

М.Б. Васильева, Д.С. Сергеевичев,  
А.С. Юношев\*, П.М. Ларионов\*\*, Р.Б. Новрузов, А.М. Караськов

## Морфофункциональная оценка ферментативного и детергентного способов децеллюляризации сердечных аллографтов

ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздравсоцразвития России, 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15, crsc@ngs.ru  
\* Институт гидродинамики им. М.А. Лаврентьева СО РАН, 630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 17  
\*\* ФГБУ «Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии» Минздравсоцразвития России, 630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, 17

УДК 616.126.3-007-1-089.844  
ВАК 14.01.05

Поступила в редакцию  
8 февраля 2012 г.

© М.Б. Васильева,  
Д.С. Сергеевичев,  
А.С. Юношев,  
П.М. Ларионов,  
Р.Б. Новрузов,  
А.М. Караськов, 2012

Проведен сравнительный анализ эффективности ферментативного и детергентного способов децеллюляризации сердечных аллографтов. Показано, что после децеллюляризации детергентным методом достигается наибольшая степень очистки клапана от клеток при сохранении его исходной механической прочности и пространственной структуры каркаса. На основании полученных данных детергентный метод может быть рекомендован в качестве предпочтительного при приготовлении аллографтов для последующего использования в кардиохирургической практике с целью уменьшения постимплантационных побочных эффектов.  
Ключевые слова: биологический клапан сердца; аллографт; децеллюляризация; тензометрия.

Замена сердечных клапанов механическими или биологическими протезами – основной способ лечения поражения клапанов сердца. Применение большинства искусственных протезов требует назначения пожизненной антикоагулянтной терапии, что существенно влияет на качество жизни пациентов, ограничивает их применение у женщин репродуктивного возраста и пациентов с нарушением системы гемостаза. Высокий процент повторных операций связан с дисфункциями протезов различной этиологии [1, 2].

В современной кардиохирургической практике растет частота применения аллогенных биологических клапанов сердца (аллографтов). Их геометрические, биомеханические и гемодинамические показатели наиболее полно соответствуют физиологическим параметрам пациента. Однако аллогенные клеточные детерминанты трансплантата, а именно молекулы гистосовместимости I класса, являющиеся частью рецепторного репертуара клеточной стенки и распознающиеся свободно циркулирующими лимфоцитами реципиента как «чужеродные», могут вызывать локальные иммуноопосредованные цитотоксические реакции, приводящие к нарушению физиологической полноценности клапана и развитию локальных

постимплантационных осложнений (воспаление, фиброз и кальцификация) [9].

Данные современных исследований показали, что использование в качестве биологических протезов соединительнотканых каркасов (СТК), полученных путем децеллюляризации, имеет очевидное преимущество перед протезированием «живыми» тканями и органами [5]. В процессе создания идеального тканеинженерного клапана важным этапом становится необходимость максимально полно удалить клетки из исходного донорского материала, но с минимальным нарушением структурной и пространственной целостности соединительнотканного каркаса. Удаление жизнеспособных клеток донора, а также частей разрушенных клеточных стенок приводит к значительному снижению иммуногенности имплантата и, следовательно, риска постимплантационного воспаления, некробиоза и других дегенеративных процессов, запускаемых иммунокомпетентными клетками пациента.

Соединительнотканый каркас – это сложная пространственно-ориентированная система структурных и функциональных белков экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ), составляющих механическую основу ткани. Компоненты ЭЦМ, а это в основном коллаген и эластин, не имеют видоспеци-

фичности и идентичны у большинства видов млекопитающих [6]. Источники тканей, из которых получают СТК, методы децеллюляризации и итоговой стерилизации разнообразны. Каждый из этих вариантов негативно влияет на строение и ультраструктуру матрикса, что в постимплантационном периоде может проявиться дисфункцией и/или несостоятельностью клапана и коротким сроком службы. На сегодняшний день разработана масса способов децеллюляризации материала, каждый из них имеет свои сильные и слабые стороны [7]. Согласно литературным источникам, для децеллюляризации клапаносодержащих сердечных аллогraftов чаще других используют ферментный и детергентный способы [10, 13, 14]. Цель нашей работы – изучение влияния детергентного и ферментного способов децеллюляризации на морфологию и биомеханические свойства экстрацеллюлярного матрикса.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом исследования послужили 30 клапаносодержащих фрагментов легочных стволов (ЛС), полученных из трупного материала с использованием «чистого», но не стерильного способа забора. Давность наступления смерти составляла в среднем  $13 \pm 2$  ч. Критерии забора тканей, противопоказания и параметры выбраковки определены согласно рекомендациям Европейского банка тканей [11]. После процедуры микродиссекции полученные аллогraftы помещали в раствор «лечения» на основе питательной среды RPMI-1640 («Биолот», Санкт-Петербург) с добавлением комплекса антимикробных препаратов широкого спектра действия в цитотоксических дозировках соответственно рекомендациям Европейского банка тканей [11]. Через 48 ч аллогraftы ополаскивали в фосфатном буфере (ФБ) с  $\text{pH} = 7,4$  и переносили в растворы для децеллюляризации.

Детергентным способом была обработана I группа аллогraftов, согласно А. Лихтенбергу и др. [13]. Легочные стволы ( $n = 10$ ) помещали в раствор, содержащий 0,5% дезоксихолата натрия («Sigma», США) и 0,5% додецилсульфата натрия («Helicon», Россия) на 24 ч. Далее следовала 6-кратная отмывка по 12 ч в ФБ для удаления остатков детергента и клеточного дебриса. Все этапы децеллюляризации проводили в термошейкере при  $3^\circ\text{C}$  при постоянном перемешивании со скоростью 160 об/мин. Ферментным способом с собственными модификациями обработали II группу графтов ( $n = 10$ ), согласно О. Тибкину и др. [14]. После ополаскивания в ФБ материал переносили в раствор Версена, содержащий 0,1% трипсина («Merck», Германия), и на 24 ч помещали в термошейкер при  $37^\circ\text{C}$ , после чего графт снова переносили в свежую среду с трипсином еще на 24 ч. Далее следовала отмывка материала в ФБ при температуре  $4^\circ\text{C}$  в течение суток при постоянном перемешивании. В качестве контроля (III группа;  $n = 10$ ) использовали размороженные криосохраненные аллогraftы, хранившиеся в питательной среде при  $4^\circ\text{C}$  с добавлением комплекса антимикробных препаратов.

Морфологическое исследование материала проводили по завершении процедуры децеллюляризации. Для этого с помощью криомикротомы «Microm HM550» («Carl Zeiss», Германия) получали серийные срезы толщиной 10 мкм, которые окрашивали гематоксилином-эозином. Для окраски ядерного материала использовали DAPI. Аппаратное обеспечение: микроскопы «Axiovert 200M» с видеокамерой «AxioCam HRC» и «Axioskop 40FL» с видеокамерой «AxioCam MRC», комплект программного обеспечения «Axiovision 4.7» («Carl Zeiss», Германия).

Тензометрические испытания аллогraftов проходили в филиале ЦКП «Механика» института гидродинамики им. М.А. Лаврентьева СО РАН. Физико-механические свойства аллогraftов исследовали в условиях продольного растяжения однотипно приготовленных образцов. Фрагменты стенок ЛС в виде полосок со стандартной длиной рабочего сегмента вырезали с помощью специального ножа. У всех образцов предварительно измеряли ширину и толщину. Исследование проводили на разрывной машине Z10 («Zwick/Roell», Германия). Одноосное однородное растяжение образцов с постоянной скоростью 10 мм/мин производили до момента появления видимого повреждения ткани. В результате экспериментов получали данные о разрушающей нагрузке и относительном удлинении, которые обрабатывали с помощью программного обеспечения SPSS 17 («IBM», США).

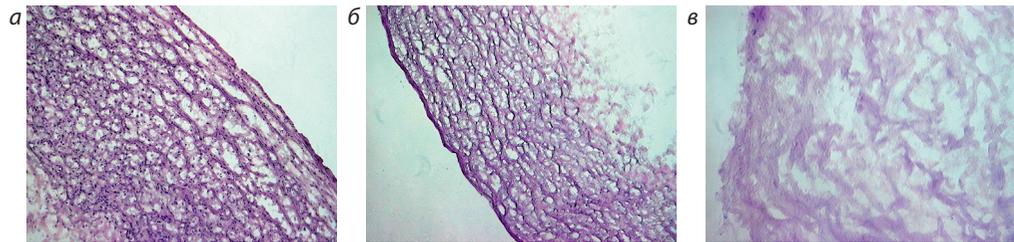
## РЕЗУЛЬТАТЫ

При микроскопическом анализе срезов стенок ЛС, окрашенных гематоксилином-эозином, в I группе ядра или какие-либо другие клеточные элементы не определялись (рис. 1), при этом базальная мембрана практически полностью сохранена и четко визуализирована. Во II группе в срезах очагами присутствовал остаточный ядерный материал, базальная мембрана была сильно фрагментирована, а местами вовсе отсутствовала. Кроме того, отмечали разволокнение и набухание тканевых элементов.

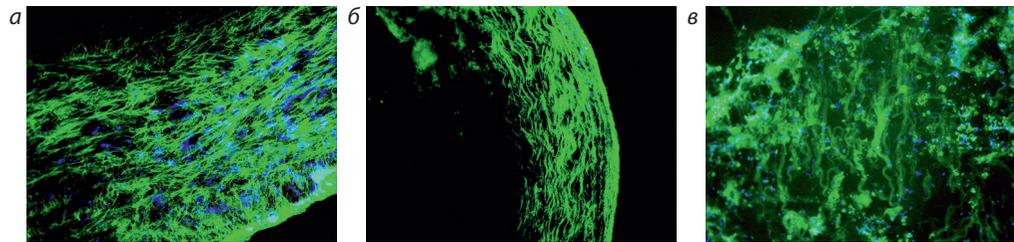
Указанная тенденция сохранялась и была подтверждена также после окраски ядерного материала препаратов с помощью DAPI на фоне аутофлуоресценции соединительнотканых волокон в двухканальном режиме (рис. 2). Во II группе сохранилось большое количество остаточного ядерного материала (показано синим цветом), а волокна СТК значительно изменены по своей конфигурации и взаимноориентации. В I группе при обработке детергентным способом компоненты ЭЦМ практически не изменены. Сохранена упорядоченная структура и радиальное расположение волокон. Однако необходимо отметить, что абсолютно полного удаления ядерного материала все же добиться не удалось.

Проведенное физико-механическое исследование показало, что средние значения максимальной разрушаю-

**Рис. 1.**  
 Поперечный срез  
 стенки ЛС (окрашен  
 гематоксилином-  
 эозином; объектив  $\times 20$ ):  
 а – контроль; децеллю-  
 ляризация: б – детерген-  
 тная; в – ферментная.



**Рис. 2.**  
 Двухканальная  
 съемка ЛС (сочетание  
 флуоресцентной окраски  
 клеточных ядер (DAPI)  
 и аутофлуоресценции  
 ЭЦМ; объектив  $\times 10$ ):  
 а – контроль; децеллюля-  
 ризация: б – детерген-  
 тная; в – ферментная.



щей нагрузки в группах контроля и детергентной обработки составляли  $16,07 \pm 3,06$  и  $13,33 \pm 2,04$  Н и значительно не различались, в то время как в группе с обработкой трипсином максимальное разрывное усилие составило  $6,93 \pm 1,54$  Н. Таким образом, мы можем говорить о выраженном снижении показателей прочностной характеристики стенки ЛС после ферментной обработки. В целом, наши данные свидетельствуют о том, что обработка исследуемого материала детергентным способом является более щадящим и тканесохраняющим методом в сравнении с ферментной децеллюляризацией.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Замена сердечных клапанов – это широко используемый метод хирургического лечения сердечной патологии. Несмотря на то что разработано большое количество видов протезов, зачастую именно реакция организма на чужеродный материал является самой большой проблемой. Именно этот фактор может резко ограничивать срок службы протеза. При использовании криосохраненных аллографтов возможной причиной дегенерации является иммунная реакция против живых клеток этих аллографтов. Соответственно, наша задача заключается в максимально полном удалении клеточной массы из исходного аллографта, но с максимально возможным сохранением биомеханических свойств. Тканеинженерные протезы на основе СТК, заселенные аутологичными клетками пациента, могут быть перспективны при создании нового типа клапана и лишены недостатков протезов предыдущих поколений.

Многие авторы используют ферментный способ децеллюляризации биологической ткани с ее дальнейшим про-

цессингом как основной [3, 4, 14, 15]. Однако, согласно результатам наших исследований, децеллюляризация ферментным способом имеет существенные недостатки. Так, в погоне за полной элиминацией остатков ядерного материала клеток дальнейшее увеличение концентрации трипсина и сроков экспозиции в растворе приводило к значительным повреждениям соединительной ткани, которые могли быть выявлены не только методами гистологии и тензометрическими испытаниями, но и при обычном визуальном контроле. Обработка ферментами ткани аллографта агрессивна и приводит к повреждению матрикса с нарушениями в базальной мембране [8].

Использование детергентов, однако, требует тщательной процедуры отмытки, так как они являются известными клеточными токсинами [12]. Тем не менее биомеханические свойства децеллюляризованного ЭЦМ, полученного по детергентной методике, более схожи с нативной тканью. Это дает нам основания предполагать, что тканевые структуры существенно не нарушены. Сохранение механической прочности матриксов клапанных аллографтов, обработанных таким способом, может обеспечить более адекватное сопротивление гемодинамической нагрузке в условиях физиологической циркуляции и будет способствовать более полной консолидации комплекса «сердце – аллографт» в организме и увеличению срока службы биологического протеза клапана сердца нового поколения.

Таким образом, децеллюляризация аллографтов детергентным способом (сочетание натрия дезоксицеллюлата и натрия додецилсульфата) является эффективным методом для удаления клеток из ткани аллографта в сравнении с ферментным способом. Полученные таким способом аллографты по своим морфо-

логическим и физико-механическим характеристикам не отличаются от криосохраненных аллографтов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Караськов А.М., Семенов И.И., Назаров В.М. и др. // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2003. № 1. С. 35–47.
2. Ларионов П.М., Литасова Е.Е., Титов А.Т. и др. // Патология кровообращения и кардиохирургия. 1999. № 1. С. 28–31.
3. Субботин Д.В., Ларионов П.М., Сергеевичев Д.С. и др. // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2008. № 4. С. 81–84.
4. Субботин Д.В., Ларионов П.М., Сергеевичев Д.С. и др. // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2009. № 4. С. 191–197.
5. Badylak S.F. // *Transplant. Immunol.* 2004. V. 12. P. 367–377.
6. Exposito J.Y., D'Alessio M., Solursh M. et al. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 15559–15562.
7. Gilbert T.W., Sellaro T.L., Badylak S.F. // *Biomaterials.* 2006. V. 27. P. 3675–3683.
8. Grauss R.W., Hazekamp M.G., Van Vliet S. et al. // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2003. V. 126, № 6. P. 2003–2010.
9. Hogan P., Duplock L., O'Brien M.F. // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1996. V. 112. P. 1260–1266.
10. Honge J.L., Funder J., Hansen E. et al. // *J. Cardiothorac. Surg.* 2011. V. 39. P. 829–834.
11. Jashari R., Goffin Y., Vanderkelen A. et al. // *Transplant. Proc.* 2010. V. 42. P. 183–189.
12. Kasimir M.T., Rieder E., Seebacher G. et al. // *Int. J. Artif. Organs.* 2003. V. 6, № 5. P. 421–427.
13. Lichtenberg A., Tudorache I., Cebotari S. et al. // *Biomaterials.* 2006. V. 27. P. 4221–4229.
14. Teebken O., Bader A., Steinhoff G. et al. // *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2000. V. 19. P. 381–386.
15. Wilczek P. // *Bul. Polish Acad. sciences technical sciences.* 2010. V. 58, № 2. P. 337–342.

**Васильева Мария Борисовна** – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории экспериментальной хирургии и морфологии ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздравсоцразвития России (Новосибирск).

**Сергеевичев Давид Сергеевич** – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией экспериментальной хирургии и морфологии ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздравсоцразвития России (Новосибирск).

**Юношев Александр Сергеевич** – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории высокоскоростных процессов НИИ гидродинамики им. М.А. Лаврентьева СО РАН (Новосибирск).

**Ларионов Петр Михайлович** – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник ФГБУ «Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии» Минздравсоцразвития России (Новосибирск).

**Новрузов Руслан Байрамович** – научный сотрудник лаборатории экспериментальной хирургии и морфологии ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздравсоцразвития России (Новосибирск).

**Караськов Александр Михайлович** – доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН, Заслуженный деятель науки РФ, директор ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздравсоцразвития России (Новосибирск).