

УДК 576.3/.7.056.83:616.126.52/.56

*В.К. Гринь, А.Г. Попандопуло, М.В. Петрова,
И.Ю. Мокрик, Д.Л. Юдицкий*

*ГУ «Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака
НАМН Украины», г. Донецк*

ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИНГ АОРТАЛЬНОГО И ЛЕГОЧНОГО КЛАПАНОВ СЕРДЦА КСЕНОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Тканевой инженеринг подразумевает реконструкцию жизнеспособной ткани с использованием аутологичных клеток, подсаженных на соединительнотканый матрикс. Данное исследование было нацелено на создание биомодифицированных сердечно-сосудистых трансплантатов посредством девитализации соединительнотканного матрикса сердечных клапанов свиней с сохранением их физиологической адгезивности. Полученные в результате эксперимента графты пригодны для заселения клетками и дальнейшей их ревитализации.

Ключевые слова: *тканевой инженеринг, графт, девитализация, адгезия, ревитализация.*

Протезирование сердечных клапанов занимает значительное место в лечении клапанных пороков сердца. Как правило, подобного рода операции имеют место на терминальных стадиях заболеваний в тех случаях, когда пластику пораженных клапанов по тем или иным причинам осуществить невозможно. Одними из главных показаний к протезированию служат грубые изменения клапана (часто с выраженным кальцинозом и фиброзом створок), обуславливающие нарушение системной гемодинамики. На сегодняшний день протезирование аортальных клапанов настолько востребовано, что превалирует над операциями по их пластической реконструкции [1, 2].

Большинство пациентов с протезированными клапанами — это лица с искусственными (механическими) протезами. В то же время механические протезы сердечных клапанов имеют ряд недостатков, включая необходимость пожизненного приема антикоагулянтов, возможность развития тромбоемболических осложнений, протезного эндокардита и острых дисфункций, недолговечность и неспособность к росту [1–3].

В отличие от механических клапанов биологические протезы позволяют избежать антикоагулянтной терапии, которая вызывает поражение печени, обладают

естественной резистентностью к инфекции, имеют хорошие гемодинамические свойства, снижают риск рецидива эндокардита, а кроме того, потенциально способны к ремоделированию в организме реципиента. Способность к ремоделированию особенно важна для детей и пациентов молодого возраста, когда необходимо обеспечить не только поддержание и обновление структуры трансплантата, но и его рост. В настоящее время частота появлений врожденных пороков сердца и сосудов держится на постоянном уровне и составляет около 0,8 % от всех родившихся. Иными словами, ежегодно в мире рождается примерно 100 000 детей с врожденными пороками сердца [1]. В связи с этим не вызывает сомнений необходимость и актуальность дальнейших разработок в области биомоделирования сердечных клапанов.

Биопротезы также не лишены недостатков — достаточно часто отмечается биодеградация клапанов (кальциноз, разрывы створок). Основной причиной подобных процессов считаются клетки донора, попадающие в организм реципиента вместе с трансплантатом и провоцирующие иммунный ответ на HLA антигены [2], а также инициация погибшими клетками кальцификации ткани трансплантата.

© В.К. Гринь, А. Г. Попандопуло, М.В. Петрова, и др., 2011

В связи с этим в последние годы активно разрабатываются методы обработки трансплантатов, обеспечивающие гибель клеток донора (девитализацию). Считается, что такой подход позволит снизить иммунный ответ и будет способствовать повышению долговечности трансплантатов клапанов сердца [1–4]. Кроме того, исключение из процесса репарации донорских клеток в ткани трансплантируемого протеза позволит использовать в качестве основы для биологического трансплантата ксеногенный материал (ксенографт). Это, безусловно, позволит сделать процедуру протезирования сердечных клапанов более доступной.

Увеличение долговечности и самообновление графта также зависят от того, насколько быстро тканеобразующие клетки реципиента проникнут в матрикс донорского клапана, образуют там популяцию и приступят к созданию собственного матрикса [3]. Максимально ускорить этот процесс можно при условии заселения трансплантата аутоклетками реципиента еще на стадии культивирования.

Таким образом, целью данной работы явилась разработка наиболее эффективного метода девитализации ксенографтов, а также последующая оценка их пригодности в качестве каркаса для аутологических клеток реципиента.

Материал и методы. Исследование проводилось с использованием сердечных клапанов 6-месячных свиней (рис. 1, 2), которые прошли соответствующую обработку раствором ЭДТА (Sigma, США) в целях инициации апоптотической гибели клеточной составляющей трансплантата с минимальным разрушающим воздействием на экстрацеллюлярный матрикс.

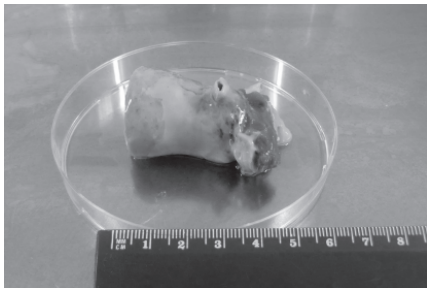


Рис. 1. Аортальный ксенографт

На следующем этапе графты, прошедшие такую обработку, подвергали оценке на сохранность их адгезивных свойств, для чего девитализированные графты инкубировали с фетальными фибробластами человека, выделенными и культивированными в

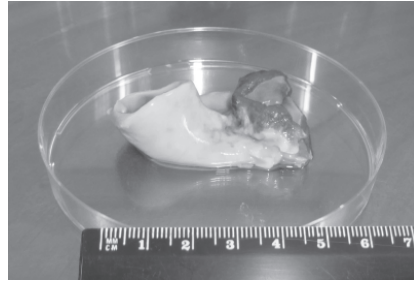


Рис. 2. Легочный ксенографт

соответствии с общепринятой методикой [5], а также предварительно окрашенными витальным флуоресцентным красителем РКН 67 Green (Sigma, США). Степень их адгезии на девитализированной ткани сердечных клапанов оценивали на 5-е сутки инкубации с использованием флуоресцентного микроскопа.

Результаты и их обсуждение. По результатам гистологического анализа образцов, прошедших обработку раствором ЭДТА (рис. 3), наблюдались характерные для апоптоза морфологические изменения в клетках (кариопикноз, кариорексис), а также уменьшалось общее их количество, в то время как клетки контрольных (интактных) образцов, напротив, имели нормальную морфологию, характерную для фибробластов: вытянутые веретенообразной формы клетки с овальным ядром (рис. 4). Это позволило нам считать процесс инициации апоптоза успешно запущенным.

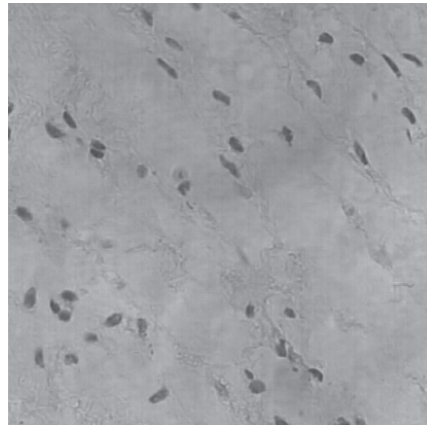


Рис. 3. Морфология клеток ксенографта. Экспериментальный образец, подвергавшийся обработке раствором ЭДТА в течение 2 суток. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$, ок. 10, об. 40

При флуоресцентном анализе будущих трансплантатов выявлено ярко выраженное свечение адгезированных на соединительнотканном матриксе клеток в лучах синевioletового спектра (рис. 5), что свидетельствует о сохранении внеклеточным мат-

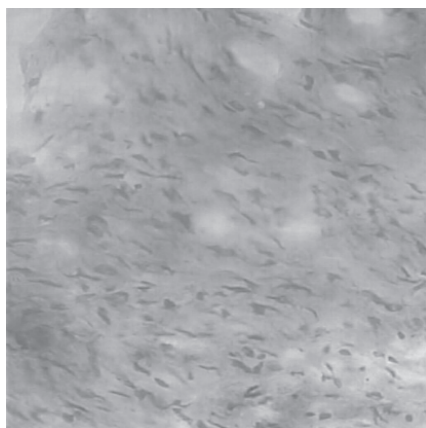


Рис. 4. Морфологія кліток ксенографта.
Контрольний (інтактний) зразок

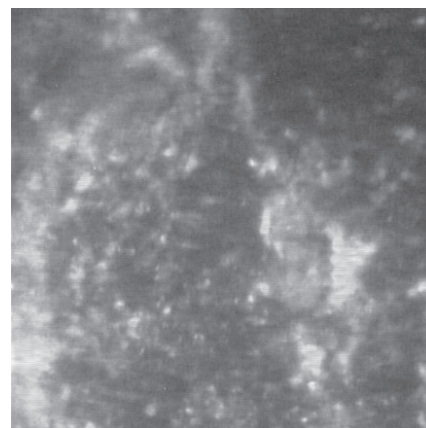


Рис. 5. Флуоресцентний аналіз оброблених ксеногенних графтів, 5-е сутки інкубації с фібробластами. $\times 400$, ок. 10, об. 40

риксом адгезивних свойств и его дальнейшей пригодности для заселения тканеобразующими аутоклетками реципиента.

Выводы

Полученные результаты свидетельствуют об успешности первого этапа заплани-

рованных исследований. Обработка графтов раствором ЭДТА эффективна для достижения девитализации ткани и в то же время достаточно лояльна по отношению к соединительнотканному матриксу, сохраняя его пригодным для дальнейшего заселения клетками в целях ревитализации.

Список литературы

1. *Schmidt D.* Tissue engineering of heart valves using decellularized xenogeneic or polymeric starter matrices / D. Schmidt, U. A. Stock, S. P. Hoerstrup // *Phil. Trans. R. Soc. B.* — 2007. — V. 362. — P. 1505–1512.
2. Изучение биосовместимости трансплантатов клапанов сердца, девитализированных антикальцинозным способом / В. С. Акатов, Р. М. Муратов, И. С. Фадеева [и др.] // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* — 2010. — Т. V, № 2. — С. 36–41.
3. Криосохраненные аллогraftы в реконструктивной хирургии пороков аортального клапана / [Бокерия Л. А., Муратов Р. М., Скопин И. И. и др.]. — М.: НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН, 2007. — 282 с.
4. Подавление кальцификации трансплантатов клапанов сердца путем их девитализации / В. С. Акатов, Н. И. Фесенко, В. В. Соловьев [и др.] // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* — 2010. — Т. V, № 1. — С. 41–46.
5. Влияние факторов культивирования на жизнеспособность фетальных фибробластов человека / А. Г. Попандопуло, Д. Ю. Игнатов, И. О. Слипченко [и др.] // *Вестник неотложной и восстановительной медицины.* — 2003. — Т. 4, № 2. — С. 323–325.

В.К. Гринь, А.Г. Попандопуло, М.В. Петрова, І.Ю. Мокрик, Д.Л. Юдіцький

ТКАНИННИЙ ІНЖЕНЕРІНГ АОРТАЛЬНОГО ТА ЛЕГЕНЕВОГО КЛАПАНІВ СЕРЦЯ КСЕНОГЕННОГО ПОХОДЖЕННЯ

Тканинний інженерінг передбачає реконструкцію життєздатної тканини з використанням аутологічних клітин, підсаджених до сполучнотканинного матриксу. Дане дослідження було спрямовано на виготовлення біомодифікованих серцево-судинних трансплантатів шляхом девіталізації сполучнотканинного матриксу серцевих клапанів серця свиней зі збереженням їх фізіологічної адгезивності. Отримані графти є придатними для заселення клітинами з метою подальшої ревіталізації.

Ключові слова: *тканинний інженерінг, графт, девіталізація, адгезія, ревіталізація.*

V.K. Gryn, A.G. Popandopulo, M.V. Petrova, I.Yu. Mokryk, D.L. Yuditskiy

TISSUE ENGINEERING OF AORTIC AND PULMONARY HEART VALVES OF XENOGENIC NATURE

Tissue engineering involves the reconstitution of viable tissue with the use of autologous cells grown on connective tissue matrix. This research was aimed to produce biomodified cardiovascular graft by devitalization of xenogenic porcine heart valves with preserving their physiological adhesion. Thus, they are suitable for cell colonization and revitalization.

Key words: *tissue engineering, graft, devitalization, adhesion, revitalization.*