

Глушкова Т. В., Овчаренко Е. А., Севостьянова В. В., Клышников К. Ю.
ФГБНУ «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово

ОСОБЕННОСТИ КАЛЬЦИФИКАЦИИ КЛАПАНОВ СЕРДЦА И ИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОТЕЗОВ: СОСТАВ, СТРУКТУРА И ЛОКАЛИЗАЦИЯ КАЛЬЦИФИКАТОВ

Ключевые слова: кальцификация, клапаны сердца, кровеносные сосуды, биопротезы клапанов сердца.

Ссылка для цитирования: Глушкова Т. В., Овчаренко Е. А., Севостьянова В. В., Клышников К. Ю. Особенности кальцификации клапанов сердца и их биологических протезов: состав, структура и локализация кальцификатов. *Кардиология*. 2018;58(5):72–81.

РЕЗЮМЕ

Кальцификация тканей сердечно-сосудистой системы и биологических заменителей нарушает их нормальную биомеханическую функцию, приводя к стенозам или разрывам тканей. Разработки стратегий по снижению риска кальцификации требуют понимания механизмов данного процесса. Однако, несмотря на то что механизмы кальцификации активно изучаются с середины 80-х годов прошлого века и широко освещены в литературе, в настоящее время нет единого мнения о причинно-следственных связях данного патологического процесса. В представленном обзоре приведены данные по составу, структурным особенностям и локализации кальцификатов в структуре естественных клапанов сердца и сосудов, биопротезов клапанов сердца, обработанных глутаровым альдегидом, а также данные по кальцификатам, полученным в экспериментах *in vivo* и *in vitro*. Данные характеристики кальцификатов отражают особенности механизма кальцификации. Результаты проведенного обзора литературы демонстрируют, что локальным триггером процесса кальцификации являются гибель клеток и микроразрушения окружающих тканей на фоне общего биохимического дисбаланса, при этом скорость процессов кальцификации обусловлена концентрацией механического напряжения.

Glushkova T. V., Ovcharenko E. A., Sevostyanova V. V., Klyshnikov K. Yu.

Research Institute for Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia

CALCIFICATION PATTERNS OF THE COMPONENTS OF THE CARDIOVASCULAR SYSTEM AND THEIR SUBSTITUTES: COMPOSITION, STRUCTURE AND LOCALIZATION OF CALCIFIC DEPOSITS

Keywords: calcification, heart valves, blood vessels, bioprosthetic heart valve.

For citation: Glushkova T. V., Ovcharenko E. A., Sevostyanova V. V., Klyshnikov K. Yu. *Calcification Patterns of the Components of the Cardiovascular System and Their Substitutes: Composition, Structure and Localization of Calcific Deposits. Kardiologiia*. 2018;58(5):72–81.

SUMMARY

Calcification of cardiovascular tissues and biological substitutes results in abnormal biomechanics, causing stenosis or tissues ruptures. Therefore, the understanding of calcification pathways will facilitate the development of strategies for calcification risk reduction. Even though calcification pathways have been studied since the mid-80s and are widely described in the medical literature, there is no consensus on the cause-and-effect relationships in this pathological process. The current review covers the composition, structural aspects and specific localization of calcific deposits in native heart valves and blood vessels, bioprosthetic heart valves treated with glutaraldehyde. Moreover, experimental data on the composition of *in vivo* and *in vitro* calcification are presented. These characteristics of calcific deposits provide new insights in the calcification pathways. According to the results of the literature review, one may conclude that cell death, microfracture of the surrounding tissues with the overall biochemical imbalance may potentiate the calcification process. Moreover, the progression of calcification process is associated with the accumulation of mechanical stress.

Патологическая кальцификация мягких тканей организма, сопутствующая заболеваниям сердечно-сосудистой системы (ССС), является одной из важных проблем современной медицины. С учетом общемировой тенденции к старению населения значение таких заболеваний, как атеросклероз и приобретенные пороки клапанов сердца, главным

образом аортальный стеноз дегенеративной этиологии, неуклонно возрастает год от года [1]. Несмотря на то что механизмы, лежащие в основе данных заболеваний, плохо изучены, в целом исследователи сходятся во мнении о частичной идентичности этих заболеваний [2, 3]. Дегенеративный аортальный стеноз, подобно атеросклерозу, представляет

собой активный воспалительный процесс, включающий все элементы аортального комплекса и приводящий к развитию кальциноза. Идентичность процессов кальцификации клапанов сердца и сосудов доказана и в экспериментах на животных. При моделировании атеросклероза у кроликов и мышей выявлена сопутствующая кальцификация створок аортального клапана (АК) различной степени: от умеренного утолщения створок до тяжелой, с образованием крупных конгломератов кальция, приводящих к нарушению движения створок и стенозу [4–6]. Сформировавшийся подобным образом кальциноз клапана постепенно прогрессирует, в конечном счете вызывая уменьшение подвижности створки и снижение эффективной площади открытия, однако без образования межкомиссуральных спаек, свойственных ревматической этиологии порока.

В последние годы интерес к изучению кальцификации также вызван развитием хирургической коррекции АК с использованием транскатетерной процедуры (TAVI). Несмотря на стремительное развитие и положительный клинический результат при использовании транскатетерных клапанов, почти 18% осложнений связаны с деформацией стента, вызванного кальцификацией окружающих структур [7]. Кроме того, крупные кальцификаты признаны независимыми предикторами для имплантации кардиостимулятора после установки транскатетерного клапана [8]. Кальцификация артерий, используемых для доставки транскатетерного клапана, усложняет проведение процедуры в целом, а в ряде случаев служит противопоказанием к подобного рода операциям. Особым типом осложнений TAVI является разрыв кальцинированной стенки аорты как одна из причин смерти после установки транскатетерного клапана [9]. Таким образом, помимо прямого влияния на эффективность TAVI-вмешательства, кальциноз элементов ССС определяет пути и возможность доставки малоинвазивного протеза, что отражено в протоколах предоперационного планирования. Из этого следует, что изучение механизмов кальцификации ССС особо актуально для подобных вмешательств, обретающих большую доступность с развитием медицины.

В целом патологическая кальцификация элементов ССС и их заменителей определяет изменения тканей, приводящие к ремоделированию и деградации биомеханических свойств данных элементов [10]. Иницирующими факторами процесса кальцификации признаны дисфункция эндотелия, воспалительные реакции, окислительный стресс [5, 6]. Изучение процессов патологической кальцификации неразрывно связано с изучением состава, структурных особенностей и локализации кальцификатов, поиском триггеров и катализаторов данного процесса. Полученные знания позволяют сформировать представление о механизмах кальцификации с целью разработки стратегий, направленных на замедление или предотвращение данного процесса.

Формирование и состав кальцификатов

Процесс патологической кальцификации мягких тканей организма заключается в формировании труднорастворимых фосфатов кальция [5, 11], который начинается с гетерогенного образования твердой фазы фосфата кальция на органической подложке. В норме в биологических жидкостях концентрация ионов кальция и фосфатов недостаточна для их самопроизвольного осаждения. Кроме того, данные ионы в нормальных условиях не обладают достаточной внутренней энергией для фазового перехода из раствора в твердый кристалл (комплексобразование). Преодоление энергетического барьера возможно в присутствии субстрата для нуклеации, которым могут являться зародыши кристаллов фосфата кальция, дефекты поверхности материала, в том числе коллагеновых или эластических волокон, фрагменты мертвых клеток (дебрис), липиды, а также наличие в ткани некоторых регуляторных белков костной ткани [5]. Согласно альтернативной теории, в местах кальцификации изначально локализованы микросреды, в которых постепенно увеличивается концентрация ионов кальция и фосфатов до точки апатитового осадка. По мнению ряда авторов, данными микросредами, или концентраторами, являются погибшие или фиксированные консервантом, в случае биопротезов, клетки. В норме жизнеспособные клетки имеют 10 000-кратный градиент осмотического давления ионов кальция между внеклеточным пространством и содержимым клетки, который поддерживается насосами клеточных мембран [12]. При повреждении клеточной мембраны или инактивации кальциевых насосов под воздействием консерванта ионы кальция пассивно диффундируют в цитоплазму клеток, где реагируют с фосфолипидами мембран клеточных органелл, образуя кристалл [12, 13]. Последующий рост образовавшегося кристалла происходит путем включения свободных ионов кальция и фосфата, доставленных на его поверхность путем диффузии из окружающих жидкостей [14]. При этом количество ионов кальция и фосфата в окружающей жидкости достаточно для его роста [12, 13].

Ранее патологическую кальцификацию естественных клапанов сердца считали пассивным процессом, позже данный процесс стали рассматривать как активный, имеющий сходство с кальцификацией при атеросклерозе [4]. В настоящее время выделяют 2 типа патологической кальцификации биологических тканей организма: дистрофическую и остеогенную. Дистрофическая является пассивным процессом в дегенерирующей соединительной ткани, при этом кальцификаты характеризуются аморфной структурой и их формирование часто связывают с осаждением фосфата кальция на клеточном дебрисе. Напротив, остеогенная кальцификация является активным процессом, протекающим на фоне активного остеогенеза, и связана с восстановлением поврежденной ткани. Остеогенные кальцификаты имеются только в 13% биоматериала, содержащего дистрофическую кальци-

фикацию, и характеризуются организованной кристаллической решеткой, как в случае костного гидроксилата [10, 15, 16]. При наличии остеогенной кальцификации обнаружены признаки активного процесса ремоделирования кости с остеобластами и резорбции костной ткани остеокластами. В кальцинированных клапанах выявлены пластинчатые кости, отмечены участки с признаками ранней стадии эндохондрального остеогенеза, подобного ростовой пластинке при заживлении переломов или при фибродисплазии, наличие костных белков, таких как остеопонтин, остеокальцин, остеоонектин, а также костных морфогенетических белков BMP (bone morphogenetic proteins), обладающих остеиндуктивными свойствами [15, 17].

Главной неорганической фазой патологической кальцификации является фосфат кальция, относящийся к карбонатсодержащему гидроксилату В-типа с частичным замещением ионов PO_4^{3-} на CO_3^{2-} [23, 24]. Гидроксилатит, выявленный в элементах ССС, имеет сходство с главной неорганической составляющей костной ткани, но не идентичен ей. Важными свойствами патогенного гидроксилата являются непрерывная химическая и биологическая активность после зарождения кристалла, а также высокая биосовместимость [11, 18–22, 24]. Патологический гидроксилатит, как правило, слабо окристаллизован и нестереометричен из-за наличия значительного количества посторонних ионов натрия, калия, магния, карбоната и кремния, входящих в состав кристаллической решетки или адсорбированных на поверхности апатита [11, 18–22, 24, 25]. Калий, как правило, встречается в сочетании с натрием, при этом хлор и сера не определяются; это указывает на то, что щелочные металлы не присутствуют в виде хлоридов или сульфатов; вероятнее всего, данные элементы включены в решетку гидроксилата с заменой кальция. Магний, при его наличии, составляет в среднем не более 5% от веса основного компонента (кальция) [25]. Замещение ионов в структуре гидроксилата приводит к изменению отношения Ca/P от 1,45 до 2,25 [20] и, как следствие, изменению свойств кристалла. К примеру, замещение кальция ионами магния, изменяя размер кристаллической решетки, стабилизирует аморфную фазу, препятствуя росту гидроксилата [18–20, 24]. Состав патогенных кальцификатов, в том числе наличие замещающих ионов, и их количество варьируют как в кальцификатах мягких тканей, полученных от разных пациентов, так и в пределах одного кальцификата [25]. На основе элементного анализа при картировании кальцинированных образцов, приготовленных на шлифах, были выявлены области кальцификатов с различной яркостью, свидетельствующей о разнородности минерализованной ткани по химическому составу [20, 22, 23, 26] (рис. 1 адаптировано по [23]). Менее яркие области имеют в своем составе более высокое содержание C и S, указывающее

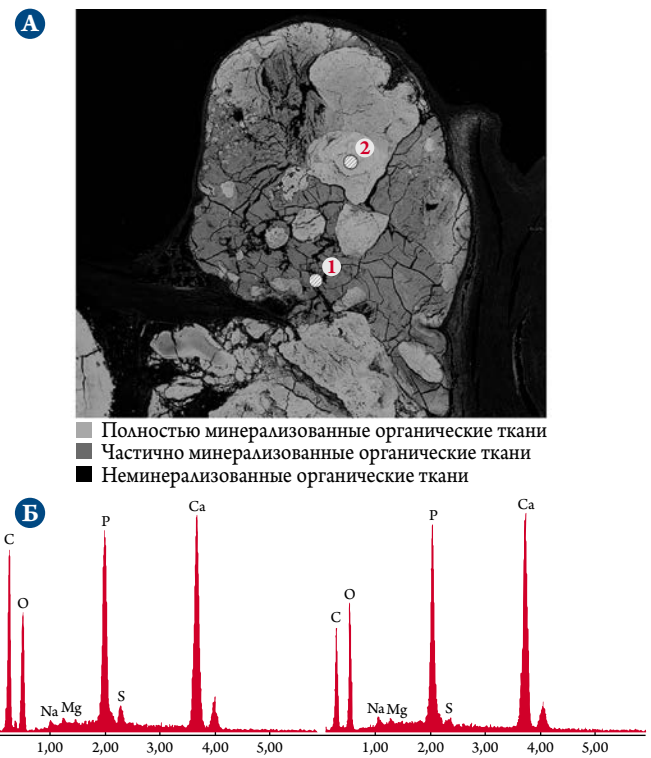


Рис. 1. Сканирующая электронная микроскопия кальцификата клапана сердца: BSE-изображение (А) и EDS-анализ (Б).

Показаны области с различной яркостью и соответствующие данным областям спектры с элементным составом: 1 – область с меньшей яркостью; 2 – более яркая область C – углерод; O – кислород; P – фосфор; Ca – кальций; Na – натрий; Mg – магний; S – сера.

на наличие большого количества органического материала. Напротив, более яркие участки с меньшим содержанием C и S [23] указывают на отсутствие в их составе остатков органического матрикса (коллагеновых и эластических волокон) [22, 23]. Более яркие участки по рентгенологической плотности приближены к кости и определяются в центре кальцификатов [26]. Данные факты свидетельствуют о постепенном процессе минерализации с разрушением и замещением биологического матрикса, которое происходит от центра кристалла кнаружи [23].

Химическая стабильность кальцификатов детерминирована кальций-фосфорным балансом и определяется длительностью патологического процесса. Методом элементного картирования доказано и подтверждено стереохимически, что кальцификаты имеют в своем составе смесь фосфатов кальция с различным соотношением Ca/P: гидроксилатит (Ca/P=1,67), октакальциевый фосфат (Ca/P=1,33) и дикальцевый фосфат дигидрат (брушит с отношением Ca/P=1). Несмотря на то что аморфный кальций, для которого отношение Ca/P определяется в диапазоне 1,2–2,2, не выявлен, авторы не исключают его наличие в кальцификатах биопротезов и естественных клапанов сердца [11, 18–20, 27, 28]. По своей природе аморфный кальций является нестабильной фазой, может

образовываться спонтанно в растворах, перенасыщенных фосфатами кальция, вне зависимости от присутствия ингибиторов кальцификации и также спонтанно растворяться под действием регуляторов кальций-фосфорного обмена [28]. Выявлены различия по составу и отношению Са/Р между остеогенными и дистрофическими кальцификатами. Остеогенные кальцификаты отличаются от дистрофических большей концентрацией Са и Р относительно остальных элементов [10, 15, 16]. Для остеогенных кальцификатов, полученных в эксперименте *in vitro*, характерно отношение Са/Р – 1,67, для дистрофических кальцификатов отношение Са/Р – 2,0, что также свидетельствует о присутствии различных фосфатов кальция, от аморфного до гидроксилapatита [16]. В ряде исследований показано, что изначально формируется менее стабильный фосфат кальция, а именно дикальциевый фосфат-дигидрат. В растворе с физиологическим рН – 7,4 происходит быстрый гидролиз дикальциевого фосфат-дигидрата в более устойчивую фазу фосфата кальция – октакальциевый фосфат и впоследствии в гидроксилapatит, который является термодинамически более стабильной фазой фосфата кальция в условиях с физиологическим рН. Доказано, что соотношение данных фосфатов кальция в структуре кальцификатов зависит от возраста кристалла: чем старше кристалл, тем в меньшем количестве определяются дикальциевый фосфат-дигидрат и октакальциевый фосфат и в большем количестве – гидроксилapatит [11, 14, 27].

Скорость развития патологической кальцификации *in vivo* определяется клеточно-гуморальными факторами. Сравнительный анализ кальцификатов биопротезов и естественных клапанов показал больший коэффициент Са/Р в естественных клапанах. Это свидетельствует о преимущественном содержании гидроксилapatита, а также о более длительном сроке формирования и развития кристалла, чем в биопротезах, где соотношение Са/Р ниже, что указывает на наличие в большей степени предшественников гидроксилapatита. Более медленный процесс кальцификации естественных клапанов сердца объясняется содержанием в тканях ингибиторов данного процесса, например, остеопонтина [5, 11, 12].

Однако, несмотря на различные данные по составу кальцификатов для различных элементов ССС, авторы сходятся во мнении, что кальцификаты, полученные в экспериментах *in vivo* при подкожной имплантации биоматериала животным, а также в экспериментах *in vitro*, биохимически и морфологически аналогичны таковым для сосудов, естественных клапанов сердца, а также биопротезов клапанов сердца, имплантируемых ортотопически в экспериментальных или клинических условиях [11, 23, 27–29]. В связи с этим помимо анализа химического состава кальцификатов не менее информативным является их морфологический анализ.

Структурные особенности кальцификатов

Кристаллы фосфатов кальция в кальцинированных биопротезах, естественных клапанах сердца и сосудах могут иметь полусферическую, сферическую, игольчатую и пластинчатую формы [11, 12, 14, 20, 30, 31] (рис. 2 адаптировано по [31]).

Морфологические особенности кальцификатов являются следствием различного элементного состава. В структуре кальцификата гидроксилapatит представлен мелкими кристаллами гексагональной формы [12, 31] (менее 5 мкм), октакальциевый фосфат – кристаллами пластинчатой формы (5–20 мкм), дикальциевый фосфат-дигидрат представлен более массивными пластинами (>20 мкм) [11, 20] (рис. 3 адаптировано по [11]). Аморфный фосфат кальция может быть представлен сферическими частицами диаметром 20–200 нм, которые со временем способны трансформироваться в волокнистые структуры. Выявление кристаллов всех форм в пределах массивного кальцификата подтверждает гипотезу о гидролитических процессах при формировании патологического кальцификата [28].

Следует также отметить, что замещение фосфат-ионов карбонат-ионами приводит к уменьшению размера кристаллов и степени его кристалличности, а с увеличением степени замещения силикатными ионами изменяется форма кристаллов с равноосной на игольчатую [19]. При этом размер кристаллов в процессе созревания увеличивается от 60 нм до 100 мкм и более [20, 21].

Помимо различий элементного состава, морфология кальцификатов зависит от контакта с окружающими тканями. Д. Э. Пухов и соавт. отметили морфологические особенности кальцификатов в зависимости от вовлеченности в процесс кальцификации различных слоев сосудистой стенки [30]. При кальцификации фиброзной покрышки (соединительнотканый каркас атеросклеротической бляшки, отделяющий липидное ядро от внутреннего просвета сосуда) кальцификаты имеют слоистую пластинчатую структуру. Вероятно, подобная морфология определена изначальным расположением кальцификатов вдоль упорядоченно расположенных волокон коллагена, с последующим укрупнением, объединением в единый конгломерат и замещением самого коллагена на начальном этапе образования сплошных отложений фосфатов кальция. В атероматозных очагах кальцификаты имеют монолитное строение игольчатой или пластинчатой формы, типичной для кристаллов холестерина, с резкой границей, вдоль которой находятся сферические частицы диаметром до 500 нм. Кальцификатам тромбов свойственно рыхлое сложение с сохранением в их структуре клеточных элементов. На границе кальцификата, обращенного в просвет артерии, также определяются сферические частицы диаметром менее 60 нм [30].

Отдельный интерес вызывает минерализация ткани в виде сферических частиц, локализованная вблизи круп-

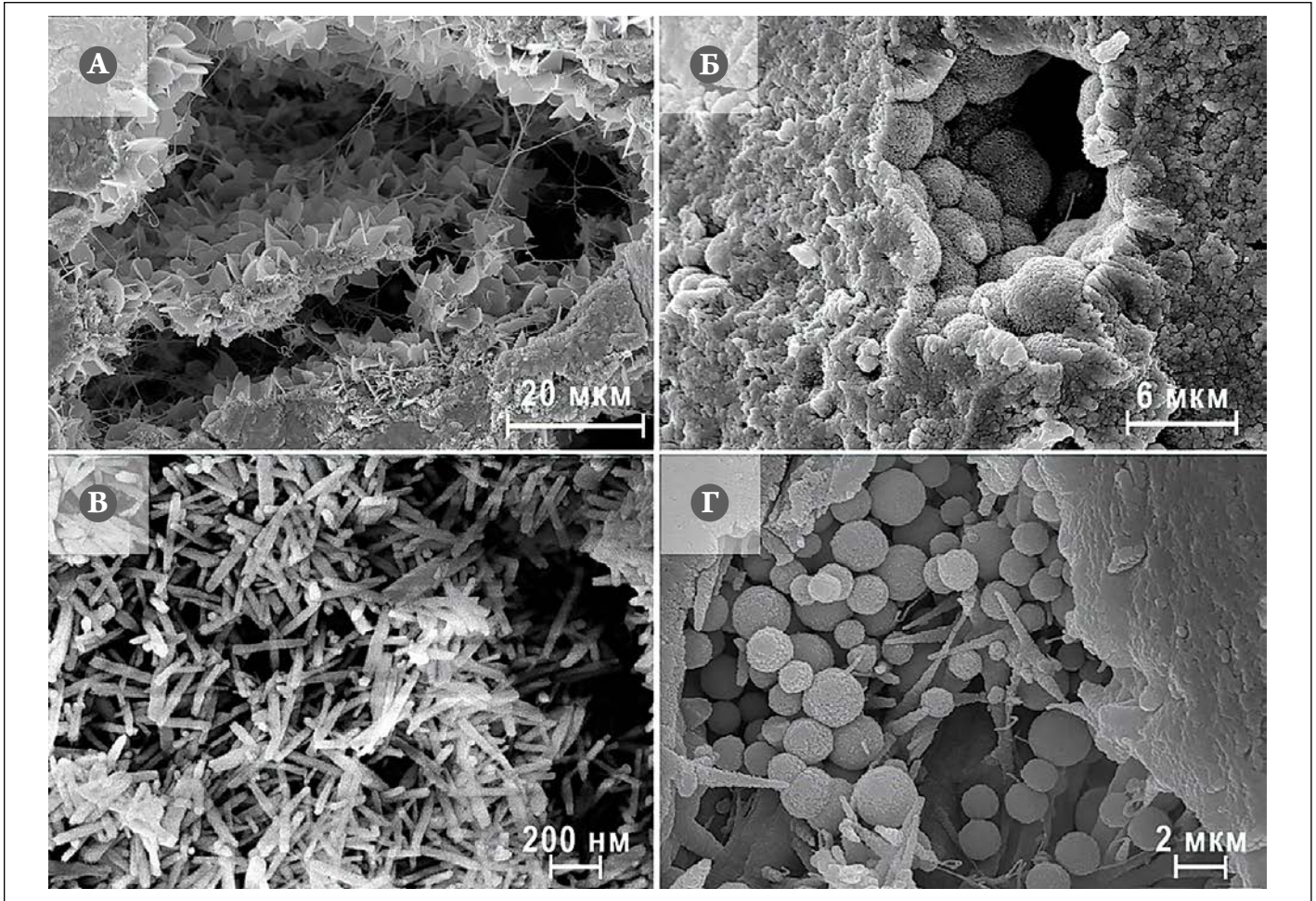


Рис. 2. Формы кристаллов фосфатов кальция, выявленные в клапанах сердца.

А – пластинчатые, Б – полусферические, В – игольчатые, Г – сферические.

ных конгломератов кальция. Данные участки определяются как минерал-дефицитные, что свидетельствует о наличии органического компонента [22–24, 30]. Следует отметить, что сферические частицы выявлены в 80% некальцинированных АК, при наличии кальцификации другой части ССС, и в 46% в отсутствие кальцификации ССС [32]. Данные частицы не только содержатся на поверхности, но и внедрены в массив кальцификата. Существует две теории происхождения сферических частиц: рассматрива-

ющие их как самопроизвольно воспроизводящиеся формы жизни, так называемые нанобактерии, или результат физико-химического явления, не имеющего отношения к живому организму, – наноны, кальцинирующиеся частицы [22, 23, 33]. Показано, что данные частицы не имеют РНК и метаболической активности, но ассоциированы с альбумином и фетуином-А в минералопротеиновый комплекс. Это позволяет предполагать, что данные частицы не что иное, как минерализованные наночастицы белка

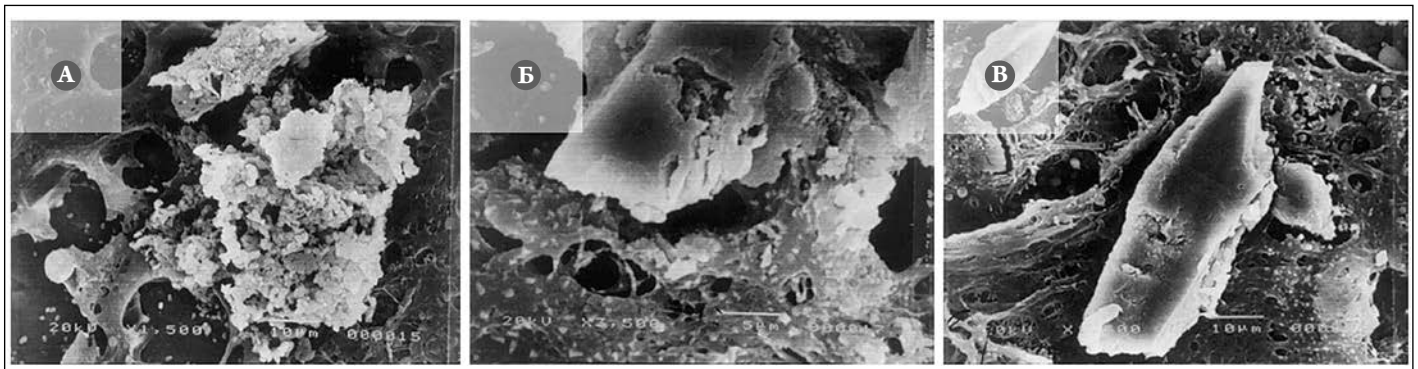


Рис. 3. Кальцификат эксплантированного биопротеза клапана сердца, изготовленного из аортального комплекса свиньи, представлен кристаллами гидроксилapatита (А), октакальциевого фосфата (Б) и дикальциевого фосфат-дигидрата (В).

и окисленных липидов [23]. Сферические частицы производят дифракционные картины, характерные для высококристаллических материалов, что отличает их от костного гидроксилатапата и кальцификата, рядом с которым они находятся. Методом элементного анализа выявлено, что в состав сферических частиц входят Са, Р и Mg [10, 32, 34]. Размеры сферических частиц заметно варьируют в диапазоне от 60 до 100 нм и имеют прямую зависимость от степени кальцификации. Авторы, указывающие размеры частиц менее 100 нм, причисляют их к матричным везикулам, которые образуются клетками в процессе остеогенеза или апоптоза. В настоящее время матричным везикулам отводится ведущая роль в формировании костной ткани и инициации патологической минерализации мягких тканей. Однако отмечено, что сферические частицы к центру массива кальцификата проявляют тенденцию к слиянию и укрупнению; это подвергает сомнению теорию, причисляющую их к матричным везикулам [22, 32, 34]. Вблизи сферических частиц выявлены ДНК-связывающие белки, участвующие в дифференциации остеобластов (Runx2, Sp7, Osterix) [32]. Таким образом, остается непонятной роль сферических частиц в процессе кальцификации, способствуют ли они остеобластической трансдифференцировке интерстициальных клеток, фибробластов и миофибробластов, или, наоборот, факторы дифференцировки приводят к накоплению данных частиц в ткани.

Сферические частицы выявлены не только в мягких тканях организма, но и в крови. Существует мнение, что данные частицы являются неотъемлемой частью процесса кальцификации мягких тканей организма, однако данную теорию ставит под сомнение то, что образующиеся в крови сферические частицы имеют низкую вероятность прохождения в стенку артерии из-за размеров, значительно больших, чем у ионов кальция и фосфатов. Таким образом, формирование сферических частиц в крови снижает концентрацию свободных ионов фосфата и кальция, уменьшая перенасыщение данными ионами жидкости, которая диффундирует в толщу стенок артерий или клапанов, контактируя со сформировавшимся депозитом кальция [14]. В эксперименте *in vitro* и *in vivo* показано, что искусственно созданные кальций-фосфатные бионы, аналогичные сферическим частицам, выявленным в кальцинированных тканях и крови, не способны вызывать кальцификацию свиного и бычьего перикарда, консервированного глутаровым альдегидом, в экспериментах *in vitro*, а также кальцификацию брюшной аорты крыс в экспериментах *in vivo* [35]. Однако отмечено их токсическое воздействие на эндотелий, что определяет их патогенность, поскольку дисфункция эндотелия признана одним из главных звеньев в развитии атеросклероза [33]. Таким образом, можно предположить, что сферические частицы являются триггером патологической кальцификации мягких тканей.

Взаимосвязь морфологии кристаллов фосфатов кальция с элементным составом, а также процентное соотношение количества зрелого гидроксилатапата и его предшественников в составе кальцификата в зависимости от сроков формирования дают основание предполагать, что одним из основных факторов процесса кальцификации элементов ССС и их заменителей являются физико-химические параметры внутренней среды организма, а именно факторы реципиента, изменяющиеся в процессе кальцификации, ускоряющие или замедляющие ее.

Локализация кальцификатов

По расположению центра кальцификата относительно поверхности биологического материала принято деление кальцификации на внутреннюю и внешнюю. По данным литературы, внешняя кальцификация встречается гораздо реже, чем внутренняя. Однако оба вида кальцификации наблюдаются как при клинических исследованиях, так и при моделировании кальцификации *in vitro* [12].

Отмечено, что внешние кальцификаты не распространяются глубоко под поверхность биоматериала, не имеют морфологического подобия и локализационной связи с внутренними кальцификатами. При изучении естественных клапанов сердца внешняя кальцификация отмечена на участках с поврежденным эндотелием и развитым воспалительным процессом, подобным процессу формирования атеросклеротической бляшки [22]. В случае АК и митрального клапана внешняя кальцификация, как правило, локализована со стороны фиброзного слоя [15, 22, 24, 36], клетки которого, по мнению ряда ученых, генетически более склонны к кальцификации [17]. В случае сосудов внешней кальцификации подвержены зоны тромбообразования и кровоизлияния [30]. Что касается биопротезов, лишенных эндотелиального слоя, внешнюю кальцификацию связывают с гибелью клеток реципиента, адгезированных на биоматериале [29], а также с кальцификацией бактериальных вегетаций [6].

Внутренние кальцификаты, как правило, более крупного размера относительно внешних, при этом ядро кальцификата расположено в толще ткани [22]. Внутренние кальцификаты отмечены преимущественно на границе спонгиозного с фиброзным или желудочковым слоями клапанов [10, 12]. На начальном этапе формирования кальцификаты определяют как мелкогранулярные частицы фосфата кальция, локализованные как внутри, так и на поверхности коллагеновых и эластических волокон, в межфибрилярном пространстве, реже в клетках, в том числе в ядрах, органеллах и дебрисе [12]. Ориентация кальцификатов по направлению биологического матрикса может быть опосредована наличием отрицательно заряженных функциональных групп аминокислот, формирующих белки внеклеточного матрикса [37]. В процессе роста наблюдаются укрупнение и объединение нескольких каль-

цификатов в единый конгломерат, который может достигать внешних поверхностей в виде прорывов [20, 22, 26].

В случае естественных клапанов сердца и биопротезов помимо внутренней и внешней локализации кальцификатов выделяют области, в которых кальцификация встречается чаще. В основном кальцификаты ассоциированы с зонами повышенного напряжения, которое испытывают ткани во время работы клапана [6, 23, 26] (рис. 4 адаптировано по [26]). Подобные закономерности описаны как в клинических исследованиях, так и в исследованиях *in vivo* и *in vitro*. В областях с повышенным напряжением можно наблюдать деструкцию биологического матрикса с образованием ниш, в которых впоследствии происходит высокая концентрация внеклеточной жидкости с последующим осаждением фосфатов кальция [23].

В пользу взаимосвязи напряженно-деформированного состояния биоматериала и развития патологической кальцификации свидетельствует и общее распределение приобретенных пороков клапанов сердца: 98,8% приходится на левые отделы сердца, которые подвергаются существенно большим нагрузкам [38]. Подобная закономерность выявлена W. Flamend и соавт. и для биопротезов клапанов сердца при ортотопической имплантации овцам. Было отмечено, что биопротезы в митральной позиции подвержены кальцификации в большей степени, чем в трикуспидальной [39].

За жизненный цикл створки клапана открываются и закрываются $3 \cdot 10^9$ раз. При каждом закрытии и открытии

клапана створки подвергаются напряжению изгиба, сдвига, растяжения и сжатия. Наибольшее напряжение скапливается в комиссуральной зоне, зоне кооптации, в куполе и основании створок [4, 27]. Аналогичная закономерность отмечена для естественных клапанов сердца, так и для биопротезов [10, 22, 40]. В перикардальных биопротезах Perimount и Trilogy после 5 мес имплантации в ортотопическую позицию овцам кальцификации подвержены в основном комиссуральная зона, в меньшей степени купол створок, основание и в незначительной степени свободный край створок [41]. Подобная закономерность расположения кальцификатов отмечена и для ряда других биопротезов, изготовленных как из перикарда, так и из АК свиньи [39]. Кроме того, в биологических протезах, удаленных по причине дисфункций, не связанных с кальцификацией, на ультраструктурном уровне кальцификаты были выявлены в комиссуральной зоне [42]. Методом компьютерной томографии при обследовании кандидатов для транскатетерной имплантации биопротезов также отмечено расположение кальцификатов вдоль зон повышенного напряжения. Анализ процесса кальцификации естественного клапана в динамике, со сроком наблюдения 3 года показал, что отдельные кальцификаты, расположенные по линии повышенного напряжения, со временем имеют тенденцию к росту и объединению в единые конгломераты, дугообразной формы, расположенные вдоль линии кооптации, и радиальной по основанию створок [26].

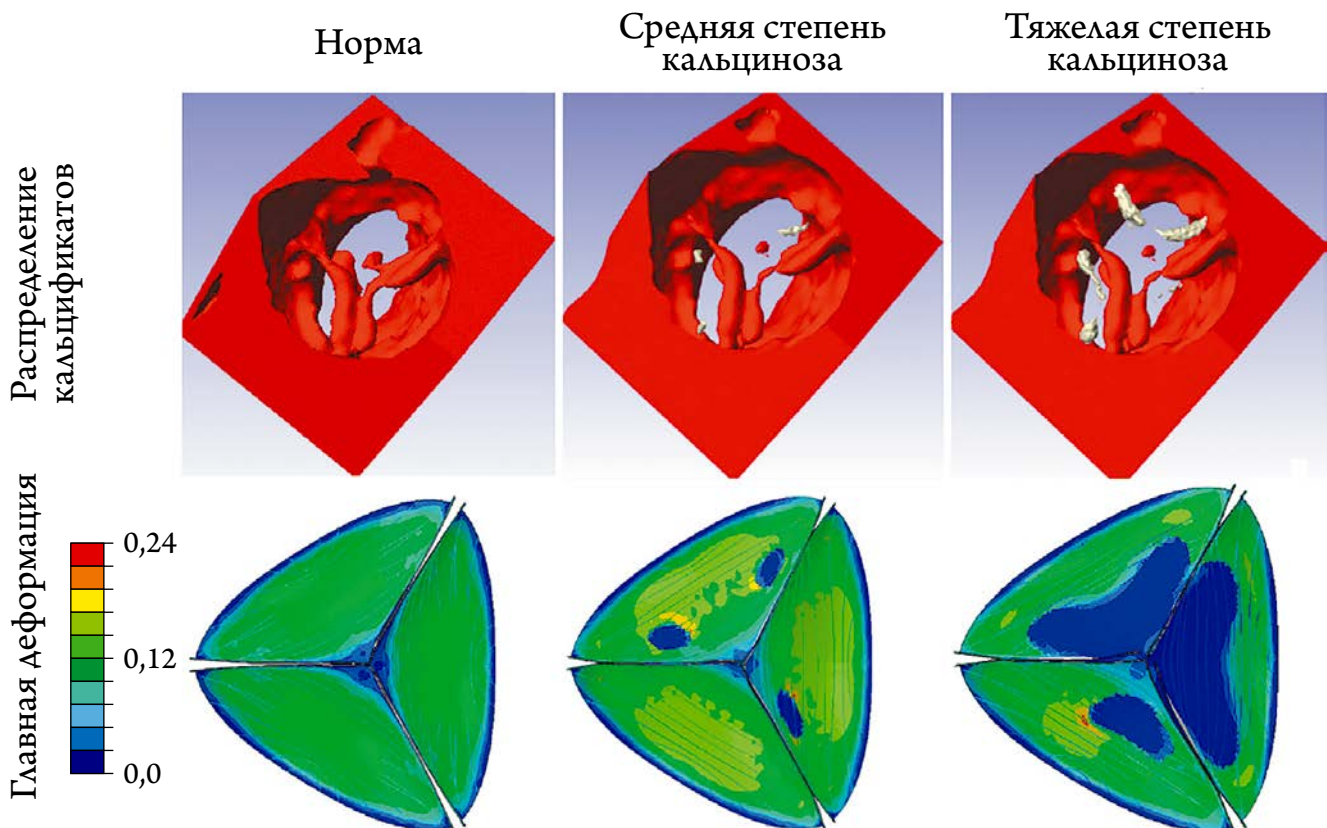


Рис. 4. Распределение патологических кальцификатов и главной деформации в створках аортального клапана.

С целью оценки связи между механическим напряжением и кальцификацией отдельный интерес представляет изучение двустворчатых АК, создающих существенно бóльшую турбулентность кровотока, и, как следствие, бóльшее напряжение сдвига, оказывающее существенное влияние на напряженно-деформированное состояние створок клапана [43]. Патологические двустворчатые АК, в отличие от трехстворчатых, более подвержены дегенерации с тяжелой формой кальцификации [23, 44] не только створок, но и синусов Вальсальвы со стенкой аорты [23]. В свою очередь, R. Halevi и соавт. выявили различия в кальцификации створок в пределах одного клапана, отметив, что некоронарная створка АК в большей степени подвержена кальцификации, чем левая и правая коронарные створки, при этом минимальная кальцификация выявлена в правой коронарной створке [26]. Данные факты также могут быть связаны с перераспределением нагрузки и появлением зон повышенного напряжения в результате взаимодействия клапанного аппарата с потоком крови.

В ряде исследований кальцификацию ускоряли путем имитации режима механического нагружения. Процесс кальцификации биопротеза *in vitro* был значительно ускорен при моделировании пульсирующего кровотока с использованием в эксперименте пульс-дубликатора. В данных экспериментах выявлена тотальная кальцификация биопротезов после $19 \cdot 10^6$ циклов с учетом 300 циклов в минуту и подтверждена идентичность кальцификатов биопротезов, полученных в естественных условиях и в эксперименте *in vitro* [10, 12]. Кроме того, получена кальцификация естественных створок АК свиньи *in vitro* через 7 дней культивирования в остеогенной среде при 15% циклическом растяжении, принятом в качестве патологических условий [17]. Повышение механического напряжения ускоряло процесс кальцификации в эксперименте *in vitro* на культуре интерстициальных клеток [45].

Представленные факты послужили развитию гипотезы о механическом напряжении как о факторе кальцификации. Однако существуют работы, в которых показано хаотичное расположение кальцификатов без привязки к зонам повышенного напряжения [24]. И исходя из того, что морфологические изменения ткани при подкожной имплантации аналогичны изменениям, наблюдаемым при кальцификации *in vivo*, очевидно, что динамическое напряжение способствует развитию кальцификации, но не является ее первопричиной [6].

Вовлеченность тканей различной видовой и тканевой принадлежности в процесс кальцификации

Изучение процесса кальцификации в рамках выбора оптимального материала в целях производства биологических протезов для сердечно-сосудистой хирургии име-

ет многолетнюю историю. Исследования доказывают различную активность материалов, используемых при производстве биопротезов клапанов сердца, в процессе кальцификации в зависимости от видовой и тканевой принадлежности. В эксперименте на крысах при использовании модели подкожной имплантации доказано, что аорта свиньи, консервированная диглицидиловым эфиром этиленгликоля (ДЭЭ), более подвержена кальцификации, чем створки АК свиньи и бычий перикард, консервированные ДЭЭ [46]. В экспериментальных работах отмечено также, что бычий перикард, консервированный глутаровым альдегидом, в отличие от свиного и лошадиного, менее подвержен кальцификации [47]. Данная тенденция прослеживается и при имплантации биологических протезов, консервированных глутаровым альдегидом, в ортотопическую позицию различным животным. На примере биопротеза Carpentier-Edwards S. A. V. при имплантации в ортотопическую позицию свиньям J. L. Honge и соавт. [40] доказали, что при наличии стенки аорты в конструкции биопротеза она более подвержена кальцификации, чем створчатый аппарат. Weber и соавт. выявили кальций в области аорты в 6 из 10 биопротезов Mosaic компании «Medtronic», имплантированных в митральную позицию свиньям сроком на 20 недель [40]. Подобные результаты получены и на других видах биопротезов при использовании модели ортотопической имплантации овцам, где также показана большая степень кальцификации биопротезов, изготовленных из АК свиньи, при сравнении с перикардальными биопротезами [39]. Данные по расположению кальцификатов, полученных в экспериментах на животных, согласуются с результатами клинических исследований по кальцификации биопротезов [40].

Причины различной степени кальцификации материалов в зависимости от тканевой и видовой специфичности до конца не изучены. Существует ряд работ, описывающих органический матрикс (коллагеновые и эластические волокна) как основной субстрат кальцификации [37, 48] с различной степенью вовлеченности в патологический процесс. Таким образом, различное соотношение коллагеновых и эластических волокон в стенке аорты, сосудов, створках клапана сердца и перикарде может влиять на степень их кальцификации. Для разработчиков заменителей элементов ССС полученные знания являются основой выбора биологического материала, способа его консервации и дополнительной модификации.

Заключение

Анализ результатов экспериментальных и клинических исследований, представленных в настоящей работе, отражает большое количество попыток объяснить механизм патологической кальцификации. Однако любая

теория, основанная на одном конкретном факторе, рассматриваемом в качестве инициатора кальцификации, не может в полной мере раскрыть суть данного патологического процесса. Таким образом, очевидно, что патологическая кальцификация является сложным динамическим процессом, захватывающим биомеханические, биохимические, иммунологические, генетические и другие

факторы организма. Более конкретное представление теории, учитывающей многофакторность данного процесса, сводится к возникновению центров нуклеации в результате локальных микроразрушений окружающих тканей и гибели клеток на фоне общего биохимического дисбаланса, при этом скорость кальцификации обусловлена концентрацией механического напряжения.

Сведения об авторах:

ФГБНУ «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово

Севостьянова В. В. – к. м. н., н. с. лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии.

Лаборатория новых биоматериалов отдела экспериментальной и клинической кардиологии

Глушкова Т. В. – к. биол. н., н. с. лаборатории.

Клышников К. Ю. – н. с. лаборатории.

Овчаренко Е. А. – к. техн. н., зав. лабораторией.

E-mail: bio.tvg@mail.ru

Information about the autor:

Research Institute for Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia

Laboratory of Novel Biomaterials, the Department of Experimental and Clinical Cardiology

Tatyana V. Glushkova – PhD.

E-mail: bio.tvg@mail.ru

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- d'Arcy J. L., Prendergast B. D., Chambers J. B. et al. Valvular heart disease: the next cardiac epidemic. *Heart* 2011;97 (2):91–93. DOI: 10.1136/hrt.2010.205096.
- Ghaisas N. K., Foley J. B., O'Brian D. S. et al. Adhesion molecules in nonrheumatic aortic valve disease: endothelial expression, serum levels and effects of valve replacement. *J Am Coll Cardiol* 2000;36 (7):2257–2262.
- Wallby L., Janerot-Sjoberg B., Steffensen T., Broqvist M. T-lymphocyte infiltration in non-rheumatic aortic stenosis: a comparative descriptive study between tricuspid and bicuspid aortic valves. *Heart* 2002;88 (4):348–351.
- New S. E., Aikawa E. Molecular imaging insights into early inflammatory stages of arterial and aortic valve calcification. *Circ Res* 2011;108 (11):1381–1391. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.110.234146.
- Farzaneh-Far A., Proudfoot D., Shanahan C., Weissberg P. L. Vascular and valvar calcification: recent advances. *Heart* 2001;85:13–17. DOI:10.1136/heart.85.1.13
- Schoen F. J., Levy R. J. Calcification of Tissue Heart Valve Substitutes: Progress Toward Understanding and Prevention. *Ann Thorac Surg* 2005;79:1072–1080. DOI:10.1016/j.athoracsur.2004.06.033
- Sturla F., Ronzoni M., Vitali M. et al. Impact of different aortic valve calcification patterns on the outcome of transcatheter aortic valve implantation: A finite element study. *J Biomech* 2016;49 (12):2520–2530. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2016.03.036.
- Fujita B., Kütting M., Seiffert M. et al. Calcium Distribution Patterns of the Aortic Valve as a Risk Factor for the Need of Permanent Pacemaker Implantation After Transcatheter Aortic Valve Implantation. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2016;17 (12):1385–1393. DOI: 10.1093/ehjci/jev343
- Harbaoui B., Montoy M., Charles P. et al. Aorta calcification burden: Towards an integrative predictor of cardiac outcome after transcatheter aortic valve implantation. *Atherosclerosis* 2016;246:161–168. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.01.013.
- 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. DOI: 10.1016/j.semcdb.2015.09.004.
- Mikroulis D., Mavrilas D., Kapelos J. et al. Physicochemical and microscopical study of calcific deposits from natural and bioprosthetic heart valves. Comparison and implications for mineralization mechanism. *J Mater Sci Mater Med* 2002;13:885–889.
- Pettenazzo E., Deiwick M., Thiene G. et al. Dynamic in vitro calcification of bioprosthetic porcine valves evidence of apatite crystallization. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 2001;121 (3):500–509. DOI: 10.1067/j.mtc.2001.112464
- Kim K. M., Herrera G. A., Battarbee H. D. Role of glutaraldehyde in calcification of porcine aortic valve fibroblasts [see comments]. *Am J Pathol* 1999;154 (3):843–852. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65331-X
- Grases F., Sohnel O., Zelenkova M. Ultrafine Structure of Human Aortic Valve Calcific Deposits. *J Cytol Histol* 2014;5 (2):214. DOI.org/10.4172/2157-7099.1000214
- Mohler III E. R., Gannon F., Reynolds C. et al. Bone Formation and Inflammation in Cardiac Valves. *Circulation* 2001;103 (11):1522–1528.
- Chen J., Peacock J. R., Branch J., David Merryman W. Biophysical analysis of dystrophic and osteogenic models of valvular calcification. *J Biomech Eng* 2015;137 (2):020903. DOI: 10.1115/1.4029115.
- Balachandran K., Sucusky P., Jo H., Yoganathan A. P. Elevated Cyclic Stretch Induces Aortic Valve Calcification in a Bone Morphogenic Protein-Dependent Manner. *Am J Pathol* 2010;177 (1):49–57. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090631
- Titov L. T., Larionov P. M., Shhukin V. S., Zajkovskij V. I. Mehanizm mineralizacii serdecnyh klapanov. Poverhnost'. Rentgenovskie, sinhrotronnye i nejtronnye issledovaniya 2001;3:74–79. Russian (Титов Л. Т., Ларионов П. М., Щукин В. С., Зайковский В. И. Механизм минерализации сердечных клапанов. Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования 2001;3:74–79).
- Veresov A. G., Putljev V. I., Tret'jakov Ju. D. Himija neorganicheskikh biomaterialov na osnove fosfatov kal'cija. *Ros him zh* 2004; XLVIII

- (4):52–64. Russian (Вересов А. Г., Пуляев В. И., Третьяков Ю. Д. Химия неорганических биоматериалов на основе фосфатов кальция. *Рос хим жур* 2004; XLVIII (4):52–64).
20. Delogne C., Lawford P. V., Habesch S. M., Carolan V. A. Characterization of the calcification of cardiac valve bioprostheses by environmental scanning electron microscopy and vibrational spectroscopy. *J Microscopy* 2007;228 (1):62–77. DOI: 10.1111/j.1365-2818.2007.01824.x
 21. Lamanova L. M. Tkanevaja kal'cifikacija v serdečno-sosudistoj sisteme. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta* 2010;337:194–197. Russian (Ламанова Л. М. Тканевая кальцификация в сердечно-сосудистой системе. *Вестник Томского государственного университета* 2010;337:194–197).
 22. Puhov D. Je., Vasil'ev S. V., Zotov A. S. et al. Mikromorfologija, sostav, osobennosti lokalizacii mineral'nyh otlozhenij stvorok aortal'nyh klapranov po dannym skanirujushhej jelektronnoj mikroskopii i rentgenodifrakcionnogo analiza. *Vestnik Nacional'nogo mediko-hirurgicheskogo Centra im. N. I. Pirogova* 2014;9 (1):23–30. Russian (Пухов Д. Э., Васильев С. В., Зотов А. С. и др. Микроморфология, состав, особенности локализации минеральных отложений створок аортальных клапанов по данным сканирующей электронной микроскопии и рентгенодифракционного анализа. *Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н. И. Пирогова* 2014;9 (1):23–30).
 23. Cottignoli V., Cavarretta E., Salvador L. et al. Morphological and Chemical Study of Pathological Deposits in Human Aortic and Mitral Valve Stenosis: A Biomineralogical Contribution. *Patholog Res Int* 2015;2015:342984. DOI: 10.1155/2015/342984.
 24. Orzechowska S., Wrybel A., Goncerz G. et al. Physicochemical and Micro-Tomographic Characterization of Inorganic Deposits Associated with Aortic Stenosis. *J Heart Valve Dis* 2014;23 (1):40–47.
 25. Prieto R. M., Gomila I., Sühnel O. et al. Study on the structure and composition of aortic valve calcific deposits: Etiological aspects. *J Biophys Chem* 2011;2 (1):19–25. DOI:10.4236/jbpc.2011.21003
 26. Halevi R., Hamdan A., Marom G. et al. Progressive aortic valve calcification: Three-dimensional visualization and biomechanical analysis. *J Biomechanics* 2015;48 (3):489–497; DOI: 10.1016/j.jbiomech.2014.12.004.
 27. Weska R. F., Aimoli C. G., Nogueira G. M. et al. Natural and Prosthetic Heart Valve Calcification: Morphology and Chemical Composition Characterization. *Artif Organs* 2010;34 (4):311–318. DOI: 10.1111/j.1525-1594.2009.00858.x.
 28. Tomazic B. V. Physicochemical principles of cardiovascular calcification. *Z Kardiol* 2001;90 (3):68–80.
 29. Popandopulo A. G., Petrova M. V., Judicikij D. L., Mokrik I. Ju. Mehanizmy kal'cifikacii sosudisto-klapannyh bioprotezov i metody ee izuchenija. *Suchasni medicni tehnologii* 2011;3 (4):313–16. Russian (Поландопуло А. Г., Петрова М. В., Юдицкий Д. Л., Мокрик И. Ю. Механизмы кальцификации сосудисто-клапанных биопротезов и методы ее изучения. *Сучасні медичні технології* 2011;3 (4):313–16).
 30. Puhov D. Je., Vasil'ev S. V., Zotov A. S. et al. Osobennosti lokalizacii i sostav mineral'nyh otlozhenij ateroskleroticheskijh bljashek koronarnykh arterij po dannym skanirujushhej jelektronnoj mikroskopii i rentgenodifrakcionnogo analiza. *Ateroskleroz i dislipidemii* 2014;1:40–49. Russian (Пухов Д. Э., Васильев С. В., Зотов А. С. и др. Особенности локализации и состав минеральных отложений атеросклеротических бляшек коронарных артерий по данным сканирующей электронной микроскопии и рентгенодифракционного анализа. *Атеросклероз и дислипидемии* 2014;1:40–49).
 31. Cottignoli V., Relucanti M., Agrosom G. et al. Biological Niches within Human Calcified Aortic Valves: Towards Understanding of the Pathological Biomineralization Process. *Biomed Res Int* 2015; 2015 DOI: 10.1155/2015/542687.
 32. Bertazzo S., Gentleman E., Cloyd K. L. et al. Nano-analytical electron microscopy reveals fundamental insights into human cardiovascular tissue calcification. *Nature Materials* 2013;12 (6):576–583; DOI: 10.1038/nmat3627.
 33. Kutihin A. G., Velikanova E. A., Glushkova T. V. et al. Shodstvo mineralo-organicheskijh nanochasticej, vydelennyh iz ateroskleroticheskijh, i iskusstvenno sintezirovannyh mineralo-organicheskijh nanochasticej. *Medicina v Kuzbasse* 2015;14 (4):55–66. Russian (Кутихин А. Г., Великанова Е. А., Глушкова Т. В. и др. Сходство минерало-органических наночастиц, выделенных из атеросклеротических, и искусственно синтезированных минерало-органических наночастиц. *Медицина в Кузбассе* 2015;14 (4):55–66).
 34. Bertazzo S., Gentleman E. Aortic valve calcification: a bone of contention. *Eur Heart J* 2016; DOI:10.1093/eurheartj/ehw071
 35. Kutihin A. G., Velikanova E. A., Glushkova T. V. et al. Rol' kal'cij-fosfatnyh bionov v patogeneze ateroskleroza: otsutstvie prjamoj kal'cifikacii tkanej i izmenenija konformacii antikalcificirujushhijh belkov. *Medicinskij al'manah* 2016;1 (41):135–139. Russian (Кутихин А. Г., Великанова Е. А., Глушкова Т. В. и др. Роль кальций-фосфатных бионов в патогенезе атеросклероза: отсутствие прямой кальцификации тканей и изменения конформации антикальцифицирующих белков. *Медицинский альманах* 2016;1 (41):135–139).
 36. Sathyamurthy I., Alex S. Calcific aortic valve disease: Is it another face of atherosclerosis? *Indian Heart J* 2015;67 (5):503–506. DOI: 10.1016/j.ihj.2015.07.033.
 37. Wang Y., Azais T., Robin M. et al. The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite. *Nature Materials* 2012;11 (8):724–733. DOI: 10.1038/nmat3362.
 38. Lung B., Baron G., Butchart E. G. et al. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J* 2003;24 (13):1231–1243.
 39. Flameng W., Meuris B., Yperman J. et al. Factors influencing calcification of cardiac bioprostheses in adolescent sheep. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;132:89–98. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2006.02.036
 40. Honge J. L., Funder J. A., Pedersen T. B. et al. Degenerative processes in bioprosthetic mitral valves in juvenile pigs. *J Cardiothorac Surg* 2011;15 (6):72. DOI:10.1186/1749-8090-6-72.
 41. Flameng W., Meuris B., De V. G. et al. Trilogry pericardial valve: hemodynamic performance and calcification in adolescent sheep. *Ann Thorac Surg* 2008;85 (2):587–592. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2007.09.041.
 42. Bottio T., Thiene G., Pettenazzo E. et al. Hancock II bioprosthesis: A glance at the microscope in mid-long-term explants. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126 (1):99–105.
 43. Stankovic Z., Allen B. D., Garcia J. et al. 4D flow imaging with MRI. *Cardiovasc Diagn Ther* 2014;4 (2):173–192. DOI: 10.3978/j.issn.2223-3652.2014.01.02.
 44. Bouchareb R., Boulanger M., Fournier D. et al. Mechanical strain induces the production of spheroid mineralized microparticles in the aortic valve through a RhoA/ROCK-dependent mechanism. *J Mol Cellular Cardiol* 2014;67:49–59. DOI:10.1016/j.yjmcc.2013.12.009.
 45. Fisher C. I., Chen J., Merryman W. D. Calcific nodule morphogenesis by heart valve interstitial cells is strain dependent. *Biomech Model Mechanobiol* 2013;12:5–17. DOI:10.1007/s10237-012-0377-8
 46. Zhuravleva I. Ju., Glushkova T. V., Veremeev A. V. et al. Primenenie aminodifosfonata dlja profilaktiki kal'cifikacii jepoksiobrabotannyh bioprotezov. *Patologija krovoobrashhenija i kardiohirurgija* 2010;2:18–21. Russian (Журавлева И. Ю., Глушкова Т. В., Веремеев А. В. и др. Применение аминодифосфоната для профилактики кальцификации эпоксиобработанных биопротезов. *Патология кровообращения и кардиохирургия* 2010;2:18–21).
 47. Masumoto H., Watanabe T., Sakai Y. et al. Experimental study of calcification of the xenopericardia. *Kyobu Geka* 2000;53 (6):468–471.
 48. Bailey M. T., Pillarisetti S., Xiao H., Vyavahare N. R. Role of elastin in pathologic calcification of xenograft heart valves. *J Biomed Mater Res A* 2003;66 (1):93–102. DOI: 10.1002/jbm.a.10543.

Поступила 15.01.17 (Received 15.01.17)