

Фундаментальная медицина. Экспериментальная кардиология

УДК 616.126.3:611.018

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АОРТАЛЬНОГО ГРАФТА ПОСЛЕ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ

Д. С. СЕРГЕЕВИЧЕВ, Н. А. ПОДХВАТИЛИНА, М. Б. ВАСИЛЬЕВА,
Н. Р. НИЧАЙ, А. И. СУББОТОВСКАЯ, А. М. КАРАСЬКОВ

*Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения
имени академика Е. Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения
и социального развития Российской Федерации, Новосибирск, Россия*

Цель. Анализ особенности аллогraftов аортального клапана, децеллюляризованных с помощью раствора трипсина или комбинированного действия растворов додецилсульфата и дезоксихолата натрия.

Материалы и методы. Проводили гистологические, бактериологические и механические испытания graftа.

Результаты. После удаления клеточных элементов трипсином достоверно снижалась прочность аллогraftа по сравнению с группой контроля и образцов после детергентной обработки. Гистологический анализ образцов аортальных аллогraftов достоверно показал выраженное нарушение пространственной организации соединительнотканного каркаса клапана после ферментной обработки.

Заключение. Детергентная децеллюляризация является предпочтительным методом получения бесклеточного аортального аллогraftа, т. к. позволяет эффективно удалить клетки донора и сохранить микроструктуру и биомеханические свойства graftа.

Ключевые слова: аллогraft, децеллюляризация, соединительнотканый каркас, тканевая инженерия.

MORPHOFUNCTIONAL FEATURES OF AORTIC GRAFT AFTER DECELLULARIZATION

D. S. SERGEEVICHEV, N. A. PODHVATILINA, M. B. VASILIEVA,
N. R. NICHAY, A. I. SUBBOTOVSKAYA, A. M. KARASKOV

*Federal State Budgetary Institution «Academician E. N. Meshalkin Research Institute
for Circulatory Pathology» under the Russian Ministry of Healthcare and Social Development,
Novosibirsk, Russia*

Purpose. The aim is to analyze the features of aortic valve allografts decellularized with trypsin solution or a combination of the sodium dodecyl sulfate/deoxycholate solution.

Materials and methods. We performed histological, bacteriological and mechanical testing of graft.

Results. It was found that after the removal of cellular elements with trypsin the strength of allograft significantly decreased compared with the control group and the samples exposed to detergent treatment. Histological analysis of aortic allograft specimens showed significantly impaired spatial organization of the connective tissue framework of the valve after the enzymatic treatment.

Conclusion. Detergent decellularization is the preferred method for obtaining cell-free aortic allografts because it can effectively remove the donor cells and maintain the microstructure and biomechanical properties of the valve graft.

Key words: allograft, decellularization, connectivetissue framework, tissue engineering.

Введение

С момента внедрения в кардиохирургическую практику первых искусственных и биологических клапанов сердца происходит постоянное и непрерывное совершенствование их конструкции и функциональных характеристик. Однако стремление к

максимальному приближению свойств клапанных протезов к параметрам естественного клапана остается на сегодняшний день мечтой о совершенном биологическом протезе. К аллогraftам относятся трансплантаты от донора того же биологического вида, и многими авторами он рассматривается как

предпочтительный вариант протезирования клапана аорты у молодых пациентов, особенно тем, для которых нежелательна антикоагулянтная терапия. При этом варианте использования достигаются физиологичность кровотока, обеспечивающая превосходную гемодинамику, низкая тромбогенность, естественная резистентность к инфекции, возможность имплантации в условиях узкого корня аорты, медленное развитие дисфункции. Основной проблемой этих видов заменителей естественных клапанов сердца является их относительная недолговечность за счет иммунологических реакций организма.

Современные методы тканевой инженерии позволяют избежать недостатков, связанных с реакцией иммунной системы, путем удаления клеточного содержимого ксено- или аллогенного клапанного каркаса и последующей репопуляцией его клетками реципиента [2]. Децеллюляризация позволяет значительно снизить иммуногенность имплантата, приводит к снижению риска отторжения, воспаления и других деструктивных процессов, контролируемых иммунокомпетентными клетками реципиента.

Механическая основа клапана представлена соединительнотканым каркасом (СТК) – продуктом секреции клеток аортальной стенки, составляющих систему структурных и функциональных протеинов экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ). Компоненты ЭЦМ постоянно взаимодействуют с клетками в ответ на изменения условий микроокружения, что является ключевым моментом, влияющим на миграцию, пролиферацию и дифференцировку клеток [4]. Основными компонентами ЭЦМ являются универсальные для большинства видов млекопитающих коллаген и эластин.

В настоящее время, несмотря на уже представленные различные конструкции биологических протезов, все же актуальным остается вопрос об источниках тканей, из которых получают СТК, а также методах их возможной децеллюляризации. Каждый из последних имеет свои достоинства и недостатки и по-разному влияет на строение и ультраструктуру СТК [3]. По данным литературы, наилучшее соотношение эффективности децеллюляризации и сохранения структуры СТК достигается при использовании ферментных или детергентных способов [5, 8].

Цель. Изучение влияния детергентного и ферментного способов децеллюляризации на морфологию и биомеханические свойства аортального аллогraftа.

Материалы и методы

Материалами исследования послужили 8 клапаносодержащих фрагментов аорт человека, полученных из трупного материала с использованием «чистого» способа забора. Период теплой ишемии составлял до 12 ч, общий период отсутствия кровообращения был до 18 ч. Критерии забора тканей, противопо-

казания к применению и условия выбраковки были определены согласно рекомендациям Европейского банка тканей [7].

Все аллогraftы были выделены способом «прецизионной микродиссекции». После проведенной микродиссекции аллогraftы подвергались бактериальной деконтаминации в растворе RPMI-1640 (Биолот, СПб.) с добавлением комплекса антимикробных препаратов широкого спектра действия в цитотоксических дозировках с последующим проведением микробиологического контроля. Через 48 ч проводилась однократная отмывка аллогraftа в 400 мл фосфатного буфера Дюльбекко pH = 7,4 (ДФБ) и погружение в растворы для децеллюляризации.

Весь цикл децеллюляризации осуществляли в двухмерном термошейкере при 37 °C (Heidolf, Германия). Первая группа аллогraftов (n = 4) подверглась обработке детергентным способом – смесью растворов 0,5 % додецилсульфата и 0,5 % дезокси-холата натрия (Sigma, США) с временем экспозиции 24 ч и этапом 6-кратной отмывки по 12 ч в ДФБ, согласно A. Lichtenberg с соавт. [6]. Во второй группе аллогraftов (n = 4) обработка осуществлялась ферментным способом с использованием 0,1 % раствора трипсина, согласно O. Teebken с соавт. [10], с собственными модификациями [1]. Контрольная группа была представлена криосохраненными аллогraftами, хранившимися в питательной среде при 4 °C с добавлением комплекса антибиотиков.

Морфологический контроль аллогraftов осуществлялся перед процедурой децеллюляризации, а также после ее завершения. Фиксацию материала проводили в 10 % забуференном формалине, гистологическую проводку и подготовку парафиновых блоков – по стандартным гистологическим методикам. Все парафиновые срезы толщиной 5 мкм были получены с помощью полуавтоматического ротационного микротомы Microm HM340 (Carl Zeiss, Германия), которые затем окрашивали гематоксилин-эозином (Биовитрум, Россия), набором реагентов для окраски методом Пикро – Маллори (Bio-Optica, Италия), ядерным зондом DAPI. Для визуализации и документирования гистологических препаратов использовали микроскоп Axiovert 200M с видеокamerой AxioCam HRc и комплект программного обеспечения Axiovision 4.7 (Carl Zeiss, Германия).

Исследование механической прочности аллогraftов выполняли с использованием разрывной машины Z10 (Zwick/Roell, Германия). Физико-механические испытания фрагментов аллогraftов проводили в условиях одноосного растяжения. Фрагменты аллогraftов вырезали в виде полос равной ширины (10 мм), которые фиксировали в захватах разрывной машины так, что длина рабочей части испытуемого образца составляла 25–30 мм. Все образцы фрагментов аллогraftов были стандартизированы по длине, ширине и толщине. Одноосное растяжение образцов

проводилось с постоянной скоростью 10 мм/мин до момента появления видимого повреждения ткани. В результате экспериментов получали данные о разрушающей нагрузке.

Для выделения нуклеиновых кислот из аллогraftа использовали набор реагентов для выделения ДНК из формалин-фиксированных и заключенных в парафин тканей QIAamp DNA FFPE Tissue kit (QIAGEN, Германия). Концентрацию ДНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoVue Plus (GE Healthcare, Швеция). Во всех случаях ДНК выделяли из 20 серийных парафиновых срезов толщиной 10 мкм.

Полученные результаты исследований обрабатывали с помощью программного обеспечения SPSS версии 17.0 (IBM, США). Нормальность распределения выборки проверяли критерием Шапиро – Уилка. В случае подтверждения нормального распределения выборки, описательные статистики представляли в виде среднее $\pm$ стандартное отклонение, при непараметрическом распределении – в виде медианы и 25-го, и 75-го квартилей. Достоверность различий между группами проверяли критерием Стьюдента для нормальных выборок и критериями Крускала – Уоллиса и Манна – Уитни для непараметрических.

Результаты

В ходе исследования нами обнаружено, что после обработки детергентным способом и раствором трипсина аллогraftы сильно различались макроскопически: первые по внешнему виду были похожи на нативные аллогraftы, вторые значительно теряли форму. При микроскопическом анализе гистологических срезов, окрашенных гематоксилин-эозином и по Пикро – Маллори в первой группе, было выявлено, что удаление клеток происходит преимущественно из интимы и адвентиции аорты, однако в медиа присутствие клеточных элементов снижается незначительно (рис. 1).

Базальная мембрана практически на всем протяжении четко визуализируется и полностью сохраняет свое строение. В образцах гистологических срезов второй группы отмечается значительная фрагментация базальной мембраны, а местами ее визуализация вообще не прослеживалась ввиду нарушения типичной структуры, при этом практиче-

ски полностью отсутствовали клеточные элементы во всех слоях СТК аортального аллогraftа. Кроме того, было выявлено, что в гистологическом материале первой группы отмечается максимальная сохранность соединительнотканного каркаса, в то время как после обработки раствором трипсина на срезах практически отсутствовали эластические структуры (эластические мембраны и эластические волокна), а коллагеновые волокна местами были значительно фрагментированы. Полученное при окраске по Пикро – Маллори значительное уменьшение количества эластических волокон в материале из второй группы, вероятнее всего, может быть объяснено низким избирательным действием трипсина, что в конечном счете оказывает влияние на снижение механических свойств тканевых фрагментов аллогraftов второй группы. Многие авторы в своих работах используют ферментный способ децеллюляризации биологической ткани с ее дальнейшим процессингом как основной [1, 11]. Однако, согласно результатам наших исследований, децеллюляризация ферментным способом имеет существенные недостатки в виде снижения механической прочности децеллюляризованного аортального аллогraftа и снижения сохранности соединительнотканного каркаса представленных аллогraftов.

Данные, полученные при исследовании механической прочности аллогraftов, показали, что значения разрушающего напряжения в группах контроля и детергентной обработки значимо не различались ($p = 0,9$) (данные не показаны). При проведении тестов на растяжение фрагментов аллогraftов, обработанных раствором трипсина, было обнаружено достоверное снижение механической прочности в сравнении с остальными группами: $p = 0,003$ в сравнении с группой детергентной обработки и $p = 0,012$ в сравнении с контролем.

Для оценки эффективности децеллюляризации все препараты были окрашены ядерным красителем DAPI (рис. 2). Было подтверждено, что в первой группе при обработке детергентным способом полного удаления ядерного материала добиться не удалось. При этом аутофлюоресценция компонентов

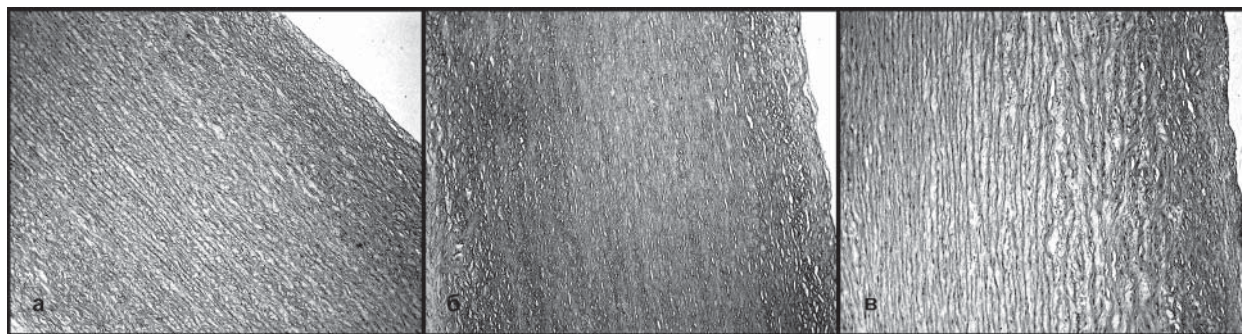


Рис. 1. Поперечный срез аортального аллогraftа. Окраска гематоксилин-эозином: а – группа контроля; б – обработка детергентами; в – обработка трипсином. Увеличение $\times 10$

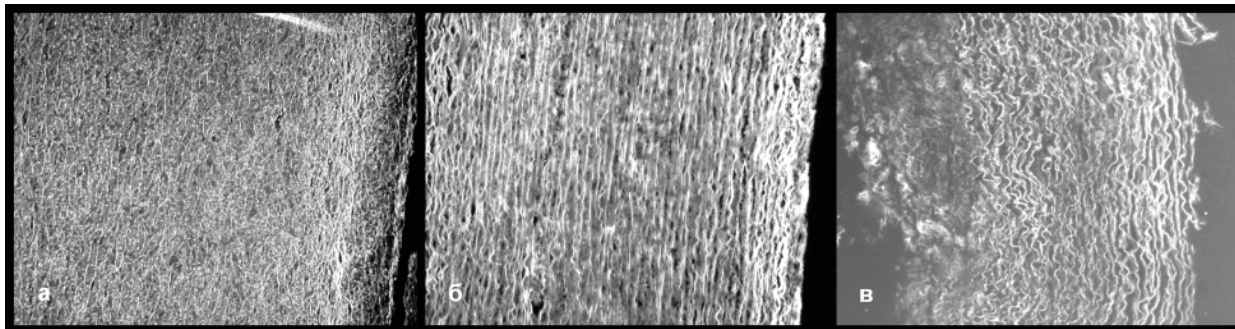


Рис. 2. Поперечный срез аортального аллогraftа. Флуоресцентная окраска DAPI:
а – группа контроля; б – обработка детергентами; в – обработка трипсином. Увеличение x10

экстрацеллюлярного матрикса свидетельствует о сохранении ячеистого строения ЭЦМ, схожего по конфигурации с нативной тканью.

Во второй группе наблюдалось выраженное разобщение межклеточных волокон, нарушение их взаимориентации и практически полное отсутствие ядерного материала. Из этого следует, что эффективно удаляя клеточный компонент аллогraftа, обработка трипсином существенно нарушает пространственное строение СТК.

Также в проведенном исследовании для оценки полноты децеллюляризации аортального аллогraftа были проанализированы остаточные количества ДНК. Установлены значимые различия между контрольной группой и исследуемыми образцами (данные не приведены). Однако различия непосредственно между исследуемыми группами статистически не значимы ($p = 0,094$).

Обсуждение

Нами было обнаружено, что биомеханические свойства децеллюляризованного экстрацеллюлярного матрикса аллогraftа, обработанного детергентным способом, более близки к нативному состоянию аортального клапана. Потеря прочности образцов, обработанных детергентом, происходит, по всей видимости, в результате уменьшения концентрации глюкозаминогликанов и нарушения межколлагеновых взаимосвязей [9], обусловленной воздействием ионных детергентов. Использование подобного избирательного механизма способа децеллюляризации позволяет предположить, что тканевые структуры не подвергаются значительным нарушениям. Остаточная прочность исследованных матриксов клапанных аллогraftов аорты, обработанных таким способом, может обеспечить адекватное сопротивление физиологической гемодинамической нагрузке в условиях гемоциркуляции. А постепенная репопуляция клеточного содержимого аллогraftа будет способствовать более полной консолидации в организме комплекса сердце – аллогraft и увеличению срока использования данного биологического протеза [2].

Таким образом, децеллюляризация аортальных аллогraftов детергентным способом (сочетание на-

трия дезоксихолата и натрия додецилсульфата) не обеспечивает полного удаления клеточных структур, однако в сравнении с ферментным способом позволяет наиболее полно сохранить нативную структуру и биомеханические свойства СТК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Субботин Д. В., Ларионов П. М., Сергеевичев Д. С. Морфологическая оценка цитоархитектоники аортального графта на этапах биотехнологии с анализом изменений спектров лазерно-индуцированной флуоресценции // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2009. № 4. С. 191–196.
2. Cebotary S., Mertsching H., Kallenbach K. Construction of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix // Circulation. 2002. Vol. 106, suppl. I. P. 63–68.
3. Crapo P., Gilbert T., Badylak S. An overview of tissue and whole organ decellularization processes // Biomaterials. 2011. Vol. 32. P. 3233–3243.
4. Dohmen P., Konertz W. Tissue-engineered heart valve scaffolds // Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg. 2009. Vol. 15(6). P. 362–367.
5. Histological evaluation and biomechanical characterization of an acellular porcine cornea scaffold / L. Du [et al.] // Br. J. Ophthalmol. 2010.
6. In-vitro re-endothelialization of detergent decellularized heart valves under simulated physiological dynamic conditions / A. Lichtenberg [et al.] // Biomaterials. 2006. Vol. 27. P. 4221–4229.
7. Jashari R., Goffin Y., Vanderkelen A. European Homograft Bank: Twenty Years of Cardiovascular Tissue Banking and Collaboration With Transplant Coordination in Europe // Transplant. Proc. 2010. Vol. 42. P. 183–189.
8. Meyer S., Chiu B., Churchill T. Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat // J. Biomed. Res. A. 2006. Vol. 79(2). P. 254–262.
9. Reider E., Kasimir M.T., Silberhumer G. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 2004. Vol. 127. P. 399–405.
10. Tissue engineering of vascular grafts: human cell seeding of decellularised porcine matrix / O. Teebken [et al.] // Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 2000. Vol. 19. P. 381–386.
11. Wilczek P. Heart valve bioprosthesis: effect of different acellularization methods on the biomechanical and morphological properties of porcine aortic and pulmonary valve // Bulletin of the Polish academy of technical sciences. 2010. Vol. 58(2). P. 337–342.

Статья поступила 20.08.2012.