

УДК 616.12-089.819.843:612.171.3-77

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2018-4-94-102>

Для цитирования: Мухамадияров Р.А., Рутковская Н.В., Кокорин С.Г., Одаренко Ю.Н., Мильто И.В., Барбараш Л.С. Типирование клеток биопротезов клапанов сердца, эксплантированных вследствие развития кальций-ассоциированных дисфункций. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (4): 94–102.

## Типирование клеток биопротезов клапанов сердца, эксплантированных вследствие развития кальций-ассоциированных дисфункций

Мухамадияров Р.А.<sup>1</sup>, Рутковская Н.В.<sup>1</sup>, Кокорин С.Г.<sup>1</sup>,  
Одаренко Ю.Н.<sup>1</sup>, Мильто И.В.<sup>2,3</sup>, Барбараш Л.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (НИИ КПССЗ) Россия, 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6

<sup>2</sup> Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ) Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

<sup>3</sup> Национальный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ) Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

### РЕЗЮМЕ

Целью работы явилось иммуногистохимическое (ИГХ) типирование клеток в составе кальцинированных биопротезов (БП) клапанов сердца, удаленных при реоперациях.

**Материалы и методы.** Исследованы 19 БП моделей «КемКор» и «ПериКор» (ЗАО «Неокор», г. Кемерово), извлеченных из митральной позиции по причине развития первичной тканевой несостоятельности с кальцификацией. Для иммуногистохимического типирования клеток в составе анализируемых образцов применяли следующие маркеры: CD3 (Т-лимфоциты), CD20 (В-лимфоциты), CD34 и VEGFR2 (эндотелиоциты), CD68 (моноциты/макрофаги), виментин (фибробласты),  $\alpha$ -гладкомышечный актин (гладкие миоциты).

**Результаты.** Наблюдали неравномерное распределение и большое разнообразие межклеточных взаимодействий, а также контактов с компонентами матрикса с минеральными депозитами. Для эндотелиоцитов (CD34- и VEGFR2-положительных клеток) были характерны два типа локализации. В первом варианте они образовывали монослой на поверхности створок БП, во втором – входили в состав капиллярноподобных структур в поверхностном слое ксеноматериала. CD68-позитивные клетки встречались как в поверхностных, так и в глубоких слоях образцов. Вблизи клеток отмечали фрагментацию и расслоение коллагеновых волокон с формированием тонкофибриллярных ячеистых сетей. Виментин-позитивные клетки (фибробласты) располагались группами или поодиночке в участках деструкции соединительнотканной основы и, вероятно, принимали участие в формировании нового матрикса. Плотность  $\alpha$ -гладкомышечных актин-позитивных клеток, имеющих характерную для гладких миоцитов форму, преобладала в поверхностных участках створок БП и снижалась в более глубоких отделах. CD3- и CD20-позитивные клетки, относящиеся к Т- и В-лимфоцитам соответственно, в большинстве анализируемых образцов были представлены единичными клетками.

**Выводы.** Поддержание структурной и функциональной целостности БП определяется комплексом факторов реципиента, к числу которых, помимо механических повреждений в процессе функционирования, могут быть отнесены иммунные и клеточные механизмы.

**Ключевые слова:** тканевая несостоятельность, кальцификация, эксплантация, иммуногистохимическое исследование.

✉ Мухамадияров Ринат Авхадиевич, e-mail: rem57@rambler.ru.

## ВВЕДЕНИЕ

Основными факторами, ограничивающими широкое клиническое применение биопротезов (БП) клапанов сердца, являются развитие дегенеративных изменений соединительнотканного матрикса ксеностворок в организме реципиентов и, соответственно, ухудшение функциональных характеристик имплантируемых устройств [1]. К наиболее распространенному варианту структурных дисфункций БП относят кальцификацию ксеногенных тканей, закономерным итогом которой становятся тяжелые нарушения внутрисердечной и системной гемодинамики, а также необходимость выполнения повторных хирургических вмешательств, сопровождающихся относительно высоким риском неблагоприятных исходов. Несмотря на постоянное совершенствование моделей БП и поиск способов повышения их минералорезистентности, данная проблема далека от своего разрешения. Наиболее перспективными направлениями в представленной области являются изучение возможных механизмов минерализации ксеногенных материалов и поиск потенциальных способов управления этим процессом [2, 3]. В настоящее время возможность регуляции патологической кальцификации на клеточном, биохимическом и генетическом уровнях не подвергается сомнению, однако факторы инициации и прогрессирования структурных изменений биологических объектов до сих пор детально не исследованы [4].

Ранее в серии наших работ были определены параллели между развитием дегенеративных поражений сердечно-сосудистой системы и кальций-опосредованной первичной тканевой несостоятельностью БП, продемонстрировано активное участие клеток реципиента в процессе минерализации ксеногенных тканей, а также представлены постимплантационные модификации створок БП, предшествующие формированию клинически выраженных дисфункций [5, 6]. Существенным ограничением данных исследований была идентификация клеточных элементов с использованием исключительно рутинных методик окрашивания.

Целью настоящей работы явилось иммуногистохимическое (ИГХ) типирование клеток в составе кальцинированных ксеноперикардиальных протезов клапанов сердца после продолжительного периода их функционирования в организме реципиентов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы 19 ксеноаортальных эпокси-обработанных БП моделей «КемКор» и «Пе-

риКор» (ЗАО «Неокор», г. Кемерово), извлеченных из митральной позиции при повторных хирургических вмешательствах в связи с развитием кальциевой дегенерации ксеноматериала. Когорту реоперированных больных составили 10 женщин и 9 мужчин. Участники исследования подписывали информированное согласие.

Средний возраст пациентов на момент выполнения повторных операций соответствовал ( $69 \pm 8$ ) лет при средних сроках функционирования БП ( $8 \pm 4$ ) года. Этиологический фактор формирования пороков нативных митральных клапанов в исследуемой группе был представлен ревматической болезнью сердца. Причинами развития структурных дисфункций ксеноперикардиальных БП во всех случаях явилась первичная тканевая несостоятельность с кальцификацией. На момент определения показаний к репротезированию у пациентов отсутствовали клинические и лабораторные признаки активности воспалительного процесса, данных за наличие инфицирования ксеногенного материала клапанов БП, согласно результатам эхокардиографических исследований, также не получено.

Для гистологического и иммуногистохимического ИГХ исследований эксплантированные БП целиком помещали в 4%-й раствор параформальдегида (48 ч). После фиксации из створок вырезали фрагменты, которые подвергали декальцинации в 9%-м водном растворе ЭДТА (рН 7,8) с последующей гистологической проводкой и заливкой в парафиновую смесь Histomix (БиоВитрум, Россия). Из парафиновых блоков на полуавтоматическом микротоме (МЗП 01-Техном, Россия) готовили срезы (5 мкм), которые монтировали на обычные предметные стекла, а также на предметные стекла с полилизинным покрытием (Thermo Scientific, США). Полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином и по Ван Гизону. Исследование препаратов и фотосъемку проводили на микроскопе AXIO Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) с помощью цифровой камеры Canon G5 (Canon, Япония).

Для ИГХ типирования клеток применяли следующие маркеры: CD3 (Т-лимфоциты), CD20 (В-лимфоциты), CD34 и VEGFR2 (эндотелиоциты), CD68 (моноциты/макрофаги), виментин (фибробласты),  $\alpha$ -гладкомышечный актин (гладкие миоциты). В работе использовали моноклональные мышинные (CD3, CD20, CD34, CD68, виментин) и кроличьи (CD1,  $\alpha$ -гладкомышечный актин), а также поликлональные кроличьи (VEGFR2)

антитела Novocastra Laboratories, Thermo Scientific и Spring Bioscience, реагирующие с антигенами человека.

Для выявления описанных выше маркеров проводили высокотемпературную демаскировку антигенов в цитратном буфере (0,01 моль; рН 6,0) –  $\alpha$ -гладкомышечный актин, CD68, CD34, VEGFR2, CD3; в трис-ЭДТА буфере (рН 9,0) – виментин; без демаскировки – CD20. Блокирование эндогенной пероксидазы, разведение первичных антител и время их экспозиции определяли согласно протоколам производителей первичных антител. Для обнаружения результатов ИГХ реакции использовали полимерную визуализирующую систему Novolink (Polymer detection system) (Novocastra, Великобритания). Иммуноферментную реакцию останавливали, промывая срезы в фосфатном буфере (рН 7,4), после чего докрашивали гематоксилином Майера и заключали в канадский бальзам. Параллельно с выявлением антигенов при каждом окрашивании проводили постановку положительного и отрицательного контролей.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При исследовании БП, эксплантированных в связи с развитием минерализации ксеногенного материала, в структуре створок были обнаружены многочисленные и разнообразие клетки. Морфологическая сохранность идентифицируемых клеточных элементов, с одной стороны, позволяла сделать заключение об их функциональной активности, с другой – свидетельствовала о принадлежности реципиенту.

Клетки определялись на предсердной и желудочковой поверхностях, а также внутри образцов створок, однако наибольшую их плотность отмечали во внешних участках БП и в прилежащих слоях. При этом обращала на себя внимание мозаичность изменений створок ксеноклапанов, в которых участки с минеральными депозитами различных размеров и форм сочетались с зонами выраженной деструкции и фрагментами с относительно сохранной структурой тканей (рис. 1). В ряде случаев кальциевые депозиты, визуализируемые в составе биоматериала, были окружены клетками.

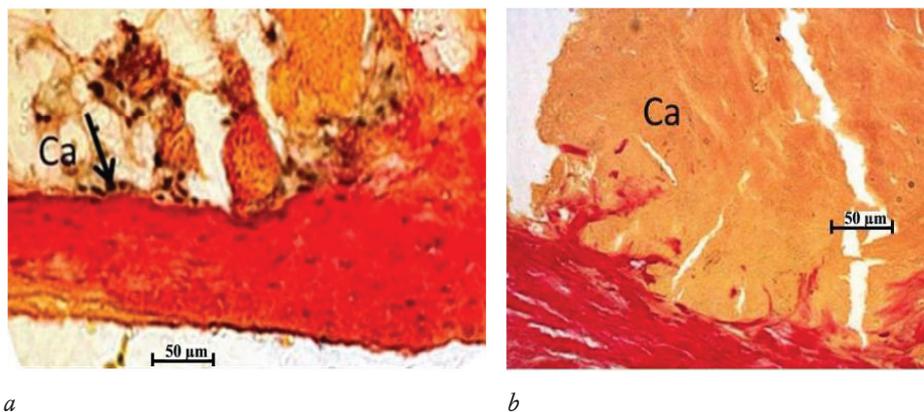


Рис. 1. Кальциевые депозиты (Ca) с клеточным окружением (a) и без него (b). Стрелкой показаны клетки.  $\times 100$   
 Fig. 1. Calcium deposits (Ca) with a cellular environment (a) and without it (b). An arrow shows cells.  $\times 100$

Отдельные участки поверхности створок БП были представлены монослоем плоских удлинённых клеток (рис. 2, a). При иммуногистохимическом типировании они идентифицированы как CD34- и VEGFR2-позитивные, что подтвердило их принадлежность к эндотелиоцитам. Следует отметить, что соединительнотканый матрикс створок в проекции зон, покрытых эндотелием, имел интактную структуру, характеризующуюся плотной упаковкой коллагеновых волокон с сохранностью их тинкториальных свойств, и содержал лишь единичные клетки.

Отсутствие монослоя эндотелиоцитов на поверхностях створок, как правило, ассоциирова-

лось с большей выраженностью деструктивных изменений матрикса БП, разрыхлением волокон коллагена, образованием многочисленных полостей, а также наличием локальных клеточных скоплений (рис. 2, b). В отдельных сегментах исследуемых образцов эндотелиоциты выстилали имеющиеся щелевидные пространства, образуя структуры, схожие с капиллярами.

Вблизи участков с выраженной фрагментацией коллагеновых волокон наблюдали присутствие CD68-позитивных клеток (рис. 3). Следует отметить, что для этих клеток в равной степени была характерна локализация как в поверхностных, так и в глубоких слоях створок БП (рис. 3, b).

При этом CD68-положительные клетки группировались преимущественно в зонах деструкции ксенотенного материала (рис. 4). В местах локализации мононуклеарных инфильтратов наблюдалось наиболее выраженное нарушение архитектоники

волокон коллагена с расширением пространств между ними. На некоторых препаратах отмечены фрагментация и расслоение коллагеновых волокон с формированием тонкофибриллярных ячеистых сетей.

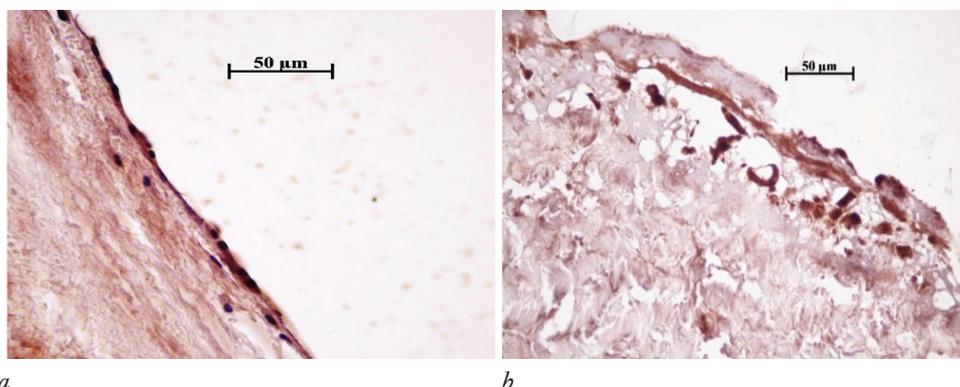


Рис. 2. Эндотелиоциты на поверхности створки биопротеза (*a*,  $\times 200$ ) и толще створки (*b*,  $\times 100$ ). Иммуногистохимическая реакция на VEGF,  $\times 200$

Fig. 2. Endotheliocytes on the surface of the bioprosthetic valve (*a*,  $\times 200$ ) and inside the valve (*b*,  $\times 100$ ). Immunohistochemical reaction to VEGF  $\times 200$

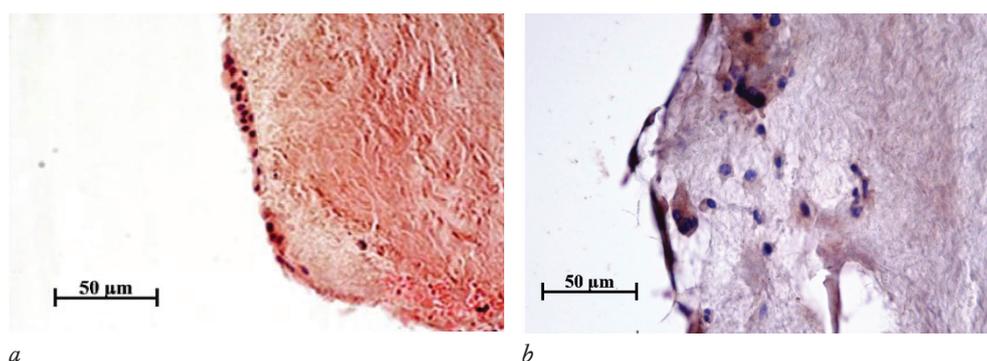


Рис. 3. Макрофаги на поверхности створок биопротезов: *a* – окраска по Ван Гизону,  $\times 100$ ; *b* – иммуногистохимическая реакция на CD68,  $\times 200$

Fig. 3. Macrophages on the surface of bioprosthetic valves: *a* – Van Gieson's stain,  $\times 100$ ; *b* – immunohistochemical reaction to CD68,  $\times 200$

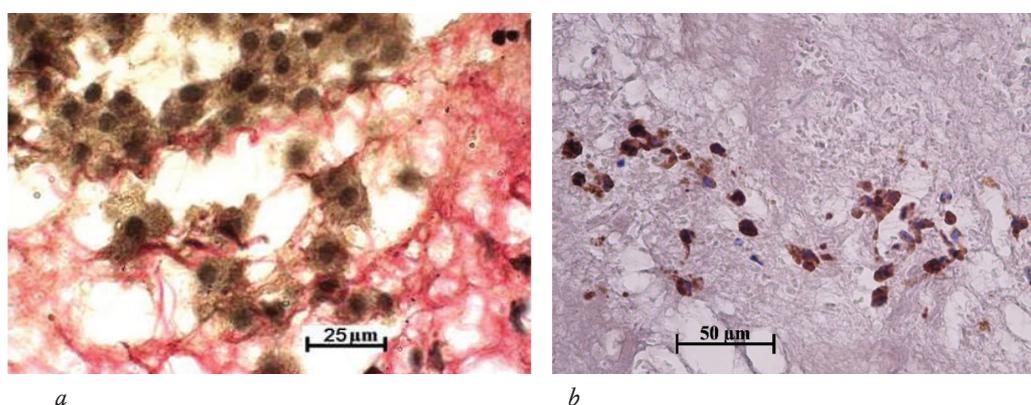
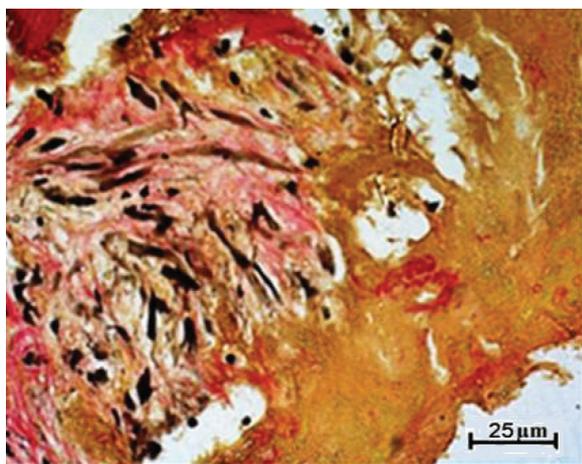


Рис. 4. Макрофаги в створке биопротеза: *a* – окраска по Ван Гизону,  $\times 400$ ; *b* – иммуногистохимическая реакция на CD68,  $\times 200$

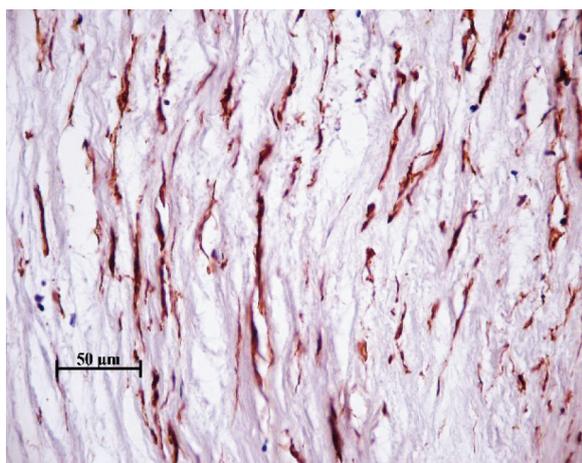
Fig. 4. Macrophages in the bioprosthetic valve: *a* – Van Gieson's stain,  $\times 400$ ; *b* – immunohistochemical reaction to CD68,  $\times 200$

В стенках полостей, наблюдаемых в створках БП, идентифицировали также виментин-положительные клетки, что позволило отнести их к фибробластам. Эти клетки располагались как группами, так и поодиночке. Как правило, они располагались между коллагеновыми волокнами в участках деструкции соединительнотканной основы и, вероятно, принимали участие в формировании нового матрикса, заполняющего существующие дефекты створок и имеющего иную интенсивность прокрашивания.

Веретенновидные клетки с продолговатым ядром, локализованные поодиночке в толще створок БП (рис. 5, *a*), демонстрировали положительную ИГХ реакцию на  $\alpha$ -гладкомышечный актин (рис. 5, *b*). Плотность расположения этих клеток была значительно выше в поверхностных слоях образцов ксеногенных клапанов и уменьшалась в более глубоких участках.



*a*



*b*

Рис. 5. Гладкие миоциты в створке биопротезов: *a* – окраска по Ван Гизону,  $\times 400$ ; *b* – иммуногистохимическая реакция на актин,  $\times 200$

Fig. 5. Smooth myocytes in the bioprosthetic valve: *a* – Van Gieson's stain,  $\times 400$ ; *b* – immunohistochemical reaction to actin,  $\times 200$

CD3- и CD20-положительные клетки, относящиеся к Т- и В-лимфоцитам, соответственно, в большинстве исследуемых срезов были представлены единичными элементами, что позволяет сделать вывод о незначительной выраженности иммунных реакций на имплантированный ксеногенный материал в отдаленном периоде функционирования БП.

Обращает на себя внимание одновременное присутствие в анализируемых образцах створок БП нескольких типов клеток. Кроме того, следует отметить неравномерное их распределение в ксеногенных тканях и отсутствие характерной локализации. В ряде срезов клеточные скопления располагались в непосредственной близости с компонентами матрикса и минеральными депозитами в составе БП. Однако наряду с подобной локализацией, в структуре створок эксплантированных клапанов наблюдали наличие участков, свободных от клеточных инфильтратов и с высокой сохранностью волокон коллагена.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время известно, что отложение минеральных депозитов в створках БП клапанов сердца, происходящее в процессе их функционирования в организме реципиента, может быть следствием как пассивного образования аморфных участков кальцификации, так и проникновения в исходно девитализированный материал субпопуляций клеток с остеобластным фенотипом [7–9]. Согласно современным представлениям, последние происходят из пула циркулирующих в крови полипотентных клеток-предшественниц, миграция и дифференцировка которых осуществляются при участии комплекса экзо- и эндогенных факторов.

Результаты представленного исследования позволяют сделать вывод, что выраженность процессов деструкции ксеноматериала, наряду с глубиной и степенью клеточной инфильтрации, определяет наличие или отсутствие эндотелизации поверхностей створок, контактирующих с кровью непосредственно после имплантации БП в организм реципиента. Данное наблюдение согласуется с мнением ряда авторов о возможности проникновения мононуклеарных лейкоцитов и клеток-предшественниц, способных подвергаться проостеогенной и профибробластической трансформации, внутрь ксеноклапанов через дефекты поверхностей створок. В данном случае девитализированные ткани БП выполняют роль матрицы для фиксации клеток реципиента, цир-

кулирующих в кровотоке [9]. В настоящей работе ассоциации между степенью дегенеративных изменений имплантированных клапанов, с одной стороны, а также количеством и разнообразием идентифицируемых клеток – с другой, могут быть рассмотрены как свидетельство пусковой роли нарушения целостности образующегося на поверхностях образцов эндотелиального слоя в последующей репопуляции тканей БП и развитии структурных дисфункций.

Источником формирования эндотелиальной выстилки у основания створок ксеноклапанов, вероятно, является эндотелий эндокарда, в то время как эндотелизация их свободного края, по всей видимости, обусловлена миграцией и дифференцировкой циркулирующих в крови полипотентных клеток-предшественниц.

Кроме эндотелиоцитов, среди клеток, заселяющих ткани створок БП, обнаружены макрофаги. Деструкция, фрагментация и гомогенизация компонентов ксеноклапанов, а также формирование полостей свидетельствуют о высокой коллагенолитической активности этих клеток [10]. Известно, что продукты распада коллагена, являясь хемоаттрактантами для моноцитов, усиливают их миграцию из сосудистого русла, поддерживают локальный воспалительный процесс и повышают аффинитет к ионам кальция, содержащимся в крови, что может играть триггерную роль в образовании зародышевых фаз минеральных кристаллов [11].

В качестве альтернативной роли макрофагов в реализации механизмов кальцификации биологических клапанов сердца можно рассматривать активацию иммунного воспаления [8, 11, 12]. Однако поскольку среди клеток, инфильтрирующих ксеногенные ткани БП, лимфоциты и плазмоциты составили весьма небольшую часть, роль иммунного воспаления в развитии финальных стадий кальцификации имплантированных ксеноклапанов вряд ли можно считать значимой.

Наиболее представительной явилась группа клеток фибробластического дифферона, в том числе способных продуцировать экстрацеллюлярный матрикс, что, на наш взгляд, отражает течение процессов ремоделирования, проявляющихся новообразованием соединительной ткани. Наличие неоваскуляризации ксеногенного материала, в свою очередь, способствует поддержанию репопуляции БП и обеспечению нормальной жизнедеятельности клеток [13].

На основании полученных данных можно сделать вывод, что эндотелизация поверхностей БП в процессе их функционирования выполняет защит-

ную функцию, изолируя внутренние слои створок имплантированных клапанов от агрессивного воздействия факторов реципиента и препятствуя как клеточной инфильтрации, так и механической деструкции створок под влиянием гемодинамических факторов [11, 12, 14, 15]. При утрате барьерной роли эндотелиального слоя происходит клеточно-опосредованная деградация БП. Кроме того, результаты настоящего исследования позволяют предполагать, что клеткам, заселяющим девитализированные ткани ксеноклапанов, вероятно, присуща способность реагировать на внешние стимулы активацией процессов дифференцировки и синтетических функций. Установлено, что в исследуемом материале БП параллельно протекают два активных разнонаправленных процесса: разрушение ксеногенных тканей при участии макрофагов и ее структурная регенерация, ассоциированная с активностью фибробластов реципиента [5, 6]. При этом клеточные реакции и их последствия могут значительно отличаться от таковых в нативных элементах сердечно-сосудистой системы, что обусловлено дополнительным влиянием ряда факторов, к числу которых относятся состояние внутрисердечной гемодинамики, химическая обработка имплантируемых БП, выраженность проявлений системного воспалительного ответа и прочие.

Таким образом, развитие кальциевой дегенерации ксеногенных клапанов сердца представляет собой многостадийный процесс [7, 8, 15]. К числу факторов, его инициирующих, могут быть отнесены механические и иммунные повреждения поверхностей имплантированных клапанов на ранних сроках после имплантации. В последующем через образующиеся дефекты вглубь створок проникают полипотентные клетки реципиента и компоненты крови. Каждый тип клеток выполняет свою генетически детерминированную функцию, однако полноценная регуляция и синхронизация их деятельности в условиях существования в ксеногенных тканях, по всей видимости, отсутствуют. В результате долговременное поддержание структурной и функциональной целостности имплантированного биоматериала вряд ли возможно. Дальнейший сценарий развития событий и продолжительность функционирования БП клапанов сердца, вероятно, будут определены комплексом факторов имплантата и реципиента, включающих совершенствование технологий производства ксеноклапанов, методик химической модификации биоматериала, а также особенности иммунного статуса реципиента и состояние систем гуморальной регуляции гомеостаза.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дальнейшие исследования процесса патологической кальцификации мягких тканей позволят определить точки приложения потенциальных фармакологических агентов для его подавления и продлить сроки функционирования БП клапанов сердца. В свою очередь, модель межклеточных взаимодействий в исходно девитализированном ксеногенном материале, имплантированном в организм реципиента, может быть рассмотрена с общих позиций минерализации биологических объектов. Экстраполяция полученных данных на процессы, происходящие в нативных элементах сердечно-сосудистой системы, позволит сделать выводы о механизмах регуляции патологической кальцификации и факторах ее модулирующих.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Мухамадияров Р.А. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных. Рутковская Н.В. – анализ и интерпретация данных, обоснование рукописи. Кокорин С.Г. – проверка критически важного интеллектуального содержания. Одаренко Ю.Н. – проверка критически важного интеллектуального содержания. Мильто И.В. – анализ и интерпретация данных, обоснование рукописи. Барбараш Л.С. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

## СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ (протокол № 5 от 03.08.2018).

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kaneko T., Aranki S., Javed Q., McGurk S., Shekar P., Davidson M, Cohn L. Mechanical versus bioprosthetic mitral valve replacement in patients <65 years old. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2014; 147 (1): 117–126. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2013.08.028.
2. Барбараш Л.С., Журавлева И.Ю. Эволюция биопротезов клапанов сердца: достижения и проблемы двух десятилетий. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2012; 1: 4–11. [Barbarash L.S., Zhuravleva I.Yu. Bioprosthetic heart valve evolution: two decades of advances and challenges. *Kompleksnyye problemy*

3. Овчаренко Е.А., Клышников К.Ю., Саврасов Г.В., Глушкова Т.В., Барбараш Л.С. Исследование гидродинамической функции малоинвазивного биопротеза клапана аорты. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2016; 5 (2): 39–45. [Ovcharenko E.A., Klyshnikov K.Yu., Savrasov G.V., Glushkova T.V., Barbarash L.S. Investigation of the hydrodynamic performance of the minimally invasive aortic valve prosthesis. *Kompleksnyye problemy serdechno-sosudistykh zabolevaniy – Complex Problems of Cardiovascular Diseases.* 2016; 5 (2): 39–45 (in Russ.)]. <http://dx.doi.org/10.17802/2306-1278-2016-2-39-45>.
4. Barbarash O.L., Rutkovskaya N.V., Hryachkova O.N., Gruzdeva O., Uchasova E., Ponasenko A., Kondyukova N., Odarenko Y., Barbarash L. Impact of recipient-related factors on structural dysfunction rates of xenoaortic bioprosthetic heart valve. *Pat. Prof. Adher.* 2015; 9: 389–399. <https://doi.org/10.2147/PPA.S76001>.
5. Мухамадияров Р.А., Рутковская Н.В., Мильто И.В., Барбараш Л.С. Патогенетические параллели между развитием кальцификации нативных клапанов аорты и ксеногенных биопротезов клапанов сердца. *Гены и клетки.* 2016; 11 (3): 72–79. [Mukhamadiyarov R.A., Rutkovskaya N.V., Mil'to I.V., Kudryavtseva Yu.A., Barbarash L.S. Pathogenetic parallels between the development of calcification of native aortic valves and xenogenic bioprostheses of heart valves. *Geny i kletki – Genes and Cells.* 2016; 11(3): 83–91 (in Russ.)].
6. Мухамадияров Р.А., Рутковская Н.В., Сидорова О.Д., Барбараш Л.С. Исследование клеточного состава кальцинированных биопротезов клапанов сердца. *Вестник РАМН.* 2015; 70 (6): 662–668. [Mukhamadiyarov R.A., Rutkovskaya N.V., Sidorova O.D., Barbarash L.S. Cellular composition of calcified bioprosthetic heart valves. *Vestnik RAMN – Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2015; 70 (6): 662–668 (in Russ.)]. <http://dx.doi.org/10.15690/vramn560>.
7. Ruiz J.L., Hutcheson J.D., Aikawa E. Cardiovascular calcification: Current controversies and novel concepts. *Cardiovasc. Pathol.* 2015; 24 (4): 207–212. DOI: 10.1016/j.carpath.2015.03.002.
8. Evrard S., Delanaye P., Kamel S., Cristol J.P., Cavalier E., Urena-Torres P. et al. Vascular calcification: from pathophysiology to biomarkers. *Clinica Chimica Acta.* 2015; 438: 401–414. DOI: 10.1016/j.cca.2014.08.034.
9. Pal S.N., Golledge J. Osteo-progenitors in vascular calcification: a circulating cell theory. *J. Atheroscler. Thromb.* 2011; 18: 551–559. <http://doi.org/10.5551/jat.8656>.
10. Qin X., Corriere M.A., Matrisian L.M., Guzman R.J. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates aortic calcification. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26 (7): 1510–1516. DOI: 10.1161/01.ATV.0000225807.76419.a7.

11. Sophie E.P., Aikawa E. Molecular imaging insights into early inflammatory stages of arterial and aortic valve calcification. *Circ. Res.* 2011; 108: 1381–1391. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.234146.
12. Kim J.J., Hou L., Huang N.F. Vascularization of three-dimensional engineered tissues for regenerative medicine applications. *Acta Biomaterialia.* 2016; 41: 17–26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.06.001>.
13. Jansson K., Bengtsson L., Swedenborg J., Haegerstrand. In vitro endothelialization of bioprosthetic a.heart valves provides a cell monolayer with proliferative capacities and resistance to pulsatile flow. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.* 2001; 121 (1): 108–115. <http://dx.doi.org/10.1067/mtc.2001.110251>.
14. Nina V.J.S., Pomerantzeff P.M.A., Casagrande I.S.J., Chung D. In vivo endothelialization of cardiac bioprostheses: conventional versus non-aldehyde preservation. *Braz. J. Cardiovasc. Surg.* 2004; 19 (2): 144–151. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-76382004000200008>.
15. Hutcheson J.D., Goettsch C., Rogers M.A., Aikawa E. Revisiting cardiovascular calcification: A multifaceted disease requiring a multidisciplinary approach. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2015; 46: 68–77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.09.004>

Поступила в редакцию 21.09.2017

Подписана в печать 09.11.2018

Мухамадияров Ринат Авхадиевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория новых биоматериалов, отдел клинической и экспериментальной кардиологии, НИИ КПССЗ, г. Кемерово.

Рутковская Наталья Витальевна, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория кардиоваскулярного биопротезирования, отдел клинической и экспериментальной кардиологии, НИИ КПССЗ, г. Кемерово.

Кокорин Станислав Геннадьевич, канд. мед. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория кардиоваскулярного биопротезирования, отдел клинической и экспериментальной кардиологии, НИИ КПССЗ, г. Кемерово.

Одаренко Юрий Николаевич, канд. мед. наук, зав. лабораторией кардиоваскулярного биопротезирования, НИИ КПССЗ, г. Кемерово.

Мильто Иван Васильевич, д-р биол. наук, доцент, кафедра морфологии и общей патологии, СибГМУ; кафедра биотехнологии и органической химии, НИ ТПУ, г. Томск.

Барбараш Леонид Семенович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, гл. науч. сотрудник, НИИ КПССЗ, г. Кемерово.

(✉) Мухамадияров Ринат Авхадиевич, e-mail: rem57@rambler.ru.

УДК 616.12-089.819.843:612.171.3-77

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2018-4-94-102>

For citation: Mukhamadiyarov R.A., Rutkovskaya N.V., Kokorin S.G., Odarenko Yu.N., Mil'to I.V., Barbarash L.S. Cell typing of biological heart valves prosthesis explained due to the development of calcium-associated dysfunctions. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2018; 17 (2): 94–102.

## Cell typing of biological heart valves prosthesis explained due to the development of calcium-associated dysfunctions

Mukhamadiyarov R.A.<sup>1</sup>, Rutkovskaya N.V.<sup>1</sup>, Kokorin S.G.<sup>1</sup>,  
Odarenko Yu.N.<sup>1</sup>, Mil'to I.V.<sup>2,3</sup>, Barbarash L.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (RICICD)*  
6, Sosnoviy Blv., Kemerovo, 650002, Russian Federation

<sup>2</sup> *Siberian State Medical University (SSMU)*  
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

<sup>3</sup> *National Research Tomsk Polytechnic University (NR TPU)*  
30, Lenin Av., Tomsk, Tomsk, 634050, Russian Federation

### ABSTRACT

**Purpose.** To perform immunohistochemical typing of cells obtained from calcinated biological heart valve prosthesis removed during reoperations.

**Materials and methods.** We investigated 19 models (“KemCor” and “PeriCor”) of biological heart valve prosthesis produced by NeoCor Company (Kemerovo, Russia) and removed from the mitral position due to the development of primary tissue inconsistency with calcification. The following markers were used for immunohistochemical cells typing in the analyzed samples: CD3 (T-lymphocytes), CD20 (B-lymphocytes), CD34 and VEGFR2 (endotheliocytes), CD68 (monocytes/macrophages), vimentin (fibroblasts), and  $\alpha$ -smooth muscle actin (smooth myocytes).

**Results.** Uneven distribution and wide variety of intercellular interactions, as well as contacts with matrix components and mineral deposits, were observed. In case of endotheliocytes (CD34 and VEGFR2 positive cells) two types of localization were described. In the first variant, they formed a monolayer on the surface of biological prosthesis flaps; in the second variant, they were a part of capillary-like structures in the surface of the xenomaterial. CD68 positive cells were found both in a surface and in deep layers of the samples. Near such cells fragmentation and stratification of collagen fibers with the formation of fine-fibrous cellular networks were detected. Vimentin-positive cells (fibroblasts) were located in groups or singly in the sites of destruction of the connective tissue and took part in the formation of a new matrix. The density of  $\alpha$ -smooth muscle actin-positive cells, morphologically identical to myocytes, was high in the surface of biological prosthesis flaps and low in the deeper layers. CD3 and CD20 positive cells related to T- and B-lymphocytes, respectively, were represented by the single cells in most of analyzed samples.

**Conclusions.** Maintaining of the structural and functional integrity of biological heart valve prosthesis, in addition to the characteristics of the implantable devices, defines a complex of recipient factors, including not only mechanical damage during operation, but also various immune and cellular mechanisms.

**Key words:** biological heart valve prosthesis, calcification, cells typing.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

#### SOURCE OF FINANCING

The authors state that there is no funding for the study.

#### CONFORMITY WITH THE PRINCIPLES OF ETHICS

The study was approved by the local ethics committee under the RICICD (Protocol No. 5 of 03.11.2018).

Received 21.09.2017

Accepted 09.11.2018

**Mukhamadiyarov Rinat A.**, PhD, Senior Researcher, Laboratory of New Biomaterials, Department of Clinical and Experimental Cardiology, RICICD, Kemerovo, Russian Federation.

**Rutkovskaya Natalia V.**, DM, Leading Researcher, Laboratory of Cardiovascular Bioprosthetics, Department of Clinical and Experimental Cardiology, RICICD, Kemerovo, Russian Federation.

**Kokorin Stanislav G.**, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Cardiovascular Bioprosthetics, Department of Clinical and Experimental Cardiology, RICICD, Kemerovo, Russian Federation.

**Odarenko Yuri N.**, PhD, Head of the Laboratory of Cardiovascular Bioprosthetics, Department of Clinical and Experimental Cardiology, RICICD, Kemerovo, Russian Federation.

**Milto Ivan V.**, DBSc, Associate Professor, Department of Morphology and General Pathology, SSMU; Department of Biotechnology and Organic Chemistry, NR TPU, Tomsk, Russian Federation.

**Barbarash Leonid S.**, DM, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Chief Researcher, RICICD, Kemerovo, Russian Federation.

(✉) **Mukhamadiyarov Rinat A.**, e-mail: rem57@rambler.ru.