Acellularne łaty biologiczne pokrywane mezenchymalnymi komórkami macierzystymi i ich potencjalne wykorzystanie w zabiegach rekonstrukcji lewej komory serca

Acellular patches seeded with mesenchymal stem cells – potential use in left ventricle surgical remodelling

Piotr Wilczek[1,2], Zbigniew Małota[1], Jerzy Nożyński[2], Roman Przybylski[2], Marian Zembala[2]

[1]Fundacja Rozwoju Kardiochirurgii, Pracownia Bioinżynierii, Zabrze
[2]Śląskie Centrum Chorób Serca, Katedra i Oddział Kliniczny Kardiochirurgii i Transplantologii ŚUM, Zabrze

Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska 2010; 7 (1): 66–80

Streszczenie

Wstęp: Zabieg chirurgicznej rekonstrukcji lewej komory serca jest z powodzeniem wykorzystywany do przywrócenia prawidłowej kurczliwości chorobowo zmienionego mięśnia sercowego. Łaty biologiczne uzyskiwane technikami inżynierii tkankowej, pokrywane komórkami autologicznymi szpiku kostnego mogą stanowić potencjalne narzędzie wykorzystywane w zabiegach rekonstrukcji lewej komory serca.

Cel: Celem pracy była analiza możliwości wykorzystania izolowanych i hodowanych w warunkach *in vitro* komórek szpiku i wykorzystania ich w przygotowaniu łaty biologicznej przeznaczonej do zabiegów rekonstrukcji lewej komory serca.

Materiał i metody: Izolowane ze szpiku kostnego komórki były hodowane w warunkach *in vitro*, różnicowane i charakteryzowane. Oceniano również zdolność izolowanych komórek do zasiedlania acellularnych rusztowań. Dodatkowo badano właściwości biomechaniczne łat syntetycznych, komercyjnie wykorzystywanych w zabiegach rekonstrukcji lewej komory serca oraz łat biologicznych. Dla oceny wpływu właściwości biomechanicznych łat syntetycznych i biologicznych na poprawę kurczliwości lewej komory serca wykorzystano metody symulacji komputerowej.

Wyniki: Izolowane komórki szpiku hodowane i różnicowane w warunkach *in vitro* wykazywały cechy fenotypowe i morfologiczne komórek linii śródbłonka. Komórki te efektywnie zasiedlały acellularne matryce biologiczne. Porównanie właściwości biomechanicznych łat syntetycznych i biologicznych wskazało na różnice modułu elastyczności, który był istotnie wyższy dla łat syntetycznych przy jednocześnie istotnie niższych wartościach odkształcenia w porównaniu z łatami biologicznymi.

Wnioski: Izolowane komórki szpiku mogą być efektywnie hodowane i różnicowane w warunkach *in vitro* i wykorzystywane

Abstract

Background: Left ventricle surgical restoration is a promising therapy in patients with an ischaemically altered akinetic or dyskinetic ventricle. Tissue engineered patches seeded with autologous bone morrow cells offer a potential tool for treatment of ischaemic cardiomyopathy in left ventricle surgical restoration therapy.

Aim: The aim of the study was to analyze the possibility to use in vitro differentiated bone morrow cells for the fabrication of tissue-engineered biological patches for use in left ventricle surgical restoration treatment.

Material and method: Bone morrow cells were isolated, cultured in different conditions and characterized in vitro. Tissue-engineered patches were fabricated by seeding these cells on an acellular scaffold. Uniaxial tensile test was used to estimate the biomechanical properties of the synthetic and biological patch. The test was performed in static and dynamic conditions.

Results: Bone marrow cells can be effectively isolated and differentiated in in vitro conditions and seeded on an acellular scaffold. These cells can be differentiated in the endothelial cell lineage. The uniaxial tensile test demonstrated a significant increase in the elastic modulus of the synthetic patch after the accelerated tensile test. No significant increase in the modulus was observed for the biological patch.

Conclusion: The results demonstrate that an acellular scaffold can be effectively tissue-engineered by bone morrow cells. The increase of elastic modulus in the synthetic patch after the accelerated tensile test can influence the haemodynamic properties of the left ventricle. This limits the use of the synthetic patch in left ventricle surgical restorations. The use of tissue-engineered patches can overcome the problems with synthetic patches.

Adres do korespondencji: dr n. med. Piotr Wilczek, Fundacja Rozwoju Kardiochirurgii, ul. Wolności 345 A, 41-800 Zabrze, tel. +48 32 373 56 31, faks +48 32 373 56 77, e-mail: mildes@post.pl

w tworzeniu łat biologicznych w oparciu o techniki inżynierii tkankowej. Tego rodzaju łaty biologiczne ze względu na swoje właściwości biomechaniczne oraz możliwość stymulowania procesów regeneracji i remodelowania mogą być potencjalnie wykorzystywane w zabiegach rekonstrukcji lewej komory serca.
Słowa kluczowe: inżynieria tkankowa, remodelowanie, mezenchymalne komórki macierzyste.

Key words: tissue engineering, remodelling, mesenchymal stem cells.

Wstęp

Ostre zespoły wieńcowe stanowią w chwili obecnej istotny problem kliniczny. W ich przebiegu dochodzi do upośledzenia kurczliwości lewej komory serca. W odpowiedzi na zamknięcie tętnicy dozawałowej następuje przebudowa ściany lewej komory serca. Zjawisko to przebiega w 2 etapach: wczesna faza remodelowania, która zachodzi już w pierwszych godzinach po zawale mięśnia sercowego, jest zjawiskiem korzystnym, mającym na celu adaptację serca do pracy w warunkach zwiększonego obciążenia. Późna faza remodelowania jest natomiast zjawiskiem zdecydowanie niekorzystnym, bowiem zmiany zachodzące w jej przebiegu prowadzą często do trwałego upośledzenia kurczliwości lewej komory serca. W tych sytuacjach zastosowanie może mieć: leczenie farmakologiczne, pełna rewaskularyzacja lub chirurgiczna rekonstrukcja lewej komory serca. Ta ostatnia metoda wydaje się w chwili obecnej najbardziej obiecująca. Istotą zabiegu chirurgicznej rekonstrukcji lewej komory serca jest wycięcie miejsca akinezy lub dyskinezy mięśnia sercowego, a następnie próba odtworzenia właściwego, eliptycznego kształtu koniuszka lewej komory serca. W metodzie Menicantiego używa się w tym celu specjalnego narzędzia, tzw. *mennequin*. W dalszej kolejności następuje wszycie łaty dakronowej w miejscu wrót tętniaka, a następnie zbliżenie pozostałej części ściany tętniaka. Efektem przeprowadzonego zabiegu chirurgicznego jest przywrócenie fizjologicznego kształtu komory serca, dzięki czemu dochodzi do likwidacji niekorzystnych naprężeń. Trwałość tego efektu możliwa jest m.in. dzięki wszyciu łaty, która pozwala na utrzymanie zadanego kształtu. W chwili obecnej najczęściej stosowane są łaty dakronowe pokrywane kolagenem lub konserwowane chemicznie łaty z bydlęcego *pericardium*. Tego rodzaju konstrukcje zapewniają głównie funkcję mechaniczną, nie są natomiast elementem, który w sposób aktywny pozwalałby na stymulowanie procesów regeneracji i remodelowania chorobowo zmienionej tkanki mięśnia sercowego, co pozwoliłoby na przywrócenie prawidłowej kurczliwości lewej komory serca.

Wydaje się, że funkcję taką mogłyby spełniać łaty biologiczne pokrywane komórkami autologicznymi. Tego rodzaju łaty spełniałyby zarówno funkcję mechaniczną, jak i, dzięki zastosowanemu komponentowi komórkowemu, pozwalałyby na aktywne stymulowanie procesów remodelowania lewej komory serca.

Cel pracy

Celem pracy była ocena możliwości hodowli i różnicowania w warunkach *in vitro* komórek szpiku i ich wykorzystania w tworzeniu łat biologicznych w oparciu o techniki inżynierii tkankowej. Celem było również porównanie właściwości biomechanicznych łat syntetycznych i biologicznych i analiza z użyciem metod modelowania komputerowego wpływu tych właściwości na kurczliwość lewej komory serca.

Materiał i metody

Przygotowanie bezkomórkowych matryc

W prowadzonych badaniach tkanki *pericardium* świńskiego poddawano procesowi acellularyzacji w taki sposób, aby uzyskać w pełni bezkomórkową matrycę z jednoczesnym zachowaniem nienaruszonej struktury macierzy zewnątrzkomórkowej. Tkanki pobierane były w warunkach jałowych, a następnie przenoszone na okres 24 godz. do kąpieli antybiotykowej. Następnie poddawane były trawieniu enzymatycznemu przy użyciu roztworu trypsyny/EDTA, a w dalszej kolejności inkubowane w detergencie (jednoprocentowy roztwór SDS). Skuteczność metody acellularyzacji potwierdzano w badaniach histopatologicznych.

Izolacja macierzystych komórek mezenchymalnych (MSC) i ich różnicowanie w hodowli w komórki endotelialne oraz mioblasty

Do izolacji macierzystych komórek mezenchymalnych (ang. *mesenchymal stem cells* – MSC) każdorazowo pobierano 5 ml szpiku. Pobrany szpik rozcieńczano w stosunku 1 : 5 w medium hodowlanym suplementowanym 0,5-procentowym FCS oraz heparyną w proporcji 100 U heparyny/ml. Następnie rozcieńczony szpik nawarstwiano na roztwór Ficoll-Paque i wirowano w gradiencie stężeń przy 900 g przez 30 min w temperaturze pokojowej. Po odwirowaniu komórki płukano dwukrotnie w medium hodowlanym zawierającym 0,5-procentowy FCS. Komórki warstwy środkowej przenoszono następnie do medium hodowlanego zawierającego L-glutaminę, penicylinę (10 U/ml), streptomycynę (100 µg/ml), i inkubowano w 37°C w warunkach 5-procentowego przepływu CO_2. Po 24 godz. komórki, które nie uległy adhezji, zlewano. Pozostałe komórki hodowano w medium, które wymieniano co 3 dni.

Po uzyskaniu 75% konfluencji w hodowli pierwotnej komórki przenoszono do hodowli wtórnych.

Komórki w hodowli wtórnej podzielono na 2 grupy eksperymentalne. W pierwszej prowadzono hodowle komórkowe suplementowane za pomocą różnych stężeń ECGS (ang. *endothelial cell growth suplement*). W eksperymencie tym

wyróżniono następujące podgrupy: a) kontrola (hodowane bez ECGS); b) 0,4-procentowy ECGS; c) 2,5-procentowy ECGS; d) 4,8-procentowy ECGS.

W drugim eksperymencie dodatkowym czynnikiem różnicującym było zastosowane podłoże do hodowli komórkowych. W eksperymencie tym wyróżniono następujące podgrupy: a) kontrolna – hodowla prowadzona w standardowych naczyniach hodowlanych i niesuplementowana za pomocą ECGS; b) hodowle suplementowane za pomocą ECGS; c) hodowle prowadzone na podłożu fibronektyny, niesuplementowane za pomocą ECGS; d) hodowle prowadzone na podłożu fibronektyny i dodatkowo suplementowane za pomocą ECGS.

Każdorazowo, w celu identyfikacji komórek oraz w celu monitorowania procesu różnicowania, komórki będą fenotypowane z użyciem przeciwciał: CD 105, CD 117, CD 144, CD 166, CD 31, CD 34, Ki 67.

CD 105 – ekspresja tego receptora związana jest z linią komórek układu naczyniowego i tkanki łącznej, receptor ten występuje na komórkach śródbłonka naczyniowego oraz komórkach mezenchymalnych. Jest komponentem receptora TGF-β, jego ekspresja moduluje odpowiedź na czynniki wzrostu.

CD 144 – nosi również nazwę VE-kadheryny (ang. *vascular endothelial cadherin*), jest przezbłonowym białkiem odpowiedzialnym za połączenia między komórkami endotelialnymi.

CD 166 – jego ekspresja związana jest m.in. z komórkami endotelialnymi.

CD 117 i CD 34 – receptory komórek macierzystych typowe dla komórek niezróżnicowanych. W niektórych przypadkach CD 117 koegzystuje z receptorem CD 34.

Ki 67 – marker proliferacji komórkowej.

Do oznaczeń wykorzystano technikę cytometrii przepływowej. Oznaczenie wykonywano przy użyciu cytometru przepływowego Beckman Coulter FC-500, do analizy wykorzystano program do analizy danych cytometrycznych MXP Analysis Beckman Coulter.

Wszystkie oznaczenia wykonywano pierwszego dnia hodowli wtórnej oraz po 7 dniach jej prowadzenia.

Na każdym z etapów hodowli identyfikowano również morfologię izolowanych komórek. W tym celu stosowano obserwację komórek przy użyciu kontrastu fazowego, wykorzystując technikę Plas-DIC.

W prowadzonych obserwacjach oceniano zmiany indeksu kształtu komórkowego jako wyraz funkcji komórek, obliczając indeks kształtu wg następującego wzoru:

$$\frac{4\pi A}{p^2}$$

gdzie A – powierzchnia komórki, p – obwód komórki.

Stosując powyższy wzór, przyjęto następujące założenia: dla idealnego koła wartość indeksu kształtu wynosi 1, dla idealnej linii – 0. Wartość indeksu kształtu dla komórek endotelialnych (kształt romboidalny) powinna dążyć do 1, natomiast wartość indeksu kształtu dla komórek fibroblastycznych (kształt wrzecionowaty) powinna dążyć do jedności. Założenia te obrazuje schemat (ryc. 1.).

Obserwacje wykonywano przy użyciu mikroskopu badawczego Axio Observerver, do analizy danych wykorzystano program Axio Vision 4.6 (Zeiss).

Nahodowywanie komórek na bezkomórkowe matryce

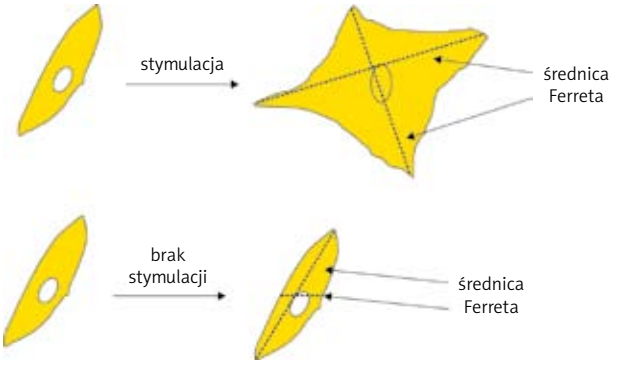
Bezkomórkowe matryce przed nahodowaniem na nie komórek inkubowano przez co najmniej 48 godz. w medium hodowlanym w celu wypłukania resztek detergentu, medium suplementowano surowicą i czynnikami wzrostu. Następnie metodą sedymentacji nanoszono komórki. Podobnie jak w przypadku hodowli komórkowych, hodowlę prowadzono w inkubatorze z 5-procentowym przepływem CO_2 w temperaturze 37°C. Hodowlę prowadzono przez okres 8 tyg. Fragmenty tkanek do badań pobierano w następujących odstępach czasowych: kontrola po 1 tyg. hodowli, po 2 tyg. hodowli, po 3 tyg. hodowli, po 8 tyg. hodowli.

Efektywność zasiedlania komórkami bezkomórkowych matryc oceniano za pomocą techniki mikroskopii fluorescencyjnej. W tym celu zastosowano barwniki przyżyciowe – dwuoctan fluoresceiny (FDA), który wykazuje zieloną fluorescencję i znakuje żywe komórki, jodek propidyny (PI), który wykazuje czerwoną fluorescencję i znakuje komórki martwe. Badanie wykonywano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Axio Observer (Zeiss), do analizy danych wykorzystano program Axio Vision 4.6 (Zeiss).

Fragmenty tkanki do badań w mikroskopii świetlnej utrwalano w 99-procentowym alkoholu etylowym i zatapiano w bloczkach parafinowych. Przy użyciu mikrotomu rotacyjnego pocięto fragmenty o grubości 5 µm. Tkanki barwiono przy użyciu hematoksyliny i eozyny (H-E), a następnie otrzymane preparaty wizualizowano z użyciem mikroskopu Reichert Polyvar 2.

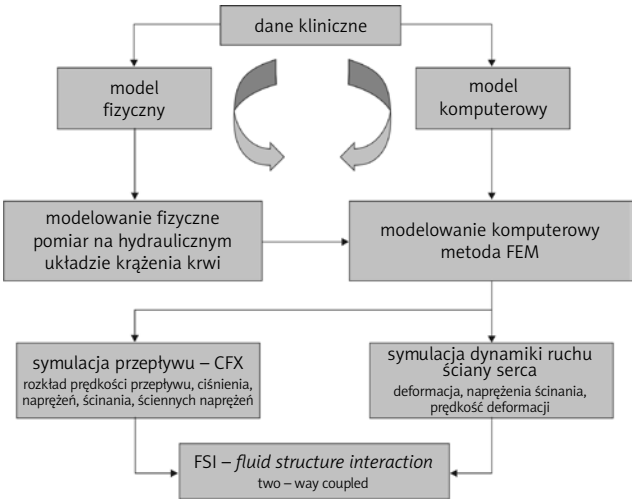
Badania biomechaniczne i hemodynamiczne

Zarówno dla tkanek natywnych i acellularnych, jak i dla materiałów syntetycznych wykonanych z dakronu przepro-



Ryc. 1. Schemat obrazujący zależność funkcji komórek od zmiany indeksu kształtu

wadzono jednoosiowe statyczne testy rozciągania oraz testy zmęczeniowe, w których materiał badany poddawano cyklicznym obciążeniom. W przypadku testów zmęczeniowych, ze względu na fakt, że prowadzone były w sposób długoterminowy, materiał badany umieszczano w komorze środowiskowej.



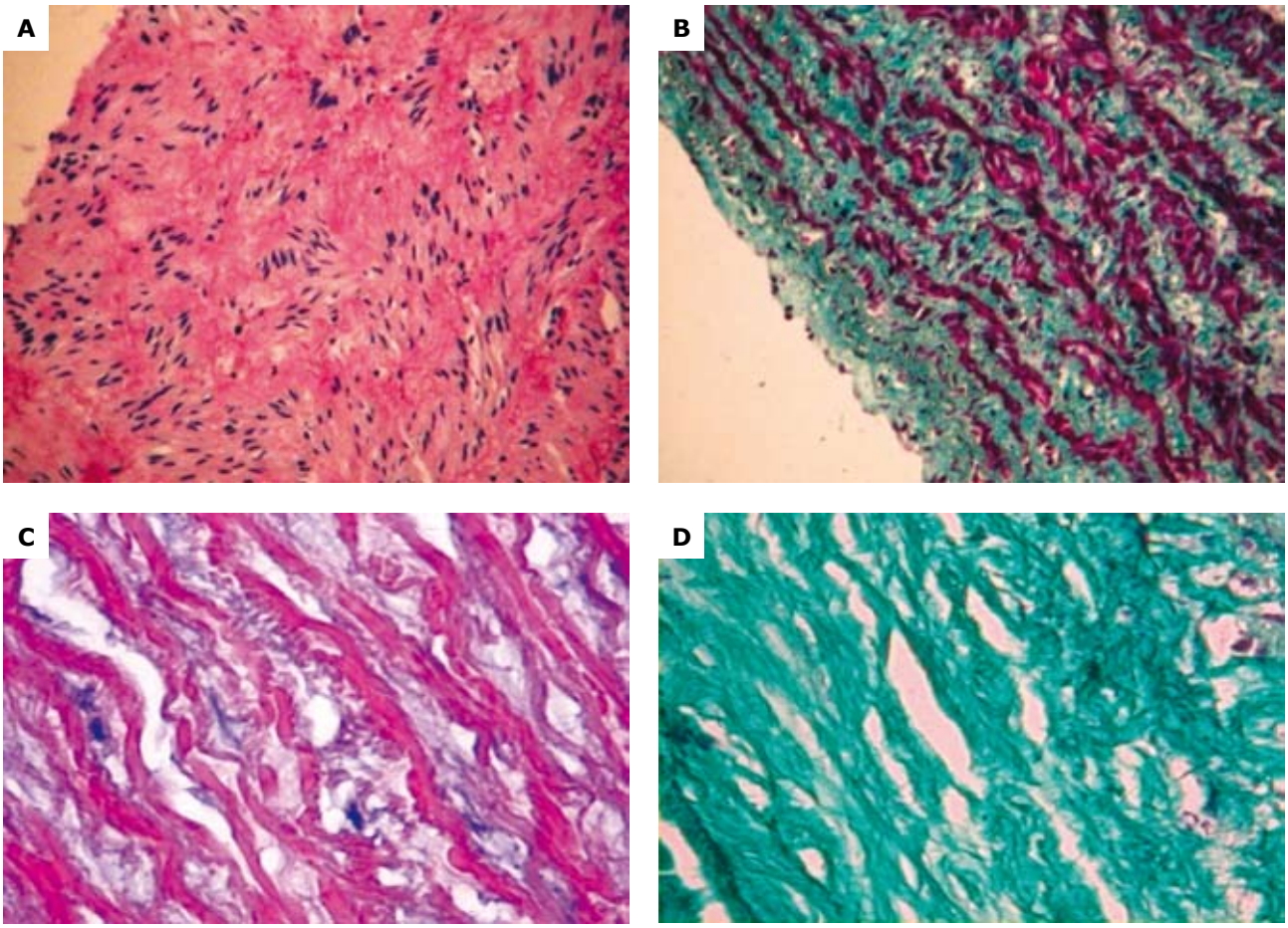
Ryc. 2. Ogólny schemat modelowania lewej komory serca

Badania wykonano przy użyciu maszyny wytrzymałościowej MTS.

Do analizy danych wykorzystano programu Test Works 4.0 firmy MTS. Analizowano wartości krytycznych naprężeń w funkcji deformacji tkanki: granicę plastyczności i sprężystości, siłę zerwania, wartości relaksacji materiału poddanego określonemu naprężeniu. Tkanki biologiczne, w odróżnieniu od większości materiałów sztucznych, nie dają się w prosty sposób opisać w dziedzinie parametrów mechanicznych, dlatego wprowadzono analizę dotyczącą porównania modułów Younga dla typowych obciążeń fizjologicznych dla aorty 100 i 300 G oraz pełny opis w postaci równań konstytutywnych.

Modelowanie komputerowe

Uproszczony schemat modelowania FSI, który zastosowano w prowadzonych badaniach, przedstawiono na ryc. 2. Metoda badań oparta jest na danych eksperymentalnych, które stanowią podstawę budowy modeli fizycznych i kom-



Ryc. 3A–D. Przykładowe obrazy mikroskopowe tkanek natywnych. A – barwienie H-E; B – barwienie Massonoa oraz acellularnych; C – barwienie H-E; D – barwienie Massonoa. W tkance natywnej widoczna prawidłowa histostruktura, utkanie bogato komórkowe z grupami włókien mięśniowych gładkich oraz włóknami łącznotkankowymi i kolagenowymi niewykazującymi zmian. W tkance acellularnej widoczny obraz zdecellularyzowanej tkanki, włókna kolagenowe o prawidłowej barwliwości

puterowych. Dodatkowo wykorzystano dane kliniczne (wartości ciśnienia, natężenia przepływu) w celu zdefiniowania odpowiednich fizjologicznych warunków w hydraulicznym układzie krążenia. Zarówno dane eksperymentalne, jak i dane kliniczne wykorzystywano jako warunki początkowe oraz brzegowe w symulacji komputerowej.

Modelowanie komputerowe (Ansys 11)

W celu określenia wpływu mechanicznych właściwości łaty na wydajność pracy serca (objętość wyrzutową) oraz naprężenia *myocardium* wykorzystano symulację komputerową (Ansys 11) opartą na metodzie elementów skończonych (FEM) wraz z zaawansowaną metodą FSI (ang. *fluid structure interreactions*) łączącą symulację przepływów (CFX) z analizami wytrzymałościowymi. W metodzie FEM obszar przepływu jest dzielony na małe regiony zwane elementami skończonymi. Dla każdego takiego elementu rozwiązywane jest równanie przepływu Naviera-Stokesa wraz z równaniem zachowania masy i energii, w celu określenia prędkości, ciśnienia, naprężeń, deformacji itp. Dzięki temu istnieje możliwość symulacji przepływu krwi z uwzględnieniem właściwości mechanicznych (m.in. modułu Younga) ściany serca i wzajemnego oddziaływania ciecz–ściana serca w czasie jego skurczu. W celu uproszczenia (dla małych deformacji) zastosowano model lewej komory serca (LV) o kształcie eliptycznym z izotropowym linowo elastycznym modelem miokardium, spełniającym prawo Hooka. Wykonano symulacje komputerowe LV z łatą o współczynniku Poissona równym 0,42 i module sprężystości Younga, zarówno 100 MPa, jak i 300 MPa.

Wyniki

Przygotowanie bezkomórkowych matryc

Metoda łącznej inkubacji w roztworze trypsyny/EDTA wraz z 15-minutową inkubacją w 0,5-procentowym roztworze SDS skutkowała całkowitym usunięciem komórek i reszt komórkowych. Obserwowano również dobrze zachowaną strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej. W badanym materiale po acellularyzacji nie obserwowano również cieni jąder, nie obserwowano obrzęku tkanek ani obrzęku kolagenu. Struktura macierzy zewnątrzkomórkowej w wyniku oddziaływania czynników enzymatycznych i chemicznych nie była uszkodzona. W obrazie mikroskopowym obserwowano prawidłowy obraz tkanki acellularnej.

Izolacja macierzystych komórek mezenchymalnych (MSC) i ich różnicowanie w hodowli w komórki endotelialne oraz mioblasty

W ocenie ilości komórek pozytywnych względem badanych receptorów w hodowli wtórnej poddawanej działaniu różnych stężeń ECGS zaobserwowano wzrost wartości procentowych, w szczególności dla receptorów CD 105 oraz CD 166. W przypadku receptora CD 105 był to prawie 3-krotny wzrost odsetka komórek CD 105 pozytywnych w grupie, w której zastosowano najwyższe (4,8%) stężenie ECGS w porównaniu z kontrolą negatywną. W przypadku receptora CD 166 obserwowano ok. 40-procentowy wzrost ilości komórek pozytywnie reagujących z tym receptorem w porównaniu z kontrolą negatywną. Zaobserwowano również zwiększony odsetek komórek pozytywnych względem receptora wewnątrzkomórkowego Ki 67 w stosunku do grupy kontrolnej, jednak wartości tego receptora w poszczególnych grupach badanych nie różniły się istotnie (tab. I).

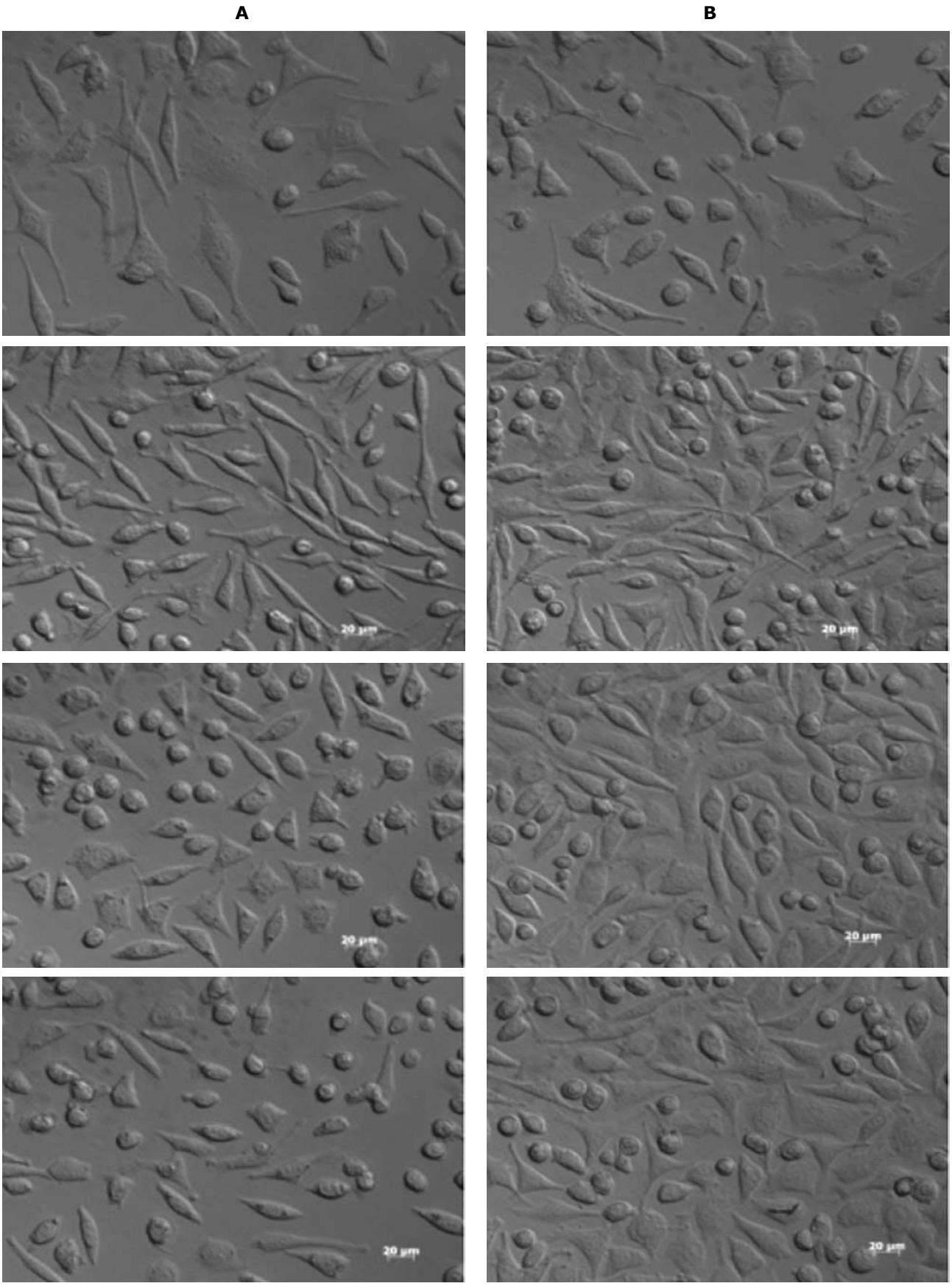
W badaniach mikroskopowych zaobserwowano wzrost liczby komórek w hodowlach suplementowanych za pomocą ECGS, przy czym zarówno na podstawie ilości zdarzeń, jak i wykonanych profili hodowli komórkowych zaobserwowano, że wzrost liczby komórek był powiązany ze stężeniem zastosowanego czynnika wzrostu (ryc. 4.). Równolegle do zmian gęstości komórkowej w prowadzonych hodowlach zaobserwowano korelację pomiędzy zastosowanym stężeniem ECGS a zmianą cech morfologicznych badanych komórek. Wyrazem tego były obserwowane zmiany indeksu kształtu komórkowego. W przypadku grupy kontrolnej oraz grupy, w której zastosowano 0,4-procentowe stężenie ECGS, wartości indeksu kształtu na początku eksperymentu oraz po 7 dniach hodowli nie różniły się istotnie. W przypadku grupy, w której zastosowano 2,5-procentowe oraz 4,8-procentowe stężenie ECGS, obserwowano spadek wartości indeksu kształtu komórkowego, jednocześnie obserwacje mikroskopowe wskazywały na obecność większej ilości komórek o pokroju romboidalnym (tab. II).

W ocenie cytometrycznej ilości komórek pozytywnych względem badanych receptorów w hodowlach różnicowanych ze względu na zastosowany czynnik wzrostu oraz rodzaj podłoża zaobserwowano istotne różnice, w szczególności w odniesieniu do receptorów CD 105 oraz CD 166. W obu przypadkach wartości notowane dla grupy ECGS FN były istotnie wyższe od wartości w pozostałych grupach.

Obserwacje mikroskopowe komórek w poszczególnych badanych grupach wykazały wzrost gęstości komórkowej

Tab. I. Wartości procentowe komórek pozytywnych względem badanego receptora. Oznaczenia poszczególnych receptorów wykonywano bezpośrednio po izolacji komórek, a nastepnie po 7 dniach hodowli suplementowanej zmiennymi stężeniami ECGS

Wartości procentowe	CD 105	CD 144	CD 166	CD 117	CD 34	CD 31	Ki 67
komórki po izolacji	5,26	0,2	15,05	2,12	1,0	28,93	
kontrola	9,55	0,03	16,61	0,0	0,03	0,03	6,08
0,4-procentowy ECGS	13,95	0,03	17,86	0,0	0,03	0,04	9,52
2,5-procentowy ECGS	18,82	0,09	18,7	0,0	0,0	0,1	10,36
4,8-procentowy ECGS	32,26	0,04	23,44	0,0	0,0	0,2	10,56



Ryc. 4A–B. Przykładowe obrazy komórek w hodowli wtórnej – kontrola, 0,4-procentowy ECGS, 2,5-procentowy ECGS, 4,8-procentowy ECGS – uzyskane: A – w czasie „0" (przed rozpoczęciem eksperymentu), B – po 7-dniowej hodowli

Tab. II. Wartości indeksu kształtu komórkowego oraz powierzchni komórek w hodowlach suplementowanych zmiennymi stężeniami ECGS. Oceniane parametry analizowano w hodowli wtórnej po rozpoczęciu eksperymentu oraz po 7 dniach hodowli

	Indeks kształtu		Powierzchnia [µm]	
	dzień „0"	dzień 7.	dzień „0"	dzień 7.
kontrola negatywna	0,45	0,44	346	352
0,4-procentowy ECGS	0,43	0,41	337	416
2,5-procentowy ECGS	0,61	0,49	392	474
4,8-procentowy ECGS	0,74	0,41	354	401

Tab. III. Tabela przedstawiająca wartości procentowe komórek pozytywnych względem badanego receptora. Oznaczenia poszczególnych receptorów wykonywano bezpośrednio po izolacji komórek, a następnie po 7 dniach hodowli

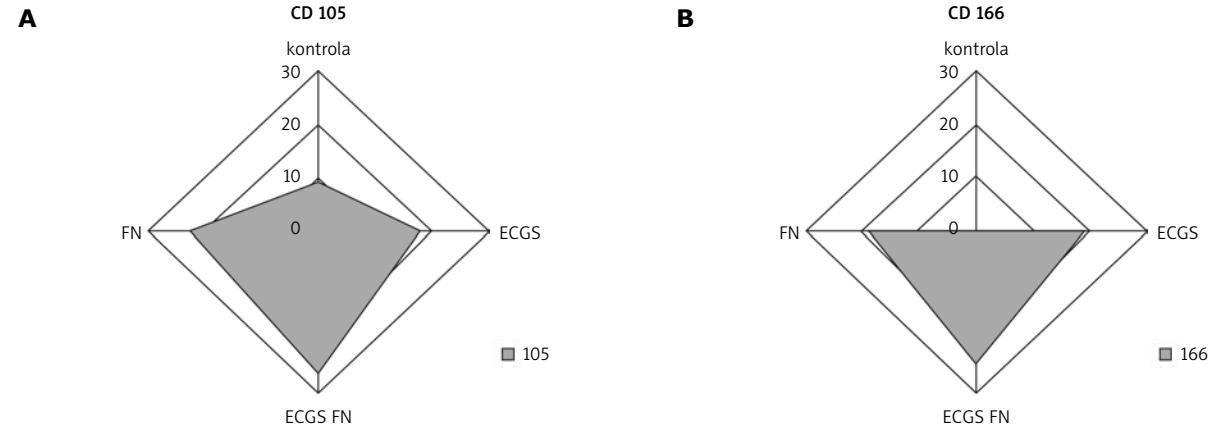
Wartości procentowe	Kontrola	ECGS	ECGS FN	FN
CD 105	9,37	18,1	26,7	22,8
CD 144	15,29	0,43	0,74	0,8
CD 166	0,34	18,8	24,7	18,6
CD 117	0	0,46	2,03	0,98
CD 31	3,1	3,52	1,64	2,62
CD 34	0,58	1,63	0,47	1,09

Tab. IV. Wartości indeksu kształtu komórkowego oraz powierzchni komórek w hodowlach różnicowanych ze względu na zastosowany czynnik wzrostu (**ECGS**), rodzaj zastosowanej powierzchni – fibronektyna (**FN**) oraz hodowle, w których zastosowano oba czynniki różnicujące (**ECGS FN**). Oceniane parametry analizowano w hodowli wtórnej po rozpoczęciu eksperymentu (D1) oraz po 7 dniach hodowli (D2)

	Indeks kształtu		Powierzchnia [µm]	
	D1	D2	D1	D2
ECGS	0,1125498	0,220669	5839	3609
ECGS FN	0,1286569	0,2143732	7081	2607
FN	0,1141384	0,1286569	4514	3489

Tab. V. Wartości parametrów mechanicznych: modułu elastyczności, odkształcenia oraz energii zrywania dla łat syntetycznych oraz tkanek natywnych i acellularnych

	Moduł elastyczności (Mpa)	Odkształcenie [%]	Energia zrywania [J/m2]
łata syntetyczna test statyczny	217	3,9	192 522
łata syntetyczna test zmęczeniowy	328	2,7	147 613
łata biologiczna natywna	4,13	58,9	18 749
łata biologiczna acellularna	3,71	54,1	15 708

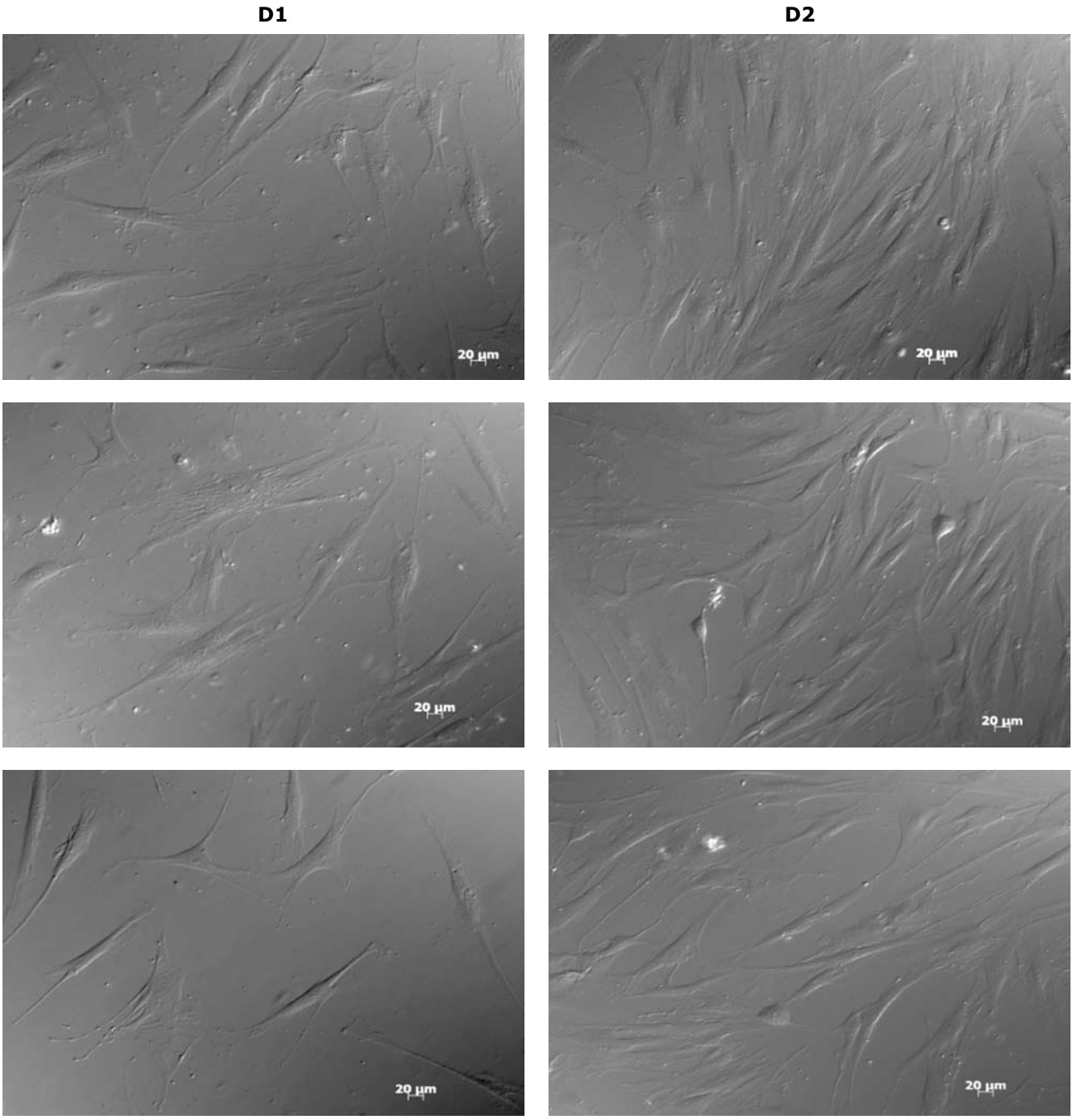


Ryc. 5A–B. Odsetek komórek CD 105 oraz CD 166 pozytywnych w badanych grupach w hodowli wtórnej różnicowanych ze względu na: zastosowany czynnik wzrostu (**ECGS**), rodzaj zastosowanej powierzchni – fibronektyna (**FN**) oraz hodowle, w których zastosowano obydwa czynniki różnicujące – **ECGS FN**

w hodowlach po 7 dniach eksperymentu. Nie odnotowano jednak istotnych różnic w ilości komórek w poszczególnych badanych grupach. Analiza morfologii komórek w badanych grupach wykazała niewielki wzrost indeksu kształtu komórkowego w poszczególnych grupach. Największy, 96-procentowy wzrost wartości indeksu kształtu odnotowano dla grupy **ECGS**, w grupie **ECGS FN** wzrost ten wynosił 66%, natomiast najniższe wartości odnotowano dla grupy **FN** (12%).

Nahodowywanie komórek na bezkomórkowe matryce

Obserwacje mikroskopowe komórek nahodowanych na bezkomórkowe matryce komórek wykazały ich prawidłowy wzrost. Nahodowane komórki były żywe (zielona fluorescencja), jedynie nieliczne komórki (ok. 5%) w poszczególnych grupach wykazywały pozytywną reakcję względem PI, wykazywały czerwoną fluorescencję i klasyfikowane były

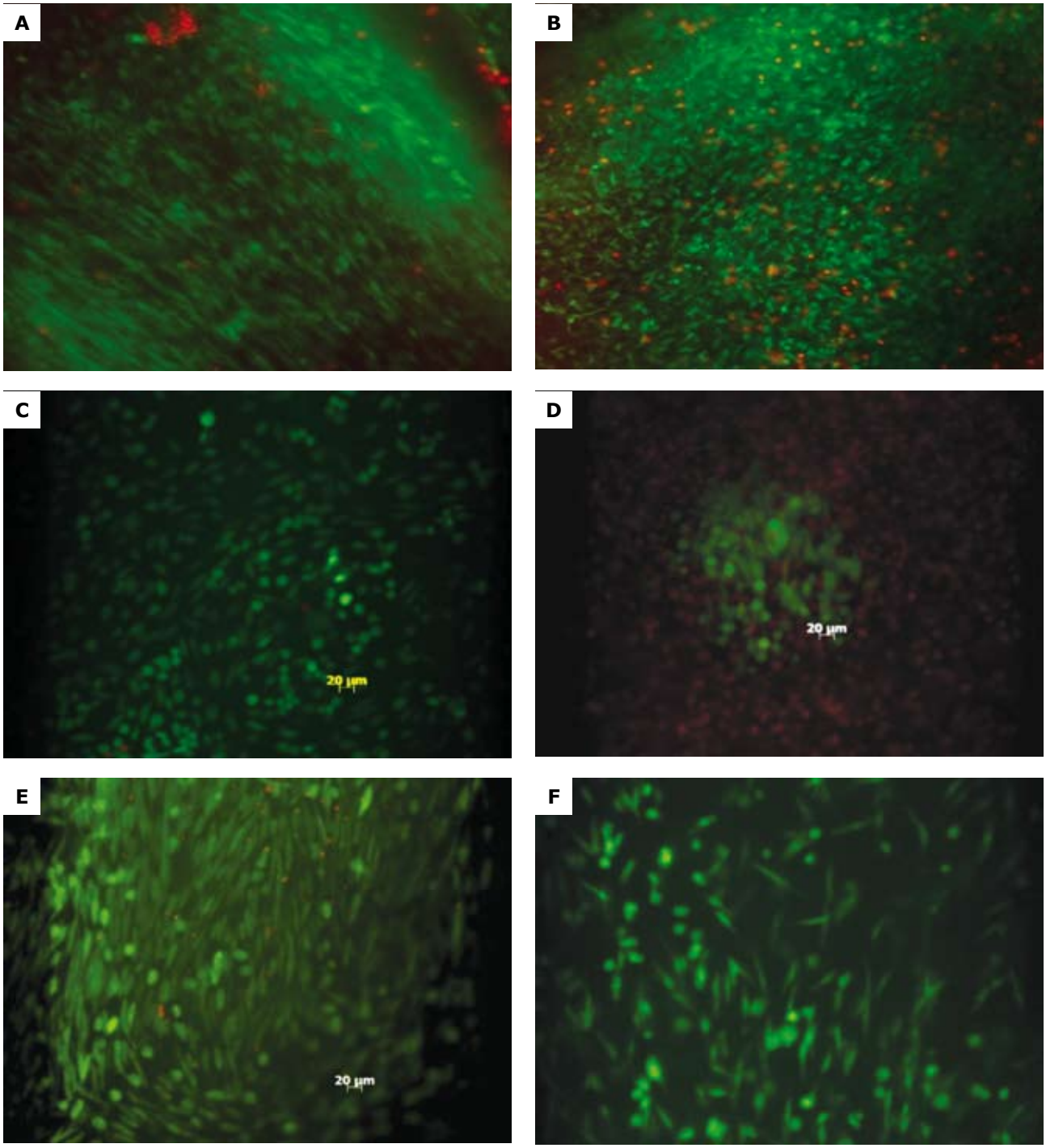


Ryc. 6. Przykładowe obrazy komórek w hodowli wtórnej różnicowanych ze względu na: zastosowany czynnik wzrostu (**ECGS**), rodzaj zastosowanej powierzchni – fibronektyna (**FN**) oraz hodowle, w których zastosowano obydwa czynniki różnicujące (**ECGS FN**). Oceniane parametry analizowano w hodowli wtórnej po rozpoczęciu eksperymentu (D1) oraz po 7 dniach hodowli (D2)

jako martwe. Obserwowane wartości były porównywalne z wartościami dla grupy kontrolnej, którą stanowiła tkanka natywna. W poszczególnych grupach badanych gęstość komórkowa oraz kierunkowość ułożenia komórek była zgodna z obserwowaną dla grupy kontrolnej. W 1. i 2. tyg. hodowli komórki obserwowane były jedynie na powierzchni tkanki. Po okresie 3 tyg. obserwowano cechy migracji komórek do wnętrza acellularnych tkanek, po okresie 8 tyg. komórki migrowały.

Badania biomechaniczne i hemodynamiczne

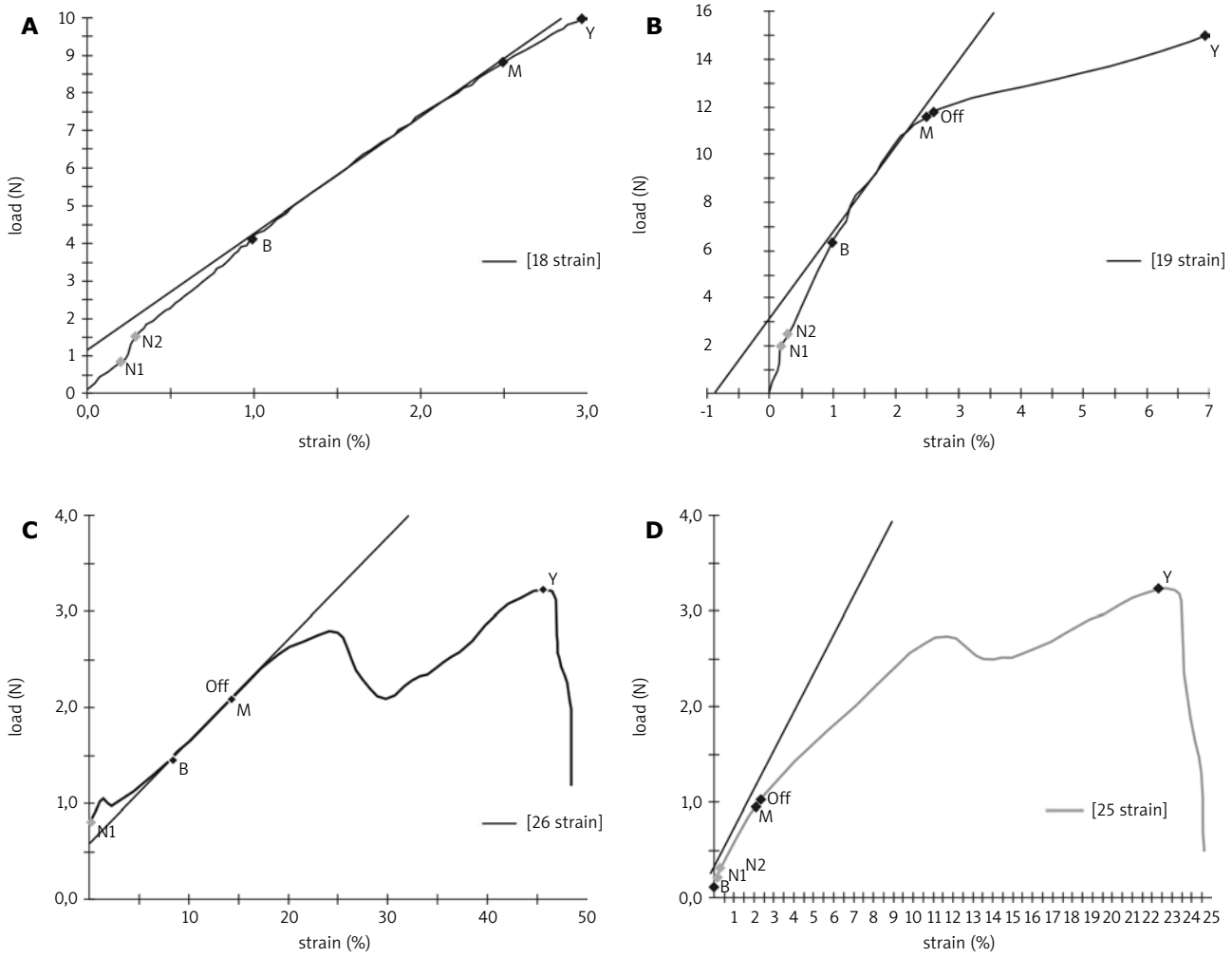
Badania biomechaniczne wykazały istotnie wyższe wartości modułów elastyczności dla łat syntetycznych. Były one średnio 50-krotnie wyższe dla łat syntetycznych w porównaniu z łatami biologicznymi natywnymi i acellularnymi. Jednocześnie wartości odkształcenia dla łat biologicznych były wyższe o ok. 90% od wartości notowanych dla łat syntetycznych. Dodatkowo dla łat synte-



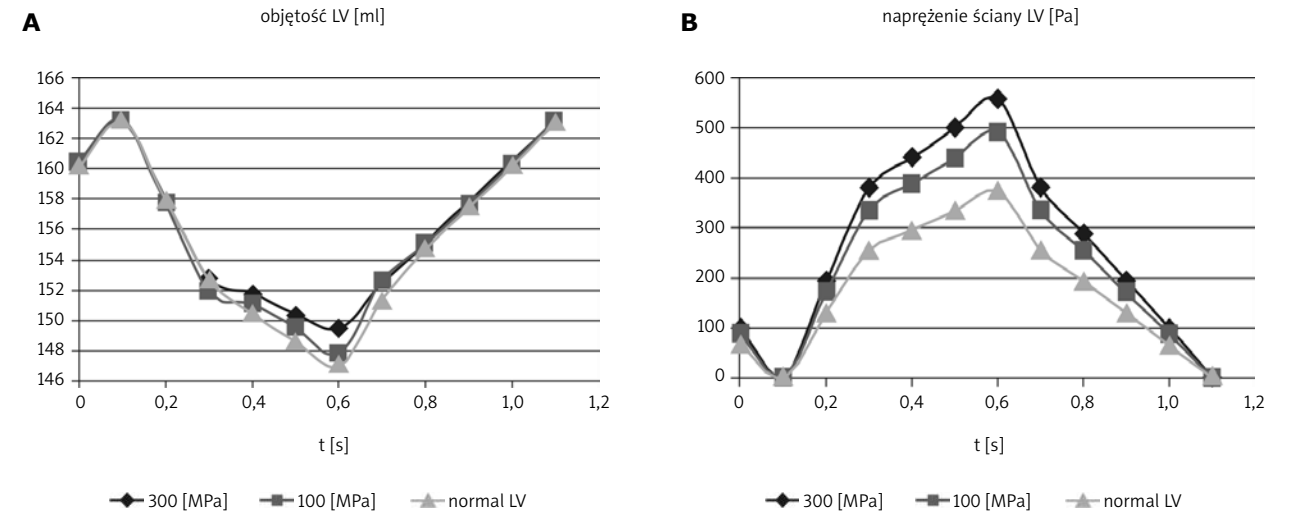
Ryc. 7A–F. Przykładowe obrazy mikroskopii fluorescencyjnej komórek nahodowywanych na bezkomórkowe matryce. A, B – kontrola pozytywna, którą stonowiła tkanka natywna, C – komórki po 1 tyg. hodowli, D – komórki po 2 tyg. hodowli, E – komórki po 3 tyg. hodowli, F – komórki po 8 tyg. hodowli. Jako barwniki przyżyciowe zastosowano FDA – wykazuje zieloną fluorescencję, komórki takie klasyfikowane są jako żywe, oraz PI – znakuje martwe komórki, wykazuje czerwoną fluorescenję.

tycznych obserwowano wzrost modułu elastyczności po testach zmęczeniowych i spadek wartości odkształcenia. Po testach zmęczeniowych dla łat syntetycznych obserwowano również spadek energii zrywania o 25% w stosunku do testów statycznych.

Zastosowanie łaty komorowej wykonanej z dakronu zaburza dynamikę ruchu ściany, zmniejsza wydajność pracy serca (EF) oraz zwiększa ścienne naprężenia ściany lewej komory serca. Modelowanie komputerowe (ryc. 9.) potwierdziło istotny wpływ właściwości mechanicznych łaty na wydajność pracy serca (EF) oraz naprężenia mięśnia sercowego. Sztywna łata o module sprężystości 300 MPa powoduje spadek EF aż o ponad 11% oraz wzrost naprężenia mięśnia sercowego w okolicy łaty prawie o 50% (tab. VI).



Ryc. 8A–D. Przykładowe wykresy jednoosiowych testów zrywania dla: A – łaty syntetycznej w badaniu statycznym, B – łaty syntetycznej w teście zmęczeniowym, C – tkanek acellularnych w teście statycznym, D – tkanek acellularnych w teście zmęczeniowym



Ryc. 9A–B. Wykres zmian objętości oraz naprężeń lewej komory w czasie jednego cyklu pracy serca po rekonstrukcji metodą TR3ISVR™ (E = 300 MPa)

Rekonstrukcja lewej komory serca pośrednio wpływa również na wielkość niedomykalności zastawki mitralnej, głównie wskutek poszerzenia (deformacji) pierścienia oraz zwiększenia odległości pomiędzy mięśniami brodawkowymi w czasie fazy skurczu serca.

Sztywna łata (E = 300 Mpa) stosowana w procedurze TR3ISVR™ zwiększa odległość między mięśniami brodawkowymi w czasie skurczu komory o ok. 5 mm (ryc. 10.). Zastosowanie łaty o mniejszym współczynniku sztywności pozwala na zmniejszenie odległości między mięśniami brodawkowymi nawet o 50% (tab. VII).

Dyskusja

Zastoinowa niewydolność krążenia (ang. *congestive heart failure* – CHF) pomimo dużego postępu w leczeniu zawału serca jest nadal jedną z głównych przyczyn zgonu pacjentów. Powoduje ona wzrost objętości komory oraz zmianę geometrii z normalnej, eliptycznej, na kołową. Zwiększone ciśnienie w lewej komorze zwiększa naprężenia ścian serca (serce wykonuje większą pracę) i zapotrzebowanie na tlen, a to prowadzi do martwicy komórek i zwiększenia obszaru braku kurczliwości (akinezy). Pozostały czynny obszar ulega rozciągnięciu. Maleje wydajność serca. Zwiększa się naprężenie ściany komory i zmniejsza zarazem jej grubość [1–3].

Wśród najczęściej stosowanych chirurgicznych metod leczenia CHF możemy wyróżnić metody stosowane już od wielu lat, takie jak:

- przeszczep serca,
- operacja metodą Dora,
- operacja metodą Batisty,
- kardiomioplastyka metodą Carpentiera;

oraz metody współczesne:

- rewaskularyzacja mięśnia sercowego,
- plastyka zastawki mitralnej z implantacją pierścienia,
- chirurgiczne remodelowanie lewej komory (ang. *surgical ventricular reconstruction* – SVR),
- terapie genowe.

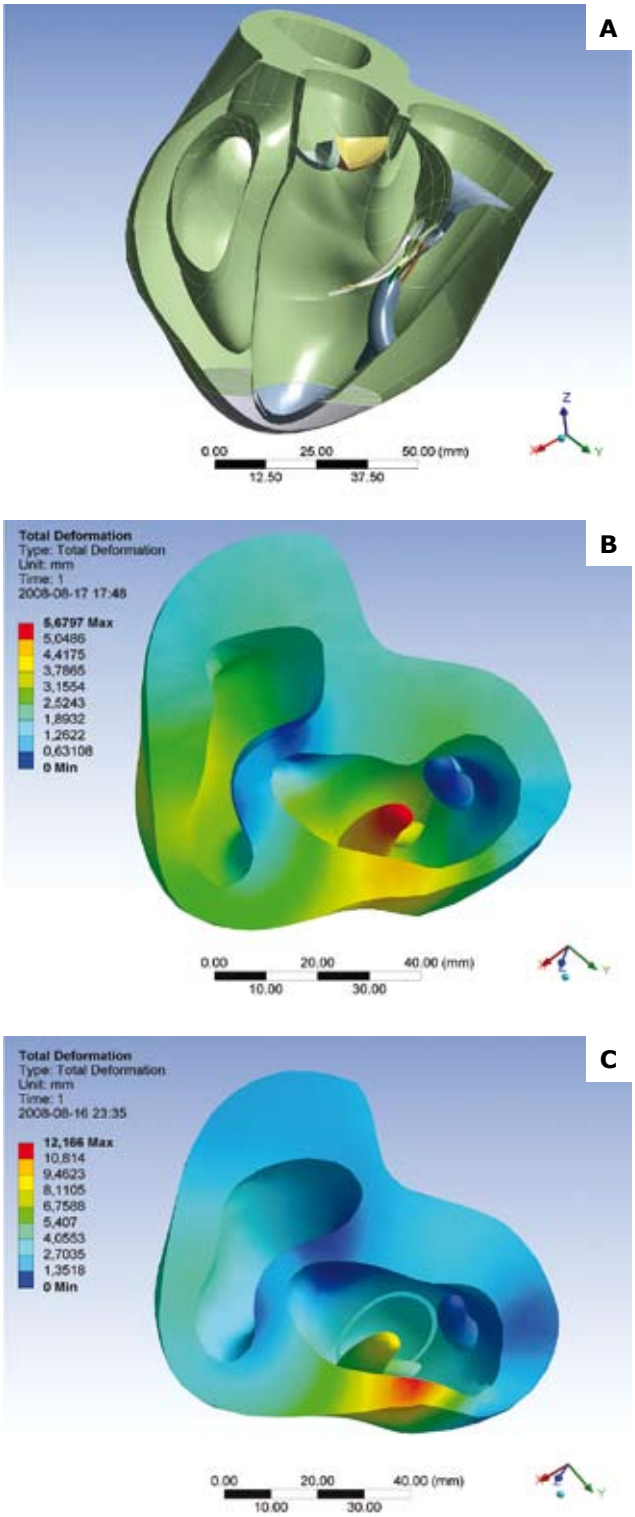
Tab. VI. Wpływ właściwości mechanicznych łaty na frakcję wyrzutową oraz ścienne naprężenia lewej komory serca po rekonstrukcji metodą TR3ISVR™

	Moduł sprężystości łaty	
	100 Mpa	300 Mpa
spadek frakcji wyrzutowej (EDV–ESV) LV	5,2%	11,6%
wzrost naprężenia LV	31,4%	49,3%

Tab. VII. Wpływ właściwości mechanicznych łaty na deformację mięśni brodawkowych podczas fazy końcowoskurczowej dla serca po rekonstrukcji metodą TR3ISVR™

Odległość mięśni brodawkowych [mm]	Serce prawidłowe	Moduł sprężystości łaty	
		100 Mpa	300 Mpa
Top	11,98	15,09	17,15
Base	23,20	26,90	28,32

Ponad 40 lat doświadczeń w stosowaniu rekonstrukcji lewej komory serca opisanych przez Cooleya (1958), Jatene'a (1984), Dora (1985), Di Donato (2001), Buckberga (2001) i Menicantiego [4–8] doprowadziło do powstania w 2002 r.



Ryc. 10A–C. Deformacja miokardium oraz mięśni brodawkowych podczas fazy końcowoskurczowej serca: A – model serca, B – przed rekonstrukcją LV, C – po rekonstrukcji metodą TR3ISVR™ (E = 300 MPa)

kolejnej modyfikacji tego zabiegu – TR3ISVR™ (zwanej też procedurą Menicantiego). Pomimo rozwoju terapii farmakologicznej dopiero zastosowanie chirurgicznej rekonstrukcji LV znacznie poprawiło wyniki przeżycia (w ciągu 5 lat) z 60% do prawie 90%. Obecnie jedną z najbardziej intensywnie rozwijanych metod leczenia pozawałowej CHF jest rekonstrukcja lewej komory serca polegająca na wycięciu (lub zaszyciu, zmarszczeniu) martwego obszaru ściany lewej komory serca, nadaniu komorze odpowiedniego (eliptycznego) kształtu, objętości oraz odtworzenie nowego koniuszka. W przypadku stwierdzenia niedomykalności lewego ujścia przedsionkowo-komorowego wykonywana jest również plastyka zastawki mitralnej (od strony komory) [9]. Metoda SVR jest stosunkowo nowa, w wyniku badań doświadczalnych powstają ciągle kolejne koncepcje jej stosowania.

W metodach SVR zastosowanie mogą mieć zarówno łaty syntetyczne, wykonane najczęściej z dakronu, jak i też łaty biologiczne, pokrywane materiałem komórkowym. W przypadku łat dakronowych metoda rekonstrukcji lewej komory serca pacjentów z CHF zmniejsza ogólnie jej objętość, lecz uzyskanie właściwego kształtu jest bardzo trudne. Zastosowanie łaty komorowej wykonanej z dakronu zaburza dynamikę ruchu ściany, zmniejsza EF oraz zwiększa ścienne naprężenia ściany lewej komory serca. Główną wadą procedury TR3ISVR™ jest zastosowanie sztywnej łaty wykonanej z dakronu, co powoduje niedomykalność zastawki mitralnej wskutek zwiększenia odległości między głównymi mięśniami brodawkowymi.

Dlatego zastosowanie łaty o małym module sprężystości pozwoliłoby na łatwiejsze odwzorowanie kształtu i tym samym poprawienie dynamiki pracy serca. Z tego względu wydaje się, że coraz szersze zastosowanie mogą mieć łaty uzyskiwane z zastosowaniem technik inżynierii tkankowej. W konstrukcji tego rodzaju łat wykorzystywane mogą być rusztowania wykonane z materiałów biodegradowalnych pokrywane komórkami autologicznymi. Nahodowane na rusztowania komórki syntetyzują macierz zewnątrzkomórkową, co przy jednoczesnej degradacji polimeru powoduje, że w efekcie końcowym tworzona jest łata biologiczna.

Najczęściej w konstrukcji tego rodzaju protez zastosowanie mają materiały biodegradowalne. Jednym z pierwszych materiałów wykorzystywanych do modelowania tego typu protez był kwas poliglikolowy – PGA (ang. *polyglycolic acid*). PGA wykorzystywany był m.in. do konstrukcji zastawki trójpłatkowej przez Hoerstrup i wsp. [10].

W konstrukcji bioprotez zastosowanie znajdują również połączenia biodegradowalnych polimerów, takie jak PGA np. z kwasem polilaktamowym – PLA [11].

Bioprotezy tego rodzaju charakteryzowała znaczna trombogenność. Zwierzęta, którym wszczepiano wykonane z tych materiałów zastawki, ginęły w okresie krótkim po operacji (36 godz.), a przyczyną śmierci był zawał mięśnia sercowego w przebiegu niewydolności oddechowej [12].

W prowadzonych badaniach jako materiał dla tworzenia rusztowania zastosowano łatę biologiczną, która stanowiła rusztowania dla nahodowywania komórek. Ww tym przypadku wykorzystywanoą tkanki kolagenowe, np. tkanka perikardium, z której z zastosowaniem metod chemicznych i enzymatycznych usuwano komórki dawcy, a w to miejsce nahodowywano komórki biorcy.

Acellularne bioprotezy pokrywane komórkami autologicznymi powstały jako alternatywa, m.in. dla protez ksenogennych konserwowanych chemicznie oraz protez opartych na materiałach syntetycznych. Konserwacja chemiczna jest czynnikiem, który może pozytywnie oddziaływać na właściwości mechaniczne tkanki, redukując jej immunogenność. Jednak wadą tego rodzaju konserwacji jest relatywnie szybko postępujący proces degradacji oraz kalcyfikacji tkanek [13, 14].

Jedną z najczęściej stosowanych metod usuwania komórek, która z powodzeniem została również wykorzystana w prowadzonych badaniach, jest inkubacja tkanek w roztworze trypsyna/EDTA w połączeniu z krótką inkubacją w roztworze detergentu, którym był siarczan sodowy sodecylu (SDS). Zarówno dane literaturowe, jak i wyniki prowadzonych badań wskazują, że stosowanie tej metody pozwala na całkowite usunięcie komórek, bez widocznych zmian w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej [15–17]. W konsekwencji powstaje bioproteza posiadająca właściwości mechaniczne zbliżone do tkanki natywnej. Potwierdzeniem tego były badania właściwości biomechanicznych tkanek natywnych i acellularnych. W pierwszej kolejności wykonywano statyczne testy zrywania, które pozwalały ocenić charakter zmian istotnych parametrów biomechanicznych, takich jak moduł elastyczności, odkształcenie czy energia zrywania. Testy te wykazały, że zmiany powstałe w wyniku oddziaływania na tkankę czynników enzymatycznych i chemicznych nie wpłynęły istotnie na pogorszenie właściwości mechanicznych tkanek. W dalszej kolejności prowadzono testy zmęczeniowe, w których tkanka podlegała cyklicznym obciążeniom jednoosiowym, a następnie po zakończeniu testów ponownie badano parametry biomechaniczne. Porównanie modułu elastyczności, odkształcenia oraz energii zrywania w badanych grupach tkanek nie wykazało istotnej zmiany właściwości mechanicznych. Zaobserwowano jedynie niewielki spadek modułu elastyczności oraz wartości odkształcenia. Można zatem przypuszczać, że zastosowanie łat biologicznych w zabiegach remodelowania zapewnia utrzymanie właściwości mechanicznych w trakcie działających obciążeń cyklicznych. Zastosowanie tego rodzaju łat nie powinno zatem zaburzać dynamiki ruchu ściany ani zmniejszać EF oraz naprężenia ściany lewej komory serca. Potwierdzeniem tego były uzyskane wyniki modelowania komputerowego, w którym wykorzystano dane fizyczne uzyskane z badań wytrzymałościowych. Powszechnie stosowane w zabiegach remodelowania łaty dakronowe wykazują niewątpliwie większą sztywność od łat biologicznych, wskazują na to również uzyskane wyniki badań mechanicznych, w których obserwowano istotnie wyższe wartości modułu elastyczności w porównaniu z tkanką biologiczną, przy zaledwie kilkuprocentowym ich odkształceniu. Testy zmęczeniowe wykonywane z użyciem łat dakronowych wyka-

zały wzrost wartości modułu elastyczności oraz spadek wartości odkształcenia w porównaniu z łatą dakronową, która nie została poddana testom zmęczeniowym. Wyniki badań łat dakronowych wskazują, że ulegają one usztywnieniu w wyniku działających obciążeń cyklicznych. Tego rodzaju wyniki mogą tłumaczyć fakt, że zastosowanie łaty z dakronu zaburza dynamikę ruchu ściany, zmniejsza EF oraz zwiększa ścienne naprężenia ściany lewej komory serca. Potwierdziły to wyniki symulacji komputerowej, które wyraźnie wskazują na obniżenie frakcji wyrzutowej oraz wzrost naprężenia lewej komory serca dla łat dakronowych, dla których obserwowano wyższe wartości modułu elastyczności oraz obniżenie wartości odkształcenia.

Warto również podkreślić, że zastosowanie łat biologicznych może być korzystne nie tylko ze względu na ich właściwości biomechaniczne, ale dodatkowo macierz zewnątrzkomórkowa może pełnić istotne funkcje biologiczne [18]. W badaniach Robinsona i wsp. w regeneracji chorobowo zmienionego mięśnia sercowego zastosowano acellularne łaty biologiczne wszczepiane świniom, u których w układzie modelowym generowano zawał mięśnia sercowego. W grupie zwierząt, której wszczepiano łaty acellularne, zaobserwowano po okresie 1 i 3 mies. istotną poprawę funkcji skurczowej lewej komory. Po okresie 3 mies. łaty były wyszczepiane, w obrazie histologicznym obserwowano infiltrację komórek mięśniówki gładkiej oraz obszary pozytywne względem α-aktyny, co może potwierdzać aktywny udział elementów macierzy zewnątrzkomórkowej w procesach regeneracji i remodelowania.

Równie istotny co rodzaj zastosowanego materiału rusztowania jest właściwy dobór komponentu komórkowego. Dzięki zastosowaniu komórek, które pokrywają rusztowanie biologiczne, zastosowana bioproteza posiada nie tylko korzystne właściwości biomechaniczne, ale również powoduje stymulowanie procesów naprawy, remodelowania w obrębie zastosowanej bioprotezy. W aplikacjach związanych z terapiami komórkowymi podejmowane są próby wszczepiania zawiesiny komórek w okolice niedokrwionego fragmentu mięśnia sercowego, jednak w takim przypadku obserwuje się znaczną śmiertelność komórek po ich implantacji. Dlatego wydaje się, że dodatkową korzyścią wynikającą z zastosowania łat biologicznych jest fakt, że stanowią one efektywny nośnik dla komórek, zapewniając im przeżycie w miejscu wszczepienia.

Wydaje się, że wielu badaczy podtrzymuje tezę, iż komórki mięśnia sercowego mogą być z dobrym efektem przeszczepiane do zmienionego niedokrwiennie serca [19–21]. Kardiomiocyty stanowią jednak grupę komórek, które w hodowli *in vitro* wykazują niski potencjał proliferacyjny i ulegają szybkiej degradacji.

Istnieją jednak doniesienia wskazujące, że zabieg rekonstrukcji lewej komory serca w połączeniu z transplantacją kardiomiocytów w obszar graniczny niedokrwiennie zmienionego mięśnia sercowego oraz jednoczesne stosowanie ACE inhibitorów przyczynia się do poprawy funkcji lewej komory serca, powodując również, że efekt wszczepienia łaty remodelującej zostaje utrzymany [22, 23].

Oprócz kardiomiocytów w terapii uszkodzonego mięśnia sercowego jako materiał komórkowy wykorzystywane mogą być komórki mięśniówki gładkiej izolowane z naczynia żylnego. Posiadają one bowiem cechy funkcjonalne zbliżone do kardiomiocytów, natomiast ich dodatkową zaletą jest większy w stosunku do kardiomiocytów potencjał proliferacyjny oraz ich łatwiejsze pozyskanie.

Komórki mięśniówki gładkiej posiadają zdolność do utrzymania długotrwałego skurczu tonicznego przy relatywnie niskim zapotrzebowaniu energetycznym, ponadto wykazują one wysoką maksymalną siłę skurczu, nawet w porównaniu z mięśniami szkieletowymi [24]. Eksperymenty związane z zastosowaniem komórek mięśniówki gładkiej zostały przeprowadzone przez Yoo i wsp. [25]. W prowadzonych eksperymentach obserwowano poprawę funkcji rozkurczowej serca. W grupie, w której dokonano przeszczepu komórek mięśniówki gładkiej, odnotowano wyższe szczytowe ciśnienia skurczowe. Funkcja skurczowa serca w grupie, w której zastosowano komórki mięśniówki gładkiej, była porównywalna z wartościami obserwowanymi u zdrowych osobników.

Komórki mięśniówki gładkiej mogą być wykorzystywane nie tylko w postaci zawiesiny komórkowej, ale również mogą służyć do pokrywania powierzchni łat przeznaczonych do zabiegów remodelowania lewej komory. W badaniach prowadzonych przez Matsubayashi i wsp. [26] komórki mięśniówki gładkiej izolowane z aorty szczura były nahodowywane na syntetyczną łatę wykonaną z polimeru PCLA i hodowane przez okres 2 tyg. Następnie tak przygotowane łaty wszczepiano szczurom, u których w modelu eksperymentalnym generowano obszar niedokrwienia. Jako kontrolę wszczepiano łaty z PCLA niepokrywane komórkami. Po 8 tyg. od wszczepienia łaty w grupie, w której polimer pokrywany był komórkami, zaobserwowano tworzenie się elastycznej tkanki, a także poprawę funkcji skurczowej lewej komory.

Komórki mięśniówki gładkiej niewątpliwie wykazują przydatność w zastosowaniach związanych z inżynierią tkankową, w tym w tworzeniu łat biologicznych wykorzystywanych w zabiegach remodelowania lewej komory serca. Należy jednak podkreślić, że pozyskanie tego rodzaju komórek autologicznych wiąże się z dodatkowym obciążeniem dla pacjenta, związanym z koniecznością wcześniejszego pobrania fragmentu naczynia, z którego mogłyby być izolowane komórki. Dlatego bardzo interesującą alternatywą wydają się być komórki mononuklearne izolowane ze szpiku kostnego. Pobranie niewielkiej ilości szpiku kostnego dla celów hodowli komórkowych może być wykonane w warunkach ambulatoryjnych i nie stanowi dodatkowego obciążenia dla pacjenta. Ponadto komórki te mogą różnicować się w komórki endotelialne, komórki mięśniówki gładkiej, a ze względu na ich duży potencjał proliferacyjny możliwe jest uzyskanie znacznej ilości tych komórek, co ma istotne znaczenie dla ich nahodowywania na rusztowania syntetyczne i biologiczne. Nie bez znaczenia jest również fakt, że komórki te stanowią dobrą alternatywę wobec komórek mięśniówki gładkiej w sytuacji, kiedy ze względu na

koegzystencję chorób naczyniowych lub wykorzystanie naczyń w innych procedurach nie jest możliwe ich pobranie od pacjenta.

Jak się wydaje, komórki takie z powodzeniem mogą być wykorzystywane w konstrukcji łat biologicznych. W badaniach Cho i wsp. komórki acellularne pokrywano komórkami mononuklearnymi izolowanymi ze szpiku. Izolowane komórki w warunkach *in vitro* różnicowano w komórki endotelialne oraz mięśniówki gładkiej, a następnie nahodowywano na acellularne matryce. Następnie tak przygotowane łaty pokryte komórkami wszczepiano psom. Po okresie 3 tyg. wypreparowane fragmenty łat biologicznych oceniano z użyciem technik histologicznych. Po okresie tym nie obserwowano widocznych cech trombogenności wszczepionej tkanki. Obserwowano natomiast regenerację warstwy śródbłonka oraz komórek mięśniówki gładkiej. Dodatkowo obserwowano obecność syntetyzowanych elementów macierzy zewnątrzkomórkowej, kolagenu i elastyny, co potwierdza zachodzące procesy odbudowy i wzrostu tkanki.

Opierając się na powyższych przesłankach, w prezentowanej pracy wykorzystano komórki macierzyste izolowane ze szpiku kostnego. Po izolacji komórki hodowano w warunkach *in vitro*. Komórki te podlegały również różnicowaniu. Ponieważ o sposobie różnicowania komórek decydować mogą zarówno czynniki chemiczne, jak i mikromechaniczne, przeprowadzono dwa eksperymenty. W pierwszym z nich komórki poddane były zróżnicowanym stężeniom czynników wzrostu – w tym celu stosowano ECGS, który stanowi mieszaninę czynników wzrostu, m.in. bFGF (czynnik wzrostu fibrioblastów) oraz ECGF (ang. *endothelial cell growth factor*). W drugim eksperymencie dodatkowym czynnikiem różnicującym było zastosowane podłoże hodowlane.

W prowadzonych hodowlach *in vitro* obserwowano cechy różnicowania się komórek w kierunku linii komórek endotelialnych. Wskazywały na to zarówno cechy fenotypowe hodowanych komórek, jak i obraz morfologiczny, którego wyrazem były m.in. zmiany indeksu kształtu komórkowego. Dodatkowo, w hodowlach, które porowadzono na podłożu z fibronektyną łącznie z suplementacją za pomocą ECGS, obserwowano istotnie wyższe wartości dla receptorów CD 105 i CD 166, które są m.in. receptorami linii endotelialnych komórek naczyniowych. Wydaje się, że tego rodzaju obserwacje mogą świadczyć o synergistycznym działaniu czynników wzrostu i czynników mikromechanicznych na różnicowanie komórek. Może to zatem stanowić dodatkowy argument dla stosowania łat biologicznych, wskazując na istotne oddziaływanie nie tylko czynników chemicznych, ale również mechanicznych na procesy regeneracji i remodelowania tkanek.

Uzyskane w hodowli komórki były następnie nahodowywane na acellularne rusztowania biologiczne. Analiza wzrostu komórek na acellularnych rusztowaniach wskazywała na prawidłowe zasiedlenie tkanki nahodowanymi komórkami. Przy tym w początkowym okresie hodowli komórki zasiedlały jedynie powierzchnię tkanek, a po okresie ok. 8 tyg. obserwowano również wyraźną infiltrację komórek do wnętrza tkanek.

Wnioski

Izolowane ze szpiku kostnego komórki mononuklearne mogą być z powodzeniem hodowane i różnicowane w warunkach *in vitro*. Różnicowane komórki wykazują cechy morfologiczne i fenotypowe linii komórek śródbłonka. Różnicowanie komórek zależne jest zarówno od czynników chemicznych, jak i od stymulacji mikromechanicznej. Hodowane i różnicowane komórki mogą w sposób efektywny zasiedlać acellularne matryce, tworząc łaty biologiczne w oparciu o techniki inżynierii tkankowej.

Cechy biomechaniczne łat biologicznych mogą przyczyniać się do poprawy kurczliwości lewej komory serca, omijając jednocześnie ograniczenia związane ze stosowaniem łat syntetycznych.

Praca finansowana w ramach badań statutowych KNW oraz w ramach projektu rozwojowego – R13 016 03.

Piśmiennictwo

1. Gaudron P, Eilles C, Kugler I, Ertl G. Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Circulation 1993; 87: 755-63.
2. Sharpe N. Ventricular remodeling following myocardial infarction. Am J Cardiol 1992; 70: 20C-26C.
3. Suttonn S, Sharpe JN. LV Remodeling after MI. Circulation 2000; 101: 2981--2988.
4. Menicanti L, Dor V, Buckberg GD, Athanasuleas CL, Di Donato M. Surgical Ventricular Reconstruction. Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery. Vol. 13, No. 4, Oct. 2001.
5. Menicanti L, Di Donato M. The Dor procedure: What has changed after fifteen years of clinical practice? J Thorac Cardiovasc Surg 2002; 5: 886--890.
6. Przybylski R, Zembala M, Kukulski T. Nowa metoda chirurgicznej rekonstrukcji lewej komory serca sposobem Menicantiego. Kardiochir Torakochir Pol 2004; 1: 64-70.
7. Buckberg GD. The helix and the heart. J Thorac Cardiovasc Surg 2002; 124: 863-883.
8. Dor V, Di Donato M, Sabatier M, Montiglio F, Civaia F. Left ventricular reconstruction by endoventricular circular patch plasty repair: a 17-year experience. Semin Thorac Cardiovasc Surg 2001; 13: 435-447.
9. Di Donato M, Sabatier M, Dor V, Gensini GF, Toso A, Maioli M, Stanley AW, Athanasuleas C, Buckberg G. Effects of the Dor procedure on left ventricular dimension and shape and geometric correlates of mitral regurgitation. J Thorac Cardiovasc Surg 2001; 121: 91-96.
10. Hoerstrup SP, Kadner A, Melnitchouk S, Trojan A, Eid K, Tracy J, Sodian R, Visjager JF, Kolb SA, Grunenfelder J, Zund G, Turina MI. Tissue engineering of functional trileaflet heart valves from human marrow stromal cells. Circulation 2002; 106: I143-150.
11. Kim WG, Park JK, Park YN, Hwang CM, Jo YH, Min BG, Yoon CJ, Lee TY. Tissue engineered heart valve leaflets: an effective method for seeding autologous cells on scaffolds. Int J Artif Organs 2000; 23: 624-628.
12. Kim WG, Cho SK, Kang MC, Lee TY, Park JK. Tissue engineered heart valve leaflets-animal study. Int J Artif Organs 2001; 24: 642-648.
13. Simionescu TD, Lovekamp JJ, Vyavahare RN. Degeneration of bioprosthetic heart valve cusp and wall tissue is initiated during tissue preparation: an ultrastructural study. J Heart Valve Dis 2003; 12: 226-234.
14. Simionescu TD, Lovekamp JJ, Vyavahare RN. Glycosaminoglycan-degrading enzymes in porcine aortic heart valves: Implication for bioprosthetic heart valve degeneration. J Heart Valve Dis 2003; 12: 217-225.
15. Teebken OE, Bader A, Steinhoff G, Haverich A. Tissue engineering of vascular grafts: Human cell seeding of decellularized porcine matrix. Eur J Vasc Endovasc Surg 2000; 19: 381-386.
16. Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Meliss RR, Pethig K, Haverich A, Bader A. Tissue engineering of pulmonary hearts valves on allogenic acellular matrix conduits. Circulation 2000; 102: SIII50-55.
17. Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, Silberhumer G, Wolner E, Simon P. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. Int J Artif Organs 2003; 26: 421-427.

18. Robinson KA, Li J, Mathison M, Redkar A, Cui J, Chronos NA, Matheny R, Badylak S. Extracellular matrix scaffold for Ccardiac repair. Circulation 2005; 112 (Suppl. I): I-135-I-143.
19. Leor J, Patterson M, Quinones MJ, Kedes LH, Kloner RA. Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat: a potential method for repair of infarcted myocardium? Circulation 1996; 94 (Suppl. 9): II-332-II-336.
20. Scorsin M, Marotte F, Sabri A, Le Dref O, Demirag M, Samuel JL, Rappaport L, Menasche P. Can grafted cardiomyocytes colonize peri-infarct myocardial areas? Circulation 1996; 94 (Suppl. 9): II-337-II-340.
21. Connold AL, Frischknecht R, Dimitrakos M, Vrbová G. The survival of embryonic cardiomyocytes transplanted into damaged host rat myocardium. J Muscle Res Cell Motil 1997; 18: 63-70.
22. Sakakibara Y, Tambara K, Lu F, Nishina T, Sakaguchi G, Nagaya N, Nishimura K, Li RK, Weisel RD, Komeda M. Combined procedure of surgical repairand cell transplantationfor levt ventricular aneurysm: an experimantaly study. Circulation 2002; 106 (Suppl. 12): I-193-I-197.
23. Nomoto T, Nishina T, Miwa S. Angiotensin – converting enzyme inhibitors helps prevent late remodeling after left ventricular aneurysm repair in rats. Circulation 2002; 106 (Suppl. 12): I-115-I-119.
24. Guyton AC. Contraction and excitation of smooth muscle. Textbook of Medical Physiology. 8th ed. W.B Saunders Co., Philadelphia 1991; 87-95.
25. Yoo KJ, Li RK, Weisel RD, Mickle AG, Tomita S, Ohno N, Fuji T. Smooth muscle cell transplantation is better than heart cells transplantation for improvement of heart function in dilated cardiomyopathy. Yonsei Medical Journal 2002; 43: 296-303.
26. Matsubayashi K, Fedak PW, MIckle DA, Weisel RD, Ozawa T, Li RK. Improved left ventricular aneurysm repair with vascular smooth muscle grafts. Circulation 2003; 108 (Suppl. II): II-219-II-225.