

DOI: 10.15825/1995-1191-2015-1-74-85

ТКАНЕВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ АТРИОВЕНТРИКУЛЯРНОГО КЛАПАНА: ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННАЯ МАТРИЦА НА МОДЕЛИ МИТРАЛЬНОГО АЛЛОГРАФТА ОВЦЫ

П.П. Яблонский^{1, 2, 3}, С. Чеботарь¹, И. Тудораки¹, А. Хилфiker¹, С.М. Яшин³,
А. Хаверих¹

¹ Медицинский университет Ганновера

² Санкт-Петербургский государственный университет, медицинский факультет

³ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, кафедра госпитальной хирургии № 2 с клиникой

Цель: разработка тканево-инженерной матрицы заменителя атриовентрикулярного клапана с использованием децеллюляризованного аллогraftа. **Материалы и методы.** Работа была выполнена на овечьих митральных клапанах (n = 100). Клапаны были изъятые и децеллюляризованы целиком с использованием 21-го протокола, основанного на различных детергентных растворах. Эффективность децеллюляризации оценивалась при помощи иммунофлуоресцентного анализа на ДНК, маркер внутриклеточных антигенов и на эпитоп α -GAL как маркер мембран-ассоциированных антигенов, а также с помощью количественного анализа ДНК. Выполнены механические испытания полученной матрицы на одноосное растяжение. Проведен тест на способность к репопуляции аллогенными эндотелиальными клетками. Для оценки структуры матрицы и степени ее репопуляции во время цитотоксического теста выполнялись гистологические окраски гематоксилином и эозином, по Мовату и по Ван-Гизону, а также ИФА на коллаген I, IV и маркеры эндотелиальных клеток. **Результаты.** Наиболее эффективными для децеллюляризации цельного митрального аллогraftа показали себя протоколы, в которых концентрация детергентного раствора постепенно повышалась. Однако и этот метод оказался неэффективным в отношении мембран-ассоциированного эпитопа α -GAL. Восстанавливающий агент позволил значительно улучшить результаты, полностью элиминировав ДНК и α -GAL, а абсолютное количество ДНК в тканях было уменьшено на 96,4%. Механические испытания выявили сопоставимые свойства нативных и децеллюляризованных клапанов, а при высеве на створки последних эндотелиальных клеток к 7-м суткам культивации их поверхность была покрыта монослоем клеток. **Заключение.** Полученные результаты позволяют констатировать возможность создания матрицы для протеза атриовентрикулярного клапана с использованием децеллюляризованного аллогraftа, обладающего сопоставимыми с нативным клапаном механическими свойствами и потенциалом к репопуляции. Комбинация детергентного раствора восходящих концентраций и восстанавливающего агента эффективнее для децеллюляризации цельного митрального клапана, чем чистый детергентный раствор.

Ключевые слова: тканевая инженерия, митральный клапан.

TISSUE ENGINEERING OF THE ATRIOVENTRICULAR VALVE: DECELLULARIZED MATRIX IN OVINE MITRAL ALLOGRAFT MODEL

P.P. Iablonskii^{1, 2, 3}, S. Cebotari¹, I. Tudorache¹, A. Hilfiker¹, S.M. Yashin³, A. Haverich¹

¹ Medical High school Hannover

² St.-Petersburg State University, Medical Faculty

³ 1st St.-Petersburg State Medical University, Department for Hospital Surgery № 2

Aim. Development of the tissue engineered matrix for the atrioventricular valve graft in a large animal model. **Materials and methods.** The study was performed on ovine mitral valves (n = 100). The decellularization of the whole mitral valve grafts was performed using 21 different detergent-based protocols.

Для корреспонденции: Яблонский Павел Петрович. Адрес: 194017, г. Санкт-Петербург, Костромской пр., 11–125. Тел. (906) 260 22 47. E-mail: pavel.yablonski@gmail.com.

For correspondence: Iablonskii Pavel Petrovich. Address: 194017 St.-Petersburg, Kostromskoy pr., 11–125. Tel. (906) 260 22 47. E-mail: pavel.yablonski@gmail.com.

The effectiveness of the decellularization was investigated by immunofluorescent staining for DNA (as a marker of intracellular antigens) and α -GAL (as a marker of membrane-associated antigens), as well as DNA quantification. The mechanical properties and the repopulation potential were analyzed. The structure and repopulation rate analysis included hematoxylin-eosin, Movat's pentachrome and Van Gieson histological staining, and immunofluorescent staining for collagen I and IV, as well as endothelial cell markers. **Results.** The protocols that included the gradual rise of the detergent solution were shown to be the most effective for the decellularization of the whole mitral valve graft. At the same time, the detergents alone failed to remove α -GAL. The reducing agent enhanced the decellularization, which resulted in complete removal of DNA and α -GAL, according to immunofluorescent staining. DNA quantification showed a 96.4% reduction in DNA content. The mechanical properties were shown to be comparable to the native tissue. The reseeded of the decellularized tissue showed a potential for the repopulation. **Conclusions.** A new matrix for the atrioventricular valve substitute could be developed using the decellularization as the initial step of the valve tissue engineering. The detergent combined with a reducing agent showed significantly better results compared to the detergents alone for the mitral valve decellularization. The matrix demonstrated mechanical properties, comparable with the native one, and the potential for the repopulation.

Key words: tissue engineering, mitral valve.

ВВЕДЕНИЕ

Митральный клапан является вторым после аортального по частоте поражения, и соответственно, по количеству хирургических вмешательств на нем. Только в Германии в 2011 году было выполнено 2500 протезирований митрального клапана. Важно отметить, что не менее $\frac{3}{4}$ от общего количества имплантированных клапанов составили биологические протезы [1]. Несомненными их преимуществами являются биосовместимость, более физиологичная гемодинамика, отсутствие необходимости пожизненного приема антикоагулянтов. Высокий риск тромбозмболических и геморрагических осложнений антикоагулянтной терапии дополняет картину принципиальных недостатков механических клапанных протезов [2]. В то же время главный недостаток биологических клапанов связан с их недолговечностью [3].

Наибольшие трудности вызывает выбор протеза для больных моложе 60 лет. Традиционно применяемые механические протезы создают трудности для женщин детородного возраста в вопросах планирования семьи. Для больных детского возраста любой протез с жестким каркасом оборачивается необходимостью его замены в очень короткие сроки [4–6].

В то же время в мире созданы и успешно применяются к клинике легочные и аортальные аллогraftы, разработанные с применением элементов тканевой инженерии. Так, пятилетние результаты их клинического использования показали способность протезов к росту вместе с организмом реципиента и отсутствие необходимости в повторных вмешательствах [7, 8, 25].

В связи с этим целью настоящей работы явилась разработка тканево-инженерной матрицы заменителя атриовентрикулярного клапана с использованием децеллюляризованного аллогraftа на модели овцы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа была выполнена на крупных животных – овцах – в строгом соответствии с Европейской директивой 2010/63/EU.

Работа выполнялась в лабораторных условиях, *in vitro*, на митральных клапанах овец ($n = 96$), эксплантированных в стерильных условиях. В табл. 1 показано, как были использованы полученные митральные аллогraftы (МА).

Таблица 1

Распределение МА по видам работ

Вид работы	Количество МА
Создание методики децеллюляризации	68
Определение количества ДНК	10
Цитотоксический тест	4
Механические испытания	14
Всего	96

Создание тканевой матрицы включало создание метода децеллюляризации с контролем его эффективности, а также оценку биологических и механических свойств полученной матрицы.

Децеллюляризация

Клапаны забирались целиком в стерильных условиях, включая обе створки с фиброзным кольцом и каймой мышцы левого предсердия шириной 3–5 мм, хорды и папиллярные мышцы. Затем производилась децеллюляризация МА. Был использован 21 вариант растворов, различающихся по используемым компонентам, их концентрации и времени экспозиции (табл. 2). Проанализирован эффект различных детергентов в нескольких концентрациях, а в последней серии использовался β -меркаптоэтанол, разрушающий дисульфидные связи в молекулах белков.

Таблица 2

Методы, используемые при децеллюляризации овечьего МА

	Метод децеллюляризации	Серия 1, n = 8	Серия 2, n = 5	Серия 3, n = 4	Серия 4, n = 18	Серия 5, n = 29
1	0,025% SDS + 0,025%SD	2 × 12 ч				
2	0,05% SDS + 0,05%SD	2 × 12 ч				
3	0,1% SDS + 0,1%SD	2 × 12 ч				
4	0,2% SDS + 0,2%SD	2 × 12 ч	3 × 12 ч	5 × 8 ч		
5	0,3% SDS + 0,3%SD	2 × 12 ч	3 × 12 ч	5 × 8 ч		
6	0,4% SDS + 0,4%SD	2 × 12 ч	3 × 12 ч	5 × 8 ч		
7	0,5% SDS + 0,5%SD	2 × 12 ч	3 × 12 ч	5 × 8 ч	5 × 8 ч	
8	Восходящие концентрации с прекондиционированием Дистиллированная вода 0,2% SDS + 0,2%SD 0,3% SDS + 0,3%SD 0,4% SDS + 0,4%SD 0,5% SDS + 0,5%SD				8 ч 8 ч 8 ч 8 ч 8 ч	8 ч 8 ч 8 ч 8 ч 8 ч
9	0,5% SDS с прекондиционированием Дистиллированная вода 0,5% SDS				8 ч 5 × 8ч	
10	0,5% SDS + 0,5%Triton X100				6 × 8ч	
11	Восходящие концентрации с прекондиционированием и восстанавливающим агентом Дистиллированная вода 0,2% SDS + 0,2%SD + 25 mMβ-ME 0,3% SDS + 0,3%SD + 25 mMβ-ME 0,4% SDS + 0,4%SD + 25 mMβ-ME 0,5% SDS + 0,5%SD + 25 mMβ-ME					6 ч 12 ч 12 ч 12 ч 12 ч

Качество децеллюляризации оценивалось как с помощью световой микроскопии (окраска гематоксилином-эозином), так и при помощи иммунофлуоресцентного анализа (ИФА): окраска на ДНК – DAPI, Invitrogen; α-GAL–DyLight 594 Bandeiraea Simplicifolia Lectin I Isolectin B4, Vector Laboratories. Для оценки степени повреждения межклеточного вещества выполнялась окраска по Мовату, по Ван-Гизону, а также иммунофлуоресцентные окраски на коллаген I и IV типа (соответственно C2345 clone COL-I, Sigma, и M0785 clone CI22, DAKO). После эксплантации выполнялись вышеперечисленные гистологические окраски, а также ИФА на маркеры эндотелиальных клеток (CD31 – моноклональный мышиный IgG_{2a}, Serotec; vWF – поликлональный кроличий IgG, Dako; eNOS – моноклональный мышиный IgG₁, eNOS/NOS Type III, BD Transduction Laboratories).

Определение количества ДНК

Для определения количества ДНК было использовано по три фрагмента створок каждого ДМА, в качестве контроля выступали два свежих МА, приготовленных аналогично. Для выделения ДНК из ткани использовался набор DNeasy Blood&Tissue Kit (QIAGEN N.V.) в соответствии с рекоменда-

циями компании-производителя. Подсчет количества ДНК в полученных растворах осуществлялся спектрофотометром NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) с прилагающимся комплектом программного обеспечения.

Цитотоксический тест

Для исключения остаточной токсичности использованного раствора был проведен цитотоксический тест. Было подготовлено 8 клапанов, децеллюляризованных с помощью финального протокола и эндотелиальных клеток (ЭК) овцы, развившихся из предшественников эндотелиальных клеток, полученных из периферической крови взрослой овцы. Клетки производили белок, обладающий красной флуоресценцией (RFP, red fluorescent protein). Методики получения овечьих ЭК и трансфекции RFP с помощью лентивируса описаны ранее [9]. Из каждого клапана было иссечено по два фрагмента (зоны A2, P2), каждый был помещен в отдельную лунку 12-луночных панелей, фиксирован металлическим кольцом. В качестве положительного контроля использовались две лунки, покрытые желатином. В каждую лунку высевались 32 000 клеток на 1 см² в среде EGM (Lonza). Клетки культивировались при температуре 39 °C, при содержании CO₂ в атмос-

фере 5%. Смена среды производилась ежедневно, после фотосъемки (микроскоп BX40F, Olympus) с цветной камерой AxioCamMRc (Carl Zeiss). После окончания формирования монослоя из фрагментов створок приготавливались гистологические препараты, выполнялись окраски: гематоксилином и эозином, по Мовату, а также ИФА для подтверждения эндотелиальной природы клеток (eNOS, vWF, CD31).

Механические испытания

Для механических тестов были использованы 7 свежих и 7 децеллюляризованных МА. Испытания проводились на аппарате Zwick/Roell Z 0.5 (Zwick/Roell). Использовался радиально-ориентированный фрагмент зоны A2 с размером испытываемой части $5 \times 2,5$ мм (соотношение сторон 2:1). Методика исследования была описана ранее [10].

Оценивались следующие значения: переходная деформация (ϵ_{Tr} , %) и соответствующее ей значение силы (σ_{Tr} , МПа), предельная деформация (ϵ_{UTS} , %), предельное значение силы (σ_{UTS} , МПа), модуль эластичности ткани в начальном (эластическом) и конечном (коллагеновом) отрезках кривой зависимости деформации от нагрузки. Затем производилась нормализация значения силы относительно площади поперечного сечения испытываемого образца.

Статистический анализ

Данные представлены как значение $\pm$ стандартное отклонение. Статистический анализ проводился с использованием парного критерия Стьюдента для малых выборок при помощи пакета STATISTIKA 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Децеллюляризация

В табл. 3 показано влияние различных методов децеллюляризации на МА.

Из таблицы видно, что ни один из растворов не оказывал значимого влияния на гистологическую структуру МА (СМ), а также волокна коллагена I, визуализируемые при ИФА. Также показано, что детергенты в концентрации менее 0,2% не приводят к разрушению клеточного ядра, а концентрации 0,2–0,5% при 24-часовой экспозиции разрушают клетки, но не элиминируют фрагменты ядер (СМ), что подтверждалось ИФА, визуализировавшим большое количество ДНК, как свободных, так и в составе ядер, а также α -GAL.

Использование 0,2–0,5%-растворов с увеличенной на 50% экспозицией – до 36 ч – привело к полному отсутствию ядер клеток в образцах (СМ). Но при ИФА во всех структурах митрального кла-

пана выявлялось большое количество свободных ДНК и эпитоп α -GAL.

В третьей серии экспериментов показано, что учащение смены раствора на 1/3 при незначительном, всего на 4 часа, увеличении суммарной экспозиции клапана раствору детергентов приводило к существенному повышению эффективности процесса. Однако сокращение количества ДНК и α -GAL в тканях, выявленных при ИФА, по-прежнему было недостаточным. В то же время отмечено, что МА, подвергшийся обработке 0,5% SDS+0,5% SD, имел несколько большую флюоресценцию DAPI при ИФА, чем МА, децеллюляризованный в 0,4% SDS+0,4% SD, при неизменности гистологической картины.

В четвертой серии экспериментов концентрация детергентов постепенно повышалась при каждой смене раствора – с минимально эффективного уровня, на котором мицеллы еще не образуются (для SDS – 0,2%, или 6,94 мМ), до максимально эффективного – 0,5%, после предварительной обработки дистиллированной водой, вызывающей осмотический шок. Было достигнуто практически полное отсутствие визуализируемых при ИФА нуклеиновых кислот, однако сохранялось значительное количество визуализируемого эпитопа α -GAL.

В пятой серии экспериментов использовался децеллюляризирующий раствор с восстанавливающим агентом – β -меркаптоэтанолом, денатурирующим вторичную и третичную структуру белков за счет разрушения дисульфидных связей посредством восстановления образующих их сульфогидрильных групп. Гистологически была выявлена полная децеллюляризация с сохранением структуры всех компонентов клапана (рис. 1–3). По результатам ИФА срезов, ДНК и α -GAL не были обнаружены (рис. 4). ИФА является качественным методом анализа, поэтому в дополнение к нему была выполнена количественная оценка концентрации ДНК с помощью спектрофотометра. Без использования ДНазы уровень ДНК в децеллюляризованных клапанах снизился на 71,2% ($82,9 \pm 48,2$ нг/мг против $287,8 \pm 76,5$ нг/мг, $p < 0,01$), а после обработки ферментом – на 96,4% ($10,4 \pm 16,9$ нг/мг, $p < 0,01$). ИФА на коллаген I не выявил различий в сравнении со свежим МА (рис. 5), а по результатам ИФА 3 препаратов с антителами к коллагену IV типа было отмечено некоторое снижение интенсивности окраски, тем не менее флюоресценция АТ к коллагену IV прослеживалась на всем протяжении створки митрального клапана с обеих сторон и хорд (рис. 6).

Цитотоксический тест

Для цитотоксического теста использовались МА, децеллюляризованные с помощью финаль-

Таблица 3

Влияние метода децеллюляризации на митральный аллогraft

Параметр	Раствор (номер/серия эксперимента)																				
	1/1	2/1	3/1	4/1	4/2	4/3	5/1	5/2	5/3	6/1	6/2	6/3	7/1	7/2	7/3	7/4	8/4	8/5	9/4	10/4	11/5
Разрушение ядер (СМ)	–	–	–	–	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Удаление фрагментов ядер (СМ)	–	–	–	–	–	+	–	–	+	–	–	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+
Удаление ДНК (ИФА)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–	+	+
Удаление α-GAL (ИФА)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
Изменение структуры матрикса (СМ)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Изменение структуры коллагена I (ИФА)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Изменение структуры коллагена IV (ИФА)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	±

Примечание. СМ – световая микроскопия, ИФА – иммунофлюоресцентный анализ).

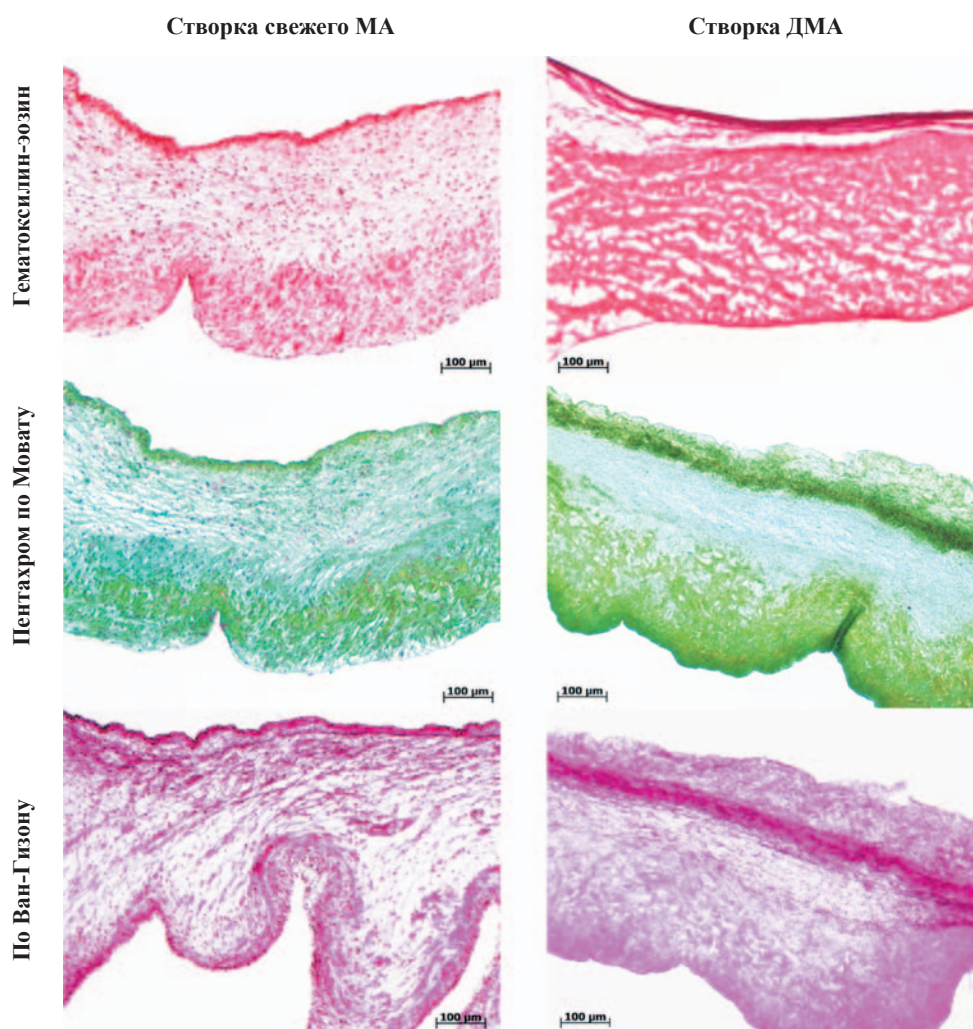


Рис. 1. Гистологическая картина передней створки свежего (МА) и децеллюляризованного (ДМА) митрального аллогraftа

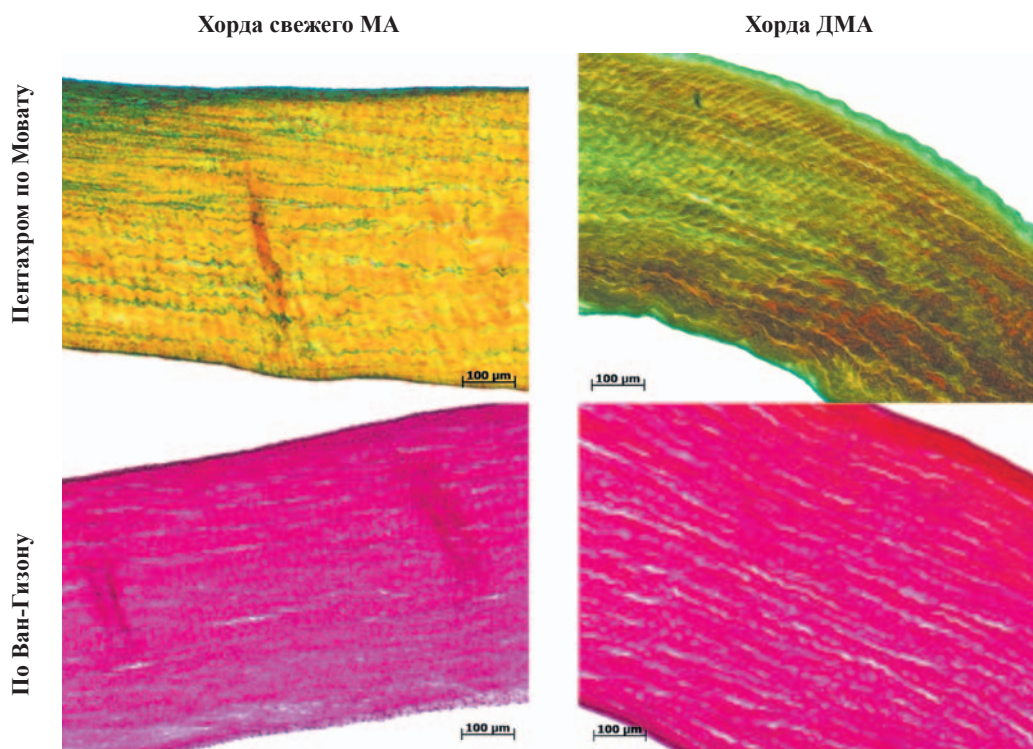


Рис. 2. Гистологическая картина хорды первого порядка свежего МА и ДМА

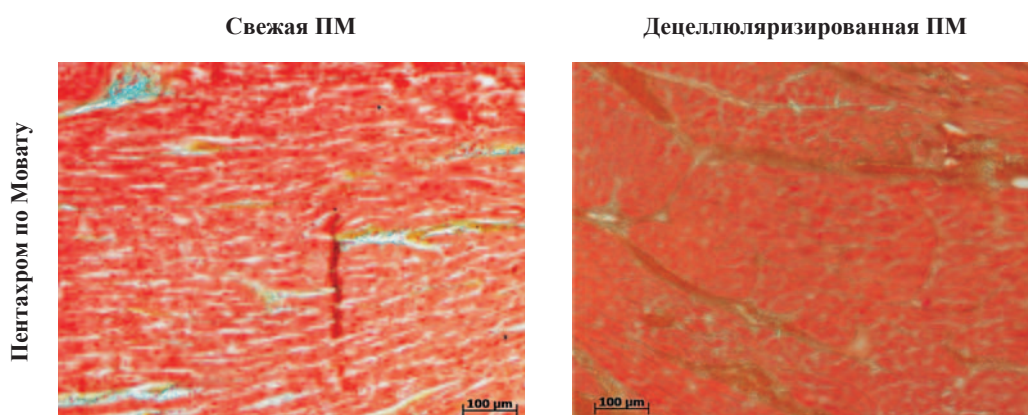


Рис. 3. Гистологическая картина папиллярной мышцы свежего МА и ДМА

ного раствора (11/5). Микрофотографии клеток, сделанные в 1-е сутки после начала эксперимента, показали равномерное распределение одиночных клеток по поверхности створки МА, аналогичное контрольной лунке. Первые колонии обнаруживались уже на 3-й день культивации, и к 7-му дню все фрагменты клапанов были покрыты монослоем клеток (рис. 7), имеющим вид булыжной мостовой, типичный для эндотелиальных клеток. После окончания эксперимента из засеянных фрагментов створок были приготовлены препараты для световой микроскопии и ИФА. Окраски по Мовату и гематоксилином и эозином показали, что клетки располагаются равномерным однорядным слоем по поверхности створки ДМА. Эндотелиальная природа

клеток на поверхности фрагментов клапанов была подтверждена при ИФА. Клетки были положительны на типичные для ЭК антигены CD31, фактор фон Виллебранда, эндотелиальную NO-синтазу.

Механические свойства

Толщина створок митрального клапана в результате децеллюляризации составила $0,35 \pm 0,06$ мм против $0,24 \pm 0,11$ мм у свежего МА; $p = 0,074$.

Значения σ_{UTS} для децеллюляризованных образцов оказались выше, чем для свежих – $1,23 \pm 0,35$ МПа против $2,16 \pm 0,42$ МПа ($p < 0,001$), так же, как и модуль эластичности ткани в коллагеновой фазе кривой – $5,5 \pm 1,26$ против $8,29 \pm 2,86$ ($p = 0,04$).

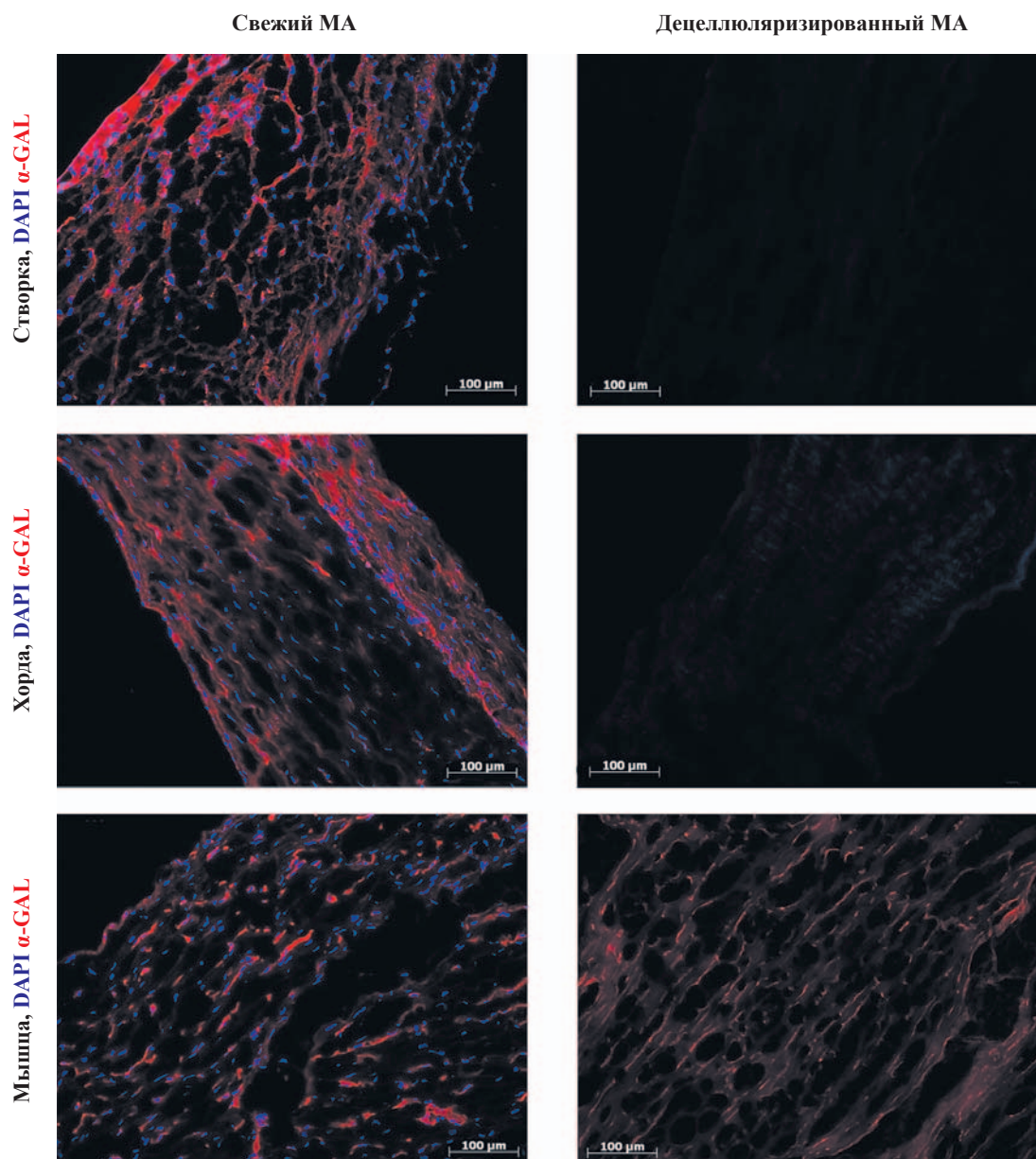


Рис. 4. Иммунофлуоресцентный анализ свежего МА и ДМА. Синяя флюоресценция – ДНК, красная флюоресценция – эпитоп α -GAL

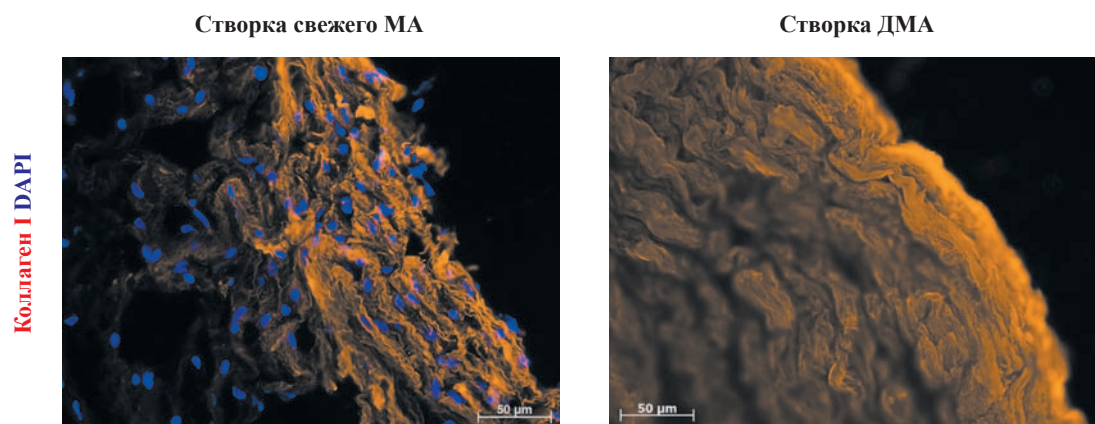


Рис. 5. Иммунофлуоресцентный анализ свежего МА и ДМА. Синяя флюоресценция – ДНК, желтая – коллаген I

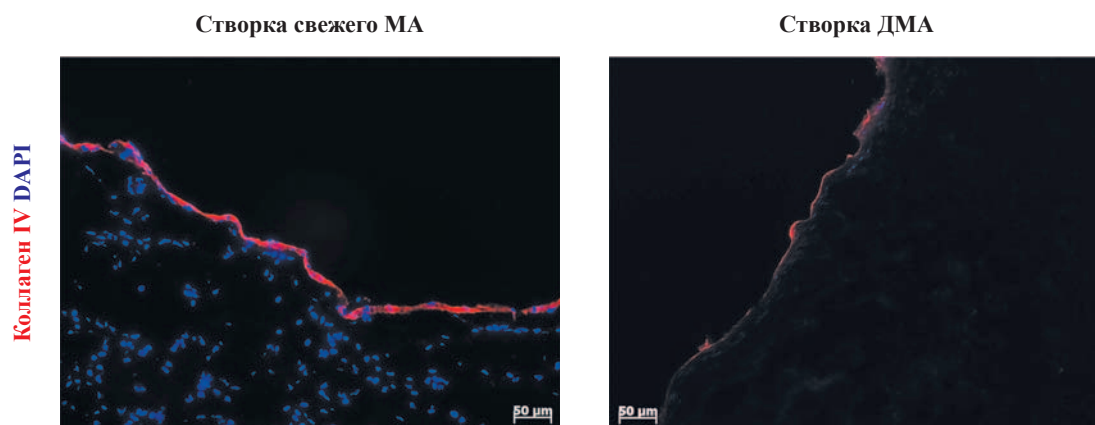


Рис. 6. Иммунофлюоресцентный анализ свежего МА и ДМА. Синяя флюоресценция – ДНК, красная – коллаген IV

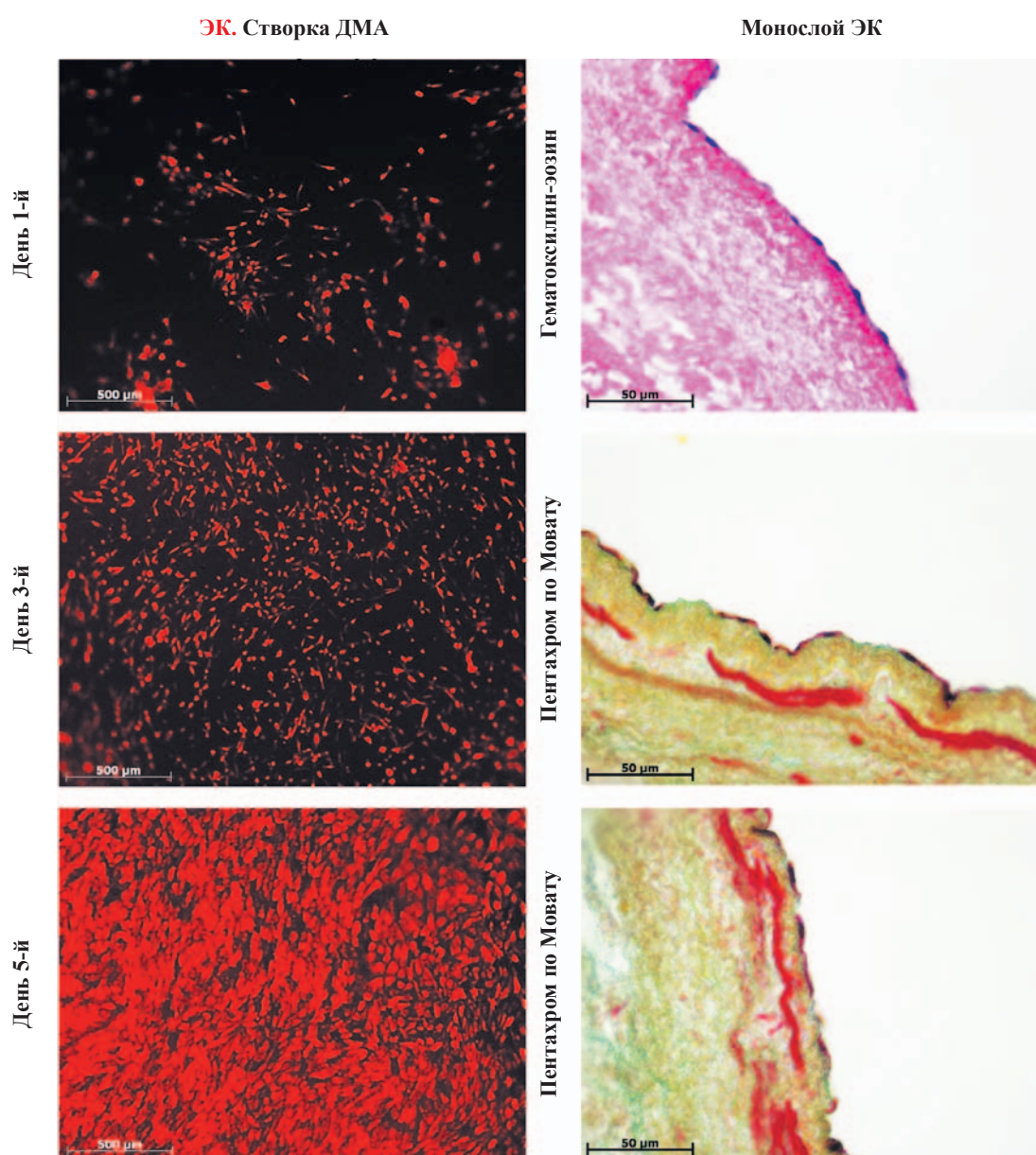


Рис. 7. Цитотоксический тест. Слева – флюоресцентная микроскопия колоний эндотелиальных клеток (ЭК) на поверхности ДМА. Красная флюоресценция – цитоплазма живой клетки. Справа – световая микроскопия препаратов после завершения цитотоксического теста. На поверхности ДМА – слой эндотелиальных клеток

С другой стороны, изменения в остальных показателях не были статистически достоверны. Так, отмечалось некоторое увеличение показателей ϵ_{Tr} ($0,1 \pm 0,05$ vs $0,18 \pm 0,09$; $p = 0,15$) и σ_{Tr} ($0,12 \pm 0,05$ МПа vs $0,24 \pm 0,08$ МПа; $p = 0,08$), а также ϵ_{UTS} ($0,3 \pm 0,09$ vs $0,44 \pm 0,1$, $p = 0,09$) и модуля эластичности в начальной (эластиновой) части кривой ($0,39 \pm 0,28$ vs $0,67 \pm 0,55$, $p = 0,46$). Данные представлены на рис. 8.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящий момент идет активный поиск нового заменителя для сердечных клапанов. И если для аортальной и легочной позиции были предложены

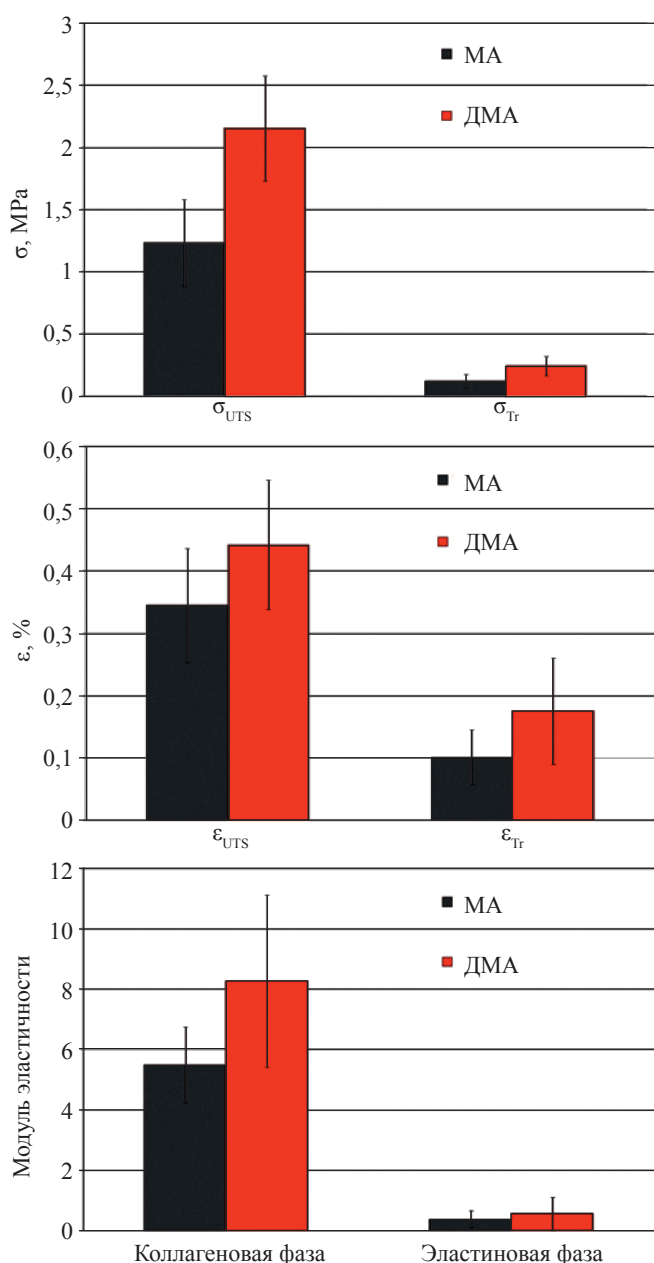


Рис. 8. Результаты механических испытаний свежего МА и ДМА. Объяснения в тексте

сразу несколько типов протезов, как основанных на донорской ткани [6–8], так и синтетических [11], то для атриовентрикулярных клапанов по-прежнему используются традиционные типы заменителей. Использование же криосохраненных МА очень ограничено и не дает преимуществ по сравнению с ксеногенными биологическими протезами [12].

Для оценки ДМА в соответствии с поставленными задачами была выбрана модель крупного животного. Из всех широко известных моделей крупного животного, использующихся в экспериментальных работах по сердечной и легочной хирургии, – обезьяна, собака, свинья, овца – была выбрана именно последняя. Помимо уже упомянутого сходства физиологических и гемодинамических параметров (давление в большом и малом кругах кровообращения, объемы и давления в полостях сердца) овца обладает ускоренным кальциевым метаболизмом, что позволяет в короткие сроки оценить устойчивость клапанного протеза к биодеградации и кальцификации, и соответственно, его долговечность. Исследования, проведенные ветеринарами в 1970-х годах, показали, что уровень кальция и фосфора в сыворотке крови овец в возрасте 5–7 месяцев превышает таковой у человека в 1,5–2 раза. [13] Эта особенность делает модель овцы лучшей для испытания как алло-, так и ксеногенных трансплантатов, в том числе и сердечных клапанов, позволяя в короткие сроки получить данные, соответствующие отдаленным результатам у человека.

Децеллюляризация митрального аллогraftа представляет более сложной по сравнению с легочным или аортальным аллогraftами, используемыми в клинической практике на протяжении более чем десяти лет. Митральный клапан состоит из створок, хорд и папиллярных мышц – все эти элементы призваны противостоять очень высокому давлению – в отличие от аортального клапана, максимальный градиент давлений у здорового человека на котором равен 80 мм рт. ст. и фиксируется в диастолу, митральному клапану необходимо выдерживать систолическое давление не менее 120 мм рт. ст. Кроме того, вследствие таких различий условий функционирования толщина створки митрального клапана 240 мкм, в 3 раза больше таковой у аортального, что, безусловно, усложняет децеллюляризацию.

Головки папиллярных мышц служат местом прикрепления хорд митрального клапана к миокарду. После иссечения их из миокарда они теряют кровоснабжение, и с хирургической точки зрения представляют собой только якорь для фиксации донорских хорд к папиллярным мышцам реципиента. При изучении гистологических препаратов свежих папиллярных мышц было установлено, что волокна, формирующие хорды, после вхождения в мио-

кард распадаются на отдельные пучки и теряются в миокарде уже на глубине 1,5–2 мм от эндокарда. Такой небольшой объем ткани слишком мал для наложения хирургического шва, поэтому необходимо сохранить большее количество мышцы, что является еще одной особенностью, влияющей на децеллюляризацию – для эффективного разрушения клеток в мышце и вымывания из нее антигенов было необходимо увеличить общее время экспозиции растворов.

Детергенты как основной компонент раствора для децеллюляризации были выбраны из-за их способности разрушать клетки и вымывать из ткани их компоненты, с одной стороны, и малого влияния на внеклеточный матрикс. В литературе описаны различные другие группы агентов, используемых с той же целью: ферменты, кислоты и основания, гипо- и гипертонические растворы, спирты, хелатирующие вещества, а также различные физические методы воздействия [14]. Все они действительно способны разрушить клетки, однако самой по себе гибели клеток недостаточно для адекватного снижения иммуногенности тканей, что приводит к их ранней биодеградации – это известно, например, по результатам имплантации аортальных кондуитов Synergraft [15]. С другой стороны, многие из упомянутых агентов (ферменты, кислоты и основания) негативно влияют на внеклеточный матрикс, ослабляя его механическую прочность [14].

Таким образом, необходимым сочетанием свойств – эффективное разрушение клеток, удаление клеточного детрита и минимальное воздействие на внеклеточный матрикс – обладают именно детергенты. По данным литературы, анионные детергенты, SDS и дезоксихолат натрия, являются очень эффективными агентами для децеллюляризации клапанов и сосудов из-за их высокой проникающей и моющей способности, что и продиктовало их выбор для обработки митрального аллогraftа, содержащего, в том числе, и плотные соединительно-тканые структуры [16, 17].

Однако, как показали первые этапы работы, детергенты не полностью решают задачу вымывания антигенных структур из ткани клапана. Причиной этого, вероятнее всего, является неспособность элиминировать белковые структуры, фиксированные к внеклеточному матриксу – как известно, именно белки и ассоциированные с ними полисахариды ответственны за большую часть иммунного ответа реципиента. Известно, что дезоксихолат натрия не влияет на структуру белка, а SDS способен денатурировать только четвертичную и третичную структуры [17]. Таким образом, одним из способов увеличения количества вымываемых из ткани белков может являться полная денатурация их структуры. Для этого в децеллюляризующий раствор был

введен дополнительный агент – β -меркаптоэтанол. Он разрушает дисульфидные связи, денатурируя белок до первичной структуры. Впервые восстанавливающий агент, дитиотреитол, был использован с этой целью Wong и соавт. [18, 19]. В этой работе на небольших фрагментах перикарда было показано, что восстанавливающие агенты способны значительно увеличить количество вымываемых из ткани белков, и соответственно, улучшить результат децеллюляризации. Эти данные полностью согласуются с результатами настоящей работы.

Принято считать, что сохранение базальной мембраны в процессе децеллюляризации в дальнейшем облегчает адгезию и пролиферацию клеток на поверхности клапана. Теоретически базальная мембрана, а именно один из двух ее основных компонентов, коллаген IV типа, может быть элиминирован из ткани восстанавливающими агентами, поскольку в основе его полимеризации лежат дисульфидные связи. Именно они наравне с лизин-гидроксиминовыми связями позволяют четырем трехспиральным мономерам коллагена IV типа образовывать тетрамерную структуру, взаимодействуя N-концевыми участками [20]. С другой стороны, в работе Reddy et al. [21], несмотря на неверную гипотезу о наличии дисульфидных связей между C-концевыми NC1-участками коллагена IV типа, было показано, что межмолекулярное взаимодействие при формировании димеров устойчиво к крайне высоким концентрациям β -меркаптоэтанола (до 35–40%) и SDS (2%). Позже было установлено, что взаимодействие C-концевыми NC1-участками с формированием димеров происходит исключительно благодаря гидрофильно-гидрофобному взаимодействию, и соответственно, вообще не подвергается восстановлению β -меркаптоэтанолом. Таким образом, дисульфидные связи являются только одним из трех типов взаимодействий, участвующих в полимеризации коллагена IV типа, что позволило предположить наличие устойчивости этого белка к небольшим концентрациям восстанавливающих агентов, что и было подтверждено ИФА децеллюляризованных структур митрального клапана [20].

Данные механических испытаний ДМА согласуются с описанными в литературе [22, 23], а также с ранее полученными результатами для аортальных и легочных клапанов [24, 25]. Некоторое увеличение предельной силы и модуля эластичности в начальной части кривой объясняется некоторым уменьшением толщины створки, что дает статистически значимые различия после нормализации абсолютных значений этих параметров относительно толщины створки.

Токсические эффекты детергентов и возможности их уменьшения были изучены нашей группой ранее [26]. Поэтому проведенный цитотоксический тест был направлен только на изучение токсическо-

го эффекта β-меркаптоэтанола и показал возможность репопуляции ДМА, что было подтверждено по результатам испытаний *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработанная методика создания матрицы заменителя атриовентрикулярного клапана на модели овцы с использованием технологии децеллюляризации как начального этапа тканевой инженерии биологического аллогенного протеза оказалась эффективной. Полученные результаты на данном этапе позволяют говорить о некоторых преимуществах полученной матрицы над классическим ксенографтом, однако требуются продолжительные эксперименты *in vivo* для оценки отдаленных результатов ее имплантации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Herzbericht 2011: Schoenende Herzoperationen im Kontext des demographischen Bevoelkerungswandels. Deutsche Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie.
2. Cevik C, Izgi C, Dechyapirom W, Nugent K. Treatment of prosthetic valve thrombosis: rationale for a prospective randomized clinical trial. *J. Heart. Valve Dis.* 2010; 19: 161–170.
3. Hoffmann G, Lutter G, Cremer J. Durability of bioprosthetic cardiac valves. *Dtsch. Arztebl. Int.* 2008; 105: 143–148.
4. Erez E, Kanter KR, Isom E, Williams WH, Tam VK. Mitral valve replacement in children. *Journal of Heart and Valve Disease.* 2003; 12: 25–29; discussion 30.
5. Caldarone CA, Raghuvver G, Hills CB, Atkins DL. Long-Term Survival after Mitral Valve Replacement in Children Aged <5 Years. *Circulation.* 2001; 104: I-143–I-147.
6. Миролюбов ЛМ, Мулдашев ЭР, Нигматуллин РТ, Шангина ОР и др. Новый тип гомографта. Первый опыт применения. *Практическая медицина.* 2013; 71: 74–76. Mirolyubov LM, Muldashev ER, Nigmatullin RT, Shangina OR et al. A new type of homograft. First Experiment. *Prakticheskaya meditsina.* 2013; 71: 74–76. [English Abstract].
7. Cebotari S, Tudorache I, Ciubotaru A et al. Use of fresh decellularized allografts for pulmonary valve replacement may reduce the reoperation rate in children and young adults: early report. *Circulation.* 2011; 124: S115–S123.
8. da Costa FD, Dohmen PM, Duarte D et al. Immunological and echocardiographic evaluation of decellularized versus cryopreserved allografts during the Ross operation. *European Journal of Cardiothoracic Surgery.* 2005; 27: 572–578.
9. Vukadinovic-Nikolic Z, Andree B, Dorfman SE, Pflaum M, Horvath T et al. Generation of bioartificial heart tissue by combining a three-dimensional gel-based cardiac construct with decellularized small intestinal submucosa. *Tissue Eng Part A.* 2014; 20: 799–809^a.
10. Korossis S, Booth C, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN et al. Tissue engineering of cardiac valve prostheses II: biomechanical characterization of decellularized porcine aortic heart valves. *Journal of Heart and Valve Disease.* 2002; 11: 463–471.
11. Weber B, Dijkman PE, Scherman J, Sanders B, Emmer MY, Grünenfelder J et al. Off-the-shelf human decellularized tissue-engineered heart valves in a non-human primate model. *Biomaterials.* 2013; 34: 7269–7280. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.04.059.
12. Nappi F, Spadaccio C, Chello M, Lusini M, Acar C. Impact of Structural Valve Deterioration on Outcomes in the Cryopreserved Mitral Homograft Valves. *J. Card. Surg.* 2014; XX: 1–7.
13. Long CH, Ullrey DE, Miller ER, Vincent BH, Zutaut CL. Sheep hematology from birth to maturity. III. Serum calcium, phosphorus, magnesium, sodium and potassium. *Journal of animal Science.* 1965; 24: 145–150.
14. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* 2011; 32: 3233–3243. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
15. Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U et al. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *European Journal of Cardiothoracic Surgery.* 2003; 23: 1002–1006. DOI: 10.1016/S1010-7940(03)00094-0
16. Hayworth D. Detergents for Cell Lysis and Protein Extraction. Protein Methods Library. Thermo Scientific. <http://www.piercenet.com/method/detergents-cell-lysis-protein-extraction>.
17. Bhuyan AK. On the Mechanism of SDS-Induced Protein Denaturation. *Biopolymers.* 2009; 93: 186–199. DOI 10.1002/bip.21318
18. Wong ML, Leach JK, Athanasiou KA, Griffiths LG. The role of protein solubilization in antigen removal from xenogeneic tissue for heart valve tissue engineering. *Biomaterials.* 2011; 32: 8129–38.
19. Wong ML, Leach JK, Athanasiou KA, Griffiths LG. Stepwise solubilization-based antigen removal for xenogeneic scaffold generation in tissue engineering. *Acta Biomaterialia.* 2013; 9: 6492–501.
20. Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG. Mammalian Collagen IV. *Microscopy Research and Technique.* 2008; 71: 357–370.
21. Reddy GK, Hudson BG, Bailey AJ, Noelken ME. Reductive cleavage of the disulfide bonds of the collagen IV noncollagenous domain in aqueous sodium dodecyl sulfate: absence of intermolecular nondisulfide cross-links. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1993; 190: 277–282. PMID: 8422253.
22. Grashow JS, Yoganathan AP, Sacks MS. Biaxial stress-stretch behavior of the mitral valve anterior leaflet at physiologic strain rates. *Ann. Biomed. Eng.* 2006; 34: 315–325.
23. Grande-Allen KJ, Liao J. The Heterogeneous Biomechanics and Mechanobiology of the Mitral Valve: Implications for Tissue Engineering. *Current Cardiology Report.* 2011; 13: 113–120.

24. Tudorache I, Cebotari S, Sturz G, Kirsch L, Hurschler C, Hilfiker A et al. Tissue Engineering of Heart Valves: Biomechanical and Morphological Properties of Decellularized Heart Valves. *The Journal of Heart Valve Disease*. 2007; 16: 567–574.
25. Бобылев ДО, Чеботарь С, Тудораче И, Хаверих А. Тканевая инженерия клапанов сердца: новые возможности и перспективы. *Кардиология*. 2011; 51: 50–56. Bobylev DO, Cebotari S, Tudorache I, Haverich A. Tissue Engineering of Heart Valves: New Opportunities and Challenges. *Kardiologiya*. 2011; 51: 50–56. [English Abstract].
26. Cebotari S, Tudorache I, Jaekel T, Hilfiker A, Dorfman S, Ternes W et al. Detergent Decellularization of Heart Valves for Tissue Engineering: Toxicological Effects of Residual Detergents on Human Endothelial Cells. *Artificial Organs*. 2010; 34: 206–210.

Статья поступила в редакцию 05.02.2015 г.