

Ультраструктура артерий после девитализации низкими температурами и ионизирующим облучением

UDC 57.085.2:615.832.9

D.V. BYZOV*, N.V. REPIN, L.N. MARCHENKO, T.P. GOVORUKHA,
I.P. MIKHAYLOVA, O.P. SYNCHIKOVA, B.P. SANDOMIRSKY

Ultrastructure of Arteries after Devitalization with Low Temperatures and Ionizing Irradiation

В работе представлены результаты электронной микроскопии артерий малого диаметра после криообработки и ионизирующего облучения. Показано, что комбинированное действие замораживания-отогрева и последующего облучения потоком электронов приводит к полной девитализации сегментов артерий с сохранением соединительнотканного каркаса.

Ключевые слова: девитализация, сосудистые скаффолды, биологические сосудистые протезы.

У роботі представлені результати електронної мікроскопії артерій малого діаметра після криообробки та іонізуючого опромінення. Показано, що комбінована дія заморожування-відігрівання і подальшого опромінення потоком електронів призводить до повної девіталізації сегментів артерій із збереженням сполучнотканинного каркаса.

Ключові слова: девіталізація, судинні скаффолди, біологічні судинні протези.

The report represents the data of electron microscopic study of small-diameter arteries following cryotreatment and ionizing irradiation. Combination of freeze-thawing with following irradiation by electron beam was shown to result in a complete devitalization of arteries while maintaining the connective-tissue frame intact.

Key words: devitalization, vascular scaffolds, biological vascular prostheses.

В настоящее время существует проблема дефицита сосудистых графтов для аортокоронарного шунтирования и протезирования периферических артерий. Аутогенные сосуды часто недоступны ввиду их ограниченного количества или вовлечения в патологический процесс, а синтетические протезы непригодны для такого рода операций. Как альтернативу было предложено наносить слой эндотелия на искусственные полимерные протезы, что увеличивает биосовместимость конструкции и значительно снижает риск тромбообразования и рестенозов полимеров. Несмотря на лучшую проходимость, эндотелизированные протезы обеспечивают эффективную гемодинамику в течение 3–5 лет менее чем в 50% случаев [1]. Перспективно использовать в качестве сосудистых скаффолдов девитализированные ксеногенные ткани [8, 12, 15]. Большинство предлагаемых методов девитализации основаны на применении различных комбинаций детергентно-энзимных растворов [10], что обуславливает недостаточную механическую прочность полученных скаффолдов [5, 6, 14] и может вызывать формирование аневризматических расширений. Кроме того, использование цитотоксических веществ повышает тромбогенность

Nowadays there is a problem of the shortfall of vascular grafts for aortocoronary bypass surgery as well as prosthetics of peripheral arteries. Autogenic vessels are often unavailable because of their limited number or involvement into pathological process, and synthetic prostheses are not valid for such surgeries. The application of epithelium layer to artificial polymer prostheses for increasing the biocompatibility of the construct and significant reduction of the risk of both thrombus formation and polymer re-stenoses was proposed as an alternative. In spite of better patency the endothelized prostheses provide an effective blood circulation for 3–5 years less than in 50% of cases [1]. The use of devitalized xenogenous tissues as vascular scaffolds can be a promising issue [8, 12, 15]. The majority of the proposed devitalization methods is based on the application of different combinations of detergent-enzyme solutions [10], stipulating an insufficient mechanical strength of the resulted scaffolds [5, 6, 14] and can cause the formation of aneurismal dilatations. In addition, the use of cytotoxic substances increases the thrombogenicity and complicates following endothelization of biological scaffolds [11, 13]. The known methods of chemical devitalization do not achieve the combination of elasticity, mechanical strength and re-

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 372-74-35, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта:
altei@ukr.net

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 372 7435, fax: +380 57 373 3084, e-mail: altei@ukr.net

и осложняет последующую эндотелизацию биологических скаффолдов [11, 13]. Известные методы химической девитализации не позволяют достичь сочетания эластичности, механической прочности и устойчивости к ранней биодеградации полученных ксенотрансплантатов [5]. Поэтому все большее внимание уделяется разработке методов девитализации с использованием физических факторов [9, 13], которые позволяют снизить иммуногенность ксеногенной ткани и обеспечить сохранность механической прочности артерий.

В работах [2, 3, 7] представлены данные оптической микроскопии и результаты оценки биомеханических характеристик сосудов малого диаметра после комбинированного действия низких температур и ионизирующего облучения.

Цель работы – изучить ультраструктуру артериальной стенки на основных этапах девитализации.

Материалы и методы

Эксперименты проведены в соответствии с “Общими принципами экспериментов на животных”, одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2007) и согласованными с положениями “Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1986). Объектом исследования были внутригрудные артерии свиньи, которые после выделения и препарирования трижды промывали охлажденным до 4°C физиологическим раствором с добавлением: 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина, 6 мг/мл флуконазола. После промывания часть артерий подвергали облучению электронами на установке ЛУЭ-2000 по двум экспериментальным режимам (“изолированное облучение”), различающихся величиной поглощенной дозы ($D_1 = D_2/2$). Оставшиеся артерии после удаления остатков промывочного раствора с поверхности и просвета сосудов помещали в стерильные криостойкие контейнеры (“Eurotubo”, “Deltalab”, Испания), которые погружали в пары жидкого азота. После отогрева на водяной бане при температуре 37°C сосуды также подвергали облучению электронами по двум указанным режимам. В процессе облучения температуру артерий постоянно контролировали (не более 25°C). Временной интервал с момента отогрева артерий до облучения не превышал 90 мин.

Для проведения электронно-микроскопических исследований образцы фиксировали по стандартной методике [4]. Ультраструктуру сосудистой стенки исследовали с помощью электронного микроскопа ПЭМ-125К (Россия) при ускоряющем напряжении 75 кВ, снабженного системой съемки и анализа изображения САИ-01А (АО “SELMI”,

sistance to early biodegradation of the obtained xenografts [5]. Therefore, more attention is paid to the developing of devitalization methods using physical factors [9, 13], enabling to reduce immunogenicity of xenogenous tissue and provide the integrity of mechanical strength of arteries.

In the reports [2, 3, 7] the light microscopy data, as well as the results of assessment of biomechanical characteristics of small diameter vessels after a combined effect of low temperatures and ionizing irradiation are presented.

The aim of this research was to investigate the ultrastructure of arterial wall at main stages of devitalization.

Materials and methods

The experiments were carried-out in the accordance with General principles of the experiments in animals, approved by the 3rd National Congress in Bioethics (2007, Kiev) and coordinated with the statements of European Convention about the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (Strasbourg, 1986). The research object were porcine intrathoracic arteries, which after isolation and preparation were thrice washed with a cooled down to 4°C physiological solution supplemented with 100 IU/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin and 6 mg/ml fluconazole. After washing the part of vessels were subjected to the irradiation with electrons using LUE-2000 device according to two experimental regimens (‘separate irradiation’), differing by the amount of absorbed dose ($D_1 = D_2/2$). The surface and lumen of remained arteries were cleaned from the rests of washing solution and the arteries were placed into sterile cryostable containers (Eurotubo, Deltalab, Spain), which were plunged into liquid nitrogen vapors. After thawing in water bath at 37°C the vessels were also subjected to the irradiation according the mentioned two experimental regimens. During irradiation the temperature of arteries was constantly controlled (below 25°C). The time interval from the moment of thawing of arteries prior to irradiation did not exceed 90 min.

To perform electron microscopy studies the samples were fixed according to the standard methods [4]. Ultrastructure of vascular wall was investigated by means of electron microscope PEM-125K (Russia) at 75 kV accelerating voltage, adjusted with the recording system and analyzer of images SAI-01A (JSC SELMI, Ukraine), using CCD camera DX-2 (Germany) and the KAPPA software (Germany).

Results and discussion

According to the data of electron microscopy the freezing down to -196°C and following thawing of porcine arteries resulted in significant loosening and endothelium focus desquamation. In preserved endotheliocytes we observed nuclei swelling, destruction of

г. Сумы), с использованием CCD камеры DX-2 (Германия) и пакета программ фирмы "КАРРА" (Германия).

Результаты и обсуждение

По данным электронно-микроскопического исследования замораживание до -196°C и последующий отогрев артерий свиньи приводили к значительному разрыхлению и очаговой десквамации эндотелия. В сохранившихся эндотелиоцитах наблюдали набухание ядер, деструкцию органелл и разрывы цитолеммы. Базальная мембрана (БМ), располагающаяся под эндотелием, в основном сохранялась. Подэндотелиальный слой характеризовался наличием рыхлой тонкофибриллярной соединительной ткани, большей частью гидратированной, о чем свидетельствовали электронно-светлые полости в нем (рис. 1).

Структура ВЭМ, а также эластических мембран меди артерии сохранена (рис. 2). Коллагеновые волокна (КВ), располагающиеся между эластическими мембранами (ЭМ) и гладкомышечными клетками (ГМК), не имели грубых структурных нарушений. Однако для ГМК были характерны изменения формы и ультраструктуры ядер, отсутствие инвагинаций кариолеммы, а разрыхления гетерохроматина свидетельствовали о набухании ядер (рис. 3, 4).

Цитоплазма ГМК вакуолизирована, митохондрии имели значительно просветленный матрикс без крист (рис. 3). Цитолеммы ГМК были сохранены, при этом отмечался очаговый лизис их базальных мембран.

Нарушения структуры зоны соединения коллагеновых волокон и эластических мембран не наблюдались (рис. 5).

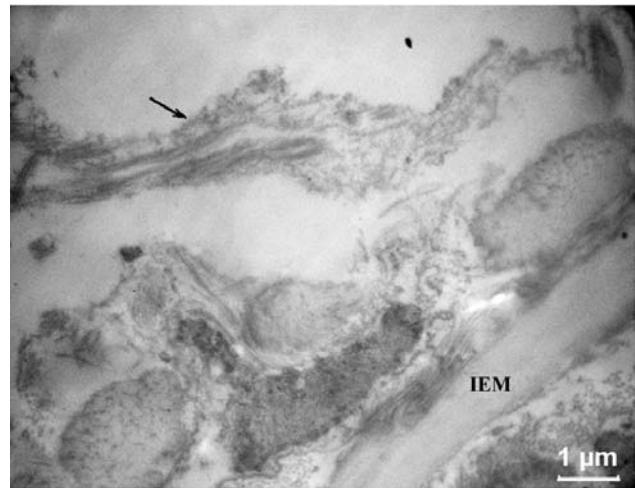


Рис 1. Фрагмент внутренней оболочки артерии после замораживания-отогрева; стрелкой обозначена БМ; IEM – внутренняя эластическая мембрана.

Fig. 1. Fragment of artery inner membrane after freeze-thawing; BM is marked with an arrow; IEM – inner elastic membrane.

organelles and ruptures of cytolemma. Basal membrane (BM) located beneath epithelium was mainly preserved. Sub-endothelial layer was characterized with the presence of loosened thin fibrillary connective tissue, which was mainly hydrated, that was confirmed by present electron-light cavities inside (Fig. 1).

Structure of IEM as well as the elastic membranes of artery tunica media was preserved (Fig. 2). Collagen fibers (CF) located between elastic membranes (EM) and smooth muscle cells (SMC) had no rough structural disorders. However, the SMC were characterized by changed shape and ultrastructure of nuclei, absence of karyolemma invaginations, and loos-

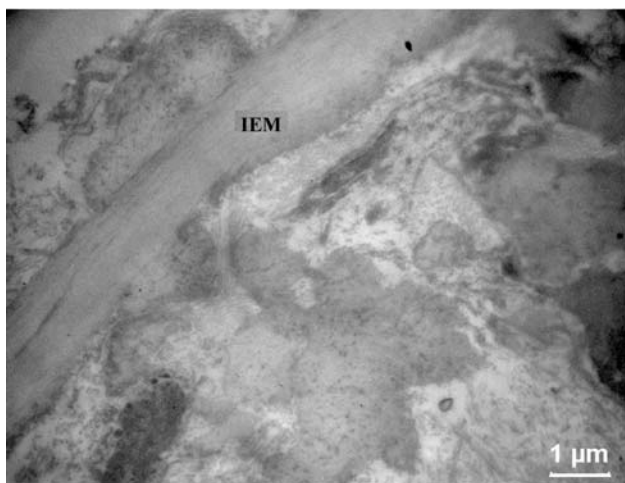


Рис 2. Сохранность структуры ВЭМ (IEM) после замораживания-отогрева артерии.

Fig. 2. Preserved structure of IEM after freeze-thawing of artery.

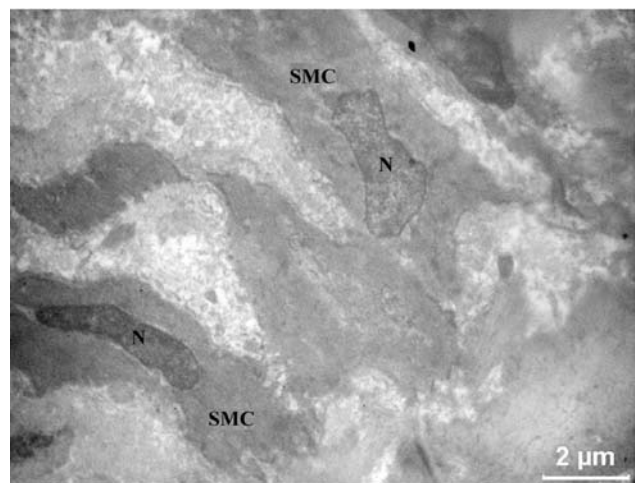
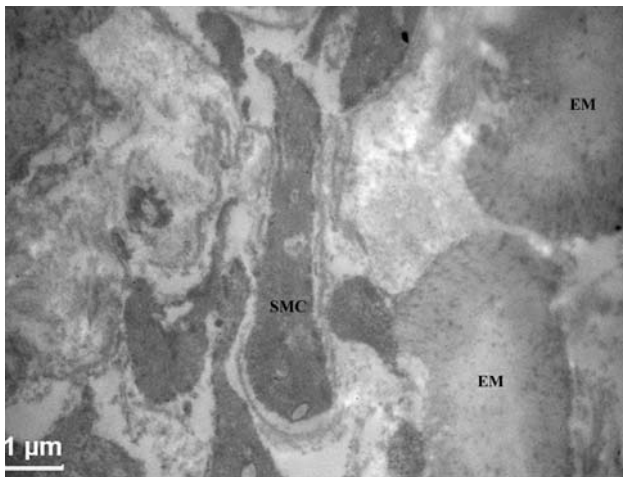
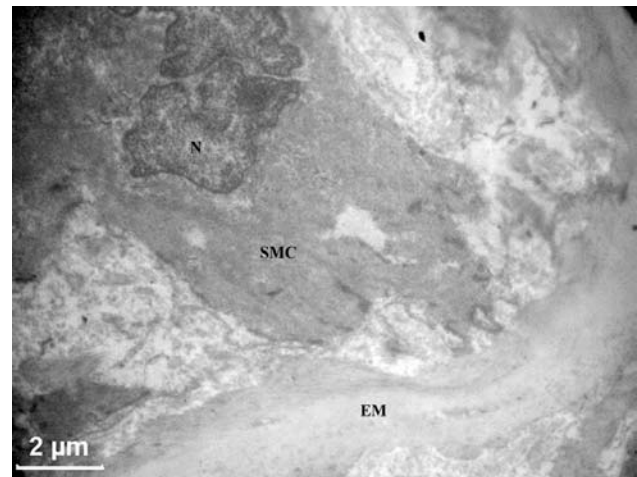


Рис 3. Структура ГМК (SMC) после замораживания-отогрева артерии; N – ядро.

Fig. 3. Structure of SMC after freeze-thawing of artery. N – nucleus.



a



a

б

b

Рис. 4. Криповреждение ГМК (SMC) меди артерии после замораживания-отогрева: а – фрагментация клеток, набухание митохондрий; б – набухание и фрагментация ядра (N), очаговый лизис базальной мембраны и цитолеммы; EM – эластическая мембрана.

Fig. 4. Cryodamage of SMC of artery tunica media after freeze-thawing of artery: a – cell fragmentation, mitochondria swelling; b – swelling and fragmentation of nucleus (N), focus lysis of basal membrane and cytolemma.

Следует отметить, что наличие очагов сохранившейся эндотелиальной выстилки и остатков ГМК в сосудистой меди после криовоздействия не свидетельствует о полной девитализации ткани и может вызвать иммуногенные реакции при трансплантации.

Электронно-микроскопическое исследование структуры артерии свиньи после “изолированного” облучения по двум режимам свидетельствовало о глубоких деструктивных изменениях клеточных компонентов тканей вне зависимости от величины используемой дозы облучения. В обоих случаях практически весь эндотелиальный слой был подвержен десквамации. В большей части отслоившихся эндотелиальных клеток выявлены явные признаки деструкции (рис. 6). Подэндотелиальный слой представлен рыхлой соединительной тканью, содержащей разволокненные КВ.

В структуре меди эластические мембраны и коллагеновые волокна после “изолированного” облучения в основном сохранялись (рис. 7). Ядра ГМК содержали гетерохроматин высокой электронной плотности вдоль кариолеммы, а также расширенное перинуклеарное пространство. Цитоплазма подвергалась вакуолизации, особенно на периферии клеток. Для митохондрий характерны признаки набухания, деструкции крист и просветления матрикса. Цистерны эндоплазматического ретикулума (ЭПР) расширены, особенно в околоядерной зоне (рис. 8, б).

Наблюдались очаговый лизис плазмолеммы и фрагментация базальных мембран ГМК. Необходимо отметить, что после “изолированного” облучения по режиму 1 в меди артерии обнаруживалось значительное количество сильно разрушенных

енинг of heterochromatin, testified to nuclei swelling (Fig. 3, 4).

Cytoplasm of SMC was vacuolized, mitochondria had significantly enlightened matrix with no cristas (Fig. 3). Cytolemmas of SMC were preserved, and there was found a focus lysis of their basal membranes.

No damages of the junction zone structure in collagen fibers and elastic membranes were observed (Fig. 5).

It should be noted that the presence of partially preserved endothelial bed and rests of SMC in tunica media after cryoeffect do not testify to a complete tissue devitalization, and can provoke immunological reactions after transplantation.

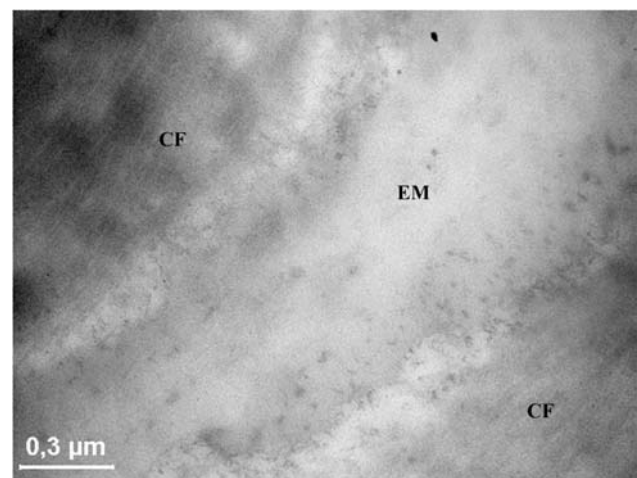
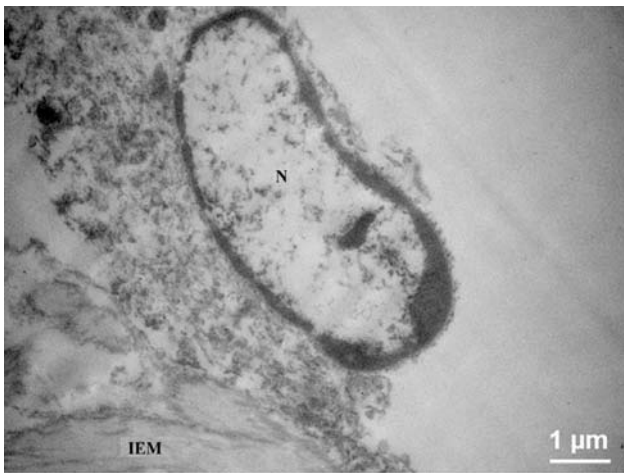
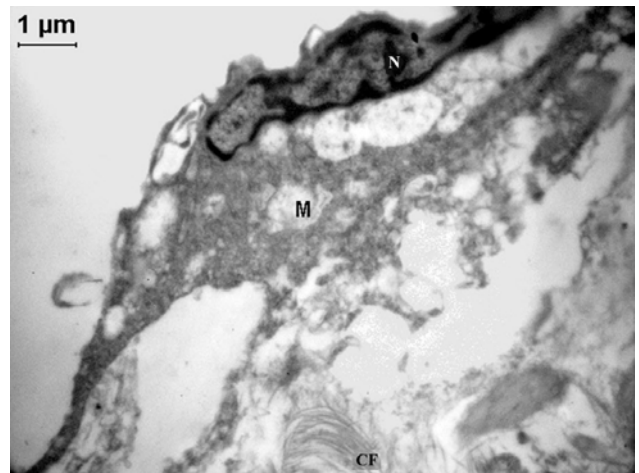


Рис. 5. Ультраструктура участка соединения КВ (CF) и ЭМ (EM) после замораживания-отогрева.

Fig. 5. Ultrastructure of the junction site of CF and EM after freeze-thawing.



а



б

Рис. 6. Ультраструктура эндотелия артерии после “изолированного” облучения в режимах 1 (а) и 2 (б). Отрыв эндотелиоцитов от базальной мембраны; N – ядро; IEM – ВЭМ; CF – КВ; М – митохондрия.

Fig. 6. Ultrastructure of artery endothelium after ‘separate’ irradiation on regimens 1 (a) and 2 (b). Separation of endotheliocytes from basal membrane; N – nucleus; M – mitochondria.

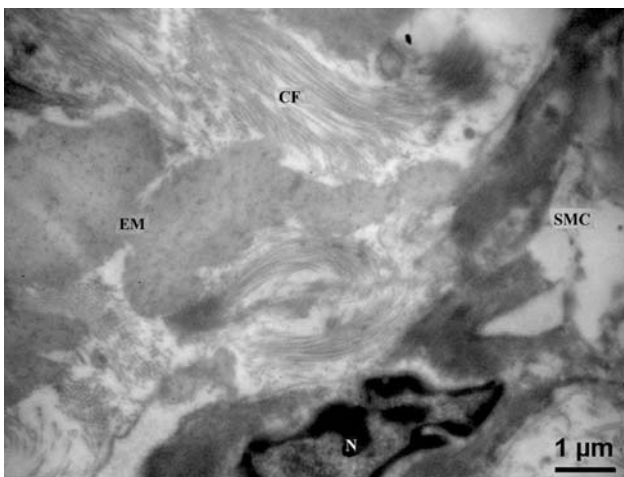
ГМК и больших электронно-светлых полостей, содержащих клеточный детрит (рис. 8, а). Зоны прикрепления коллагеновых волокон к эластическим мембранам практически не повреждены (рис. 9).

Анализ состояния артериальной стенки после сочетанного воздействия замораживания-отогрева и последующего облучения по одному из двух режимов, различающихся величиной дозы, не выявил существенной разницы в их ультраструктуре. Эндотелиальный слой в этих образцах полностью отсутствовал. Базальная мембрана преимущественно сохранена (рис. 10).

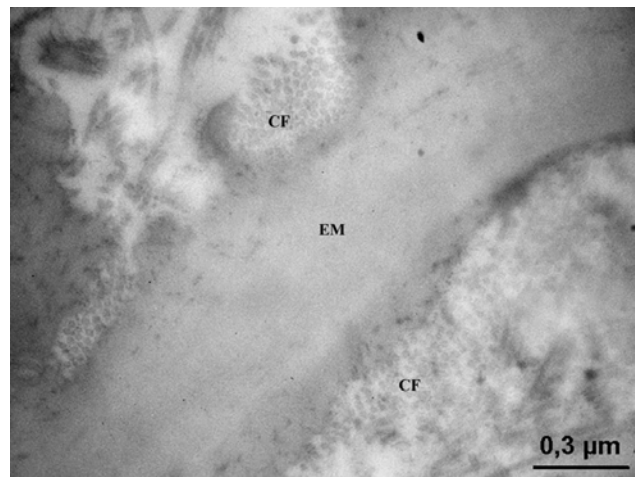
Подэндотелиальный слой состоял из рыхлой соединительной ткани, содержащей диссоциированные пучки КВ и скопления аморфного эластина. Выявлена деструкция клеточных элементов

Electron microscopy study of the porcine artery after ‘separate’ irradiation according to two regimens testified to deep destructive changes of cell components of the tissues not depending on the value of the used irradiation dose. In both cases almost entire endothelial layer was desquamated. In the major part of exfoliated endothelial cells the signs of destruction were evident (Fig. 6). Sub-endothelial layer was represented by a loosened connective tissue, containing unfibred CF.

In tunica media structure the elastic membranes and collagen fibers were mainly preserved after ‘separate’ irradiation according to two regimens (Fig. 7). SMC nuclei contained heterochromatin of a high electron density along the karyolemma as well as widened perinuclear space. Cytoplasm was vacuolized, especially on cell periphery. The signs of swelling, destruct-



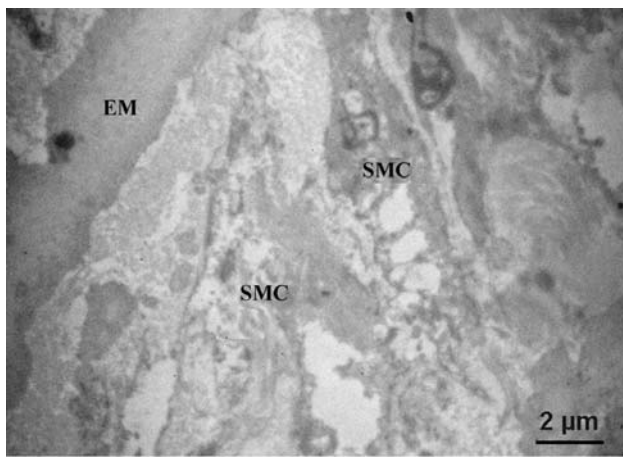
а



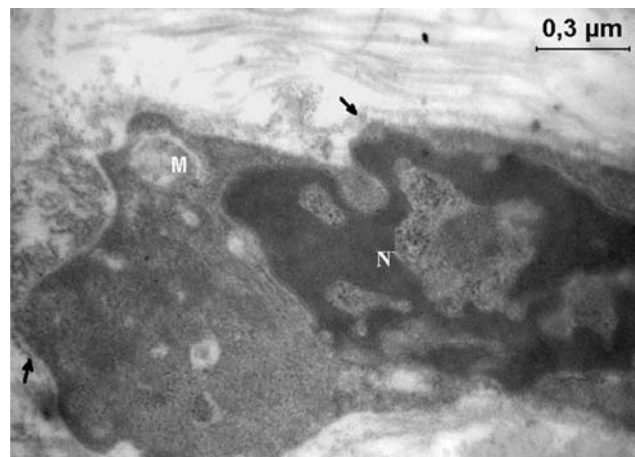
б

Рис. 7. Высокая степень сохранности структуры ЭМ (EM) и КВ (CF) после “изолированного” облучения по режиму 2; N – ядро; SMC – ГМК.

Fig. 7. High preservation degree of EM and CF structure after ‘separate’ irradiation according to the regimen 2; N – nucleus.



а



б

Рис. 8. Структура меди артерии после “изолированного” облучения по режиму 2: а – деструкция ГМК (SMC), расположенных между двумя ЭМ; б – типичные изменения ультраструктуры миоцита (вакуолизация цитоплазмы, истончение цитоплазматического слоя, контакт ядра (N) с базальной мембраной ГМК (стрелка)); ЭМ – эластическая мембрана; М – митохондрия.

Fig. 8. Structure of artery media after ‘separate’ irradiation according regimen 2: a – destruction of SMC, located between EM; b – typical changes of myocyte ultrastructure (cytoplasm vacuolization, thinning of cytoplasm layer, contact of nucleus (N) with basal membrane of SMC (arrow)); M – mitochondria.

этого слоя, проявившаяся в виде разрушения ядер и цитоплазматических органелл эндотелиоцитов (рис. 11). Внутренняя эластическая мембрана сохраняла свою целостность.

Для ГМК, находящихся на разных участках меди, характерна неодинаковая степень структурных повреждений. Часть ГМК содержала отростчатые ядра с маргинальным расположением хроматина, просветлением кариоплазмы и различными включениями, которые, вероятно, являются результатом структурной модификации ДНК под действием ионизирующего облучения (рис. 12).

tion of cristas and matrix enlightening were characteristic for mitochondria. Cisterns of endoplasmic reticulum (EPR) were widened, especially in the perinuclear zone (Fig. 8b).

There was observed a focus lysis of plasmolemma and fragmentation of SMC basal membranes. It should be noted that after ‘separate’ irradiation according the regimen 1 in artery media there was found a significant amount of strongly destroyed SMC and large electron-light cavities, containing cell dendrites (Fig. 8a). The zones of collagen fibers' attachment to elastic membranes were almost not damaged (Fig. 9).

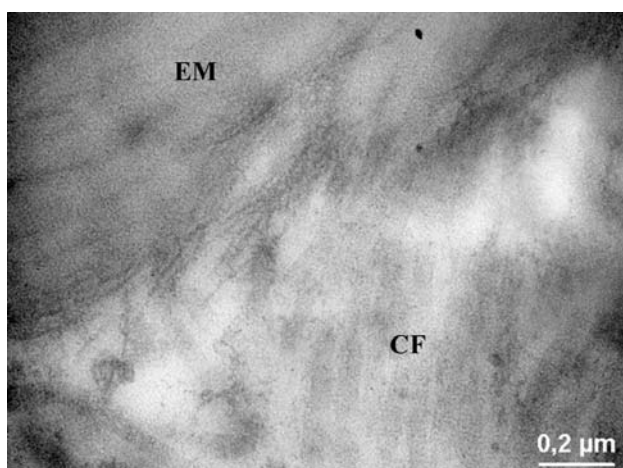


Рис. 9. Сохранность структуры ЭМ (EM) и КВ (CF) после “изолированного” облучения по режиму 1.

Fig. 9. Preserved EM and CF structure after ‘separate’ irradiation according to the regimen 1.

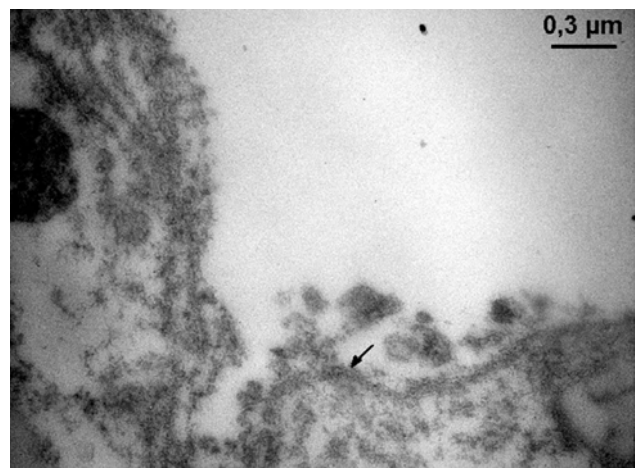
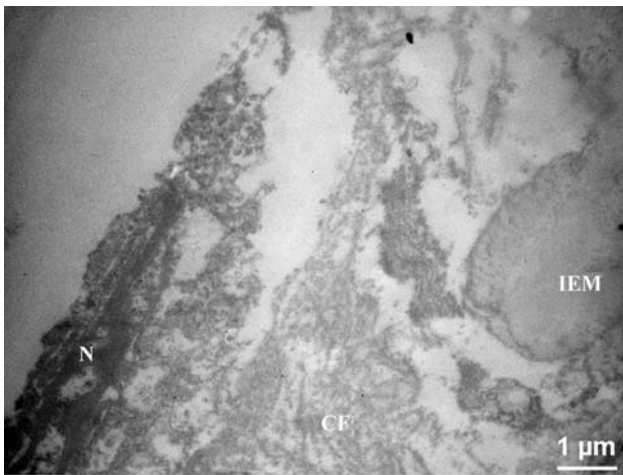
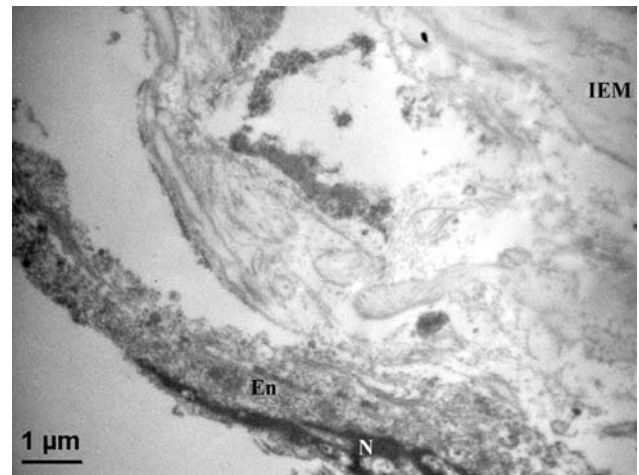


Рис. 10. Сохранность базальной мембраны эндотелия (стрелка) после его десквамации после замораживания и облучения по режиму 1.

Fig. 10. Preserved basal membrane of endothelium (arrow) after its desquamation after freezing and irradiation according to the regimen 1.



a



б

Рис. 11. Ультраструктура эндотелия и подэндотелиального слоя после замораживания-отогрева и облучения по режимам 1 (а) и 2 (б); N – ядро; IEM – ВЭМ; CF – КВ; EM – ЭМ.

Fig. 11. Ultrastructure of endothelium and sub-endothelial layer after freeze-thawing and irradiation according to the regimens 1 (a) and 2 (b); N – nucleus.

В околоядерной зоне вакуолизированной цитоплазмы определялись расширенные цистерны ЭПР и набухшие просветленные митохондрии с частичной или полной утратой ими крист (рис. 13). Следует отметить, что в этих клетках сохранялась целостность цитолеммы, а их базальные мембраны были фрагментированы.

В средней части медики между соседними эластическими мембранами обнаруживались обширные электронно-светлые полости с фрагментами разрушенных ГМК (рис. 14). Эластические мембраны и пучки коллагеновых волокон экстрацел-

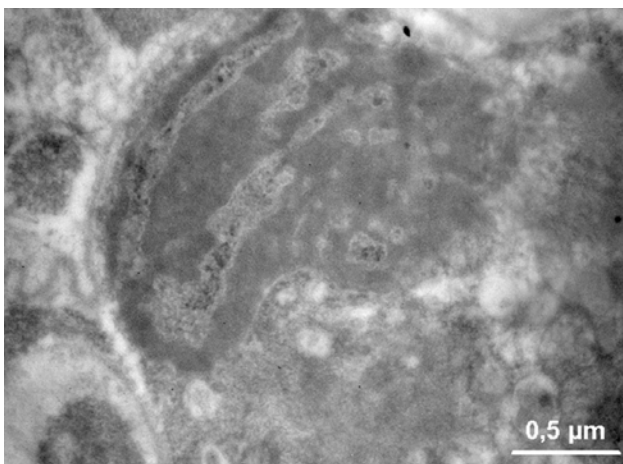


Рис. 12. Фрагмент ГМК медики артерии после замораживания и облучения по режиму 1. Нарушение ультраструктуры ядра в виде электронно-светлых включений разной формы и размера.

Fig. 12. Fragment of SMCs of artery media after freezing and irradiation according to the regimen 1. Disorder of nucleus ultrastructure as electron light inclusions of different shapes and sizes.

Analysis of the state of arterial wall after a combined effect of freeze-thawing and following irradiation according to one of two regimens, differing by the dose, did not reveal a significant difference in their ultrastructure. Endothelial layer in these samples was completely absent. Basal membrane was predominantly preserved (Fig. 10).

Sub-endothelial layer consisted of loosen connective tissue, comprising dissociated bunches of CF and clusters of amorphous elastin. There was found the destruction of this layer cell elements, manifested in the destruction of nuclei and cytoplasmic organelles of endotheliocytes (Fig. 11). Inner elastic membrane preserved its integrity.

For SMC being in various sites of tunica media non-uniform degree of structural damages was characteristic. The part of SMC contained spike-like nuclei with marginal location of chromatin, enlightening of cytoplasm and different inclusions which likely resulted from DNA structural modification under the effect of ionizing irradiation (Fig. 12).

In the perinuclear zone of vacuolized cytoplasm we found widened cisterns of EPR and swollen enlightened mitochondria with partial or complete loss of cristas (Fig. 13). It should be noted that in these cells the cytolemma integrity was preserved and their basal membranes were fragmented.

In the middle part of tunica media between neighboring elastic membranes a vast electron-light cavities with the fragments of destroyed SMC were revealed (Fig. 14). Elastic membranes and bunches of collagen fibers of extracellular connective tissue matrix mainly preserved their structure (Fig. 14, 15).

Zones of attachment of collagen fibers to elastic membranes were almost not damaged (Fig. 16).

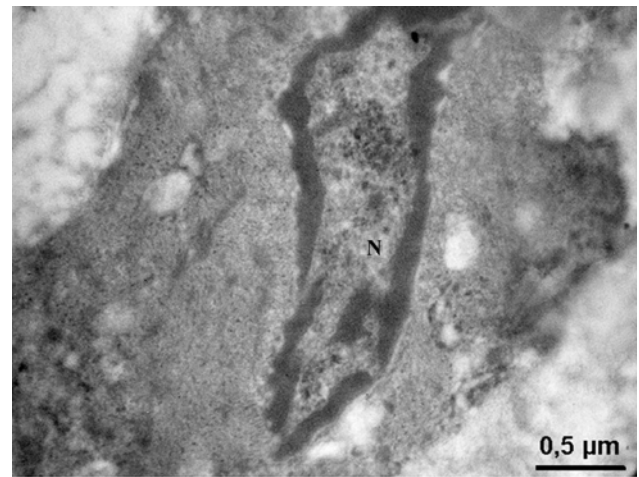
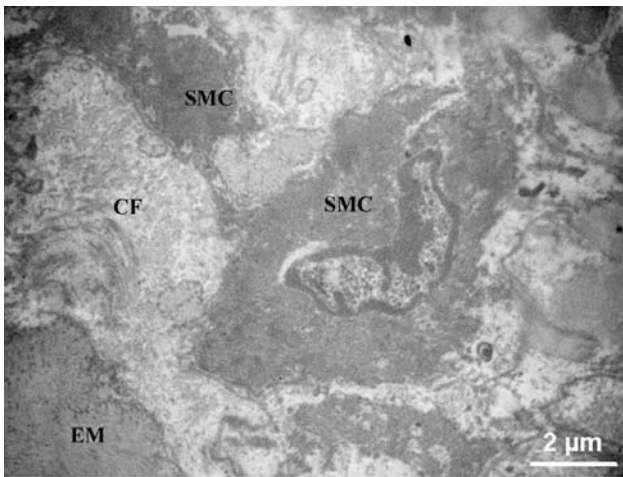


Рис. 13. Ультраструктура ГМК (SMC) после замораживания и облучения по режимам 1 (а) и 2 (б); CF – КВ; EM – ЭМ; N – ядро.

Fig. 13. Ultrastructure of SMCs after freezing and irradiation according to the regimens 1 (a) and 2 (b); N – nucleus.

люлярного соединительнотканного матрикса в основном сохраняли свою структуру (рис. 14, 15).

Зоны прикрепления коллагеновых волокон к эластиновым мембранам практически не повреждены (рис. 16).

Полученные электронно-микроскопические данные хорошо коррелируют с результатами по увеличению прочности девитализированных артерий в продольном и радиальном направлениях [2, 3]. С нашей точки зрения, изменения механической прочности артерий могут быть связаны с частич-

The obtained electron microscopic data are in well concordance with the results on the increased strength of devitalized arteries in longwise and radial directions [2, 3]. We believe that changes in mechanical strength of arteries may be related to either partial or complete destruction of SMC, providing normally the natural spatial distribution and maintaining of the carcass. The destruction of muscular layer cells leads to the formation of internal cavities in the spaces between membranes, providing the approaching of elastic membranes, as well as elevated structural rigidity of vascular wall.

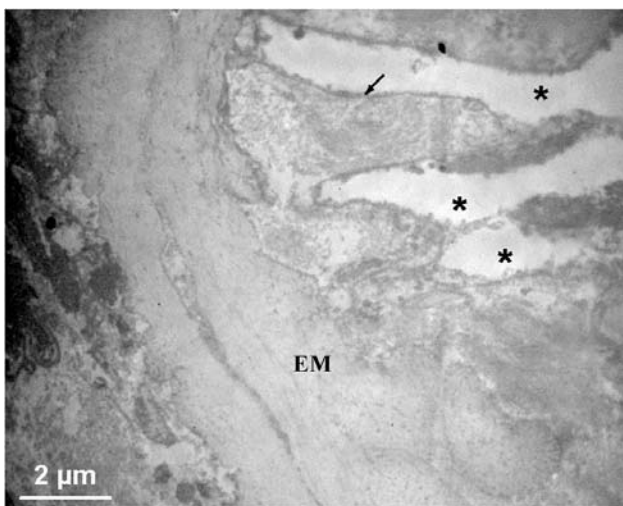


Рис. 14. Участок меди artery с полной деструкцией ГМК в виде электронно-светлых полостей (*), окруженных базальными мембранами ГМК (стрелка), после замораживания и облучения по режиму 1; EM – ЭМ.

Fig. 14. Ultrastructure of artery tunica media with complete destruction of SMCs as electron light cavities (*), surrounded by basal membranes of SMC (arrow) after freezing and irradiation according to the regimen 1.

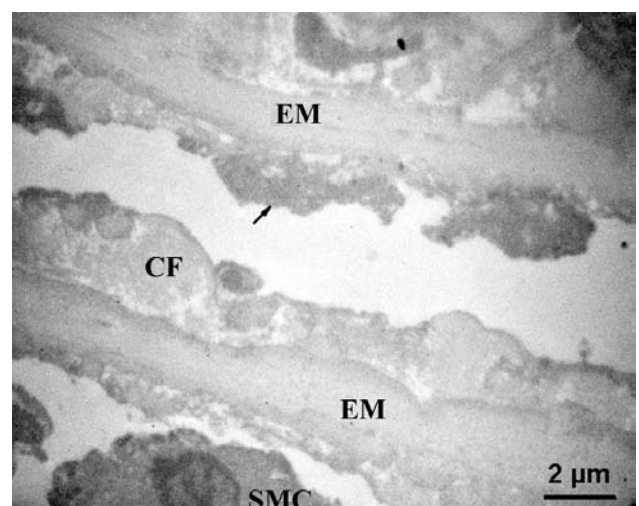


Рис 15. Фрагменты разрушенных ГМК (стрелка), расположенных между двумя сохраненными эластическими мембранами, в меди artery после замораживания и облучения по режиму 2; SMC – ГМК; CF – КВ; EM – ЭМ.

Fig. 15. Fragments of destroyed SMC (arrow) located between two preserved elastic membranes, in artery tunica media after freezing and irradiation according to the regimen 2.

Рис. 16. Участки соединения коллагеновых волокон и эластических мембран меди артерии после замораживания и облучения по режиму I; CF – КВ; EM – ЭМ.

Fig. 16. Sites of joining collagen fibers and elastic membranes of artery media after freezing and irradiation according the regimen I.

ным или полным разрушением ГМК, обеспечивающих в исходном состоянии естественное пространственное распределение и удержание каркаса. Разрушение клеток мышечного слоя приводит к образованию внутренних полостей в межмембранных пространствах, обеспечивая сближение эластических мембран, а также повышение структурной жесткости сосудистой стенки.

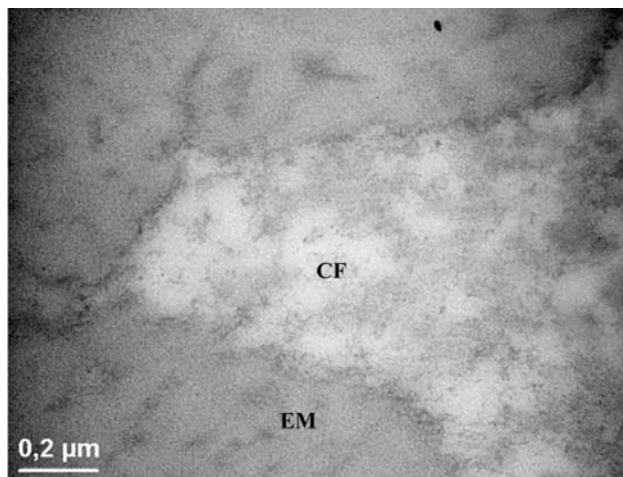
Кроме того, значительное влияние на прочностные свойства артерии может оказывать разрушение коллагеновых пучков вследствие изменения межбелковых взаимодействий и, возможно, формирования поперечных сшивок молекул коллагена.

Выводы

Комбинирование замораживания-отогрева и ионизирующего облучения приводит к более полной девитализации фрагментов артерий свиньи с сохранением эластических мембран и пучков коллагеновых волокон, а также их пространственных взаимосвязей по сравнению с криообработкой. Во всех случаях экспериментального воздействия наиболее чувствительным компонентом в структуре артерии были клеточные элементы и непосредственно контактирующие с ними зоны коллагеновых волокон. Установлено, что каркасные структуры (эластические мембраны и связанные с ними пучки коллагеновых волокон) более устойчивы к используемым воздействиям и менее подвержены структурной деградации.

Литература

1. *Бызов Д.В., Сынчикова О.П., Пушкова Е.Н. и др.* Биотехнологические аспекты создания трансплантатов артерий // *Биотехнология.*– 2010.– Т. 3, №3.– С. 21–30.
2. *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.
3. *Бызов Д.В., Сынчикова О.П., Михайлова И.П., Сандомирский Б.П.* Влияние ионизирующего облучения на артерии свиньи при создании девитализированных скаффолдов // *Биотехнология.*– 2010.– Т. 3, №6.– С. 75–79.
4. *Уикли Б.* Электронная микроскопия для начинающих / Пер. с англ. под ред. Полякова В.Ю.– М.: Мир, 1975.– 324 с.
5. *Amiel G., Komura M., Shapira O. et al.* Engineering of blood vessels from acellular collagen matrices coated with human endothelial cells // *Tissue Eng.*– 2006.– Vol. 12, N8.– P.2355–2365.



In addition a considerable effect on strength properties of artery may be rendered by loosening of collagen bunches due to change in interactions between proteins and probably the formation of cross-linkings of collagen molecules.

Conclusions

Combination of freeze-thawing and ionized irradiation results in more complete devitalization of porcine artery fragments with preserving elastic membranes and bunches of collagen fibers as well as of their spatial relationships if compared with the cryotreatment solely. For all the cases of experimental exposures the most sensible components in the artery structure were the cell elements and the zones of direct contacts between collagen fibers and cells. It has been established that skeleton structures (elastic membranes and the bunches of collagen fibers connected to these membranes) were resistant to the applied exposures and less subjected to structural degradation.

References

1. *Byzov D.V., Synchykova O.P., Pushkova Ye.N. et al.* Biotechnological aspects of creating transplants of arteries // *Biotekhnologiya.*– 2010.– Vol. 3, N3.– P. 21–30.
2. *Byzov D.V., Synchykova O.P., Mikhaylova I.P., Sandomirsky B.P.* Application of low temperatures to create xenogenous vascular scaffolds // *Biotekhnologiya.*– 2010.– Vol. 3, N1.– P. 41–45.
3. *Byzov D.V., Synchykova O.P., Mikhaylova I.P., Sandomirsky B.P.* Effect of ionizing irradiation on porcine arteries when creating devitalized scaffolds // *Biotekhnologiya.*– 2010.– Vol. 3, N6.– P. 75–79.
4. *Weakley B.* A beginner's handbook in biological electron microscopy.– Moscow: Mir, 1975.– 324 p.
5. *Amiel G., Komura M., Shapira O. et al.* Engineering of blood vessels from acellular collagen matrices coated with human endothelial cells // *Tissue Eng.*– 2006.– Vol. 12, N8.– P. 2355–2365.
6. *Borschel G., Huang Y.-C., Calve S. et al.* Tissue engineering of recellularized small-diameter vascular grafts // *Tissue Eng.*– 2005.– Vol. 11, N5–6.– P. 778–786.

6. Borschel G., Huang Y.-C., Calve S. et al. Tissue engineering of recellularized small-diameter vascular grafts // *Tissue Eng.*– 2005.– Vol. 11, N5–6.– P. 778–786.
7. Byzov D.V., Synchykova O.P., Mikhaylova I.P. et al. Freezing and gamma-radiation for devitalization of vascular scaffolds // *Cryobiology.*– 2010.– Vol. 61, N3.– P. 389.
8. Conklin B., Richter E., Kreutziger K. et al. Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft // *Med Eng & Physics.*– 2002.– Vol. 24, N3.– P. 173–183.
9. Funamoto S., Nam K., Kimura T. The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels // *Biomaterials.*– 2010.– Vol. 31, N13.– P. 3590–3595.
10. Gilbert T., Sellaro T., Badylak S. Decellularization of tissues and organs // *Biomaterials.*– 2006.– Vol. 27, N19.– P. 3675–3683
11. Gratzner P., Harrison R., Woods T. Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix // *Tissue Eng.*– 2006.– Vol. 12, N10.– P. 2975–2983.
12. Liu G.F., He Z.J., Yang D.P. et al. Decellularized aorta of fetal pigs as a potential scaffold for small diameter tissue engineered vascular graft // *Chin. Med. J.*– 2008.– Vol. 121, N15.– P. 1398–1406.
13. Ota T., Taketani S., Iwai S. Novel method of decellularization of porcine valves using polyethylene glycol and gamma irradiation // *Ann. Thorac. Surg.*– 2007.– Vol. 83, N4.– P. 1501–1507.
14. Roy S., Silacci P., Stergiopulos N. Biomechanical properties of decellularized porcine common carotid arteries // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*– 2005.– Vol. 289, N4.– P. 1567–1576.
15. Zhu C., Ying D., Mi J. et al. Development of anti-atherosclerotic tissue-engineered blood vessel by A20-regulated endothelial progenitor cells seeding decellularized vascular matrix // *Biomaterials.*– 2008.– Vol. 29, N17.– P. 2628–2636.
7. Byzov D.V., Synchykova O.P., Mikhaylova I.P. et al. Freezing and gamma-radiation for devitalization of vascular scaffolds // *Cryobiology.*– 2010.– Vol. 61, N3.– P. 389.
8. Conklin B., Richter E., Kreutziger K. et al. Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft // *Med Eng & Physics.*– 2002.– Vol. 24, N3.– P. 173–183.
9. Funamoto S., Nam K., Kimura T. The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels // *Biomaterials.*– 2010.– Vol. 31, N13.– P. 3590–3595.
10. Gilbert T., Sellaro T., Badylak S. Decellularization of tissues and organs // *Biomaterials.*– 2006.– Vol. 27, N19.– P. 3675–3683
11. Gratzner P., Harrison R., Woods T. Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix // *Tissue Eng.*– 2006.– Vol. 12, N10.– P. 2975–2983.
12. Liu G.F., He Z.J., Yang D.P. et al. Decellularized aorta of fetal pigs as a potential scaffold for small diameter tissue engineered vascular graft // *Chin. Med. J.*– 2008.– Vol. 121, N15.– P. 1398–1406.
13. Ota T., Taketani S., Iwai S. Novel method of decellularization of porcine valves using polyethylene glycol and gamma irradiation // *Ann. Thorac. Surg.*– 2007.– Vol. 83, N4.– P. 1501–1507.
14. Roy S., Silacci P., Stergiopulos N. Biomechanical properties of decellularized porcine common carotid arteries // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*– 2005.– Vol. 289, N4.– P. 1567–1576.
15. Zhu C., Ying D., Mi J. et al. Development of anti-atherosclerotic tissue-engineered blood vessel by A20-regulated endothelial progenitor cells seeding decellularized vascular matrix // *Biomaterials.*– 2008.– Vol. 29, N17.– P. 2628–2636.

Accepted in 22.03.2011

*Поступила 22.03.2011
Рецензент И.П. Высеканец*