

УДК 615.361.11/13-089.014.41:612.014.482.31



Манченко А. А., Михайлова И. П., Сандомирский Б. П.

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина

e-mail: anna.gorlenko@gmail.com

МОРФОЛОГИЯ ТКАНЕВОЙ РЕАКЦИИ У КРЫС ПРИ ПОДКОЖНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ КСЕНОПЕРИКАРДА И СТВОРОК АОРТАЛЬНОГО КЛАПАНА СВИНЬИ, ДЕВИТАЛИЗИРОВАННЫХ КРИОРАДИАЦИОННЫМ СПОСОБОМ

РЕЗЮМЕ

При создании ксенотрансплантатов снижение иммуногенности является приоритетным требованием предимплантационной обработки исходной донорской ткани. Для создания тканевых имплантатов на основе перикарда и створок аортального клапана нами разработан оригинальный способ девитализирующей обработки, основанный на сочетанном воздействии низких температур ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) и ионизирующего излучения (β -радиации). Такой подход обеспечивает повреждение основных мишеней иммуногенности биоматериала за счет последовательных эффектов крио- и радиационно-химического повреждения, а также активации процессов радиационно-индуцированного апоптоза.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Оценить влияние низкотемпературного и радиационного воздействия, а также их синергический эффект на биосовместимость девитализированных ксенотканей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. При гистологическом исследовании изучали особенности тканевой реакции экспериментальных животных в ответ на имплантацию ксеноперикарда и створок клапана в нативных тканях (контроль), тканях после замораживания-отогрева и тканях после замораживания-отогрева и облучения в дозе 25 кГр. Через 7, 14 суток, 1, 3, 6 и 12 месяцев оценивали морфологические изменения структуры имплантата, воспалительную реакцию со стороны тканей реципиента, образование капсулы и степень ее зрелости, сохранность клеточного компонента ксеоимплантата, скорость восстановления тканей ложа реципиента.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Сравнительный анализ показал принципиальные отличия показателей приживления и тканевой реакции криосохраненных и облученных имплантатов от образцов после замораживания и β -радиации. Криорадиационная обработка в значительной степени снижает иммунный ответ на имплантацию. Девитализированные ткани способствуют стимуляции ранней репарации собственных тканей реципиента, сохраняют компактность и структурную целостность. Через год граница между имплантатом и соединительной тканью стиралась – биоматериал полностью прорастал тканью реципиента. Данные изменения свидетельствуют о биоинтеграции собственной соединительной ткани в имплантате с последующим его замещением.

ВЫВОДЫ. Подтверждена возможность применения модифицированных криорадиационным способом ксеноперикарда и створок аортального клапана для восстановления целостности и структуры мягких тканей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тканевые имплантаты, перикард, аортальный клапан, девитализация ткани, криоконсервирование, ионизирующее излучение.

Одним из способов создания тканевых имплантов, применяемых в реконструктивно-восстановительной хирургии для улучшения репаративных процессов и обновления структурно-функциональных элементов в поврежденных тканях и органах, является девитализация исходной донорской ткани животных. Девитализирующая обработка должна решать следующие задачи: 1 – предотвращение иммунологического конфликта путем удаления либо разрушения клеток донора из имплантируемого образца (девитализация), что существенно снижает выраженность иммунного ответа со стороны реципиента; 2 – стабилизация структуры ткани (консервация); 3 – сохранение адекватных биомеханических свойств; 4 – стерильность имплантируемого материала. После трансплантации такой бесклеточный ксенокаркас постепенно будет заселяться аутогенными клетками и формировать прочную структуру биологического протеза. Соединительно-тканевые волокна при этом будут медленно лизироваться макрофагами и таким образом ксенотрансплантат полностью интегрируется в организм реципиента.

Большинство способов получения тканевых биоимплантов из ксеногенных тканей основаны на продолжительной обработке различными детергентно-энзимными и консервирующими растворами (глутаровый альдегид различной концентрации и эпоксисоединения различного состава), разнообразными гипо- и гипертоническими буферами, действие которых связано с разрушением иммуногенных компонентов, дублированием ткани и ее структурной стабилизацией. Методы химической обработки позволяют эффективно снижать антигенные свойства тканей и предупреждать их бактериальное обсеменение за счет антисептических свойств используемых реагентов. При этом они имеют ряд недостатков, среди которых выделяют остаточную цитотоксичность, повышение вероятности возникновения дополнительных процессов минерализации в ткани за счет увеличения количества центров нуклеации кальциноза, а также повреждение структурных белков тканевого матрикса [1-3]. Вышеуказанные эффекты в значительной степени ограничивают внедрение таких методов в клиническую практику.

Для получения тканевых имплантов из перикарда и аортальных створок клапана (АК) свиньи мы разработали оригинальный способ девитализирующей обработки, основанный на сочетанном воздействии низких температур (-196 °С) и ионизирующего излучения (β -радиации). Впервые такой способ был испытан нами при создании сосудистых протезов малого диаметра из артерий свиньи [4]. Такой подход обеспечивает повреждение основных мишеней иммуногенности биоматериала за счет последовательных эффектов крио- и радиационно-химического повреждения, а также активации процессов радиационно-индуцированного апоптоза. Данный способ исключает использование химических реагентов, что способствует повышению качества получаемых тканевых имплантов и тем самым снижает риск осложнений после трансплантации, а также обеспечивает полноценную вирусную и бактериальную стерилизацию пластического биоматериала. Низкие температуры решают проблему сохранения биологического материала на промежуточных этапах технологического процесса, так и проблему долгосрочного хранения тканевых эквивалентов.

В предыдущих работах нами были изучены морфологический статус, структурные, антигенные характеристики и упругопрочностные свойства ксенотканей под действием низких температур, ионизирующего излучения и их сочетанного воздействия. Показано, что криорадиационная обработка вызывает деградацию и потерю поверхностной выстилки (эндотелия, мезотелия), а также выраженные деструктивные изменения всех клеточных элементов в перикарде и створках АК. При этом сохраняются пространственное расположение, взаимосвязи, а также структурная целостность волокнистых компонентов соединительно-тканевой основы. Экспрессия α -Gal эпитопа – основного ксеноантигена – снижается в тканях перикарда и створках в 3 раза по сравнению с нативными, что позволяет снизить иммуногенный потенциал ткани и тем самым обеспечивает биосов-

местимость имплантов при ксенопротезировании. Девитализированные ткани обладают адекватными физико-механическими свойствами, характерными для нативных тканей как в продольном, так и в поперечном направлении. Глубокое замораживание и β -радиация инициируют образование дополнительных поперечных связей и проявляют синергический эффект – усиливаются прочностные и упругие свойства, что обеспечивает структурную стабилизацию и консервацию имплантата [5-7].

Большое значение при исследовании биосовместимости биоматериалов имеют процессы, происходящие в тканях реципиента при имплантации ксенотканей в экспериментальных биологических моделях. Реакция на имплантацию является основным критерием на способность материала встраиваться в организм пациента, индуцировать клеточный или тканевый ответ, необходимый для достижения оптимального терапевтического эффекта. Считается, что девитализированные биоматериалы, содержащие в своем составе только волокнистые элементы, обладают низкой антигенностью. Коллагеновые и эластические волокна, входящие в состав ксеногенных трансплантатов, обладают видоспецифичностью, что обуславливает принципиально различную по своей природе реакцию организма реципиента.

Так, при имплантации аллогенных тканей иммунная реакция ограничивается только макрофагальной активностью, а продукты распада обеспечивают фенотипическое созревание разных популяций макрофагов, в связи с чем имплантация аллогенных биоматериалов приводит к формированию адекватного регенерата. Ксеногенный биоматериал вызывает типичную реакцию клеточного иммунитета, по-видимому, за счет возникающей функциональной несостоятельности макрофагов, что приводит к хроническому течению воспаления и формированию грубоволокнистой рубцовой соединительной ткани в зоне имплантации [8]. На сегодняшний день морфологические процессы, происходящие в тканях реципиента при имплантации ксеноперикарда и створок клапанов, модифицированных криорадиационным способом, не изучены.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ: установить в динамике особенности тканевой реакции у крыс в ответ на имплантацию ксеноперикарда и створок аортального клапана (АК) свиньи после низкотемпературного и радиационного воздействий, а также особенности их резорбции и биоинтеграции; оценить синергический эффект криорадиационного воздействия на биосовместимость девитализированных ксенотканей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали перикард и створки АК 6-8-месячных беспородных свиной. Ткани выделяли в течение 5 мин после забоя животного на мясоперерабатывающем предприятии (г. Богодухов) при соблюдении правил асептики и максимально возможной атравматичности. В течение 1 часа их транспортировали в лабораторию, где препарировали, промывали охлажденным стерильным 0,9 % раствором NaCl с добавлением антибиотика Vicillin-3 (Киевмедпрепарат, Украина).

Ткани перикарда и створки АК были разделены на 4 группы и подвергались различным физическим воздействиям криорадиационной обработки: № 1 (N) – нативные ткани; № 2 (R) – ткани, облученные в дозе 25 кГр; № 3 (F) – ткани после замораживания (-196 °С) и отогрева; № 4 (FR) – ткани после замораживания-отогрева и последующего облучения в дозе 25 кГр. Образцы в криоконтейнерах (*Deltalab*, Испания) погружали в жидкий азот со скоростью замораживания 40 °С/сек. Отогревание контейнеров выполняли на водяной бане при +36 °С. Облучали образцы потоком электронов с величиной поглощенной дозы в диапазоне от 25 до 30 кГр с помощью линейного ускорителя электронов «ЛУЭ-10» (Украина). После облучения стерильные контейнеры с образцами хранили в парах жидкого азота при температуре от -150 до -170 °С. Нативные образцы тканей имплантировали через 10-12 часов после выделения.

Эксперименты на животных выполнялись на базе вивария Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины с соблюдением всех правил асептики, в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2007) и согласованными с положением «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Имплантиацию образцов экспериментальным животным осуществляли под кожу в область межлопаточного пространства по методу Fishbein M. et al. (1982). Такая область характеризуется малой подвижностью и доступностью для самого животного, что сводит к минимуму вероятность его вмешательства в экспериментальный процесс. Морфологические особенности подкожной жировой клетчатки человека и крыс сходны по некоторым параметрам. Общими являются: рыхлая соединительнотканная основа, ячеистое строение, плотность кровеносных сосудов. Эксперимент проводили на 80 5-6-месячных самцах крыс породы Wistar, массой 200-250 г. С поверхности кожи крыс в области операционного поля удаляли шерсть и обрабатывали 70 % раствором этилового спирта. Операцию проводили в стерильных условиях под эфирным ингаляционным наркозом. Делали разрез длиной 2 см на спине животного и формировали подкожные карманы с помощью заостренного шпателя, отделяя подкожные ткани от мышечного слоя (рис. 1). В просвет кармана помещали подготовленные имплантаты размером 1x1 см, которые фиксировали по углам к мышечной ткани узловым единичным швом Vicryl 3.0 (Ethicon, США). Разрез кожи закрывали нерассасывающейся нитью. После завершения хирургической манипуляции все животные сохраняли физиологическую активность. Животных выводили из эксперимента на 7-е, 14-е сутки, а также через 1, 3, 6 и 12 месяцев после операции путем декапитации под эфирным наркозом. Эти сроки выбраны с учетом развития репаративных процессов и образования полноценного рубца [9].

Тканевую реакцию и изменение структуры биоматериала после имплантации изучали методом световой микроскопии. Материалом для гистологического исследования послужил комплекс тканей лопаточной области крыс, включая имплантированную структуру. Образцы для морфологического исследования иссекали с окружающей и подлежащей тканью. Фиксированные в 10 % растворе нейтрального формалина фрагменты ткани проводили по спиртам восходящей концентрации, заливали в целлоидин-парафин. Срезы толщиной 6-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Светооптическое исследование микропрепаратов проводили на микроскопе Magnum TPL (Medline Scientific Limited, Великобритания), микрофотографирование – камерой Sigeta, обработку микрофотографий – с помощью программы для обработки изображений для цифровых камер Sigeta (Южная Корея). В качестве маркеров успешного приживления или, напротив, биодеструкции трансплантата мы использовали следующие морфологические показатели: изменение структуры; интенсивность и продолжительность воспалительной реакции со стороны тканей реципиента; время образования капсулы и степень ее зрелости; степень сохранности клеточного компонента; скорость восстановления первоначальной структуры тканей ложа реципиента. Очень важно, сохраняет ли трансплантат структурную целостность или подвергается фрагментации и резорбции. Эти факторы определяют, насколько быстрыми будут васкуляризация и смена клеточных ассоциаций с полиморфноклеточной на лимфо-макрофагальную, а затем и на фибробластическую. Тем самым определяется время и скорость формирования коллагеновых волокон капсулы, которая является барьером и связующим звеном между трансплантатом и тканями реципиента [8, 10]. Для получения более объективных данных проводили полуколичественную оценку выраженности воспалительной реакции: 0 – отсутствие признаков; (+) – единичные клетки (нейтрофилы, лимфоциты, макрофаги, эозинофилы); (++) – небольшие фокусы; (+++) – отдельные и сливные фокусы; (++++) – обширные инфильтраты.

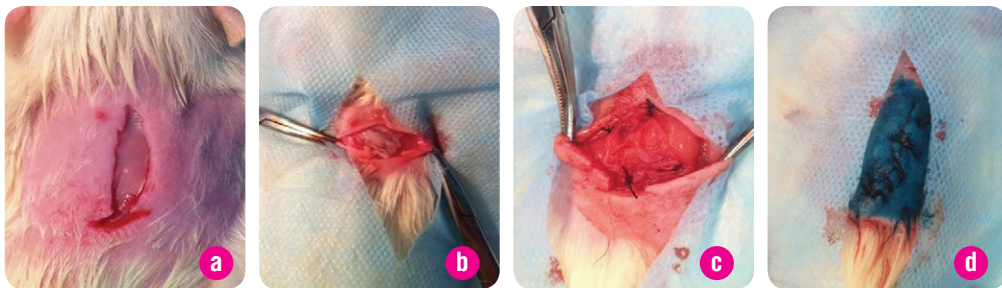


Рис. 1. Этапы операции по подкожной имплантации тканевых лоскутов:
а – разрез до 2 см;
б – размещение тканевых лоскутов в подкожном кармане;
с – фиксация узловым единичным швом в 4 точках;
д – закрытие раны обвивным непрерывным швом.

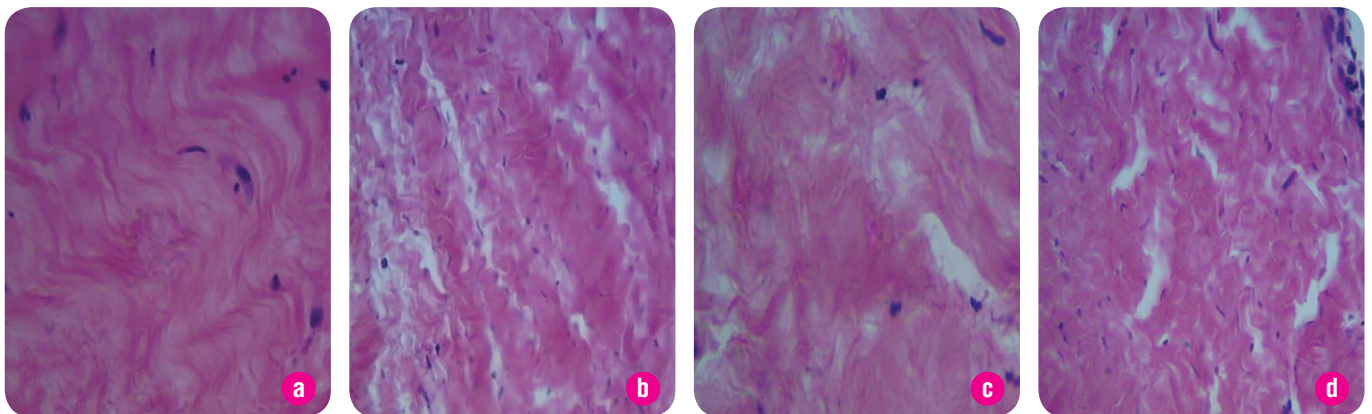


Рис. 2. Микрофотографии фрагмента перикарда через 7 суток после имплантации. Окраска – гематоксилин и эозин, об. x40, ок. x10.
а – нативный перикард (группа N) с нормальными фибробластами;
б – группа F – бледные деформированные ядра фибробластов, сохраненная структура пучков волокон и полости между пучками;
с – группа R – наличие погибших фибробластов, разволокнение стромы с потерей извитости;
д – группа FR – погибшие фибробласты, волокна с сохраненной структурой и небольшими микротрещинами между пучками.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На 7-е сутки у всех животных, которым подсаживали исследуемые образцы перикарда и створок АК, ранние изменения тканей имели качественно схожую картину и все признаки острого травматического воспаления: нейтрофильная инфильтрация, отек, кисты с детритом, макрофагальная реакция, пролиферация фибробластических клеток, новообразование капилляров, прорастание грануляционной ткани в имплантат. На этом этапе все образцы окружены широким валом из грануляционной ткани. В серии экспериментов по подсадке створок АК, в отличие от перикарда, не отмечается воспалительных изменений жировой ткани. Качественные отличия касались состояния самого имплантата. Нативные имплантаты представлены волокнистой разволокненной тканью, в которой извитость волокон сохранялась, с хорошо определяющимися многочисленными фибробластами (рис. 2, а).

Клеточный инфильтрат начинал поглощать подсаженный образец, инвазируя его и вращая между его структурами. Волокна в имплантате после замораживания-оттаивания (группа F) были расположены компактно, их структурная целостность сохранялась, между пучками волокон появлялись полости. Многочисленные слабо окрашенные ядра фибробластов были деформированы (рис. 2, б). В имплантатах, подвергнутых β -излучению (группа R), происходило разволокнение пучков коллагеновых волокон, снижение либо утрата их извитости, фибробласты имели пикнотично деформированные ядра, либо необычно вытянутую форму, что указывает на их гибель. (рис. 2, в). В имплантатах после криорадиационной обработки (группа FR) хорошо определялись пучки волокон, в них не наблюдалось разделения волокон, истончения и снижения извитости. По центру имплантата был более компактен, чем на периферии и содержал малочисленные ядра фибробластов с признаками кариорексиса (рис. 2, д).

ИМПЛАНТАЦИЯ НАТИВНЫХ ОБРАЗЦОВ ПЕРИКАРДА И СТОРОК АК (ГРУППА N)

При подсадке нативных образцов к 14-м суткам острота воспалительной реакции снижалась и начинался период пролиферации с образованием сосудистых связей. Наблюдалась фрагментация ксеноимплантатов с набуханием волокон в окружении мощного вала из лимфоидно-макрофагальных клеток и грануляционной ткани. Отмечалась краевая деструкция фрагментов, не спаянных с тканями реципиента (рис. 3, а), т. е. после затухания травматической реакции наблюдалась реакция отторжения. Уже через месяц после подсадки имплантаты фрагментировались и состояли из разволокненных и отечных волокон. В зоне деструкции встречались кисты с лизированным материалом, по периферии по-прежнему сохранялась грануляционная ткань, а между ними – вал из круглоклеточных элементов (рис. 3, б).

К трем месяцам в зоне имплантации оставались небольшие фрагменты имплантатов, окруженные по периметру капсулой, внутренний узкий слой которой был представлен клеточным инфильтратом, в котором преобладали лимфоциты, макрофаги, плазмциты, эозинофилы и фибробласты. Этими же клетками был густо инфильтрирован и сам имплантат. Кнаружи от этого узкого клеточного слоя имплантат был опоясан слоем пигментированных макрофагов (рис. 3, в). В ткани между фрагментами определялось множество гигантских многоядерных клеток, принимающих участие в резорбции имплантата (рис. 3, д).

Через 6 месяцев наблюдалась полная резорбция имплантата (рис. 3, е). Через год имплантируемые образцы практически отсутствовали и были представлены лишь очень мелкими фрагментами (рис. 3, ф).

ИМПЛАНТАЦИЯ ЗАМОРОЖЕННЫХ-ОТОГРЕТЫХ ОБРАЗЦОВ ПЕРИКАРДА И СТОРОК АК (ГРУППА F)

Через 14 суток после подсадки створки АК не лизировались и были представлены очень крупными фрагментами, практически

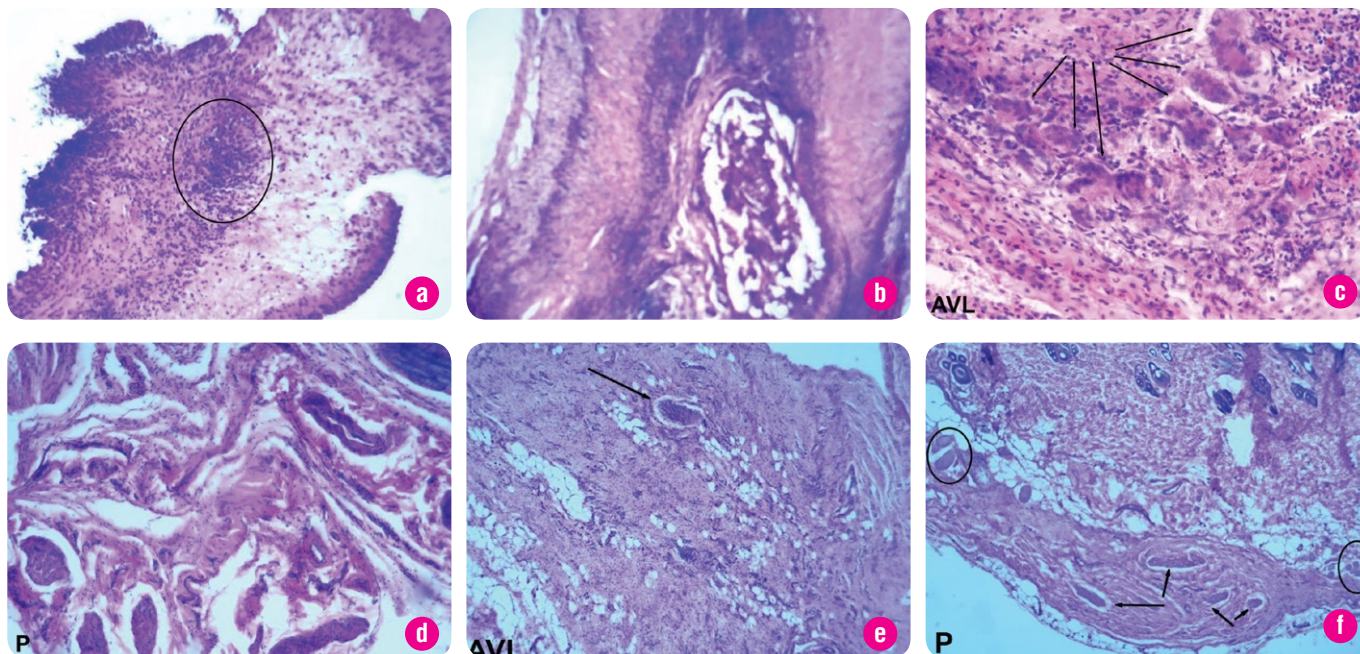


Рис. 3. Микрофотографии створки АК (AVL), перикарда (P) и морфология окружающих тканей после имплантации; группа N (нативные ткани). Окраска – гематоксилин и эозин.

а – через 14 сут.: краевая биодеструкция фрагмента, нейтрофильная инфильтрация внутри, об. x10, ок. x10;

б – через 1 мес.: зона деструкции, киста с резорбированным материалом в центре фрагмента, об. x4, ок. x10;

в – через 3 мес.: многоядерные гигантские клетки кнаружи от капсулы (стрелки), об. x25, ок. x10;

д – через 3 мес.: фрагменты имплантата, чередующиеся с лимфоидными инфильтратами, кистами, фрагментами дегенеративно измененных волокон, об. x10, ок. x10;

е – через 6 мес.: подкожная жировая клетчатка нормального строения, фрагмент трансплантата (стрелка), об. x4, ок. x10;

ф – через 12 мес.: мелкие фрагменты имплантата в окружении соединительной ткани (стрелки). Отекшие мышечные волокна (окружность), об. x4, ок. x10.

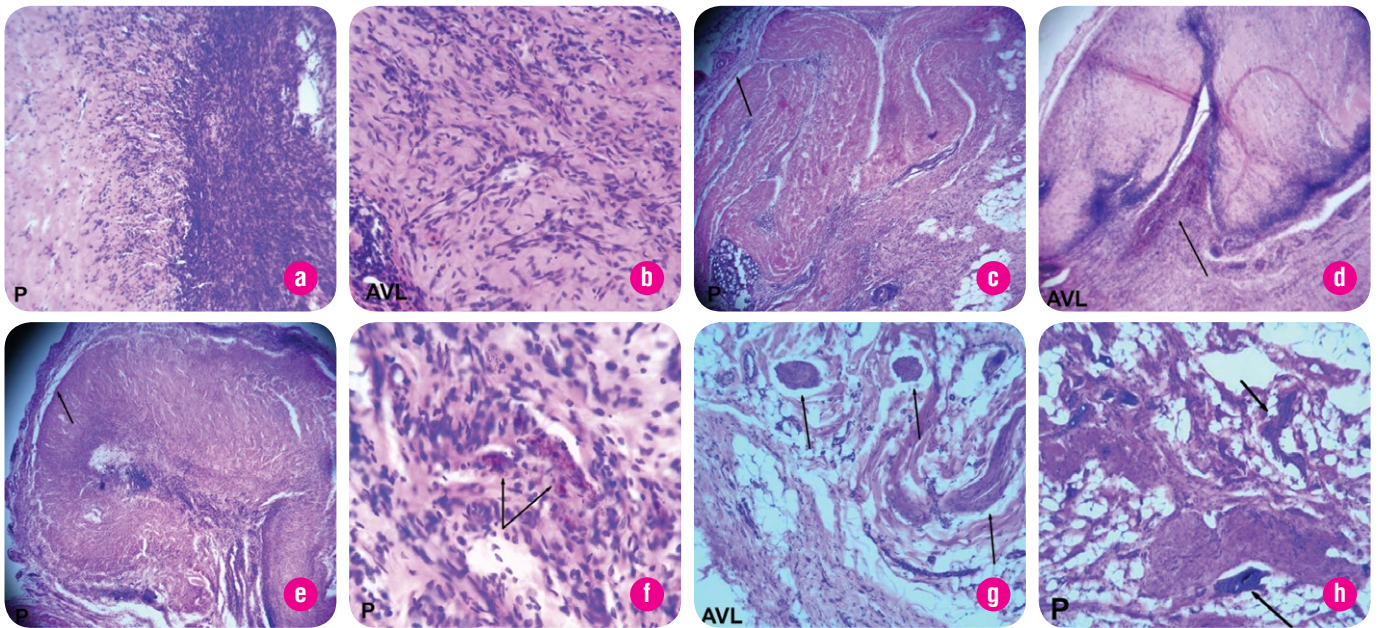


Рис. 4. Микрофотографии створки АК (AVL), перикарда (P) и морфология окружающих тканей после имплантации. Группа F (ткани, облученные в дозе 25 кГр). Окраска – гематоксилин и эозин.

- а – через 14 сут.: внутренний слой капсулы – круглоклеточные элементы, наружный слой – грануляционная ткань, об. x25, ок. x10;
 б – через 14 сут.: инвазия фибробластами и капиллярами, об. x25, ок. x10;
 с – через 1 мес.: имплантат окружен узкой капсулой из рыхлой соединительной ткани (стрелка), жировая ткань имеет нормальное строение, об. x4, ок. x10;
 д – через 1 мес.: капсула из рыхлой соединительной ткани, имплантат малоклеточный, об. x25, ок. x10;
 е – через 3 мес.: имплантат компактный, окружен узкой капсулой из ВСТ (стрелка), об. x4, ок. x10;
 ф – через 3 мес.: пигментированные макрофаги в окружающей ткани (стрелки), об. x40, ок. x10;
 г – через 6 мес.: мелкие и узкие лентовидные фрагменты имплантата (стрелки), об. x4, ок. x10;
 h – через 12 мес.: фрагменты трансплантата, окруженные типичной подкожной жировой клетчаткой, лимфоидная инфильтрация мелких фрагментов (стрелки), об. x20, ок. x10.

сливающимися с окружающей тканью. Перикард компактный, местами отечный, клеточность его была ниже, чем в предыдущий срок, а по краям встречались кисты с резорбированным материалом. Имплантаты были окружены узкой капсулой, в которой можно выделить 2 слоя: внутренний, состоящий преимущественно из клеток соединительно-тканного ряда и макрофагов, и наружный, представленный хорошо васкуляризированной грануляционной тканью (рис. 4, а). Капилляры прорастали непосредственно в имплантат вместе с небольшим количеством фибробластов, гистиоцитов и лимфоцитов с образованием внутренней зоны капсулы (рис. 4, б).

Через 1 месяц после имплантации образцы, подвергнутые низкотемпературному воздействию, хорошо визуализировались. Перикард представлял компактную структуру в виде витков узкой ленты в окружении тонкой капсулы из рыхлой соединительной ткани (PCT), содержащей больше клеток, чем волокон. Среди клеточных элементов преобладали лимфоциты, макрофаги и фибробласты (рис. 4, с). Створки АК окружались узким пояском из лимфоидных клеток, наружи от которого наблюдалась зрелая грануляционная ткань. По центру имплантата отмечалась незначительная клеточная инфильтрация, хотя волокна были местами отечные. В восстановившей свое нормальное строение окружающей ткани наблюдалось много пигментированных макрофагов (рис. 4, д), т.е. практически отсутствовала воспалительная реакция ткани на имплантат.

Через 3 месяца после подсадки имплантаты сохраняли свою структуру, были инкапсулированы тонкой полоской плотной соединительной тканью с минимальными воспалительными изменениями в окружающей ткани (рис. 4, е). В зоне нахождения образцов наблюдались небольшие скопления макрофагов, гистиоцитов и фибробластов (рис. 4, ф).

Схожая морфологическая картина отмечалась на сроках 6 и 12 месяцев в области имплантации. Створки АК определялись как много-

численные мелкие и лентовидные фрагменты, не инкапсулированные и расположенные раздельно в окружении тканей без воспалительного процесса (рис. 4, г). Перикард у части животных был представлен большими фрагментами, которые перемежались участками жировой ткани без признаков воспаления, хотя в отдельных мелких фрагментах наблюдалась инфильтрация лимфоцитами. В ряде случаев имплантат не выявлялся (рис. 4, h).

ИМПЛАНТАЦИЯ ОБЛУЧЕННЫХ ПОТОКОМ ЭЛЕКТРОНОВ ОБРАЗЦОВ КСЕНОПЕРИКАРДА И СТОРОК АК (ГРУППА R)

Начиная с ранних сроков наблюдения, в местах контакта имплантата с тканями реципиента развивалась воспалительная реакция с сильной нейтрофильной инфильтрацией и отмечалась деструкция тканевых структур. В результате лизиса створки АК разделялись на узкие ленты или поглощались наползающим инфильтратом (рис. 5, а). Основная масса перикарда оставалась компактной, признаков фрагментации и активной резорбции отмечено не было (рис. 5, б).

К 1-му месяцу в зоне нахождения имплантатов воспалительная инфильтрация уменьшалась или исчезала полностью. Крупные фрагменты трансплантата располагались отдельно от спокойных окружающих тканей без признаков лимфоидно-макрофагального воспаления по периметру. Встречались скопления пигментированных макрофагов с включением редких лимфоцитов (рис. 5 с, д).

Через 3 месяца после имплантации створки АК представляли из себя относительно крупные фрагменты, соединенные друг с другом узкими перешейками. Трансплантат был разволокнен, более узок и фрагментирован по сравнению с первоначальным вариантом, содержал многочисленные макрофаги и ядра фибробластов, а также полнокровные микрососуды. Капсула не определялась. Перикард, окруженный капсулой из PCT, сохранял относительную целостность, хотя

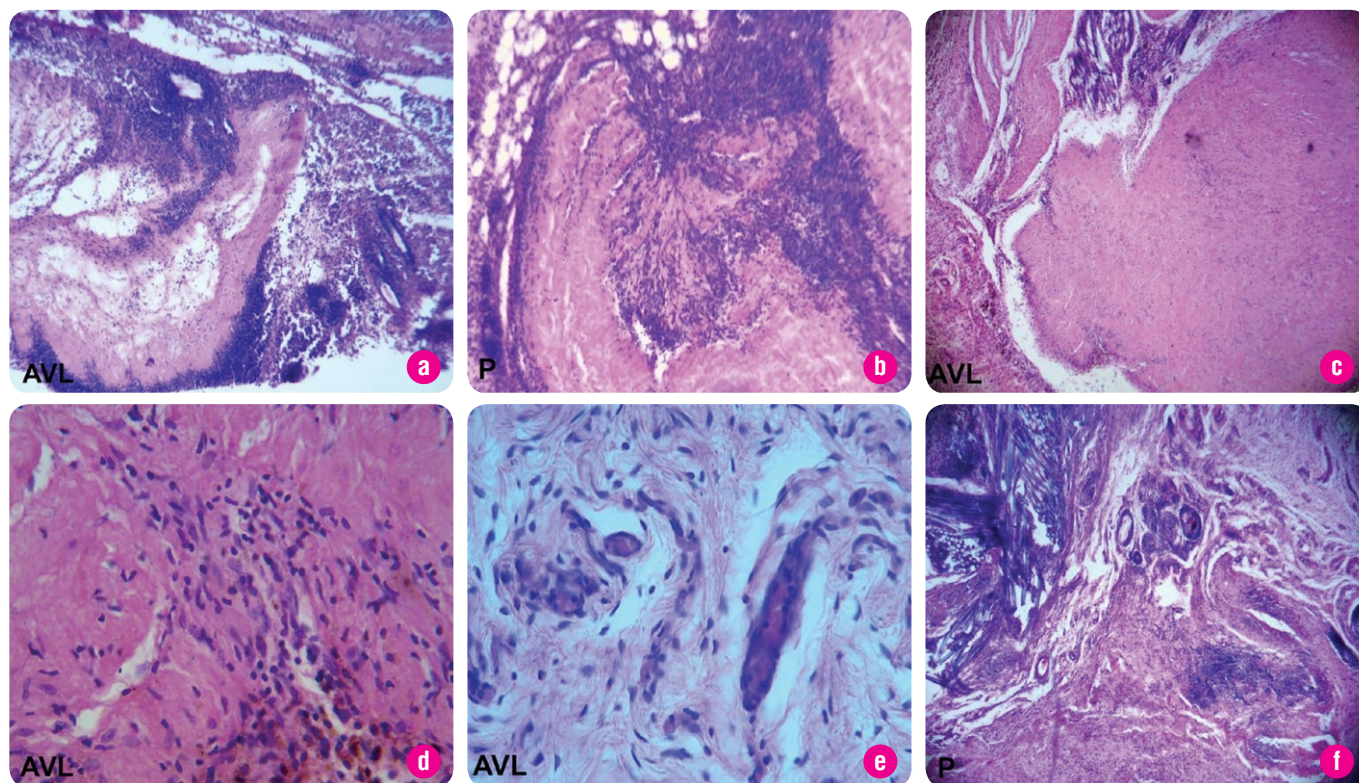


Рис. 5. Микрофотографии состояния створки АК (AVL), перикарда (P) и морфология окружающих тканей после имплантации. Группа R (ткани после замораживания (-196 °C) и отогрева). Окраска – гематоксилин и эозин.

- a – через 7 сут.: нейтрофильная инфильтрация и резорбция фрагментов имплантата, об. x10, ок. x10;
 b – через 7 сут.: прорастание клеточных тяжей и новообразованных капилляров в имплантат, об. x25, ок. x10;
 c – через 1 мес.: свободно лежащий имплантат не окружен капсулой, окружающие ткани без воспаления, об. x4, ок. x10;
 d – через 1 мес.: небольшое скопление лимфоцитов и пигментированных макрофагов, об. x40, ок. x10;
 e – через 3 мес.: многочисленные макрофаги, фибробласты, полнокровные сосуды, об. x25, ок. x10;
 f – через 3 мес.: имплантат окружен капсулой из PCT, окружающая ткань имеет нормальное строение, видны крупные кисты с остатками резорбированного материала, об. x4, ок. x10.

кнаружи от капсулы наблюдались крупные фрагменты биоматериала, соседствующие с кистами. Кисты содержали остатки как биоматериала, так и разрушенные ткани реципиента. Кисты и фрагменты имплантата разделялись прослойками грануляционной ткани с хорошей васкуляризацией и обилием плазматических клеток, макрофагов, лимфоцитов и гигантских клеток, которые осуществляли лизис имплантата (рис. 5, e, f).

ИМПЛАНТАЦИЯ ДЕВИТАЛИЗИРОВАННЫХ (ЗАМОРОЖЕННЫХ И ОБЛУЧЕННЫХ ПОТОКОМ ЭЛЕКТРОНОВ) ОБРАЗЦОВ ПЕРИКАРДА И СТОРОК АК (ГРУППА FR)

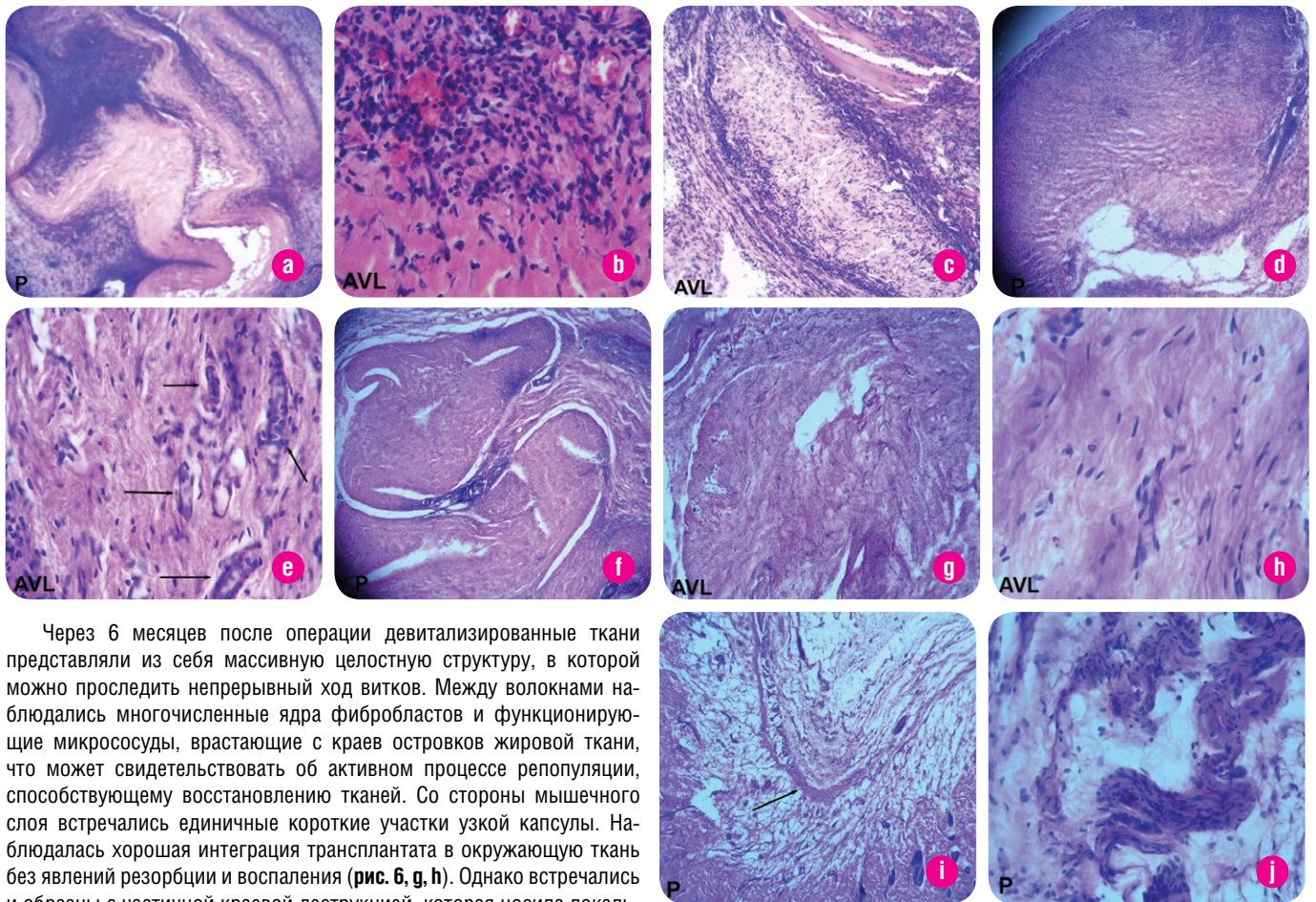
Через 14 суток после подсадки ксеноимплантаты сохраняли свою структуру, фрагментация отсутствовала и наблюдалась незначительная очаговая разволокненность. Снаружи перикард находился в окружении двухслойной соединительнотканной капсулы, наружный слой которой был представлен грануляционной тканью, а внутренний – соединительной, приобретающей волокнистый характер (рис. 6, a).

Круглоклеточные скопления встречались в местах соприкосновения структур имплантата. В окружающей ткани наблюдалось много фибробластов, лимфоцитов, гигантских клеток, встречались эозинофилы. В зоне имплантации створок АК происходил активный ангиогенез: новые капилляры появлялись из хорошо кровенаполненных капилляров окружающей ткани; одновременно с ангиогенезом продолжалась пролиферация и миграция клеток фибробластического ряда (рис. 6, b). Можно предположить, что девитализированные образцы способствовали стимуляции ранней репарации собственных

тканей. Сосудистая реакция с клеточной пролиферацией в области имплантации ксеноткани направлена на возмещение лизированных структур донорского материала.

К 1-му месяцу основная масса ксеноимплантатов по-прежнему оставалась компактной. Сформировавшаяся капсула створок АК состояла из 2 слоев: наружного – с местами рыхлой соединительной ткани, местами волокнистой, внутреннего – представленного узкой полоской лимфоцитов, которые выстраивались по краю трансплантата (рис. 6, c). Тонкая капсула вокруг перикарда представляла волокнистую соединительную ткань (ВСТ) и практически сливалась с окружающими тканями без признаков воспалительных изменений. К этому сроку на месте имплантации ксеногенных створок подкожная жировая клетчатка была полностью восстановлена, при этом содержала макрофаги с зернами пигмента в цитоплазме и гигантские многоядерные клетки (рис. 6, d).

К 3-му месяцу трансплантаты практически сливались с окружающими тканями, окружались тонкой капсулой из волокнистой соединительной ткани и были хорошо васкуляризованы. По периферии образца клеточность несколько возрастала за счет присутствия (помимо фибробластов) лимфоцитов, макрофагов и небольших скоплений лимфоидных клеток (рис. 6, e). В окружающих тканях отсутствовали признаки воспаления, наблюдалось характерное для них строение с наличием пигментированных макрофагов (рис. 6, f). В створках встречались фрагменты, которые были инвазированы гигантскими клетками и пигментированными макрофагами, т.е., по всей видимости, продолжалась очаговая резорбция и завершался процесс резорбции остатков клеточных элементов.



Через 6 месяцев после операции девитализированные ткани представляли из себя массивную целостную структуру, в которой можно проследить непрерывный ход витков. Между волокнами наблюдались многочисленные ядра фибробластов и функционирующие микрососуды, врастающие с краев островков жировой ткани, что может свидетельствовать об активном процессе репопуляции, способствующему восстановлению тканей. Со стороны мышечного слоя встречались единичные короткие участки узкой капсулы. Наблюдалась хорошая интеграция трансплантата в окружающую ткань без явлений резорбции и воспаления (рис. 6, g, h). Однако встречались и образцы с частичной краевой деструкцией, которая носила локальный характер.

Через 12 мес перикард по-прежнему сохранял свою структурную целостность, представляя из себя узкий непрерывный тяж, окруженный соединительной тканью без признаков воспалительного процесса. Наблюдались компактные пучки волокон с сохраненной гофрированной структурой. Сохранялась и незначительная краевая макрофагальная активность, которая может свидетельствовать о достаточно медленной краевой биодеструкции. На этом этапе видимых признаков капсулы не наблюдалось, трансплантат полностью был интегрирован в ткани реципиента (рис. 6, i, j).

Таким образом, результаты имплантации демонстрируют различную динамику приживления для ксеногенных тканей, которые подвергались разным видам воздействия (табл. 1).

В случае имплантации нативных образцов воспалительная реакция в окружающей ткани и непосредственно в местах контакта с имплантатом носила выраженный характер вплоть до 3-го месяца, лимфоидно-макрофагальные элементы приходили на смену нейтрофилам лишь в период между 14 и 30 сутками. Трансплантаты подвергались активной резорбции, имели место отеки, разволокнение, дислокация ядер, секвестрация, в результате чего уже через 2 недели можно было видеть относительно крупные, а к 3-му месяцу – лишь мелкие фрагменты трансплантата. В итоге происходило вакантное замещение основной массы имплантата регенератом, имеющим строение, схожее с подкожно-жировой клетчаткой. Формирование соединительнотканной капсулы не происходит: до 1-го месяца фрагменты окружает грануляционная ткань, а к 3-му месяцу и позже никаких признаков вала или капсулы не выявляется.

По сравнению с нативными образцами воспалительные процессы у животных, когда ткань подвергалась криообработке, выражены не так сильно и затухают быстрее, проявлялись лишь в умеренной лейкоцитарной инфильтрации на ранних сроках наблюдения. Вплоть до 3-го месяца имплантаты представляли достаточно компактную

Рис. 6. Микрофотографии состояния створки АК (AVL), перикарда (P) и морфология окружающих тканей после имплантации. Группа FR (ткани после замораживания-отогрева и последующего облучения в дозе 25 кГр). Окраска – гематоксилин и эозин.

a – через 14 сут.: имплантат сохраняет целостность, окружен двухслойной капсулой, об. x4, ок. x10;

b – через 14 сут.: прорастание капилляров и фибробластов из окружающей ткани, об. x25, ок. x10;

c – через 1 мес.: крупный фрагмент, вокруг которого капсула из ВСТ и лимфоцитов, об. x10, ок. x10;

d – через 1 мес.: компактный имплантат окружен узкой капсулой из волокнистой ткани, видны очаги скопления лимфоидных и макрофагальных клеток, об. x4, ок. x10;

e – через 3 мес.: участок имплантата по центру: волокнистая структура, низкая клеточность, обилие капилляров (стрелки), об. x25, ок. x10;

f – через 3 мес.: имплантат окружен узкой капсулой из волокнистой ткани, клеточность самого имплантата и окружающей ткани низкая, об. x4, ок. x10;

g – через 6 мес.: массивный целостный трансплантат, спокойные окружающие ткани, об. x4, ок. x10;

h – через 6 мес.: фрагмент имплантата, видны волокна, ядра фибробластов, микрососуды, об. x40, ок. x10;

i – через 12 мес.: непрерывный тяж имплантата, об. x4, ок. x10;

j – через 12 мес.: небольшие фрагменты имплантата, инфильтрированные лимфоцитами, об. x20, ок. x10.

Таблица 1. Маркеры приживления и выраженность воспалительной реакции при подкожной имплантации крысам различных групп ксеноперикарда и створок аортального клапана свиньи в динамике.

СРОКИ	ГРУППЫ	ВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ РЕАКЦИЯ				КАПСУЛА И СТЕПЕНЬ ЕЕ ЗРЕЛОСТИ		КОМПАКТНОСТЬ ТРАНСПЛАНТАТА	
		В ОКРУЖАЮЩЕЙ ТКАНИ		В ИМПЛАНТАТЕ		ПЕРИКАРД	СТВОРКИ АК	ПЕРИКАРД	СТВОРКИ АК
		ПЕРИКАРД	СТВОРКИ АК	ПЕРИКАРД	СТВОРКИ АК				
7 сут	N	++++	+++	+++	+++	широкая ГТ	широкая ГТ	К	К
	F	++++	++	++	++	широкая ГТ	умер. ширины ГТ + Ф	К	К
	R	++	++	++	++	широкая ГТ	умер. ширины ГТ + ЛБ, М	К	КФр
	FR	++	++	++	++	широкая ГТ	умер. ширины ГТ + Л, М	К	К
14 сут	N	++	++	+	++	широкая ГТ + Л, М	широкая ГТ	Фр	Фр
	F	+	+	+	+	умер. ширины ГТ + Л, М	узкая ГТ + Ф	К	К
	FR	+	+	+	+	умер. ширины ГТ + ВСТ	узкая, зрелая ГТ	К	К
1 мес	N	++	++	+	+	широкая ГТ + Л и Ф	умер. ширины ГТ + Л, М	Фр	Фр
	F	+	+	+	+	узкая РСТ	узкая ГТ + Л	К	К
	R	+	+	0	0	РСТ	клеточный ободок	КФр	КФр
	FR	0	+	+	0	узкая ВСТ	узкая РСТ, местами ВСТ	К	К
3 мес	N	++	+	+	+	отсутствует	узкая ГТ + Л, М	МФр	МФр
	F	+		+		узкая ВСТ	-	К	-
	R	+	+	+	0	узкая РСТ	отсутствует	К	КФр
	FR	0	+	+	0	очень узкая, ВСТ	узкая ВСТ	К	К
6 мес	N	0	0	+	0	отсутствует	отсутствует	МФр	МФр
	F	0	0	+	0	узкая ВСТ	отсутствует	КФр	МФр
	FR	0	0	0	0	оч. узкая ВСТ со стороны МТ	оч. узкая ВСТ со стороны МТ	К	К

Примечания: Группы: N – нативные ткани; R – ткани, облученные в дозе 25 кГр; F – ткани после замораживания (-196 °С) и отогрева; FR – ткани после замораживания-отогрева и последующего облучения в дозе 25 кГр.

Гистологическое описание: АК – аортальный клапан; ГТ – грануляционная ткань; РСТ – рыхлая соединительная ткань; ГТ – грануляционная ткань; ВСТ – волокнистая соединительная ткань; МТ – мышечная ткань; Л – лимфоциты; М – макрофаги; Ф – фибробласты; ЛБ – лимфобласты; Фр – фрагментирован; МФ – мелкие фрагменты; КФ – крупные фрагменты; К – компактный.

Шкала: 0 – отсутствие признаков; (+) – единичные клетки (нейтрофилы, лимфоциты, макрофаги, эозинофилы); (++) – небольшие фокусы; (+++) – отдельные и сливные фокусы; (++++) – обширные инфильтраты.

структуру и сохраняли свою целостность в окружении тонкой капсулы из РСТ. Лизис трансплантата происходил медленно с одновременным прорастанием аутогенными клетками и сосудами. Через 6 месяцев трансплантат разделялся на фрагменты разных размеров, перемежающихся участками неизменной жировой ткани.

Микроскопическая картина, наблюдаемая в зоне имплантации образцов после обработки ионизирующим излучением, в целом подобна группе замораживания-отогрева, за исключением более спокойной реакции со стороны тканей реципиента. К 1-му месяцу после трансплантации воспалительная реакция окружающих тканей уменьшалась или исчезала полностью, лишь кое-где определялось скопление пигментированных макрофагов с добавлением редких лимфоцитов. Отмечалось нарушение компактности и целостности трансплантата, что представлено крупными фрагментами и разволокненностью его соединительнотканых пучков. На более длительных сроках после имплантации соединительнотканная капсула вокруг фрагментов трансплантата не определялась, однако продолжалось разволокнение и фрагментация имплантатов. Клеточные элементы макрофагального ряда осуществляли постепенный лизис имплантатов.

Выраженность воспалительной реакции на имплантаты после девитализирующей обработки (группа FR) снижалась в тканях ложа

реципиента даже на ранних этапах (7-е сутки). Начиная с 14 суток, такая тканевая реакция с менее выраженной воспалительной фазой приводила к более быстрому формированию и созреванию соединительнотканной капсулы. На этом сроке выявлялись первые признаки образования волокнистой капсулы, через 1 месяц она была хорошо выражена и сохранялась в том или ином виде через 3 и 6 месяцев. В итоге сравнительно слабая и вскоре затухающая воспалительная реакция в окружающей ткани, быстрая смена полиморфноядерной клеточной популяции на лимфо-макрофагальную (до 14-ти суток), активный ангиогенез и быстрое формирование зрелой соединительнотканной капсулы приводило к тому, что имплантат быстро прорастал структурами реципиента с наличием узкой ограничительной капсулы. К шести месяцам основная масса биоматериала оставалась компактной и сохраняла характерное строение с многочисленными фибробластами и функционирующими микрососудами. Через 12 месяцев после подсадки девитализированные ткани по-прежнему сохраняли свою структурную целостность и были окружены соединительнотканью без признаков воспаления. Наблюдалась компактность пучков волокон с сохраненной гофрированной структурой, а также было выявлено незначительной краевой макрофагальной активности и полной интеграции трансплантата в ткани реципиента.

ВЫВОДЫ

В результате морфологического анализа образцов перикарда и створок аортального клапана после различных видов воздействия и ксенотрансплантации были выявлены принципиальные отличия показателей приживления и тканевой реакции для образцов, подвергнутых сочетанному низкотемпературному воздействию и β -радиации в сравнении с тканью криосохраненных и облученных потоками электронов имплантатов.

Криорадиационная обработка перикарда и створок АК в значительной степени снижает иммунный ответ на имплантацию: слабые воспалительные проявления сменяются быстрым и интенсивным формированием зрелой соединительнотканной капсулы; активный ангиогенез приводит к быстрому прорастанию и хорошей интеграции в тканях реципиента. Таким образом, можно считать, что девитализированные ткани стимулируют раннюю репарацию тканей реципиента.

Девитализированные имплантаты на всех сроках наблюдения сохраняют компактность и структурную целостность, краевая биодеградация происходит медленно. Через 12 месяцев граница между имплантатом и соединительной тканью стиралась – биоматериал полностью прорастал собственной тканью животного, что свидетельствует о биоинтеграции собственной соединительной ткани в имплантате с последующим его замещением, является признаком ремоделирования и доказывает его гипоиimmunогенность.

Наше исследование подтверждает возможность применения модифицированных криорадиационным способом ксеноперикарда и створок клапана для восстановления целостности и структуры мягких тканей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины [Текст] / А. М. Гольцев, Е. А. Гордиенко, Г. О. Бабийчук и др. // Харьков: Райдер, 2012. – 767 с.
2. Бызов Д. В. Применение низких температур для создания девитализированных сосудистых скаффолдов [Текст] / Д. В. Бызов // Харьков, 2012. – 146 с.
3. Биотехнологические аспекты создания трансплантатов артерий [Текст] / Д. В. Бызов, О. П. Сынчикова, Е. Н. Пушкова, и др. // Биотехнология. – 2010. – Т. 3, № 3. – С. 21–30.
4. Пат. 68379, Украина, МПК А61L 27/00, А01N1/02. Спосіб підготовки ксеногенних артерій для судинного протезування [Текст] / Б. П. Сандомирський, Д. В. Бизов, І. П. Михайлова, О. П. Синчикова – № u2011 10193; заявл. 19.08.2011, опубл. 26.03.2012, Бюл. № 6.
5. Mikhailova I. Effect of low temperatures and ionizing irradiation upon physical-mechanical properties and connective – tissue structures of porcine fibrous pericardium and aortic valve leaflets [Text] / I. Mikhailova, B. Sandomirsky, A. Gorlenko // Period Biolog. – 2014. – Vol. 116, № 1. – P. 105–114.
6. Михайлова И. П. Физико-механические свойства девитализированных ксеноимплантатов на основе перикарда, створок аортального клапана и артерий [Текст] / И. П. Михайлова, А. А. Манченко, Д. В. Бызов // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, № 4. – С. 311–328.
7. Ультраструктура тканей перикарда и створок аортального клапана свиньи, девитализированных крио- и радиационным воздействием [Текст] / Н. В. Репин, Л. Н. Марченко, Т. П. Говоруха, и др. // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, № 3. – С. 246–254.
8. Севастьянов В. И. Биосовместимые материалы [Текст] / В. И. Севастьянов, М. Т. Кирпичикова // М.: МИА, 2011. – 511 с.
9. Данилов Р. К. Гистология человека в мультимедиа [Текст] / Р. К. Данилов, А. А. Клишов, Т. Г. Боровая // СП.: ЭЛБИ – СПб., 2003. – 362 с.
10. Серов В. В. Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология) [Текст] / В. В. Серов, А. Б. Шехтер // М.: Медицина, 1981. – 312 с.



СТАТЬЯ НА САЙТЕ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Авторы подтверждают отсутствие возможных конфликтов интересов.

Поступила в редакцию 05.04.2016 г.

Принята к печати 30.05.2016 г.