

**МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ АРТЕРИЙ ПОСЛЕ ГЛУБОКОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ И ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ****Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)**

Данная работа выполнена в соответствии с темой № 2. 2. 6. 72 «Вплив низьких температур та екстрактів серця і селезінки на процеси некротизації і регенерації міокарду, судин та хряща», № государственной регистрации 0112U003133.

**Вступление.** Проблема создания адекватных сосудистых протезов при протезировании сосудов малого диаметра является приоритетной и на сегодняшний день. Несмотря на то, что созданы надежные сосудистые протезы для аорты и артерий крупного диаметра, по-прежнему остается актуальным вопрос о протезировании артерий малого и среднего диаметров. Лучшими заменителями этих артерий являются аутогенные артерии и вены. Однако применение аутоартерий крайне ограничено, что обусловлено, прежде всего, опасностью ишемии донорской зоны и наличия достаточного количества материала [1, 3, 4]. Известно, что синтетические сосудистые протезы в отдаленные сроки после имплантации в артерии малого диаметра тромбируются в 100% случаев. Ограниченность применения аллогенных сосудистых протезов связана с этическими вопросами использования трупного материала, а также с осложнениями, развивающимися в послеоперационном периоде (иммунные реакции, хронические воспаления, кальциноз протеза, гиперпластические окклюзии) [11].

В качестве основы для сосудистых протезов натуральные биологические ткани в значительной мере превосходят синтетические, проявляя лучшие адгезивные свойства при последующей эндотелизации и способствуют росту эндотелия. Кроме того, в зависимости от метода обработки, они могут обладать механическими свойствами, характерными для нативных сосудов. Многочисленные попытки внедрить в хирургическую практику ксеногенные биологические протезы обусловлены их очевидными преимуществами: сохранением архитектоники и конфузорности нативной артерии, нулевой хирургической порозностью, а также отличными имплантационными свойствами. И при этом, ксенографты являются более дешевыми, доступными и снимают этические проблемы.

Проблема получения эффективных ксенопротезов артерий малого и среднего диаметра связана с необходимостью преодоления иммунного конфликта даже в большей степени, чем сосудистая аллопластика. Для повышения биосовместимости трансплантатов клапанов сердца и сосудов

предлагают удалять/разрушать в них клетки донора до имплантации, то есть, проводить децеллюляризацию/девитализацию ткани [10]. Девитализация, как известно, способствует уменьшению иммунной реакции организма реципиента на трансплантат. На этом основании бесклеточные скаффолды, применяют в качестве сосудистых протезов. После трансплантации бесклеточный каркас постепенно преобразовывается, замещаясь аутогенным внеклеточным матриксом, который формируется собственными клетками реципиента и образует устойчивую, долгосрочную структуру сосудистого биопротеза [8, 10, 16]. В связи с этим, для эффективного протезирования, предимплантационная обработка сосудов должна включать следующие задачи: снижение иммуногенности биоматериала; стабилизация структуры ткани; сохранение адекватных механических свойств; стерилизация биоматериала [1, 3, 4, 8, 10, 11, 14]. Большинство современных методов девитализации ксеноартерий основаны на продолжительной обработке ткани различными детергентно-энзимными и консервирующими растворами (эпоксисоединения различного состава), разнообразными гипо- и гипертоническими буферами, действие которых связано с разрушением клеточных элементов (иммуногенных компонентов) сосудистой стенки, дублированием ткани и ее структурной стабилизацией. Методы химической обработки позволяют эффективно снижать антигенные свойства тканей и предупреждать бактериальное обсеменение биографтов за счет антисептических свойств используемых реагентов [8, 10, 14]. Однако, химические реагенты имеют большое количество отрицательных моментов, а именно снижение механической прочности и пролонгированная цитотоксичность, которая обуславливает склонность к кальцинозу и фиброзированию, что способствует ухудшению качества биопротезов. Под воздействием химической обработки, возрастает вероятность дополнительных процессов минерализации биоматериала за счет увеличения количества центров нуклеации, поскольку на степень кальцификации влияют химический состав и физические свойства ткани. Среди осложнений преобладают тромбозы, наиболее частыми причинами которых являются: несостоятельность путей «оттока», прогрессирующее облитерирующее заболевание и наличие выранных неоинтимальных стенозов – зон анастомозирования. Как правило, это приводит к потере

функциональных свойств протезов и необходимости реопераций [1, 14]. Вышеуказанные эффекты в значительной степени ограничивают внедрение «химических» методик в практику предимплантационной обработки сосудов при трансплантации. При протезировании сосудов малого диаметра и на сегодняшний день актуальным остается вопрос о наличии адекватного сосудистого заменителя. В связи с этим был предложен принципиально новый подход к созданию девитализированных сосудистых ксенопротезов малого диаметра, включающих предимплантационную обработку биоматериала с использованием физических факторов (замораживание-отогрев, ионизирующее облучение) [3, 4, 6]. Метод ксенопротезирования артериальных сосудов может найти широкое применение в клинике после разработки новых методов модификации биоматериала и новых способов адаптации генетической конституции трансплантата к тканям реципиента.

**Целью данной работы** является изучение влияния низких температур и ионизирующего излучения на морфологическую структуру артериальных сосудов свиньи при создании бесклеточных ксеногенных сосудистых скаффолдов.

**Объект и методы исследования.** Внутригрудные артерии (*a. thoracica interna*) выделяли у беспородных половозрелых свиней с соблюдением правил биоэтики, утвержденных в ИПКиК и в соответствии с «Общими этическими принципами экспериментов на животных», одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (г. Киев) и согласованными с положениями «Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985). Промытые артерии помещали в криоконтейнеры («Eurotubo, Deltalab», Испания) и погружали в жидкий азот (-196°C), где и хранили до момента использования [6]. Максимальный срок хранения достигал 9 месяцев. Отогревание образцов артерий проводили при +37°C. Для проведения исследования артерии свиней были разделены на 4 группы: I – группа контроль (нативные артерии – 10 *a. thoracica int.*), n=10; II группа – внутригрудные артерии, после воздействия низких температур, n=10; III – группа (нативные облученные артерии – 10 *a. thoracica int.*), n=10; IV группа – внутригрудные артерии, после воздействия низких температур и облучения, n=10. Облучение артерий проводили на базе Национального Научного Центра Харьковского Физико-технического института Национальной Академии наук Украины (ННЦ ХФТИ) с помощью линейного ускорителя электронов ЛУЭ-10 в дозе 25 кГр, при этом энергия облучения составляла до 10 МэВ, а средний ток – 1 мА [2]. Доза 25 кГр выбрана как минимально необходимая для обеспечения стерильности медицинских материалов [15]. Для обеспечения измерений поглощенной дозы (основного метрологического параметра радиационных технологий и испытаний) использовались калориметрические дозиметры электронного излучения (лаборатория *RISO*) и детекторы *Red-4034*

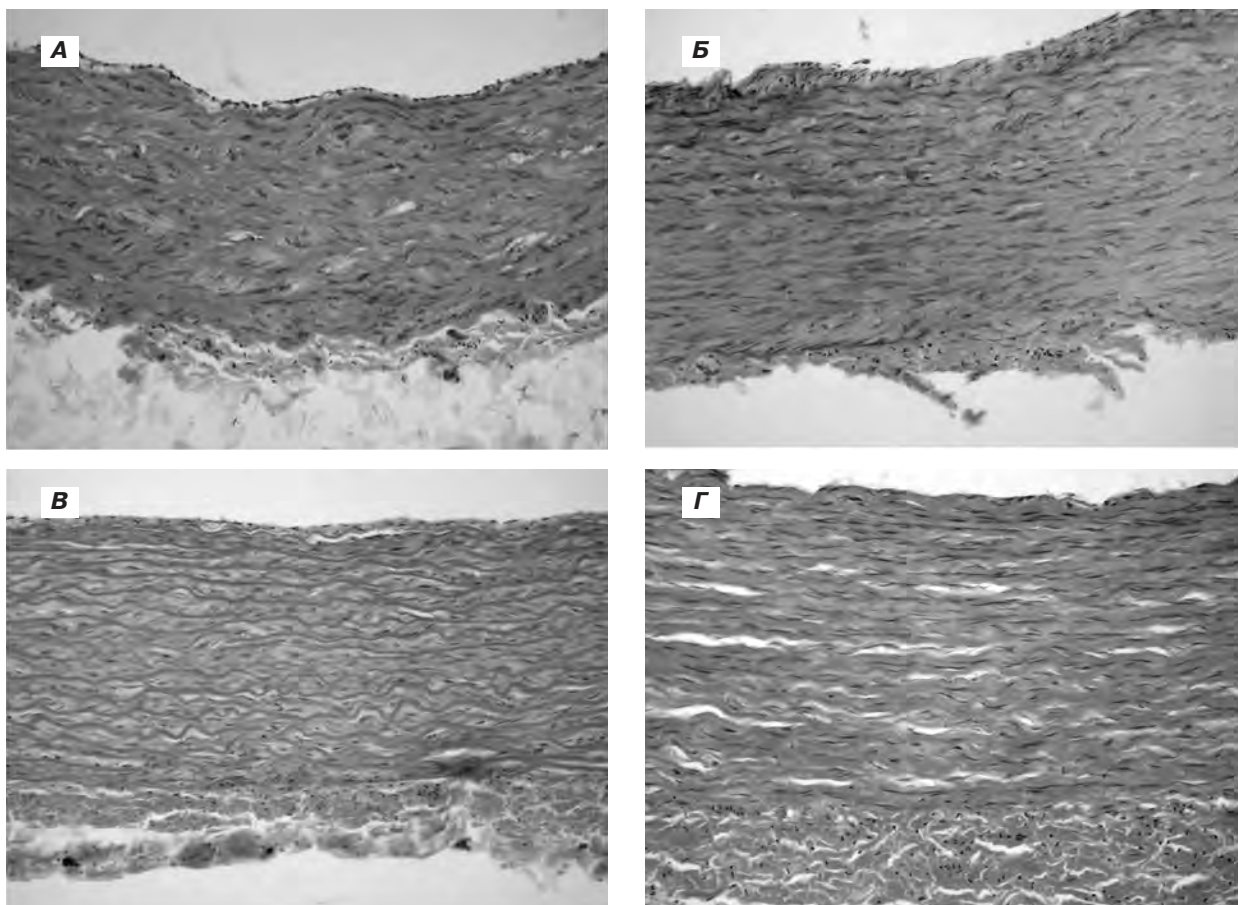
*Perspex* (Великобритания). Система сканирования электронного пучка позволяла формировать равномерное поле облучения с размерами до 100 x 500 мм<sup>2</sup>. С целью предупреждения тепловой денатурации соединительной ткани мощность поглощенной облучаемым образцом дозы выбиралась таким образом, чтобы температура в пробирках не повышалась более чем на 5°C за один проход конвейера под пучком электронов. Таким образом, температура артерий в процессе облучения не превышала 25°C.

Для общей оценки состояния исследуемых тканей артерий применяли окрашивание гематоксилином и эозином. Для выявления и дифференцировки соединительно-тканых структур использовали окрашивание препаратов фукселином на эластические волокна по Вейгерту с докраскиванием пикрофусином по методу Ван Гизон. Для оценки целостности клеточных элементов тканей артерий использовали комплекс гистохимических методик. Дезоксинуклеопротеиды (ДНП) выявляли реакцией по Фельгену-Россенбеку (контроль – гидролиз с HCl). Рибонуклеопротеиды (РНП) выявляли окраской по методу Браше (контроль кристаллической рибонуклеазой) [5,7]. Изучение препаратов, окрашенных гистологическими и гистохимическими методами проводили на микроскопе Olympus BX-41 с использованием программ Olympus DP-Soft (Version 3:1).

### **Результаты исследований и их обсуждение.**

При изучении морфологической структуры образцов нативных артерий *a. thoracica int.*, после воздействия глубокого замораживания (-196°C), ионизирующего излучения и их сочетанного влияния в стенке артерий всех исследуемых групп четко дифференцируются три оболочки: интима, медиа и адвентиция (**рис. 1**).

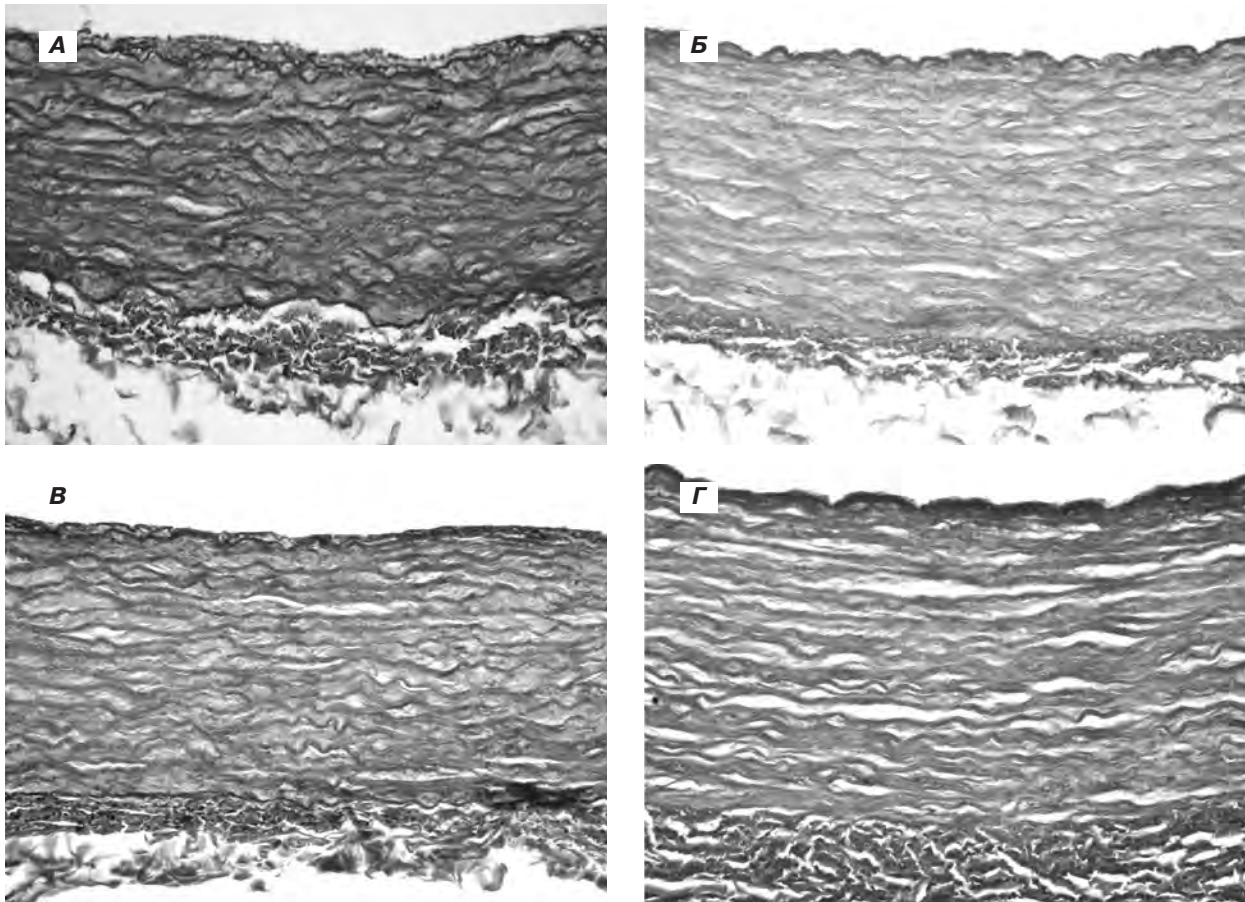
Внутренняя оболочка образцов нативных артерий (группа I) включает в себя эндотелий, подэндотелиальный слой и сплетение эластических волокон, формирующих внутреннюю эластическую мембрану (**рис. 1А**). Эндотелиальные клетки выстилают весь внутренний периметр сосудистой стенки. Клетки в образце нативной артерии несколько вытянутой формы со слабо базофильной цитоплазмой и слабо выраженной реакцией на РНП в ней, ядра клеток округлые, базофильные с умеренной реакцией на ДНП (**рис. 3А, 4А**). Подэндотелиальный слой нативных артерий свиньи представлен тонкими умеренно фуксинофильными волокнами, между которыми встречаются немногочисленные фибробласты и гладкомышечные клетки с умеренно выраженной реакцией Фельгена-Россенбека в ядре и слабо выраженной реакцией Браше в цитоплазме (**рис. 2А, 3А, 4А**). Тогда как, при влиянии глубокого замораживания (-196°C) (группа II) на артерии свиньи (**рис. 1Б**) эндотелиальная выстилка интимы наблюдается с обширными полями десквамации клеток. В сохранившихся участках и очагах эндотелиальной выстилки образцов артерий после криовоздействия наблюдаются клетки разной величины и формы, ядра вытянутые, слабо или умеренно базофильные,



**Рис. 1.** Морфологическая структура стенки артерии свиньи. **А** – образец нативной артерии, **Б** – образец артерии после глубокого замораживания, **В** – образец нативной артерии после воздействия ионизирующего облучения, **Г** – образец артерии после воздействия низких температур и ионизирующего облучения. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 200$ .

часть из них пикнотически сморщены, гиперхромны. Интенсивность реакции Фельгена-Россенбека в ядрах слабая, реже умеренная (**рис. 3Б**). Реакция на РНП в цитоплазме слабо выражена или не определяется (**рис. 4Б**). При воздействии ионизирующего облучения и сочетанного его влияния с глубоким замораживанием (группы III и IV), внутренняя оболочка артерий на всем протяжении лишена эндотелиальной выстилки. В подэндотелиальном слое облученных артерий (группа III) четко контурируются тонкие умеренно фуксинофильные коллагеновые волокна с немногочисленными фибробластами и гладкомышечными клетками между ними. Ядра клеток деформированы, пикнотичны, часть клеток визуализируется с умеренно или слабо выраженной базофилией (**рис. 1В**). Подэндотелиальный слой образцов IV группы наблюдается неравномерной толщины и состоит из компактно расположенных тонких умеренно фуксинофильных коллагеновых волокон с очагами набухания. Лежащие между ними немногочисленные фибробласты и гладкие мышечные клетки с деформированными пикнотичными и сегментированными ядрами, слабо воспринимающими основные красители (**рис. 1Г**).

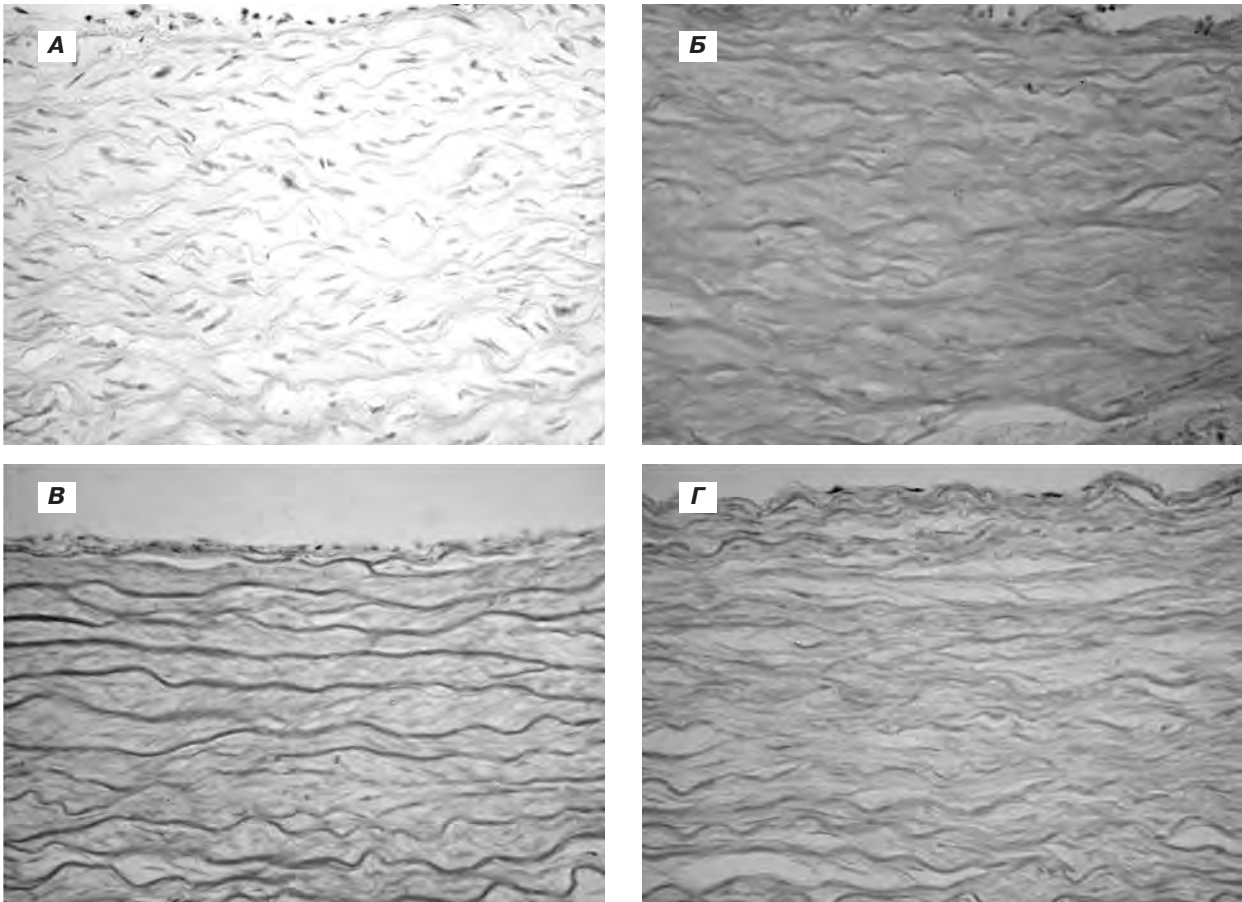
Внутренняя эластическая мембрана нативных артерий (группа I) визуализируется при окраске фукселином на эластические волокна по Вейгерту в виде непрерывной спирально ориентированной черно-коричневой линии, отделяющей внутреннюю оболочку сосуда от средней (**рис. 2А**). Эластический каркас средней оболочки сосудов сформирован спирально ориентированными окончатými эластическими мембранами с гладкими контурами, соединенными эластическими волокнами. Между эластическими мембранами определяются многочисленные гладкие мышечные клетки, фуксинофильные коллагеновые волокна, также встречаются в небольшом количестве фибробласты. Гладкие мышечные клетки, ориентированные в косом направлении по отношению к эластическим мембранам, веретенообразной формы с палочковидным умеренно базофильным ядром и слабо базофильной цитоплазмой. Тогда как, подэндотелиальный слой в образцах артерий после глубокого замораживания (группа II) (**рис. 2Б**) сужен, с участками компактного расположения волокнистых структур и неравномерной их фуксинофилией. Фибробласты и гладкие мышечные клетки исследуемых образцов с пикнотически сморщенными палочковидными ядрами, слабо



**Рис. 2.** Морфологическая структура стенки артерии свиньи. **А** – образец нативной артерии, **Б** – образец артерии после глубокого замораживания, **В** – образец нативной артерии после воздействия ионизирующего облучения, **Г** – образец артерии после воздействия низких температур и ионизирующего облучения. Окраска фукселином на эластические волокна по Вейгерту с докрасиванием пикрофусином по Ван Гизон, х200.

или умеренно выраженной реакцией Фельгена-Россенбека в ядре и отрицательной реакцией Браше в цитоплазме (рис. 3Б, 4Б). Внутренняя эластическая мембрана артерий после криовоздействия при окраске по Вейгерту, непрерывная, гладкая, с четкими контурами, изредка с мелкими очагами разрушения. Средняя оболочка стенки артерии после влияния глубокого замораживания деформирована. Ориентация гладких мышечных клеток по отношению к эластическим мембранам меняется с косой на продольную. Ядра клеток вытянутые, деформированные, слабо воспринимают основные красители, реакция на ДНП в них слабо выражена или негативная (рис. 3Б). Реакция на РНП в цитоплазме – отрицательная (рис. 4Б). Эластические мембраны меди, соединенные эластическими волокнами, со снижением извитости, четкими гладкими контурами, правильно ориентированы. Между ними визуализируются фуксинофильные коллагеновые волокна и встречаются немногочисленные фибробласты со сморщенным базофильным ядром со слабо выраженной реакцией на ДНП в нем. При сочетанном влиянии ионизирующего облучения и глубокого замораживания (группа IV) внутренняя эластическая мембрана визуализируется как непрерывная с

четкими гладкими контурами без очаговых повреждений, местами извитость ее несколько сглажена (рис. 2Г). Компактно расположенные эластические мембраны, фуксинофильные коллагеновые волокна средней оболочки сохраняют свою ориентацию, хорошо контурируются; извитость эластических волокон снижена. Гладкие мышечные клетки ориентированы продольно по отношению к эластическим мембранам. Ядра гладких мышечных клеток и многочисленных фибробластов деформированы, с признаками кариопикноза и кариорексиса с негативной реакцией Фельгена-Россенбека (рис. 3Г), лишь в единичных ядрах клеток она слабо выражена. Реакция Браше не определяется вообще (рис. 4Г). Фуксинофильные коллагеновые волокна артерий после сочетанного влияния ионизирующего облучения в дозе 25 кГр и глубокого замораживания, формирующие адвентицию, хорошо контурируются и тесно прилежат друг к другу. Клеточные элементы, расположенные между ними, визуализируются с пикнотичными или сегментированными ядрами со слабой интенсивностью реакции на ДНП в ядрах и отрицательной реакцией на РНП в цитоплазме (рис. 3Г, 4Г). Сосуды средней и наружной оболочек лишены эндотелиальной выстилки, просветы их выглядят



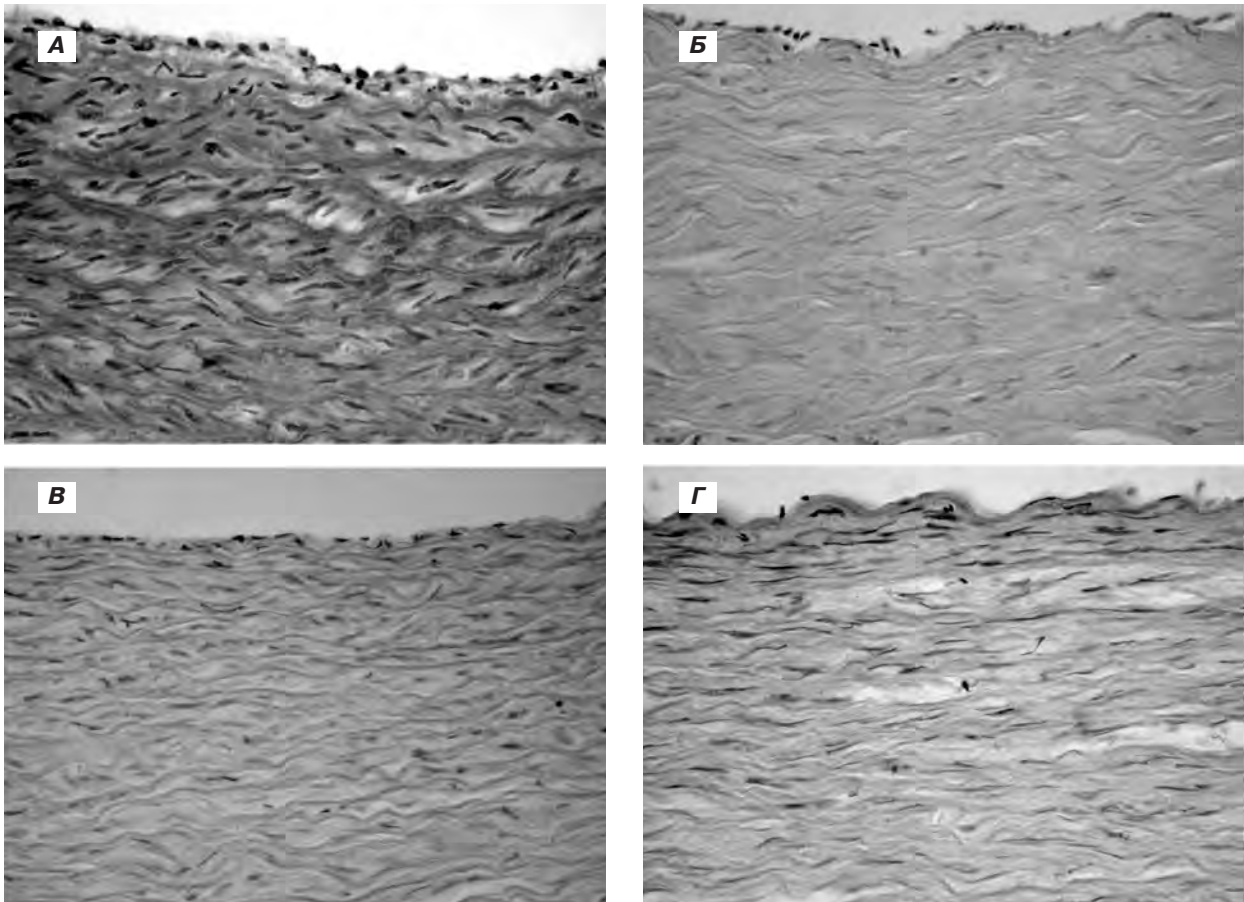
**Рис. 3.** Реакция на ДНП в ядрах эндотелиоцитов и гладких мышечных клетках артерии свиньи. А – образцы нативной артерии, Б – образец артерии после глубокого замораживания, В – образец нативной артерии после воздействия ионизирующего облучения, Г – образец артерии после воздействия низких температур и ионизирующего облучения. Реакция Фельгена-Россенбека,  $\times 400$ .

оптически пустыми или содержат небольшое количество гемолизата. Тогда как, под влиянием ионизирующего облучения эластическая мембрана нативных артерий (группа III) четко контурируется как гладкая, со снижением извитости, изредка с мелкими очагами разрыхления и поверхностными дефектами (рис. 2В). При этом, эластические мембраны и фуксинофильные коллагеновые волокна средней оболочки несколько набухшие с очаговым их разволокнением. Извитость эластических мембран несколько сглажена. Гладкие мышечные клетки ориентированы параллельно эластическим мембранам. Ядра гладких мышечных клеток и фибробластов слабо базофильны, деформированы, в состоянии кариопикноза и кариорексиса. Реакция Фельгена-Россенбека в ядрах клеток медиа слабо выражена или негативная, реакция Браше в цитоплазме не определяется (рис. 3В, 4В). Собственные сосуды стенки артерий после действия ионизирующего излучения в дозе 25 кГр лишены эндотелиальной выстилки, просветы их заполнены гемолизированными форменными элементами крови (рис. 3В, 4В).

Литературные данные относительно выраженности повреждений коллагена под влиянием различных доз ионизирующего излучения противоречивы. Некоторые авторы отмечают отсутствие значимых

повреждений соединительнотканых волокон сердечных клапанов при дозе 100 кГр [9]. Другие указывают, что выраженные повреждения коллагена появляются при дозах свыше 90 кГр [12]. Некоторые исследователи отмечают значительное снижение механических свойств сухожилий после облучения электронами в дозе 25 кГр и выше, что связывают со значительным повреждением коллагеновых волокон [15]. Однако большинство авторов сходится во мнении, что ионизирующее излучение вызывает значительно меньшие повреждения гидратированных коллагенсодержащих биоматериалов по сравнению с дегидратированными [2, 9, 12, 13].

Коллагеновые волокна адвентиции образцов артерий после глубокого замораживания (группа II) визуализируются с выраженной фуксинофилией, компактно расположены. Лежащие между ними фибробласты визуализируются с пикнотичным базофильным ядром. Реакция Фельгена-Россенбека в ядре слабо выражена или отрицательная (рис. 3Б). Реакцией Браше в цитоплазме фибробластов негативная. Встречаются свободно лежащие скопления хроматина (рис. 4Б). Просветы vasa vasorum средней и наружной оболочек стенки артерий после криовоздействия заполнены гемолизированными эритроцитами, а выстилающие их эндотелиоциты



**Рис. 4** Реакция на РНП в цитоплазме эндотелиоцитов и гладких мышечных клетках артерии свиньи. **А** – образец нативной артерии, **Б** – образец артерии после глубокого замораживания, **В** – образец нативной артерии после воздействия ионизирующего облучения, **Г** – образец артерии после воздействия низких температур и ионизирующего облучения. Реакция Браше, х400.

большей частью десквамированы. Сохранившиеся клетки визуализируются с пикнотичным вытянутым ядром со слабо выраженной реакцией Фельгена-Россенбека и слабо базофильной цитоплазмой, не дающей положительной реакции Браше (**рис. 3Б, 4Б**).

В гладких мышечных клетках и фибробластах нативных артерий (группа I) интенсивность реакции на ДНП в ядрах умеренная, интенсивность реакции на РНП в цитоплазме слабая (**рис. 3А, 4А**). Наружный слой представлен рыхло лежащими фуксинофильными коллагеновыми волокнами, между которыми определяются фибробласты с умеренно выраженной реакцией Фельгена-Россенбека в ядре и слабо выраженной реакцией Браше в цитоплазме (**рис. 3А, 4А**). В средней и наружной оболочках располагаются умеренно кровенаполненные сосуды, выстланные эндотелиоцитами с округлыми базофильными ядрами и умеренно выраженной реакцией Фельгена-Россенбека со слабо базофильной цитоплазмой и слабой интенсивностью реакции Браше. Тогда как, реакция Фельгена-Россенбека в ядрах фибробластов исследуемых образцов ткани сосудов после криовоздействия, ионизирующего излучения и их сочетанного влияния слабо выражена или отрицательная, а реакция Браше в

цитоплазме фибробластов – отсутствует вообще (**рис. 3Б, 3В, 3Г, рис. 4Б, 4В, 4Г**).

Таким образом, на основании результатов гистологического и гистохимического исследования сосудистой стенки артерий после влияния таких физических факторов, как ионизирующее излучение в дозе 25кГр, глубокое замораживание и их сочетанное воздействие было показано, что в соединительнотканном компоненте стенки артерии эластические и коллагеновые волокна, внутренняя эластическая мембрана в целом сохраняют свое пространственное расположение и структурную целостность. В клеточных элементах всех слоев стенки артерии после глубокого замораживания развиваются преимущественно деструктивные изменения в виде некробиоза и некроза гладких мышечных клеток, фибробластов, эндотелиоцитов с частичной деэндотелизацией ее интимы и vasa vasorum. В клетках всех оболочек сосудов после облучения развиваются глубокие деструктивные изменения, что проявляется тотальной десквамацией эндотелиоцитов, некрозом гладких мышечных клеток и фибробластов. При сочетанном воздействии глубокого замораживания и облучения в стенках артерий наблюдаются выраженные деструктивные

изменения клеточных элементов с тотальным кариопикнозом и кариорексисом.

**Выводы.** В соединительнотканном компоненте стенки артерии после влияния глубокого замораживания, ионизирующего излучения и их сочетанного воздействия эластические и коллагеновые волокна, внутренняя эластическая мембрана в целом сохраняют свое пространственное расположение и структурную целостность.

Реакция на дезоксирибонуклеопротеиды в ядрах эндотелиоцитов и гладких мышечных клетках артерий свиней после влияния глубокого замораживания, ионизирующего излучения и их сочетанного воздействия слабо выражена, либо отрицательная.

Реакция на рибонуклеопротеиды в цитоплазме эндотелиоцитов и гладких мышечных клетках артерий свиней после влияния глубокого замораживания, ионизирующего излучения и их сочетанного воздействия отрицательная.

В клеточных элементах всех слоев стенки артерии после глубокого замораживания развиваются преимущественно деструктивные изменения в виде некробиоза и некроза гладких мышечных клеток, фибробластов, эндотелиоцитов с частичной дезэндотелизацией ее интимы и vasa vasorum.

В клетках всех оболочек сосудов после облучения развиваются глубокие деструктивные изменения, что проявляется тотальной десквамацией эндотелиоцитов, некрозом гладких мышечных клеток и фибробластов.

При сочетанном воздействии глубокого замораживания и облучения в стенках артерий наблюдаются выраженные деструктивные изменения клеточных элементов с тотальным кариопикнозом и кариорексисом.

**Перспективы дальнейших исследований** заключаются в том, что использование ионизирующего излучения и низких температур в комплексе мероприятий по девитализации сосудистых ксенопротезов при дальнейшем изучении и при благоприятных результатах позволит перейти к созданию низкотемпературного банка биологических сосудистых протезов.

**За помощь в методической части работы с морфологической оценкой полученных результатов мы выражаем благодарность доктору мед наук, профессору Сорокиной И. В. и канд. мед. наук, доценту Наумовой О. В., Харьковский государственный медицинский университет, кафедра патологической морфологии**

### Литература

1. Бокерия Л. А. Экспериментальное обоснование возможности применения артерии и вены пуповины человека в качестве кондуитов / Л. А. Бокерия, А. Ф. Гасанов, И. И. Каграманов [и др.] // Здоровье (Баку). – 2007. – № 10. – С. 147–156
2. Борискин В. Н. Развитие радиационных технологий и испытаний в НИК «Ускоритель» ННЦ ХФТИ / В. Н. Борискин, С. А. Ванжа, В. Н. Верещака [и др.] // Вопросы атомной науки и техники. Серия: Ядерно-физические исследования. – 2008. – Т. 50, №5. – С. 150–154.
3. Бызов Д. В. Биотехнологические аспекты создания трансплантатов артерий / Д. В. Бызов, О. П. Сынчикова, Е. Н. Пушкова [и др.] // Биотехнология. – 2010. – Т. 3, № 3. – С. 21–30.
4. Бызов Д. В. Девитализированные сосудистые протезы, исследование in vivo / Д. В. Бызов, Н. А. Чиж, И. П. Михайлова [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2011. – Т. 12, № 4. – С. 81–90.
5. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Под ред. Лилли Р. – М.: Мир, 1960. – 648 с.
6. Пат. 68379 Україна, МПК А61L 27/00, А01N1/02. Спосіб підготовки ксеногенних артерій для судинного протезування / Сандомирський Б. П., Бызов Д. В., Михайлова І. П., Сынчикова О. П. [и др.]; заявитель и патентообладатель ИПКиК НАНУ. – Заявл. 19. 08. 2011, № u201110193, Публ. 26. 03. 2012, Бюл. № 6.
7. Пирс Э. Гистохимия (теоретическая и прикладная) / Под ред. Пирс Э. – М.: Иностранная литература, 1962. – 962 с.
8. Borschel G. Tissue engineering of recellularized small-diameter vascular grafts / G. Borschel, Y-C., S. Huang Calve [et al.] // Tissue Eng. – 2005. – Vol. 11, №5-6. – P. 778–786.
9. Grant R. The effects of irradiation with high energy electrons on the structure and reactivity of native and cross-linked collagen fibres / R. Grant, R. Cox, C. Kent // J. Cell. Sci. – 1970. – Vol. 7, № 2. – P. 387–405.
10. Grauss R. W. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods / R. W. Grauss, M. G. Hazekamp, F. Oppenhuizen [et al.] // Eur. J Cardiothorac. Surg. – 2005. – Vol. 27, №4. – P. 566–571.
11. Kannan R. Y. Current status of prosthetic bypass grafts: A review / R. Y. Kannan, H. J. Salacinski, P. E. Butler [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. – 2005. – Vol. 74, №1. – P. 570–581.
12. Ota T. Novel method of decellularization of porcine valves using polyethylene glycol and gamma irradiation / T. Ota, S. Taketani, S. Iwai // Ann. Thorac. Surg. – 2007. – Vol. 83, №4. – P. 1501–1507.
13. Seto A. Improved tendon radioprotection by combined cross-linking and free radical scavenging / A. Seto, Jr, Ch Gatt, M. Dunn // Clin. Orthop. Relat. Res. – 2009. – Vol. 467, №11. – P. 2994–3001.
14. Schmidt C. E. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering / C. E. Schmidt, J. M. Baier // Biomaterials. – 2000. – Vol. 21, № 2. – P. 2215–2231.
15. Sterilization of health care products-radiation sterilization-substantiation of 25 KGray as a sterilization dose for small or infrequent production batches. TC198, ICS:11. 080. 01, ISO/TS13409:2002, International Organization for Standardization, 2002.
16. Teebken O. E. Tissue engineering of vascular grafts: human cell seeding of decellularised porcine matrix / O. E. Teebken, A. Bader, G. Steinhoff [et al.] // Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. – 2000. – Vol. 19, №4. – P. 381–386.

УДК 612.014.481+612.59]611.13.068

### **МОРФОЛОГІЧНИЙ СТАН ІЗОЛЬОВАНИХ АРТЕРІЙ ПІСЛЯ ГЛИБОКОГО ЗАМОРОЖУВАННЯ І ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЕННЯ**

**Тининика Л. М., Шевченко Є. В., Михайлова І. П., Сандомирський Б. П.**

**Резюме.** Вивчали вплив низьких температур і іонізуючого випромінювання на морфологічну структуру артеріальних судин свиней при створенні безклітинних ксеногенних судинних скафолдів. Для дослідження використовували внутрішньогрудні артерії безпородних статевозрілих свиней, які були розділені на 4 групи: нативні артерії; артерії, після впливу низьких температур; нативні опромінені артерії; артерії, після впливу низьких температур і опромінення. На підставі результатів гістологічного і гістохімічного дослідження було показано, що після кровопливу та впливу іонізуючого опромінення в клітинних елементах всіх шарів стінки артерії розвиваються переважно деструктивні зміни у вигляді некробіоза і некрозу гладких м'язових клітин, фібробластів, ендотеліоцитів з частковою деендотелізацією її інтими і vasa vasorum. У сполучнотканинному компоненті стінки артерії еластичні і колагенові волокна, внутрішня еластична мембрана в цілому зберігають своє просторове розташування і структурну цілісність, незважаючи на осередкову деформацію. Реакція на ДНП в ядрах ендотеліоцитів і гладких м'язових клітинах артерій свиней після кровопливу та опромінення негативна. Реакція на РНП в цитоплазмі ендотеліоцитів і гладких м'язових клітинах артерій свиней після кровопливу та опромінення негативна. При одночасному впливі глибокого заморожування і опромінення в стінках артерій спостерігаються виражені деструктивні зміни клітинних елементів з тотальним каріопікнозом і каріорексисом.

**Ключові слова:** кровоплив, іонізуюче випромінювання, девіталізація, морфологічний стан, безклітинні ксеногенні судинні скафолди.

УДК 612.014.481+612.59]611.13.068

### **МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ АРТЕРИЙ ПОСЛЕ ГЛУБОКОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ И ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

**Тыныныка Л. Н., Шевченко Е. В., Михайлова И. П., Сандомирский Б. П.**

**Резюме.** Изучали влияние низких температур и ионизирующего излучения на морфологическую структуру артериальных сосудов свиней при создании бесклеточных ксеногенных сосудистых скаффолдов. Для исследования использовали внутригрудные артерии беспородных половозрелых свиней, которые были разделены на 4 группы: нативные артерии; артерии, после воздействия низких температур; нативные облученные артерии; артерии, после воздействия низких температур и облучения. На основании результатов гистологического и гистохимического исследования было показано, что после криовоздействия и влияния ионизирующего облучения в клеточных элементах всех слоев стенки артерии развиваются преимущественно деструктивные изменения в виде некробіоза и некроза гладких мышечных клеток, фибробластов, эндотелиоцитов с частичной деэндоотелизацией ее интими и vasa vasorum. В соединительнотканном компоненте стенки артерии эластические и коллагеновые волокна, внутренняя эластическая мембрана в целом сохраняют свое пространственное расположение и структурную целостность, несмотря на очаговую деформацию. Реакция на ДНП в ядрах эндотелиоцитов и гладких мышечных клетках артерий свиней после криовоздействия и облучения отрицательная. Реакция на РНП в цитоплазме эндотелиоцитов и гладких мышечных клетках артерий свиней после криовоздействия и облучения отрицательная. При сочетанном воздействии глубокого замораживания и облучения в стенках артерий наблюдаются выраженные деструктивные изменения клеточных элементов с тотальным каріопікнозом и каріорексисом.

**Ключевые слова:** криовоздействие, ионизирующее излучение, девитализация, морфологическое состояние, бесклеточные ксеногенные сосудистые скаффолды.

UDC 612.014.481+612.59]611.13.068

### **Morphological State of Isolated Arteries Following Deep Freezing and Ionizing Irradiation**

**Tynnyuka L. N., Shevchenko E. V., Mikhailova I. P., Sandomirsky B. P.**

**Abstract.** Natural biological tissues are superior of synthetic one in very much. They show the best adhesive properties during subsequent endothelialization and promote endothelial growth as a basis for vascular scaffolds.

The purpose of this work is studying of influence of low temperatures and the ionizing radiation on morphological structure of arterial vessels of a pig at creation cell-free xenogenic vascular scaffolds.

The effect of low temperatures and ionizing irradiation on the morphological structure of porcine arterial vessels when producing cell-free xenogenic vascular scaffolds was studied in the work.

Intrathoracic arteries of outbred mature pigs were used in the experiments. The arteries were divided into 4 groups: native arteries; arteries exposed to the action of low temperatures; native irradiated arteries; arteries, exposed to the action of low temperatures and irradiation. The purified arteries were submerged into liquid nitrogen for further usage. The samples of the arteries were thawed at +37°C. Then they were irradiated at a dose of 25 kGray with a LUE-10 linear electron accelerator. General evaluation of the states of the tissues under study was done with hematoxylin and eosin staining. Wiegert staining of preparations with fuchselin for elastic fibers followed



by Van Gieson counterstaining with picrofusine were used for identification and differentiation of the connective tissue structures. Functional activities of the arterial tissues were evaluated with the help of histochemical methods: deoxynucleoproteids were identified with a Feulgen-Rossenbeck reaction, while ribonucleoproteids were detected with a Brachet method.

The results of the histological and histochemical studies testified to cryoexposure and ionizing irradiation to induce mainly destructive alterations in the cell elements of all the layers of the arterial wall, manifested by necrobiosis and necrosis of the smooth muscle cells, fibroblasts and endotheliocytes with partial deendothelization of its intima and vasa vasorum. Within a connective tissue component of the arterial wall the elastic and collagenic fibers and the inner elastic membrane altogether maintained their spatial location and structural integrity despite focal deformation. A response to DNA-proteids in the endotheliocyte nuclei and smooth muscle cells of porcine arteries following cryoexposure and irradiation was negative. A response to RNA-proteids in the endotheliocyte cytoplasm and smooth muscle cells of porcine arteries following cryoexposure and irradiation was also negative. Combined action of deep freezing and irradiation resulted in the manifested destructive alterations in the cell elements of the arterial walls with total karyopyknosis and karyorhexis. Prospects of the future researches are the fact that the use of the ionizing irradiation and the low temperatures in the complex of actions about devitalization of vascular xenogenic scaffolds at the future researches at the favorable results will be able to creation of low temperature bank of the biological vascular scaffolds.

**Key words:** cryoexposyre, ionizing irradiation, devitalization, morphological state, cell-free xenogenic vascular scaffolds.

*Рецензент – проф. Єрошенко Г. А.*

**Стаття надійшла 7. 10. 2013 р.**