

УДК 612.014.481+612.59]611.13.068

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

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков
Харьковский национальный медицинский университет

ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ И ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ЦЕЛОСТНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ АРТЕРИЙ

Изучали влияние низких температур и ионизирующего излучения на целостность клеточных элементов артериальных сосудов свиньи при создании бесклеточных ксеногенных сосудистых скаффолдов. Установили, что в клеточных элементах всех слоёв стенки артерии после замораживания происходят преимущественно деструктивные изменения в виде некробиоза и некроза гладких мышечных клеток, фибробластов, эндотелиоцитов с частичной дезэндотелизацией её интимы и *vasa vasorum*. При сочетанном воздействии замораживания и облучения в стенках артерий наблюдаются выраженные деструктивные изменения клеточных элементов с тотальным кариопикнозом и кариорексисом.

Ключевые слова: *кривовоздействие, ионизирующее излучение, бесклеточные ксеногенные сосудистые скаффолды.*

Вопрос о наличии адекватного сосудистого заменителя для артерий малого диаметра остаётся актуальным на сегодняшний день. В связи с этим для эффективного протезирования предимплантационная обработка сосудов должна включать снижение иммуногенности биоматериала, стабилизацию структуры ткани, сохранение адекватных механических свойств, стерилизацию биоматериала [1–6]. Современные методы девитализации ксеноартерий, как правило, основаны на продолжительной обработке ткани различными химическими агентами (детергентно-энзимными и консервирующими растворами). Их действие связано с разрушением клеточных и соединительнотканых элементов биообъекта, что приводит к снижению механической прочности и пролонгированной цитотоксичности, которая из-за кальциноза, тромбоза и фиброзирования ухудшает качество биопротезов. Как правило, это приводит к потере функциональных свойств протезов и необходимости реопераций [1, 6]. Эти эффек-

ты в значительной мере ограничивают внедрение «химических» методик в практику предимплантационной обработки сосудов. Нами был предложен принципиально новый подход к созданию девитализированных сосудистых ксенопротезов малого диаметра, включающих предимплантационную обработку биоматериала с использованием физических факторов (замораживание-отогрев, ионизирующее облучение) [2, 3, 7]. 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 явилось изучение влияния низких температур и ионизирующего излучения на целостность клеточных элементов артериальных сосудов свиньи при создании бесклеточных ксеногенных сосудистых скаффолдов.

© Л.Н. Тыныныка, Е.В. Шевченко, И.П. Михайлова и др., 2013

Материал и методы. Внутригрудные артерии (*a.thoracicus interna*) выделяли у беспородных половозрелых свиней с соблюдением правил биоэтики, утверждённых в ИПКиК и в соответствии с «Общими этическими принципами экспериментов на животных», одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (г. Киев) и согласованными с положением «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). Промытые артерии помещали в криоконтейнеры («Eurotubo, Deltalab», Испания) и погружали в жидкий азот (-196 °C), где и хранили до момента использования [7]. Максимальный срок хранения достигал 9 месяцев. Образцы артерий отогревали при +37 °C. Для проведения исследования артерии свиней были разделены на четыре группы по 10 особей в каждой: 1-я – контроль (нативные артерии – 10 *a.thoracicus int.*); 2-я – внутригрудные артерии после воздействия низких температур; 3-я – нативные облучённые артерии – 10 *a.thoracicus int.*); 4-я – внутригрудные артерии после воздействия низких температур и излучения. Образцы артерий облучали на базе Национального научного центра Харьковского физико-технического института НАН Украины с помощью линейного ускорителя электронов ЛУЭ-10 в дозе 25 кГр, при этом энергия облучения составляла до 10 МэВ, а средний ток – 1 мА [8]. Доза 25 кГр выбрана как минимально необходимая для обеспечения стерильности медицинских материалов [9].

Для оценки целостности клеточных элементов тканей артерий использовали комплекс гистохимических методик. Дезоксинуклеопротейды (ДНП) выявляли реакцией по Фельгену–Россенбеку (контроль – гидролиз с HCl). Рибонуклеопротейды (РНП) выявляли окрашиванием по методу Браше (контроль кристаллической рибонуклеазой) [10, 11]. Препараты, окрашенные гистохимическими методами, изучали на микроскопе Olympus BX-41 (Япония).

Результаты и их обсуждение. Изучение целостности тканевых элементов образцов нативных артерий *a. thoracicus int.* после замораживания (-196 °C), ионизирующего излучения и их сочетанного влияния пока-

зало, что в стенке артерий всех исследуемых групп чётко дифференцируются три оболочки: интима, медиа и адвентиция (рис. 1).

Внутренняя оболочка образцов нативных артерий (1-я группа) включает эндотелий, подэндотелиальный слой и сплетение эластических волокон, формирующих внутреннюю эластическую мембрану (рис. 1, *a*). Эндотелиальные клетки выстилают весь внутренний периметр сосудистой стенки. Клетки в образце нативной артерии имеют слабо выраженную реакцию на РНП. Ядра клеток округлые, базофильные, с умеренной реакцией на ДНП (рис. 2, *a*). Подэндотелиальный слой нативных артерий свиньи представлен немногочисленными фибробластами и гладкомышечными клетками с умеренно выраженной реакцией Фельгена–Россенбека в ядре и слабо выраженной реакцией Браше в цитоплазме (рис. 1, *a* и 2, *a*).

При замораживании до -196 °C внутригрудных артерий свиньи (2-я группа) эндотелиальная выстилка интимы характеризуется обширными полями десквамации клеток. Фибробласты и гладкие мышечные клетки исследуемых образцов визуализируются с пикнотически сморщенными палочковидными ядрами, слабо или умеренно выраженной реакцией Фельгена–Россенбека в ядре и отрицательной реакцией Браше в цитоплазме (рис. 1, *б* и 2, *б*).

При воздействии ионизирующего излучения и сочетанного его влияния с замораживанием (3-я и 4-я группы) внутренняя оболочка артерий на всем протяжении лишена эндотелиальной выстилки. Ориентация гладких мышечных клеток по отношению к эластическим мембранам меняется с косой на продольную. Ядра клеток вытянутые, деформированные, реакция на ДНП в них слабо выражена или негативная (рис. 1, *в* и *г*). Реакция на РНП в цитоплазме отрицательная (рис. 2, *в* и *г*). Эластические мембраны медиа, соединённые эластическими волокнами, визуализируются со снижением извитости, чёткими гладкими контурами, правильно ориентированы. Между ними встречаются немногочисленные фибробласты со сморщенным базофильным ядром, где реакция на ДНП выражена слабо.

При сочетанном влиянии ионизирующего излучения в дозе 25 кГр и замораживания

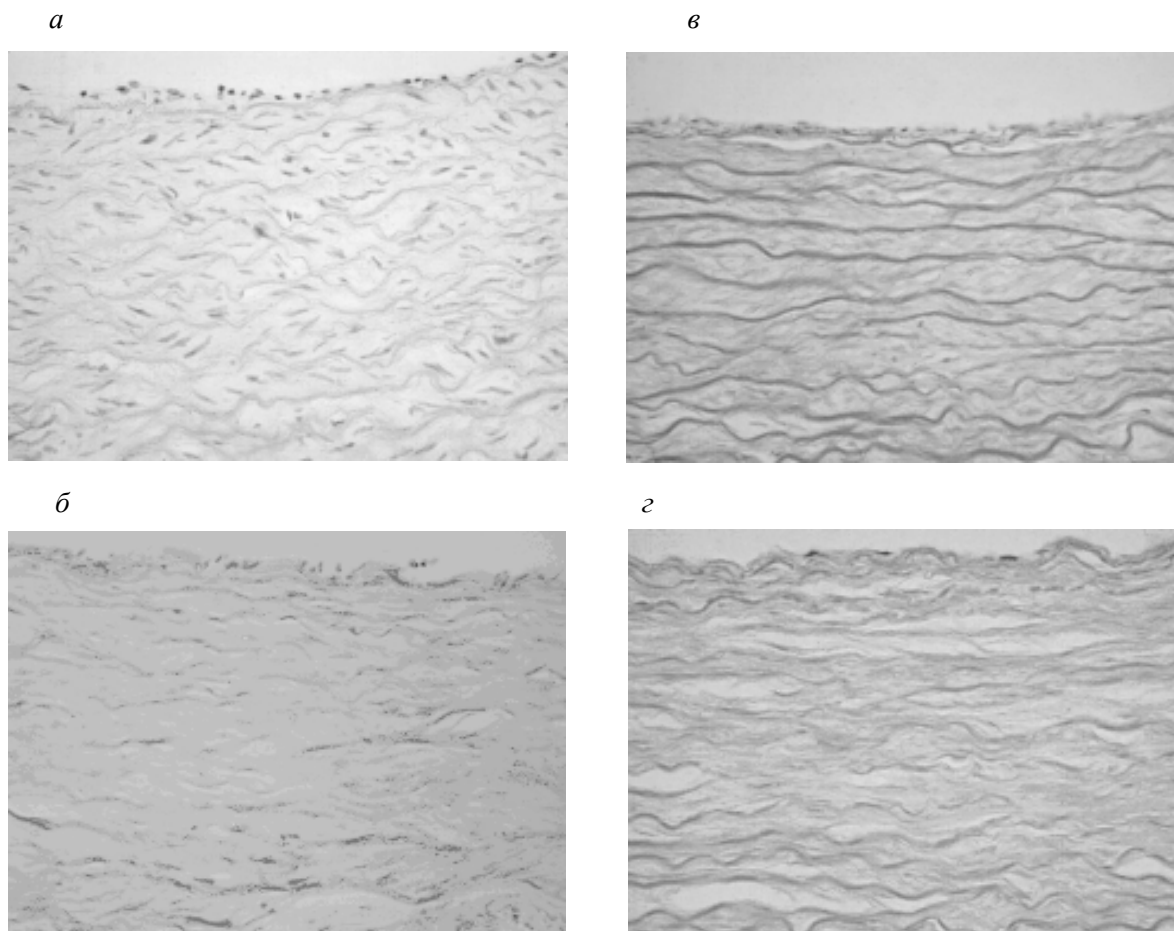


Рис. 1. Реакция на дезоксиинуклеопротеиды (ДНП) в ядрах эндотелиоцитов и гладких мышечных клетках артерии свиньи:

- 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 Фельгена–Россенбека, $\times 400$

(-196°C) внутренняя эластическая мембрана визуализируется как непрерывная, с чёткими гладкими контурами, без очаговых повреждений, местами извитость её несколько сглажена (рис. 1, *г*). Гладкие мышечные клетки ориентированы продольно по отношению к эластическим мембранам. Ядра гладких мышечных клеток и немногочисленных фибробластов деформированы, с признаками кариопикноза и кариорексиса с негативной реакцией Фельгена–Россенбека (рис. 1, *г*). Реакция Браше при этом не определяется вообще (рис. 2, *г*). Клеточные элементы, расположенные между фибробластами и гладкомышечными клетками, визуализируются с пикнотичными или сегментированными ядрами со слабой интенсивностью реакции на ДНП в ядрах и отрицательной реакцией на РНП в

цитоплазме (рис. 1, *г* и 2, *г*). Сосуды средней и наружной оболочек лишены эндотелиальной выстилки, просветы их выглядят оптически пустыми или содержат небольшое количество гемолизата.

Под влиянием ионизирующего излучения эластическая мембрана нативных артерий (3-я группа) чётко контурируется как гладкая, со снижением извитости, изредка с мелкими очагами разрыхления и поверхностными дефектами (рис. 1, *в*). Извитость эластических мембран несколько сглажена. Гладкие мышечные клетки ориентированы параллельно эластическим мембранам. Клеточные элементы гладких мышечных клеток и фибробластов слабо базофильны, деформированы, в состоянии кариопикноза и кариорексиса. Реакция Фельгена–Россенбека в ядрах клеток

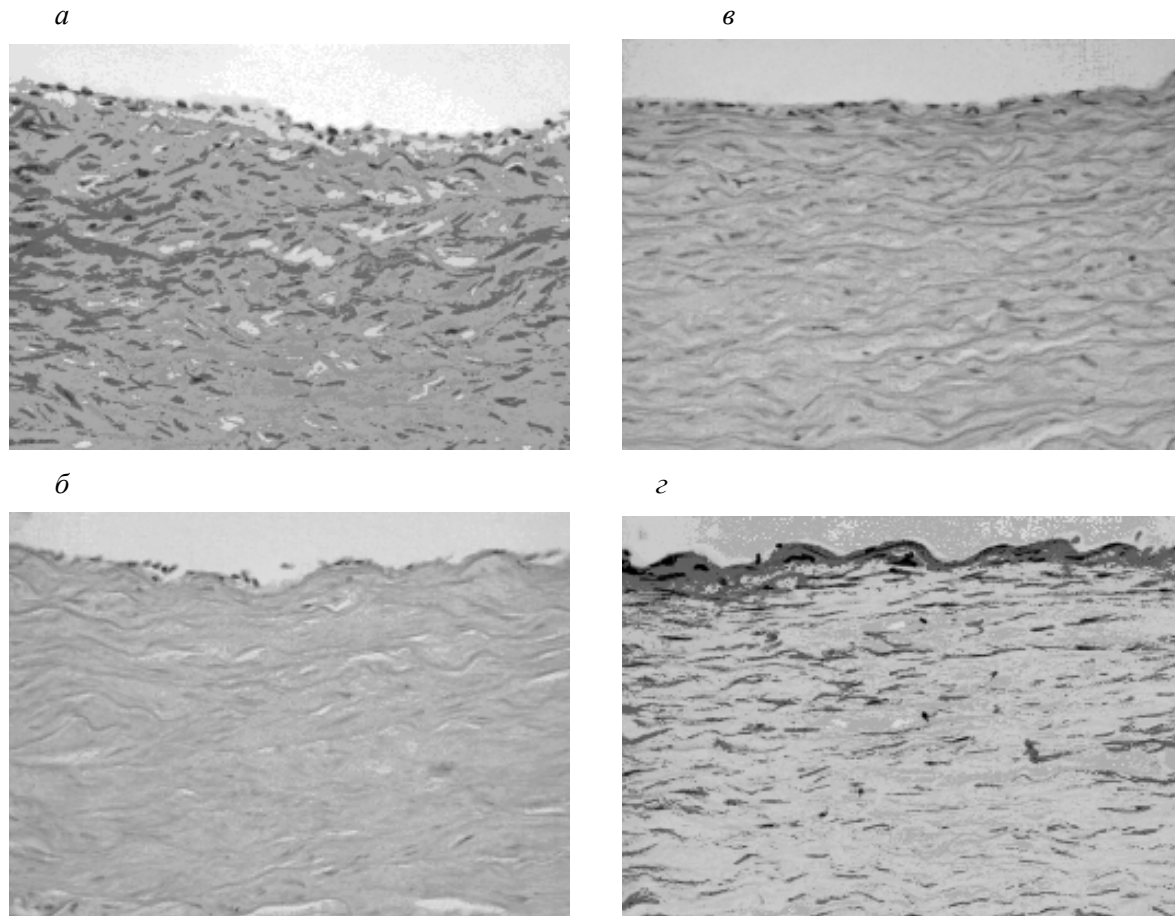


Рис. 2. Реакция на рибонуклеопротеиды (РНП) в цитоплазме эндотелиоцитов и гладких мышечных клетках артерии свиньи: а – г – те же, что и на рис. 1

меди́ слабо выражена или негативная, реакция Браше в цитоплазме не определяется (рис. 1, в и 2, в). Собственные сосуды стенки артерий после действия ионизирующего излучения в дозе 25 кГр лишены эндотелиальной выстилки, просветы их заполнены гемолизированными форменными элементами крови.

Таким образом, на основании результатов гистохимического исследования сосудистой стенки артерий под влиянием таких физических факторов, как ионизирующее излучение в дозе 25кГр, замораживание и их сочетанное воздействие, было показано, что в клеточных элементах всех слоёв стенки артерий развиваются преимущественно деструктивные изменения в виде некробиоза и некроза гладких мышечных клеток, фибробластов, эндотелиоцитов с частичной деэндотелизацией её интимы и *vasa vasorum*. При сочетанном воздействии замораживания и облучения

в стенках артерий наблюдаются выраженные деструктивные изменения клеточных элементов с тотальным кариопикнозом и кариорексисом.

Выводы

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

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

В клеточных элементах всех слоёв стенки артерии после замораживания развиваются преимущественно деструктивные изменения

в виде некробиоза и некроза гладких мышечных клеток, фибробластов, эндотелиоцитов с частичной деэндотелизацией её интимы и *vasa vasorum*.

При сочетанном воздействии замораживания и облучения в стенках артерий наблюдаются выраженные деструктивные изменения клеточных элементов с тотальным карипикнозом и карioreксисом.

Перспективы дальнейших исследований заключаются в том, что использование ионизирующего излучения и низких тем-

ператур в комплексе мероприятий по девитализации сосудистых ксенопротезов при дальнейшем их изучении и благоприятных результатах позволит перейти к созданию низкотемпературного банка биологических сосудистых протезов.

Авторы выражают благодарность докт. мед. наук, профессору Харьковского национального медицинского университета И.В. Сорокиной и лаборанту О.В. Виноград за помощь в морфологической оценке полученных результатов.

Список литературы

1. 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. Биотехнологические аспекты создания трансплантатов артерий / Д.В. Бызов, О.П. Сыникова, Е.Н. Пушкова [и др.] // Биотехнологія. – 2010. – Т. 3, № 3. – С. 21–30.
3. 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.
4. Tissue engineering of recellularized small-diameter vascular grafts / G.H. Borschel, Y.C. Huang, S. Calve [et al.] // Tissue Eng. – 2005. – Vol. 11, № 5–6. – P. 778–786.
5. 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.
6. 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.
7. Пат. 68379 Україна, МПК А61L 27/00, А01N1/02. Спосіб підготовки ксеногенних артерій для судинного протезування / Сандомирський Б.П., Бизов Д.В., Михайлова І.П. [та ін.]; заявитель и патентообладатель ИПКиК НАНУ; № u201110193; заявл. 19.08.2011; опубл. 26.03.12, Бюл. № 6.
8. 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. Сер. Ядерно-физические исследования. – 2008. – Т. 50, № 5. – С. 150–154.
9. Sterilization of health care products-radiation sterilization-substantiation of 25 кGray as a sterilization dose for small or infrequent production batches. TC198, ICS:11.080.01, ISO/TS13409:2002, International Organization for Standardization, 2002.
10. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Под ред. Р. Лилли. – М.: Мир, 1960. – 648 с.
11. Пирс Э. Гистохимия (теоретическая и прикладная) / под ред. Э. Пирс – М.: Иностран. лит-ра, 1962. – 962 с.

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

ВПЛИВ ЗАМОРОЖУВАННЯ Й ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА ЦІЛІСНІСТЬ КЛІТИННИХ ЕЛЕМЕНТІВ АРТЕРІЙ

Вивчали вплив низьких температур і іонізуючого випромінювання на цілісність клітинних елементів артеріальних судин свині при створенні безклітинних ксеногенних судинних скаффолдів. Показано, що в клітинних елементах всіх шарів стінки артерії після заморожування відбуваються переважно деструктивні зміни у вигляді некробиозу і некрозу гладких м'язових кліток, фібробластів, ендотеліоцитів з частковою деендотелізацією її інтими і *vasa vasorum*. При поєднаній дії

заморожування і опромінення в стінках артерій спостерігаються виражені деструктивні зміни клітинних елементів з тотальним каріопікнозом і каріорексисом.

Ключові слова: *кріо вплив, іонізуюче випромінювання, безклітинні ксеногенні судинні скафолди.*

L.N. Tynunika, E.V. Shevchenko, I.P. Mikhailova, B.P. Sandomirsky, O.V. Naumova

INFLUENCE OF FREEZING AND IONIZING IRRADIATION ON INTEGRITY OF THE CELLULAR ELEMENTS OF ARTERIES

The effect of low temperatures and ionizing irradiation on the integrity of the cellular elements of porcine arterial vessels when producing cell-free xenogenic vascular scaffolds was studied. The results of the 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. 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.

Key words: *cryoexposure, ionizing irradiation, cell-free xenogenic vascular scaffolds.*

Поступила 22.10.13