

Bezkomórkowe rusztowania biologiczne wykorzystywane w tworzeniu bioprotez zastawek serca – efektywność wybranych metod acellularyzacji tkanek



Acellular biological scaffolds utilized in the preparations of heart bioprosthesis – effectiveness of different methods of acellularizations

Piotr Wilczek^{1,2}, Anna Barańska¹, Barbara Kubin¹, Marian Zembala²

¹Fundacja Rozwoju Kardiologii, Pracownia Bioinżynierii, Zabrze

²Katedra i Oddział Kliniczny Kardiologii i Transplantologii ŚUM, Śląskie Centrum Chorób Serca, Zabrze

Kardiologia i Torakochirurgia Polska 2009; 6 (2): 384–390

Streszczenie

Wstęp: Inżynieria tkankowa jest dziedziną wiedzy pomocną w opracowywaniu koncepcji nowego typu bioprotez zastawek serca. Jednym z kluczowych zagadnień związanych z tworzeniem bioprotez biologicznych w oparciu o techniki inżynierii tkankowej jest optymalizacja metody otrzymywania bezkomórkowych rusztowań tkankowych, na których hodowane są komórki autologiczne. Właściwe przygotowanie rusztowania komórkowego wydaje się niezwykle istotne, ponieważ rusztowanie to pełni istotną funkcję mechaniczną oraz uczestniczy w przekazywaniu sygnałów komórkowych.

Cel pracy: Celem pracy było porównanie efektywności różnych metod acellularyzacji zastawek serca oraz ocena zakresu zmian morfologicznych tkanek dla określenia ich przydatności w zastosowaniach związanych z inżynierią tkankową zastawek serca.

Materiał i metody: Materiał do badań, który stanowiły zastawki płucne, podzielono na cztery grupy: 1) cykliczne zamrażanie i rozmrażanie, 2) 12-godzinna inkubacja w roztworze NaCl, a następnie inkubacja w r-r SDS (ang. *sodium dodecyl sulphate*), 3) 48-godzinna inkubacja w r-r Trypsyna/EDTA, 4) 48-godzinna inkubacja w roztworze Trypsyna/EDTA w połączeniu z inkubacją w r-r SDS. Efektywność acellularyzacji oceniano z użyciem techniki mikroskopii świetlnej. Po procesie acellularyzacji oceniano również zdolność wzrostu komórek na acellularnym rusztowaniu tkankowym.

Wyniki: Całkowite usunięcie komórek wraz z zachowanym prawidłowym obrazem macierzy zewnątrzkomórkowej zaobserwowano dla tkanek inkubowanych w r-r Trypsyna/EDTA, w połączeniu z inkubacją w r-r SDS – grupa 4. W grupie tej na hodowane na acellularne rusztowanie komórki tworzyły dobrze zintegrowaną monowarstwę na jej powierzchni.

Abstract

Introduction: Tissue engineering is a promising tool for the creation of new type of heart valve bioprosthesis. Crucial for the preparations of tissue scaffolds are the optimizations of the acellularizations methods. The intracellular matrix play both an important mechanical role, they act also as a signaling factor to induce the cell proliferations, migrations and differentiations. The acellularizations procedures have been commonly used in a tissue engineering applications to create the biological scaffold used for the preparations of heart valve bioprosthesis. But the efficiency of the acellularizations procedure depends on the methods are used and the tissue type. The type of acellularizations procedure determines both the effectiveness of cell removal and the type of extracellular matrix damage which influence the ability to use the tissue scaffold for the preparations of autologous heart valve.

Aim: The aim of the study was to compare the method of valve leaflets acellularization to obtain an intact collagen scaffold valuable for autologous heart valve preparations.

Material and Methods: Fresh porcine hearts obtained from slaughterhouse were transported to the laboratory in Medium 199. The pulmonary valves were dissected from the heart aseptically. The valve leaflets were divided into four groups treated as follows: 1) cyclic freezing and thawing, 2) incubation in SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) solution following 12 h NaCl incubation, 3) 48 h incubation in Trypsin/EDTA solution, 4) SDS incubation combined with Trypsin/EDTA. All results were confirmed microscopically. After decellularization process valve leaflets were seeded with fibroblast cells clone L929 (ATCC line CCL-1), to test their growth ability.

Results: After cyclic freezing and thawing process (group a) and NaCl and SDS incubation (group B) numerous cells are

Adres do korespondencji: dr n. med. Piotr Wilczek, Fundacja Rozwoju Kardiologii, Pracownia Bioinżynierii, ul. Wolności 345A, 41-800 Zabrze, tel. +32 37 35 631, faks +32 37 35 677, e-mail: mildes@post.pl

Wnioski: Właściwie prowadzony proces acellularyzacji tkanek wydaje się kluczowym dla uzyskania rusztowania biologicznego, mogącego być skutecznie wykorzystanym w procesie tworzenia bioprotez zastawek serca. Optymalizacja metody acellularyzacji pozwala na zminimalizowanie uszkodzeń w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej, co przyczynia się do utrzymania prawidłowych cech biomechanicznych tkanki oraz zapewnienia właściwą komunikację mikromechaniczną pomiędzy komórkami a elementami białek macierzy zewnątrzkomórkowej.

Słowa kluczowe: inżynieria tkankowa, zastawki serca, acellularyzacja.

Wstęp

W leczeniu zarówno wrodzonych, jak i nabytych wad zastawek serca, kiedy zawodzi leczenie konwencjonalne i wyczerpane zostają zdolności kompensacyjne organizmu, konieczne staje się leczenie operacyjne. Stanowi to wciąż jedno z większych wyzwań stawianych przed współczesną kardiologią. Pomimo że zabieg chirurgicznej wymiany zastawki serca jest metodą wykazującą dużą skuteczność kliniczną i z powodzeniem jest stosowany w leczeniu wad zastawek serca, to jednak ma on pewne ograniczenia wynikające z braku idealnego pod względem funkcjonalnym oraz pod względem trwałości substytutu zastawki natywnej. W chwili obecnej w zależności od wskazań klinicznych powszechnie stosowane są protezy mechaniczne lub biologiczne. Pomimo ogromnego postępu, jaki dokonuje się stale w dziedzinie tworzenia bioprotez zastawkowych, zarówno jedne, jak i drugie mają ograniczenia. W przypadku zastawek mechanicznych istotnym czynnikiem limitującym jest konieczność stosowania u pacjenta długoterminowej terapii przeciwzakrzepowej. Potencjalna immunogenność, stymulowanie reakcji zapalnej to niepożądane cechy, jakie mogą być związane ze stosowaniem bioprotez biologicznych. Dodatkowo zastawki biologiczne obciążone są ryzykiem wapnienia, problem ten w szczególności dotyczy ksenogennych protez zastawkowych konserwowanych związkami chemicznymi, takimi jak aldehyd glutarowy. Konsekwencjami występowania tych wad mogą być postępujące zmiany degeneracyjne tkanek, prowadzące do częściowej lub pełnej utraty funkcjonalności wszczepionych zastawek. Dlatego tym większe nadzieje wiąże się z technikami inżynierii tkankowej, stwarzającymi możliwość konstruowania bioprotez zastawkowych o większej biokompatybilności, a tym samym większej trwałości.

Koncepcja tworzenia tego rodzaju zastawek serca, tzw. TEHV (ang. *tissue engineered heart valve*) opiera się na wykorzystaniu w konstrukcji bioprotezy, rusztowania, którym może być acellularna tkanka ludzka lub odzwierzęca. Tkaniki, w szczególności ksenogenne, poddawane są dodatkowo konserwacji chemicznej, której celem jest stabilizacja macierzy zewnątrzkomórkowej oraz ewentualne usunięcie lub maskowanie miejsc antygenowych, które mogłyby stymulować reakcję immunologiczną.

Na odpowiednio przygotowane rusztowanie nahodowane są następnie komórki własne pacjenta. Mogą to być dorosłe komórki śródbłonna i fibroblasty izolowane

present in the tissue. Complete removal of cells and native collagen structure preservation were observed after SDS treatment following Trypsin/EDTA incubation (group 4). The endothelial cells seeded on the acellular tissue form the monolayer on the surface of the valve.

Conclusions: The incubation of heart valve leaflets in SDS solution following Trypsin/EDTA is an efficient method to obtain acellular valve scaffold with well preserved extracellular matrix structure ideal for the autologous cell seeding study.

Key words: tissue engineering, heart valve, acellularizations.

z naczyńia żylnego biorcy. Wydaje się jednak, że bardziej obiecującym źródłem mogą być izolowane ze szpiku kostnego mezenchymalne komórki macierzyste.

Istotnym zagadnieniem związanym z tworzeniem zastawkowych protez serca z wykorzystaniem technik inżynierii tkankowej jest pozyskanie i właściwe przygotowanie rusztowania, na którym nahodowywane będą komórki własne pacjenta. Jako materiał biologiczny dla tworzenia rusztowań wykorzystywane być mogą tkanki ludzkie lub zwierzęce, z których dzięki zastosowaniu metod enzymatycznych lub chemicznych usuwane są komórki dawcy w taki sposób, aby zachować nienaruszoną strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej. Tkanka ludzka stanowi niewątpliwie bardzo dobry materiał, który może być wykorzystany w tworzeniu protez zastawek serca, należy jednak pamiętać o stale istniejącej dysproporcji pomiędzy liczbą dawców a potencjalnych biorców. Tego rodzaju przesłanki skłaniają do myślenia o alternatywnych źródłach materiału tkankowego, który mógłby posłużyć tworzeniu bioprotez. Takim materiałem mogą być tkanki odzwierzęce, z których usuwane będą komórki, które następnie poddawane będą konserwacji chemicznej w celu ich mechanicznej stabilizacji, oraz – co ważne – w celu usunięcia antygenów odpowiedzialnych za reakcję immunologiczną.

Wydaje się zatem, że bioprotezy zastawkowe otrzymywane z wykorzystaniem technik inżynierii tkankowej mogą stanowić ważną alternatywę dla obecnie stosowanych protez biologicznych lub mechanicznych jednocześnie, co może stanowić odpowiedź na wyzwania, jakie stawia współczesna kardiologia w zakresie leczenia wad zastawkowych serca.

Cel pracy

Celem pracy było porównanie efektywności różnych metod acellularyzacji zastawek serca oraz ocena zakresu zmian morfologicznych tkanek dla określenia ich przydatności w zastosowaniach związanych z inżynierią tkankową zastawek serca.

Materiał i metody

Acellularyzacja płatków zastawek

Zastawki świńskie pobierano, a następnie transportowano w płynie Hanksa (Gibco, HBSS kat. nr 24020091). Za-

stawki aortalne były preparowane do 2 godz. od pobrania. Wstępnie oceniano w nich fenestracje, obecność złogów tłuszczowych, obrzęki oraz inne zmiany patologiczne.

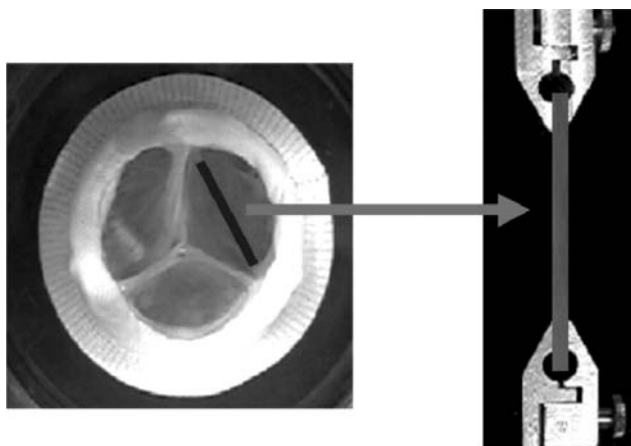
Po wypreparowaniu zastawki przenoszono do kąpeli antybiotykowej zawierającej PBS, 1% Difflucan (Pfizer), 1% Ciprofay (Bayer) na okres 24 godz. w temp. 4°C. Po kąpeli antybiotykowej zastawki były płukane w roztworze PBS, a następnie poddane procedurom acellularyzacji z zastosowaniem następujących metod: 1) cyklicznego zamrażania i rozmrażania tkanek; 2) 12-godzinnej inkubacji w NaCl w połączeniu z 30-minutową inkubacją w 0,5% SDS (ang. *sodium dodecyl sulphate*; BDH, kat. nr 442152V); 3) 48-godzinnej inkubacji w roztworze Trypsyna/EDTA (0,5 g/l trypsyny świńskiej oraz 0,2 g/l EDTA w roztworze HBSS – ang. *Hank's Balanced Salt Solution*; Sigma, kat. nr T3924); 4) 15-minutowej inkubacji w SDS w połączeniu z inkubacją w roztworze Trypsin/EDTA.

Badanie histopatologiczne i morfologiczne z wykorzystaniem technik mikroskopii świetlnej oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej

Fragmenty tkanki do badań w mikroskopii świetlnej utrwalano w 99-proc. alkoholu etylowym i zatapiano w bloczkach parafinowych. Przy użyciu mikrotomu rotacyjnego cięto je na fragmenty o grubości 5 µm. Tkanki zastawki barwiono przy użyciu roztworu hematoksyliny i eozyny (H-E), a następnie otrzymane preparaty obserwowano z użyciem mikroskopu Reichert Polyvar 2. Oceniano skuteczność procesu acellularyzacji, stopień zmian morfologicznych w obrębie macierzy oraz skuteczność zasiedlania przez komórki bezkomórkowych konstruktów.

Transmisyjna mikroskopia elektronowa – ocena zmian w obrębie glikozaminoglikanów

Fragmenty tkanek przeznaczone do badań w transmisyjnej mikroskopii elektronowej barwiono zgodnie z metodyką Simionescu [1]. Płatki zastawek utrwalano w 0,1 M buforze kokadylowym o pH 7,2 zawierającym 0,2-proc. bę-



Ryc. 1. Sposób przygotowania próbki dla jednoosiowych testów naprężeń.

kit toluidyny O, po czym inkubowano je w tych warunkach, w temperaturze 4°C przez noc. Po inkubacji płatki zastawek przepłukiwano w 0,1 M buforze kokadylowym o pH 7,2 zawierającym 0,2-proc. błękit toluidyny O. Następnie preparaty inkubowano przez 1 godz. w 1-proc. OsO₄ w 0,1 M buforze kokadylowym o pH 7,2 zawierającym 0,2-proc. błękit toluidyny O. Następnie próbki traktowano przez wzrastające stężenia etanolu, przenoszono do tlenku propylenu i zanurzano w EPON-ie. Ultracienkie skrawki (80 nm) barwiono z użyciem octanu uranylu i cytrynianu, a następnie analizowano z użyciem mikroskopu transmisyjnego JEOL JEM1200EX TEM przy napięciu 80 kV. Zastosowanie błękitu toluidyny O jest efektywne dla oceny zmian morfologicznych w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej, w tym dla oceny zmian w obrębie glikozaminoglikanów.

Testy biomechaniczne

Dla badanych zastawek natywnych i acellularnych wykonywano jednoosiowe testy naprężeń. Płatki zastawek cięto w sposób pokazany na rycinie 1.

Fragmenty płatków zastawek przeznaczone do badań wycinano w kierunku obwodowym. Każdorazowo mierzono grubość i długość próbki. Stosunek długości do szerokości wynosił 1 : 10. Do badań wykorzystano uniwersalną maszynę do testów mechanicznych (MTS Synergy 400), do analizy danych wykorzystano oprogramowanie TestWorks® (MTS Systems Corporation, Eden Prairie, MN, USA).

Pokrywanie komórkami acellularnych płatków zastawek

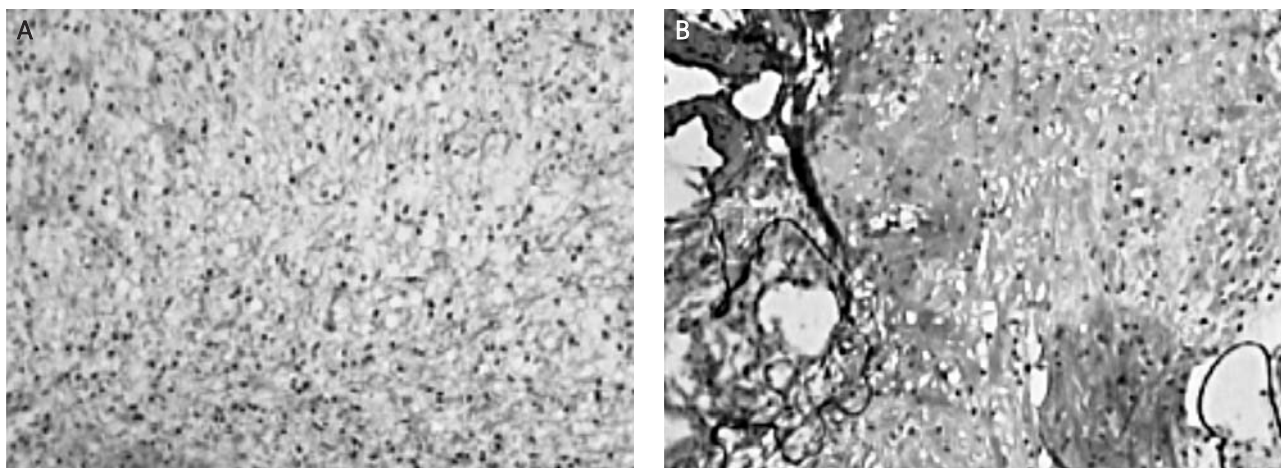
Do nahodowywania acellularnych rusztowań *in vitro* stosowano fibroblasty linii L929 (ATTC linia CCL-1). Komórki hodowano w naczyniach hodowlanych o powierzchni wzrostu 75 cm² w medium 199 suplementowanym 20-proc. surowicą cielęcą – FBS (Gibco kat. nr 10106169), 0,01 mg/ml bFGF (ang. *basic Fibroblasts Growth Factor*; Sigma F0291) w temperaturze 37°C w inkubatorze z 5-proc. przepływem CO₂. Medium hodowlane zmieniano w odstępach 2–3-dniowych. Po osiągnięciu konfluentnej monowarstwy komórki trypsynizowano i zawieszano w pełnym medium hodowlanym.

Płatki zastawek przed nahodowywaniem płukano w PBS i preinkubowano w medium 199, suplementowanym jak podano powyżej, przez 72 godz. Następnie acellularne płatki zastawek przenoszono do naczyń wielodołkowych, a przygotowaną uprzednio zawiesinę komórek umieszczano na powierzchni płatków. Przygotowane płatki zastawek pokryte komórkami hodowano w pełnym medium w standardowych warunkach. Po odpowiednim czasie hodowania tkanki badano z użyciem techniki mikroskopii świetlnej oraz TEM w celu oceny zdolności zasiedlania przez komórki acellularnych płatków zastawek oraz możliwości resyntezy glikozaminoglikanów przez nahodowywane komórki.

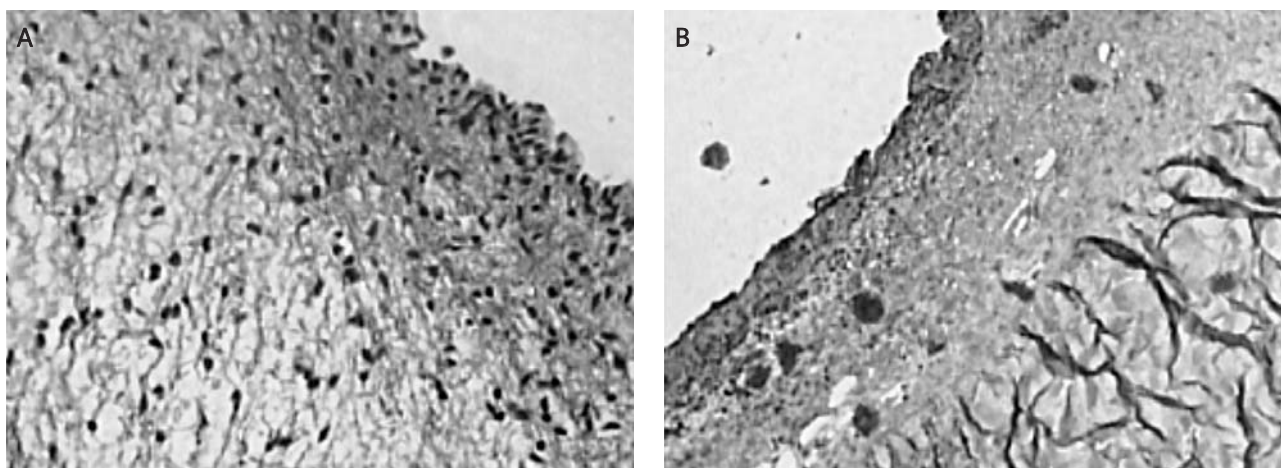
Wyniki

Acellularyzacja

W płatkach zastawek grupy kontrolnej obserwowano typową dla tego rodzaju tkanki morfologię, nie obserwowano



Ryc. 2A–B. Przekrój poprzeczny przez fragment zastawki tętnicy płucnej (ujęcia tętniczego prawego) poddany procedurze acellularyzacji z zastosowaniem metody cyklicznego zamrażania i rozmrażania: A. Tkanka natywna – cytoplazma, włókna kolagenowe oraz pozostałe włókna tkanki łącznej były zabarwione na różowo, liczne jądra fibroblastów o kształcie owalnym, były ciemnogrnatowe. B. Tkanka traktowana, z licznymi pozostałościami komórek widocznymi w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej oraz wyraźnymi cechami obrzęku płatków zastawek i uszkodzenia kolagenu. Barwienie hematoksyliną i eozyną.



Ryc. 3A–B. Przekrój poprzeczny przez fragment zastawki tętnicy płucnej (ujęcia tętniczego prawego) poddany procedurze acellularyzacji w obecności detergentu SDS oraz 12-godzinnej inkubacji w roztworze NaCl: A. Tkanka natywna – cytoplazma, włókna kolagenowe oraz pozostałe włókna tkanki łącznej były zabarwione na różowo, liczne jądra fibroblastów o kształcie owalnym, były ciemnogrnatowe. B. Tkanka traktowana, z licznymi pozostałościami komórek widocznymi w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej oraz wyraźnymi cechami obrzęku płatków zastawek i uszkodzenia kolagenu. Barwienie hematoksyliną i eozyną.

no istotnych uszkodzeń macierzy zewnątrzkomórkowej (ryc. 2A, 3A, 4A, 5A).

Po zastosowaniu procedury cyklicznego zamrażania i rozmrażania w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej obserwowano liczne nieusunięte komórki interstycjalne oraz fragmenty komórkowe. Dodatkowo obserwowano zmiany w macierzy zewnątrzkomórkowej, z widocznymi obszarami obrzęków tkanki (ryc. 2B).

Zastosowanie inkubacji w roztworze NaCl w połączeniu z inkubacją w SDS skutkowało istotnymi zmianami macierzy zewnątrzkomórkowej, w tkance traktowanej obserwowano również liczne fragmenty komórkowe (ryc. 3B).

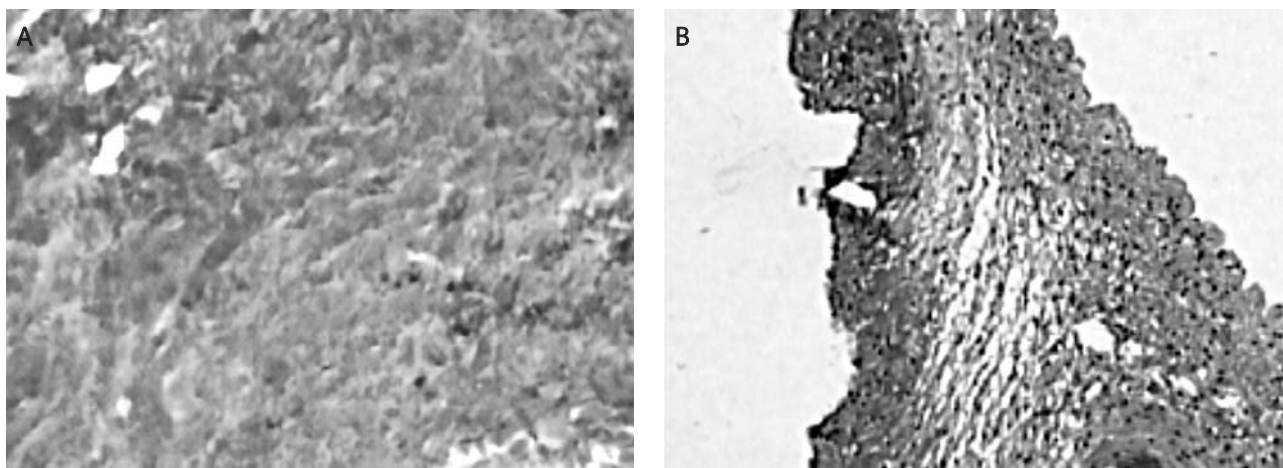
Po 48-godzinnej inkubacji w roztworze Trypsyna/EDTA obserwowano dobrze zachowaną strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej. Jednak w części badanych płatków za-

stawek obserwowano komórki i fragmenty komórkowe niecałkowicie usunięte z traktowanej tkanki (ryc. 4B).

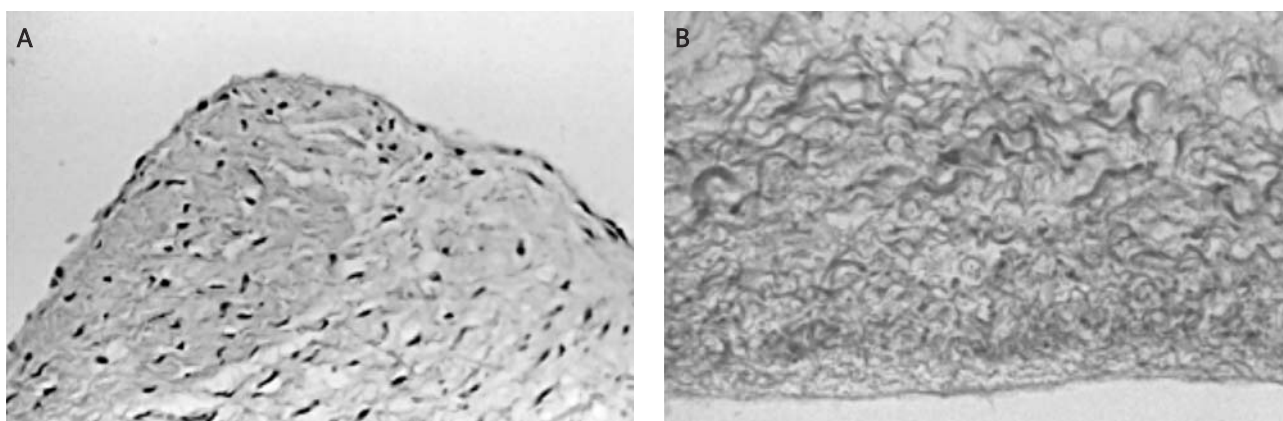
Metoda łącznej inkubacji w roztworze Trypsyna/EDTA wraz z 15-minutową inkubacją 0,5% SDS skutkowało całkowitym usunięciem komórek i reszt komórkowych (ryc. 5B). Obserwowano również dobrze zachowaną strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej.

Nahodowywanie komórek

Tylko fragmenty płatków zastawek, z których udało się w sposób całkowity usunąć komórki (płatki traktowane przy użyciu roztworu Trypsyna/EDTA, w połączeniu z inkubacją w SDS) zostały użyte w badaniach zdolności do nahodowywania komórek. We wszystkich badanych płatkach



Ryc. 4A–B. Przekrój poprzeczny przez fragment zastawki tętnicy płucnej (ujścia tętniczego prawego) poddany procedurze acellularyzacji z zastosowaniem roztworu Trypsyna/EDTA: A. Tkanka natywna – cytoplazma, włókna kolagenowe oraz pozostałe włókna tkanki łącznej były zabarwione na różowo, liczne jądra fibroblastów o kształcie owalnym, były ciemnogrnatowe. B. Tkanka traktowana, z pozostałościami komórek widocznymi w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej oraz wyraźnymi cechami obrzęku płatków zastawek i uszkodzenia kolagenu. Barwienie hematoksyliną i eozyną.



Ryc. 5A–B. Przekrój poprzeczny przez fragment zastawki tętnicy płucnej (ujścia tętniczego prawego) poddany procedurze acellularyzacji z zastosowaniem roztworu Trypsyna/EDTA w połączeniu z inkubacją w detergencie SDS: A. Tkanka natywna – cytoplazma, włókna kolagenowe oraz pozostałe włókna tkanki łącznej były zabarwione na różowo, liczne jądra fibroblastów o kształcie owalnym, były ciemnogrnatowe. B. Tkanka traktowana, w obrazie mikroskopowym zachowana prawidłowo, struktura macierzy zewnątrzkomórkowej bez cech obrzęku i uszkodzenia kolagenu, przy jednoczesnym całkowitym usunięciu elementów komórkowych z tkanki traktowanej.

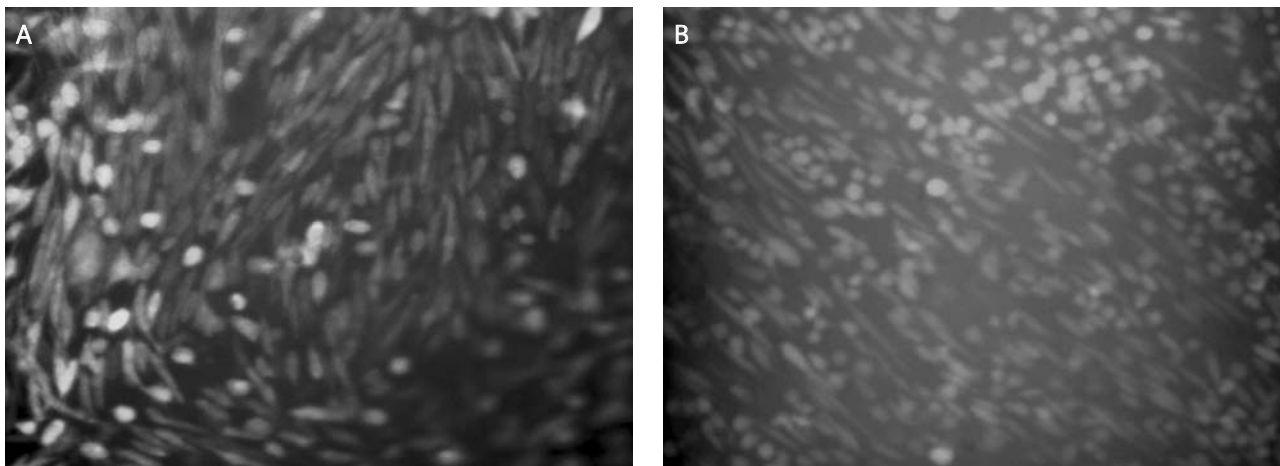
zastawek obserwowano tworzenie się jednolitej monowarstwy komórek już po 2 dniach hodowli. Potwierdzono to w obrazie histochemicznym (ryc. 7.) oraz w obrazie w mikroskopii fluorescencyjnej (ryc. 6.).

Dyskusja

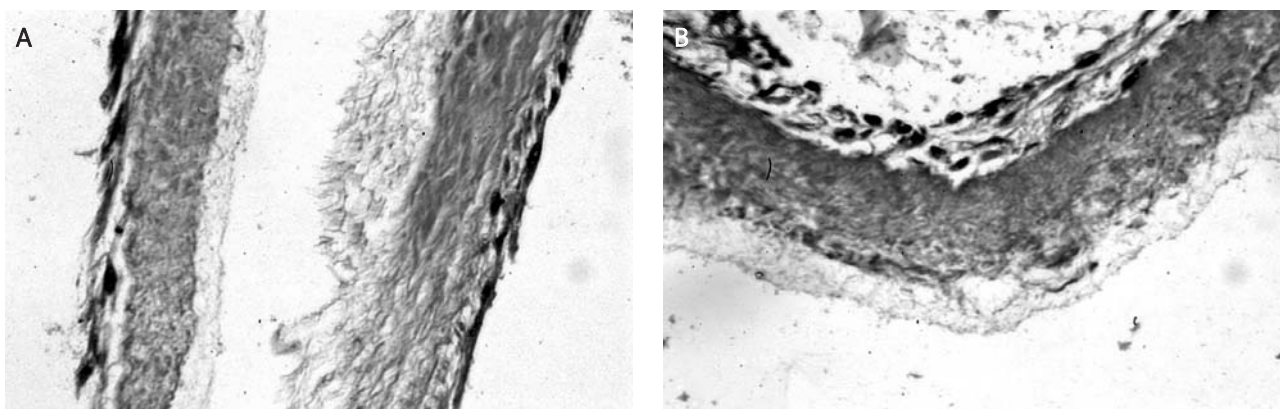
Wady zastawek serca stanowią w chwili obecnej istotny problem, zarówno społeczny, jak i kliniczny. W przebiegu tych chorób dochodzi do upośledzenia przepływu krwi przez zastawki. Mięsień sercowy zmuszony jest wtedy do wykonywania większej pracy w warunkach zwiększonego ciśnienia, tak aby zapewnić właściwy przepływ krwi do tkanek. Towarzyszą temu zwiększenie jam serca oraz niejednokrotnie zaburzenia rytmu serca. Następstwa wad zastawkowych rozwijają się powoli, początkowo bowiem skuteczne są mechani-

zmy wyrównawcze, z czasem jednak mechanizmy adaptacyjne okazują się niewystarczające, dochodzi wtedy do ujawnienia objawów klinicznych. Zmiany następowe obejmują m.in.: zwyrodnienie mięśnia sercowego, arytmie nadkomorowe, migotanie przedsionków, wtórne uszkodzenie płuc.

Wady zastawek serca możemy podzielić na wrodzone oraz nabyte. W obydwu przypadkach, kiedy zawodzi leczenie zachowawcze, koniecznym leczeniem z wyboru wydaje się zabieg kardiochirurgiczny, polegający na implantacji bioprotezy zastawkowej w miejsce uszkodzonej zastawki. W chwili obecnej dostępnych jest szereg różnego typu bioprotez zastawkowych. Są to zarówno protezy mechaniczne, jak i biologiczne. Te ostatnie mogą być pochodzenia odzwierzęcego, tzw. ksenogenne lub też tworzone w oparciu o tkankę ludzką. Pomimo że w konstrukcji tych bioprotez



Ryc. 6. Obraz w mikroskopii fluorescencyjnej tkanek acellulanych z nahodowaną warstwą fibroblastów. Obraz w mikroskopii fluorescencyjnej wskazuje, że nahodowywane komórki są żywe, o czym świadczyła zielona fluorescencja komórek barwionych przy użyciu dwuocyanu fluoresceiny (FDA).



Ryc. 7. Obraz w mikroskopii świetlnej tkanek acellulanych z nahodowaną warstwą fibroblastów po dwutygodniowym okresie hodowli w warunkach *in vitro*. Widoczna zwarta monowarstwa komórek na powierzchni tkanki.

stosowane są coraz doskonalsze rozwiązania, zastawki używane obecnie nie są pozbawione wad. Sprawia to, że ich trwałość jest niewystarczająca.

Problem ten wydaje się szczególnie istotny w odniesieniu do dzieci oraz młodych pacjentów. Postępująca degradacja implantowanej tkanki staje się przyczyną jej dysfunkcji, a w konsekwencji konieczności wykonania reimplantacji zastawki, czyli ponownego wszczepienia nowej protezy. W chwili obecnej dużą uwagę zwraca się na fakt, że większość zmian degradacyjnych macierzy zewnątrzkomórkowej, a więc białek kolagenowych i elastynowych tworzących rusztowanie dla komórek, jest ściśle związana z etapem preparatyki i przygotowania zastawek biologicznych [1].

W prezentowanej pracy płatki zastawek sercowych poddawano modyfikacji poprzez stosowanie różnych metod acellularyzacji tkanek. Efektywność tego procesu oceniano poprzez zdolność do całkowitego usuwania komórek oraz poprzez zakres zmian degradacyjnych w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej. Zaobserwowano, że w przypadku wielu powszechnie stosowanych metod acellularyzacji tka-

nek nie jest możliwe całkowite usunięcie komponentu komórkowego z tkanki natywnej zarówno przy zastosowaniu metody mechanicznej (cykliczne zamrażanie i rozmrażanie), jak i metod chemicznych. W badanym materiale obserwowano liczne pozostałości komórkowe lub fragmenty komórek. Ocena histopatologiczna wykazała istotny stopień uszkodzenia struktury macierzy zewnątrzkomórkowej, z widocznymi w jej obrębie licznymi obrzękami.

Metodą optymalną z punktu widzenia zdolności do całkowitego usuwania komórek oraz zachowania nienaruszonej struktury białek kolagenowych i elastynowych była metoda enzymatyczna w połączeniu z metodą chemiczną, czyli inkubacja w roztworze Trypsyna/EDTA. Przy zastosowaniu tej metody, możliwe było usunięcie komórek z tkanki natywnej, jednocześnie w obrazie w mikroskopii świetlnej oraz w TEM nie stwierdzono istotnych zmian w obrębie białek macierzy zewnątrzkomórkowej, a właściwości biomechaniczne tych tkanek zbliżone były do tkanek natywnych. Jednak podobnie jak w przypadku pozostałych metod acellularyzacji, w obrazie TEM obserwowano utratę GAG z tkanek.

Z danych z literatury wynika, że etap modyfikacji tkanek może prowadzić m.in. do utraty glikozoaminoglikanów z przestrzeni międzyfibrylarnej [2]. W trakcie chemicznej konserwacji zastawek biologicznych przy użyciu aldehydu glutarowego (GA) dochodzi do utraty GAG, co wynika z braku właściwej stabilizacji elementów macierzy zewnątrzkomórkowej [3]. Brak właściwej stabilizacji związany jest m.in. z utratą przez GAG funkcyjnych grup aminowych koniecznych do prawidłowego usieciowania tkanki. W trakcie preparatyki zastawek biologicznych może dochodzić również do spadku żywotności komórek budujących zastawkę. Wydzielane w trakcie śmierci komórkowej enzymy prowadzą również do degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej, w tym GAG-ów [4, 5]. Innym czynnikiem decydującym o utracie glikozoaminoglikanów z tkanki mogą być czynniki czysto mechaniczne [6, 7]. Utrata GAG-ów prowadzi do zmian degradacyjnych tkanki, a w przypadku zastawek biologicznych do istotnego obniżenia ich trwałości [8]. Te hydrofilowe polisacharydy obecne w tkance łącznej odpowiedzialne są m.in. za właściwości mechaniczne tkanek, pełnią również funkcję inhibitorów kalcyfikacji, a zatem czynników hamujących wapnienie [9–11].

W trakcie tworzenia bioprotez zastawkowych w oparciu o techniki inżynierii tkankowej tkanki poddawane są licznym modyfikacjom. Usunięcie komórek w czasie przygotowywania rusztowania kolagenowego wiąże się z jednoczesnym działaniem enzymów proteolitycznych oraz detergentów. Tkanka poddawana jest również działaniu czynników mechanicznych. Działanie enzymów proteolitycznych niezbędnych do przeprowadzenia procesu acellularyzacji może prowadzić do zmian degradacyjnych w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej. Efekt ten może ulec nasileniu na skutek uwalniania z martwych komórek enzymów litycznych. Z drugiej strony wiadomym jest, że GAG-i, które odgrywają istotną rolę mechaniczną w zastawkach, odpowiedzialne są również za stymulowanie procesów zapalnych oraz odpowiedzi immunologicznej. Mogłoby się zatem okazać, że zachowanie nienaruszonej struktury GAG-ów, jakkolwiek korzystne z punktu widzenia mechaniki oraz procesów wapnienia, może okazać się mniej korzystne z powodu możliwości stymulowania reakcji immunologicznej, prowadząc w ten sposób do degradacji tkanki.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty, podjęto również próbę oceny, w jakim stopniu możliwe jest zasiedlenie w układzie *in vitro* acellularnej struktury tkanek komórkami oraz oceny zdolności do resyntezy przez nahodowane komórki GAG. Wydaje się bowiem, że poznanie zachowania GAG-ów w trakcie procesów przygotowywania i konserwacji tkanek powinno się przyczynić do lepszego zrozumienia wpływu procesu konserwacji na strukturę tkanek, a tym samym prowadzić do doskonalenia obecnie stosowanych bioprotez zastawkowych, co niewątpliwie jest korzystne dla pacjentów.

Zaobserwowano, że tkanki w sposób efektywny były zasiedlone przez nahodowywane komórki, które po ok. 2 tyg. hodowli tworzyły na jej powierzchni jednolitą monowarstwę, jednocześnie po tym okresie hodowli obserwowano odtwarzanie się struktury GAG. Wydaje się, że dzięki tym procesom

możliwe jest utrzymanie właściwych funkcji biomechanicznych w tworzonych bioprotezach. Resynteza GAG z jednej strony może przyczynić się do poprawy właściwości mechanicznych bioprotez zastawkowych oraz do obniżenia ryzyka wapnienia implantowanych zastawek, z drugiej natomiast, ze względu na autologiczny charakter odtwarzanych glikozoaminoglikanów, może zmniejszać ryzyko stymulowania reakcji zapalnych i odpowiedzi ze strony układu immunologicznego, które mogłyby prowadzić do zmian degradacyjnych. Wydaje się, że procesy te mogą przyczynić się do zwiększenia trwałości tworzonych bioprotez sercowych.

Rodzi się zatem pytanie, czy proces tworzenia bioprotez sercowych powinien być nakierowany w pełni na zachowanie struktury natywnej tkanki, czy też powinien pozwalać na tworzenie struktury odbiegającej od tkanki natywnej, ale optymalnej dla możliwości stymulowania aktywnych procesów remodelowania zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*.

Wnioski

Właściwie prowadzony proces acellularyzacji tkanek wydaje się kluczowym dla uzyskania rusztowania biologicznego, mogącego być skutecznie wykorzystanym procesie tworzenia bioprotez zastawek serca. Optymalizacja metody acellularyzacji pozwala na zminimalizowanie uszkodzeń w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej, co przyczynia się do utrzymania prawidłowych cech biomechanicznych tkanki oraz zapewnia właściwą komunikację mikromechaniczną pomiędzy komórkami a elementami białek macierzy zewnątrzkomórkowej.

Praca powstała w ramach grantu rozwojowego – R13 016 03.

Piśmiennictwo

1. Simionescu DT, Lovekamp JJ, Vyavahare NR. Degeneration of bioprosthetic heart valve cusp and wall tissues is initiated during tissue preparation: an ultrastructural study. *J Heart Valve Dis* 2003; 12: 226-234.
2. Simionescu DT, Lovekamp JJ, Vyavahare NR. Glycosaminoglycan-degrading enzymem in porcine aortic hart valves: implications of prosthetic hart valve degradations. *J Heart Valve Dis* 2003; 12: 217-225.
3. Schoen SJ, Levy RJ. Tissue hart valves: current challenges and future research perspectives. *J Biomed Mater Res* 1999; 47: 437-465.
4. Simionescu DT, Simionescu A, Deac R. Detections of remnant proteolytic activities In unimplanted glutaraldehyde – treated bosine pericardium and explanted cardiac bioprostheses. *J Biomed Mat Res* 1993; 27: 821-829.
5. Hopwood D. Some aspects of fixations with glutaraldehyde. A biochemical and histochemical comparisons of the effect of formaldehyde and glutaraldehyde fixation on varius enzymes and glycogen, with a note of penetrations of glutaraldehyde into liver. *J Anat* 1967; 101: 83-92.
6. Vyavahare N, Ogle M, Schoen SJ, Zand R, Gloeckner DC, Sacks M, Levy RJ. Mechanizm of bioprosthetic hart valve failure: Fatigue causes collagen denaturations and glycosamine loss. *J Biomed Mater Res* 1999; 46: 44-50.
7. Mako WJ, Calabro A, Ratliff NB, Vesely I. Loss of glycosaminoglycans (GAGs) from implantem bioprosthetic hart valves. *Circulation* 1997; 1-155: 863.
8. Talman EA, Boughner DR. Glutaraldehyde fixation alters the internal shear prooerties of porcine aortic hart valve tissue. *Ann Thorac Surg* 1995; 60 (2 Suppl.): 369-373.
9. Jorge-Herro E, Fernandez P, Gutierrez M, Castillo-Olivares JL. Study of the calcifications of bosine pericardium: Analysis of implications of lipids and proteaglycans. *Biomateriale* 1991; 12: 683-689.
10. Strates B, Lian JB, Nimni ME. Calcification In cardiovascular tissue and bioprostheses. Nimni ME (ed.). *Collage* 1989; Volume III. Biotechnology. CRC Press, Boca Raton FL, 1989: 274-292.
11. Lovekamp J, Vyavahare N. Periodate-mediated glycosaminoglycan stabiliza-tion in bioprosthetic hart valves. *J biomed Mater Res* 2001; 56: 478-486.