the American College of Cardiology/ С.Т. January [et al.] // American Heart Association Task Force on practice guidelines and the Heart Rhythm Society. Circulation. – 2014. – V.130, №23. – 2071-2104.
12. A meta-analysis of randomized trials comparing bovine pericardium and other patch materials for carotid endarterectomy / P. Texakalidis [et al.] // J. Vasc. Surg. – 2018. – V.68, №4. – P.1241-1256.
13. A review of the immune response stimulated by xenogenic tissue heart valves / S.J. Bozso [et al.] // Scand J Immunol. – 2021. – V.93, №4. – P.e13018.
14. Ahmed M. The performance of a small-calibre graft for vascular reconstructions in a senescent sheep model/ M. Ahmed, G. Hamilton, A.M. Seifalian // Biomaterials. – 2014. – V.35, №33. – P.9033-9040.
15. Antioxidant enzymes reduce DNA damage and early activation of valvular interstitial cells in aortic valve sclerosis/ E. Branchetti [et al.] // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2013. – V.33. – P.e66–e74.
16. Attachment of human endothelial cells to polyester vascular grafts: pre-coating with adhesive protein assemblies and resistance to short-term shear stress / J. Chlupáč [et al.] // Physiol Res. – 2014. – V.63, №2. – P.167-177.

17. Biodegradable patches for arterial reconstruction modified with RGD peptides: results of an experimental study / V.V. Sevostianova [et al.] // *ACS Omega*. 2020. – V.5, №34. – P.21700-21711.
18. Biomaterials: Foreign Bodies or Tuners for the Immune Response / E. Mariani [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2019. – V.20, №3. – P.636.
19. Cahill T.J., Prendergast B.D. Infective endocarditis // *Lancet*. – 2016. – V.387, №10021. – P.882-893.
20. Cardiac tamponade in the “new device” era: Evaluation of 6999 consecutive percutaneous coronary interventions / R. von Sohsten [et al.] // *American Heart Journal*. – 2000. – V.140, №2. – P.279-283.
21. Carpentier’s reconstructive valve surgery: from valve analysis to valve reconstruction. Carpentier’s reconstructive valve surgery / A.F. Carpentier [et al.] // Maryland Heights, Mo: Saunders Elsevier. – 2010. – P.354.
22. Characterization of immunogenic Neu5Gc in bioprosthetic heart valves / E.M. Reuven [et al.] // *Xenotransplantation*. – 2016. – V.23, №5. – P.381-392.
23. Chen M.C. Surgical treatment of atrial fibrillation with concomitant mitral valve disease: an Asian review / M.C. Chen, J.P. Chang, Y.L. Chen // *Chang Gung Med. J*. – 2008. – V.31, №6. – P.538-545.
24. Christen M.-O. Polycaprolactone: How a Well-Known and Futuristic Polymer Has Become an Innovative Collagen-Stimulator in Esthetics / M.-O. Christen, F. Vercesi // *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. – 2020. – V.13. – P.31-48.
25. Coronary perforation and covered stents: An update and review / P. Panduranga [et al.] // *Heart Views*. – 2011. – V.12, №2. – P.63.
26. Data-independent acquisition mass spectrometry in severe rheumatic heart disease (RHD) identifies a proteomic signature showing ongoing inflammation and effectively classifying RHD cases / Salie MT [et al.] // *Clin Proteomics*. – 2022. – V.19, №1. – P.7.

27. Design and manufacture of a polyvinyl alcohol (PVA) cryogel tri-leaflet heart valve prosthesis / H. Jiang [et al.] // *Med. Eng. Phys.* – 2004. – V.26. – P.269–277.
28. Development of antibodies to human thrombin and factor V in a pediatric patient exposed to topical bovine thrombin/ C.Y. Lo [et al.] // *Pediatr Blood Cancer.* – 2010. – V.55, №6. – P.1195-1197.
29. Diagnosis, management, and clinical outcome of cardiac tamponade complicating percutaneous coronary intervention / M. Fejka [et al.] // *The American Journal of Cardiology.* – 2002. – V.90, №11. – P.1183–1186.
30. Diesen D.L. Bovine thrombin: history, use, and risk in the surgical patient / D.L. Diesen, J.H. Lawson // *Vascular.* – 2008. – №1. – P.29-36.
31. Do cytokines play a role in predicting some features and outcome in infective endocarditis? / M.C.P. Nunes [et al.] // *Adv. Infect. Dis.* – 2013. – V.3, №2. – P.115-119.
32. Durability data for bioprosthetic surgical aortic valve: a systematic review / B. Fatima [et al.] // *JAMA Cardiol.* – 2019. – V.4, №1. – P.71-80.
33. Evaluation of PCR in the molecular diagnosis of endocarditis/ S. Lang [et al.] // *J Infect.* – 2004. – V.48, №3. – P.269-275.
34. Fang S., Review: Tissue Engineering of Small-Diameter Vascular Grafts and Their In Vivo Evaluation in Large / S. Fang, D.G. Ellman, D.C. Andersen // *Animals and Humans. Cells.* – 2021. – №10. – P.713.
35. Functional growth in tissue-engineered living, vascular grafts: follow-up at 100 weeks in a large animal model / S.P. Hoerstrup [et al.] // *Circulation.* – 2006. – V.114, №1. – P.159-166.
36. Future Perspectives in Small-Diameter Vascular Graft Engineering / P. Mallis [et al.] // *Bioengineering (Basel).* – 2020. – V.7, №4. – P.160.
37. Global epidemiology of valvular heart disease / S. Coffey [et al.] // *Nature Reviews Cardiology.* – 2021. – V.18, №12. – P.853-864.

38. Global, Regional, and National Burden of Calcific Aortic Valve and Degenerative Mitral Valve Diseases, 1990-2017 / S. Yadgir [et al.] // *Circulation*. – 2020. – V.141, № 21. – P.1670-1680.
39. Glycosphingolipids of porcine, bovine, and equine pericardia as potential immune targets in bioprosthetic heart valve grafts / A. Barone [et al.] // *Xenotransplantation*. – 2018. – V.25, №5. – P.e12406.
40. Head S.J. Mechanical versus bioprosthetic aortic valve replacement / S.J. Head, M. Çelik, A.P. Kappetein // *Eur. Heart J.* – 2017. – V.38, №28. – P.2183-2191.
41. Heart disease and stroke statistics – 2021 update: a report from the American Heart Association / S.S. Virani [et al.] // *Circulation*. – 2021. – V.143. – P.e254–e743.
42. Implantation of VEGF-functionalized cell-free vascular grafts: regenerative and immunological response / R.J. Smith [et al.] // *The FASEB Journal*. – 2019. – V.33, №4. – P.5089-5100.
43. In situ vascular tissue remodeling using biodegradable tubular scaffolds with incorporated growth factors and chemoattractant molecules. / L.V. Antonova [et al.] // *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. – 2018. – V.7, №2. – P.25-36.
44. Incidence, Treatment, and Outcomes of Coronary Perforation During Chronic Total Occlusion Percutaneous Coronary Intervention / B.A. Danek [et al.] // *The American Journal of Cardiology*. – 2017. – V.120, №8. – P.1285-1292.
45. Intraoperative assessment of technical perfection in carotid endarterectomy: a prospective analysis of 1305 completion procedures. Collaborators of the EVEREST study group. Eversion versus standard carotid endarterectomy / S. Zannetti [et al.] // *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* – 1999. – V.18, №1. – P.52-58.
46. Krilleke D. The heparin-binding domain confers diverse functions of VEGF-A in development and disease: A structure–function study / D. Krilleke,

Y.S. Ng, D.T. Shima // *Biochemical Society Transactions*. – 2009. – V.37, №6. – P.1201-1206.

47. Lawson J.H. The clinical use and immunologic impact of thrombin in surgery // *Semin Thromb Hemost*. – 2006. – V.32, №1. – P.98-110

48. Luminal surface design of electrospun small-diameter graft aiming at in situ capture of endothelial progenitor cell / Miyazu K [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. – 2010. – V.94, №1. – P.53-63.

49. Materials and Manufacturing Perspectives in Engineering Heart Valves: A Review / F. Oveissi [et al.] // *Mater. Today Bio*. – 2019. – V.5. – P.100038.

50. Mechanical considerations for polymeric heart valve development: Biomechanics, materials, design and manufacturing / R.L. Li [et al.] // *Biomaterials*. – 2019. – V.225. – P.119493.

51. Mitral Valve Annuloplasty Rings: Review of Literature and Comparison of Functional Outcome and Ventricular Dimensions / A. Khamooshian [et al.] // *Innovations: Technology and Techniques in Cardiothoracic and Vascular Surgery*. – 2014. – V. 9, №6. – P.399-415.

52. Molecular detection of *Coxiella burnetii* in heart valve tissue from patients with culture-negative infective endocarditis / Y.R. Jang [et al.] // *Medicine (Baltimore)*. – 2018. – V.97, №34. – P.e11881.

53. Muhamed B. Genetics of rheumatic fever and rheumatic heart disease / B. Muhamed, T. Parks, K. Sliwa // *Nature Reviews Cardiology*. – 2020. – V.17, №3. – P.145-154.

54. Outcome of atrial fibrillation after mitral valve repair. / J.F. Obadia el Farra [et al.] // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. – 1997. – V.114, №2. – P.179–185.

55. Pashneh-Tala S. The Tissue-Engineered Vascular Graft-Past, Present, and Future / S. Pashneh-Tala, S. MacNeil, F. Claeysens // *Tissue Eng Part B Rev*. – 2016. – V.22, №1. – P.68-100.

56. Paxillin controls directional cell motility in response to physical cues / J.E. Sero [et al.] // *Cell Adh Migr.* – 2012. – V.6, №6. – P.502-508.
57. Percutaneous excimer laser coronary angioplasty: Results in the first consecutive 3,000 patients / F. Litvack [et al.] // *Journal of the American College of Cardiology.* – 1994. – V.23. – №2. – P. 323–329.
58. Polydioxanone implants: A systematic review on safety and performance in patients / J.A. Martins [et al.] // *Journal of Biomaterials Applications.* – 2020. – V.34, №7. – P. 902-916.
59. Preparation of Biodegradable and Elastic Poly ( $\epsilon$ -caprolactone-co-lactide) Copolymers and Evaluation as a Localized and Sustained Drug Delivery Carrier / J. Park [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2017. – V.18, №3. – P.671.
60. Rheumatic heart disease / E. Marijon [et al.] // *Lancet.* – 2012. – V.379. – P.953-964.
61. Small calibre biosynthetic bacterial cellulose blood vessels: 13-months patency in a sheep model / C.J. Malm [et al.] // *Scand Cardiovasc J.* – 2012. – V.46, №1. – P.57-62.
62. Standardized definitions of structural deterioration and valve failure in assessing long-term durability of transcatheter and surgical aortic bioprosthetic valves: a consensus statement from the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI) endorsed by the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) / D. Capodanno [et al.] // *Eur. Heart J.* – 2017. – V.38, №45. – P.3382-3390.
63. Structural valve deterioration is linked to increased immune infiltrate and chemokine expression / S.J. Bozso [et al.] // *J Cardiovasc Trans Res.* – 2021. – V.14. – P.503-512.
64. Study on the association of TNF- $\alpha$ (-308), IL-6(-174), IL-10(-1082) and IL-1Ra(VNTR) gene polymorphisms with rheumatic heart disease in Pakistani patients / S. Rehman [et al.] // *Cytokine.* – 2013. – V.61, №2. – P.527-531.

65. Successful Management of Coronary Artery Rupture with Stent-Graft: A Case Report / B. Ekici [et al.] // Case Reports in Medicine. – 2014. – V.2014. – P. 1–4.
66. Surgical ablation for atrial fibrillation in cardiac surgery: a meta-analysis and systematic review / D. Cheng [et al.] // Innovations (Phila). – 2010. – V.5, №2. – 84-96.
67. Swartz D.D. Animal models for vascular tissue-engineering / D.D. Swartz, S.T. Andreadis // Curr. Opin. Biotechnol. – 2013. – V.24, №5. – P.916-925.
68. Systematic review of guidelines for the management of asymptomatic and symptomatic carotid stenosis / A.L. Abbott [et al.] // Stroke. – 2015. – V.46. – P.3288-3301.
69. Systematic review of randomized controlled trials of different types of patch materials during carotid endarterectomy / S. Ren [et al.] // PLoS ONE. – 2013. – V.8, №1. – P.e55050.
70. The choice of mitral annuloplastic ring-beyond «surgeon's preference» / S. Wan [et al.] // Annals of Cardiothoracic Surgery. – 2015. – V.4, № 3. – P. 261-265.
71. The effect of an RGD-containing fusion protein CBD-RGD in promoting cellular adhesion / S.H. Hsu [et al.] // Journal of Biotechnology. – 2004. – V.111, №2. – P.143-150.
72. The effect of different mitral annuloplasty rings on valve geometry and annular stress distribution† / S.N. Skov [et al.] // Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery. – 2017. – V.24, № 5. – P.683-690.
73. The functions and applications of RGD in tumor therapy and tissue engineering / F. Wang [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2013. – V.14, №7. – P.13447-1362.
74. The interaction of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 with fibrin occurs through multiple binding sites in the  $\alpha$ IIb  $\beta$ -propeller domain / N.P. Podolnikova [et al.] // J Biol Chem. – 2014. – V.289, №4. – P.2371-2383.

75. The Society of Thoracic Surgeons 2017 clinical practice guidelines for the surgical treatment of atrial fibrillation / V. Badhwar [et al.] //Ann. Thorac. Surg. – 2017. – 103 (1): 329–41. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2016.10.076].

76. Thomas L.V. Tissue engineered vascular grafts-preclinical aspects / L.V. Thomas, V. Lekshmi, P.D. Nair // Int. J. Cardiol. – 2013. – V.167, №4. – P.1091-1100.

77. Vascular Tissue Engineering: Progress, Challenges, and Clinical Promise / H.G. Song [et al.] // Cell Stem Cell. – 2018. – V.22, №3. – P.340-354.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

### СПИСОК НАУЧНЫХ ТРУДОВ ПО ТЕМЕ НИР

1. Анализ факторов риска формирования дефицита здоровья и его индикаторных показателей у детей с врожденными пороками сердца через два года после радикальной операции. / Л.Н. Игишева [и др.] // Анализ риска здоровью. – 2022 – № 2 – С.78-109.
2. Влияние напряжения сдвига на свойства колониеформирующих эндотелиальных клеток в сравнении с эндотелиальными клетками коронарных артерий / Е.А. Великанова [и др.] // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2022. – Т.11, №4. – С.90-97.
3. Генетические предикторы спорадических врожденных пороков сердца у детей / А. В. Шабалдин [и др.] // Молекулярная медицина. – 2022. – Т.20, №1. – С.53-58.
4. Динамика приверженности лечению и качества жизни больных с протезами клапанов сердца при участии в образовательных программах (10 лет наблюдения) / Е.В. Горбунова [и др.] // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2022. – Т.11, №1. – С.69-77.
5. Матвеева В.Г. Влияние способа полимеризации на свойства фибриновых матриц (пилотное исследование *in vitro*) / В.Г. Матвеева [и др.] // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2022. – Т.11, №(4S). – С.134-145.
6. Евтушенко А.В. Propensity score matching анализ непосредственных результатов применения биологического полукаркасного протеза «Тиара» и каркасного биологического протеза «Юнилайн» при коррекции порока аортального клапана/ А.В. Евтушенко и [ др.] // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2022. – Т.11, №4S. – С. 75-87.
7. Изменение экспрессии генов в створках нативных клапанов сердца, пораженных инфекционным эндокардитом / А.В. Синицкая [и др.] //

Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины. – 2022. – Т.37, №2. – С.98-104.

8. Исследование антиоксидантного эффекта митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 на модели изолированного сердца крысы / Сенокосова Е.А. [ и др. ] //Общая реаниматология. – 2022. – 18 (4): 36-44.

9. Количественная оценка исходной концентрации кальций-фосфатных бионов как скринингового маркера минерального гомеостаза крови у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и у пациентов с хронической болезнью почек /Д.К. Шишкова [и др.] // Российский кардиологический журнал. 2022.- Т. 27. № 12. – 5064.

10. Костюнин А.Е. Структурная дегенерация биологических протезов клапанов сердца: имеются ли общие механизмы с атеросклерозом и кальцинирующим аортальным стенозом? А.Е. Костюнин // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2022. – Т.14, №1. – С. 96-106.

11. Машинное обучение в задаче детекции элементов корня аорты / К.Ю. Клышников [и др.] // Прикладная информатика. – 2022. – Т.17, №3. – С.73-83.

12. Метод неинвазивной оценки структуры биопротеза клапана сердца / К.Ю. Клышников [и др.] // Сибирский научный медицинский журнал. – 2022. – Т.42, №4. – С.85–93.

13. Модифицируемые и немодифицируемые факторы риска репротезирования митрального клапана / А.Н. Стасев [и др.] // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2022. – Т.11, №4. – С.35-46.

14. Неинвазивный метод анализа функционирования in vivo бескаркасного протеза клапана сердца «ТиАра» / П.С. Онищенко [и др.] // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2022. – Т.11, №3. – С.143-151.

15. Нейросетевой анализ стенозов коронарных артерий: оценка точности и скорости перспективных архитектур / К.Ю. Клышников [и др.] // Прикладная информатика. – 2022. – Т.17, №6. – С.68-80.

16. Оценка возможности использования колониформующих эндотелиальных клеток для разработки тканеинженерных сосудистых графтов на основании анализа профиля генной экспрессии / Е.А. Великанова [и др.] // Современные технологии в медицине. – 2022. – Т.14, № 3. – С.15-21.
17. Оценка гемодинамической значимости парапротезной фистулы после транскатетерной имплантации аортального клапана /Е.А. Овчаренко [и др.] // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2022. – Т.11, №4S. – С.153-162.
18. Оценка экспрессии провоспалительных цитокинов в гладкомышечных клетках коронарной артерии, экспонированных мутагеном алкилирующего механизма действия / М.Ю. Сеницкий [и др.] //Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2022. – Т.11, №4. – С.158-166.
19. Полиморфизм генов воспалительного ответа в патогенезе ревматической болезни сердца / А.В. Сеницкая [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2022. – Т.27, №10. – С.5197.
20. Роль полиморфизма генов фолатного цикла у матерей: вклад в предрасположенность к развитию врожденных пороков сердца / А.В. Шабалдин [и др.] // Проблемы репродукции. – 2022. – Т.28, №5. – С.23-28.
21. Сравнение бактериальной флоры, выделенной из периферической крови и клапанных структур сердца пациентов с инфекционным эндокардитом / М.А. Асанов [и др.] // Acta biomedica scientifica. – 2022. – Т.7, №2. – С.91-98.
22. Сравнительный анализ среднесрочных результатов коррекции митральной недостаточности с применением опорных колец NeoRing и RIGID: проспективное рандомизированное исследование. / И.В. Двдцатов [и др.] // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2022. – Т.11, №4. – С.62-71.
23. Тканеинженерные сосудистые заплаты – сравнительная характеристика и результаты преклинических испытаний на модели овцы /

Л.В. Антонова [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2022. – Т.24, №4. – С.94-108.

24. Ультраструктура неоинтимы нативных и искусственных элементов системы кровообращения / Р.А. Мухамадияров [и др.] // Архив патологии. – 2022. – Т.84, №3. – С.14-23.

25. Ханова М.Ю. /Основные аспекты создания in vitro клеточнозаселенных сосудистых протезов / Ханова М.Ю., Антонова Л.В. // Фундаментальная и клиническая медицина. 2022;7(4): 100-109.

26. Шабалдин А.В. Роль генов цитокинов и Toll-подобных рецепторов в патогенезе врожденных пороков сердца / А.В. Шабалдин, А.В. Сеницкая, С.А. Шмулевич // Медицинская иммунология. – 2022. – Т.24, № 3. – С.659-670.

27. Advantages of Fibrin Polymerization Method without the Use of Exogenous Thrombin for Vascular Tissue Engineering Applications / V.G. Matveeva [et al.] // Biomedicines. – 2022. –V.10, №4. – P.789.

28. Immune Response and Lipid Metabolism Gene Polymorphisms Are Associated with the Risk of Obesity in Middle-Aged and Elderly Patients / A.V. Ponasenko [et al.] // Journal of Personalized Medicine. – 2022. – V.12, №2. – P.238.

29. Early Postoperative Immunothrombosis of Bioprosthetic Mitral Valve and Left Atrium: A Case Report / A.E. Kostyunin [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2022. – V.23. – P.6736.

30. Mitochondrial DNA as a Candidate Marker of Multiple Organ Failure after Cardiac Surgery / Grigoriev E, [et al.]// International Journal of Molecular Sciences. 2022; 23(23):14748.

31. Numerical Studies of Polymer Materials with Potential for Use in Coronary Stent-Grafts / K.Yu. Klyshnikov [et al.] // Biomedical Engineering. – 2022. – V.56. – 11–17.

## СПИСОК ЗАРЕГИСТРИРОВАННЫХ ОБЪЕКТОВ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

1. Патент № 2764051 Рос. Федерация.: МПК А61F 2/06, А61L 27/14, А61L 27/34, С12N 5/00 Способ изготовления *in vitro* персонифицированного клеточнозаселенного сосудистого протеза / Матвеева В.Г., Антонова Л.В., Ханова М.Ю., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С., Великанова Е. А., Севостьянова В.В.; заявитель и правообладатель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Науч.-исслед. ин-т комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (RU). - № 2021112402; заявл. 28.04.2021; зарегистр. опубл. 13.01.2022, Бюл. № 2. – 1с.
2. Свидетельство о государственной регистрации Базы данных № 2022621335 Рос. Федерация. Регистр пациентов после хирургической коррекции приобретенных пороков клапанов сердца с персонализированным выбором программы послеоперационной реабилитации / Ляпина И.Н., Теплова Ю.Е., Шалева В.А., Помешкина С.А.; заявитель и правообладатель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Науч.-исслед. ин-т комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (RU). - № 2022621217; заявл. 30.05.2022; зарегистр. опубл. 06.06.2022, Бюл. № 6. – 1с.
3. Свидетельство о государственной регистрации Базы данных № 2022623130 Рос. Федерация. База данных детей, оперированных по поводу коррекции врождённых септальных пороков сердца / Ивкин А.А., Григорьев Е.В., Борисенко Д.В., Балахнин Д.В., Чермных И.И.; заявитель и правообладатель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Науч.-исслед. ин-т комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (RU). - № 2022623096; заявл. 17.11.2022; зарегистр. опубл. 28.11.2022, Бюл. № 12. – 1с.
4. Заявка на патент на изобретение РФ №2022108392 от 29.03.2022 «Способ хирургического лечения фибрилляции предсердий у пациентов с клапанными болезнями сердца с одномоментной их коррекцией», Лебедев Д.И., Стасев А.Н., Евтушенко А.В.