

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ОБРАБОТКИ АЛЛО- И КСЕНОГЕННЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ В СУБ- И СВЕРХКРИТИЧЕСКОМ ДИОКСИДЕ УГЛЕРОДА НА СПОСОБНОСТЬ К ПОДАВЛЕНИЮ КАЛЬЦИНОЗА

Е.И. Перепёлкин¹, А.В. Зубко², Д.В. Бритиков², И.С. Чашин^{1,2}, Н.П. Бакулева²,
К.М. Джиджихия²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук (ИНЭОС РАН), ул. Вавилова, 28, Москва, Российская Федерация, 119991; ² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Рублевское ш., 135, Москва, Российская Федерация, 121552

Основные положения

- Гибридная децеллюляризация аллографтов в сверхкритическом CO₂ с малой добавкой детергента Tween 80 эффективна в снижении кальциноза.
- Особое покрытие на основе наночастиц хитозана, полученных и нанесенных из растворов воды, насыщенной субкритическим CO₂, позволяет снизить кальциноз стандартного ГА-стабилизированного перикарда.

Цель

Сравнительный анализ антикальцификационных свойств имплантатов на основе алло- и ксеноткани после обработки в сверх- и субкритическом диоксиде углерода (CO₂).

Материалы и методы

Выполнена модификация сосудов крыс методом гибридной децеллюляризации в сверхкритическом CO₂ с детергентами и перикарда телят методом прямого нанесения покрытия из хитозановых наночастиц с серебром из растворов воды, насыщенной диоксидом углерода под давлением (угольная кислота). Проведено исследование кальциноза на крысах (n = 10 для каждого типа образца) *in vivo*. Для моделирования поведения биоматериала в организме человека применен подход имплантации крысам их аллогенных модифицированных аорт. Для определения кальция в извлекаемых образцах использован спектрофотометрический метод оценки концентрации кальция. Для оценки цитотоксичности образцов перикарда с нанопокрытием – метод измерения импеданса клеток, заселенных на образцы биоматериалов.

Результаты

Установлено, что обработка крысиных сосудов в сверхкритическом CO₂ снижает отложения солей кальция на 30% по сравнению с исходным аллографтом. Для перикарда с покрытием из наночастиц хитозана характерно еще большее снижение кальциноза – биоматрица с покрытием на основе наночастиц хитозана с серебром содержит 0,015 ± 0,005 мас.% солей кальция, что значительно ниже, чем у ГА-стабилизированного перикарда (0,070 ± 0,015 мас.%) после эксперимента. Установлено, что биокомпозиты с нанопокрытием характеризуются приблизительно одинаковым клеточным индексом по сравнению с образцом ксеноткани без покрытия. Все образцы проявляли цитостатический эффект, в том числе с нанопокрытием, что доказывает инкапсуляцию серебра в полимерную матрицу и обеспечивает отсутствие негативного влияния на организм при нормальном функционировании. Покрытие биоматрикса на основе «пустых» наночастиц хитозана способствует увеличению пролиферации клеток.

Заключение

Применение сверхкритической технологии для очистки биоматериалов, а также создания и нанесения полимерных протекторных покрытий с целью усиления способности к подавлению кальциноза представляется перспективным. Использование такого подхода модификации биопротезов является более выигрышной стратегией относительно стандартных общепринятых методов их химической модификации.

Для корреспонденции: Иван Сергеевич Чашин, chaschin@polly.phys.msu.ru; адрес: ул. Вавилова, 28, Москва, Российская Федерация, 119991

Corresponding author: Ivan S. Chaschin, chaschin@polly.phys.msu.ru; address: 28, Vavilova St., Moscow, Russian Federation, 119991

Ключевые слова Аллогraftы • Биологические протезы клапанов сердца • Кальциноз • Сверхкритические технологии • Цитотоксичность • Наночастицы • Хитозан • Угольная кислота • Сверхкритический диоксид углерода

Поступила в редакцию: 03.04.2024; поступила после доработки: 19.05.2024; принята к печати: 23.06.2024

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF PROCESSING ALLOGENEIC AND XENOGENIC BIOMATERIALS IN SUB- AND SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE ON THE ABILITY TO SUPPRESS CALCIFICATION

E.I. Perepelkin¹, A.V. Zubko², D.V. Britikov², I.S. Chashchin^{1,2}, N.P. Bakuleva², K.M. Dzhihiya²

¹ Federal State Budgetary Institution of Science “A. N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds” of Russian Academy of Sciences, 28, Vavilova St., Moscow, Russian Federation, 119991; ² Federal State Budgetary Institution “A. N. Bakulev National Medical Research Center for Cardiovascular Surgery” of the Russian Ministry of Health, 135, Rublevskoe Sh., Moscow, Russian Federation, 121552

Highlights

- Hybrid decellularization of allografts in scCO₂ with a small addition of the detergent Tween 80 is very effective in terms of reducing calcification.
- A special coating based on chitosan nanoparticles obtained and applied from the water/subcritical CO₂ system makes it possible to significantly reduce calcification of the standard GA-stabilized pericardium.

Aim	To conduct a comparative analysis of anticalcification properties of implants based on allo- and xeno-tissue after treatment in super- (scCO ₂) and subcritical carbon dioxide.
Methods	We have performed a modification of the following structures: a) rat vessels by hybrid decellularization in scCO ₂ with detergents b) calf pericardium by direct coating of chitosan nanoparticles with silver from the water/carbon dioxide system under pressure (carbonic acid). Following that we have performed an in vivo calcification study on rats (n = 10 for each type of sample). To model the behavior of biomaterial in the human body, we have implanted allogeneic modified aorta into rats. To determine the calcium in the extracted samples, we have used spectrophotometric method to estimate the concentration of calcium. To assess the cytotoxicity of nanocoated pericardium samples, we have measured the impedance of cells populated on biomaterial samples was used.
Results	The treatment of rat vessels in supercritical CO ₂ reduces the deposition of calcium salts by 30% compared to baseline allografts. Pericardium coated with chitosan nanoparticles can be characterized by a significant decrease in calcification – the biomatrix coated with Cht_Ag/TPP contains only (0.015 ± 0.005) wt.% of calcium salts, which is significantly lower compared with GA-stabilized pericardium with (0.070 ± 0.015) wt.% after the experiment. Biocomposites with nanocoating are characterized by similar cellular index compared to a sample of uncoated xeno-tissue. All samples exhibit a cytostatic effect, including nanocoated samples (Cht_Ag/TPP), which proves the encapsulation of silver in the polymer matrix and ensures the absence of negative effects on the body during normal functioning. The coating of biomatrix based on hollow chitosan nanoparticles contributes to an increase in cell proliferation.
Conclusion	The use of supercritical technology for the purification of biomaterials, as well as the creation and application of polymer protective coatings in order to enhance the ability to suppress calcification looks very promising. At the same time, the use of such a “green” approach to the modification of bioprotheses is a more advantageous strategy relative to the standard generally accepted methods of their chemical modification.
Keywords	Allografts • Bioprosthetic heart valves • Calcification • Supercritical technologies • Cytotoxicity • Nanoparticles • Chitosan • Carbonic acid • Supercritical carbon dioxide

Received: 03.04.2024; received in revised form: 19.05.2024; accepted: 23.06.2024

Список сокращений

ГА – глутаровый альдегид SDS – додецилсульфат натрия

Введение

По мере расширения возможностей современной сердечно-сосудистой хирургии растет и потребность в скаффолдах синтетического или биологического происхождения для замены тканей реципиента, которые утратили свои морфологические и функциональные свойства [1]. Эта проблема актуальна и для биологических протезов сосудов. Для решения данной задачи исследователи ведут поиск оптимальных источников биоматериала и альтернативных подходов к повышению его биосовместимости, тромборезистентности и устойчивости к кальцинозу, а также снижению иммуногенности.

Одними из основных источников материалов для биопротезов (скаффолдов) являются ксеноперикард (перикард телят, коров, свиней) и аллогенная донорская ткань. Такие биоматериалы имеют отличные гемодинамические и механико-прочностные свойства. Однако демонстрируют и значимый недостаток, заключающийся в низком сроке службы относительно механических аналогов, что существенно ограничивает применение имплантатов с биоматериалами. Основными причинами отдаленной дисфункции имплантированных аллогraftов и ксеногенных биопротезов клапанов сердца являются кальциноз и тканевая дегенерация [2, 3], которая представляет собой постепенно развивающийся процесс износа пересаженного клапана. Однако частота эндокардита для аллогraftов достоверно ниже, чем после имплантации ксеногенных биопротезов. Тем не менее основная стратегия увеличения срока службы обоих типов протезов клапанов заключается в применении подходов, снижающих кальциноз биоматериалов. Так, используют очистку биоматериалов от клеток донора и фосфолипидов (децеллюляризация) [4, 5] с целью снижения иммунного ответа со стороны организма реципиента или/и нанесение протекторного антикальциевого покрытия [6, 7].

«Золотым стандартом» децеллюляризации биоткани является последовательная химическая обработка. Традиционно после отмывки детергентом на водной основе (например, додецилсульфатом натрия (SDS)) следует обработка в растворе поверхностно-активного вещества и щелочи. Этот подход эффективен, но подготовка матрикса таким образом может занимать до нескольких дней. Биоматериал приходится отмывать несколько раз, чтобы удалить агрессивные химические агенты из-за их токсических свойств, более того, показано, что эти химические вещества повреждают соединительнотканый каркас во время децеллюля-

ризации [8, 9]. В частности, SDS, являясь мощным агентом для лизиса клеток, разрушает конфигурацию белка и нативную ультраструктуру, вызывая уплотнение коллагена в децеллюляризованных клапанах сердца [10, 11].

В последнее время повышенный исследовательский интерес вызывает «зеленый» подход децеллюляризации биотканей с применением сверхкритического диоксида углерода (CO₂) в качестве растворяющей и очищающей среды. Особенность сверхкритического CO₂ заключается в том, что доступный и дешевый диоксид углерода можно сравнительно легко перевести в сверхкритическую фазу, которая обладает сочетанием свойств жидкого и газообразного состояния агрегатного вещества. Действительно, уже при давлениях выше $P_k = 7,28$ МПа и температурах выше $T_k = 31,2$ °C диоксид углерода переходит в сверхкритическое состояние, при котором обладает высокой плотностью, сравнимой с жидкими растворителями ($\rho = 0,4\text{--}1,0$ г/см³ в зависимости от P и T), и высокими значениями коэффициента диффузии, характерными для газов. Благодаря такому уникальному сочетанию свойств вкупе с отсутствием поверхностного натяжения сверхкритический CO₂ может проникать в плотные материалы и действовать как мощный растворитель [12]. Данный растворитель в силу относительно мягких условий существования может быть применен для экологически чистой и деликатной очистки биоматериалов.

Тем не менее для полной децеллюляризации биоматериалов различной природы обработки в чистом сверхкритическом CO₂ бывает недостаточно. Ранее нами показана эффективность гибридного подхода децеллюляризации ксеногенных яремных вен быка [13] и человеческих аллогraftов [14]. Суть такого гибридного подхода состоит в экспресс-предобработке в химическом детергенте SDS (1 ч) с последовательной циклической обработкой в многокомпонентной системе, основу которой составляет сверхкритический CO₂ (~99 об.%) и малая добавка (1 об.%) неионогенного биосовместимого детергента (Tween 80), воды и этанола. Гибридный подход позволил, с одной стороны, удалить клетки из ткани, а с другой, значительно изменить структуру и улучшить механико-прочностные свойства биоматериалов с точки зрения моделирования свойств нативного клапана человека. Ожидается, что, поскольку удастся добиться эффективной децеллюляризации, модификация биоматериалов таким методом можно значительно снизить их кальциноз.

Другой основной стратегией снижения кальци-

ноза является создание протекторного антикальциевого покрытия, которое предотвращает непосредственный контакт с кровью коллагеновых фибрилл основы биопротеза. В литературе представлены исследования различных по составу и строению протекторных покрытий, которыми обрабатывали стабилизированный глутаровым альдегидом (ГА) ксеногенный перикард. Среди наиболее эффективных стоит выделить следующие полимерные покрытия: на основе альфа-аминоолеиновой кислоты – после 4 мес. имплантации обработанные данной кислотой створки кальцифицируются меньше, чем в контроле ($5,5 \pm 3,0$ против $91,2 \pm 19,5$ мг/г соответственно; $p = 0,0004$) [15], гепарина – обработка в 4–5 раз снижала кальциноз при подкожной имплантации крысам [16], сочетания с ПЭГ [17], гиалуроновой кислотой, хитозаном – снижение кальциноза с $10,5 \pm 1,3$ до $1,1 \pm 0,3$ мг/г. Также эффективными могут быть покрытия на основе низкомолекулярных веществ, например покрытых солями металлов (FeCl_3 , AlCl_3) [18, 19], или бисфосфонатами [20].

В целом подходы, основанные на модификации ГА-перикарда полимерами, более предпочтительны, поскольку можно ожидать, что такое покрытие более устойчиво в силу цепного строения молекул и гибкости цепи. Нами ранее разработан метод нанесения хитозановых покрытий на ГА-перикард из самонейтрализующейся и биологически безопасной среды – угольной кислоты под давлением [21]. Показано, что хитозановое покрытие почти на порядок относительно ГА-перикарда, децеллюляризованного с помощью SDS, снижает кальциноз, что обеспечивается как маскированием остаточных альдегидных групп, в том числе внутри микропористой матрицы, так и очисткой ткани в среде угольной кислоты. Перспективным выглядит способ нанесения особого покрытия на основе хитозановых наночастиц, дополненных антимикробными веществами. Так, покрытие на основе наносфер хитозана с внедренными наночастицами серебра способно увеличить механическую прочность матрицы, а также придать усиленный антимикробный эффект со свойством интеллектуального отклика [22].

Исходя из представленных в литературе методов модификации биоматериалов для снижения кальциноза, можно сделать вывод, что научно-исследовательский интерес представляют новые методы и подходы с использованием нетоксичных растворителей. **Целью настоящего исследования** является изучение влияния обработки биоматериалов растворителями на основе диоксида углерода под давлением (сверхкритический CO_2 , угольная кислота) на способность к подавлению кальциноза. При этом тестировали два подхода: гибридную децеллюляризацию (на модели крысиных аллогraftов) и нанесение покрытия из хитозановых нано-

частиц из растворов воды, насыщенной диоксидом углерода под высоким давлением (угольной кислотой) (на модели ГА-перикарда).

Материалы и методы

Объектами исследования стали: крысиные аллогraftы – аорты крыс – и образцы перикарда телят, стабилизированного ГА (матрицы ГА-стабилизированного перикарда), квадратной формы площадью 1×1 см² и толщиной 0,4–0,5 мм. Образцы аорты крыс модифицировали как химическим, так и новым гибридным методом с использованием сверхкритического диоксида углерода. Для модификации использовали следующие материалы: детергенты – SDS, Tween 80 (Sigma-Aldrich, США), хитозан (#448869, Sigma-Aldrich, США), химические сшиватели – ГА и триполифосфат натрия. Также применяли нитрат серебра – AgNO_3 (Sigma-Aldrich, США; номер по каталогу 10220) – в качестве прекурсора металла. На протяжении всего эксперимента использовали сверхчистые CO_2 , H_2 (> 99,997%; Linde Gas Rus, Россия) и свежеионизированную воду (Milli-Q Synthesis, США).

Крысиные аорты извлечены из животных под наркозом, затем отмыты в стерильном физрастворе. Классическую химическую модификацию крысиных аорт и перикарда телят производили согласно методике, одобренной для хирургической практики в ФГБУ «НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева» Минздрава России. Как правило, для ксеноперикарда этот метод включает первичную очистку биоматериала от остатков слизистой оболочки и крови, дальнейшую стабилизацию в 0,625% водном растворе ГА и промывку (децеллюляризацию) 1% раствором додецилсульфата натрия и буфером HEPES (Sigma-Aldrich, США). Децеллюляризацию крысиных аорт проводили в три этапа общей продолжительностью около 70 ч. Первым этапом выполняли экспозицию аорт в растворе детергента дигитонина (0,1 об./об. %) и ЭДТА (10 ммоль/л) при комнатной температуре и атмосферном давлении в течение 48 ч. Вторым этапом аорты промывали от остатков растворителя в физиологическом растворе в течение 15 мин. На третьем этапе стерилизовали в растворе антибиотика в течение 24 ч. Затем образцы многократно отмывали и хранили для последующего подкожного подсаживания крысам. Гибридный метод заключался в легкой кратковременной (1 ч) экспозиции образцов в растворе детергента SDS с последующей очисткой в растворе сверхкритического CO_2 с добавлением смеси малого количества (1 об.%) биосовместимых сорастворителей (вода, этанол) и неионогенного детергента Tween 80. Обработку в сверхкритическом CO_2 проводили в герметичном автоклаве объемом 300 мл двумя циклами по 45 мин с накачкой давления до $P_1 = 17$ МПа и сбросом до $P_0 = 9$ МПа с выдерживанием температуры в си-

стеме 39 °С. Более детально метод очистки описан в опубликованной ранее работе [14].

Исследовали структуру поверхности аорт до и после децеллюляризации методом сканирующей электронной микроскопии с использованием полевого эмиссионного микроскопа Hitachi SU 8000 (Hitachi, Япония). Образцы фиксировали в растворе 2% ГА в 0,1 М буфере HEPES-NaOH (pH 7.2), промывали тем же буфером и высушивали путем постепенной замены воды этанолом с последующим удалением этанола. Чтобы избежать поверхностных капиллярных эффектов, возникающих в результате обычного удаления этанола из образца ткани через границу раздела фаз жидкость/газ, этанол был удален потоком сверхкритического CO₂ при декомпрессии. Образец извлекали из реактора, устанавливали на 25-миллиметровую алюминиевую заглушку и фиксировали с помощью токопроводящей углеродной краски. Поверхность была покрыта тонкой пленкой (7 нм) из сплава платина/палладий (80/20) методом магнетронного распыления [23]. Изображения получены в режиме вторичных электронов при ускоряющем напряжении 2 кВ на рабочем расстоянии 8–10 мм. Поверхность образцов исследовали при увеличении от $\times 100$ до $\times 50\,000$.

Перикард телят стабилизировали и децеллюляризовали согласно классическому методу с использованием ГА и SDS. ГА-стабилизированные матрицы перикарда модифицировали путем нанесения полимерного покрытия, основу которого представляли хитозановые наносферы с внедренными наночастицами серебра. Наночастицы хитозана получали методом ионного гелирования в растворе угольной кислоты. Нанесение покрытия также происходило в растворе угольной кислоты под давлением. Раствор наночастиц в угольной кислоте получали поэтапно в герметичном реакторе, в котором воду насыщали CO₂ под давлением $p = 30$ МПа для получения 0,7 вес.% раствора хитозана. После растворения реактор вскрывали и добавляли прекурсор серебра (AgNO₃) из расчета 1 ион серебра на 10 звеньев хитозана (образец низкомолекулярного хитозана #448869 был использован для получения таких частиц). После растворения вновь насыщали CO₂ до давления 30 МПа и выдерживали систему при 25 °С и перемешивании в течение 1–2 дней. Затем в раствор добавляли ионногенный сшиватель триполифосфат натрия так, чтобы соотношение сшивателя к полимеру было 1:6, дополнительно сначала закачивая H₂ до давления 1 МПа для катализа процесса формирования металлических наночастиц, затем раствор насыщали CO₂. Такое соотношение сшивателя выбрано исходя из выявленных оптимальных условий получения наночастиц в угольной кислоте с точки зрения их стабильности, по этой же причине был выбран хитозановый материал низкой молекулярной массы и давление

CO₂ в бифазной системе $p = 30$ МПа. Покрытие на ГА-перикарде получали путем прямого нанесения из полученного раствора составных наночастиц хитозана в растворе угольной кислоты при $p = 30$ МПа и температуре 25 °С, в результате чего были получены гибридные матрицы ГА-перикарда с новым покрытием. Детальное описание методики получения полимерных наночастиц и их нанесения на матрицы ГА-перикарда представлено ранее [22].

Из-за быстрого метаболизма крыс в качестве экспресс-тестирования *in vivo* с относительно короткими временными характеристиками кальцификации мы выбрали подкожные тесты. Образцы биоматериалов (1×1 см² для перикарда и 1 см куски аорт) вместе с контрольными образцами были подкожно имплантированы крысам линии Wistar массой 180 ± 10 г (рис. 1). Образцы перикарда попарно (образец с покрытием и без него), симметрично относительно позвоночника имплантированы в центральную область спины животного. Крысиные аорты имплантированы попарно (исследуемый образец – контрольный) для каждого типа образца симметрично относительно позвоночника, в центральную область спины, в область лопаток и таза животного. На каждый тип образца приходилось по десять крыс. Каждая крыса получала одновременно два образца перикарда – ГА-перикард и ГА-перикард с покрытием на основе наночастиц хитозана с серебром – и три образца аорт (нативная, классическая, гибридная очистка). Операции проведены под анестезией золетилом. После имплантации животных содержали в нормальных условиях, с кормлением *ad libitum*. В рацион входил регулятор кальция эргокальциферол (витамин D2). Через 4 мес. после имплантации образцы были изъятые, у следов воспалительной реакции не обнаружено.

Эксперименты с животными были выполнены

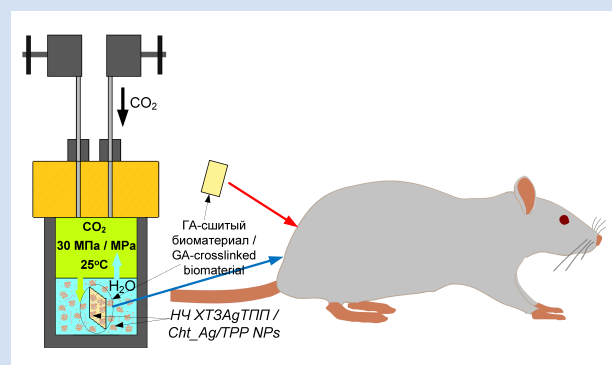


Рисунок 1. Схема эксперимента: модификация ГА-перикарда прямым нанесением покрытия на основе наночастиц хитозана с серебром из раствора в угольной кислоте с последующей подкожной имплантацией образцов крысам для проведения эксперимента *in vivo*

Figure 1. Design of the experiment: Modification of GA-pericardium by direct coating with ChtAgTPP nanoparticles in carbonic acid solution, followed by implantation into rats for *in vivo* testing

в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях. Протокол исследования одобрен ФГБУ «НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева» Минздрава России в соответствии с внутренними рекомендациями по уходу и использованию лабораторных животных.

Для определения кальция в извлекаемых образцах использован спектрофотометрический метод оценки концентрации кальция. Образцы были полностью переведены в раствор путем кислотного гидролиза в 1 М HCl (соляная кислота). Образцы взвешивали и помещали в 300 мкл раствора 1 М HCl. Затем аликвоты гидролизата объемом 30 мкл помещали в отдельные микропробирки (1,5 мл) и высушивали в течение 24 ч при 50 °С для удаления избытка кислоты. К сухому остатку добавляли 100 мкл реагента «Арсенazo III» (набор «Кальций AC ДиаС», АО «ДИАКОН-ДС», Россия). Далее образцы помещали в шейкер-термостат и инкубировали 5 мин при 37 °С. Затем аликвоты перемещали в 96-луночный планшет и регистрировали оптическую плотность при 620 ± 25 нм на планшетном ридере Tecan Infinite F200 (Tecan, Швейцария). Расчет концентрации проводили по калибровочному графику, используя стандартный раствор хлорида кальция (2,5 ммоль/л).

Для оценки возможной цитотоксичности покрытия на основе наночастиц хитозана с серебром применен метод измерения импеданса клеток, заселенных на биоматрикс. Для мониторинга пролиферации клеток в режиме реального времени использован прибор xCELLigence RTCA-SP (Agilent Technologies, США). В лунку E-Plate со встроенными золотыми электродами вносили суспензию 320 мкл среды DMEM (с бычьей фетальной сывороткой и раствором антибиотика-антимикотика), содержащей 3×10^5 клеток костномозговых мононуклеаров. Затем определяли фоновый импеданс и помещали исследуемый образец коллагеновой ткани, модифицированной наночастицами. Определяли косвенное значение клеточного индекса, связанное с изменением значений импеданса при прохождении переменного тока через лунки с образцами, что прямо пропорционально истинному значению клеточного индекса, то есть отношение прироста или снижения количества клеток к исходному количеству клеток. Измерения проводили в течение 96 ч. В качестве контроля по изменению клеточного индекса использовали лунки без исследуемых образцов (только суспензия клеток в среде). Каждый образец изучали в 5 повторях.

Результаты

Мы применяли подход, моделирующий имплантацию исходного аллогraftа, а также аллогraftа,

прошедшего специальную очистку от клеток с использованием сверхкритического CO₂, на мелких лабораторных животных. Поскольку в настоящий момент в кардиохирургической практике широко используются два типа биопротезов – аллогraftы и химически стабилизированные ГА протезы из ксеногенного перикарда, исследовательский интерес вызывает изучение возможности снижения кальциноза за счет обработки биотканей в специальных растворителях на основе диоксида углерода под высоким давлением.

Получены статистически значимые различия в кальцинозе для модифицированных и немодифицированных биоматериалов (рис. 2). Для очищенных дигитонином и ЭДТА аллогенных аорт наблюдалось снижение кальциноза на 15% ($p = 0,03$) по сравнению с нативными образцами, а для очищенных гибридным методом – на 30% по сравнению с исходным аллогraftом ($p = 0,03$).

Косвенно можно оценить эффективность децеллюляризации такого гибридного подхода при сравнении изображений поверхностей аллогraftов до и после модификации, полученных методом сканирующей электронной микроскопии (рис. 3). Действительно, поверхность аорты после обработки более детализированная, с отчетливым изображением коллагеновых фибрилл. Таким образом, такой подход позволяет, с одной стороны, эффективно децеллюляризовать ткань, прямым следствием чего является значимое снижение кальциноза.

Для перикардиальных образцов с покрытием на основе наночастиц хитозана с серебром и без такового выявлено еще более значимое отличие в показателях кальциноза ($p = 0,005$). Количество нерастворимых солей кальция, отложившихся на разных типах образцов биоматериалов, статистически значимо различалось. Средние значения

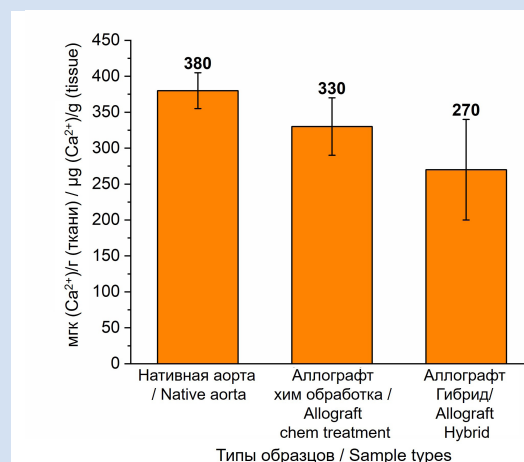


Рисунок 2. Относительное количество солей кальция, отложившихся в аллогraftах после модельного эксперимента на крысах

Figure 2. Relative amount of calcium salts deposited into allografts after model experiment on rats

количества солей кальция, адсорбированных на образцах перикарда с покрытием на основе наночастиц хитозана с серебром, и стандартного биоматериала, применяемого в качестве основы запирательного элемента биопротеза (ГА-перикард), представлены на рис. 3.

Обнаружено, ГА-перикард с покрытием на основе наночастиц хитозана с серебром содержит только $0,011 \pm 0,004$ мас.% солей кальция после проведения 4-месячного модельного эксперимента *in vivo* на крысах. Это примерно на два порядка ниже, чем для нативного коллагенового матрикса, и на порядок ниже, чем для применяемого в настоящий момент ГА-перикарда без покрытия ($0,070 \pm 0,010$ мас.%) солей кальция (рис. 4). Для каждой конкретной крысы кальцификация в образцах с покрытием всегда была значительно ниже, чем в контрольных образцах.

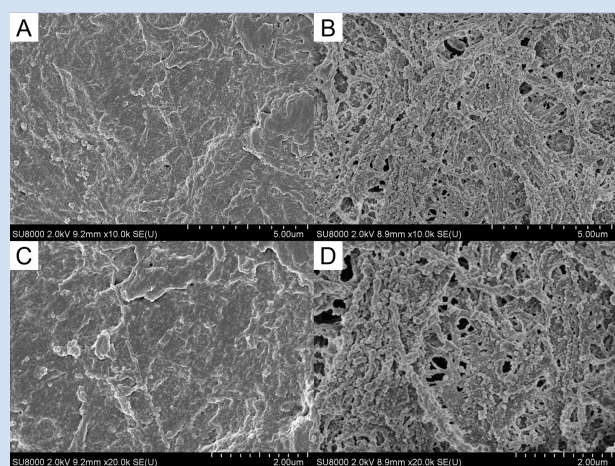


Рисунок 3. СЭМ-микрографии поверхностей нативного крысиного аллогraftа (A, C) до и после гибридной децеллюляризации (B, D). Верхний ряд изображений – увеличение $\times 10\,000$, нижний ряд – $\times 20\,000$.

Figure 3. SEM micrographs of native rat allograft surfaces (A, C) before and after hybrid decellularization (B, D). Upper row of images: magnification – $\times 10\,000$, lower row – $\times 20\,000$.

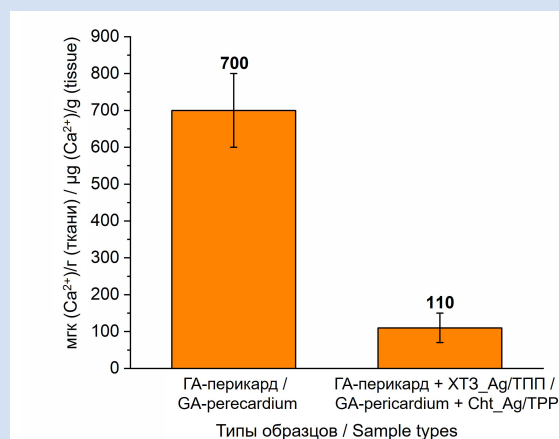


Рисунок 4. Относительное количество солей кальция, отложившихся в ГА-перикарде без покрытия и с покрытием на основе наночастиц хитозана с серебром после модельного эксперимента на крысах

Figure 4. The relative amount of calcium salts deposited into the GA-pericardium, with and without Cht_Ag/TPP coating after model experiments on rats

Поскольку показано, что ГА-перикард с покрытием из составных хитозановых наночастиц обладает выраженным антимикробным эффектом, в связи с токсичностью наночастиц Ag, инкапсулированных в полимерные частицы, важно было протестировать цитотоксичность образцов перикарда с данным покрытием.

Исследование цитотоксичности биоимплантов показало, что как образцы без покрытия, так и с покрытием на основе наночастиц биосовместимы, так как в среднем их клеточный индекс выше индекса контрольного образца. Биоконпозиты с нанопокрывтием характеризуются приблизительно одинаковым клеточным индексом по сравнению с образцом ксеноткани без покрытия. Все образцы проявляют цитостатический эффект, в том числе с покрытием на основе наночастиц хитозана с серебром, что доказывает инкапсуляцию серебра в полимерную матрицу и обеспечивает отсутствие негативных эффектов для организма при нормальном функционировании. Покрытие биоматрикса на основе «пустых» наночастиц хитозана способствует увеличению пролиферации клеток (рис. 5).

Обсуждение

Снижение количества солей кальция, отложившихся в образцы аллогraftов, децеллюляризованных гибридным подходом в среде сверхкритического CO₂, связано с эффективной очисткой биоткани от клеточных остатков и фосфолипидов, являющихся потенциальными центрами развития кальциноза. Во время экспозиции биоматериала в автоклаве высокого давления в растворе сверхкритического CO₂ образуется высокомолекулярная и коагулирующая смесь мицелл из молекул детергента и воды по типу «вода в масле» – в этом случае с

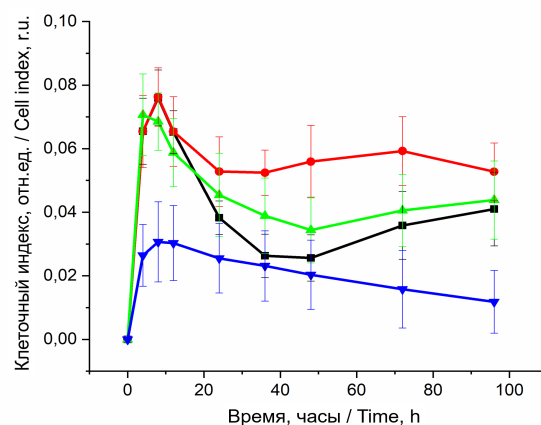


Рисунок 5. Зависимость клеточного индекса от времени. ▼ – контроль, без биоматрикса, ▲ – биоматрикс без покрытия, ● – биоматрикс с покрытием хитозан/триполифосфат натрия, ■ – биоматрикс с покрытием на основе наночастиц хитозана с серебром

Figure 5. Dependence of the cellular index on time. ▼ – Control sample, without biomatrix ▲ – biomatrix without coating, ● – biomatrix with Cht/TPP coating, ■ – biomatrix with ChtAgTPP coating

тканью могут взаимодействовать как полярные, так и неполярные участки молекул растворителя и детергента. Действительно, в сочетании со сверхкритическим CO₂ такая сложная система содержит наноразмерные капли воды, заключенные в мицеллы, которые благодаря высокому давлению обладают высокой проникающей способностью и эффективно промывают ткань по всей толщине образца [13]. Эта полярно-неполярная смесь, по-видимому, эффективна при экстракции полярных, неполярных и, в частности, амфифильных клеточных остатков, что также косвенно подтверждено сравнительным анализом СЭМ-микрографий поверхности образцов нативных аллогraftов и обработанных в растворе системы со сверхкритическим CO₂ (см. рис. 3).

Нанесение протекторного полимерного покрытия на основе наночастиц из раствора угольной кислоты под давлением способствует не только улучшению механико-прочностных свойств биоткани, дополнительному усилению антимикробных свойств [22], но и значительному (почти на порядок) снижению кальциноза. Важно отметить, что хитозан известен как биоразлагаемый материал. Тем не менее покрытие на основе наночастиц хитозана подавляет кальцификацию в течение всего периода 4-месячных подкожных тестов на крысах, что является относительно длительным периодом, принимая во внимание быстрый метаболизм крыс. Скорее всего, хитозановые наночастицы связаны с коллагеновой матрицей посредством связей основания Шиффа с остаточными группами ГА. Таким образом, ГА-перикард с покрытием на основе наночастиц хитозана представляет собой стабильный материал, устойчивый к возможному биологическому разложению [24].

Полученные нами данные о снижении кальцификации перикарда, обработанного хитозановыми наночастицами, сопоставимы со значениями, полученными нами ранее при нанесении обычного хитозанового покрытия [21], а также представленными ранее в работах, в которых использовали хитозан, растворимый при нейтральном pH, который вряд ли должен быть достаточно стабильным на биопротезах клапанов сердца в магистральном кровотоке во время длительного периода функционирования [25]. Наше покрытие на основе наночастиц адсорбируется из углекислоты при высоком давлении. Хитозан самопроизвольно теряет заряд после декомпрессии – макромолекулы депротонируются. Таким образом, без какой-либо нейтрализации щелочью он больше не растворим в нейтральных средах, таких как плазма крови, и должен быть достаточно стабильным. Поэтому мы считаем, что этот метод является более перспективным по сравнению с ранее запатентованным, при котором уменьшение кальцификации в 20–40 раз было достигнуто за счет нанесения электростатически стабилизированного бислоя производных хитозана из водных растворов при

нормальном давлении [26]. В настоящем способе влияние высокого давления, по-видимому, является значительным. Вероятно, высокое давление способствует проникновению хитозановых наночастиц в глубокие поры коллагеновой матрицы, обеспечивая тем самым особенно тщательную модификацию ткани. Кроме того, в среде угольной кислоты также идут процессы вымывания клеточных остатков и фосфолипидов, аналогично тем, которые протекают во время гибридной децеллюляризации в сверхкритическом CO₂.

Заключение

Исходя из проведенных исследований на модели крысиных аллогraftов, можно заключить, что гибридная обработка аллогraftов с применением сверхкритического CO₂ наиболее предпочтительна с точки зрения снижения кальциноза, даже в сравнении с эффективными химическими методами децеллюляризации, поскольку позволяет очищать ткань, удаляя клетки, фосфолипиды и клеточные остатки, являющиеся потенциальными центрами кальциноза. При этом также эффективным остается подход прямого нанесения хитозановых наночастиц на биоткань под давлением из растворов в угольной кислоте на ГА-стабилизированную ткань перикарда. Такой способ позволяет значительно снизить кальциноз относительно стандартного ГА-стабилизированного перикарда.

Таким образом, можно заключить, что синтез двух подходов, эффективной децеллюляризации аллогraftов в сверхкритическом CO₂ с последующей сшивкой биоткани и нанесением протекторного антикальциевого покрытия из растворов воды, насыщенной субкритическим CO₂, обладает значительными перспективами в решении важной научно-практической задачи повышения срока службы биопротезов, применяемых в кардиохирургии.

Благодарности

Эксперимент на животных *in vivo* и определение количества кальция в образцах проведены в ФГБУ «НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева» Минздрава России при поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации. Получение биокомпозитных образцов с хитозановым покрытием выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (контракт № 075-00277-24-00) с использованием оборудования ИНЭОС РАН. Исследование морфологии поверхности образцов методом электронной микроскопии выполнено в отделе структурных исследований ИОХ РАН.

Конфликт интересов

Е.И. Перепелкин заявляет об отсутствии конфликта интересов. Н.П. Бритиков заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.В. Зубко заявляет

об отсутствии конфликта интересов. И.С. Чашин заявляет об отсутствии конфликта интересов. Н.П. Бакулева заявляет об отсутствии конфликта интересов. К.М. Джиджихия заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Информация об авторах

Пере́лкин Евге́ний Игоре́вич, аспирант федерального государственного бюджетного учреждения науки Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук (ИНЭОС РАН), Москва, Российская Федерация; **ORCID** 0009-0008-4964-468X

Зубко Александр Владимирович, кандидат медицинских наук заведующий группой клеточных технологий и молекулярно-генетических исследований отдела научных разработок и опытного производства медицинских изделий для сердечно-сосудистой хирургии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-8958-1400

Бритиков Дмитрий Вячеславович, доктор медицинских наук ведущий научный сотрудник отдела научных разработок и опытного производства медицинских изделий для сердечно-сосудистой хирургии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-6942-6611

Чашин Иван Сергеевич, кандидат физико-математических наук старший научный сотрудник федерального государственного бюджетного учреждения науки Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук (ИНЭОС РАН), Москва, Российская Федерация; ведущий технолог лаборатории аллогенных материалов для сердечно-сосудистой хирургии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-1372-7180

Бакулева Наталья Петровна, кандидат химических наук заведующая лабораторией биопротезов и полимерных материалов федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-1119-5435

Джиджихия Константине Малхазович, кандидат медицинских наук заведующий лабораторией аллогенных материалов для сердечно-сосудистой хирургии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-3040-6901

Вклад авторов в статью

ПЕИ – получение и интерпретация данных исследования, написание и корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ЗАВ – получение и интерпретация данных исследования, написание статьи, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

Финансирование

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-23-00559, <https://rscf.ru/project/22-23-00559>.

Author Information Form

Perepelkin Evgeny I., Postgraduate Student, Federal State Budgetary Institution of Science “A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation; **ORCID** 0009-0008-4964-468X

Zubko Alexander V., PhD, Head of the Group for Cellular Technologies and Molecular Genetics Research, Department of Development and Pilot Production of Medical Devices for Cardiovascular Surgery, Federal State Budgetary Institution “A.N. Bakulev National Medical Research Center for Cardiovascular Surgery” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-8958-1400

Britikov Dmitry V., PhD, Leading Researcher at the Department of Development and Pilot Production of Medical Devices for Cardiovascular Surgery, Federal State Budgetary Institution “A.N. Bakulev National Medical Research Center for Cardiovascular Surgery” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-6942-6611

Chashchin Ivan S., PhD, Senior Researcher at the Federal State Budgetary Institution of Science “A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation; Leading Technologist at the Laboratory of Allogeneic Materials for Cardiovascular Surgery, Federal State Budgetary Institution “A.N. Bakulev National Medical Research Center for Cardiovascular Surgery” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-1372-7180

Bakuleva Natalia P., PhD, Head of the Laboratory of Bioprostheses and Polymer Materials, Federal State Budgetary Institution “A.N. Bakulev National Medical Research Center for Cardiovascular Surgery” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1119-5435

Dzhihiya Konstantin M., PhD, Head of the Laboratory of Allogeneic Materials for Cardiovascular Surgery, Federal State Budgetary Institution “A.N. Bakulev National Medical Research Center for Cardiovascular Surgery” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-3040-6901

Author Contribution Statement

PEI – data collection and interpretation, manuscript writing, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

ZAV – data collection and interpretation, manuscript writing, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

БДВ – получение и интерпретация данных исследования, написание статьи, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ЧИС – получение и интерпретация данных исследования, написание статьи, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

БНП – получение и интерпретация данных исследования, написание статьи, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ДКМ – получение и интерпретация данных исследования, написание статьи, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

BDV – data collection and interpretation, manuscript writing, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

ChIS – data collection and interpretation, manuscript writing, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

BNP – data collection and interpretation, manuscript writing, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

DKM – data collection and interpretation, manuscript writing, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Muzzio N., Moya S., Romero G. Multifunctional Scaffolds and Synergistic Strategies in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Pharmaceutics*. 2021;13(6):792. doi: 10.3390/pharmaceutics13060792.
- Barratt-Boyes B.G., Christie G.W. What is the best bioprosthetic operation for the small aortic root?: allograft, autograft, porcine, pericardial? Stented or unstented?. *J Card Surg*. 1994;9(2 Suppl):158-164. doi:10.1111/j.1540-8191.1994.tb00917.x.
- Haziza F., Papouin G., Barratt-Boyes B., Christie G., Whitlock R. Tears in bioprosthetic heart valve leaflets without calcific degeneration. *J Heart Valve Dis*. 1996;5(1):35-39.
- Aldridge A., Desai A., Owston H., Jennings L., Fisher J., Rooney P., Kearney J., Ingham E., Wilshaw S. Development and characterisation of a large diameter decellularised vascular allograft. *Cell Tissue Bank*. 2018;9(3):287-300. doi: 10.1007/s10561-017-9673-y.
- Sulaiman N., Bond A., Bruno V., Joseph J., Johnson J., Suleiman M., George S., Ascione R. Effective decellularisation of human saphenous veins for biocompatible arterial tissue engineering applications: Bench optimisation and feasibility in vivo testing. *J Tissue Eng*. 2021; 29;12:2041731420987529. doi: 10.1177/2041731420987529.
- Ohri R., Hahn S.K., Hoffman A.S., Stayton P.S., Giachelli C.M. Hyaluronic acid grafting mitigates calcification of glutaraldehyde-fixed bovine pericardium. *J Biomed. Mater. Res*. 2004;70A:328-334. doi: 10.1002/jbm.a.30088.
- Vasudev S.C., Moses L.R., Sharma C.P. Covalently bonded heparin to alter the pericardial calcification. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 2000;28(3):241-253. doi:10.3109/10731190009119355.
- Gilpin A., Yang Y. Decellularization strategies for regenerative medicine: from processing techniques to applications. *Biomed. Res. Int*. 2017;9831534. doi: 10.1155/2017/9831534.
- Gilbert T., Badylak S. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011;32:3233-3243. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
- Zhou J., Fritze O., Schleicher M., Wendel H-P., Schenke-Layland K., Harasztosi C., Hu S., Stock U. Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity. *Biomaterials*. 2010;31:2549-2554. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.088.
- Hwang J., San B., Turner N., White L., Faulk D., Badylak S., Li Y., Yu S. Molecular assessment of collagen denaturation in decellularized tissues using a collagen hybridizing peptide. *Acta Biomater*. 2017;53:268-278. doi: 10.1016/j.actbio.2017.01.079.
- Casali D., Handleton R., Shazly T., Matthews M. A novel supercritical CO₂-based decellularization method for maintaining scaffold hydration and mechanical properties. *J. Supercrit. Fluids*. 2018;131:72-81. doi: 10.1016/j.supflu.2017.07.021.
- Chaschin I., Khugaev G., Krashennnikov S., Petlenko A., Badun G., Chernysheva M., Dzhidzhikhiya K., Bakuleva N. Bovine jugular vein valved conduit: a new hybrid method of devitalization and protection by chitosan-based coatings using super- and subcritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*. 2020;164: 104893. doi: 10.1016/j.supflu.2020.104893.
- Chaschin I., Britikov D., Khugaev G., Salokhedina R., Zubko A., Abramchuk S., Petlenko A., Muratov R., Bakuleva N. Decellularization of the human donor aortic conduit by a new hybrid treatment in a multicomponent system with supercritical CO₂ and Tween 80. *Journal of Supercritical Fluids*. 2022;180: 105452. doi: 10.1016/j.supflu.2021.105452.
- Gott J.P., Girardot M.N., Girardot J.M., Hall J.D., Whitlark J.D., Horsley W.S., Dorsey L.M., Levy R.J., Chen W., Schoen F.J., Guyton R.A. Refinement of the alpha aminoleic acid bioprosthetic valve anticalcification technique. *Ann Thorac Surg*. 1997;64(1):50-58. doi:10.1016/s0003-4975(97)00118-5.
- Barbarash L.S., Zhuravleva I.I., Medvedeva V.M., Shaposhnikov A.N. Ways to prevent the calcification of heart valve bioprostheses. *Biull Eksp Biol Med*. 1988;106(12):732-734.
- Vasudev S.C., Chandy T., Sharma C.P., Mohanty M., Umasankar P.R. Synergistic effect of released aspirin/heparin for preventing bovine pericardial calcification. *Artif Organs*. 2000;24(2):129-136. doi:10.1046/j.1525-1594.2000.06348.x.
- Webb C.L., Flowers W.E., Horton C., Schoen F.J., Levy R.J. Long-term efficacy of Al³⁺ for prevention of bioprosthetic heart valve calcification. *ASAIO Trans*. 1990;36(3):M408-M410.
- Hirsch D., Drader J., Pathak Y.V., Yee R., Schoen F.J., Levy R.J. Synergistic inhibition of the calcification of glutaraldehyde pretreated bovine pericardium in a rat subdermal model by FeCl₃ and ethanedihydroxydiphosphonate: preincubation and polymeric controlled release studies. *Biomaterials*. 1993;14(9):705-711. doi:10.1016/0142-9612(93)90069-e.
- Timchenko T.P. Bisphosphonates as potential inhibitors of calcification in bioprosthetic heart valves (Review). *Sovrem Tekhnologii Med*. 2022; 14(2):68-78. doi: 10.17691/stm2022.14.2.07.
- Chaschin I., Sinolits M., G.A. Badun G., Chernysheva M., Anuchina N., Krashennnikov S., Khugaev G., Petlenko A., Britikov D., Zubko A., Kurilov A., Dreger E., Bakuleva N. Chitosan/hyaluronic acid polyanion bilayer applied from carbon acid as an advanced coating with intelligent antimicrobial properties for improved biological prosthetic heart valves. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022; 222:2761-2774. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.10.056.
- Perepelkin E., Sinolits M., Badun G., Chernysheva M., Anuchina N., Abramchuk S., Levin E., Bakuleva N., Popov D., Chaschin I. Composite chitosan-based nanoparticles as a basis for innovative antimicrobial coating for bioprosthesis: Preparation and application using carbonic acid as a "green" self-neutralizing solvent. *European Polymer Journal*. 2023; 193:112104. doi:10.1016/j.eurpolymj.2023.112104.
- Kashin A.S., Ananikov V.P. A SEM study of nanosized metal films and metal nanoparticles obtained by magnetron sputtering. *Russ. Chem. Bull*. 2011; 60:2602-2607. doi:10.1007/s11172-011-0399-x.
- Gallyamov M. O., Chaschin I. S., Bulat M. V., Bakuleva N. P., Badun G. A., Chernysheva M. G., Kiselyova O. I., Khokhlov A.R.. Chitosan coatings with enhanced biostability in vivo. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater*. 2018; 106:270-277. doi:10.1002/jbm.b.33852.
- Chanda J. Prevention of calcification of heart valve bioprostheses: an experimental study in rat. *The Annals of Thoracic Surgery*. 1995;60:S339-S342. doi:10.1016/0003-4975(95)00256-K.
- Бокерия Л.А., Бакулева Н.П., Костава В.Т., Гамзадзе

А.И., Галлямов М.О., Хохлов А.Р.; Государственное учреждение Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева Российской академии медицинских наук. Способ хи-

мической обработки ксеноперикарда. Патент № 2008112997/15 РФ, МПК А 61 L 27/36, А 61 F 2/24; заявл. 07.04.2008 ; опубл. 20.03.2010, Бюл. № 8.

REFERENCES

- Muzzio N., Moya S., Romero G. Multifunctional Scaffolds and Synergistic Strategies in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Pharmaceutics*. 2021;13(6):792. doi: 10.3390/pharmaceutics13060792.
- Barratt-Boyes B.G., Christie G.W. What is the best bioprosthetic operation for the small aortic root?: allograft, autograft, porcine, pericardial? Stented or unstented?. *J Card Surg*. 1994;9(2 Suppl):158-164. doi:10.1111/j.1540-8191.1994.tb00917.x.
- Haziza F., Papouin G., Barratt-Boyes B., Christie G., Whitlock R. Tears in bioprosthetic heart valve leaflets without calcific degeneration. *J Heart Valve Dis*. 1996;5(1):35-39.
- Aldridge A., Desai A., Owston H., Jennings L., Fisher J., Rooney P., Kearney J., Ingham E., Wilshaw S. Development and characterisation of a large diameter decellularised vascular allograft. *Cell Tissue Bank*. 2018;9(3):287-300. doi: 10.1007/s10561-017-9673-y.
- Sulaiman N., Bond A., Bruno V., Joseph J., Johnson J., Suleiman M., George S., Ascione R. Effective decellularisation of human saphenous veins for biocompatible arterial tissue engineering applications: Bench optimisation and feasibility in vivo testing. *J Tissue Eng*. 2021; 29;12:2041731420987529. doi: 10.1177/2041731420987529.
- Ohri R., Hahn S.K., Hoffman A.S., Stayton P.S., Giachelli C.M. Hyaluronic acid grafting mitigates calcification of glutaraldehyde-fixed bovine pericardium. *J Biomed. Mater. Res*. 2004;70A:328-334. doi: 10.1002/jbm.a.30088.
- Vasudev S.C., Moses L.R., Sharma C.P. Covalently bonded heparin to alter the pericardial calcification. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 2000;28(3):241-253. doi:10.3109/10731190009119355.
- Gilpin A., Yang Y. Decellularization strategies for regenerative medicine: from processing techniques to applications. *Biomater. Res. Int*. 2017;9831534. doi: 10.1155/2017/9831534.
- Gilbert T., Badylak S. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011;32:3233–3243. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
- Zhou J., Fritze O., Schleicher M., Wendel H-P., Schenke-Layland K., Harasztosi C., Hu S., Stock U. Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity. *Biomaterials*. 2010;31:2549–2554. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.088.
- Hwang J., San B., Turner N., White L., Faulk D., Badylak S., Li Y., Yu S. Molecular assessment of collagen denaturation in decellularized tissues using a collagen hybridizing peptide. *Acta Biomater*. 2017;53:268–278. doi: 10.1016/j.actbio.2017.01.079.
- Casali D., Handleton R., Shazly T., Matthews M. A novel supercritical CO₂-based decellularization method for maintaining scaffold hydration and mechanical properties. *J. Supercrit. Fluids*. 2018;131:72–81. doi: 10.1016/j.supflu.2017.07.021.
- Chaschin I., Khugaev G., Krashennnikov S., Petlenko A., Badun G., Chernysheva M., Dzhihzhikhiya K., Bakuleva N. Bovine jugular vein valved conduit: a new hybrid method of devitalization and protection by chitosan-based coatings using super- and subcritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*. 2020;164: 104893. doi: 10.1016/j.supflu.2020.104893.
- Chaschin I., Britikov D., Khugaev G., Salokhedina R., Zubko A., Abramchuk S., Petlenko A., Muratov R., Bakuleva N. Decellularization of the human donor aortic conduit by a new hybrid treatment in a multicomponent system with supercritical CO₂ and Tween 80. *Journal of Supercritical Fluids*. 2022;180: 105452. doi: 10.1016/j.supflu.2021.105452.
- Gott J.P., Girardot M.N., Girardot J.M., Hall J.D., Whitlark J.D., Horsley W.S., Dorsey L.M., Levy R.J., Chen W., Schoen F.J., Guyton R.A. Refinement of the alpha aminooleic acid bioprosthetic valve anticalcification technique. *Ann Thorac Surg*. 1997;64(1):50-58. doi:10.1016/s0003-4975(97)00118-5.
- Barbarash L.S., Zhuravleva I.Iu., Medvedeva V.M., Shaposhnikov A.N. Ways to prevent the calcification of heart valve bioprostheses. *Biull Eksp Biol Med*. 1988;106(12):732-734.
- Vasudev S.C., Chandy T., Sharma C.P., Mohanty M., Umasankar P.R. Synergistic effect of released aspirin/heparin for preventing bovine pericardial calcification. *Artif Organs*. 2000;24(2):129-136. doi:10.1046/j.1525-1594.2000.06348.x.
- Webb C.L., Flowers W.E., Horton C., Schoen F.J., Levy R.J. Long-term efficacy of Al³⁺ for prevention of bioprosthetic heart valve calcification. *ASAIO Trans*. 1990;36(3):M408-M410.
- Hirsch D., Drader J., Pathak Y.V., Yee R., Schoen F.J., Levy R.J. Synergistic inhibition of the calcification of glutaraldehyde pretreated bovine pericardium in a rat subdermal model by FeCl₃ and ethanehydroxydiphosphonate: preincubation and polymeric controlled release studies. *Biomaterials*. 1993;14(9):705-711. doi:10.1016/0142-9612(93)90069-e.
- Timchenko T.P. Bisphosphonates as potential inhibitors of calcification in bioprosthetic heart valves (Review). *Sovrem Tekhnologii Med*. 2022; 14(2):68-78. doi: 10.17691/stm2022.14.2.07.
- Chaschin I., Sinolits M., G.A. Badun G., Chernysheva M., Anuchina N., Krashennnikov S., Khugaev G., Petlenko A., Britikov D., Zubko A., Kurilov A., Dreger E., Bakuleva N. Chitosan/hyaluronic acid polyanion bilayer applied from carbon acid as an advanced coating with intelligent antimicrobial properties for improved biological prosthetic heart valves. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022; 222:2761–2774. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.10.056.
- Perepelkin E., Sinolits M., Badun G., Chernysheva M., Anuchina N., Abramchuk S., Levin E., Bakuleva N., Popov D., Chaschin I. Composite chitosan-based nanoparticles as a basis for innovative antimicrobial coating for bioprostheses: Preparation and application using carbonic acid as a “green” self-neutralizing solvent. *European Polymer Journal*. 2023; 193:112104. doi:10.1016/j.eurpolymj.2023.112104.
- Kashin A.S., Ananikov V.P. A SEM study of nanosized metal films and metal nanoparticles obtained by magnetron sputtering. *Russ. Chem. Bull*. 2011; 60:2602–2607. doi:10.1007/s11172-011-0399-x.
- Gallyamov M. O., Chaschin I. S., Bulat M. V., Bakuleva N. P., Badun G. A., Chernysheva M. G., Kiselyova O. I., Khokhlov A.R.. Chitosan coatings with enhanced biostability in vivo. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater*. 2018; 106:270-277. doi:10.1002/jbm.b.33852.
- Chanda J. Prevention of calcification of heart valve bioprostheses: an experimental study in rat. *The Annals of Thoracic Surgery*. 1995;60:S339–S342. doi:10.1016/0003-4975(95)00256-K.
- Bokerija L.A., Bakuleva N.P., Kostava V.T., Gamzazade A.I., Gallyamov M.O., Khokhlov A.R., Bakulev Scientific Center for Cardiovascular Surgery, RAMS. Method for chemical treatment of xenopericardium, Patent 2384348 RU. 20.03.2010. (In Russian)

Для цитирования: Перепёлкин Е.И., Зубко А.В., Бритиков Д.В., Чащин И.С., Бакулева Н.П., Джиджихия К.М. Исследование влияния обработки алло- и ксеногенных биоматериалов в суб- и сверхкритическом диоксиде углерода на способность к подавлению кальциноза. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2024;13(3): 182-192. DOI: 10.17802/2306-1278-2024-13-3-182-192

To cite: Perepelkin E.I., Zubko A.V., Britikov D.V., Chaschin I.S., Bakuleva N.P., Dzhihiya K.M. Investigation of the effect of processing allogeneic and xenogenic biomaterials in sub- and supercritical carbon dioxide on the ability to suppress calcification. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2024;13(3): 182-192. DOI: 10.17802/2306-1278-2024-13-3-182-192