

УДК 612.171.3.017.26.014.43.014.48.084

Н.В. Репин<sup>1\*</sup>, Л.Н. Марченко<sup>1</sup>, Т.П. Говоруха<sup>1</sup>,  
И.П. Михайлова<sup>2</sup>, А.А. Манченко<sup>2</sup>, Б.П. Сандомирский<sup>2</sup>

## Ультраструктура тканей перикарда и створок аортального клапана свиньи, девитализированных крио- и радиационным воздействием

UDC 612.171.3.017.26.014.43.014.48.084

N.V. Repin<sup>1\*</sup>, L.N. Marchenko<sup>1</sup>, T.P. Govorukha<sup>1</sup>,  
I.P. Mikhailova<sup>2</sup>, A.A. Manchenko<sup>2</sup>, B.P. Sandomirsky<sup>2</sup>

### Ultrastructure of Porcine Pericardium and Aortic Valve Tissues, Devitalized with Cryogenic and Irradiation Exposures

**Реферат:** В работе рассматриваются морфологические аспекты крио- и радиационных способов девитализации тканевого биоматериала – перикарда и аортального клапана, для создания бесклеточного ксенокаркаса. Структуру исследуемых тканей после низкотемпературного, ионизирующего и комбинированного воздействий изучали с помощью оптической и электронной микроскопии. Показано, что в результате применения данных способов девитализации перикарда и аортального клапана происходят выраженные деструктивные изменения клеточных элементов, дегенерация и потеря поверхностной выстилки (эндотелия, мезотелия), но в основном сохраняются пространственное расположение и структурная целостность волокнистых компонентов соединительнотканной основы.

**Ключевые слова:** бесклеточные ксеногенные материалы, девитализация, замораживание-отогрев, ионизирующее облучение, ультраструктура, перикард, аортальный клапан.

**Реферат:** У роботі розглянуто морфологічні аспекти крио- та радіаційного способів девіталізації тканинного біоматеріалу – перикарда та аортального клапана, для створення безклітинного ксенокаркаса. Структуру досліджуваних тканин після впливу низьких температур, іонізуючого опромінення та комбінованого впливу вивчали за допомогою оптичної та електронної мікроскопії. Показано, що після використання цих способів девіталізації перикарда і аортального клапана виникають виражені деструктивні зміни клітинних елементів, дегенерація і втрата поверхневого вистилання (ендотелію, мезотелію), однак практично зберігаються просторове розміщення і структурна цілісність волокнистих компонентів сполучнотканнинної основи.

**Ключові слова:** безклітинні ксеногенні матеріали, девіталізація, заморожування-відігрів, іонізуюче опромінення, ультраструктура, перикард, аортальний клапан.

**Abstract:** This paper deals with morphological assessment of cryo- and radiodevitalized tissue biomaterial, *i. e.* pericardium and aortic valve as well as a cell-free xeno-carcass designing. Structure of the studied tissues after low temperature, ionizing and combined exposures was investigated by optical and electron microscopies. The application of this method to devitalize the pericardium and aortic valve is shown to result in the expressed destructive changes of cell elements, but the spatial location and structural integrity of connective tissue fibrous components are preserved.

**Key words:** acellular xenogeneic materials, devitalization, freeze-thawing, ionizing irradiation, ultrastructure, pericardium, aortic valve.

В последнее десятилетие для целей реконструктивно-восстановительной хирургии широко используются бесклеточный бычий и свиной перикард (ксеноперикардальные пластины), обработанные различными консервантами. Наиболее эффективным консервантом является глутаровый альдегид в разной концентрации. Однако, несмотря на высокую степень сохранности морфологической структуры, пластических и механических характеристик ткани, ксеноперикард, консервированный глутаро-

Within the recent decade the acellular bovine and porcine pericardium (xenopericardial plates) treated with various preservatives have been widely used for reconstructive/recovery surgery. The most effective preservative was the glutaraldehyde in various concentrations. However, despite a high preservation of morphological structure, plastic and mechanical properties of tissues, glutaraldehyde-preserved xenopericardium had a residual antigen features and inclined to calcify, restricting its applicability. Currently, in

<sup>1</sup>Отдел криоморфологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>2</sup>Отдел экспериментальной криомедицины, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

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

Поступила 21.10.2014

Принята в печать 03.08.2015

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, №3. – С. 246–254.  
© 2015 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

<sup>1</sup>Department of Cryomorphology, and

<sup>2</sup>Department of Experimental Cryomedicine, 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 3737435, fax: +380 57 373 3084,  
e-mail: nvrepin@mail.ru

Received October, 21, 2014

Accepted August, 03, 2015

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2015. 25 (3): 246–254.

© 2015 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

вым альдегидом, обладает остаточной антигенностью и склонен к кальцификации, что ограничивает возможность его применения. В настоящее время, помимо глутарового альдегида, используют дифосфаты, гликозаминогликаны, поверхностно активные вещества и другие химические соединения [3, 8]. Для получения эффективных протезов ксеногенного происхождения необходимо устранить иммунный конфликт, с этой целью ткань подвергают предварительной процедуре девитализации (разрушение клеток донора) [6, 7, 9, 12, 13].

Ранее нами были успешно применены физические методы девитализации (замораживание-отогрев и ионизирующее излучение) для получения сосудистых графтов малого диаметра из ксенопротезов внутригрудных артерий свиньи [1]. Комбинированное использование указанных физических факторов наряду со снижением антигенных свойств ксеноткани обеспечивало высокую степень ее девитализации и структурную стабилизацию за счет образования поперечных межбелковых связей и повышения сшивающей активности фибриллярных белков при облучении [4, 5]. Естественно предположить, что после этапа девитализации, приводящего к повреждению большей части клеточных элементов ткани, качество ксенокаркаса будет определять состояние его волокнистых элементов, степень их морфологической сохранности. В литературе практически отсутствуют данные, характеризующие ультраструктурное состояние ткани каркаса после его обработки [11].

Целью данного исследования была оценка состояния ультраструктуры ткани перикарда и створок аортального клапана свиньи после девитализации крио- и радиационным способом.

### Материалы и методы

Для изготовления ксенобиопротезов использовали перикард и створки аортального клапана 6–8-месячных беспородных свиней. После забоя животных на мясокомбинате ткани выделяли в течение 20 мин при соблюдении правил асептики и минимальной травматичности. Ткани, трижды отмытые охлажденным до 4°C стерильным физиологическим раствором с добавлением антибиотиков, помещали в стерильные криостойкие контейнеры «Eurotubo» («Deltalab», Испания), замораживали погружением в жидкий азот (–196°C). Контрольные и отогреты на водяной бане при 36°C образцы облучали потоком электронов на линейном ускорителе ЛУЭ-10 (Украина). Величина поглощенной дозы 25 кГр является минимально необходимой для обеспечения стерильности медицинских материалов и допустимой для сохранения фибриллярных белков экстрацеллюлярного матрикса.

addition to glutaraldehyde one uses diphosphates, glycosaminoglycans, surfactants and other chemical compounds [2, 7]. For obtaining the effective prostheses of xenogenic origin an immune conflict has to be eliminated, for this purpose the tissue is subjected to preliminary procedure of devitalization (destruction of donor cells) [5, 6, 8, 11, 13].

Previously we have successfully applied the physical methods of devitalization (freeze-thawing and ionizing irradiation) for obtaining the small diameter vascular grafts derived from internal thoracic arteries of porcine xenoprostheses [1]. Combined use of these physical factors along with a decrease in xenotissue antigenic properties provided a high degree of devitalization and structural stabilization due to the formation of protein-protein cross-links and improved crosslinking activity when irradiated the fibrillar proteins [3, 4]. It is obvious that following the devitalization, leading to a damage of the major part of the tissue cell elements, the quality of xeno-carcass will determine the state of its fibrous elements, and the extent of their morphological preservation. There are virtually no published data describing the ultrastructural state of the carcass tissue after its treatment [10].

The aim of this research was to assess the ultrastructural state of porcine pericardium and aortic valve flaps after devitalization with cryo- and irradiation methods.

### Materials and methods

Pericardium and aortic valve flaps of 6–8-month-old outbred pigs were used to produce xenobioprostheses. The tissues were carefully isolated within 20 min after the animals' slaughtering at the meat processing plant under aseptic conditions. The tissues, washed three times with cooled down to 4°C sterile saline supplemented with antibiotics, were placed into sterile Eurotubo cryocontainers (Deltalab, Spain), and frozen by immersion into liquid nitrogen (–196°C). The control (non-frozen) and thawed in a water bath at 36°C samples were irradiated with the flow of electrons in a linear accelerator LUE-10 (Ukraine). The absorbed dose value of 25 kGy is the minimal necessary to ensure the sterility of medical materials, and allowed the preservation of fibrillar proteins of the extracellular matrix.

We studied the following groups of the pericardial and valve flaps tissues, exposed to various types of effects, correspondingly to the devitalization stages: 1 – native (non-frozen, control group); 2 – irradiated in 25 kGy dose; 3 – after freezing (–196°C) and thawing; 4 – after freeze-thawing and subsequent irradiation at a dose of 25 kGy.

For electron microscopic examination the tissue samples were fixed in 3% solution of Millonig's phosphate buffered glutaraldehyde (pH 7.3–7.4) and 1%



Изучали следующие группы тканей перикарда и створок клапана, подвергавшихся различным видам воздействий соответственно этапам девитализации: 1 – нативные (контрольная группа); 2 – облученные в дозе 25 кГр; 3 – после замораживания ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) и отогрева; 4 – после замораживания-отогрева и последующего облучения в дозе 25 кГр.

Для электронно-микроскопического исследования образцы ткани фиксировали в 3%-м растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере Миллонига (рН 7,3–7,4) и 1 %-м растворе четырехокси осмия [2]. После обезвоживания этанолом возрастающей концентрации и оксипропиленом фрагменты ткани заключали в эпон-аралдит. Полутонкие срезы (0,5 мкм) окрашивали метиленовым синим и основным фуксином, исследовали под микроскопом ЛЮМАМ МП-4 (ЛЮМО, Россия). Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме УМТП-7 («SELMI», Украина), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца [2] и исследовали в электронном микроскопе ПЭМ-125К («SELMI») при ускоряющем напряжении 75 кВ. Микроскоп снабжен системой съемки и анализа изображения САИ-01А («SELMI»), включающей также ССD-камеру DX-2 и пакет программ к ней («Карра», Германия).

### Результаты и обсуждение

Нативные створки клапана представляют собой покрытые эндотелием тонкие пластинки плотной волокнистой соединительной ткани с небольшим количеством клеток. На поперечном разрезе створки различаются три слоя. Обращенный к желудочку внутренний слой, являющийся продолжением эндокарда, эластино-коллагеновая прослойка и тонкий средний слой створки представлены рыхлой волокнистой соединительной тканью, содержащей клеточные элементы (рис. 1). Волокнистый компонент в аортальном слое представлен плотными пучками коллагеновых фибрилл, между которыми находятся тонкие филаменты, связанные с фибробластами. Со стороны желудочковой поверхности в подэндотелиальном слое преобладают эластические волокна.

Коллагеновые пучки ориентированы в различных направлениях – физиологическое свойство ткани, что ограничивает ее растяжимость и способствует восстановлению при чрезмерной деформации.

Нативный перикард состоит из плотной волокнистой соединительной ткани, покрытой мезотелием – однослойным плоским эпителием. Клеточные элементы представлены фибробластами, оседлыми макрофагами, малочисленными плазматическими клетками, лейкоцитами, а также жировыми

раствором осмия тетроксид [12]. После дегидратации в этанольных растворах возрастающей концентрации и оксипропилене фрагменты тканей были встроены в Epon-Araldite. Полу-тонкие срезы (0.5 мм) были окрашены метиленовым синим и основным фуксином, затем исследованы с помощью ЛЮМАМ МП-4 микроскопа (ЛЮМО, Россия). Ультратонкие срезы были получены с помощью УМТП-7 ультрамикротоме (SELMI, Украина), контрастированы уранилацетатом и цитратом свинца [12] и исследованы с помощью электронного микроскопа TEM-125K (SELMI) при ускоряющем напряжении 75 кВ. Микроскоп был оборудован системой регистрации и анализа изображений САИ-01А (SELMI), которая также включала ССD-камеру DX2 и соответствующее программное обеспечение (Kappa, Германия).

### Results and discussion

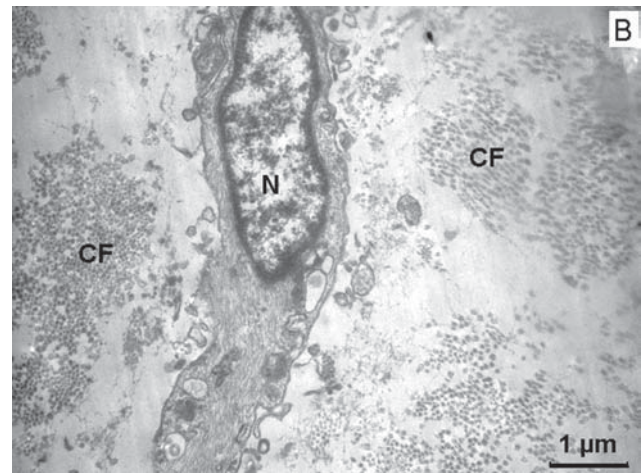
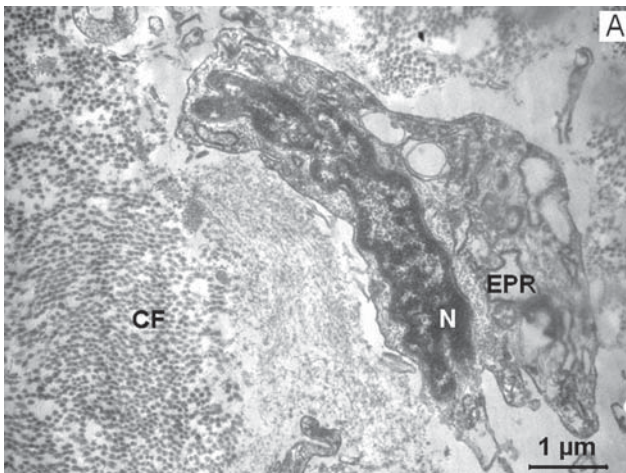
Native valve flaps represented endothelium-covered thin plates of dense fibrous connective tissue with few number of cells. Cross-sections of the flaps had three layers. Overlooking towards the ventricle inner layer, which was a continuation of endocardium, the elastin-collagen interlayer and a thin middle layer of the flap were represented by a loosen fibrous connective tissue containing the cell elements (Fig. 1). The fibrous component in aortic layer contained dense bundles of collagen fibrils, between which there were thin filaments associated with fibroblasts. The elastic fibers predominated in sub-endothelial layer of the ventricular surface.

Collagen bundles were oriented in different directions, a physiological feature of the tissue, restricting its stretchability and promoting a recovery when excessive deformation.

The native pericardium consisted of dense fibrous connective tissue covered with mesothelium which was a single layer squamous epithelium. The cells represented with fibroblasts, tissue-fixed macrophages, small plasma cells, white blood cells, as well as fat cells, localized along the vessels. Connective-tissue base and the mesothelium were separated by a thin basal membrane, beneath which there was a layer of elastic fibers inter-twisted with collagen fibrils bundles (Fig. 2). This arrangement of fibers ensured the resistance of tissue to mechanical stress.

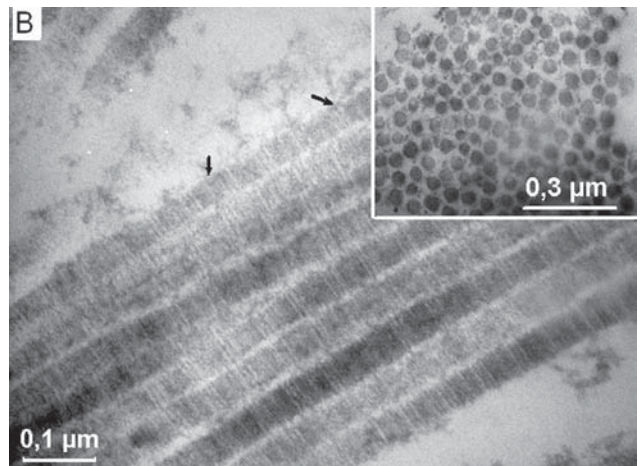
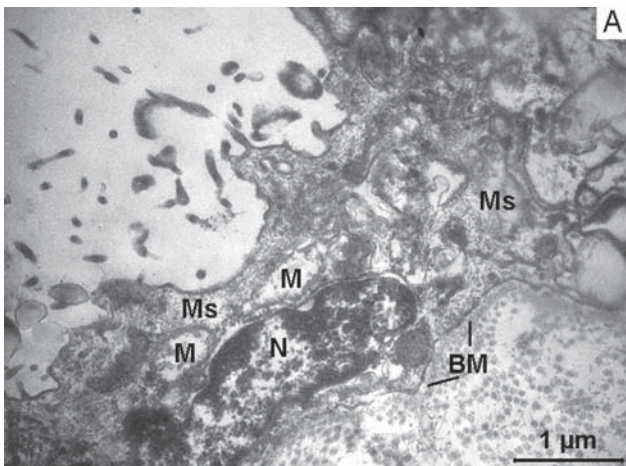
Freeze-thawing of aortic valve caused the changes in the ultrastructure of fibrous connective tissue which were typical for low-temperature effect. The most vulnerable link was the endothelial lining which was almost absent after the valve samples thawing. Cells of the tissue underwent cryodestruction of various depth. Some of the cells had the signs of organelles swelling, destruction of the mitochondria cristae, nuclei heterochromatization, extending of endoplasmic reticulum cisterns and perinuclear space whereas cytolemma





**Рис. 1.** Ультраструктура среднего слоя створки клапана в контроле: **A** – фибробласт в окружении эластических и коллагеновых волокон; **B** – фибробласт в составе рыхлой волокнистой соединительной ткани; N – ядро; EPR – гранулированный эндоплазматический ретикулум; CF – коллагеновые волокна.

**Fig. 1.** Ultrastructure of valve flap middle layer in control: **A** – fibroblast surrounded by elastic and collagen fibers; **B** – fibroblast as a component of loose connective tissue; N – nucleus; EPR – granulated endoplasmic reticulum; CF – collagen fibers.



**Рис. 2.** Ультраструктура мезотелия и подлежащей соединительнотканной основы перикарда в контроле (**A**); коллагеновые фибриллы в продольном и поперечном (вставка) сечении (**B**); Участки взаимосвязи фибрилл с белково-полисахаридными элементами внутри пучка обозначены стрелкой; Ms – мезотелий; BM – базальная мембрана; N – ядро; M – митохондрия.

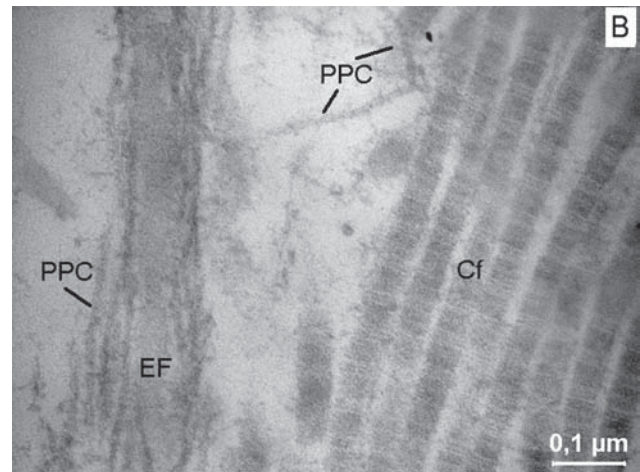
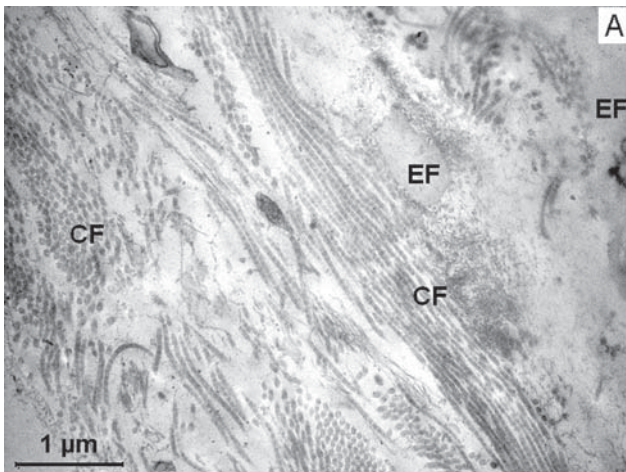
**Fig. 2.** Ultrastructure of mesothelium and underlying connective tissue of pericardium bases in control (**A**); collagen fibrils in longitudinal and transverse (cut-in) sections (**B**); Sites of inter-linkages of fibril with protein-polysaccharide elements within the bundle indicated by an arrow; Ms – mesothelium; BM – basal membrane; N – nucleus; M – mitochondria.

клетками, локализованными вдоль сосудов. От соединительнотканной основы мезотелий отделен тонкой базальной мембраной, под которой располагается слой эластических волокон, переплетенных пучками коллагеновых фибрилл (рис. 2). Такое расположение волокон обеспечивает устойчивость ткани к механическому напряжению.

Замораживание-отогрев аортального клапана вызывает типичные для низкотемпературного воздействия изменения ультраструктуры волокнистой соединительной ткани. Наиболее уязвимым звеном является эндотелиальная выстилка, которая после размораживания образцов клапана практи-

remained integral. There were also found the completely destroyed cells surrounded by the bundles of collagen fibrils or elastic fibers. Ultrastructural state of the aortic valve collagen and elastic fibers was close to native one, which was manifested in preserving the protein-polysaccharide complexes, binding the collagen fibrils (Fig. 3).

Similar ultrastructural changes were observed following freeze-thawing of the pericardium. There were no mesothelial cells on the surface. Fibroblasts were characterized with vacuolization of organelles, a condensed chromatin prevailed in their nuclei. The cytolemma was preserved in most processes of these



**Рис. 3.** Ультраструктура коллагеновых и эластических волокон створки клапана после замораживания-отогрева: сохранение взаимосвязи коллагеновых и эластических волокон (A), а также коллагеновых фибрилл с белково-полисахаридными комплексами (PPC) (B); CF – коллагеновые волокна; EF – эластические волокна; Cf – коллагеновые фибриллы.

**Fig. 3.** Ultrastructure of collagen and elastic fibers of the valve flaps after freeze-thawing: maintaining the relationship between collagen and elastin fibers (A), as well as collagen fibrils with a protein-polysaccharide complex (PPC) (B); CF – collagen fibers; EF – elastic fibers; Cf – collagen fibrils.

чески отсутствует. Клеточные элементы ткани подвергаются криодеструкции в разной степени. Часть клеток имеет признаки набухания органелл, деструкции крист митохондрий, гетерохроматизации ядер, расширения цистерн эндоплазматического ретикулума и перинуклеарного пространства при целостности цитолеммы. Обнаруживаются также полностью разрушенные клетки, окруженные пучками коллагеновых фибрилл или эластических волокон. Состояние ультраструктуры коллагеновых и эластических волокон аортального клапана близко к нативному, что проявляется в сохранении белково-полисахаридных комплексов, связывающих коллагеновые фибриллы (рис. 3).

Подобные изменения ультраструктуры наблюдаются и после замораживания-отогрева перикарда. На поверхности отсутствуют мезотелиальные клетки. Фибробласты характеризуются вакуолизацией органелл, в их ядрах преобладает конденсированный хроматин. У большинства отростков этих клеток сохранена цитолемма (рис. 4, A). Коллагеново-эластический каркас ткани перикарда не подвергается существенным изменениям после замораживания. Среди пучков коллагеновых и эластических волокон наблюдаются электронно-светлые полости, возможно являющиеся результатом гидратации ткани после замораживания-оттаивания (рис. 4, B).

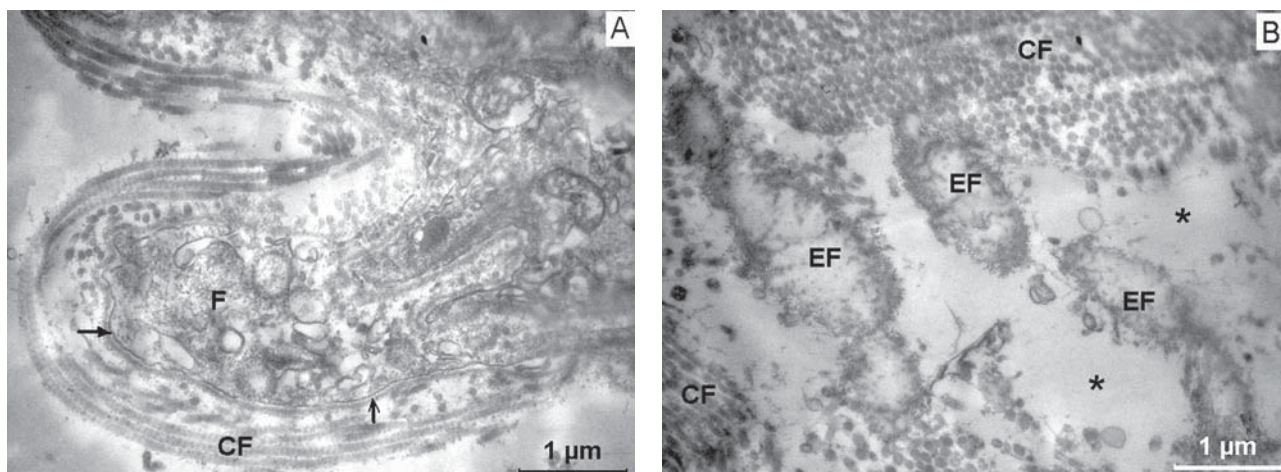
В структуре тканей створки клапана и перикарда после облучения преобладают деструктивные изменения клеточных элементов: конденсация хроматина ядер; образование больших пузырей и нарушение целостности цитолеммы; вакуолизация

cells (Fig. 4A). Collagen-elastic scaffold in pericardium tissue was not subjected to significant changes after freezing. Among the bundles of collagen and elastic fibers the electron-light cavities were observed, likely resulted from hydration of tissue after freeze-thawing (Fig. 4B).

Following irradiation the destructive changes of cellular elements prevailed in the structure of valve flap and pericardium tissues: nuclei chromatin condensation; formation of large bubbles and cytollemma disintegrity; vacuolization of cytoplasm organoids; mesothelium desquamation from a pericardial surface and de-endothelization of valve flaps (Fig. 5). Collagen-elastic base was characterized by some loosening due to the formation of cavities around the processes of connective tissue cells. Assessment of the fine structure of collagen fibrils revealed that the irradiation led to a partial dissociation of protein-polysaccharide complexes, binding the collagen fibrils in the bundle, and the formation of enlightened cavities between the fibrils (Fig. 6).

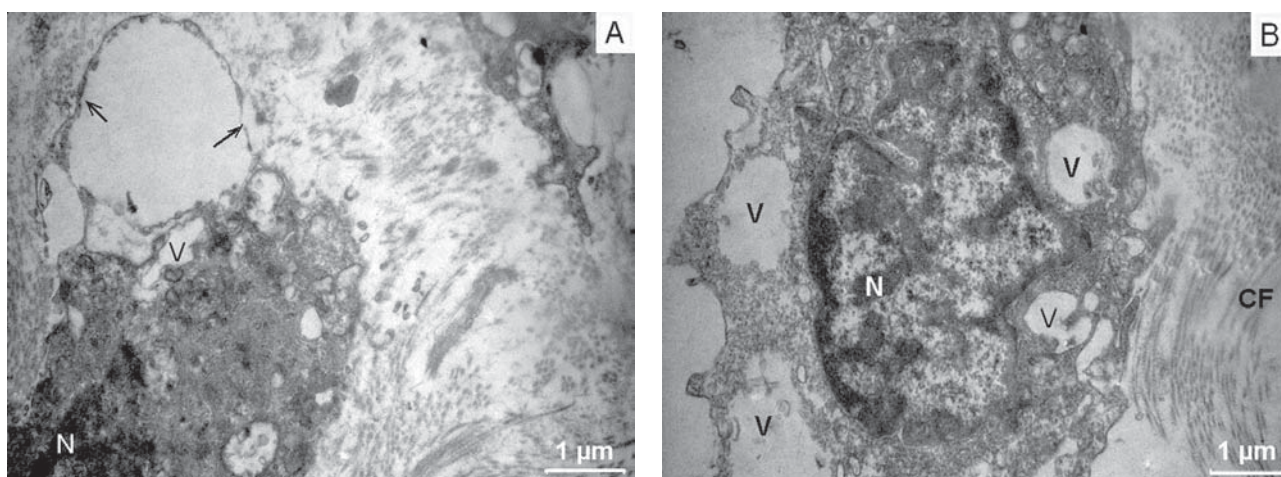
The combined effect of low temperatures and subsequent irradiation resulted in expressed destructive changes in cell tissue elements of aortic valve and pericardium. Endothelial lining of valve flaps and pericardium mesothelium was completely absent. In connective tissue cells along with nuclei heterochromatization, cytoplasm organoid vacuolization and local destruction of cytollemma the formation of large surface bubbles in perinuclear area as well as in the cell processes was observed (Fig. 7A). The extensive electron-transparent cavities were observed around the cells of a loosen connective tissue, testifying to a tissue





**Рис. 4.** Ультраструктура разных участков ткани перикарда после замораживания-отогрева: **A** – сохранность цитолеммы (стрелка) отростков фибробласта; **B** – электронно-светлые полости между эластическими и коллагеновыми волокнами (обозначено звездочкой); CF – коллагеновые волокна; EF – эластические волокна; F – отростки фибробласта.

**Fig. 4.** Ultrastructure of different parts of pericardium after freeze-thawing: **A** – cytolemma preservation (arrow) of fibroblast processes; **B** – electron-light cavities between elastic and collagen fibers (asterisk indicated). CF – collagen fibers; EF – elastic fibers; F – fibroblast processes.



**Рис. 5.** Деструктивные изменения клеточных элементов клапана после облучения: **A** – отслоение цитолеммы с образованием пузырей и нарушение ее целостности; **B** – вакуолизация и деструкция органелл цитоплазмы; N – ядро; V – вакуоли; CF – коллагеновые волокна.

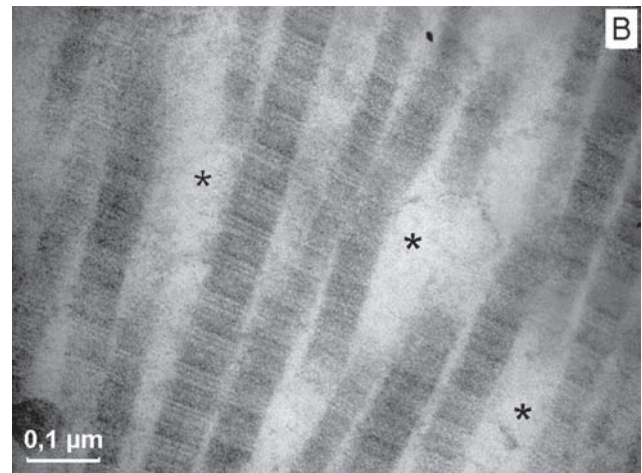
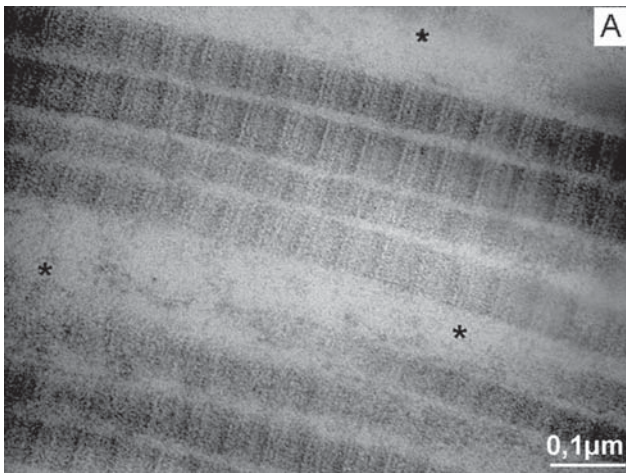
**Fig. 5.** Destructive changes of valve cell elements after irradiation: **A** – cytolemma detachment with bulbs formation and disorder of its integrity; **B** – vacuolization and destruction of cytoplasmic organelles; N – nucleus; V – vacuole; CF – collagen fibers.

органойдов цитоплазмы; десквамация мезотелия с поверхности перикарда и деэндотелизация створок клапана (рис. 5). Коллагеново-эластическая основа характеризуется некоторым разрыхлением за счет образования полостей вокруг отростков соединительнотканых клеток. При исследовании тонкой структуры коллагеновых фибрилл было обнаружено, что облучение приводит к частичной диссоциации белково-полисахаридных комплексов, связывающих коллагеновые фибриллы в пучке, и образованию просветленных полостей между фибриллами (рис. 6).

Комбинированное воздействие низких температур и последующего облучения вызывает выраженные

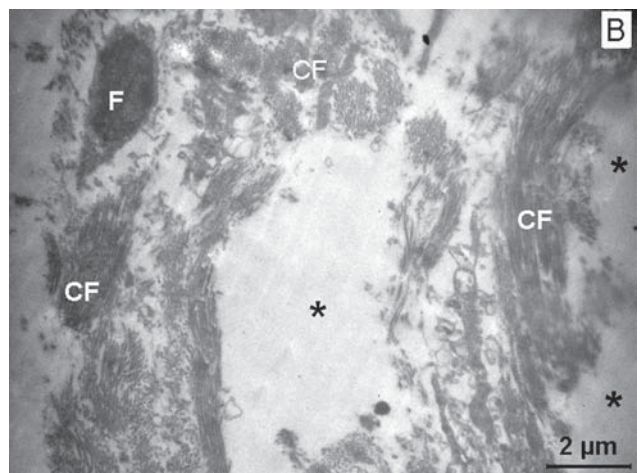
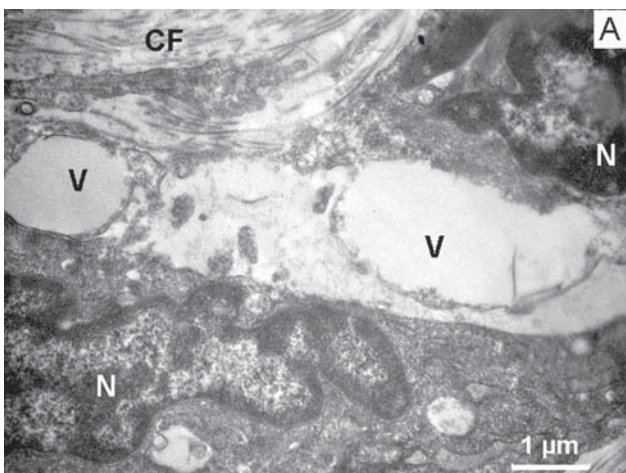
hydrations. The ultrastructure of elastic and collagen fibers was not significantly altered (Fig. 8C), however, electron transparent cavities were also observed between the bundles (see Fig. 7B). The protein-polysaccharide complexes connecting fibrils were preserved inside the collagen bundles and collagen-elastic interlayers (see Fig. 8A, B).

Thus, the most resistant to freezing and irradiation objects in valve and pericardium tissues were the fibrous components, which ultrastructure underwent the least changes. Taking into account this fact, we analyzed the morphometric characteristics of the fibrils of pericardial and valve collagen fibers under the applied effects. The fibril period and diameter were



**Рис. 6.** Нарушение структуры белково-полисахаридных комплексов (обозначено звездочкой), связывающих фибриллы коллагена в пучке после облучения перикарда (А) и клапана (В).

**Fig. 6.** Disordered structure of protein-polysaccharide complexes (asterisk indicated), linking collagen fibrils in bundle after irradiation of pericardium (A) and valve (B).



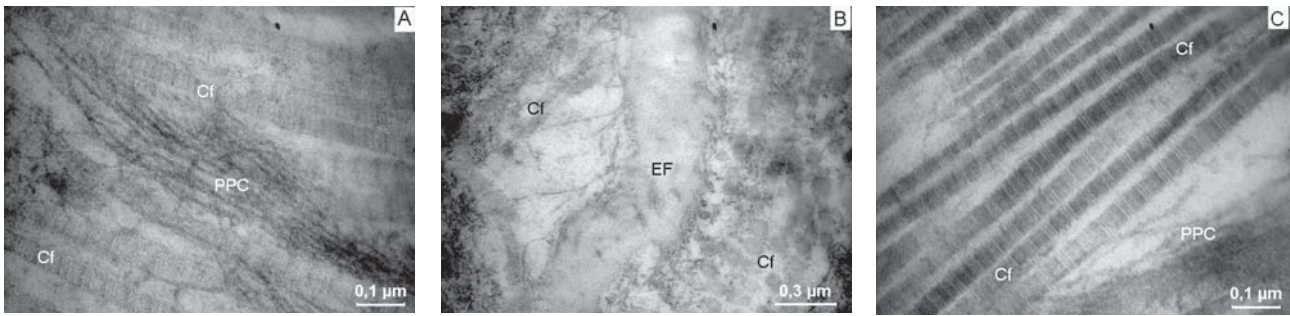
**Рис. 7.** Ультраструктура тканей перикарда и клапана после комбинированного воздействия замораживания-отогрева и облучения: А – гетерохроматизация ядра и вакуолизация цитоплазмы; В – электронно-светлые полости (\*) между пучками коллагеновых волокон в средней части створки клапана; N – ядро; V – вакуоли; CF – коллагеновые волокна; F – отросток фибробласта.

**Fig. 7.** Ultrastructure of pericardial and valve tissues after combined effects of freeze-thawing and irradiation: A – heterochromatization of nucleus and cytoplasm vacuolization; B – electron-transparent cavities (\*) between the bundles of collagen fibers in the middle of the valve flap; N – nucleus; V – vacuole; CF – collagen fibers; F – fibroblast process.

деструктивные изменения клеточных элементов тканей аортального клапана и перикарда. Эндотелиальная выстилка створок клапана и мезотелий перикарда полностью отсутствуют. В соединительнотканых клетках наряду с гетерохроматизацией ядер, вакуолизацией органоидов цитоплазмы и локальной деструкцией цитолеммы наблюдается образование крупных поверхностных пузырей как в околоядерной зоне, так и в отростках клеток (рис. 7, А). Вокруг клеток рыхлой соединительной ткани наблюдаются обширные электронно-прозрачные полости, свидетельствующие о гидратации ткани. Ультраструктура эластических и коллагеновых волокон не претерпевает существенных изме-

assumed as the criterion to analyze morphometry. As Fig. 9 demonstrates, the parameter with most resistance to effect was the fibril's period. The index varied slightly *versus* the control both for the valve flaps and pericardium for all experimental effects. To a large extent the fluctuations in the values were characteristic for the diameter of fibrils. This index was increased in the samples of the irradiated valves, unlike pericardium for which a marked decrease of the parameter was found under these effects. Ionizing irradiation caused the dehydration and compaction of collagen fibers, that stimulated the emergence of cross-linking and might be manifested in the changes of their ultrastructure [9].



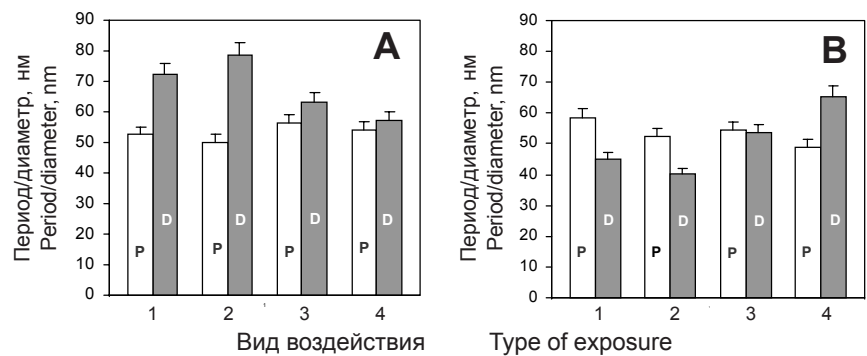


**Рис. 8.** Ультраструктура ткани створки аортального клапана (**A, B**) и перикарда (**C**) после комбинированного воздействия: **A, B** – сохранность коллагеновых и эластических волокон и белково-полисахаридных комплексов; **C** – сохранность тонкой организации коллагеновых фибрилл; EF – эластические волокна; Cf – коллагеновые фибриллы; PPC – белково-полисахаридные комплексы.

**Fig. 8.** Tissue ultrastructure of aortic valve flap (**A, B**) and pericardium (**C**) after combined exposure: **A, B** – preservation of collagen and elastin fibers as well as protein-polysaccharide complexes; **C** – preservation of intrinsic organization of collagen fibrils; EF – elastic fibers; CF – collagen fibrils; PPC – protein-polysaccharide complexes.

нений (рис. 8, C), однако между пучками также наблюдаются электронно-светлые полости (см. рис. 7, B). Внутри коллагеновых пучков и коллагеново-эластических прослоек сохраняются белково-полисахаридные комплексы, соединяющие фибриллы (см. рис. 8, A, B).

Таким образом, в ткани клапана и перикарда наиболее устойчивыми к замораживанию и облучению оказались волокнистые компоненты, ультраструктура которых претерпела наименьшие изменения. Учитывая этот факт, мы проанализировали морфометрические характеристики фибрилл коллагеновых волокон клапана и перикарда при используемых воздействиях. В качестве критерия были взяты период и диаметр фибриллы. Как следует из рис. 9, наиболее устойчивым к воздействию параметром является период фибриллы. Этот показатель как для створок клапана, так и перикарда при всех экспериментальных воздействиях изменялся незначительно относительно контроля. В большей степени колебания значений были характерны для диаметра фибрилл. Этот показатель увеличивается в образцах клапанов, подвергнутых облучению, в отличие от перикарда, для которого отмечается уменьшение параметра при данных воздействиях. Ионизирующее излучение вызывает дегидратацию и уплотнение волокон коллагена, что стимулирует появление поперечных шивков и может проявляться в изменении их ультраструктуры [10].



**Рис. 9.** Величина периода (P) и диаметра (D) коллагеновых фибрилл клапана (**A**) и перикарда (**B**) в зависимости от вида воздействия на ткань: 1 – контроль; 2 – замораживание-отогрев; 3 – облучение; 4 – замораживание-отогрев и облучение.

**Fig. 9.** Value of period (P) and diameter (D) of collagen fibrils of valve (**A**) and pericardium (**B**) depending on type of impact on tissue; 1 – control; 2 – freeze-thawing; 3 – irradiation; 4 – freeze-thawing and irradiation.

## Conclusions

Freezing and irradiation cause destructive changes of aortic valve and pericardium cell elements, as well as lead to degradation and loss of surface lining (endothelium, mesothelium). The combined effect of low temperatures and irradiation provides a high devitalization degree of the studied tissues.

The most resistant to freezing and irradiation appeared to be fibrous components of the valve and pericardium tissues, the ultrastructure of those was characterized by preserved architecture of fibrils and protein-polysaccharide complexes.

## References

1. Byzov D.V., Chizh N.A., Mikhaylova I.P. et al. Devitalized vascular prostheses: in vivo study. *Vestnik Transplantologii i Iskusstvennykh Organov* 2011; 12 (4): 81–90.



## Выводы

Замораживание и облучение вызывают деструктивные изменения клеточных элементов аортального клапана и перикарда, а также приводит к деградации и потере поверхностной выстилки (эндотелия, мезотелия). Комбинированное воздействие низких температур и облучения обеспечивает высокую степень девитализации исследуемых тканей.

Наиболее устойчивыми к замораживанию и облучению оказались волокнистые компоненты ткани клапана и перикарда, ультраструктура которых характеризуется сохранением архитектоники фибрилл и белково-полисахаридных комплексов.

## Литература

1. Бызов Д.В., Чиж Н.А., Михайлова И.П. и др. Девитализированные сосудистые протезы, исследование *in vivo* // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2011. – Т. 12, №4. – С. 81–90.
2. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. – М.: Мир, 1975. – 324 с.
3. Conklin B., Richter E., Kreutziger K. et al. Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft // *Med. Eng. & Physics*. – 2002. – Vol. 24, №3. – P. 173–183.
4. Grant R.A., Cox R.W., Kent C.M. The effects of irradiation with high energy electrons on the structure and reactivity of native and cross-linked collagen fibres // *J. Cell Sci.* – 1970. – Vol. 7, №2. – P. 387–405.
5. Grassl E.D., Barocas V. Effects of freezing on the mechanical properties of blood vessels // *ASME Heat Transfer Division HTD*. – 2004. – №375. – P. 699–703.
6. 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, №10. – P. 2975–2983.
7. Muratov R., Britkoc D., Sachkov A. et al. New approach to reduce allograft tissue immunogenicity. Experimental data // *Cardio Vasc. Thorac. Surg.* – 2010. – Vol. 10, №3. – P. 408–412.
8. Ravi S., Chaikof E.L. Biomaterials for vascular tissue engineering // *Regen. Med.* – 2010. – Vol. 5, №1. – P. 107–120.
9. Schoen F., Levy R. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention // *Ann. Thorac. Surg.* – 2005. – Vol. 79, №3. – P. 1072–1080.
10. Seto A., Gatt J.R. Improved tendon radioprotection by combined cross-linking and free radical scavenging // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 2009. – Vol. 467, №11. – P. 2994–3001.
11. Teebken O.E., Haverich A. Tissue Engineering of Small Diameter Vascular Grafts // *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* – 2002. – Vol. 23. – P. 475–485.
12. Valentin J., Stewart-Akers A., Gilbert T. et al. Macrophage participation in the degradation and remodeling of extracellular matrix scaffolds // *Tissue Eng.* – 2009. – Vol. 15, №7, Pt. A. – P. 1687–1694.
13. Yang J., Yamato M., Shimizu T. et al. Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering // *Biomaterials.* – 2007. – Vol. 28, №34. – P. 5033–5043.
2. Conklin B., Richter E., Kreutziger K. et al. Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft. *Med Eng & Physics* 2002; 24 (3): 173–183.
3. Grant R.A., Cox R.W., Kent C.M. The effects of irradiation with high energy electrons on the structure and reactivity of native and cross-linked collagen fibres. *J Cell Sci* 1970; 7 (2): 387–405.
4. Grassl E.D., Barocas V. Effects of freezing on the mechanical properties of blood vessels. *ASME Heat Transfer Division HTD* 2004; 375: 699–703.
5. 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; 12 (10): 2975–2983.
6. Muratov R., Britkoc D., Sachkov A. et al. New approach to reduce allograft tissue immunogenicity. Experimental data. *Cardio Vasc Thorac Surg* 2010; 10 (3): 408–412.
7. Ravi S., Chaikof E.L. Biomaterials for vascular tissue engineering. *Regen Med* 2010; 5 (1): 107–120.
8. Schoen F., Levy R. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *Ann Thorac Surg* 2005; 79 (3): 1072–1080.
9. Seto A., Gatt J.R. Improved tendon radioprotection by combined cross-linking and free radical scavenging. *Clin Orthop Relat Res* 2009; 467 (11): 2994–3001.
10. Teebken O.E., Haverich A. Tissue Engineering of Small Diameter Vascular Grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002; 23: 475–485.
11. Valentin J., Stewart-Akers A., Gilbert T. et al. Macrophage participation in the degradation and remodeling of extracellular matrix scaffolds. *Tissue Eng* 2009; 15 (7), Pt. A.: 1687–1694.
12. Weakley B.S. *Electron microscopy for beginners*. Moscow: Mir; 1975.
13. Yang J., Yamato M., Shimizu T. et al. Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering. *Biomaterials* 2007; 28 (34): 5033–5043.

