

УДК:57.085.23:616.361:616-78

ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ОБЛУЧЕНИЯ НА АРТЕРИИ СВИНЬИ ПРИ СОЗДАНИИ ДЕВИТАЛИЗИРОВАННЫХ СКАФФОЛДОВ

Д. В. Бызов
О. П. Сынчикова
И. П. Михайлова
Б. П. Сандомирский

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, Харьков

E-mail: cryo@online.kharkov.ua

Актуальной проблемой тканевой инженерии является разработка адекватного метода девитализации ксеногенных артерий с целью создания сосудистых протезов малого диаметра. Детергентно-энзимная обработка сопровождается значительными побочными эффектами. Мы разрабатываем новый подход к девитализации ксеноартерий с использованием эффектов повреждения низкими температурами и ионизирующим облучением. В работе представлены экспериментальные данные по воздействию облучения электронами на морфофункциональные характеристики артерий свиньи. Показано, что в исследуемых дозах облучение вызывает деэндотелизацию артерий, при более высокой дозе отмечается также интерфазная гибель гладкомышечных клеток; структурная целостность соединительнотканых волокон сосудистой стенки не нарушается. Выявлено селективное повышение прочности облученных артерий в радиальном направлении.

Ключевые слова: скаффолды, сосудистые протезы, девитализация, биоинженерия, ксеногенные артерии.

Наиболее перспективным направлением в тканевой инженерии сосудистых протезов малого диаметра ($d \leq 6$ мм), продемонстрировавшим положительные результаты во многих исследованиях [1, 2], является использование девитализированных сосудистых ксеноскаффолдов [3, 4]. Девитализированные ксенососуды представляют собой композицию из естественного внеклеточного матрикса (эластиновые и коллагеновые волокна) [5], сохраняют долгосрочную устойчивую структуру и биомеханическую прочность нативных артерий [6, 7, 8]. Впоследствии после трансплантации девитализированные ткани могут быть засеяны разнообразными кардиоваскулярными клетками, включая эндотелиоциты, как *in vitro*, так и *in vivo* [2, 9]. Девитализированная ткань сохраняет способность к восстановлению, росту и ремоделированию *in vivo*.

Однако свойства сосудистых ксеноскаффолдов непосредственно связаны с применяемым методом девитализации [6, 10]. Для создания девитализированных сосудистых скаффолдов мы изучаем возможность комбинированного использования криоповреждения [11] и облучения электронами.

В предыдущей работе были описаны особенности влияния экстремальных низких температур на морфологическую структуру и биомеханические свойства артерий свиньи [12–14]. В настоящем исследовании представлены экспериментальные данные по воздействию облучения электронами на ксеноартерии. Облучение применялось с целью разрушения клеточных элементов стенки артерии и стерилизации биологической ткани [12, 13].

Цель исследования — изучения влияния ионизирующего облучения на морфофункциональные свойства артерий свиньи.

Материалы и методы

В течение 30 мин после забоя препарированы общие сонные и внутренние грудные артерии свиньи с соблюдением всех норм «Европейской конвенции о защите позвоночных животных» (Страсбург, 1985).

Артерии подвергали облучению флюэсом электронов в двух режимах при помощи линейного ускорителя электронов на базе Харьковского физико-технического институ-

та (ХФТИ). Применяли два режима облучения, которые отличались величиной поглощенной дозы. Артерии разделили на следующие группы: I — нативные ($n = 10$); II — облученные по 1-му режиму ($n = 10$); III — облученные по 2-му режиму ($n = 10$).

Морфологическую структуру артерий оценивали с помощью оптической микроскопии ($\times 200$): окраска гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону.

Механические свойства изучали путем деформирования сосудов в продольном (*strength-test*) и радиальном (*burst-test*) направлениях, как было описано ранее [14].

Статистические данные оценивали по U-критерию Манна–Уитни с помощью программы SPSS 17.

Результаты и обсуждение

При окраске гематоксилином и эозином артерий, облученных по 1-му режиму, отмечаются обширные участки десквамированного эндотелия, деформированные ядра гладкомышечных клеток (рис. 1, 2). После облучения артерий по 2-му режиму эндотелий не определяется, отмечается наличие сегментированных и деформированных ядер гладкомышечных клеток, что указывает на интерфазную гибель клеток (рис. 3). Структурная целостность сосудистой стенки не нарушена. Подобные изменения наблюдали во всех исследуемых образцах.

При окраске пикрофуксином по Ван-Гизону обеих групп облученных артерий выявлено сохранение структуры экстрацеллюлярного соединительнотканного матрикса. Отмечается уплотнение и утолщение волокон, что напоминает морфологические изменения после воздействия на артерии низких температур [14]. Компактное расположение

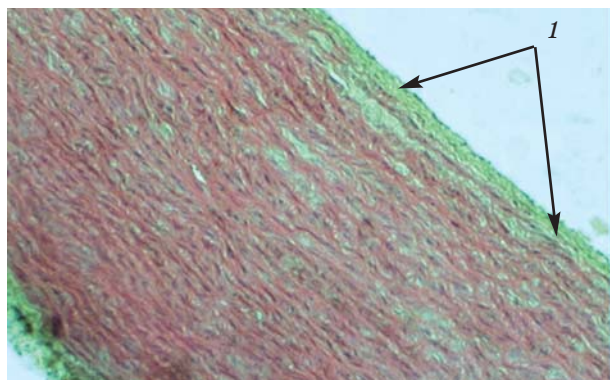


Рис. 1. Нативная артерия свиньи:
1 — эндотелиальный слой.
Окраска гематоксилином и эозином ($\times 200$)

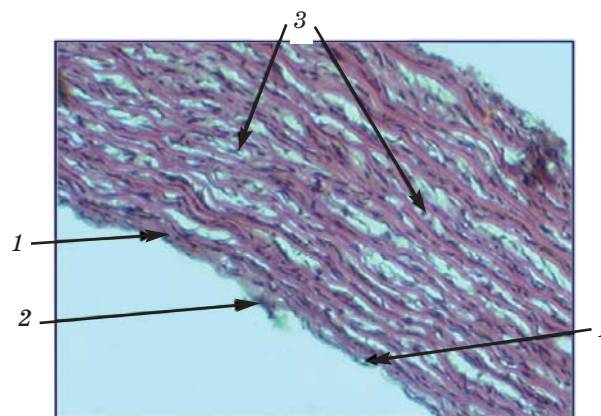


Рис. 2. Артерия свиньи, облучение по 1-му режиму:

- 1 — участки десквамированного эндотелия;
 - 2 — группа эндотелиоцитов;
 - 3 — деформированные ядра гладкомышечных клеток.
- Окраска гематоксилином и эозином ($\times 200$)

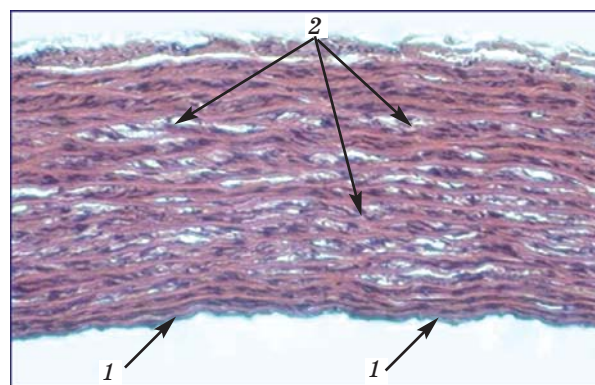


Рис. 3. Артерия свиньи, облучение по 2-му режиму:

- 1 — деэндотелизированное поле;
 - 2 — сегментированные и деформированные ядра гладкомышечных клеток.
- Окраска гематоксилином и эозином ($\times 200$).

соединительнотканых волокон связано с формированием поперечных швов между отдельными волокнами коллагена (появлением дополнительных С–С связей). Базальная мембрана после облучения остается интактной, что особенно важно для последующего заселения скаффолда эндотелием. Существенные различия в соединительнотканной структуре между облученными группами не выявлены (рис. 4, 5, 6). Описанная картина отмечалась во всех исследуемых образцах.

Определение прочности в продольном направлении не продемонстрировало статистически значимых различий облученных артерий по сравнению с группой контроля (рис. 7).

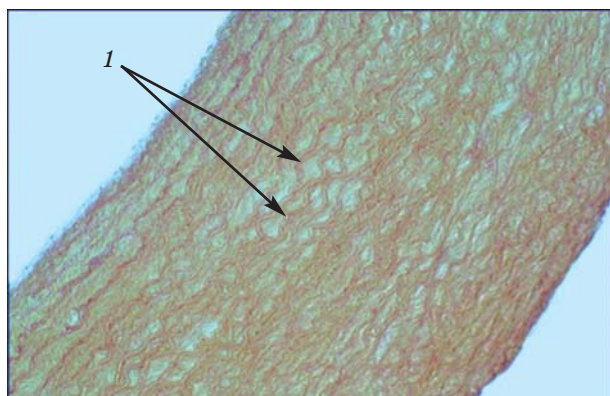


Рис. 4. Нативная артерия свиньи:
1 — коллагеновые и эластиновые волокна, демонстрирующие выраженную извитость.
Окраска по Ван-Гизону ($\times 633$).



Рис. 5. Артерия свиньи, облучение по 1-му режиму:
1 — коллагеновые и эластиновые волокна, отмечается их компактное расположение.
Окраска по Ван-Гизону ($\times 633$)

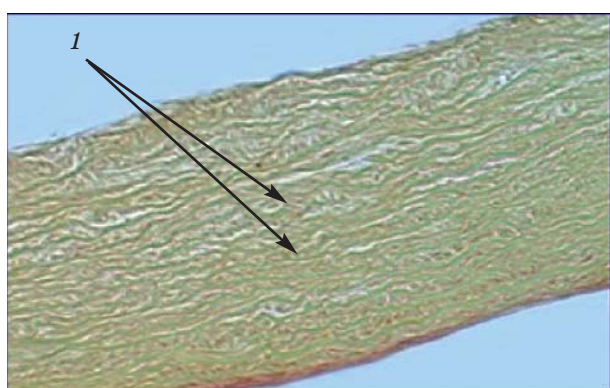


Рис. 6. Артерия свиньи, облучение по 2-му режиму:
1 — коллагеновые и эластиновые волокна, отмечается их компактное расположение.
Окраска по Ван-Гизону ($\times 633$)

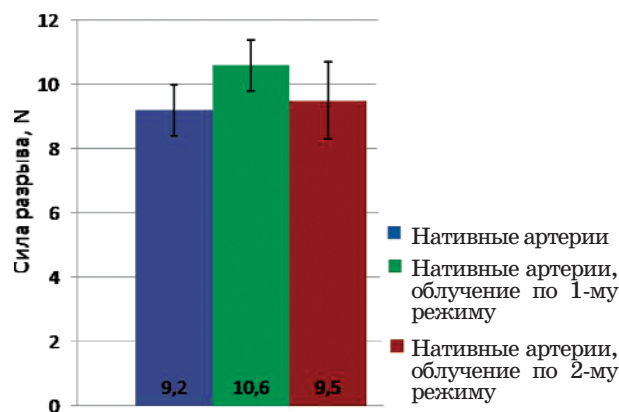


Рис. 7. Механическая прочность артерий в продольном направлении (*strength-test*), $n = 10$

Прочность в радиальном направлении является более значимым показателем в связи с физиологичным разнонаправленным векторным распределением деформирующих сил, моделирующих давление крови. При оценке полученных данных выявлено статистически значимое увеличение прочности в обеих группах облученных артерий по сравнению с нативными сосудами (рис. 8). Следует отметить, что между облученными группами достоверные различия не отмечены. Увеличение механической прочности можно объяснить процессом кроссликинга, т. е. формированием поперечных сшивок между отдельными волокнами коллагена, что происходит под воздействием ионизирующего облучения. Это явление может предотвратить ранний энзимный лизис соединительнотканного каркаса в организме реципиента.

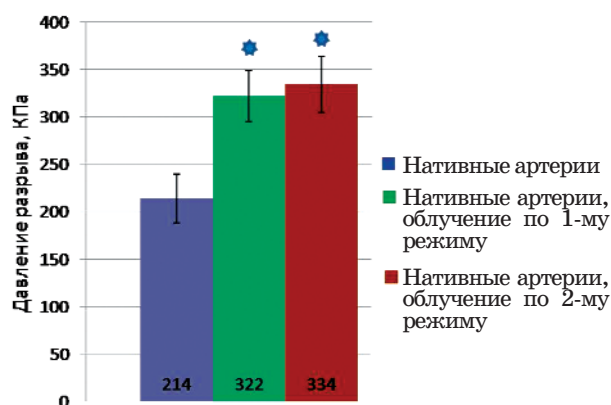


Рис. 8. Механическая прочность артерий в радиальном направлении (*burst-test*), $n = 10, p < 0,05$

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что облучение электронами в исследуемых дозах (режимы 1, 2) вызывает частичную девитализацию артерий свиньи. Причем при более высокой дозе (2-й режим) эндотелиальный слой полностью отсутствует, отмечаются признаки интерфазной гибели гладкомышечных клеток. Исследуемые режимы облучения не вызывают нарушений структурной целостности соединительнотканного каркаса. Отмечается селективное повышение механической прочности облученных артерий в радиальном направлении, что объясняется процессом

кросслинкинга. Ионизирующее облучение может быть использовано как этап создания девитализированных сосудистых ксеноскаффолдов, обеспечивая при этом стерилизацию биоматериала.

Коллектив авторов выражает благодарность сотрудникам кафедры сопротивления материалов Харьковского национального технического института «НТУ ХПИ», а также Национального научного центра Харьковского физико-технического института за консультативную и техническую поддержку.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ota T., Taketani S., Iwai S. et al. Novel method of decellularization of porcine valves using polyethylene glycol and gamma irradiation // *Ann. Thorac. Surg.* — 2007. — N 83. — P. 1501–1507.
2. Liu G., He Z., Yang D. et al. Decellularized aorta of fetal pigs as a potential scaffold for small diameter tissue engineered vascular graft // *Chin. Med. J.* — 2008. — N 121 (15). — P. 1398–1406.
3. Edelman E. R. Vascular tissue engineering: designer arteries // *Circ. Res.* — 1999. — N 85. — P. 1115–1117.
4. Schmidt C. E., Baier J. M. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering // *Biomaterials.* — 2000. — V. 21, N 22. — P. 2215–2231.
5. Badylak S. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction // *Transpl. Immunol.* — 2004. — N 12. — P. 267–377.
6. Roy S., Silacci P., Stergiopoulos N. Biomechanical properties of decellularized porcine common carotid arteries // *American. J. Phys. — Heart and Circ. Phys.* — 2005. — N 289. — P. 1567–1576.
7. Бызов Д. В., Сынчикова О. П., Пушкова Е. Н. и др. Биотехнологические аспекты создания трансплантатов артерий // *Биотехнология.* — 2010. — Т. 3, № 3. — С. 21–30.
8. Chan B. P., Leong K. W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations // *Eur. Spine J.* — 2008. — N 17 (Suppl 4). — P. 467–479.
9. Amiel G. E., Komura M., Shapira O. et al. Engineering of blood vessels from acellular collagen matrices coated with human endothelial cells // *Tissue Eng.* — 2006. — N 12. — P. 2355–2365.
10. Gratzner P. F., Harrison R. D., Woods T. Matrix Alteration and not Residual Sodium Dodecyl Sulfate Cytotoxicity Affects the Cellular Repopulation of a Decellularized Matrix // *Ibid.* — 2006. — V. 10, N 12. — P. 2975–2983.
11. Byzov D., Synchykova O., Mikhaylova I. et al. Cryobiological stage of creation of vascular scaffolds // *Укр. біохім. журн.* — 2009. — Т. 81, № 4 (спеціальний випуск). — С. 287.
12. Henner W. D., Rodriguez L. O., Hecht S. M., Haseltine W. A. Gamma Ray induced deoxyribonucleic acid strand breaks. 3'-Glycolate termini // *J. Biol. Chem.* — 1983. — V. 25, N 258. — P. 711–713.
13. Sterilization of health care products-radiation sterilization-substantiation of 25 kGy as a sterilization dose for small or infrequent production batches. TC198, ICS:11.080.01, ISO/TS13409:2002, International Organization for Standardization.
14. Бызов Д. В., Сынчикова О. П., Михайлова И. П., Сандомирский Б. П. Применение низких температур для создания ксеногенных сосудистых скаффолдов // *Биотехнология.* — 2010. — Т. 3, № 1. — С. 41–45.

**ВПЛИВ ІОНІЗУЮЧОГО
ОПРОМІНЮВАННЯ НА АРТЕРІЇ СВИНІ
ПРИ СТВОРЕННІ
ДЕВІТАЛІЗОВАНИХ СКАФОЛДІВ**

*Д. В. Бизов
О. П. Синчикова
І. П. Михайлова
Б. П. Сандомирський*

Інститут проблем кріобіології
та кріомедицини НАН України, Харків

E-mail: cryo@online.kharkov.ua

Актуальною проблемою тканинної інженерії є розробка адекватного методу девіталізації ксеногенних артерій з метою створення судинних протезів малого діаметра. Детергентно-ензимна обробка супроводжується значними побічними ефектами. Ми розробляємо новий підхід до девіталізації ксеноартерій з використанням ефекту ушкодження низькими температурами та іонізуючим опромінюванням. У роботі представлені експериментальні дані щодо дії опромінювання електронами на морфофункціональні характеристики артерій свині. Показано, що в досліджуваних дозах опромінювання спричинює деендотелізацію артерій, за вищої дози відзначається також інтерфазна загибель гладком'язових клітин; структурна цілісність сполучнотканинних волокон судинної стінки не порушується. Виявлено селективне підвищення міцності опромінених артерій в радіальному напрямі.

Ключові слова: скафолди, судинні протези, девіталізація, біоінженерія, ксеногенні артерії.

**IONIZING IRRADIATION EFFECT
ON PORCINE ARTERIES
FOR CREATION
OF DEVITALIZED SCAFFOLDS**

*D. V. Byzov
O. P. Synchikova
I. P. Mikhaylova
B. P. Sandomirskiy*

Institute of Problems of Cryobiology and
Cryomedicine of National Academy of Sciences
of Ukraine, Kharkiv

E-mail: cryo@online.kharkov.ua

An actual task of tissue engineering is the development of adequate devitalization method of xenogenic arteries to create the small diameter vascular prostheses. Detergent-enzyme treatment is accompanied by some quite serious side effects. A new approach to devitalization of xenoarteries using the effect of damage by low temperatures and ionizing radiation is under our development. In the paper the experimental findings on the effect of ionizing radiation on morphological and functional characteristics of porcine arteries are presented. The studied radiation doses have been shown to cause deendothelization of arteries, higher ones also caused interphase death of smooth muscle cells. Structural integrity of connective tissue fibers of vascular wall is not impaired. The selective rise of the strength parameters of irradiated arteries in radial direction has been revealed as well.

Key words: scaffolds, vascular grafts, devitalization, bioengineering, xenogenic arteries.