

ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ПРОТЕЗИРОВАНИЯ КЛАПАНОВ СЕРДЦА

HISTOLOGICAL EVALUATION OF BIOLOGICAL TISSUES USED FOR HEART VALVE PROSTHESIS

**F. Gamaeva
A. Musukaeva
K. Khachetlova**

Summary. In modern medicine, the importance of plastic material for reconstructive interventions can hardly be overestimated. The most suitable material is cadaveric allograft, a tissue ideal in structure, hemodynamics, and organ compatibility. In this study, we investigated the issue of preimplantation processing of valve allografts for cardiac hock prosthetics. The main principle of processing is the complete removal of donor cellular elements with preservation of the connective tissue matrix intact. The aspects of aortic allograft strength and quality of its decellularization were studied on the model of 10 porcine aortic roots. A native porcine root served as a control, and a decellularization group and a decellularization group supplemented with supercritical CO₂ treatment served as the study group. It was found out that decellularization according to the scheme «digitonin+EDTA» did not affect the allograft strength, and additional application of supercritical treatment in CO₂ allowed to get rid of the remaining cellular elements — loci of further calcinosis.

Keywords: histology, histoarchitectonics, assessment of elastic strength characteristics, decellularization.

Современные техники реконструкции запира-тельных элементов сердца позволяют выполнить максимально анатомичное клапансохраняющее вмешательство и достичь выживаемости пациента сопоставимой с таковой в общей популяции [1].

Наряду с реконструктивной хирургией, активно развивается протезирование клапанов сердца, которое остается достаточно востребованным вмешательством в кардиохирургия (в настоящее время до 60 тысяч пациентов нуждаются в замене аортального клапана) [2].

Как при реконструкции, так и при замене клапанов сердца, необходим качественный биологический материал, обеспечивающий высокую свободу от протез-зависимых осложнений. На сегодняшний день нет доста-

Гамаева Фатима Баталовна
кандидат ветеринарных наук, доцент,
Кабардино-Балкарский государственный университет
им. Х.М. Бербекова, г. Нальчик
gamaevafatima53@gmail.com

Мусукаева Анжелика Баталовна
Кабардино-Балкарский государственный университет
им. Х.М. Бербекова, г. Нальчик
anzhela.musukaeva@mail.ru

Хачетлова Карина Казбековна
Кабардино-Балкарский государственный университет
им. Х.М. Бербекова, г. Нальчик
karina.urusbambetova@yandex.ru

Аннотация. В современной медицине важность пластического материала для реконструктивных вмешательств трудно переоценить. Наиболее подходящим материалом является трупный аллографт — идеальная по структуре, гемодинамике и органной совместимости ткань. В данном исследовании изучен вопрос предимплантационной обработки клапанных аллографтов для протезирования запира-тельных структур сердца. Основным принципом обработки является полное удаление клеточных элементов донора с сохранением в неизменном виде соединительнотканного матрикса. Изучены аспекты прочности аортального аллографта и качество его децеллюляризации на модели 10 свиных корней аорты. В качестве контроля выступал нативный свиной корень, в качестве группы изучения — группа децеллюляризации и группа децеллюляризации, дополненной сверхкритической обработкой CO₂. Выявлено, что децеллюляризация по схеме «дигитонин+ЭДТА» не влияет на прочность аллографта, а дополнительное применение сверхкритической обработки в CO₂ позволяет избавиться от оставшихся клеточных элементов — локусов дальнейшего кальциноза.

Ключевые слова: гистология, гистоархитектоника, оценка упругопрочностных характеристик, децеллюляризация.

точно качественного биологического материала для производства каркасных и бескаркасных клапанных протезов, заплат [3].

Наиболее перспективным является материал, полученный от организма того же вида, так называемый аллографт. Клапанные аллографты обеспечивают идеальное соответствие протез — пациент, обладают анатомией, сходной с нативной, при этом, обеспечивают наилучшие показатели гемодинамики (эффективную площадь открытия створок аортального клапана, минимальный транклапанный градиент, возможность циклической деформации структур) [4].

Клапанные аллографты, применяемые с 60-х годов прошлого столетия, отлично зарекомендовали себя

в лечении тяжелых пороков, так как обеспечивали высокую свободу от протезного эндокардита, тромботических осложнений.

Однако, применение аллографтов было лимитировано невозможностью их правильной предоперационной подготовки, обработки.

Предыдущие исследования продемонстрировали обширные возможности по модификации свойств биологической ткани для ССХ [1-5]. В арсенале производителей медицинских изделий есть технологии по снижению иммуногенности материала, увеличению его прочности, замедлению отложения депозитов гидроксиапатита, повышению способности к репопуляции клетками пациента.

Одним из важных свойств биологической ткани является механическая устойчивость к циклическим деформациям (более 1 миллиона циклов открытия — закрытия за 1 неделю). Считается, что именно механическая устойчивость является наиболее важным фактором продолжительного срока службы протеза.

Кроме того, считается, что наличие клеточных элементов (как живых клеток, так и их «обломков») является фактором, способствующим более раннему отказу протеза вследствие его деградации. Удаление клеточных элементов с сохранением матрикса неповрежденным — важная задача, находящаяся в плоскости гистологии, тканевой инженерии.

Отсюда актуальность работы — изучение упругопрочностных характеристик, а также гистоархитектоники биологической ткани, подготовленной разными способами, является первым этапом в создании биопротезов клапанов сердца с более высокой свободой от протеззависимых осложнений.

Цель исследования заключается в оценке гистологических и механических характеристик биологической ткани на модели клапанных элементов сердца животного.

Данное исследование является экспериментальным. В нем мы оценивали гистологические и упругопрочностные характеристики биологических тканей, обработанных различными способами.

Изучали гистологические характеристики ткани створок аортального клапана, извлеченного из сердца взрослой свиньи. Материалом для эксперимента послужили сердца, полученные при сотрудничестве с ГБУ «Кабардино-Балкарский центр ветеринарной медицины» структурного подразделения Республиканской ветеринарной лаборатории, с которым было заключено соответствующее соглашение о поставке 10 сердец массой 200–300 кг (всего было поставлено 10 сердец). Сердца транспортировались в лабораторию учреждения в контейнере с физиологическим раствором и гепарином. Выполнялось препаровка сердца, выделялся корень аорты, из которого иссекались створки аортального клапана. Далее каждая из трех створок была препаратом для дальнейшего изучения. Было сформировано 3 группы.

Группа 1 («девитализация + удаление клеточных элементов с помощью сверхкритического CO_2 »).

Под девитализацией мы понимали обработку створки в 500 мл 10 мМ стерильного раствора ЭДТА с добавлением 50 мг дигитонина при pH раствора 6,0. Экспозиция в растворе продолжалась в течение 2 дней, при этом емкость с девитализирующимися створками была установлена на магнитную мешалку, в связи с чем, раствор постоянно перемешивался, что поддерживало его гомогенность и помогало в проникновении девитализирующих агентов вглубь ткани.

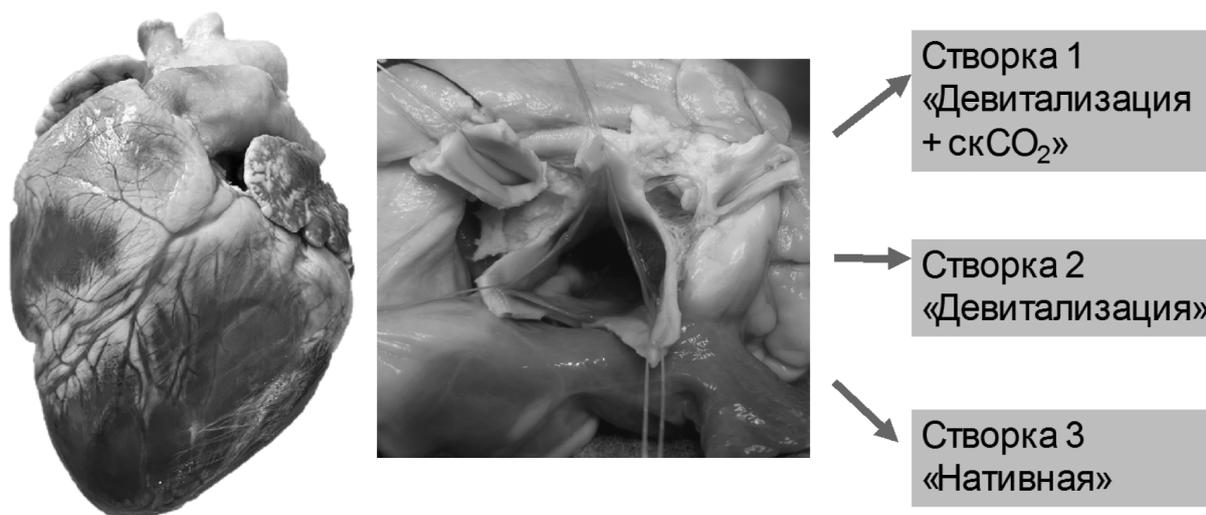
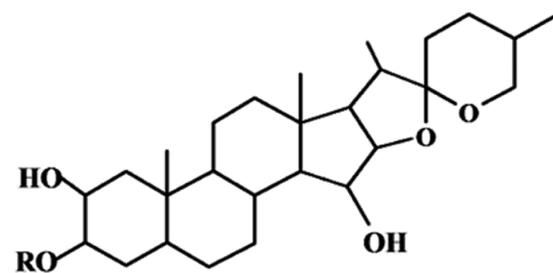


Рис. 1. Препаровка створок аортального клапана

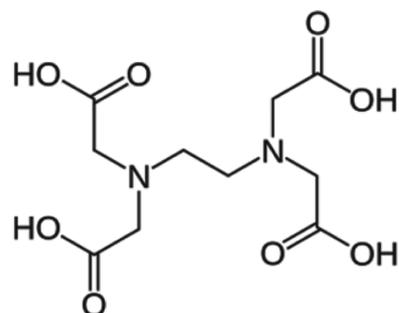


Магнитная мешалка



Дигитонин

R = -ксилоза-(галактоза)₂-(глюкоза)₂-



ЭДТА

Дигитонин
Рис. 2. Девитализация

Под сверхкритическим состоянием CO₂ мы понимали такое состояние замкнутой системы, в которой углекислый газ находился при температуре 31,1°C и давлении свыше 7,4 Мпа (в среднем 8,1 ± 1,1 Мпа). В таких условиях он принимал свойства жидкости и газа. Сочетание двух данных свойств давало тот эффект, что диоксид углерода достаточно хорошо проникал вглубь ткани аллогraftа (проявляя свойство газа) и одновременно с этим достаточно хорошо «вымывал» клеточные элементы (или так называемые «обломки» клеток), оставшиеся в матриксе аллогraftа после девитализации.

Группа 2 («девитализация»). В данной группе исследовали створки, подвергшиеся только девитализации по схеме, описанной ранее

Группа 3 («нативная створка»). В данной группе исследовали нативные створки, только извлеченные из сердца свиньи сразу после транспортировки в лабораторию.

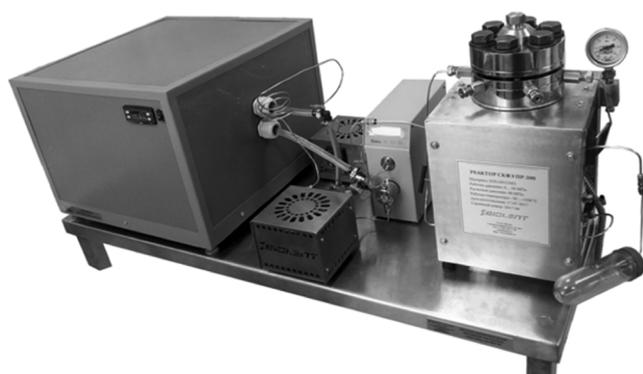
В каждой группе оказалось по 10 створок. Группы были вполне сопоставимы по размеру створок, размеру фиброзного кольца аортального клапана, возрасту животного, полу, так как каждое сердце было источником для биоматериала в каждую из групп сравнения.

Материалы и методы оценки створок

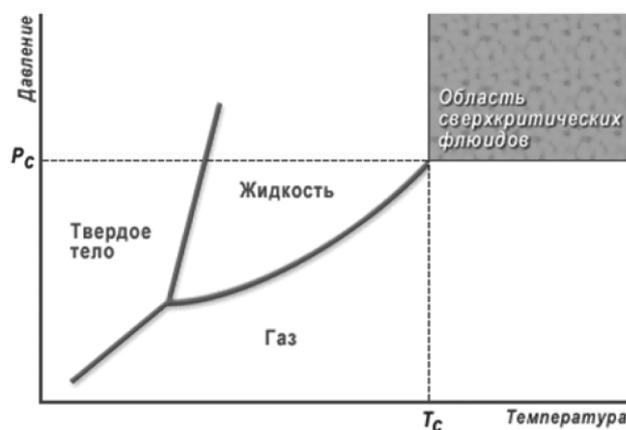
Оценка упруго прочностных характеристик проводилась на разрывной машине. Было исследовано 5 рандомных образцов створок

Оценка наличия клеток и их жизнеспособности проводилась методом микроскопии препаратов, окрашенных флуоресцентным красителем. Было исследовано 5 оставшихся образцов створок.

Ноеchst 33342 — зеленый краситель, который проникал в клетки и связывался с хроматином, «подсвечивая» живые клетки.



а



б

Рис. 3. Сверхкритическая установка

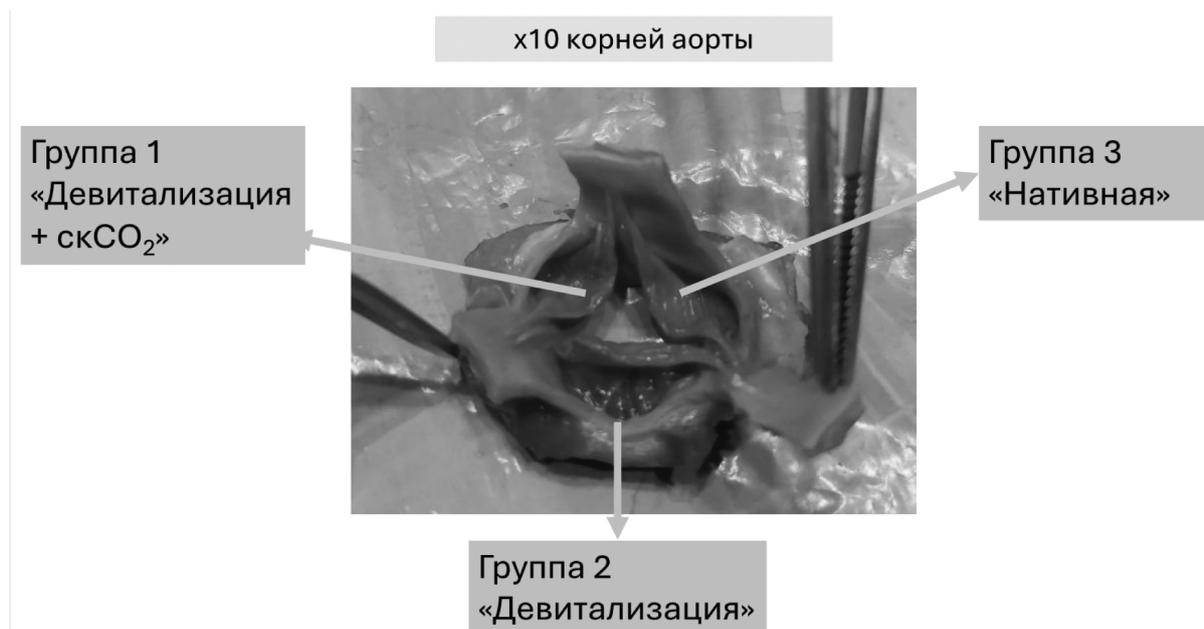


Рис. 4. Дизайн формирования сопоставимых групп сравнения

Этидиумбромид, красный флуоресцентный краситель, проникающий через поврежденную мембрану, окрашивает ядра мертвых клеток в красный цвет (в то время как в живых клетках не накапливается или «выкачивается»)

На проведение исследование было получено разрешение локального этического комитета (протокол заседания 1 от 22. 11. 2024)

Результаты исследования представлены в таблице 1.

Оценивая таблицу 1, можно сделать вывод, что упруго прочностные характеристики в целом не менялись при обработке как с помощью девитализации, так и при девитализации, дополненной обработкой сверхкритическим CO₂. Однако, девитализация статистически значимо увеличивала упругие свойства аллогraftа. В настоящее время нет данных о том, каким образом данный факт может влиять на отдаленные результаты имплантации аллогraftов, поэтому требуются детальные исследования данного вопроса *in vivo*. В нашем исследовании изучение данного вопроса не проводилось.

Исследование клеточных элементов препаратов показало, что нативные створки, не обработанные каким-либо методом, демонстрировали достаточно высокое содержание живых клеточных элементов. Однако, имелись и единичные мертвые клетки, что, вероятно, было связано с началом некробиоза ткани после забоя животного. Так большинство сердец доставлялось после забоя в течение примерно 2–3 часов, а подготовка гистологических препаратов занимала по времени около 1 часа. На протяжении всего этого времени температура окру-

жающей среды была на уровне 20 градусов по Цельсию, что, вероятно, вызвало гибель данных клеток.

В группе девитализации имелось достаточно большое количество мертвых клеток, что говорит о удачно завершившейся девитализации. При этом, девитализация не затронула соединительнотканную матрицу, так как при исследовании упругопрочностных свойств не было найдено статистически значимых отличий между девитализированным аллогraftом и нативным. Сохранение упругопрочностных характеристик мы считаем самым главным предиктором высокой свободы от протез-зависимых осложнений при использовании клапанных аллогraftов.

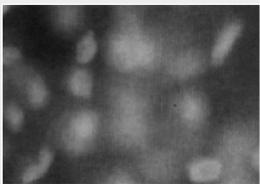
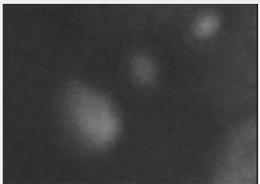
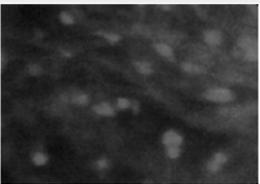
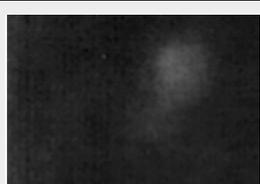
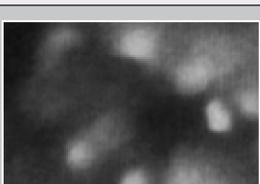
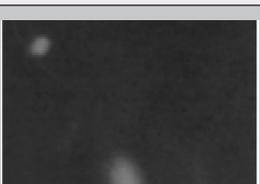
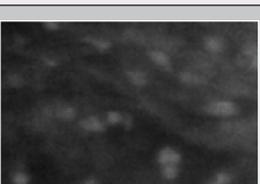
Наконец, в группе «Девитализация+ scCO₂» также не было явной потери прочностных характеристик, таким образом, можно было заключить, что матрица аллогraftа не был поврежден. Вместе с этим, все препараты, подвергшиеся сверхкритической обработке, были бедны клеточными элементами.

Применение клапанных аллогraftов в протезировании запирающих элементов сердца является крайне перспективным направлением при коррекции как врожденных, так и приобретенных пороков сердца [6].

Аллогraftы оказались незаменимыми при коррекции инфекционного поражения нативных структур сердца, сопровождающихся деструкцией не только запирающих элементов, но и фиброзных колец клапанов, центрального фиброзного тела, аорто-митрального продолжения. Особое преимущество перед имеющимися протезами имеет митральный аллогraft в трикуспидальной позиции, где использование кар-

Таблица 1.

Оценка препаратов

	Группа 1 («девитализация + удаление клеточных элементов с помощью сверхкритического CO ₂ »)	Группа 2 («девитализация»)	Группа 3 («нативная створка»)	p-value (группа 1&группа 2)	p-value (группа 1&группа 3)	p-value (группа 2&группа 3)
Модуль прочности (образцы 1–5), МПа	Ось: — 14,85±1,5 Рад.:12,55±1,5	Ось: — 13,85± 1,5 Рад.:11,35±1,1	Ось: — 15,851,1 Рад.:13,85±1,2	>0.05 >0.05	>0.05 >0.05	>0.05 >0.05
Модуль упругости (образцы 1–5), МПа	Ось: — 28,55±11,1 Рад.:20,44±13,2	Ось: — 29,55±11,1 Рад.:21,814±11,2	Ось: — 25,55±11,1 Рад.:17,614±12,1	>0.05	0,02	0,05
Запас деформационной способности (образцы 1–5)	Ось: — 1,15± 0,9 Рад.:1,15±0,3	Ось: — 1,11± 0,1 Рад.:1,52±0,2	Ось: — 1,85± 1,1 Рад.:1,5±1,2	>0.05 >0.05	>0.05 >0.05	>0.05 >0.05
Образец 4				–	–	–
Образец 5				–	–	–
Образец 6				–	–	–
Образец 7				–	–	–

касных заводских протезов ассоциировано с высоким риском тромботических осложнений и повторного протезного эндокардита [7].

Вместе с этим применение аллогraftов пока ограничено отсутствием критической массы фундаментальных исследований в области тканевой инженерии. Сохранение в нативном виде невозможно, так как аллогraft, состоящий из живой ткани, склонен вызывать клеточные реакции иммунного ответа, напоминающие органное отторжение [1–3].

Способы девитализации с «уничтожением» клеток ассоциированы с повреждением всего аллогraftа и потерей его упругопрочностных характеристик.

Применение методов децеллюляризации с использованием детергентов дигитонина и ЭДТА оказывает более селективное действие на клетки, вызывая их апоптоз без значимого повреждения коллагена и эластина. Данный тезис был вполне подтвержден в нашем исследовании [8].

Наконец, применение методов «вымывания» клеточных элементов представляется крайне важным, так как сохранение в матриксе молекул ДНК, бексов и прочих «обломков клеток» может приводить к еще большей клеточной реакции, чем на нативный пересаженный протез. Требуется продолжить изучение данного направления с применением методов пересадки биологических образцов в организм лабораторных животных и последующей оценкой степени кальцификации [9].

По результатам исследования удалось сделать вывод об относительно безопасной децеллюляризации — при

ней прочность аллогraftа не снижалась (в сравнении с нативным клапаном), хотя отмечалось некоторое увеличение эластичности. Наконец, мы пришли к выводу, что после децеллюляризации в матриксе накапливается достаточно большое количество «обломков» клеток, сохранение которых *in situ* может способствовать кальцинозу и иммунному ответу. В противовес этому, мы представили доказательства возможности вполне успешного «вымывания» клеток с помощью сверхкритического CO₂, мы считаем, что данная технология может найти широкое применение в клапанной хирургии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бокерия Л.А., Царегородцев А.В., Бритиков Д.В., Глянцев С.П. История разработки и применения бескаркасного митрального аллогraftа для протезирования атриовентрикулярных клапанов сердца. Часть 1. От эксперимента до криосохранения. Бюллетень ННПЦССХ Сердечно-сосудистые заболевания. 2024
2. Бокерия Л.А., Царегородцев А.В., Бритиков Д.В., Глянцев С.П. История разработки и применения бескаркасного митрального аллогraftа для протезирования атриовентрикулярных клапанов сердца. Часть 2. От криосохранения до децеллюляции. Бюллетень ННПЦССХ Сердечно-сосудистые заболевания. 2024
3. Komarov R.N., Tsaregorodtsev A.V., Tkachev M.I., et al. Monoblock aorto-mitral homograft: surgical technique and results. *MOJ Clin Med Case Rep.* 2023;13(3):58-60. DOI: 10.15406/mojcr.2023.13.00438
4. Комаров Р.Н., Царегородцев А.В., Ткачев М.И., Васалатий И.М., Олейник И.В., Панченко М.О., Ключина А.Г., Нуридджанян А.В., Калинина Ю.А., Лайпанов М.А., Тебиева Д.К. Применение криосохраненных гомогraftов в клапанной хирургии — опыт одной клиники. *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины.* 2024;39(2):78–85. <https://doi.org/10.29001/2073-8552-2024-39-2-78-85>
5. Komarov R.N., Tsaregorodtsev A.V., Tkachev M.I. Monoblock aorto-mitral homograft: surgical technique and results // *MOJ Clin Med Case Rep.* — 2023;13(3) — P. 58–60. — 10.15406/mojcr.2023.13.00438
6. Комаров Р.Н., Царегородцев А.В., Ткачев М.И., Савина В.А., Базиянц Л.Р. Клинический случай использования аортомитрального гомогraftа у пациента с инфекционным эндокардитом: техника операции и непосредственные результаты // *Минимально инвазивная сердечно-сосудистая хирургия.* — 2023. — С. 58–64.
7. Комаров Р.Н., Нуждин М.Д., Белов В.А., Чернявский С.В., Исмаилбаев А.М., Дракина О.В., Царегородцев А.В., Базиянц Л.Р. Митральный гомогraft в трикуспидальной позиции: показания к имплантации и хирургическая техника // *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний* — 2023. — 10.17802/2306–1278-2023-12-2
8. Нуждин М.Д., Комаров Р.Н., Мацуганов Д.А., Мельников И.Ю., Царегородцев А.В. Технические аспекты и результаты применения клапанных гомогraftов в хирургии атриовентрикулярных клапанов сердца: систематический обзор // *Патология кровообращения и кардиохирургия* — 2023. — С. 42–53. — 10.21688/1681–3472-2023-2-42-53.
9. Urganci E., Aschacher T., Herbst C., Andreas M., Schlein J., Sandner S., Laufer G., Zimpfer D. Implantation of a decellularized aortic homograft in a child. *Multimed Man Cardiothorac Surg.* 2020 Mar 19;2020. doi: 10.1510/mmcts.2020.007. PMID: 32356619.

© Гамаева Фатима Баталовна (gamaevafatima53@gmail.com); Мусукаева Анжелика Баталовна (anzhela.musukaeva@mail.ru);

Хачетлова Карина Казбековна (karina.urusbambetova@yandex.ru)

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»