

УДК 611.018:616.12–089

© А. Г. Попандопуло, М. В. Петрова, Д. Л. Юдицкий, 2013

МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНОГО МАТРИКСА ДЕВИТАЛИЗИРОВАННЫХ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ТРАНСПЛАНТАТОВ

А. Г. Попандопуло, М. В. Петрова, Д. Л. Юдицкий

Лаборатория клеточного и тканевого культивирования (зав. – проф. Попандопуло А. Г.), ГУ «Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В. К. Гусака НАМНУ». 83045 Украина, г. Донецк, пр-т Ленинский, 47. E-mail: pmv-07@yandex.ru

MORPHOLOGICAL EXAMINATION OF THE EXTRACELLULAR MATRIX OF DECELLURIZED CARDIOVASCULAR GRAFTS

A. Popandopulo, M. Petrova, D. Yuditskiy

SUMMARY

Our goal was to produce a biomodified cardiovascular graft by decellularisation of the heart valve extracellular matrix. To achieve decellularisation we used a special solution inducing an apoptotic death of the graft cells. After the treatment with decellularizing solution, the graft extracellular matrix preserved the structural integrity and therefore was applicable for further colonization by the recipient's cells to realize the recellularization.

МОРФОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЕКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНОГО МАТРИКСУ ДЕВІТАЛІЗОВАНИХ СЕРЦЕВО- СУДИННИХ ТРАНСПЛАНТАТІВ.

А. Г. Попандопуло, М. В. Петрова, Д. Л. Юдицкий

РЕЗЮМЕ

Проведено дослідження з отримання девіталізованого сполучнотканинного матриксу клапанів серця з метою виготовлення біомодифікованих серцево-судинних трансплантатів. Для цього у клітинах трансплантату ініціювалась апоптотична загибель під дією децелюляризуючого розчину. Після обробки даним розчином сполучнотканинний матрикс графту зберігає структурну цілісність і, таким чином, є придатним до подальшого заселення клітинами реципієнту (рецелюляризації).

Ключевые слова: графт, соединительнотканый (экстрацеллюлярный) матрикс, девитализация, адгезия, ревитализация.

Сердце – это биологический насос, в котором клапанные структуры играют принципиально ту же роль, что и клапанные конструкции, применяемые в технике и обеспечивающие одностороннее движение жидкости (крови) [5, 8, 13, 14].

Ранее считалось, что все сердечные клапаны – простые структуры, пассивно движущиеся в ответ на действующий градиент давления. Сейчас становится очевидным, что они имеют более сложное строение и функцию [11]. Поэтому создание «активного» заменителя клапана сердца предполагает значительную схожесть его по структуре и функции с естественным клапаном, что вполне реально благодаря развитию тканевой инженерии [1, 15]. Примером такого заменителя являются децелюлированные аллогенные или ксеногенные трансплантаты. Однако, для полноценного выполнения своих функций, будущий трансплантат наравне с минимизацией клеточной составляющей донорской ткани, что обеспечивает низкую иммуногенность протеза, а также меньшую его подверженность деструкции в результате кальцификации, должен обладать неизменной структурой внеклеточного каркаса.

Межклеточный матрикс образует каркас органа и является универсальным «биологическим» клеем; участвует в регуляции водно-солевого обмена.

Матрикс створки клапана по своей толщине неоднороден и представлен тремя различными слоями – фиброзным, губчатым и желудочковым.

Фиброзный слой лежит около выходной наружной поверхности клапанов [10] и формирует устойчивый к нагрузкам каркас створки, состоящий из слоев коллагеновых волокон [6, 7, 12]. Эти волокна располагаются радиально в виде складок, давая возможность растяжения артериальных клапанов при закрытии.

Желудочковый слой намного тоньше, чем остальные, и изобилует эластичными волокнами, которые позволяют тканям противостоять постоянной деформации [3].

Между фиброзным и желудочковым находится губчатый слой (спонгиоза), состоящий из слабоорганизованной соединительной ткани в вязкой среде. Доминирующими матриксными компонентами этого слоя являются протеогликаны с произвольно ориентированным коллагеном и тонкими слоями эластина [2, 4, 9].

Таким образом, значение внеклеточного матрикса для нормального функционирования органа сложно переоценить. Основной целью данной работы было получение морфологически не измененного бесклеточного экстрацеллюлярного матрикса сосудисто-клапанного графта, способного к адекватному упруго-прочностному ответу на прогнозируемое физическое воздействие *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили с использованием сердечных клапанов 4–6-месячных свиней. Образцы, принимавшие участие в исследованиях, были подвержены воздействию раствора, оказывающего апоптотическое воздействие на клеточную составляющую графта, в течение 2-х суток. В качестве такового использовался раствор ЭДТА (Sigma, США) в концентрации 10 мМ. По истечении заданного времени экспозиции образцы тщательно отмывались в среде с содержанием солей в концентрации близкой к физиологической.

Полученный гистологический 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 Вергофу для оценки состояния эластических волокон и производили постановку ШИК-реакции с целью исследования состояния коллагеновых волокон.

Изучение препаратов в проходящем свете проводили на исследовательском микроскопе Olympus AX70 (Япония) с цифровой видеокамерой Olympus DP50, соединенной с персональным компьютером.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно результатам гистологического анализа (рис.1) на фоне уменьшенного количества клеток в ткани экстрацеллюлярный матрикс остается в практически неизменном состоянии.

Заметна слабой выраженности базофилия ткани, что, предположительно, связано с достаточно долгим пребыванием образцов в жидкой среде апоптозирующего раствора.

В срезах, сделанных из ткани в области стыка створки клапана, стенки аорты и фиброзного кольца, наблюдается ШИК-позитивная реакция. Наиболее интенсивно данная реакция выражена в области створки клапана. По результатам окраски эластических волокон по Вергофу участок стенки аорты окрасился в темно-бордовый цвет, в области створки клапана препарат окрашен в малиновый цвет (рис.2).

ВЫВОДЫ

Позитивные результаты специфической окраски внеклеточного матрикса дают нам основание полагать, что воздействие децеллюлирующим раствором не вызывает структурных изменений в волокнах и их физиологическая целостность 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.

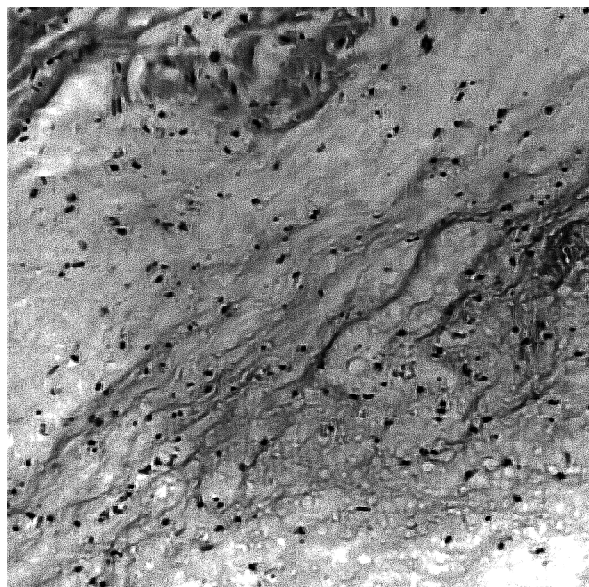


Рис. 1 Створка клапана. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$ (окуляр-10, объектив-40)

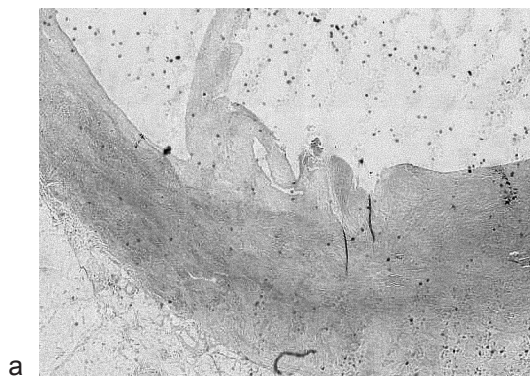


Рис.2 Результат гистологического анализа внеклеточного матрикса. Увеличение $\times 300$. а) результат PAS-реакции на коллаген; б) окраска по Вергофу

ЛИТЕРАТУРА

1. Акатов В. С. 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.
2. Биологическая химия: краткий курс лекций для иностранных учащихся стомфака / А. Д. Таганович [и др.].– Мн.: БГМУ, 2005.– 119 с.
3. Орловский П. И., Гриценко В. В., Юхнев А. Д., Евдокимов С. В., Гавриленков В. И. Искусственные клапаны сердца / Под ред. Академика РАМН Ю. Л. Шевченко.– СПб.: ЗАО «ОЛМА Медиа Групп», 2007.– 448с.
4. Allograft aortic valve implantation: techniques for all types of aortic valve and root pathology / O'Brien M.F., McGiffin D.C., Stafford E. G. // *Ann Thorac Surg.*– 1989.– Vol. 48 (4).– P. 600–9.
5. Brewer R. J., Deck D., Capati B. et.al. The dynamic aortic root; Its role in aortic valve function // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*– 1976.– Vol. 72, № 3.– P. 413–417.
6. Cardiac fibroblasts: function, regulation of gene expression, and phenotypic modulation. / M. Eghbali // *Basic Res. Cardiol.*– 1992.– V. 87, Suppl. 2.– P. 183–189.
7. Collagen network of the myocardium: function, structural remodelina and regulatory mechanisms / K. T. Weber, Y. Sun, S. C. Tuagi, J. P. Cleutjens // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1994.– V. 26.– P. 279–292.
8. Dagum P., Green R., Nistal F. J. et.al. Deformational dynamics of the aortic root: models and physiologic determinants // *Circulation.*– 1999.– Vol. 100, № 19 (Supl).– P. 54–62.
9. Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling / R. W. Grauss, M. G. Hazekamp, S. van Vliet, A. C. Gittenberger-de Groot, M. C. DeRuiter // *J. Thorac. and Cardiovasc. Surg.*– 2003.– Vol. 126.– P. 63–82.
10. Differential effects of gamma-interferon on collagen and fibronectin gene expression. / M. J. Czaja, F. R. Weiner, M. Eghbali et al. // *J. Biol. Chem.*– 1987.– V. 262.– P. 1348–1351.
11. Morphology of the Human Mitral Valve / J. H. C. Lam; N. Ranganathan; E. D. Wigle; M. D. Silver // *Circulation.*– 1970. Vol. 41.– P. 449–458.
12. Myocardial remodelling and matrix metalloproteinases in heart failure: turmoil within the interstitium. / E. M. Wilson, F. G. Spinale // *Ann. Med.*– 2001.– V. 33.– P. 623–634.
13. Thubrikar M., Heckman J. L., Nolan S. P. High speed cine-radiographic study of aortic valve leaflet motion // *J. Heart Valve Disease.*– 1993.– Vol. 2.– № 3.– P. 653–661.
14. Thubrikar M., Nolan S. P. Boshier L. P. et.al. The cyclic changes and structure of the base of the aortic valve // *Am. Heart J.*– 1980.– Vol. 99.– № 2.– P. 217–224.
15. 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.– Vol. 362.– P. 1505–1512.