

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

МАНЧЕНКО АННА ОЛЕКСАНДРІВНА

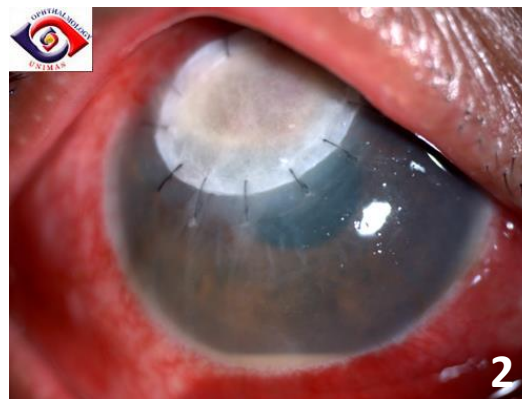
**ВПЛИВ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР І ПОТОКІВ ЕЛЕКТРОНІВ
НА ТКАНИНИ ПЕРИКАРДА І СТУЛОК КЛАПАНА
СЕРЦЯ ПРИ ЇХ КОНСЕРВУВАННІ**

Актуальність роботи



1

Безкаркасні біопротези
клапана серця



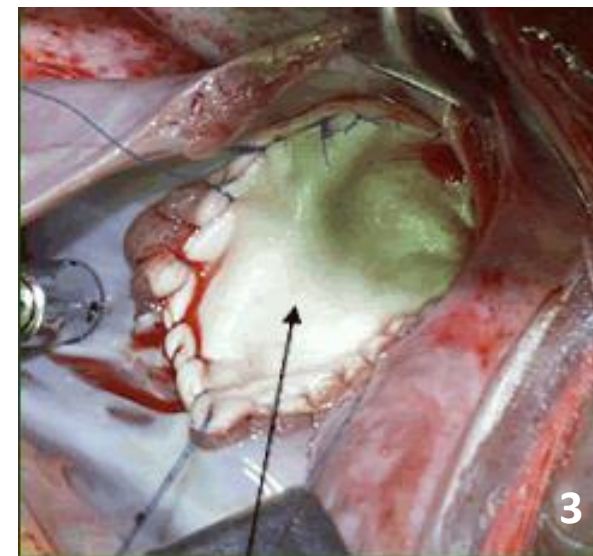
2

Перфорація рогівки, вкрита
лоскутом перикарда



4

Застосування лоскута
перикарда під час
установки імплантату



3

Заплата из ксеноперикарда

Пластика дефекта
міжпередсердної перетинки

Завдання передімплантаційної обробки ксенотканин:

- Зниження імуногенності;
- Збереження адекватних біомеханічних властивостей;
- Стабілізація структури;
- Повна стерилізація.

Мета роботи

Комплексна оцінка ефективності девіталізуючої обробки перикарда і стулок аортального клапана свині з використанням низьких температур та іонізуючого опромінення потоком електронів для створення тканинних імплантатів.

Завдання дослідження:

1. Дослідити *in vitro* характер морфологічних змін тканин Пр і САК свині після впливу низьких температур (-196°C), опромінення потоком електронів та їх комбінованої дії;
2. Вивчити антигенні властивості Пр і САК після впливу низьких температур і комбінованої дії низьких температур та опромінення потоком електронів;
3. Вивчити зміни пружно-міцносних властивостей Пр і САК після впливу низьких температур, опромінення потоком електронів та їх комбінованої дії;
4. Дослідити *in vivo* динаміку тканинної реакції на імплантацію Пр і САК після впливу низьких температур, опромінення потоком електронів та їх комбінованої дії;
5. Вивчити ступінь біоінтеграції і функціональну ефективність девіталізованого комбінованою дією низьких температур та опромінення потоком електронів ксеноперикарда на експериментальній моделі *in vivo* – пластика дефекту стінки сечового міхура.

Об'єкт дослідження

Вплив низьких температур, опромінення потоком електронів та їх комбінованої дії на морфологічні, імунобіологічні та біомеханічні характеристики перикарда і стулок аортального клапана свині для створення тканинних імплантатів.

Предмет дослідження

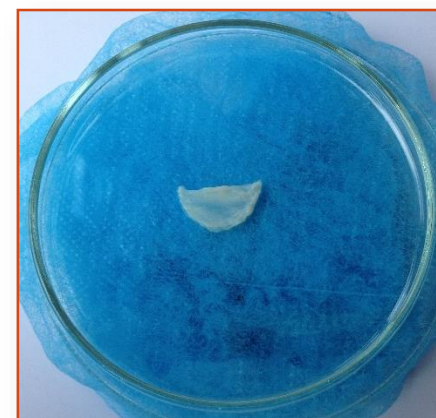
Перикард і стулки аортального клапана після впливу низьких температур, опромінення потоком електронів та їх комбінованої дії, а також після ксенотрансплантації.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріали дослідження



Перикард (Пр)



Стулки аортального клапана (САК)

Етапи обробки



Ксенотканина



Рідкий азот



Опромінення потоком електронів
 $D_{\text{погл}} = 25 \div 30 \text{ кГр}$



Пари рідкого азоту

Сандомирський БП, Бизов ДВ, Михайлова ІП, та ін., винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини, патентовласник. Спосіб підготовки ксеногенних артерій для судинного протезування. Патент України № 68379. 2012 Бер 26.

- Для морфологічного дослідження застосовували стандартні гістологічні методи забарвлювання (гематоксилін і еозин, пікрофуксин по Ван Гізон) та електронно-мікроскопічне дослідження (забарвлювання напівтонких зрізів метиленовим синім і основним фуксином, ультратонких зрізів – уранілацетатом, цитратом свинцю);
- Експресію колагену I і III типів, еластину и ендотеліальних клітин вивчали імуногістохімічним методом;
- Експресію основного ксеноантигена – епітопа α -Gal на ендотеліальній поверхні тканин вивчали імуногістохімічним методом:

$$S_{\text{відн}} = S_{\text{екс}} / S_{\text{заг}} \times 100\%,$$

где $S_{\text{відн}}$ – відносна площа експресії епітопа α -Gal (%);

$S_{\text{екс}}$ – сумарна площа, яку займають імунопозитивні клітини в зразку;

$S_{\text{заг}}$ – загальна площа ендотеліальної поверхності образця.

- Для оцінки ступеню вираженості тканинної реакції на імплантацію тканин та імуногістохімічних маркерів використовували напівкількісні методи;

Групи тканин:

- **N (native)** – нативні;
- **R (radiation)** – опромінені в дозі 25 кГр;
- **F (freeze)** – після заморожування(-196°C)–відігріву;
- **FR (freeze-radiation)** – після заморожування–відігріву і подальшого опромінювання в дозі 25 кГр.

- Для вивчення фізико-механічних властивостей проводили розтягнення тканин до моменту порушення цілісності на деформаційній машині FP 100/1. Швидкість деформації – $V=60$ мм/хв, граничне значення навантаження – $F = 4,0$ кг. Деформаційні криві обробляли і розраховували основні фізико-механічні показники за формулами:

$$\underline{E = (F_2 - F_1)L_0/S(L_2 - L_1)L},$$

де E – модуль пружності, МПа,

F_1 – початкова сила розтягнення в зоні пружних деформацій, Н,

F_2 – кінцева сила розтягнення в зоні пружності, Н, L_0 – початкова довжина зразка, мм.

S – площа поперечного перетину зразка, мм²,

L_1 – довжина зразка, яка відповідає F_1 , мм,

L_2 – довжина зразка, яка відповідає F_2 , мм,

$$\underline{\lambda = F_{max}/S},$$

де λ – межа міцності, МПа,

F_{max} – максимальна сила розтягнення, Н;

S – площа поперечного перетину зразка, мм².

$$\underline{L = (L_2 - L_1)/L_1 \times 100\%},$$

де L – відносне подовження, %,

L_1 – початкова довжина зразка, мм,

L_2 – довжина зразка під час навантаження в момент початку розриву, мм.

$$\underline{\delta = L_2/L_1},$$

де δ – запас деформативної здатності ,

L_1 – початкова довжина зразка, мм,

L_2 – довжина зразка під час навантаження в момент розриву, мм.

(Пат. 2430746 РФ; Пат. 68379 України)

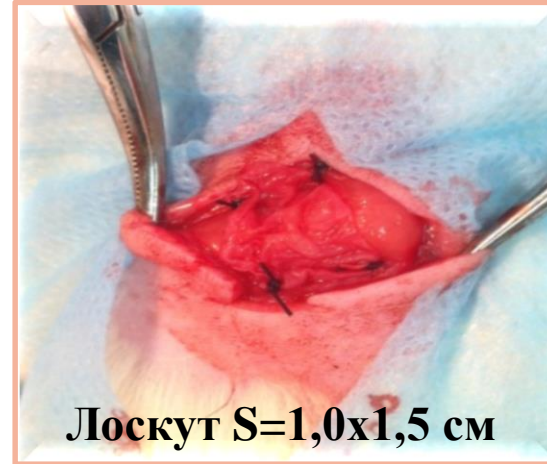
- Статистичну обробку здійснювали за допомогою програмного забезпечення «SPSS Statistics-17.0» (США) та «Microsoft Office Excel» (США). Відмінності вважали достовірними при $p < 0,05$.

Експериментальна біологічна модель *in vivo* для вивчення тканинної реакції на імплантацію



Щури, n=85

<http://www.i-sonnik.ru/belaya-krysa/>



Лоскут S=1,0x1,5 см

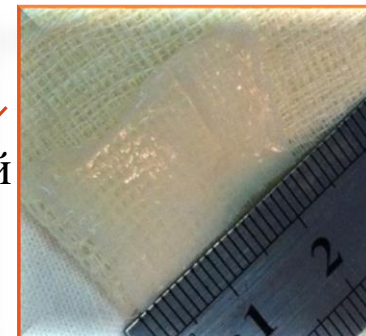
- Імплантація зразків (тканинних імплантатів (ТІ)) проводилась у підшкірно-жирову клітковину щурів в ділянку міжлопаткового простору за методом **Fishbein M.** та співавт. (1982).
- Робота виконана на **85 самцях білих безпородних щурів** віком 5-6 місяців.
- Тварин виводили з експерименту на **7, 14 доби** та на **1, 3, 6 і 12 місяців**.

Експерименти виконані у відповідності з вітчизняними і міжнародними біоетичними документами; зокрема, матеріалами IV Європейської Конвенції по захисту хребетних тварин (ETS 123 (1986)), ратифікованою в Україні, законодавчими документами України по проведенню експериментів на тваринах.

Модель *in vivo* для вивчення біоінтеграції та функціональної ефективності ксеноперикарда - пластика дефекта стінки сечового міхура



- n = 19
- кролик породи Шиншила
- маса - 3100–4000 г
- самки
- Ксеноперикардiальний лоскут – 2x2,5 см



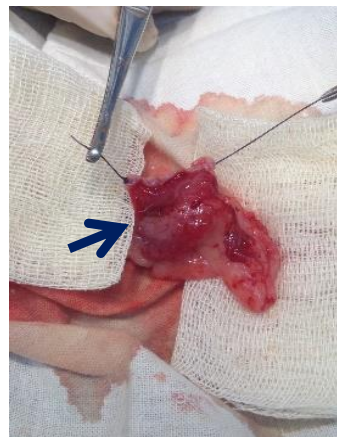
Етапи операції



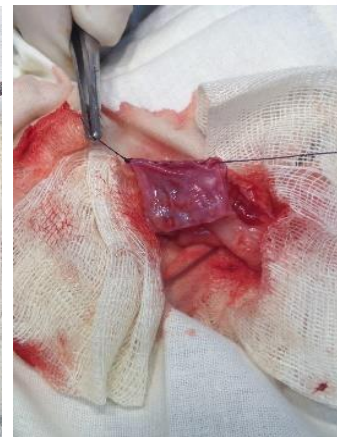
Сечовий міхур (СМ)



після пункції



➔ – розріз



пришивання лоскута

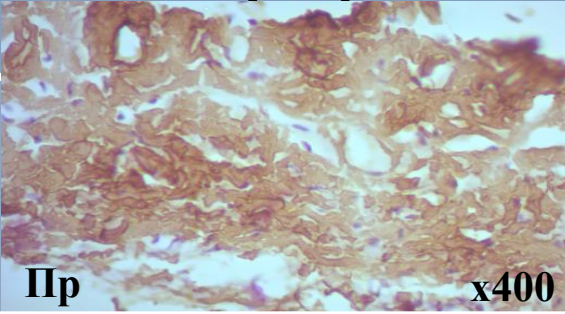
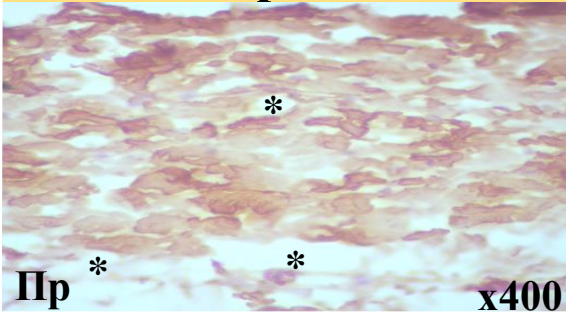
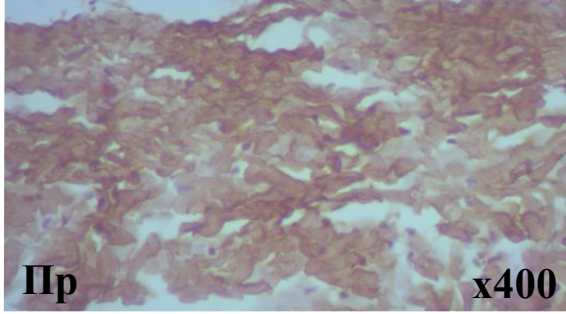
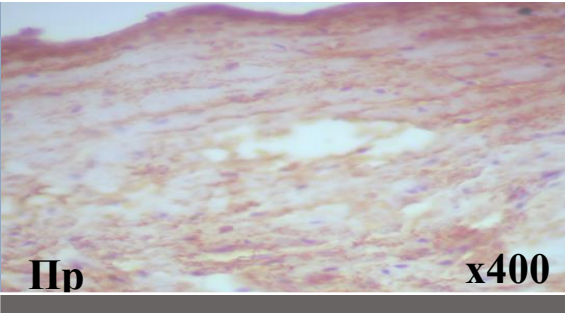
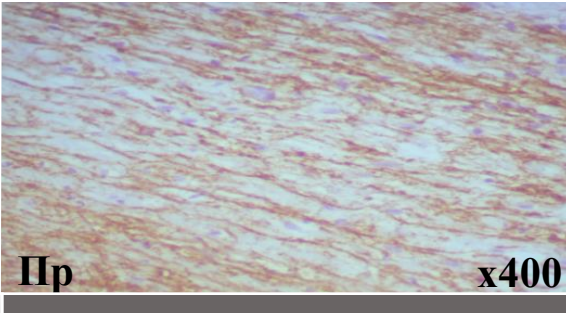
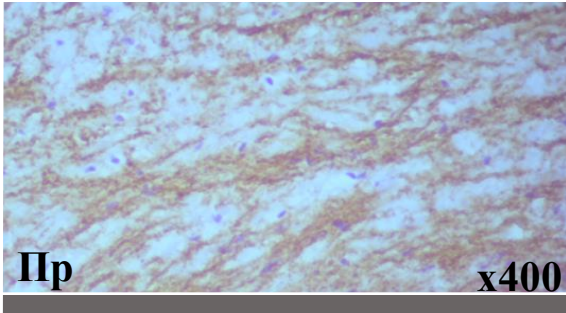
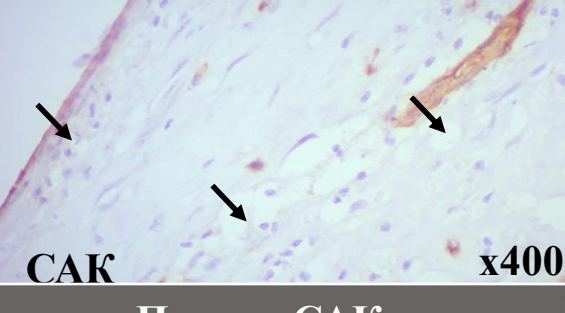
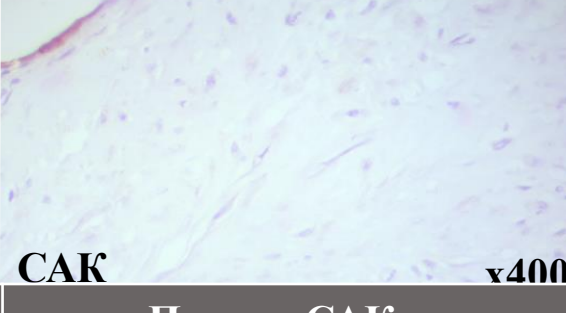
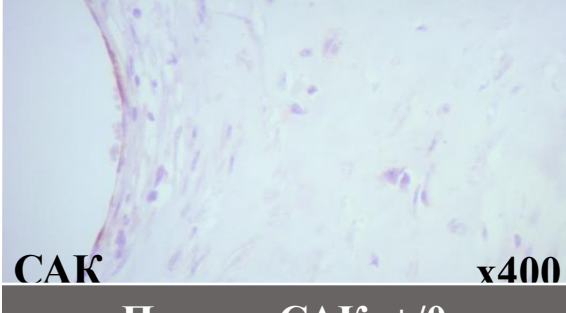


СМ з латкою

- Експеримент включав розміщення лоскута у стінці тіла СМ.
- Функціональний стан СМ контролювали динамічним УЗД (сканер «Сономед-500», лінійний датчик 7,5 МГц).
- Тварин виводили з експерименту через 1, 3, 4, 6, 7 місяців після операції.
- Після забору, СМ досліджували макро- і мікроскопічним методами.

РЕЗУЛЬТАТИ

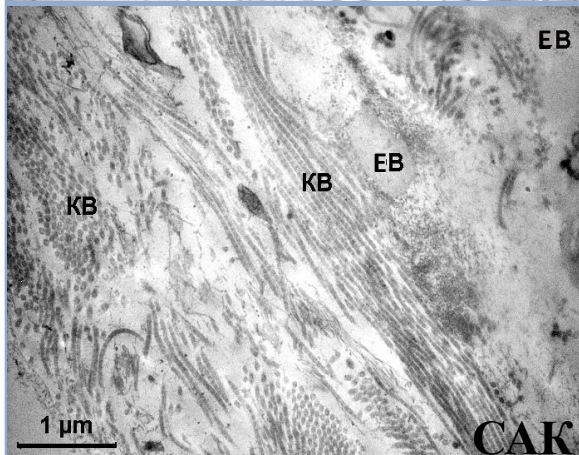
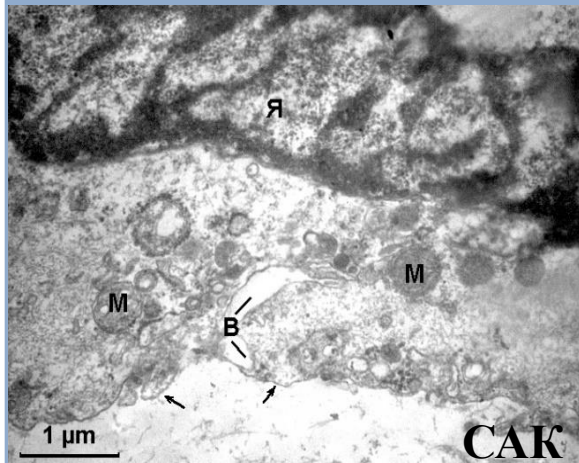
Експресія маркерів колагенів, еластину та ендотеліальних клітин в тканинах Пр і САК

	F-заморожуванні	R - опромінені	FR – комбінована дія
Колаген I	 <p>Пр x400</p> <p>+++</p>	 <p>Пр * x400</p> <p>++</p>	 <p>Пр x400</p> <p>++</p>
Еластин	 <p>Пр x400</p> <p>+++</p>	 <p>Пр x400</p> <p>++</p>	 <p>Пр x400</p> <p>++</p>
Ендотелій	 <p>САК x400</p> <p>Пр – ; САК ++</p>	 <p>САК x400</p> <p>Пр – ; САК +</p>	 <p>САК x400</p> <p>Пр – ; САК +/-</p>

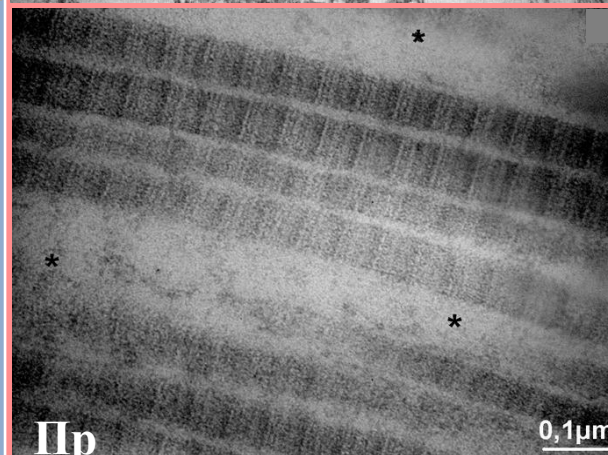
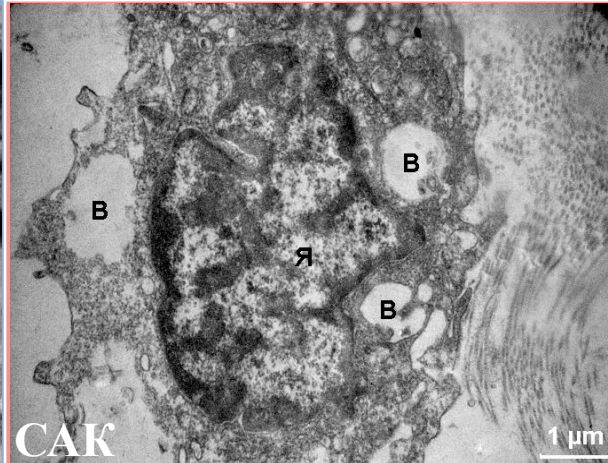
Примітка: 0 – відсутність; + – слабка вогнищева; ++ – помірна вогнищева; +++ – виражена реакція.

Ультраструктура перикарда і стулок

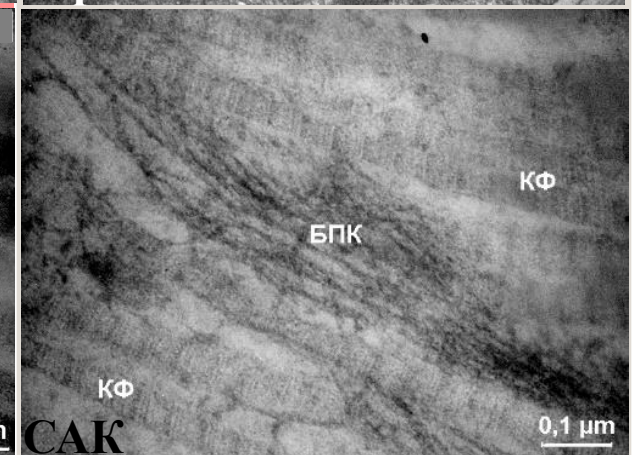
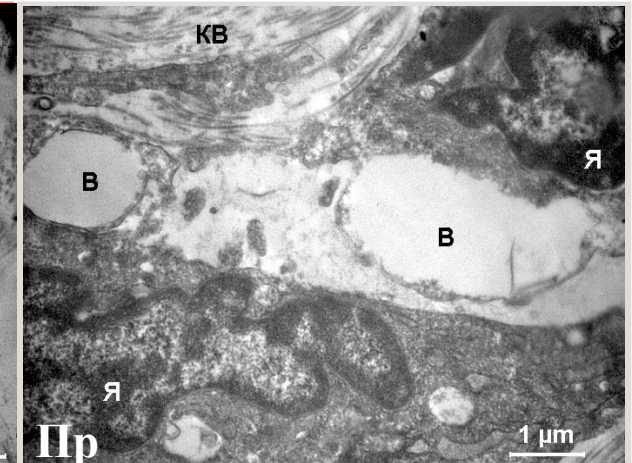
Г-заморожуванні



Р - опромінені

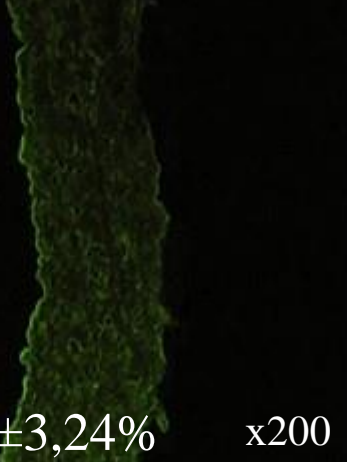
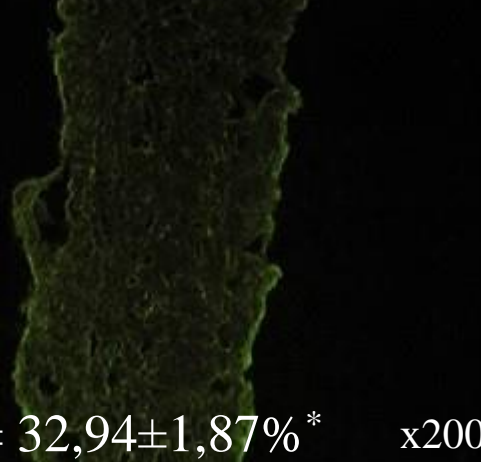
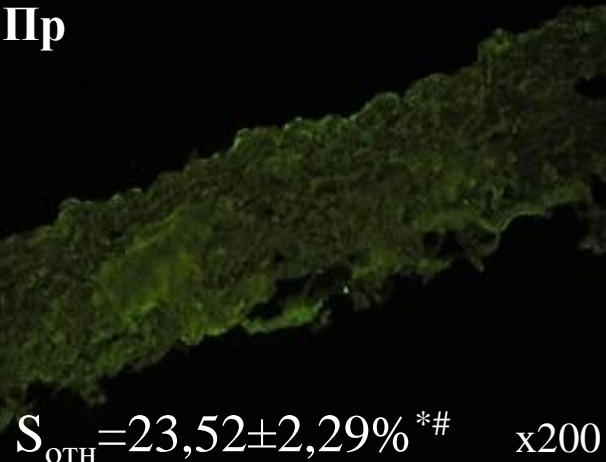

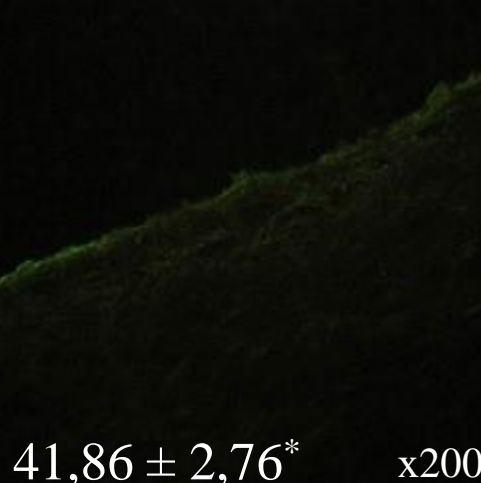
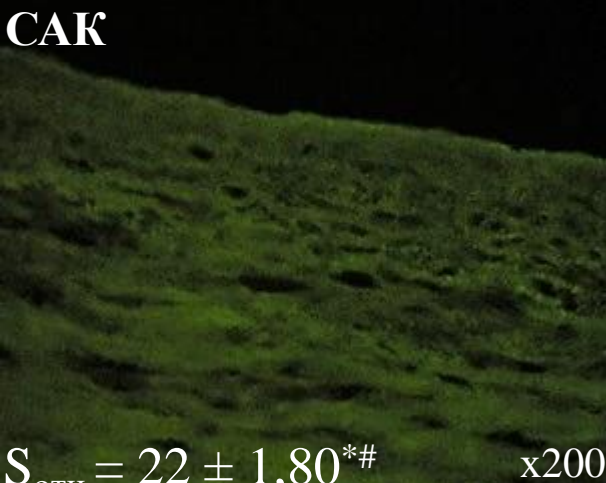


FR – комбінована дія



КВ – колагенові волокна, ЕВ – еластинові волокна, КФ – колагенові фібрили,
 БПК – білково-полісахаридний комплекс, М – мітохондрії, В – вакуолі, Я – ядро,
 цитолема вказана стрілками,
 * – порушення структури білково-полісахаридних комплексів.

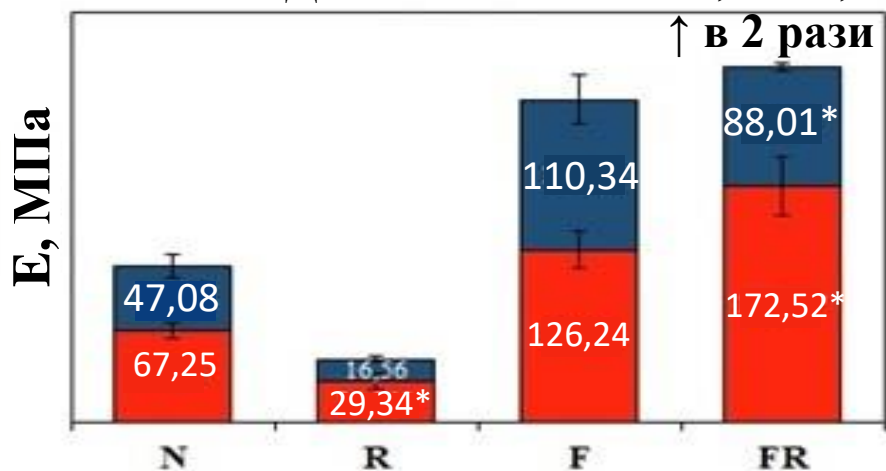
Експресія епітопа α -1,3-Gal на поверхні тканин стулок і перикарда

N	F	FR
<p>Пр</p>  <p>$S_{\text{отн}} = 67,64 \pm 3,24\%$ x200</p>	<p>Пр</p>  <p>$S_{\text{отн}} = 32,94 \pm 1,87\%^*$ x200</p>	<p>Пр</p>  <p>$S_{\text{отн}} = 23,52 \pm 2,29\%^{\#}$ x200</p>
< в 2 рази		< в 3 рази
<p>САК</p>  <p>$S_{\text{отн}} = 77,23 \pm 2,78$ x200</p>	<p>САК</p>  <p>$S_{\text{отн}} = 41,86 \pm 2,76^*$ x200</p>	<p>САК</p>  <p>$S_{\text{отн}} = 22 \pm 1,80^{\#}$ x200</p>

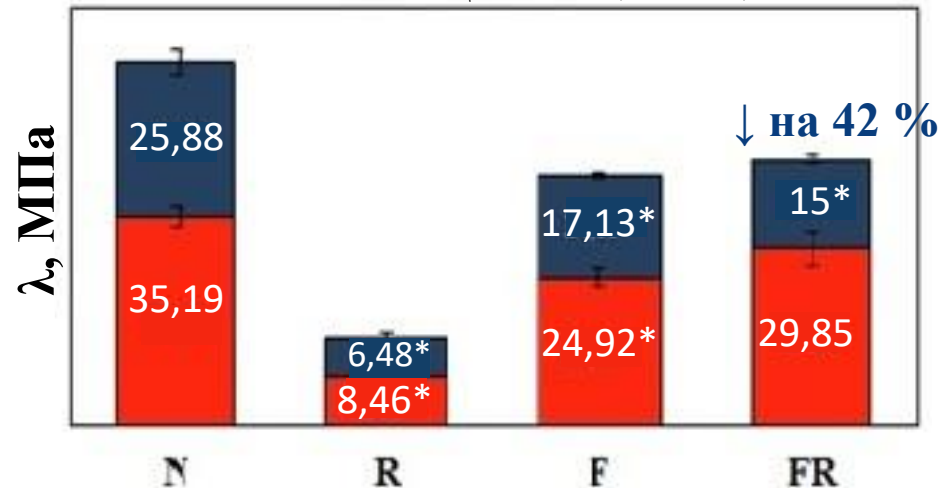
Примітка: Первинні мишачі а/т: епітопа α -Gal «mAb (M86)»; вторинні кролячі антимишачі FITC-кон'юговані а/т. *, # – відмінності статистично значущі в порівнянні з нативними тканинами (група N) і після заморожування (група F) відповідно, $p < 0,05$. Контроль: судини свиней - високий рівень мічення (позитивний), кровоносні судини людини відсутність мічення (негативний).

Біомеханічні властивості тканин перикарда

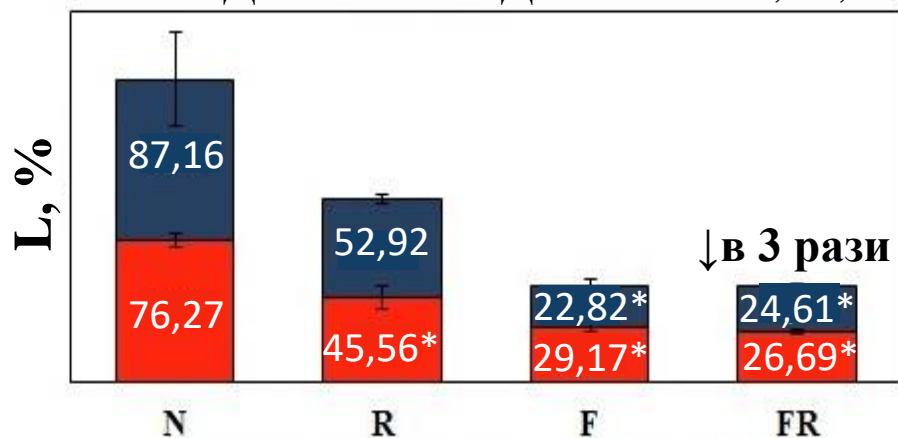
МОДУЛЬ ПРУЖНОСТІ, МПа,



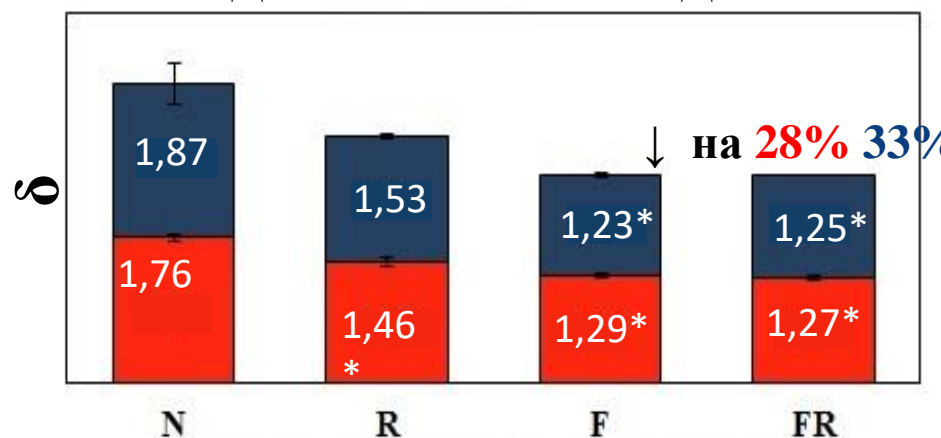
МЕЖА МІЦНОСТІ, МПа,



ВІДНОСНЕ ПОДОВЖЕННЯ, %,



ЗАПАС ДЕФОРМАТИВНОЇ ЗДАТНОСТІ

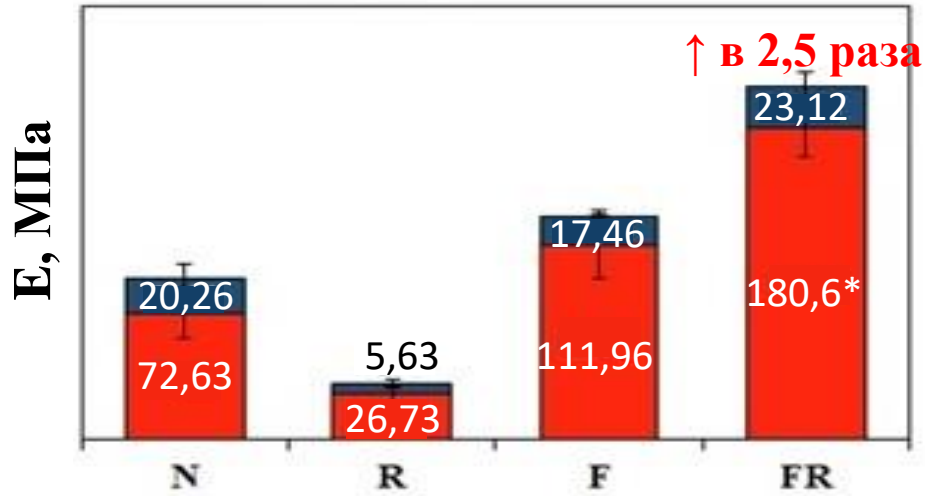


■ поперечний напрямок навантаження ■ продольний напрямок навантаження

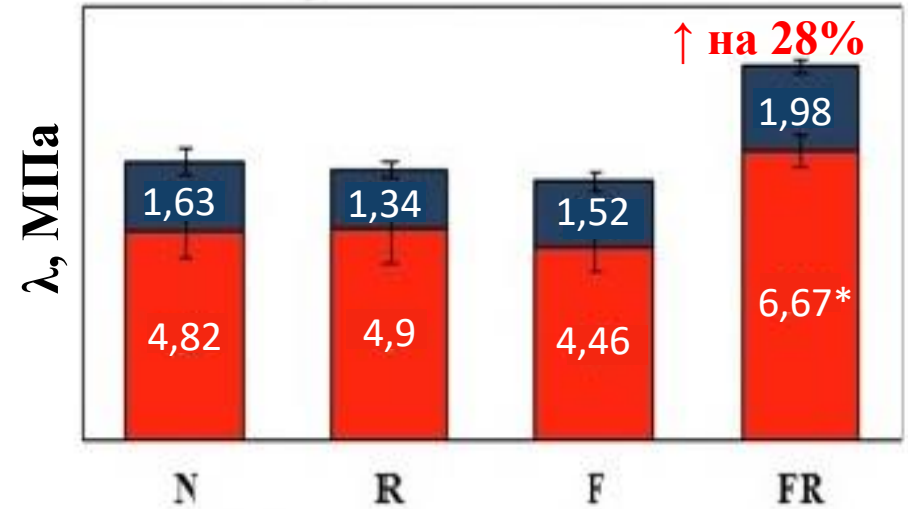
Примітка: * – відмінності статистично значущі відносно контролю, $p < 0,05$.

Біомеханічні властивості тканин стулок аортального клапана

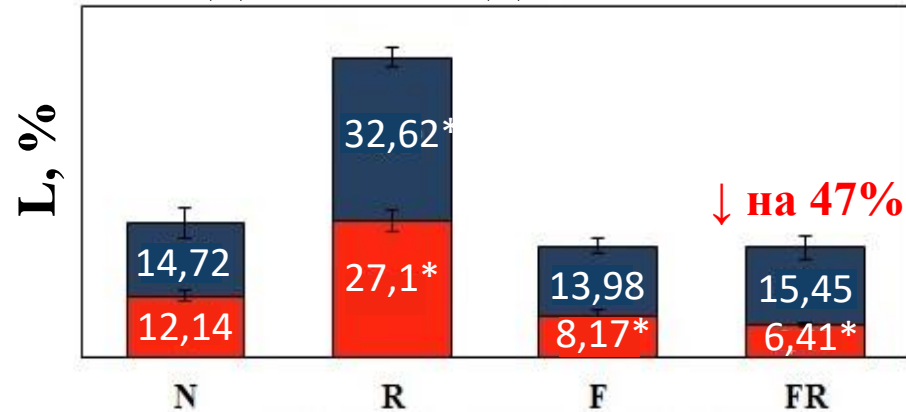
МОДУЛЬ ПРУЖНОСТІ, МПа,



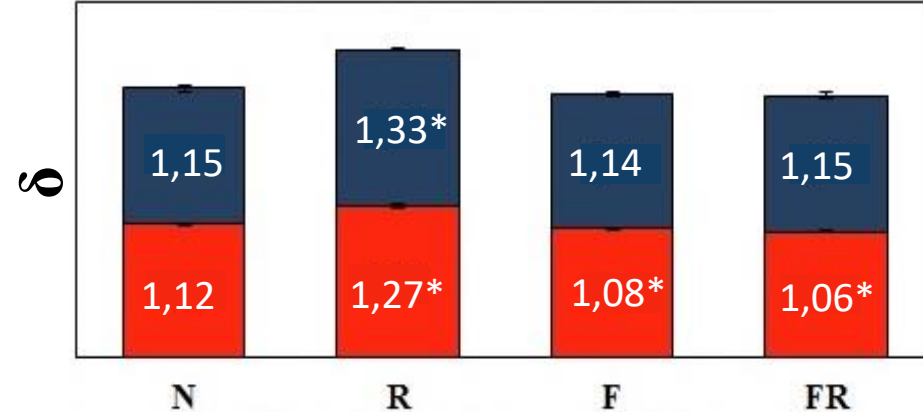
МЕЖА МІЦНОСТІ, МПа,



ВІДНОСНЕ ПОДОВЖЕННЯ, %,



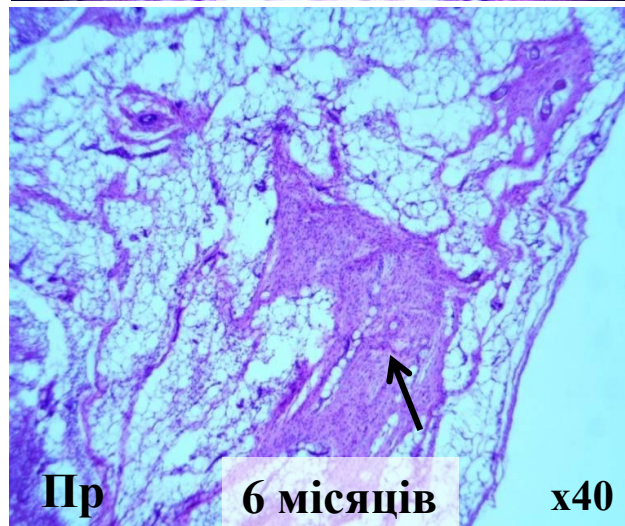
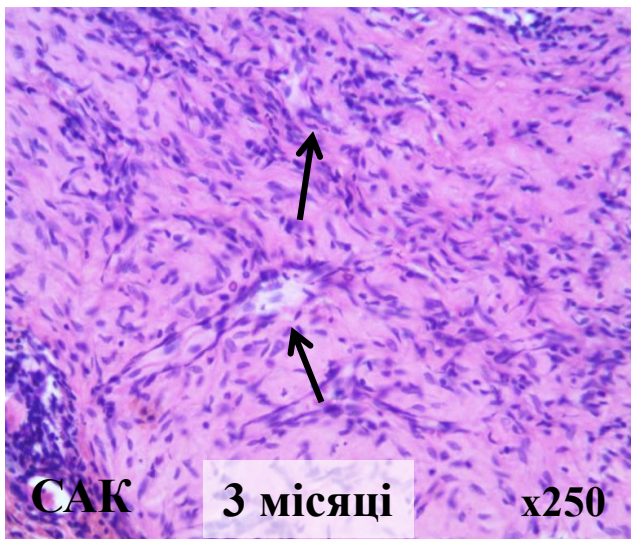
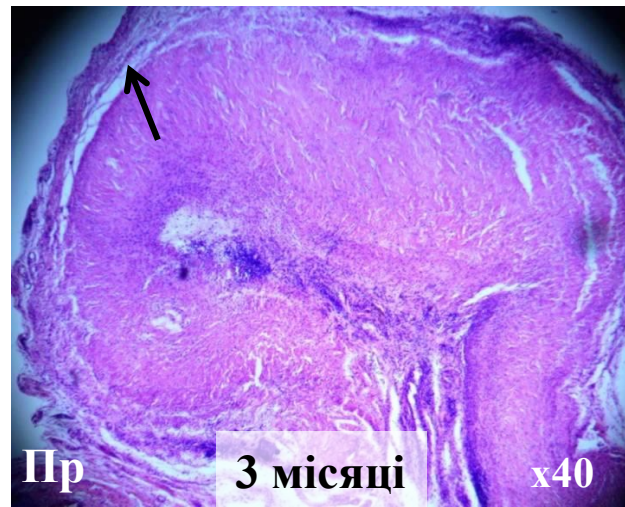
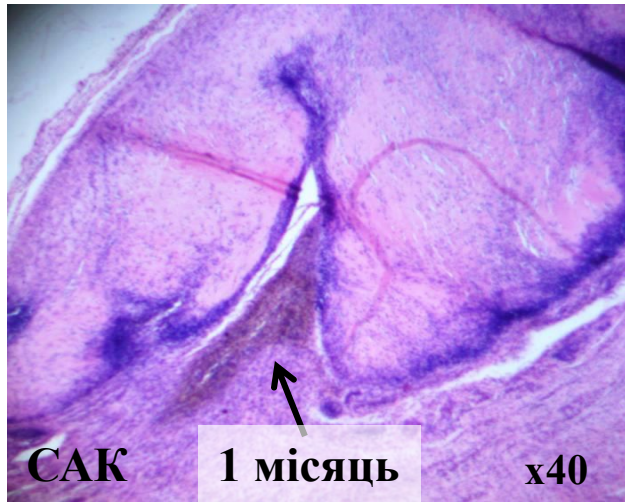
ЗАПАС ДЕФОРМАТИВНОЇ ЗДАТНОСТІ



■ поперечний напрямок навантаження ■ продольний напрямок навантаження

Примітка: * – відмінності статистично значущі відносно контролю, $p < 0,05$.

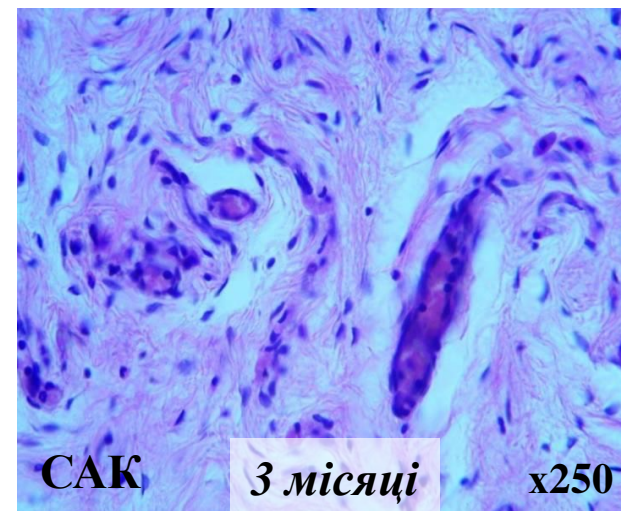
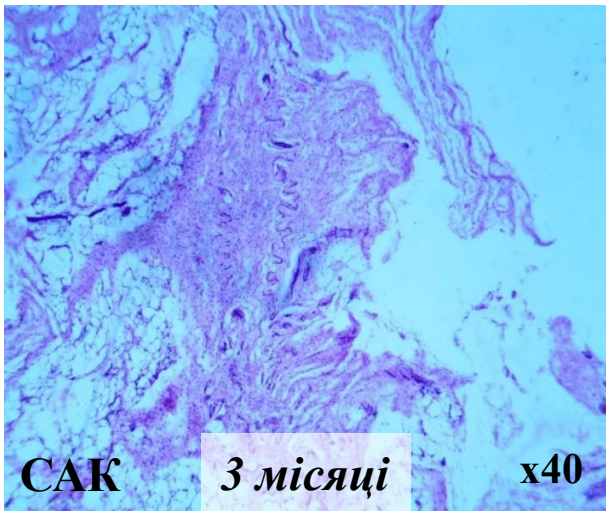
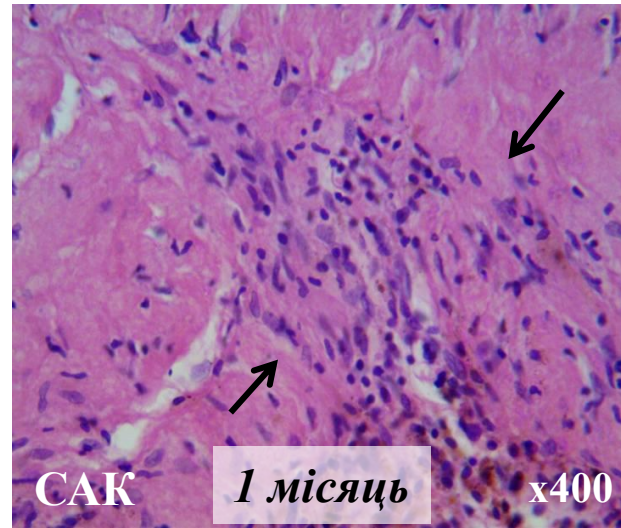
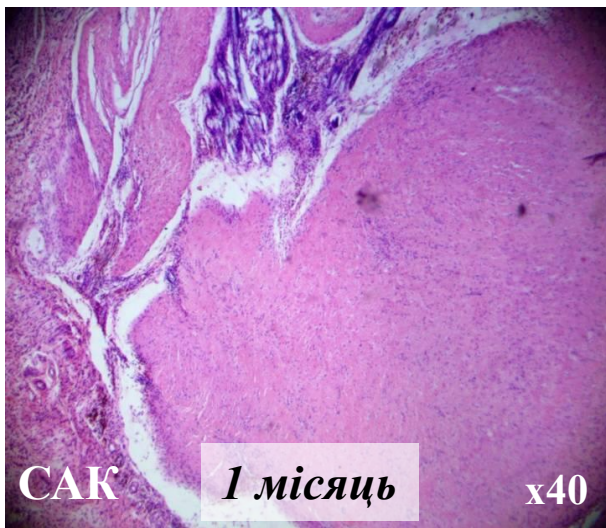
Тканинна реакція на імплантацію тканин перикард та стулок



Забарвлення:
гематоксиліном
і еозином.

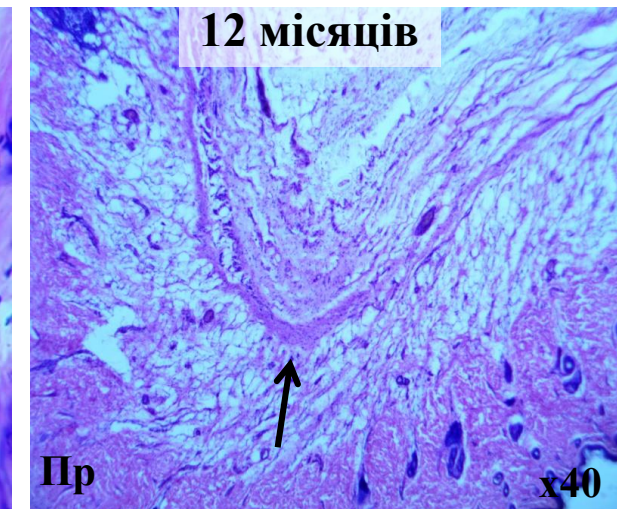
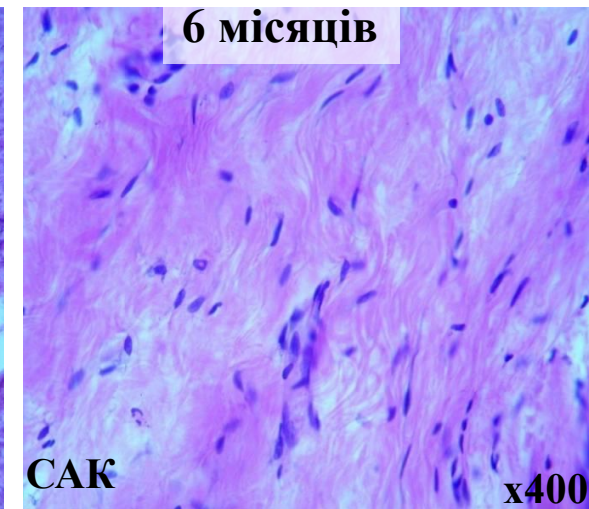
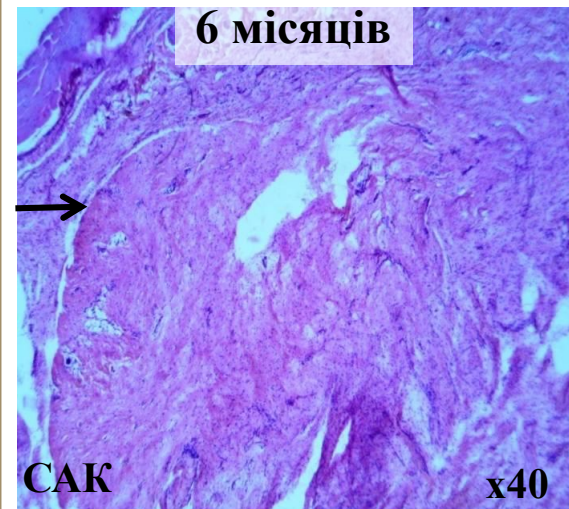
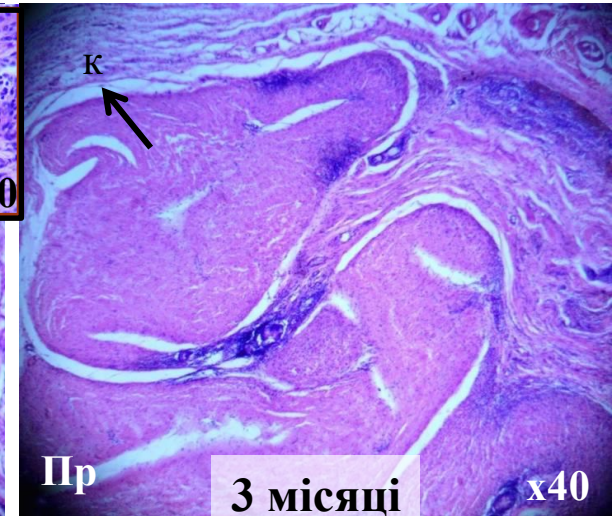
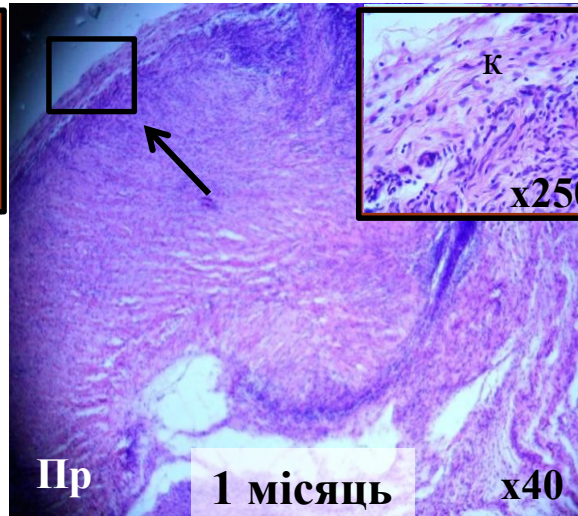
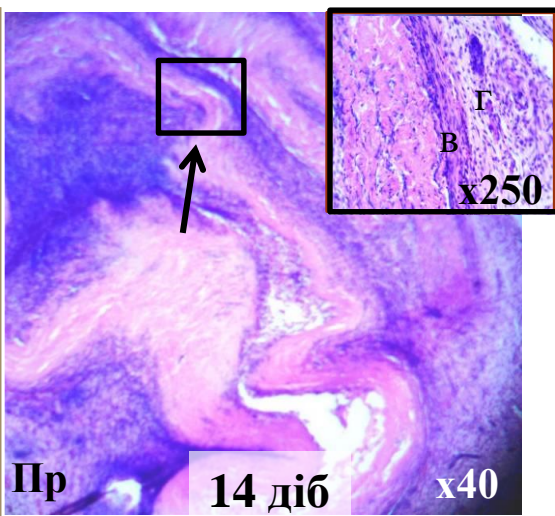
На 7-14 доб. помірна лейкоцитарна інфільтрація, на 3-му міс. тканинні імплантати (ТІ) – досить компактні структури і зберігали свою цілісність в оточенні тонкої капсули з ПСТ, лізис ТІ відбувався повільно з одночасним проростанням аутогенними клітинами і судинами. Через 6 міс. ТІ поділявся на різного розміру фрагменти, які перемежовувалися ділянками незміненої жирової тканини.

R



Забарвлення: гематоксиліном і еозином.

Через 1 міс. запальна реакція оточуючих тканин зменшувалася або зникла, рідко визначалося скупчення пігментованих макрофагів, лімфоцитів, ТІ представлений великими фрагментами, пучки розволокнені. На 3-му міс. сполучнотканинна капсула навколо фрагментів ТІ не визначалася, продовжувалися його розволокнення і фрагментація. Клітинні елементи макрофагального ряду здійснювали лізис ТІ.



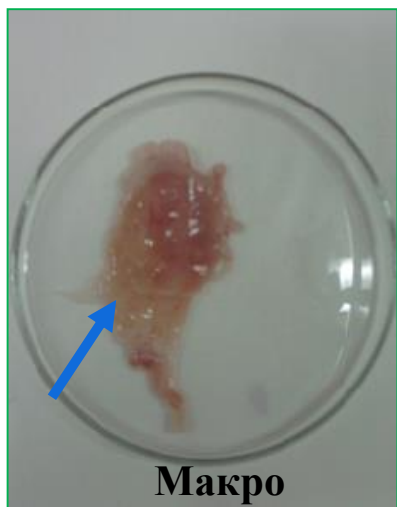
FR

к – капсула, в – волокниста, г – грануляційна. Забарвлення: гематоксиліном і еозином

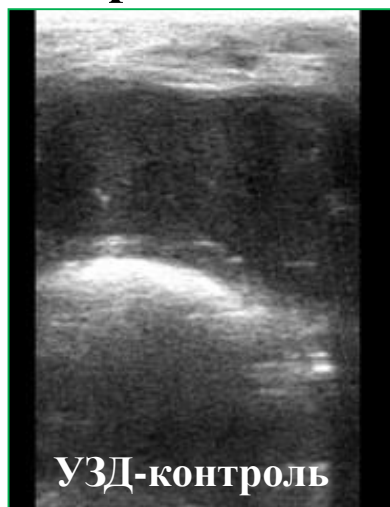
Слабка запальна реакція в оточуючій тканині (на 7-му добу), швидка зміна поліморфноядерної клітинної популяції на лімфомакрофагальну (до 14-ої доби), активний ангиогенез і швидке формування зрілої сполучнотканинної капсули приводили до швидкого проростання ТІ тканинами реципієнта з наявністю вузької обмежувальної капсули. До 6-ти місяців основна маса ТІ залишалася компактною. Через рік ТІ зберігав цілісність і був оточений сполучною тканиною без ознак запалення.

Морфологічна характеристика і функціональна ефективність девіталізованого ксеноперикарда при пластиці дефекту стінки СМ

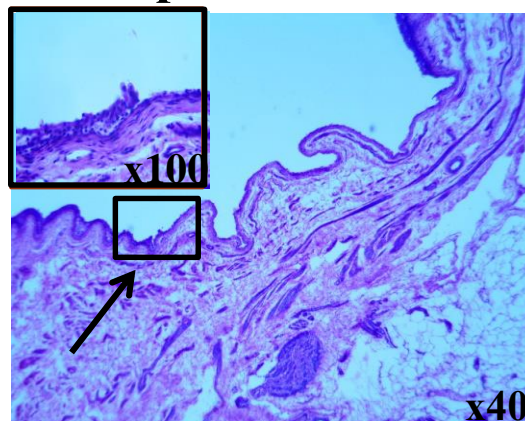
Через 3 місяці після трансплантації



Макро

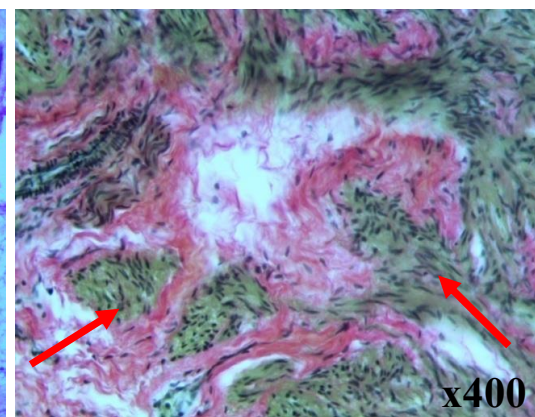


УЗД-контроль

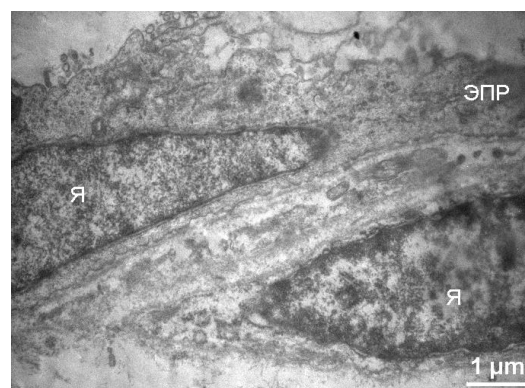


x100

x40



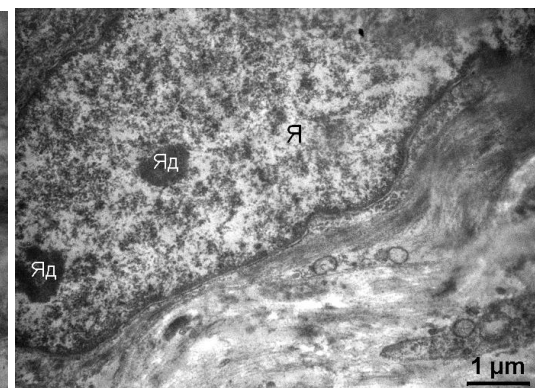
x400



ЭПР

Я

1 μm



Я

Яд

Яд


1 μm

Стінка протеза еластична, без деформації, з ознаками активної васкуляризації. На УЗД відсутні ознаки запального процесу.

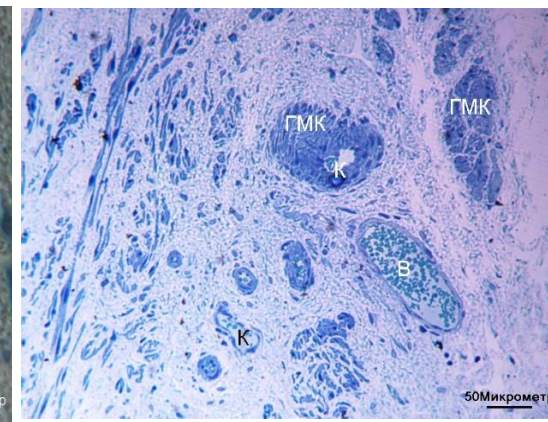
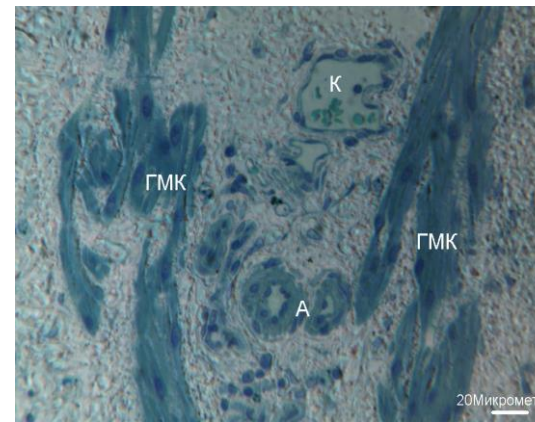
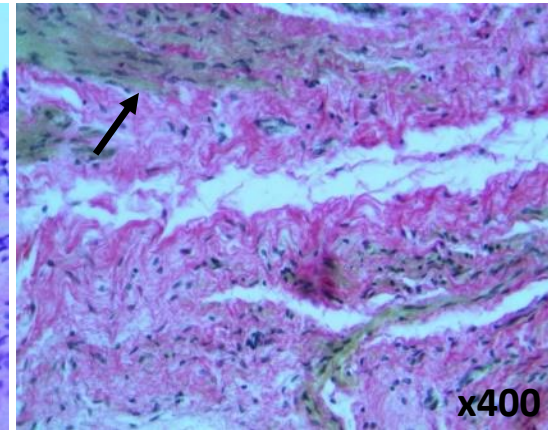
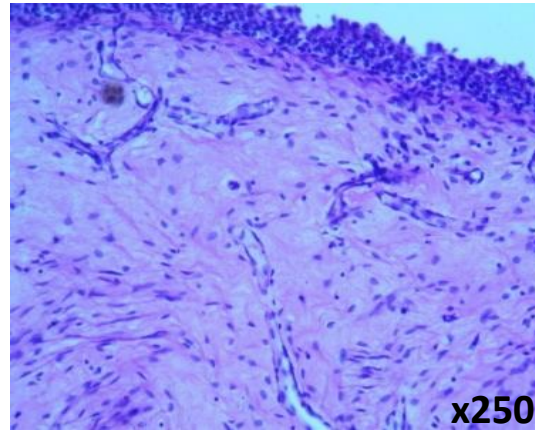
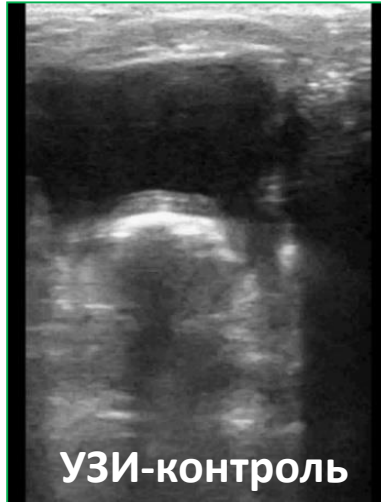
В ТІ відбувалися перебудова колагенової структури і епітелізація слизової оболонки.

Складчастість вже сформована, в глибоких шарах відзначено проростання вузьких шарів ГМК із боку нативної тканини СМ.


Виявлялися фібробласти з ядрами подовженої форми. Ядра деяких фібробластів містили 1–2 ядерця глобулярно-фібрилярної природи.

Я – ядро, Яд – ядерце, ЕПР – ендоплазматичний ретикулум;  - зона протеза. Забарвлення: гематоксиліном і еозином, за Ван Гізоном, метиленовим синім і основним фуксином.

Через 6 місяців після трансплантації



- УЗД: наповнюваність в нормі та повна скоротність СМ.
- Внутрішня поверхня протеза представлена добре васкуляризованою слизовою оболонкою, яка була вистлана повністю сформованим епітелієм.
- М'язовий шар практично відновлений. Пучки м'язових клітин утворювали поздовжній і циркулярний шари.
- Кровоносні і лімфатичні судини розташовувалися в товщі сполучної тканини і серед пучків ГМК

К – кровеносні капіляри; А – артеріола; ГМК – гладком'язові клітини; В – венула,  - зона протеза. Забарвлення: гематоксиліном і еозином, пікрофуксином за методом Ван Гісона, метиленовий синій і основний фуксин.