

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

*Государственное учреждение “Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В. К. Гусака
НАМН Украины”, 83045, Донецк*

**Донецкий государственный медицинский университет им М. Горького МЗ Украины,
83003 Донецк*

АНАЛИЗ МОРФОЛОГИИ И УПРУГО-ПРОЧНОСТНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНОГО МАТРИКСА СОСУДИСТО-КЛАПАННЫХ БИОПРОТЕЗОВ

Проведено исследование сердечных клапанов 4-6-месячных свиней для получения бесклеточного соединительнотканного каркаса с сохраненной матричной структурой и физико-механическими параметрами для изготовления сосудисто-клапанных биопротезов. По результатам гистологических окрасок допускаем, что физиологическая целостность в ходе децеллюляризации не нарушена. Анализ физико-механических особенностей матрикса показал значительное сохранение им упругости и эластичности, что делает его пригодным для дальнейшего использования в качестве каркаса для протеза.

Ключевые слова: тканевая инженерия, децеллюляризация, ксенографт, экстрацеллюлярный матрикс.

Ежегодно болезни системы кровообращения уносят жизни миллионов людей, лидируя на протяжении последних двух десятилетий среди причин смерти. Все чаще, обсуждая эту ситуацию, специалисты называют ее “эпидемией смертности от сердечно-сосудистых заболеваний конца XX века”. По данным ВОЗ, в 2008 г. в мире от сердечно-сосудистых заболеваний умерло 17,5 млн чел. (30 % всех заболеваний) [10]. Часто единственно возможным вариантом спасения жизни пациента является замена поврежденного участка органа протезом.

В настоящее время для практической кардиохирургии в качестве заменителей используются более 80 моделей искусственных клапанов: как механических, так и биологических. Механические

клапанные протезы обладают неоспоримыми положительными качествами — достаточно высокой долговечностью и удобством имплантации. Однако биологические искусственные клапаны, вне зависимости от своей конструкции, обладают рядом неоспоримых преимуществ по сравнению с ними. Они позволяют избежать некоторых послеоперационных осложнений, имеющих место при использовании механических заменителей клапанов; способны к формированию кровотока, по своей структуре близкого к физиологическому; обладают низкой тромбогенностью, естественной резистентостью к инфекции; менее подвержены риску развития рецидива эндокардита; обладают потенциалом к ремоделированию в организме реципиента [7].

ГУ “Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В. К. Гусака НАМН Украины”

В. К. Гринь — директор института, акад. НАМН Украины

И. Ю. Мокрик — зав. отделением детской кардиохирургии, к.м.н.

Лаборатория клеточного и тканевого культивирования

А. Г. Попандопуло — зав. лаб., д.м.н., профессор (pag.lctc@mail.ru)

М. В. Петрова — биолог

Донецкий государственный медицинский университет им М. Горького МЗ Украины

Д. Л. Юдицкий — клинический ординатор

© В. К. Гринь, М. В. Петрова, А. Г. Попандопуло, И. Ю. Мокрик, Д. Л. Юдицкий, 2014.

К основным недостаткам биопротезов можно отнести недостаточное их количество (если говорить об аллогенном материале), а также ограниченность срока службы, так как долговечность данного вида протезов зависит от возраста пациента, активности процессов дегенерации и кальцификации, приводящих к деструкции ткани [14, 16]. Сам по себе процесс кальцификации может играть положительную роль, например в восстановительной хирургии костных тканей, когда кальцификации подвергаются имплантированные конструкции (штифты, протезы суставов и др.), но в случае кардиоваскулярных трансплантатов это приводит к потере функциональных свойств протезов и необходимости повторных операций [4].

На данный момент точные причины кальцификации биологических протезов неясны. Однако, согласно одной из существующих теорий, причиной кальцификации являются погибшие клетки [12, 15]. Данная теория основана на том факте, что ткань с отмершими в результате некроза клетками подвергается данному процессу быстрее, поскольку погибшие клетки являются необходимым условием, приводящим к локальному изменению концентрации кальция, фосфатов, белков, липидов, ферментов, что вызывает отложение растворимых форм фосфатов кальция и при определенных условиях переход их в нерастворимые [15]. В связи с этим в последние годы активно разрабатываются методы предварительной обработки биологического материала (перед использованием его в качестве трансплантата), обеспечивающей децеллюляризацию донорской ткани.

Важно отметить, что существует два основных пути отмирания клеток тканей и органов животных и человека — апоптоз и некроз. Некроз обычно начинается с повреждения плазматической мембраны, приводящего к нарушению способности клеток сохранять свой ионный гомеостаз. Из-за разрывов плазматической мембраны содержимое цитоплазмы, включая лизосомные энзимы, попадает во внеклеточное пространство, что *in vivo* вызывает значительные повреждения ткани и сопровождается активным воспалительным процессом [12].

В отличие от некроза отмирание клеток путем апоптоза происходит и в физиологических условиях. Апоптоз — запрограммированная клеточная гибель, энергетически зависимый, генетически контролируемый процесс, который запускается специфическими сигналами и избавляет организм от ослабленных, ненужных или поврежденных клеток. Данный тип гибели клетки характеризуется активацией нелизосомных эндогенных эндонуклеаз, которые расщепляют ядерную ДНК на

маленькие фрагменты. Так, в развитии апоптоза выделяют три морфологически различимые стадии: сигнальную (индукторную), эффекторную и стадию деградации (деструкции). Индукторами апоптоза могут быть как внешние (внеклеточные) факторы, так и внутриклеточные сигналы. Сигнал воспринимается рецептором и далее последовательно передается молекулам-посредникам (мессенджерам) различного порядка и достигает ядра, где происходит включение программы клеточного "самоубийства" путем активации летальных и/или репрессии антилетальных генов. В ядре регистрируются первые морфологические признаки апоптоза: конденсация хроматина с формированием его осмиофильных скоплений, прилежащих к ядерной мембране. Позже появляются инвагинации (вдавнения) ядерной мембраны и происходит фрагментация ядра. В основе деградации хроматина лежит ферментативное расщепление ДНК [3, 12]. После реализации этого этапа процесс становится необратимым. Затем наступает межнуклеосомная дезинтеграция ДНК, т. е. разрывы нитей ДНК, находящихся между нуклеосомами. Отделившиеся фрагменты ядра, ограниченные мембраной, называют апоптотическими тельцами. В цитоплазме происходит расширение эндоплазматического ретикулума, конденсация и сморщивание гранул. Клеточная мембрана утрачивает ворсинчатость и образует пузырьвидные вздутия. Клетки округляются и отделяются от субстрата. На поверхности клетки экспрессируются различные молекулы, распознаваемые фагоцитами: фосфосерин, тромбоспондин, десалирированные мембранные гликоконъюгаты, в результате чего *in vivo* происходит поглощение тела клетки, находящейся в состоянии апоптоза, другими клетками (макрофагами и соседними клетками) и ее деградация в окружении лизосом фагоцитарных клеток [3, 12]; причем, как уже упоминалось ранее, данный процесс иммунологически инертен и не сопровождается воспалительной реакцией, а также разрушением ткани [12].

Одним из общепринятых методов децеллюляризации посредством инициации апоптоза является использование бескальциевого раствора этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). Он позволяет избежать повреждения тканевого матрикса в процессе его децеллюляриционной обработки, а также его дегенерации вследствие кальцификации [1]. ЭДТА — хелат, способный связывать ионы кальция, вследствие чего взаимодействие кадгеринов нарушается и физическое соединение клеток в единую ткань ослабляется что приводит к диссоциации клеток. В то же время, согласно данным литературы, более высокие концентрации ЭДТА

способны инициировать процесс апоптоза [5, 11]. Кроме того, являясь хелатором кальция, магния и ряда других ионов металлов, ЭДТА используется для подавления накопления кальция и фосфатов в митохондриях в процессе клеточной гибели.

Помимо децеллюляризации производство долгосрочно функционирующих кардиоваскулярных имплантатов предполагает значительную их схожесть по структуре и функции с естественным клапаном или сосудом, что вполне реально благодаря развитию тканевой инженерии [2, 16]. То есть, для полноценного выполнения своих функций будущей трансплантат, наравне с минимизацией клеточной составляющей донорской ткани, должен обладать неизменной структурой внеклеточного каркаса.

Экстрацеллюлярный матрикс играет роль своего рода динамического соединения с резидентной клеточной популяцией, поддерживая, в то же время, структуру и трехмерную форму соответствующего органа. Помимо роли матрикса в развитии и поддержании гомеостаза он может быть использован в качестве индуктивного скаффолда, способствующего ремоделирующему ответу после хирургической операции. Механизм данного ответа лежит в высвобождении латентных пептидов, являющихся митогенами и хемоаттрактантами для эндогенных стволовых и прогениторных клеток, а также в модуляции врожденного иммунного ответа и обеспечении тканеспецифичных молекулярных стимулов для поддержания фенотипа и функции клеток [13]. Его значение для нормального функционирования органа сложно переоценить. Таким образом, при условии сохранения матриксом его морфо-функциональных свойств, равно как и физико-механических, можно считать его пригодным для дальнейшего использования в качестве каркаса сердечно-сосудистого протеза.

Цель исследования — получение бесклеточного соединительнотканного каркаса сосудисто-клапанного биопротеза с сохраненной матричной структурой, способного к адекватному упруго-прочностному ответу на прогнозируемое физическое воздействие *in vivo*.

Материал и методы. Исследование проводили с использованием сердечных клапанов 4-6-месячных свиней. Забор сердец осуществляли в условиях операционной с выполнением требований “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях” (Страсбург, 18.03.1986) и постановления Первого национального конгресса по биоэтике (Киев, 2001). Клапаны выделяли в стерильных условиях в среднем через 4 часа после

забора сердца. В течение последующих двух суток полученные образцы были подвержены воздействию апоптозвызывающего раствора, в качестве которого использовали раствор ЭДТА (Sigma, США) в концентрации 10 ммоль/л. По истечении указанного времени экспозиции образцы тщательно отмывали в среде с содержанием солей в концентрации близкой к физиологической. Контрольная группа образцов оставалась интактной, не подвергаясь действию апоптозвызывающего раствора.

В дальнейшем полученный материал фиксировали в 10 % растворе забуференного нейтрального формалина в течение 24 часов. После дегидратации материал заливали в высокоочищенный парафин с полимерными добавками (*Richard-Allan Scientific*, США) при температуре не выше 60 °С. Из парафиновых блоков на ротационном микротоме *Shandon Finesse 325 (Thermo Scientific, США)* делали срезы ткани толщиной 5 мкм. Микроскопическое исследование проводили с использованием методики серийных срезов. Срезы ткани помещали на предметные стекла и затем окрашивали по стандартным методикам гематоксилином и эозином, а также по Вирхову (Вергофу) для оценки состояния эластических волокон и производили постановку PAS-реакции с целью исследования состояния коллагеновых волокон. Специфические реакции на компоненты внеклеточного матрикса позволяют, прокрасив волокно, оценить целостность и неизменность химического состава эластического или коллагенового волокна. Изучение препаратов в проходящем свете проводили на исследовательском микроскопе *Olympus AX70* (Япония) с цифровой видеокамерой *Olympus DP50*, соединенной с персональным компьютером.

Соединительная ткань сосудистой стенки представлена рыхлой волокнистой соединительной тканью, а створка клапана — это покрытые эндотелием тонкие фиброзные пластинки из плотной волокнистой соединительной ткани с небольшим количеством клеток. В рыхлой соединительной ткани коллагеновые волокна располагаются в различных направлениях в виде изогнутых, спиралевидно скрученных, округлых или уплощенных тяжей толщиной 1-3 мкм и более [6]. Длина их различна. Внутренняя структура коллагенового волокна определяется фибриллярным белком коллагеном, синтезируемым на рибосомах гранулярной эндоплазматической сети фибробластов, а также углеводным компонентом коллагенового волокна. Именно углеводный компонент, представленный веществом полисахаридной природы, окрашивается в лиловый или лилово-красный цвет.

Эластические волокна по прочности уступают коллагеновым. Форма поперечного разреза эласти-

ческих волокон округлая и уплощенная. В рыхлой волокнистой соединительной ткани они широко анастомозируют друг с другом. Толщина эластических волокон обычно меньше коллагеновых и достигает 1 мкм. В составе эластических волокон различают микрофибриллярный и аморфный компоненты. Зрелые эластические волокна содержат 90 % аморфного компонента эластических белков в центре, а на периферии волокна — микрофибриллы. В отличие от коллагеновых в эластических волокнах нет структур с поперечной исчерченностью [6, 9].

При проведении окраски эластических волокон по Вирхову эластические волокна окрашиваются в черный цвет, ядра клеток — сине-черные; коллаген, фибрин, глия и миелин — в розовый, эритроциты — в оранжево-красный.

Помимо гистологического анализа после децеллюляризации образцы исследовали по прочностным характеристикам. Физико-механические свойства матрикса изучали при помощи установки для измерения прочности и эластичности сосудистой стенки внутренним давлением [1]. При этом проходящий испытание графт крепился на ниппеле диаметром, соответствующем диаметру имплантата. Края сосуда плотно фиксировали нитью. Через вентиль давление воздуха с малой скоростью подачи нагнетали в сосуд до момента его разрыва. В соответствии со значением давления, которое регистрировали при помощи блока аналого-цифрового преобразователя, на экране персонального компьютера строилась диаграмма, отображающая процесс разрыва сосуда в координатах давление/время. Результаты такого рода проверки позволяют сделать предположения касательно того, сохраняет ли внеклеточный матрикс графтов, прошедших девитализирующую обработку, свои упруго-прочностные свойства на достаточном для применения его *in vivo* уровне.

Результаты и их обсуждение. Основываясь на том факте, что апоптоз имеет свои отличительные морфологические признаки как на светооптическом, так и на ультраструктурном уровне [8, 12], было проведено гистологическое исследование тканей образцов, прошедших этап децеллюляризации, а также тканей интактных (контрольных) образцов. При этом в обработанных образцах отмечались упомянутые выше морфологические признаки апоптоза: общее количество клеток снизилось, большинство из них имело выраженные морфологические изменения в ядрах (кариопикноз, кариорексис), что свидетельствует об успешной инициации апоптоза (рис. 1). Клетки контрольных (интактных) образцов имели нормальную морфо-

логию, характерную для фибробластов: вытянутые веретенообразной формы клетки с овальным ядром.

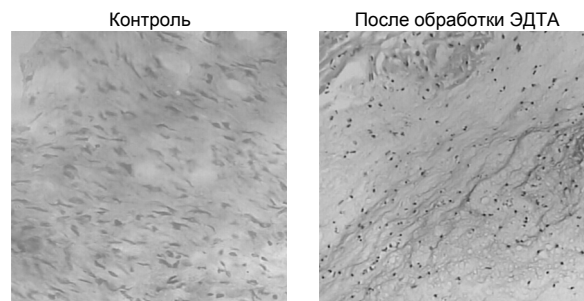


Рис. 1. Гистологический анализ морфологии клеток ксеногraftа (окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$).

Стоит отметить, что выбранный для исследования способ децеллюляризации с применением ЭДТА не позволяет достичь полного удаления погибших клеток, в особенности клеток из толщи матрикса. Очевидно, это связано с тем, что клетки могут мигрировать с поверхности обрабатываемой ткани в ее толщу в результате отрицательного хемотаксиса. Тем не менее, данный вид децеллюляризации индуцирует апоптотическую гибель клеток в трансплантатах, позволяя со временем полностью реализоваться процессу в условиях *in vivo* с участием макрофагов [5].

Согласно результатам гистологического анализа, полученным при специфических окрасках на составляющие экстрацеллюлярного матрикса, коллагеновые и эластиновые волокна сохранили свою структуру после децеллюляризации. В срезах, сделанных из ткани аорты и фиброзного кольца, наблюдалась PAS-позитивная реакция (рис. 2), наиболее интенсивно выраженная в области створки клапана.

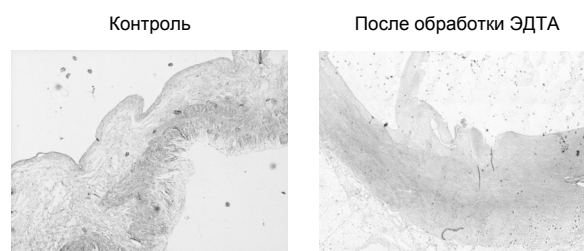


Рис. 2. Результат гистологического анализа внеклеточного матрикса (PAS-реакция на коллаген, $\times 300$).

После обработки эластических волокон по Вирхову участок стенки аорты окрасился в темно-бордовый цвет, в области створки клапана препарат был окрашен в малиновый цвет. Черным цве-

том окрасились собственно эластические волокна (рис. 3).

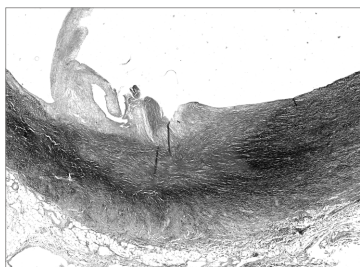


Рис. 3. Результат гистологического анализа внеклеточного матрикса; образец после обработки ЭДТА (окраска по Вирхову на эластин, $\times 300$).

Следует учитывать, что коллагеновые волокна в составе соединительной ткани определяют ее прочность, а эластические — эластичность и растяжимость. Позитивные результаты специфической окраски внеклеточного матрикса дают основание полагать, что его физиологическая целостность в ходе децеллюляризации не нарушена. Матрикс сохраняет свои морфо-функциональные свойства и, следовательно, при условии равного сохранения им физико-механических свойств пригоден для дальнейшего использования в качестве каркаса сердечно-сосудистого протеза.

Согласно предварительным результатам исследования графтов, прошедших этап децеллюляризации на установке для измерения прочности и эластичности сосудистой стенки внутренним давлением [1], физико-механические свойства экстрацеллюлярного матрикса обработанных образцов сохраняются приближенными к таковым контрольных, что свидетельствует о достаточной прочности стенки сосуда для выдерживания внутрисосудистого давления *in vivo*. Так, стенка аорты, прошедшей воздействие раствором ЭДТА по описанной выше схеме, выдерживает давление порядка 115-120 кПа (863-900 мм рт. ст.), в то время как стенка контрольного образца (аорта), оставшегося интактным, выдерживает давление в 180-200 кПа (1350-1500 мм рт. ст.).

Использование трехмерных экстрацеллюлярных тканевых матричных скаффолдов в качестве основы для аутологичных клеток с целью получения протеза сердечного клапана — это возможность решить проблему нехватки донорского материала, ускорить процесс регенерации органа и улучшить качество жизни пациента после трансплантации. Одним из важных условий для этого является получение неповрежденного децеллюлирующими агентами внеклеточного матрикса, сохраняющего свою архитектуру, состав и физические свойства и, как следствие, способного к полноценному выполнению своих физиологических функций.

Список использованной литературы

1. Автономова Л. В., Дергун С. М., Гончарова Г. А. и др. Механические испытания на растяжение и внутреннее давление сосудов имплантантов // Вестник НТУ "ХПИ": Сб. науч. тр. Тематический выпуск "Динамика, прочность машин". — 2009. — № 30. — С. 3-7.
2. Акатов В. С., Муратов Р. М., Фадеева И. С. и др. Изучение биосовместимости трансплантатов клапанов сердца, девитализированных антикальцинозным способом // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2010. — 5, № 2. — С. 36-41.
3. Актуальные проблемы патофизиологии / Под ред. Б. Б. Мороз. — М.: Медицина, 2001. — 422 с.
4. Барбараш Л. С., Барабаш Н. А., Журавлева И. Ю. Биопротезы клапанов сердца: проблемы и перспективы. — Кемерово: Современная отечественная книга, 1994. — 547 с.
5. Бокерия Л. А., Муратов Р. М., Скопин И. И. и др. Криосохраненные аллогraftы в реконструктивной хирургии пороков аортального клапана. — М.: НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН, 2007. — 282 с.
6. Евтушенко С. К., Лисовский Е. В., Евтушенко О. С. Дисплазия соединительной ткани в неврологии и педиатрии: (клиника, диагностика, лечение). — Донецк: ИД Заславский, 2009. — 372 с.
7. Орловский П. И., Гриценко В. В., Юхнев А. Д. и др. Искусственные клапаны сердца / Под ред. Ю. Л. Шевченко. — СПб.: ЗАО "ОЛМА Медиа Групп", 2007. — 448 с.
8. Райс Р. Х., Гуляева Л. Ф. Биологические эффекты токсических соединений: курс лекций. — Новосибирск: Новосиб. гос. ун-т., 2003. — 208 с.
9. Самусев Р. П., Смирнов А. В. Атлас по цитологии, гистологии и эмбриологии. — М.: ООО "Изд-во Оникс", 2006. — 400 с.
10. Сердечно-сосудистые заболевания: Информ. бюл. ВОЗ № 317, март 2013 г. [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/ru/>
11. Таганович А. Д. Биологическая химия: краткий курс лекций для иностранных учащихся стоматфака. — Минск: БГМУ, 2005. — 119 с.
12. Фільченков О. О., Стойка Р. С. Апоптоз і рак: від теорії до практики. — Тернопіль: Укрмед книга, 2006. — 524 с.
13. Badylak S. F., Weiss D. J., Caplan A., Macchiarelli P. Engineered whole organs and complex tissues // Lancet. — 2012. — 379, № 9819. — P. 943-952.
14. Kasimir M., Rieder E., Seebacher G., Nigisch A. Decellularisation does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves // J. Heart Valve Dis. — 2006. — 15, № 2. — P. 278-286.
15. Rosanova I., Michenko B., Zaitsev V. The effect of cells on biomaterials calcification: experiments with diffusion chamber // J. Biomed. Mater. Res. — 1991. — 25. — P. 277-280.

16. Schmidt D., Stock U. A., Hoerstrup S. P. Tissue engineering of heart valves using decellularized xenogeneic or polymeric starter matrices // Philos. Trans. R. Soc. London. B. Biol. Soc. — 2007. — 362. — P. 1505-1512.

Получено 19.12.2013

АНАЛІЗ МОРФОЛОГІЇ ТА ПРУЖНО-МІЦНІСНИХ ПОКАЗНИКІВ ЕКСТРАЦЕЛЮЛЯРНОГО МАТРИКСУ СУДИННО-КЛАПАННИХ БІОПРОТЕЗІВ

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

Державна установа "Інститут невідкладної та відновної хірургії ім. В. К. Гусака НАМН України"
83045 Донецьк

*Донецький державний медичний університет ім. М. Горького МОЗ України

Проведено дослідження серцевих клапанів 4-6-місячних свіней з отримання безклітинного сполучнотканинного каркасу зі збереженою матричною структурою та фізико-механічними параметрами для виготовлення судинно-клапанних біопротезів. Згідно з результатами гістологічних фарбувань припускаємо, що фізіологічну цілісність у ході децелюляризації не порушено. Аналіз фізико-механічних властивостей матриксу показав значне збереження їм пружності та еластичності, що робить його придатним для подальшого використання в якості каркасу для протезу.

THE ANALYSIS OF MORPHOLOGY AND ELASTIC-TENSILE PROPERTIES OF EXTRACELLULAR MATRIX OF VESSEL-VALVULAR BIOLOGICAL PROSTHESES

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

State Institution "V. K. Gusak Institute of Emergency and Reconstructive Surgery NAMS Ukraine",
83045 Donetsk

*M. Gorky Donetsk State Medical University Ministry of Health Ukraine, 83003 Donetsk

Cardiac valves of 4-6-month-old pigs were studied with special reference to obtaining an acellular connective tissue frame with intact matrix and physical-mechanical parameters for making vessel-valvular biological prostheses. The results of histological dyeing showed that decellularization process did not disturb their physiological value. The analysis of physical-mechanical peculiarities of matrix revealed significant retention of its elasticity and flexibility. Therefore, the matrix can be used as a frame of prosthesis