

УДК 616.126.3/56

© М.В. Петрова, 2012.

## АПОПТИЧЕСКАЯ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИЯ, КАК СПОСОБ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ДЕСТРУКТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОТЕЗАХ СЕРДЕЧНЫХ КЛАПАНОВ

**М.В. Петрова**

*ГУ «Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака НАМНУ», лаборатория клеточного и тканевого культивирования (зав. – проф. А.Г. Попандопуло), г. Донецк.*

### APOPTOTIC DECELLULARIZATION AS A PREVENT METHOD FROM DESTRUCTIVE CHANGES IN BIOLOGICAL HEART VALVES XENOGRAFTS

**M.V. Petrova**

#### SUMMARY

Bioartificial grafts of heart valves and vessels should have certain properties, moreover, be steady to calcification. This research was aimed to produce biomodificated cardiovascular graft by decellularisation of heart valve connective tissue matrix. To achieve decellularisation 10 mM EDTA solution was used. It seems, that decellularisation is successful, but number of apoptotic cells are not identical in different parts of graft

### АПОПТИЧНА ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦІЯ ЯК СПОСІБ ЗАПОБІГАННЯ ДЕСТРУКТИВНИХ ЗМІН У БІОЛОГІЧНИХ ПРОТЕЗАХ СЕРЦЕВИХ КЛАПАНІВ.

**М.В. Петрова**

#### РЕЗЮМЕ

Проведено дослідження з отримання девіталізованого сполучнотканинного матриксу клапанів серця за допомогою запуску апоптозу. У якості девіталізуючого використовувався 10мМ розчин ЕДТА. Ініціацію апоптозу можна вважати вдаюю, але кількість апоптичних клітин не однакове для різних структур ксенографту.

**Ключевые слова:** графт, деструкция, апоптоз, девитализация.

Наиболее распространенным способом лечения, характерным для терминальных стадий заболеваний клапанного аппарата сердца, является хирургическая замена поврежденного клапана механическим или биологическим протезом. Механические заменители клапанов зарекомендовали себя как долговечные структуры. Однако, с ними связаны риск ряда осложнений, возникающих из-за их не физиологичной поверхности и нарушений кровотока. К тому же проблематична пересадка механических заменителей сердечных клапанов юным пациентам, так как по причине постоянного быстрого роста они нуждаются в регулярной и частой замене протеза.

В качестве биологических протезов используют клапаны животного происхождения (ксенографты) или взятые от доноров (аллографты). Они обладают лучшей механической стабильностью, и дают возможность заблаговременного банкирования протезов необходимого размера [9]. Помимо этого, биологические протезы потенциально способны к ремоделированию в организме реципиента, что особенно важно для детей и пациентов молодого возраста, поскольку позволяет обеспечить не только поддержание и обновление структуры трансплантата, но и его рост. Тем не менее, и у биологических протезов есть свои недостатки. Кроме существующего риска развития специфического иммунного ответа, они обладают меньшей долговечностью. Основной причиной этого является

деструкция трансплантата вследствие отложения кальцийсодержащих образований на поверхности или в толще имплантируемых изделий, приводящей к потере функциональных свойств протезов и необходимости повторных операций. На накопление кальция влияет целый ряд факторов, в том числе и физико-химические свойства материала имплантата. С увеличением его гидрофобности и шероховатости увеличивается количество адсорбированных белков и липидов, а это влияет на избирательность к адсорбции и десорбции комплексов кальция.

В настоящее время мировая наука предлагает ряд теоретических обоснований механизма кальцификации биоматериалов. Существуют теории, согласно которым ведущая роль в процессе физиологической и патологической кальцификации отводится клеткам. Предполагается, что [1, 2, 4, 6] кальцификация начинается с гибели клеток. Некротическая гибель клеток приводит к локальному изменению концентрации кальция, фосфатов, белков, липидов, ферментов, что вызывает отложение растворимых форм фосфатов кальция и при определенных условиях переход их в нерастворимые. Помимо этого, гибель клеток способствует появлению в среде фрагментов клеточных мембран, образующих везикулы. Кристаллы фосфатов формируются внутри такой структуры, а места их адсорбции на поверхности имплантата служат центрами последующей кальцификации. Кроме того,

с гибелью клеток связано и появление в районе кальцификации обогащенных кальцием митохондрий [3].

Эффективная борьба с кальцификацией биопротеза, а также риском развития специфического иммунного ответа, возможно, предполагает одновременное или поэтапное использование лекарственных препаратов совместно с предимплантационной обработкой биоматериалов. Предимплантационная обработка может быть реализована посредством эффективной и рациональной девитализации протеза, при помощи инициации апоптотической гибели его клеточного компонента. Предполагается, что это позволит избежать деструктивных изменений, имеющих место при некрозе, а также кальцификации трансплантата, являющейся их следствием.

Апоптоз — гибель клетки вследствие реализации программы, приводящей к поэтапному прекращению её жизнедеятельности. В отличие от некроза, апоптоз не обязательно патологический процесс. Существует ряд физиологических процессов (наблюдающихся в основном в ходе морфогенеза или поддержания нормального состава обновляющихся клеточных популяций), когда клетки, завершившие свой жизненный цикл, удаляются путём апоптоза [8]. Апоптоз имеет свои отличительные морфологические признаки, как на светооптическом, так и на ультраструктурном уровне.

Наиболее характерными морфологическими изменениями при апоптозе являются: агрегация хроматина, конденсация ядра и цитоплазмы, а также фрагментация ядра и цитоплазмы на покрытые плазматической мембраной везикулы (апоптотические тельца), которые содержат конденсированный ядерный материал, митохондрии и рибосомы [7]. При гистологической окраске гематоксилином и эозином вовлеченными в апоптоз определяются единичные клетки или небольшие группы клеток. Апоптотические клетки выглядят как округлые или овальные скопления интенсивно эозинофильной цитоплазмы с плотными фрагментами ядерного хроматина [5, 8].

Таким образом, основной целью нашего исследования было добиться инициации апоптоза в клетках ксенографта.

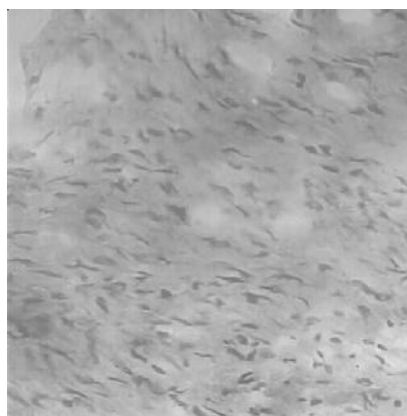
#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили с использованием сердечных клапанов 6-месячных свиней. Образцы, принимавшие участие в исследованиях, были подвержены воздействию апоптозвызывающего раствора 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

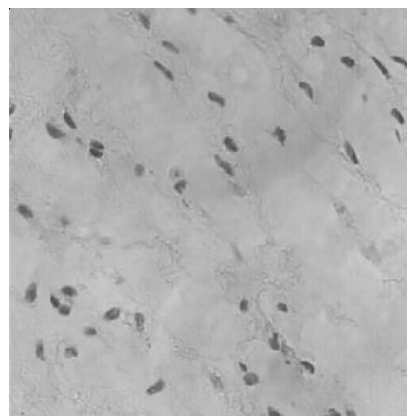
к физиологической. С целью проверки запуска апоптоза часть образцов подвергалась гистологическому анализу путем окраски гематоксилин-эозином и специфической покраски на апоптоз (Apoptag® Peroxidase ISOL Kit, Chemicon), позволяющей идентифицировать ДНК-разрывы на начальных стадиях апоптоза.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно результатам проведенного гистологического анализа, в образцах, прошедших обработку раствором ЭДТА, наблюдаются перечисленные выше морфологические признаки апоптоза (рис.1). Уменьшается общее количество клеток; у большинства из них выражены морфологические изменения в ядрах (кариопикноз, кариорексис). Все эти изменения свидетельствуют об успешной инициации апоптоза. Клетки же контрольных (интактных) образцов, напротив, имеют нормальную морфологию, характерную для фибробластов: вытянутые веретенообразной формы клетки с овальным ядром.



а

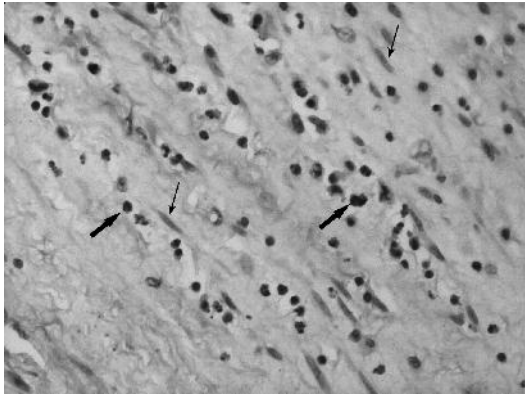


б

**Рис.1. Гистологический анализ морфологии клеток ксенографта. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 400.**

а) контрольный (интактный) образец; б) экспериментальный образец, подвергавшийся обработке раствором ЭДТА в течение 2-х суток с последующей отмывкой.

Согласно результатам специфической окраски на апоптоз (ApopTag® Peroxidase ISOL Kit, Chemicon), количество клеток, находящихся в состоянии апоптоза, рознится в различных структурах клапана (рис.2). Наибольшее их число в створке, что может быть связано с относительной тонкостью этой структуры клапана по сравнению с остальными, а также с возможной миграцией клеток в толщу ткани в случае с сосудистой стенкой.



**Рис.2. Специфическая окраска на апоптоз (ApopTag® Peroxidase ISOL Kit, Chemicon). Увеличение x 225. Большими стрелочками указаны клетки, окрашенные в коричневый цвет и находящиеся в состоянии апоптоза. Маленькие стрелочки – живые клетки.**

#### ВЫВОДЫ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что раствор ЭДТА, в выбранной нами концентрации (10 мМ), а также предложенная схема обработки графтов являются эффективными с точки зрения девитализации. Инициация апоптоза в створке клапана, а также на поверхности сосудистой части клапана проходит успешно. Процесс запуска апоптоза проходит не одинаково в различных структурах ксенографта.

#### 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. Бокерия Л.А. Криосохраненные аллографты в реконструктивной хирургии пороков аортального клапана / Л. А. Бокерия, Р. М. Муратов, И. И. Скопин [и др.]. – М.: НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН, 2007. – 282 с.
3. Волова Т. Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов. – Красноярск: СФУ, 2009. – С.168-170.
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. Райс Р.Х. Биологические эффекты токсических соединений: курс лекций / Р.Х. Райс, Л.Ф. Гуляева. – Новосибирск: Новосиб. гос. ун-т, 2003. – 208с.
6. Снижение кальцификации бесклеточных трансплантатов клапанов сердца путем внедрения в них перед имплантацией изогенных гладкомышечных клеток. / В.С. Акатов, Н.И. Рындина, В.В. Соловьев [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2003. – №4. – С. 64–67.
7. Фильченков А.А. Апоптоз и рак / А.А. Фильченков, Р.С. Стойка. – К.: Морион, 1999. – С. 6–12.
8. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death / S. Elmore // Toxicologic Pathology. – 2007. – Vol. 35. – P. 495–516.
9. 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.