



УДК 616.126

DOI 10.17802/2306-1278-2021-10-2S-32-35

МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ КАК ВОЗМОЖНЫЙ ФАКТОР ДЕГЕНЕРАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОТЕЗОВ КЛАПАНОВ СЕРДЦА

А.Е. Костюнин, Т.В. Глушкова, Л.А. Богданов, Е.А. Овчаренко

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Сосновый бульвар, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Цель	Выявить экспрессию и возможные источники матриксных металлопротеиназ (ММП) и их тканевых ингибиторов (ТИМП) в биопротезных клапанах сердца.
Материалы и методы	Материалом исследования стали эпоксиобработанные биопротезы клапанов сердца (ЗАО «НеоКор», Кемерово, Россия), полученные при репротезировании. Для оценки степени дегенерации ксенобиоматериала криосрезы створок окрашивали гематоксилином и эозином, ализариновым красным С и масляным красным. Детекцию ММП-1, 2, 8, 9, 12, ТИМП-1, 2 и типирование клеток антителами к CD45, CD68, CD3, CD19 и миелопероксидазе нейтрофилов выполняли посредством иммуногистохимического окрашивания.
Результаты	Изучены 7 ксеноаортальных и 7 ксеноперикардиальных биопротезных клапанов сердца, удаленных из аортальной (n = 2, только ксеноперикардиальные) и митральной (n = 12) позиций. Во всех образцах отмечена инфильтрация створок клетками реципиента, все ксеноаортальные и один ксеноперикардиальный биопротезы аккумулировали липиды. Полуколичественный анализ показал, что более агрессивная клеточная инфильтрация свойственна ксеноаортальным биопротезам (p = 0,038). При окрашивании срезов на ММП-1, 2, 8, 9, 12 и ТИМП-1, 2 выявлена экспрессия клетками всех перечисленных соединений. Окрашивание ксенотканей на ММП-9 также наблюдали в отсутствие клеток.
Заключение	Инфильтрирующие биопротезные клапаны сердца клетки реципиента продуцируют ММП-1, 2, 8, 9, 12, миелопероксидазы нейтрофилов и ТИМП-1, 2. Также ММП-9 поступает в ксеноткани преимущественно из крови.
Ключевые слова	Биопротезные клапаны сердца • Структурная дегенерация • Клеточная инфильтрация • Матриксные металлопротеиназы

Поступила в редакцию: 11.06.2021; принята к печати: 20.06.2021

MATRIX METALLOPROTEINASES AS A POSSIBLE FACTOR OF BIOLOGICAL PROSTHETIC

A.E. Kostyunin, T.V. Glushkova, L.A. Bogdanov, E.A. Ovcharenko

Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", 6, Sosnoviy Blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

Aim	To identify the expression and possible sources of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in bioprosthetic heart valves (BHVs).
Methods	The material for the study was epoxy-treated BHVs (NeoKor Ltd, Kemerovo) obtained during valve re-prosthetics. Cellular infiltration and ECM degradation were assessed by haematoxylin and eosin staining while lipid deposition and calcification were analysed by Oil Red O and Alizarin Red S staining. Cellular typing and detection of MMP-1/-2/-8/-9/-12 and TIMP-1/-2 expression in samples were performed using immunohistochemical staining with antibodies to CD45, CD68, CD3, CD19, myeloperoxidase, and to the corresponding MMPs and TIMPs. Analysis of samples was performed by light microscopy.

Для корреспонденции: Александр Евгеньевич Костюнин, rhabdophis_tigrina@mail.ru; адрес: Сосновый бульвар, 6, Кемерово, Россия, 650002

Corresponding author: Alexander E. Kostyunin, rhabdophis_tigrina@mail.ru; address: 6, Sosnoviy Blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

Results

We examined 7 xenoaortic and 7 xenopericardial BHVs which were removed during re-replacement from the aortic (n = 2) and mitral (n = 12) positions. In studied leaflets from 13 explanted BHVs, sporadic infiltrates consisting of macrophages and neutrophils were revealed. Semi-quantitative analysis showed that more aggressive cellular infiltration is characteristic of xenoaortic BHVs (p = 0.038). MMP-1/-2/-8/-12 and TIMP-1/-2 were weakly expressed and co-localised with infiltrating cells whilst MMP-9 was abundant in the loosened extracellular matrix (ECM) devoid of host cells.

Conclusion

The recipient cells infiltrating BHVs are sources of MMP-1/-2/-8/-9/-12 and TIMP-1/-2. In addition, MMP-9 can diffuse into BHVs leaflets from the blood of patients.

Keywords

Bioprosthetic heart valves • Structural valve degeneration • Cell infiltration • Matrix metalloproteinases

Received: 11.06.2021; accepted: 20.06.2021

Список сокращений

ММП – матриксные металлопротеиназы ТИМП – тканевые ингибиторы металлопротеиназ

Введение

Биопротезы клапанов сердца отличаются от механических аналогов низкой тромбогенностью, превосходными гемодинамическими характеристиками и бесшумностью работы, но подвержены структурной дегенерации биологического компонента, проявляющейся разрывами и кальцификацией створчатого аппарата. Из-за постепенного развития дегенеративных изменений в ксенобиоматериале уже через 10–15 лет после имплантации почти половина биопротезов требуют замены, что резко ограничивает возможности применения данных медицинских изделий у пациентов моложе 65 лет [1].

За структурной дегенерацией стоит множество механизмов, включающих клеточную инфильтрацию [2]. Считается, что клетки реципиента продуцируют широкий спектр ферментов и их ингибиторов, в частности матриксные металлопротеиназы (ММП) и тканевые ингибиторы металлопротеиназ (ТИМП), которые могут опосредовать протеолитическое расщепление или нарастание паннуса [2].

Цель настоящего исследования – установить, экспрессируются ли в створках эпоксиобработанных биопротезов клапанов сердца основные типы ММП и ТИМП, а также выявить возможные источники этих соединений.

Материалы и методы

В исследовании изучены 7 ксеноаортальных и 7 ксеноперикардальных биопротезов клапанов сердца производства ЗАО «НеоКор» (Кемерово, Россия), удаленных из аортальной (n = 2) и митральной (n = 12) позиций при репротезировании. Для подготовки криосрезов на криотоме Microm

HM 525 (Thermo Fisher Scientific, Германия) использовали центральную часть каждой створки, а также участки с дегенеративными изменениями.

Для оценки степени дезинтеграции ксенобиоматериала выполнены гистологические окраски гематоксилином и эозином, ализариновым красным С и масляным красным в соответствии со стандартными протоколами. Для иммуногистохимической реакции использовали набор реагентов NovoLink Polymer Detection System (Leica Microsystems Inc., США) согласно протоколу производителя. При этом для детекции ММП и ТИМП применяли антитела к ММП-1 (ab52631, Abcam, 1:1000), ММП-2 (ab92536, Abcam, 1:1000), ММП-8 (ab53017, Abcam, 1:1000), ММП-9 (ab38898, Abcam, 1:1000), ММП-12 (ab52897, Abcam, 1:1000), ТИМП-1 (ab211926, Abcam, 1:2000) и ТИМП-2 (ab1828, Abcam, 1:2000). С целью типирования клеток – антитела к панлейкоцитарному маркеру CD45 (ab10558, Abcam, 1:4000), маркеру макрофагов CD68 (ab955, Abcam, 1:1000), Т-лимфоцитов CD3 (ab16669, Abcam, 1:1000), В-лимфоцитов CD19 (MA5-32544, Invitrogen, 1:1000) и миелопероксидазе нейтрофилов (ab208670, Abcam, 1:8000). В качестве контроля выступали интактные эпоксиобработанные ксеноотканы: бычий перикард и створки аортального клапана свиньи.

Анализ окрашенных срезов выполняли посредством светового микроскопа AxioImager.A1 (Carl Zeiss, Германия) и программы для обработки изображений AxioVision (Carl Zeiss, Германия).

Исследование проводили в соответствии со стандартами Надлежащей клинической практики и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской

ассоциации. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ. Все пациенты подписали письменное информированное согласие после объяснения сути исследования.

Результаты

Изученные ксеноаортальные биопротезы клапанов сердца ($n = 7$) функционировали 169 (143; 221) 129–300 мес., ксеноперикардимальные ($n = 7$) – 34 (1; 75) 0,07–78 мес. ($p = 0,0006$). Клиническими показателями к репротезированию являлись стеноз ($n = 2$), недостаточность ($n = 8$) или их комбинация ($n = 4$). Непосредственной причиной дисфункции 12 изделий стала структурная дегенерация, два ксеноперикардимальных биопротеза удалили из-за тромбоза и излома каркаса через 2 и 30 дней после имплантации соответственно. За исключением биопротеза клапана сердца, функционировавшего двое суток, во всех образцах отмечена клеточная инфильтрация, также один ксеноперикардимальный и все ксеноаортальные биопротезы аккумулировали липиды. Клетки определены преимущественно вблизи крупных кальцификатов и по краям перфораций. Не выявлено четкой связи между локализацией отложений кальция и клеточных инфильтратов, что свидетельствует о дистрофическом характере кальцификации. Иммуногистохимическое типирование показало, что в клеточных скоплениях доминировали макрофаги и нейтрофилы, тогда как Т- и В-лимфоциты присутствовали единично. По результатам полуколичественного анализа, более агрессивная клеточная инфильтрация свойственна ксеноаортальным биопротезам клапанов сердца ($p = 0,038$). Клетки реципиента экспрессировали ММП-1, 2, 8, 9, 12 и ТИМП-1, 2, однако присутствие ММП-9 не зависело от клеточной инфильтрации.

Обсуждение

Выявление в створках биопротезов клапанов сердца скоплений иммунных клеток, локализованных с участками дезинтегрированного матрикса и продуцирующих широкий спектр ферментов, по-

зволяет предполагать их участие в развитии структурной дегенерации. Тем не менее клетки редко проникают вглубь створок, тогда как толща последних окрашивается антителами к ММП-9. Предположительно, ММП-9 происходит из плазмы крови, как и липиды, аккумулируемые в створках биопротезов. Как известно, обработка диэпоксидными соединениями не защищает ксенобиоматериал от протеолитической дегенерации [3], поэтому накопление ММП-9 может способствовать разрушению в них коллагеновых и эластических волокон. Таким образом, ММП-9 может быть одной из основных причин структурной дегенерации. Следует отметить, что к похожим выводам пришли и другие авторы, изучавшие зарубежные модели биопротезов клапанов сердца, сшитых глутаровым альдегидом [4].

Заключение

Присутствующие в створках биопротезов клапанов сердца клетки реципиента являются источником ММП-1, 2, 8, 9, 12, миелопероксидазы нейтрофилов и ТИМП-1, 2. В отличие от других изученных ферментов ММП-9 поступает в ксеноткани преимущественно из крови.

Конфликт интересов

А.Е. Костюнин заявляет об отсутствии конфликта интересов. Т.В. Глушкова заявляет об отсутствии конфликта интересов. Л.А. Богданов заявляет об отсутствии конфликта интересов. Е.А. Овчаренко заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Исследование проведено в рамках комплексной программы фундаментальных научных исследований по фундаментальной теме НИИ КПССЗ № 0546-2019-0002 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов с реализацией пациентоориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

Информация об авторах

Костюнин Александр Евгеньевич, кандидат биологических наук научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-6099-0315

Глушкова Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук старший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-4890-0393

Author Information Form

Kostyunin Alexander E., candidate of Biological Sciences at the Laboratory of New Biomaterials of the Experimental Medicine Department, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-6099-0315

Glushkova Tatiana V., candidate of Biological Sciences, a senior research assistant at the Laboratory of New Biomaterials of the Experimental Medicine Department, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-4890-0393

Богданов Лев Александрович, младший научный сотрудник лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-4124-2316

Овчаренко Евгений Андреевич, кандидат технических наук заведующий лабораторией новых биоматериалов отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-7477-3979

Bogdanov Lev A., a junior research assistant at the Laboratory of Fundamental Aspects of Atherosclerosis of the Experimental Medicine Department, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-4124-2316

Ovcharenko Evgeny A., candidate of Technical Sciences, Head of the Laboratory of New Biomaterials of the Experimental Medicine Department, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-7477-3979.

Вклад авторов в статью

КАЕ – получение данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ГТВ – анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

БЛА – получение данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ОЕА – интерпретация данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

Author Contribution Statement

KAE – data collection, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

GTV – data analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

BLA – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

OEA – data interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Otto C.M., Nishimura R.A., Bonow R.O., Carabello B.A., Erwin J.P. 3rd, Gentile F., Jneid H., Krieger E.V., Mack M., McLeod C., O’Gara P.T., Rigolin V.H., Sundt T.M. 3rd, Thompson A., Toly C. 2020 ACC/AHA Guideline for the management of patients with valvular heart disease: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2021; 143(5):e72-e227. doi:10.1161/CIR.0000000000000923
2. Kostyunin A.E., Yuzhalin A.E., Rezvova M.A., Ovcharenko E.A., Glushkova T.V., Kutikhin A.G. Degeneration of bioprosthetic heart valves: Update 2020. *J Am Heart Assoc*.

- 2020; 9(19):e018506. doi:10.1161/JAHA.120.018506
3. Zhuravleva I.Y., Karpova E.V., Oparina L.A., Poveschenko O.V., Surovtseva M.A., Titov A.T., Ksenofontov A.L., Vasilieva M.B., Kuznetsova E.V., Bogachev-Prokophiev A.V., Trofimov B.A. Cross-linking method using pentaepoxide for improving bovine and porcine bioprosthetic pericardium: A multiparametric assessment study. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 2021; 118:111473. doi:10.1016/j.msec.2020.111473
4. Simionescu A., Simionescu D.T., Deac R.F. Matrix metalloproteinases in the pathology of natural and bioprosthetic cardiac valves. *Cardiovasc. Pathol.* 1996; 5(6):323-32.

Для цитирования: Костюнин А.Е., Глушкова Т.В., Богданов Л.А., Овчаренко Е.А. Матриксные металлопротеиназы как возможный фактор дегенерации биологических протезов клапанов сердца. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2021;10(2S): 32-35. DOI: 10.17802/2306-1278-2021-10-2S-32-35

To cite: Kostyunin A.E., Glushkova T.V., Bogdanov L.A., Ovcharenko E.A. Matrix metalloproteinases as a possible factor of biological prosthetic. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2021;10(2S): 32-35. DOI: 10.17802/2306-1278-2021-10-2S-32-35