

Получение адгезивного бесклеточного матрикса для сердечно-сосудистого протеза[#]

UDC 616.126.3–089.844

M.V. PETROVA, A.G. POPANDOPULO, D.L. YUDITSKIY, I.YU. MOKRIK

Derivation of Adhesive Cell-Free Matrix for Cardiovascular Prosthesis[#]

Протезирование сердечных клапанов занимает значительное место в лечении клапанных пороков. Ежегодно в мире проводится около 275 000 подобных операций. Наиболее перспективными в области сердечно-сосудистой хирургии считают биологические трансплантаты на основе ксенологического материала (ксенографты). Они позволяют избежать антикоагулянтной терапии и обладают потенциалом к ремоделированию в организме реципиента, что особенно важно в тех случаях, когда необходимо обеспечить не только поддержание и обновление структуры трансплантата, но и его рост [5].

В последние годы активно разрабатываются методы обработки трансплантатов, обеспечивающие гибель клеток донора. Считается, что такой подход будет способствовать уменьшению иммунного ответа и повышению долговечности трансплантатов клапанов сердца [1–3, 6]. Однако при этом важно сохранить максимально интактным внеклеточный матрикс. Предполагается, что для этого предпочтительней использовать апоптотическую децеллюляризацию. Она не сопровождается деструктивными изменениями в соединительно-тканном матриксе под действием лизосомальных ферментов, как в случае клеточного некроза.

Таким образом, целью нашего исследования является децеллюляризация ксеногенных графтов сердечных клапанов с последующей оценкой успешности запуска процесса апоптоза, оценка адгезивности внеклеточного матрикса.

Исследование проводили с использованием сердечных клапанов 6-месячных свиней. Забор сердец осуществлялся в условиях операционной с выполнением требований «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или других научных целей» (Страсбург,

Prosthetics of cardiac valves holds a high position in treatment of valvular diseases. Annually in the world about 275,000 of such surgeries have been performed. The most perspective in the field of cardiovascular surgery are biological transplants based on xenological material (xenografts). They enable to avoid anticoagulative therapy and have a potential of remodeling in recipient's organism that is especially important in those cases when it is necessary to provide not only maintenance and regeneration of transplant structure, but also its growth [5].

Recent years are remarkable by an active development of methods of transplants processing, which provide the death of donor cell. It is hypothesed that this approach will contribute to the reduction of immune response and increasing durability of transplants of cardiac valves [1–3, 6]. However, it is important to preserve the extracellular matrix maximally intact. It is suggested that the application of apoptose based decellularization is more preferable, whereas it is not accompanied by destructive changes in connective-tissue matrix caused by lysosomal enzymes as is possible in case of cell necrosis.

Thus, the research aim was to assess the methods of cardiac valve xenograft decellularization and to check if the process of apoptosis was efficient and the treated extracellular matrix had proper adhesive properties.

The research was performed with cardiac valves of 6-month-old pigs. Heart sampling was carried-out in operating room conditions with compliance of the requirements of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986) and the statements of the 1st National Congress on Bioethics (Kiev, 2001). Valves were derived under sterile conditions in average in 4 hours later heart sampling. The obtained

ГУ «Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака НАМН Украины», г. Донецк

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: пр-т Ленинский, 47; г. Донецк 83045; электронная почта: pmv-07@yandex.ru

[#] Данное исследование было представлено на мини-симпозиуме «День стволовой клетки», проходившем 22 мая 2012 года в г. Харькове.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; e-mail: pmv-07@yandex.ru

[#] This reseach was presented at minisimposium Stem Cell Day, held in Kharkov, Ukraine, on the 22th of May, 2012.

1986) и постановления I Национального конгресса по биоэтике (Киев, 2001). Клапаны выделяли в стерильных условиях в среднем через 4 ч после забора сердца. Полученные образцы были подвержены воздействию апоптозвызывающего раствора 10 мМ ЭДТА («Sigma», США) в течение 2-х суток. По истечении заданного времени экспозиции образцы тщательно отмывали в среде с содержанием солей в концентрации, близкой к физиологической. С целью проверки запуска апоптоза часть образцов подвергали гистологическому анализу (окраска гематоксилином-эозином) и специфической окраске («Apoptag® Peroxidase ISOL Kit», «Chemicon», США), позволяющей идентифицировать разрывы ДНК на начальных стадиях апоптоза.

Для оценки адгезивных свойств матрикса децеллюлизованные графты инкубировали с фетальными фибробластами человека, выделенными и культивированными в соответствии с общепринятой методикой [4]. Перед инкубацией культуру фибробластов окрашивали витальным флуоресцентным красителем PKH 67 Green («Sigma») и ресуспендировали в культуральной среде. Степень адгезивности децеллюлизованной ткани сердечных клапанов оценивали на 5-е сутки инкубации с использованием флуоресцентного микроскопа.

Согласно результатам проведенного гистологического анализа в образцах, прошедших обработку раствором ЭДТА (рис. 1), уменьшается общее количество клеток, у большинства из них выражены изменения в морфологии ядер (кариопикноз, кариорексис), что свидетельствует об успешной инициации апоптоза. Клетки же контрольных (интактных) образцов, напротив, имеют нормальную морфологию, характерную для фибробластов: вытянутые веретенообразной формы клетки с овальным ядром.

Согласно результатам специфической окраски («Apoptag® Peroxidase ISOL Kit») количество клеток, находящихся в состоянии апоптоза, разнится в различных структурах клапана (рис. 2). Наибольшее их количество в створке. Это может быть связано с относительной ее тонкостью по сравнению с сосудистой стенкой и участком фиброзного кольца, что облегчает проникновение действующего раствора в толщу структуры и его апоптоз-индуцирующее воздействие. Кроме того, большее коли-

samples were exposed in apoptosis-inducing solution of 10 mM EDTA (Sigma, USA) for 2 days. After exposure the samples were carefully washed in the medium with salts of concentration close to physiological one. To examine the efficiency of apoptosis initiation a part of samples was analysed histologically (staining with hematoxylin and eosin) and underwent special staining (Apoptag® Peroxidase ISOL Kit, Chemicon, USA) to allow the identification of breaks in DNA at initial stages of apoptosis.

To assess adhesive properties of matrix the decellularized grafts were incubated with human fetal fibroblasts derived and cultured according to the standard method [4]. Before incubation the culture of fibroblasts was stained with vital fluorescent dye PKH 67 Green (Sigma) and resuspended in cultural medium. Adhesion rate of decellularized tissue of cardiac valves was estimated by the 5th day of incubation using fluorescent microscopy.

Histological analysis of the samples treated with EDTA solution (Fig. 1) revealed the decrease in total number of cells, appearance of expressed changes in nuclei morphology in most of them (karyopyknosis, karyorhexis) testifying to the successful initiation of apoptosis. The cells of control (intact) samples on the contrary had normal morphology characteristic for fibroblasts. *viz.* extended spindle-shaped cells with oval-shaped nucleus.

Specific staining with Apoptag® peroxidase showed the different content of a cells at apoptosis state in various structures of valve (Fig. 2). The highest number of the

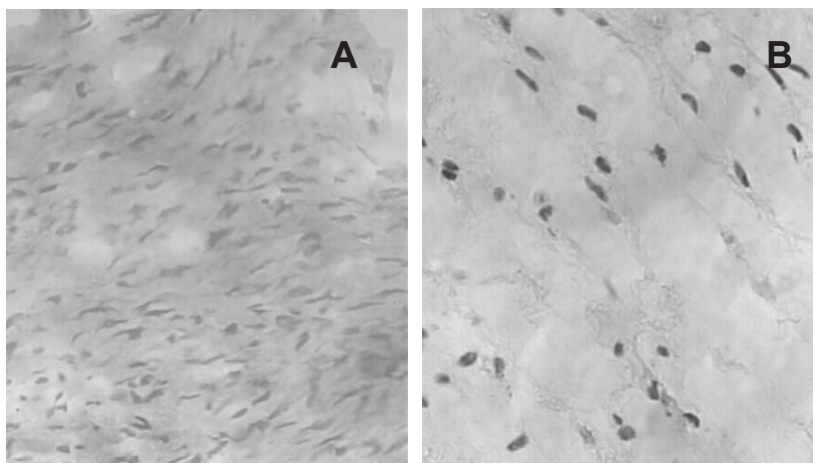


Рис. 1. Гистологический анализ морфологии клеток ксенографта: А – контрольный (интактный) образец; В – образец, подвергнутый обработке раствором ЭДТА в течение 2-х суток и последующей отмывке. Окраска гематоксилином и эозином; $\times 400$.

Fig. 1. Morphology of xenograft cells: A – control (intact) sample; B – sample, exposed in EDTA solution for 2 days and following washing. Staining with hematoxylin and eosin; $\times 400$.

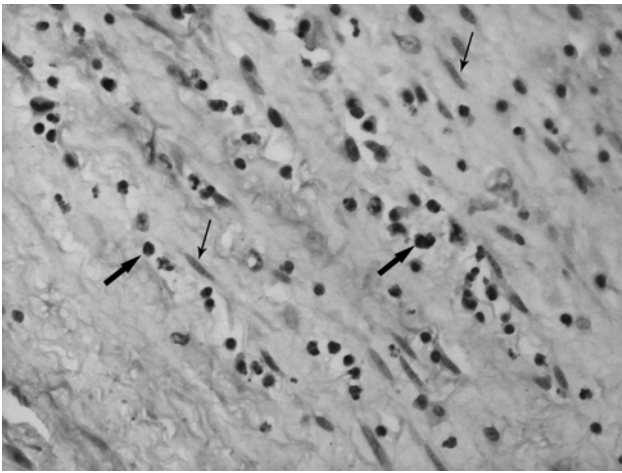


Рис. 2. Участок ткани клапана после обработки в растворе ЭДТА и отмывки. Специфическая окраска на апоптоз («Apoptag® Peroxidase ISOL Kit»); $\times 225$. Большими стрелками показаны клетки, находящиеся в состоянии апоптоза; маленькими – живые клетки.

Fig. 2. Valve tissue after treatment with EDTA solution and washing. Specific apoptosis staining (Apoptag® Peroxidase ISOL Kit), $\times 225$. Large arrows point the cells being in apoptosis state, small ones show the living cells.

чество жизнеспособных клеток в толще ткани по сравнению с поверхностными зонами в структурно более сложных участках, возможно, также связано с миграцией клеток в результате отрицательного хемотаксиса.

Во время флуоресцентного анализа будущих трансплантатов наблюдалось ярко выраженное свечение адгезированных на соединительно-тканном матриксе клеток в лучах сине-фиолетового спектра, что свидетельствует о сохранении внеклеточным матриксом адгезивных свойств и его пригодности в дальнейшем для заселения тканеобразующими аутоклетками реципиента.

Исходя из полученных результатов можно предположить, что раствор ЭДТА в концентрации 10 мМ, а также предложенная схема обработки графтов эффективны 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. После обработки децеллюлирующим раствором соединительно-тканый матрикс графта сохраняет адгезивность и, следовательно, пригоден для дальнейшего заселения клетками с целью ревитализации.

apoptotic cells was found in the leaflet. This may be associated with its relative thinness if compared with the vessel wall or the annulus fibrosis region that could simplify the penetration of treating solution into the depth of the structure and following apoptosis induction. In addition, the higher number of viable cells in tissue depth if compared with superficial zones in regions with complicated structure is also associated with cell migration due to negative chemotaxis.

Fluorescent analysis of supposed transplants revealed the bright fluorescing cells adhered to connective-tissue matrix under violet blue excitation, that in our opinion testified to the preservation of adhesive properties of extracellular matrix and to its availability for further colonization with tissue-forming autocytes of a recipient.

According to the obtained data we may suggest that EDTA solution of 10 mM as well as suggested scheme of grafts treatment are effective in terms of decellularization. Initiation of apoptosis in valve leaflet as well as on surface of vascular region of valve was efficient. The initiation of apoptosis was not uniform in different structures of xenograft. After treatment with decellularizing solution the connective tissue matrix of graft preserved the adhesive properties and therefore was applicable for further colonization by cells to realize the revitalization.

Литература

1. Акатов В.С., Рындина Н.И., Соловьев В.В. и др. Снижение кальцификации бесклеточных трансплантатов клапанов сердца путем внедрения в них перед имплантацией изогенных гладкомышечных клеток // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2003. – №4. – С. 64–67.
2. Акатов В.С., Фесенко Н.И., Соловьев В.В. и др. Подавление кальцификации трансплантатов клапанов сердца путем их девитализации // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. V, №1. – С. 41–46.
3. Бокерия Л.А., Муратов Р.М., Скопин И.И. и др. Криосохраненные аллогraftы в реконструктивной хирургии поро-

References

1. Akatov V.S., Ryndina N.I., Solov'ev V.V. et al. Reduction of calcinosis of cell-free transplants of cardiac valves by introduction into them isogenic smooth muscle cells // Vestnik Transplantologii i Iskusstvennykh Organov. – 2003. – N4. – P. 64–67.
2. Akatov V.S., Fesenko N.I., Solov'ev V.V. et al. Inhibition of calcinosis of cardiac valve transplants by their devitalization // Kletochnaya Transplantologiya i Tkanevaya Inzheneriya. – 2010. – Vol. V, N1. – P. 41–46.

- ков аортального клапана. – М.: НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН, 2007. – 282 с.
4. *Попандопуло А.Г., Игнатов Д.Ю., Слипченко И.О. и др.* Влияние факторов культивирования на жизнеспособность фетальных фибробластов человека // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2003. – Т. 4, №2. – С. 323–325.
 5. *Hoerstrup S.P., Sodian R., Daebritz S. et al.* Functional living trileaflet heart valves grown in vitro // *Circulation*. – 2000. – Vol. 102, Supl. III. – P. 44–49.
 6. *Steinhoff G., Stock U., Karim N. et al.* Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits // *Circulation*. – 2000. – Vol. 102, Supl. III. – P. 50–55.
 3. *B okeriya L.A., Muratov R.M., Skopin I.I. et al.* Cryopreserved allografts in reconstructive surgery of aortic valve failure. – Moscow: Bakoulev Scientific Center for Cardiovascular Surgery of the Russian Academy of Medical Sciences, 2007. – 282 p.
 4. *Popandopulo A.G., Ignatov D.Yu., Slipchenko I.O. et al.* Effect of culturing factors on viability of fetal human fibroblasts // *Vestnyk Neotlozhnoy i Vosstanovitelnoy Meditsyny*. – 2003. – Vol. 4, N2. P. 323-325.
 5. *Hoerstrup S.P., Sodian R., Daebritz S. et al.* Functional living trileaflet heart valves grown in vitro // *Circulation*. – 2000. – Vol. 102, Supl. III. – P. 44–49.
 6. *Steinhoff G., Stock U., Karim N. et al.* Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits // *Circulation*. – 2000. – Vol. 102, Supl. III. – P. 50–55.

Поступила 01.06.2012

Accepted 01.06.2012