

УДК 616.12-089.844:615.477.2

А.Г. Попандопуло, М.В. Петрова*

Исследование физических свойств и морфологических характеристик бесклеточного матрикса сосудисто-клапанных биопротезов[#]

UDC 616.12-089.844:615.477.2

A.G. Popandopulo, M.V. Petrova*

Examination of Physical Properties and Morphological Characteristics of Cell-Free Matrix of Vascular-Valve Bioprosthesis[#]

Ключевые слова: тканевая инженерия, децеллюляризация, ксенографт, экстрацеллюлярный матрикс.

Ключові слова: тканинна інженерія, децелюляризація, ксенографт, екстрацелюлярний матрикс.

Key words: tissue engineering, decellularization, xenograft, extracellular matrix.

Ежегодно болезни системы кровообращения уносят жизни миллионов людей, лидируя на протяжении последних двух десятилетий среди причин смерти. Все чаще, обсуждая эту ситуацию, специалисты называют ее современной эпидемией смертности от сердечно-сосудистых заболеваний. По данным ВОЗ в 2008 г. в мире от сердечно-сосудистых заболеваний умерло 17,5 млн человек (30% всех заболеваний) [4]. Часто единственно возможным вариантом спасения жизни пациента является замена поврежденного участка органа протезом.

Создание такого заменителя предполагает его значительную схожесть по структуре и функции с естественным клапаном или сосудом, что вполне реально благодаря развитию тканевой инженерии [2, 5]. Примером такого заменителя являются децеллюляризованные аллогенные или ксеногенные трансплантаты. Однако для полноценного выполнения своих функций будущий трансплантат наравне с минимизацией клеточной составляющей донорской ткани должен обладать неизменной структурой внеклеточного каркаса.

Межклеточный матрикс образует каркас органа и является универсальным «биологическим клеем», участвует в регуляции водно-солевого обмена. Его значение для нормального функционирования органа сложно переоценить. Таким образом, при условии сохранения матриксом морфофункциональных и физико-механических свойств можно предположить,

Each year, cardiovascular diseases claim the lives of millions of people, and are the prevailing cause of death for last two decades. More and more often the experts discussing the situation call it contemporary deathful epidemic of cardiovascular diseases. According to the WHO, in 2008 the world count of fatal cases caused by cardiovascular diseases reached 17.5 million people (30% of all diseases) [4]. Often the only option to save a patient's life is a replacing the injured part of an organ by prosthesis.

The creation of such a substitute implies a high similarity in structure and function to the natural valve or vessel, which is entirely possible due to the development of tissue engineering [2, 5]. As an example of such substitutes could serve decellularized allogeneic or xenogeneic transplants. However, to perform its functions in full, the supposed graft along with the minimal content of cells from donor tissue should have an unchanged structure of extracellular matrix.

Intercellular matrix forms the framework of an organ and is an universal 'biological glue', also it is involved into the regulation of water-salt metabolism. Its importance for the normal functioning of the organ is difficult to overstress. Thus, upon preservation of matrix morphofunctional and physico-mechanical properties it can be assumed as suitable for further use as scaffold for cardiovascular prosthesis.

The purpose of the study was to obtain morphologically unchanged cell-free matrix for vascular graft

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

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

[#]Данное исследование было представлено на минисимпозиуме «День стволовой клетки», проходившем 24 мая 2013 года в г. Киеве.

Поступила 15.06.2013
Принята в печать 30.08.2013

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №3. – С. 275–278.
© 2013 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

V.K. Gusak Institute of Urgent and Recovery Surgery of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Donetsk, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:
47, Leninsky ave., Donetsk, Ukraine 83045;
e-mail: pmv-07@yandex.ru

[#]This research was presented at minisymposium Stem Cell Day, held in Kiev, Ukraine, on the 24th of May, 2013.

Received June, 15, 2013
Accepted August, 30, 2013

Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – Vol. 23, Nr. 3. – P. 275–278.
© 2013 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

что он пригоден для дальнейшего использования в качестве каркаса сердечно-сосудистого протеза.

Цель исследования – получение морфологически неизменного бесклеточного матрикса сосудисто-клапанного графта, способного к адекватному упругопрочностному ответу на прогнозируемое физическое воздействие *in vivo*.

Исследование проводили с использованием сердец 4–6-месячных свиней. Сосудисто-клапанные графты выделяли в стерильных условиях в среднем через 4 ч после забора сердца. В течение последующих 2-х суток полученные образцы подвергали воздействию апоптоз-индуцирующего раствора ЭДТА («Sigma», США) в концентрации 10 мМ. По истечении указанного времени экспозиции образцы тщательно отмывали в среде с содержанием солей в концентрации, близкой к физиологической. Контрольная (интактная) группа образцов не подвергалась действию апоптоз-индуцирующего раствора.

Образцы затем окрашивали согласно стандартным методикам гематоксилином и эозином, по Вергофу для оценки состояния эластических волокон, а также проводили PAS-реакцию для оценки состояния коллагеновых волокон. Физико-механические свойства матрикса (прочность и эластичность сосудистой стенки) изучали при помощи специальной нагнетательной установки [1]. Тестируемый графт закрепляли на ниппеле диаметром, соответствовавшем диаметру имплантата; края сосуда плотно фиксировали нитью, а затем с малой скоростью нагнетали воздух в сосуд до момента его разрыва и получали диаграммы зависимости давления разрыва от времени.

Протекание апоптоза приводит к появлению определенных морфологических признаков, которые можно увидеть с помощью световой микроскопии [3]. Гистологическое исследование тканей образцов, прошедших этап децеллюляризации, показало наличие признаков апоптоза: уменьшение общего количества клеток, выраженные морфологические изменения в ядрах (кариопикноз, кариорексис), что свидетельствовало об успешной инициации апоптоза (рис. 1). Клетки контрольных (интактных) образцов имели нормальную морфологию, характерную для фибробластов: вытянутые веретенообразной формы клетки с овальным ядром.

Гистологический анализ препаратов после специфического окрашивания на составляющие

valve capable of adequate elastic-strength response to the supposed physical impact *in vivo*.

The study was performed using the hearts of 4–6-month-old pigs. Vascular and valvular grafts were isolated under sterile conditions, 4 hours after the excision of the heart in average. During the subsequent 2 days the samples were exposed to an apoptosis-inducing EDTA solution (Sigma, USA) in concentration of 10 mM. After this exposure the samples were thoroughly washed in medium containing salts in concentrations close to the physiological. The control (intact) group of samples was not exposed to the apoptosis-inducing procedure.

The samples were afterwards stained according to standard techniques with hematoxylin and eosin, and according to Verhoeff to assess the state of elastic fibers, as well as PAS-reaction was carried-out to evaluate the state of collagen fibers. Physical and mechanical properties of the matrix (the strength and elasticity of the vascular wall) were studied using a special pressure-producing device [1]. The tested graft was placed on the pin with diameter corresponding to the one of the implant, the edge of the vessel were tightly fixed using thread, and then air was slowly pumped into the vessel until its disruption, thereafter dependencies of disruption pressure *vs.* time were plotted.

The progress of apoptosis leads to the appearance of certain morphological signs that can be seen by light microscopy [3]. Histological examination of tissue samples underwent the decellularization revealed the signs of apoptosis: reduction of the total number of cells, marked morphological changes in nuclei (karyopyknosis, karyorrhexis), *i. e.* successful initiation of apoptosis (Fig. 1). The cells of the control (intact) samples had normal morphology typical for fibroblasts: elongated spindle-shaped cells with oval nuclei.

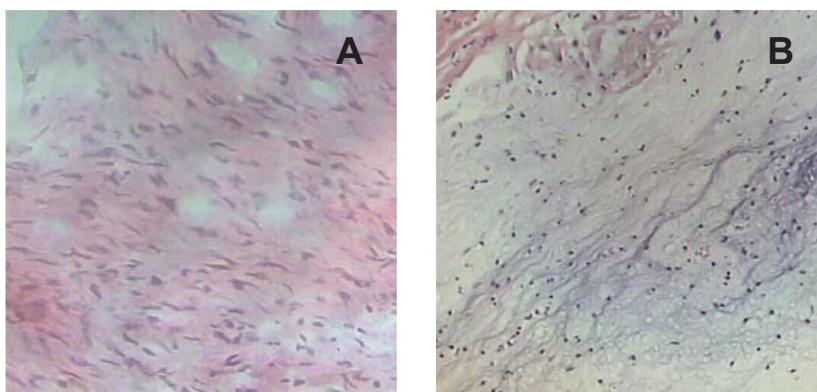


Рис. 1. Гистологический препарат клеток ксенографта. Окраска гематоксилином и эозином; $\times 400$. **А** – контрольный (интактный) образец; **В** – образец после обработки ЭДТА.

Fig. 1. Histological section of xenograft cells. Staining with hematoxylin and eosin; $\times 400$. **A** – control (intact) sample, **B** – sample after treatment with EDTA.



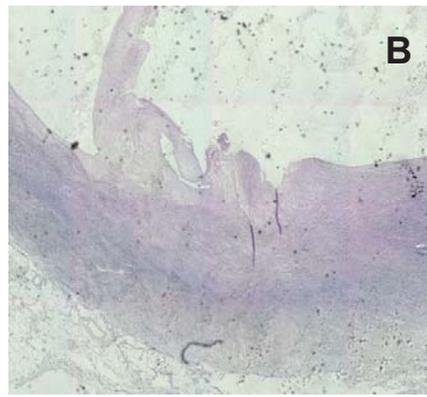
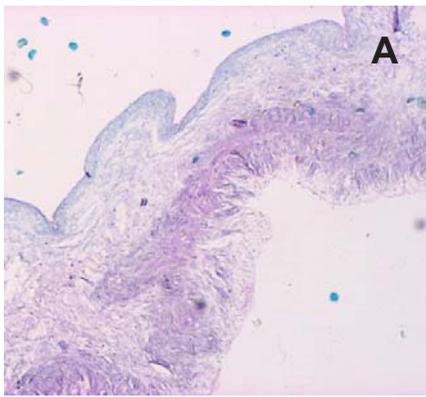


Рис. 2. Специфическое окрашивание гистологического препарата на внеклеточный матрикс (PAS-реакция на коллаген), $\times 300$: **A** – контрольный (интактный) образец; **B** – образец после обработки ЭДТА.

Fig. 2. Specific staining of the histological section for revealing extracellular matrix (PAS-reaction to collagen), $\times 300$: **A** – control (intact) sample, **B** – sample after treatment with EDTA.

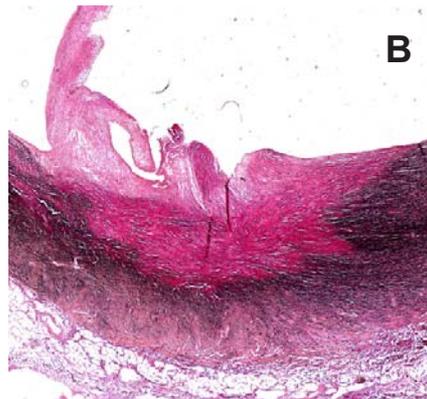


Рис. 3. Специфическое окрашивание гистологического препарата на внеклеточный матрикс (окраска по Вергофу на эластин), $\times 300$: **A** – контрольный (интактный) образец; **B** – образец после обработки ЭДТА.

Fig. 3. Specific staining of the histological section for revealing extracellular matrix (Verhoeff staining to elastin), $\times 300$: **A** – control (intact) sample, **B** – sample after treatment with EDTA.

экстрацеллюлярного матрикса показал сохранность структуры коллагеновых и эластиновых волокон после децеллюляризации. В срезах ткани аорты и фиброзного кольца наблюдалась PAS-позитивная реакция (рис. 2), наиболее выраженная в области створки клапана.

Окрашивание эластиновых волокон по Вергофу было получено на участке стенки аорты (темно-бордовый цвет) и области створки клапана (малиновый цвет) (рис. 3).

Позитивные результаты специфической окраски внеклеточного матрикса позволяют предположить о его физиологической целостности после децеллюляризации. Матрикс сохранил свои морфофункциональные свойства и, следовательно, при условии сохранения им физико-механических свойств, будет пригоден для дальнейшего использования в качестве каркаса сердечно-сосудистого протеза.

Предварительный анализ физико-механических свойств внеклеточного матрикса обработанных образцов показал их сохранность на уровне, близком к контрольному, что может свидетельствовать о прочности стенок сосуда, достаточной для выдерживания внутрисосудистого давления *in vivo*. Так, стенка аорты, подвергнутая децеллюляризации по описанной схеме, выдерживала давление порядка 115–120 КПа

Histological analysis of the sections after specific staining for extracellular matrix showed the preservation of collagen and elastin fibers structure after decellularization. Tissue sections of aorta and fibrous ring had PAS-positive reaction areas (Fig. 2), the most evident it was in the valve leaflet area.

Staining of elastic fibers according Verhoeff was successful in aorta wall area (maroon color) and in valve leaflet area (crimson color) (Fig. 3).

Positive specific staining of extracellular matrix allowed to suggest its physiological integrity after decellularization. The matrix preserved its morphofunctional properties and therefore, if its physical and mechanical properties were also preserved, it would be suitable for further use as a scaffold for cardiovascular prosthesis.

Preliminary analysis of the physical and mechanical properties of the extracellular matrix of the treated samples showed their preservation at a level close to the control, which might indicate the strength of the vessel wall as sufficient to withstand intravascular pressure *in vivo*. For example, the aorta wall subjected to decellurization as described above, withstood the pressure of the order of 115–120 kPa (863–900 mm Hg), and the wall of the control aorta sample withstood the pressure of 180 kPa (1350 mm Hg). We are continuing the studies to confirm the observed regularities.

(863–900 мм рт. ст.), а стенка контрольного образца аорты – в 180 КПа (1350 мм рт. ст.). Мы продолжаем исследования для подтверждения отмеченных закономерностей.

Литература

1. Автономова Л.В., Дергун С.М., Гончарова Г.А. и др. Механические испытания на растяжение и внутреннее давление сосудов имплантантов // Вестник НТУ «ХПИ»: Сборник научных трудов. Тематический выпуск «Динамика, прочность машин». – 2009. – №30. – С. 3–7.
2. Акатов В.С., Муратов Р.М., Фадеева И.С. и др. Изучение биосовместимости трансплантатов сердца, девитализированных антикальцинозным способом // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. V, №2. – С. 36–41.
3. Райс Р.Х., Гуляева Л.Ф. Биологические эффекты токсических соединений: курс лекций. – Новосибирск: Новосибир. гос. ун-т, 2003. – 208 с.
4. Сердечно-сосудистые заболевания. Информационный бюллетень №317. Март 2013 г. [Электронный документ] // [веб-сайт] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/ru/> (15.04.2013).
5. Schmidt D., Stock U.A., Hoerstrup S.P. Tissue engineering of heart valves using decellularized xenogeneic or polymeric starter matrices // Phil. Trans. R. Soc. B. – 2007. – Vol. 362. – P. 1505–1512.

References

1. Avtonomova L.V., Dergun S.M., Goncharova G.A. Mechanical testing of tensile strength and internal pressure of vessel implants // Bulletin of National Technical University 'Kharkov Polytechnical Institute'. Collection of Scientific Papers. Special Issue 'Dynamics and Strength of Machines'. – 2009. – N30. – P. 3–7.
2. Akatov V.S., Muratov R.M., Fadeeva I.S. et al. Biocompatibility study of heart valves transplants devitalized by anticalcinosis method // Cell Transplantation and Tissue Engineering. – 2010. – Vol. V, N2. – P. 36–41.
3. Rais A.D., Gulyaeva L.F. Biological effects of toxic compounds: lectures. – Novosibirsk: Novosibirsk State University, 2003. – 208 p.
4. Cardiovascular diseases (CVDs). Fact sheet №317. Updated March 2013 [Electronic document] // [web site] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> (14.04.2013).
5. Schmidt D., Stock U.A., Hoerstrup S.P. Tissue engineering of heart valves using decellularized xenogeneic or polymeric starter matrices // Phil. Trans. R. Soc. B. – 2007. – Vol. 362. – P. 1505–1512.

