

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

Бизов Денис Володимирович

УДК: 57.085.2:615.832.9:617-089.844

**ЗАСТОСУВАННЯ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР ДЛЯ СТВОРЕННЯ
ДЕВІТАЛІЗОВАНИХ СУДИННИХ СКАФOLDІВ**

14.01.35 - кріомедицина

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Харків – 2012

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор,
Заслужений діяч науки і техніки України
Сандомирський Борис Петрович,
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,
завідувач відділу експериментальної кріомедицини, м. Харків

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор,
Лауреат Державної премії України
Фурманов Юрій Олександрович,
Інститут хірургії та трансплантології ім. О.О. Шалімова
АМН України,
завідувач відділу експериментальної хірургії, м. Київ

доктор медичних наук,
Легач Євген Іванович,
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,
головний науковий співробітник відділу кріобіохімії і
фармакології нейро-гуморальних систем, м. Харків

Захист відбудеться «20» березня 2012 р. о «13:30» годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Автореферат розісланий «16» лютого 2012 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради
доктор біологічних наук, професор

Розанов Л. Ф.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Захворювання серцево-судинної системи і, перш за все, атеросклероз та його ускладнення займають перше місце серед причин летальності та інвалідизації дорослого населення економічно розвинених країн світу (Бокерія Л.А., 2008; *Roger V. et al.*, 2011). Загальновизнаним «золотим стандартом» лікування серцево-судинних захворювань, зумовлених облітерацією артерій, що використовується при неефективності медикаментозної терапії та ендоваскулярної ангіопластики / стентування, є операції судинного протезування або шунтування, які являють собою заміну / обхід облітерованого сегменту артерії за допомогою судинних протезів і реваскуляризацію зони ішемії. Судинні графти широко використовуються при гострій травмі та в комплексі допоміжних хірургічних методів лікування невазкулярної патології: формування гемодіалізних артеріо-венозних шунтів, судинні вставки при радикальних операціях та органних трансплантаціях (*Cernadas M.*, 2003; Решетов І.В., 2004; *Marubashi S. et al.*, 2005; Готьє С.В, 2008).

Результати реконструктивних операцій з використанням судинних протезів багато в чому визначаються їх видом та якістю. На теперішній час існує декілька видів судинних графтів. Найкращими замінниками артерій малого діаметру (≤ 6 мм) як і раніше вважаються аутологічні артерії та вени, проте їх використання значною мірою обмежено з різних причин, у тому числі у зв'язку з травматичністю їх виділення. В 30% випадків придатні для трансплантації вени у пацієнта відсутні або залучені у патологічний процес (Бокерія Л.А., 2007). Синтетичні, ало- і ксеногенні графти малого діаметру схильні до гострих тромбозів, відторгнення, хронічного запалення, кальцинозу та гіперпластичної оклюзії (Edelman E., 1999).

Основними якостями ідеального судинного трансплантату повинні бути довгострокова прохідність, біологічна сумісність, механічна міцність, гіпоалергенність та гіпоімуногенність, відсутність токсичності, низька вартість, можливість серійного виробництва та відсутність тромбогенності (*Sarkar S.*, 2007). На теперішній час максимально наближеними до цих якостей є так звані девіталізовані протези, або скафолди, – сучасний напрямок в експериментальній судинній хірургії і трансплантології, що являють собою ділянку ксеносудини, штучним шляхом позбавленої ендотеліального та м'язового шарів.

Сучасні методи девіталізації пов'язані з багаторазовою обробкою ксеносудин розчинами детергентів, ензимів, різноманітних гіпо- та гіпертонічних буферів, яка повинна забезпечувати повну девіталізацію судини і досягнення максимальної гіпоімуногенності (*Tudorache I.*, 2007). Слід зазначити, що використання для девіталізації цитотоксичних речовин та ензимів значно ускладнює подальшу інтеграцію протезу в організм реципієнта, що обумовлено збереженням залишкової цитотоксичності після протезування, і сприяє зменшенню характеристик міцності ксенопротезів за рахунок пошкодження сполучнотканинних волокон судинної стінки (*Funamoto S.*, 2010). Крім того, висока вартість одержуваних графтів також обмежує можливості судинних хірургів повною мірою використовувати девіталізовані судинні ксенографти.

Необхідність використання судинних ксенопротезів як в практичній медицині, так і в наукових дослідженнях не викликає сумнівів. Пошук і реалізація більш ефективних, економічно обґрунтованих методик отримання судинних скафолдів мають величезне значення для створення повноцінних ксенобіопротезів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт відділу експериментальної кріомедицини Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України «Одержання екстрактів з кріоконсервованого ксеногенного матеріалу, їх склад та біологічна дія» (шифр – 2.2.6.33, № держреєстрації 0107U000539).

Мета і задачі дослідження. Мета роботи полягала в експериментальній оцінці ефективності використання низьких температур у комбінації з іонізуючим опроміненням для девіталізації артерій малого діаметру, розробці методики отримання судинних ксеноскафолдів.

Відповідно до поставленої мети передбачалося вирішити наступні задачі:

1. Вивчити *in vitro* характер морфологічних змін артеріальної стінки при девіталізації низькими температурами та іонізуючим опроміненням.
2. Вивчити *in vitro* вплив низьких температур та іонізуючого опромінення на біомеханічні властивості (міцність в поздовжньому та радіальному напрямках, граничну деформацію) артерій малого діаметру.
3. Вивчити *in vivo* біосумісність і ступінь імуногенності артерій після впливу низьких температур та іонізуючого опромінення.
4. Вивчити функціональність, ступінь тромбогенності та особливості біоадаптації артерій, девіталізованих низькими температурами та іонізуючим опроміненням, при ксенотрансплантації в системний кровотік.

Об'єкт дослідження. Вплив низьких температур та іонізуючого опромінення, що застосовуються для девіталізації артерій малого діаметру *in vitro*, на їх морфофункціональні характеристики, у т.ч. після ксенотрансплантації.

Предмет дослідження. Артерії малого діаметру, що підвергалися впливу низьких температур та іонізуючого опромінення, з метою створення девіталізованих ксеноскафолдів.

Методи дослідження. Для вирішення поставлених задач в роботі використовували біомікроскопічні, гістологічні, електронно-мікроскопічні, біофізичні та статистичні методи досліджень. Адекватність функціонування девіталізованих судинних ксенографтів після експериментального протезування оцінювали за клінічними ознаками.

Наукова новизна отриманих результатів. У роботі досліджено принципово новий, що не має світових аналогів, підхід до створення девіталізованих судинних ксенопротезів малого діаметру (≤ 6 мм) з використанням фізичних факторів (заморожування-відігрів та іонізуюче опромінення). Було вперше вивчено вплив комбінованої та ізольованої дії низьких температур та опромінення потоком електронів на морфологічну структуру та біомеханічні властивості артерій. Вперше показано, що обробка артерій досліджуваними фізичними факторами призводить до повної деендотелізації і руйнування гладеньком'язових клітин судинної медії при зберіганні сполучнотканинної структури артеріальної стінки. Показано, що

застосування низьких температур у комбінації з іонізуючим опроміненням знижує імуногенність ксеногенних артерій і уповільнює швидкість їх біодеградації. Отримані результати дозволили розробити методику девіталізації ксеноартерій малого діаметру без використання цитотоксичних хімічних реагентів. Вперше показано, що девіталізовані досліджуваними фізичними факторами ксеногенні артерії адекватно функціонують в системному кровотоці протягом 12 міс без розвитку реакцій відторгнення та імуногенного запалення.

Практичне значення отриманих результатів. В результаті комплексу виконаних робіт виявлено сприятливі характеристики девіталізованих ксеноартерій у вигляді відсутності імуногенних реакцій, стенозів і дилатацій, адекватне функціонування протягом 12 міс. Отримані за результатами експериментів *in vivo* позитивні результати вказують на доцільність проведення доклінічних і клінічних досліджень, які дозволять впровадити девіталізовані ксеноартерії у клінічну практику. З урахуванням анатомічних особливостей використаних в експериментах тварин розроблена експериментальна хірургічна модель, що дозволяє досліджувати судинні протези малого діаметру в системному кровотоці, особливістю якої є можливість тривалого передавлення аорти кролика без розвитку клінічно значущих патологічних змін, викликаних ішемією. Визначено основні напрямки подальших досліджень, що дозволять вивести розроблені девіталізовані судинні ксенопротези на рівень доклінічних і клінічних досліджень і створити кріобанк судинних ксенографтів.

Особистий внесок здобувача. Вибір теми дисертаційного дослідження, постановка мети та задач, вибір об'єкту і методів дослідження, обговорення отриманих експериментальних результатів і формулювання висновків були виконані під керівництвом професора Б.П. Сандомирського. Представлені для захисту наукові результати отримані, оброблені та проаналізовані дисертантом особисто. Автор самостійно опрацював спеціалізовану літературу по темі дисертації, провів інформаційно-патентний пошук, виконав експериментальні дослідження, прийняв активну участь у написанні та підготовці до публікації всіх статей і тез по темі дисертаційної роботи, провів статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, розробив основні положення та висновки дисертації. При виконанні окремих розділів методичну та консультативну допомогу надали співробітники Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. В опублікованих у співавторстві роботах особистий внесок здобувача полягає в наступному:

- в роботах [1,3,4,6,11,12] – в заборі, препаруванні та обробці артерій, визначенні біомеханічних характеристик, аналізі результатів вимірювань і гістологічних даних;

- в роботах [2,7,8,13] – в підготовці експериментального матеріалу, виконанні хірургічних втручань з ксеноімплантації ділянок артерій, аналізі отриманих результатів та літературних даних;

- в роботах [5,9,10,14] – в заборі, підготовці та обробці артерій, виконанні хірургічних втручань з ксенопротезування сегменту черевної аорти у кролів, веденні післяопераційного періоду, аналізі гістологічних досліджень.

Апробація результатів дисертації. Основні положення роботи були представлені та обговорені на: VII Міжнародній Парнасівській конференції, Ялта, 3-7 жовтня, 2009р; Міжнародній конференції «*SLTB Annual Scientific Meeting "Application of Cryobiology from Human Tissue Engineering to Plant Genebank Integration"*», Гановер, Німеччина, 7-9 вересня, 2009р; Міжнародних конференціях «Холод в біології та медицині», Харків, 28-29 травня 2009р, 27-28 травня 2010р, 18-19 травня 2011р; Міжнародній конференції «*47th Annual Meeting of the Society for Cryobiology "Cryo-2010"*», Брістоль, Великобританія, 17-20 липня, 2010р; XIX Міжнародній конференції з фізики радіаційних явищ та радіаційного матеріалознавства, Алушта, 6-11 вересня, 2010р; V Всеросійському з'їзді трансплантологів, Москва, 8-10 жовтня, 2010р; V з'їзді трансплантологів України, Харків, 5-7 жовтня, 2011р; Міжнародній конференції «*4th Joint ESAO-IFAO Congress*», Порто, Португалія, 9-12 жовтня 2011р.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 14 наукових робіт, які повністю відображають основний зміст дисертації, в тому числі 4 статті в спеціалізованих фахових наукових виданнях України, 1 стаття в іноземному науковому журналі та 9 тез доповідей – у збірках наукових праць науково-практичних конференцій, з'їздів, симпозіумів.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація викладена на 146 сторінках друкованого тексту, з яких 116 сторінок основного змісту. Робота включає в себе наступні розділи: вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень та їх обговорення, узагальнення, висновки та бібліографічний список з 272 джерел, які викладено на 30 сторінках. Робота ілюстрована 47 малюнками та 5 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження. Всі експерименти проведені відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених III Національним конгресом з біоетики (Київ, 2007) і узгоджених з положеннями «Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985).

Об'єктом дослідження були внутрішні грудні артерії свині (*a.thoracica interna*), виділені у безпородних свиней віком 8-10 міс протягом 20хв після забою на Харківському м'ясокомбінаті. Артерії ретельно препарували, видаляли жирові привіски і надлишки сполучної тканини з боку адвентиціальної оболонки. Внутрішній діаметр виділених артерій варіював від 2,5 до 3,5 мм, довжина – від 5 до 20 см. Судини тричі промивали охолодженим до +4 ° С стерильним фізіологічним розчином з додаванням антибіотиків і протигрибкових препаратів (100 МЕ/мл пеніциліну, 100 мг/мл стрептоміцину, 6 мг/мл флуконазолу).

Промиті артерії поміщали в стерильні полімерні кріоконтейнери ("*Eurotubo, Deltalab*", Іспанія), не допускаючи деформування судинної стінки в поздовжньому і поперечному напрямках. У подальшому пробірки занурювали в рідкий азот, де і зберігали до моменту використання. Максимальний термін зберігання складав 3

місяці. Інтервал часу від моменту виділення артерій до заморожування не перевищував 4 годин.

Відігрів пробірок виконували на водяній бані при $+36^{\circ}\text{C}$. Відігріті зразки транспортували в Національний науковий центр Харківський фізико-технічний інститут (ННЦ ХФТІ НАН України), де за допомогою лінійного прискорювача електронів ЛУЕ-10 проводили їх опромінення потоком електронів у двох експериментальних режимах: 25 кГр і 50 кГр. При цьому енергія опромінення становила до 10 МеВ, а середній струм – 1 мА. Дозу 25 кГр вибрано як мінімально необхідну для забезпечення стерильності медичних матеріалів (ISO/TS13409: 2002). Верхню дозу опромінення було вибрано як максимально допустиму для збереження сполучнотканинних волокон (Хількін А.М. та ін, 1976; Seto A. *et al.*, 2008). У процесі опромінення температуру зразків постійно контролювали (не більше 25°C) з метою попередження теплової денатурації сполучнотканинних структур. Час від моменту відігріву контейнерів до моменту початку опромінення знаходився у межах 90-120 хв. Для вивчення ізольованої дії іонізуючого опромінення на артерії свині у вищевказаних режимах також опромінювали нативні судини. Зберігання зразків після опромінення здійснювали в парах рідкого азоту на рівні 15см над поверхнею дзеркала рідкого азоту при температурі від -150 до -170°C .

В процесі дослідження були виділені наступні групи артерій: 1. Артерії після заморожування-відігріву; 2. Артерії, опромінені в дозі 25 кГр; 3. Артерії, опромінені в дозі 50 кГр; 4. Артерії після заморожування-відігріву і наступного опромінення в дозі 25 кГр; 5. Артерії після заморожування-відігріву і наступного опромінення в дозі 50 кГр. У всіх експериментах групою контролю вважали нативні артерії свині.

Після експериментальних впливів, сегменти артерій, які були взяті на гістологічне дослідження, фіксували в 10%-ному нейтральному формаліні, зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації та заключали в парафін. Виготовляли зрізи завтовшки 5-7мкм, які фарбували гематоксиліном і еозином для отримання оглядових гістопрепаратів. Враховуючи еластичний тип досліджуваних артерій і важливість чіткої диференціації внутрішньої еластичної мембрани (ВЕМ), стан сполучнотканинних волокон судинної стінки оцінювали в препаратах, пофарбованих за Ван-Гізоном в модифікації *Verhoeff* (Carson F. *et al.*, 2009). Морфологічний аналіз ендотеліального шару проводили за допомогою імпрегнації сріблом міжендотеліальних границь за Zand T. (1982) в модифікації Кондакова І.К. (2000).

Морфометричні вимірювання артерій після досліджуваних фізичних впливів виконували на гістологічних зрізах за допомогою програмного забезпечення *BioVision 4.0* і *AxioVision 4.8*. Товщину судинної стінки вимірювали в 20 точках по всьому периметру артерії на 7 різних гістологічних зрізах та вираховували середнє значення. Внутрішній периметр артерії вимірювали на 7 поперечних зрізах і обчислювали середній показник. Внутрішній та зовнішній радіуси судинного просвіту розраховували для кожної з 20 обраних точок на 7 різних зрізах за формулами:

$$R_{\text{вн}} = \frac{P}{2\pi} \quad (1),$$

$$R_{\text{зовн}} = R_{\text{вн}} + h \quad (2),$$

де: $R_{\text{вн}}$ – внутрішній радіус артерії;
 R – внутрішній периметр, мм;
 $R_{\text{зовн}}$ – зовнішній радіус, мм;
 h – товщина судинної стінки, мм.

Ультраструктуру артеріальної стінки досліджували за допомогою електронного мікроскопу ПЕМ-125К при напрузі прискорення 75 kV, обладнаного системою зйому та аналізу зображення САЗ - 01А (АТ "SELMI", м. Суми) з використанням CCD камери DX-2 і пакету програм фірми "КАРРА" (Німеччина).

Біомеханічні властивості артерій досліджували на базі кафедри опору матеріалів Національного технічного університету «Харківського політехнічного інституту» (НТУ ХПІ). Вимірювання міцності в поздовжньому напрямку (*strength-test*), пружності і показника максимального розтягнення артерій проводили на універсальному деформуючому пристрої *FP 100/1* (*VEB TIW Rauenstein*, Німеччина).

З метою зменшення можливих похибок вимірювань, викликаних неоднорідністю судинної стінки на різних ділянках однієї артерії, на підставі абсолютних показників навантаження, прикладеного в певну одиницю часу, був обчислений відповідний показник напруження артеріальної стінки за формулою:

$$\sigma = F/S \quad (3),$$

де: σ – напруження, МПа;
 S – площа поперечного перетину артерії, м².

Для визначення останнього, поперечний зріз кожного артеріального сегменту, взятий безпосередньо перед проведенням випробування, вимірювали з точністю до 10 мкм на мікроскопі *Meiji Techno* (Японія) в 10 точках за периметром і розраховували середнє значення.

Значення відносної деформації судинної стінки, відповідне кожному показнику напруження вираховували за формулою:

$$\varepsilon = \left(\frac{L_1 - L}{L} \right) * 100\% \quad (4),$$

де: ε – відносна деформація, %;
 L – початкова довжина артеріального сегменту, мм;
 L_1 – довжина артеріального сегменту, деформованого при визначеному напруженні, мм.

Вивчення міцності артерій в радіальному напрямку (*burst-test*) проводили на пристрої, що складається з ресивера з електронним датчиком тиску *MPX-5700DP* (*Freescale Semiconductor*, Китай).

Статистичні дані оцінювали за універсальним критерієм достовірності Манна-Уїтні за допомогою програми *SPSS Statistics 17.0*. Відмінності вважали достовірними при $p < 0,05$. Кількісні дані в тексті дисертації представлені у вигляді середніх значень і стандартних девіацій. Діаграми та графіки вистроювали та обробляли за допомогою програмного забезпечення *Origin Pro 8* і *Microsoft Excel 2007*.

Для вивчення біосумісності і ступеню імуногенності артерій на етапах девіталізації виконували їх ксеноімплантацію. Дослідження проводили на 80 самках щурів лінії *Wistar*, віком 3 міс і масою тіла 100-150г. Імплантацію сегментів артерій виконували під шкіру. На термінах 3, 7, 14 діб, 4 та 8 тижнів після операції тварин виводили з експерименту, імплантовану ділянку артерії вилучали. Оцінювали макроскопічну реакцію тканин на імплантат, а також ступінь клітинної інфільтрації вилучених артеріальних лоскутів і оточуючих їх тканин на гістологічних препаратах за допомогою оптичної мікроскопії.

Вивчення функціональності, гемосумісності і ступеню тромбогенності проводили на безпородних кролях віком 2 роки, з масою тіла 3,200 - 4,500г. Було виконано 10 операцій ксенопротезування інфраренального сегменту черевної аорти з використанням у якості судинних графтів девіталізованих ксеноартерій. Антикоагулянтні та антиагрегантні препарати в післяопераційному періоді не застосовували.

Результати досліджень та їх обговорення

Вплив низьких температур та опромінення потоком електронів на морфологічну структуру артерій. Макроскопічна структура артерій після заморожування-відігрівання не змінювалася порівняно з нативними артеріями. При відсутності деформацій артерій під час заморожування судини після відігрівання зберігали початкову форму і не спадалися.

Заморожування до температури рідкого азоту призводило до формування широких деендотелізованих полів, що виражалось в деструкції і розпаді цементних ліній, які характеризують стан міжклітинних контактів. Збережені групи ендотеліоцитів характеризувалися гетерогенністю за площею та поліморфізмом клітин, виявлялися мікрODEфекти міжендотеліальних контактів. У збережених ендотеліюцитах спостерігалось набухання ядер, деструкція органел і розриви цитолемми. Базальна мембрана, що розташовується під ендотелієм, практично не ушкоджувалася. ВЕМ зберігала структурну цілісність і не зазнавала деформацій (рис.1a). У середньому шарі артеріальної стінки після заморожування-відігріву визначалися деформації, розволокнення та численні поздовжньо-орієнтовані мікророзриви м'язових волокон, що пов'язано з механічними напруженнями, які зазнає стінка судини внаслідок кристалоутворення (рис.2a). Для гладеньком'язових клітин (ГМК) були характерні зміни форми і ультраструктури ядер, які виявлялися у вигляді відсутності інвагінацій каріолемми і розрихлення гетерохроматину, що свідчить про набухання ядер. Еластичні волокна характеризувалися зниженням звитості і компактним розташуванням. Ймовірно, ці зміни пов'язані з формуванням зшивок між сполучнотканинними волокнами, їх зближенням за рахунок заповнення

простору деформованих м'язових волокон, а також частковою дегідратацією судинної стінки. Компактне розташування сполучнотканинних волокон після заморожування-відігрівання також обумовлене їх «зв'язуванням» між собою під дією тиску кристалів льоду, що утворюються в позаклітинному матриксі. Цілісність сполучнотканинних волокон, їх безперервність, впорядкованість і просторове орієнтування не порушувалися.

Іонізуюче опромінення призводило до повної десквамації ендотелію незалежно від поглиненої дози. ВЕМ переважно зберігала структурну цілісність. Судинна медія характеризувалася розрихленням м'язових волокон при наявності сегментованих і деформованих ядер ГМК, які також характеризувалися наявністю гетерохроматину високої електронної щільності і розширеним перінуклеарним простором. Спостерігався осередковий лізис плазмолемми, фрагментація базальних мембран і вакуолізація цитоплазми ГМК. Виявлялося ущільнення і компактне розташування сполучнотканинних волокон, зменшення їх звитості, що нагадує морфологічні зміни після дії на артерії низьких температур. Структурна цілісність еластичних мембран і колагенових волокон переважно зберігалася. Слід зазначити, що опромінення в дозі 50 кГр призводило до певного набухання еластичних мембран і формування поодиноких ділянок їх розволокнення, що свідчить про початкові деструктивні зміни сполучнотканинних волокон. При цьому їх структурна цілісність, безперервність і просторове орієнтування не порушувалися. Адвентиціальний шар в обох групах опромінених артерій був представлений рихлими сполучнотканинними волокнами і не змінювався у порівнянні з нативом.

Комбінування заморожування-відігріву і подальшого іонізуючого опромінення дозволило домогтися не тільки довгострокового зберігання артерій, а й максимальної ушкоджуючої дії на клітинні елементи судинної стінки. Аналіз стану артеріальної стінки після впливу низьких температур та опромінення не показав суттєвої різниці в їх ультраструктурному стані в залежності від поглиненої дози. Інтима девіталізованих артерій була представлена добре збереженою ВЕМ, контури якої чітко диференціювалися, порушення безперервності не спостерігалися. Ендотеліальний шар був відсутній по всій довжині артерії. Середня оболонка складалася з рихлих і деформованих м'язових волокон, на протязі яких визначалися великі електронно-світлі порожнини з фрагментами зруйнованих ГМК (рис.16). Структурна цілісність і безперервність сполучнотканинних волокон після обох доз опромінення переважно зберігалися, при цьому, на відміну від ізольовано опромінених артерій, ділянки їх розволокнення були відсутні (рис.26). Описані зміни свідчать про те, що попереднє заморожування-відігрівання мінімізує початкову ушкоджуючу дію іонізуючого опромінення на структуру сполучнотканинних волокон артерій свині. При цьому клітинні елементи судинної стінки після комбінованої дії двох фізичних факторів зазнають деструкції.

Морфометричні показники судинної стінки після впливу низьких температур та іонізуючого опромінення. Як видно з таблиці 1, товщина судинної стінки змінювалась у всіх групах оброблених артерій, проте не завжди супроводжувалася відповідними змінами люмінального периметру, внутрішнього

($R_{\text{вн}}$) і зовнішнього ($R_{\text{зовн}}$) радіусу. Ймовірно, це пов'язано з різною чутливістю сполучнотканинних волокон і ГМК судинної стінки до досліджуваних фізичних факторів.

Таблиця 1.

Морфометричні показники артеріальної стінки на етапах девіталізації

Експериментальні групи	Показники			
	Товщина стінки, мкм	Периметр, мм	$R_{\text{вн}}$, мм	$R_{\text{зовн}}$, мм
Нативні артерії	240,69±35,2	10,99±0,29	1,75±0,05	1,99±0,05
Артерії після заморожування	205,17±18,9 ^a	10,88±0,12	1,73±0,02	1,93±0,02 ^a
Артерії після опромінення 25 кГр	183,79±22,7 ^{a,b}	10,86±0,23	1,73±0,04	1,91±0,04 ^a
Артерії після опромінення 50 кГр	228,19±32,8 ^{a,b}	12,12±0,6 ^{a,b}	1,93±0,09 ^{a,b}	2,16±0,09 ^{a,b}
Артерії після заморожування та опромінення 25 кГр	189,69±15,8 ^{a,b,c}	10,53±0,36 ^{a,b}	1,68±0,06 ^{a,b}	1,87±0,05 ^{a,b,c}
Артерії після заморожування та опромінення 50 кГр	177,6±15,9 ^{a,b,c}	10,48±0,13 ^{a,c}	1,67±0,02 ^{a,c}	1,85±0,02 ^{a,c}

Примітка: ^a Достовірно ($p < 0,05$) відносно групи контролю;

^b Достовірно ($p < 0,05$) відносно попередньої групи;

^c Достовірно ($p < 0,05$) відносно опромінених тією ж дозою артерій без попереднього заморожування-відігріву.

Так, товщина артеріальної стінки після заморожування-відігріву зменшується за рахунок зниження $R_{\text{зовн}}$, що пояснюється зближенням еластичних мембран судинної медії, їх вкороченням внаслідок скорочення розрихлених м'язових волокон і частковою дегідратацією судинної стінки. Слід зазначити, що внутрішній периметр і $R_{\text{вн}}$ безпосередньо залежать від властивостей ВЕМ, яка відмежовує судинний просвіт. Відсутність змін даних показників пов'язана як зі стійкістю структури ВЕМ до заморожування-відігріву, так і з малою кількістю м'язових волокон поблизу просвіту артерії.

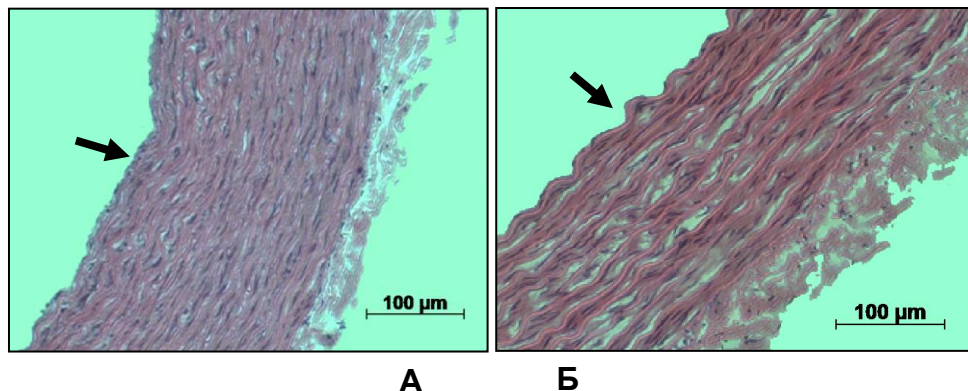


Рис. 1. Морфологічна структура артеріальної стінки, забарвлення гематоксилином та еозином, х200.

А – артерія після заморожування-відігріву;

Б – артерія після комбінованої дії низьких температур і опромінення 25 кГр;

Стрілкою позначена люмінальна поверхня судини.

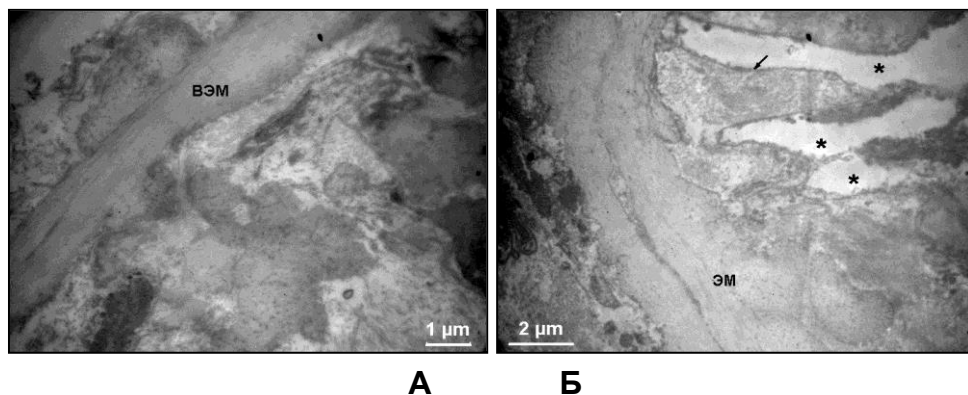


Рис. 2. Ультраструктура артеріальної стінки.

А – збереженість ВЕМ після заморожування;

Б – повна деструкція ГМК у вигляді електронно-світлих порожнин (*) і збереженість волокон після комбінації заморожування-відігріву та опромінення 25 кГр.

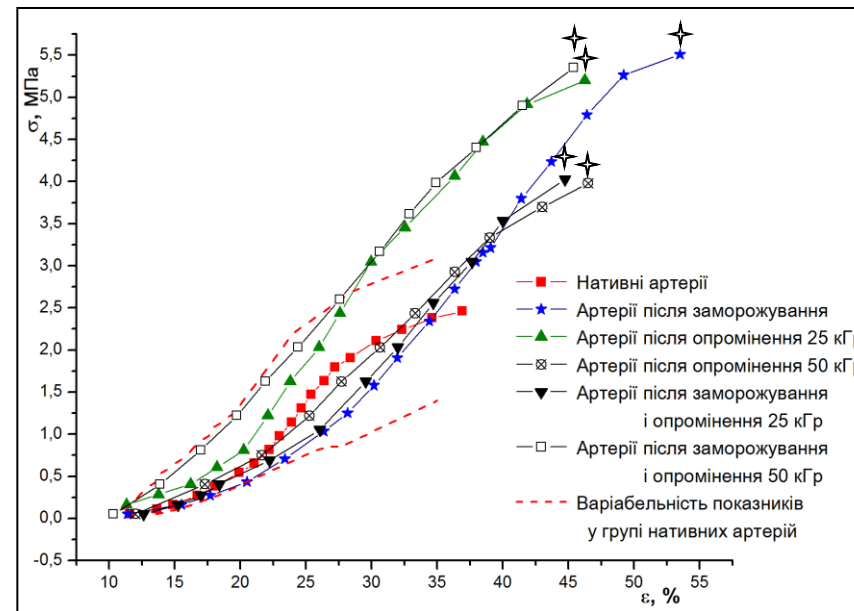


Рис. 3. Залежність відносної деформації судинної стінки від прикладеного навантаження.

✦ – достовірно ($p < 0,05$) відносно контролю.

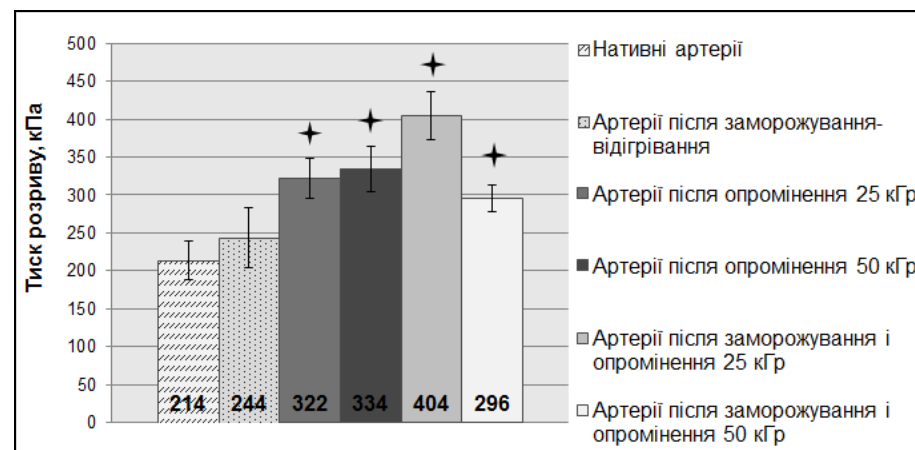
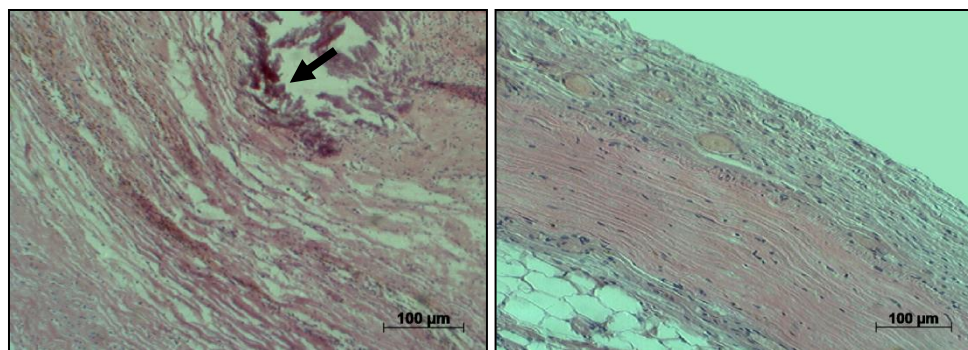
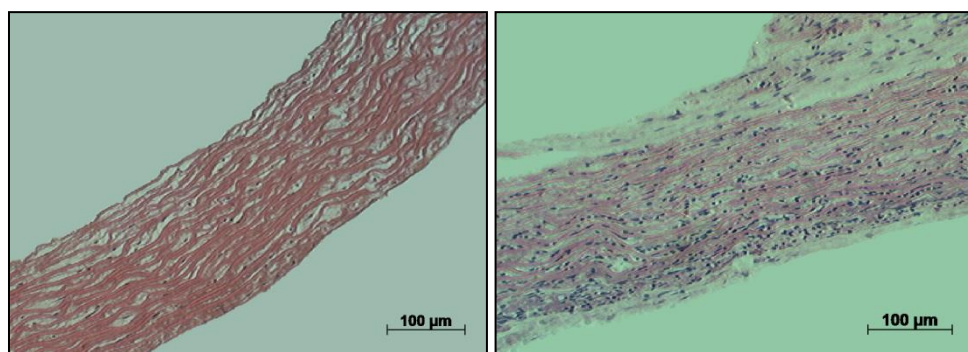


Рис. 4. Механічна міцність артерій в радіальному напрямку, кПа.

✦ – достовірно ($p < 0,05$) відносно контролю.

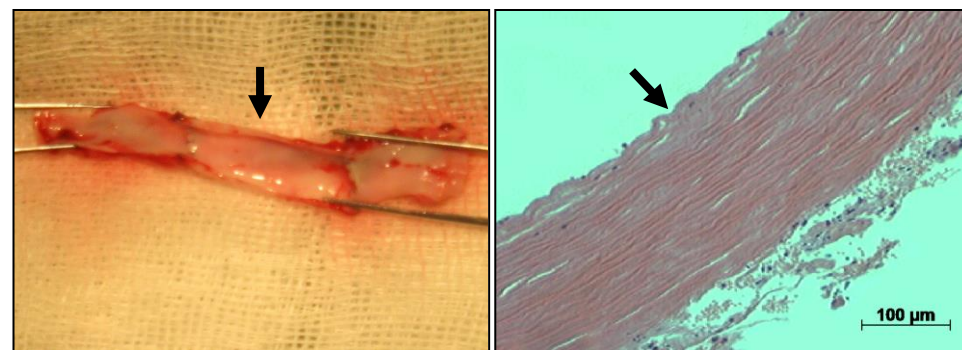


А Б



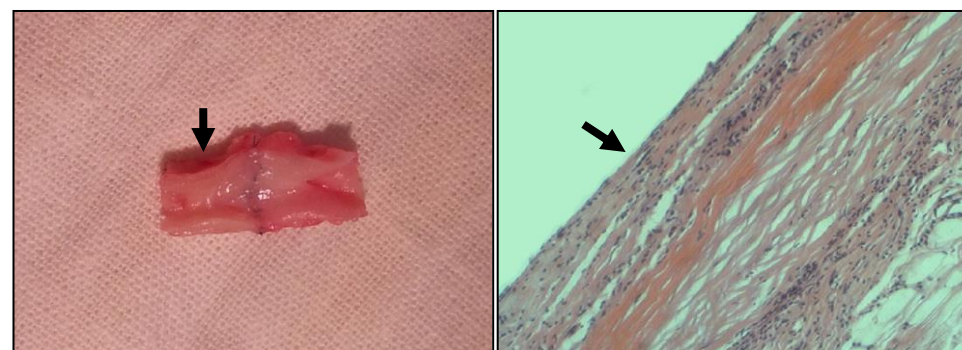
В Г

Рис. 5. Імплантація під шкіру, 8 тижнів після операції.
 А – нативні артерії; стрілкою позначена ділянка кальцинозу;
 Б – артерії після заморожування-відігріву;
 В – артерії після заморожування і опромінення 25 кГр;
 Г – артерії після заморожування і опромінення 50 кГр.
 Забарвлення гематоксиліном та еозином, х200



А Б

Рис. 6. Девіталізований графт, 7 діб після операції.
 А – макроскопічна картина, стрілкою позначений протез;
 Б – стінка протезу, забарвлення гематоксиліном та еозином, х200; стрілкою позначена люмінальна поверхня.



А Б

Рис. 7. Девіталізований графт, 12 міс після протезування.
 А – макроскопічна картина, стрілкою позначений протез;
 Б – стінка протезу, забарвлення гематоксиліном та еозином, х200; стрілкою позначена люмінальна поверхня.

Зміни товщини артеріальної стінки після опромінення потоком електронів безпосередньо залежали від величини поглиненої дози. Опромінення дозою 25 кГр призводило до змін, схожих з групою артерій після заморожування-відігріву: товщина судинної стінки зменшувалася за рахунок зниження $R_{\text{зовн}}$. При цьому товщина стінки артерій після опромінення була достовірно меншою відносно групи артерій після заморожування-відігріву. Ймовірно, це пов'язано з більш вираженим зближенням еластичних мембран, їх зв'язуванням між собою і компактним розташуванням за рахунок заповнення простору зруйнованих ГМК.

Підвищення дози опромінення до 50 кГр також призводило до зменшення товщини судинної стінки, але переважно за рахунок збільшення $R_{\text{вн}}$. Описані зміни пов'язані з двома процесами, що відбуваються паралельно: скорочення і зв'язування ВЕМ з підлеглими структурами під дією більш високої дози опромінення і певним набуханням сполучнотканинних волокон судинної медії.

Товщина артеріальної стінки після комбінованої дії заморожування-відігріву і опромінення потоком електронів зменшувалася за рахунок $R_{\text{зовн}}$, що нагадує зміни після ізолюваного заморожування-відігріву, при цьому також відмічалася зменшення внутрішнього периметру і $R_{\text{вн}}$ при обох дозах опромінення. Таким чином, при комбінованому впливі двох досліджуваних фізичних факторів спостерігалися зміни, характерні для кожного з них окремо. При цьому вираженість ефекту опромінення була меншою після попереднього заморожування-відігрівання в порівнянні з ізолюваним опроміненням. Так, на відміну від ізолюваного опромінення артерій в дозі 50 кГр, після попереднього заморожування-відігріву внутрішній периметр, $R_{\text{вн}}$ і $R_{\text{зовн}}$ зменшувалися, що свідчить про відсутність значущого зв'язування ВЕМ з підлеглими структурами.

Біомеханічні властивості ксеногенних артерій на етапах девіталізації. Адекватні біомеханічні характеристики артеріальних протезів є важливим компонентом їх функціональності, корелюючим з міцністю швів судинних анастомозів і резистентністю артерій до дилатації *in vivo* (Mitchell S., 2003). Усереднені по всіх вимірюваних зразках криві залежності напруження-деформація нативних артерій і артерій після девіталізації наведені на рис.3.

Всі криві мали характерну для сполучнотканинних структур S-подібну форму, з чітко диференційованими ділянками, що відповідають в'язкій течії, пружній деформації і напруженню руйнування тканини. Початкові відрізки кривих, що характеризують, в основному, ковзання окремих фібрил у волокні відносно одна одної (Глазер Р., 1988), відповідають області фізіологічних навантажень на артерії і для всіх досліджуваних груп знаходяться в межах границь варіабельності нативних судин. Довжина областей пружної деформації всіх груп оброблених артерій в значній мірі перевищує даний показник в нативних артеріях, тобто прикладене навантаження, яке викликає початкове руйнування окремих сполучнотканинних фібрил в групі нативних артерій, призводить лише до додаткового їх подовження після впливу досліджуваних фізичних факторів.

Як видно з таблиці 2, заморожування-відігрів достовірно підвищує міцність (σ_p) і граничну деформацію (ε_p) артерій в поздовжньому напрямку, що пояснюється зближенням і компактним розташуванням сполучнотканинних волокон. Збільшення

максимального розтягнення артерій переважно за рахунок області пружної деформації свідчить про наявність молекулярних взаємодій між фібрилами колагену, оскільки за рахунок свого розташування уздовж довжини судини, саме вони зазнають основного навантаження при поздовжній одноосовій деформації.

Опромінення потоком електронів також призводило до підвищення міцності артерій і збільшувало показник відносного подовження за рахунок формування додаткових внутрішньо- і міжмолекулярних кросслінк-зшивок між окремими колагеновими фібрилами (Fratzl P., 2008). Слід зазначити, що підвищення дози опромінення до 50 кГр призводило до певного зниження граничної міцності артерій у порівнянні з 25 кГр, при збереженні її вище рівня нативних судин. Це пов'язано з початковими деструктивними змінами фібрилярних білків судинної стінки і появою розривів в ланцюгах фібрил, що узгоджується з даними мікроскопії і морфометрії.

Таблиця 2.

Біомеханічні показники артерій

Досліджувані групи	Показники	
	σ_p , МПа	ε_p , %
Нативні артерії	2,47±0,64	36,92±6,81
Артерії після заморожування-відігріву	5,51±0,91*	53,58±12,34*,***
Артерії після опромінення 25 кГр	5,22±0,72*	46,24±10,12*
Артерії після опромінення 50 кГр	4,06±0,66*,**	46,2±11,2*
Артерії після заморожування-відігріву та опромінення 25 кГр	4,03±0,87*	44,73±11,3*
Артерії після заморожування-відігріву та опромінення 50 кГр	5,35±0,82*,**	45,4±5,96*

Примітка. * – достовірно ($p < 0,05$) відносно контролю (нативні артерії);

** – достовірно ($p < 0,05$) відносно артерій з меншою дозою опромінення;

*** – достовірно ($p < 0,05$) відносно всіх досліджуваних груп.

Вплив на артерії іонізуючим опроміненням в дозі 25 кГр після попереднього заморожування-відігріву також призводило до достовірного підвищення міцності на розрив, проте цей показник був нижчий рівня ізолюваного опромінення. Слід також зазначити, що підвищення дози опромінення до 50 кГр, на відміну від ізолюваного опромінення, призводило до достовірного підвищення міцності артерій у порівнянні з 25 кГр, що пояснюється відсутністю значущих розривів в ланцюгах сполучнотканинних фібрил. Одержані результати підтверджують припущення про наявність радіопротекторної дії процесу заморожування-відігріву на сполучнотканинну структуру артеріальної стінки.

Міцність артерій в радіальному напрямку достовірно підвищувалася у всіх групах опромінених артерій (рис. 4). Слід зазначити, що при двоосному деформуванні, на відміну від одноосного, навантаження рівномірно розподіляється на колагенові та еластинові волокна судинної стінки. При цьому менша міцність еластичних волокон зумовлює більш низькі показники максимального напруження артеріальної стінки при біаксимальному деформуванні в порівнянні з моноаксимальним.

Механізм підвищення міцності артерій після опромінення в радіальному напрямку представляється схожим з одноосною деформацією. Проте процес заморожування-відігріву не впливав на цей показник, що, ймовірно, пов'язано з мінімальними змінами еластичних волокон.

Біосумісність і ступінь імуногенності артерій після заморожування-відігріву та іонізуючого опромінення. Результати ксеноімплантації продемонстрували розвиток вираженого гострого імуногенного запалення, яке переходило в хронічний процес в групі нативних артерій, що призводило до деструкції сполучнотканинних волокон судинної стінки, формування осередків кальцинозу і ранньої біодеградації імплантату (рис.5а). Реакція на заморожені-відігріті артерії була менш вираженою і проявлялася лише у помірній лейкоцитарній інфільтрації на ранніх термінах спостереження, ущільненні і склерозуванні волокон, розростанні сполучної тканини навколо імплантату до 8-го тижня спостереження (рис.5б). Гострі клітинні реакції в групах артерій після заморожування та опромінення в обох дозах не відзначалися. На 2-му тижні спостереження виявлялися поодинокі макрофагальні «острівці» в судинній стінці. До 8 тижня було виявлено рівномірне заселення судинної медії макрофагами і клітинами фібробластичного ряду, які є невід'ємним компонентом процесу ремоделювання біоімплантату (Badylak S. et al., 2008; Valentin J. et al., 2009). При цьому спостерігалось збереження структурної цілісності сполучнотканинних волокон (рис.5 в, г).

Результати ксенопротезування сегменту черевної аорти. Було виконано 10 експериментальних операцій судинного протезування. Відмова від використання антикоагулянтних препаратів дозволила оцінити гемосумісність внутрішньої поверхні протеза в несприятливих умовах напруженої згортально-протизгортальної системи крові, активованої операційною травмою, крововтратою і розкриттям судинного просвіту. Всі трансплантовані біологічні графти зберігали функціональність в повному обсязі. Гострі тромбози і стенотичні зміни, викликані властивостями протеза, на ранніх і віддалених термінах спостереження були відсутні.

Гістологічне дослідження девіталізованих протезів продемонструвало відсутність реакцій відторгнення та імуногенного запалення на всіх строках спостереження. Вже на 1-у добу післяопераційного періоду було виявлено значний ступінь лізису залишившихся фрагментів ГМК. До 7-ї доби спостереження макроскопічно протез зберігав початковий вигляд, візуально люмінальна поверхня не відрізнялася від аорти (рис.6а). Сполучнотканинна структура протезу не ушкоджувалася і була представлена впорядковано розташованими, безперервними волокнами без ознак біодеградації і деструктивно-некротичних змін. Клітинні

фрагменти не візуалізувалися (рис.6б). В параанастомозній зоні визначалися окремі групи ендотеліоцитів. До 15-ї доби післяопераційного періоду було виявлено формування численних вогнищ ендотелізації по всій довжині люмінальної поверхні протезу, заселення судинної медії поодинокими макрофагами і початок формування *vasa vasorum* в адвентиціальному шарі. У терміни 6-9 міс після операції деструктивно-дегенеративні зміни з боку біопротезу були відсутні. В цей період в судинній медії виявлялися поодинокі макрофаги, фіброblastи і ГМК при збереженні повноцінної сполучнотканинної структури стінки протезу. Максимальне заселення стінки протезу клітинами реципієнта було виявлено в період 9-12 міс після трансплантації. Так, до 12 міс спостереження відзначалося значне збільшення кількості клітин, переважно фіброblastів, в судинній медії, при збереженні цілісності і впорядкованості сполучнотканинної структури девіталізованих судин. Деструктивно-некротичні зміни були відсутні по всій довжині графту. Люмінальна поверхня протезу візуально не відрізнялася від аорти, пристінкові тромби і стенотичні зміни були відсутні (рис.7). Інтима була представлена чисельними вогнищами ендотелізації при відсутності безперервної вистілки, що пов'язано з незавершеним до даного терміну ремоделюванням і триваючим процесом оновлення сполучнотканинної структури протезу, у т.ч. парантимальної зони. Оскільки стійка ендотелізація неможлива без повноцінної регенерації інших судинних структур, що пов'язано з потребою в структурних, метаболічних і функціональних зв'язках з медіальним шаром, і структурно-функціональної єдності регенеруючих судинних структур, наявність чисельних вогнищ ендотелізації в умовах незавершеного ремоделювання біологічного графту представляється сприятливим результатом.

Таким чином, максимальний термін спостереження після трансплантації склав 12 міс. Протягом всього післяопераційного періоду девіталізовані ксенографти адекватно функціонували, забезпечуючи достатнє кровопостачання. Ознаки відторгнення, імуногенних запалень, стенозів і аневризматичних дилатацій були відсутні.

За результатами проведених досліджень виявлено позитивні характеристики ксеногенних артерій, девіталізованих низькими температурами та іонізуючим опроміненням, які обґрунтовують доцільність подальших досліджень і можливість їх впровадження в клінічну практику.

ВИСНОВКИ

Дисертаційна робота містить теоретичне та експериментальне обґрунтування нового підходу – комбінованої дії низьких температур та іонізуючого опромінення – для девіталізації ксеноартерій малого діаметру. Переваги використання зазначених фізичних факторів полягають у чіткому дозуванні, можливості стандартизації, стерилізації, тривалого зберігання біоматеріалу та відсутності пролонгації цитотоксичної дії.

1. Заморожування до -196°C призводить до часткової деендотелізації люмінальної поверхні артеріальної стінки і мікророзривам м'язових волокон

судинної медії. При цьому сполучнотканинні волокна і ВЕМ зберігають просторове розташування і структурну цілісність.

2. Опромінення артерій потоком електронів в дозах 25 і 50 кГр викликає повну деендотелізацію і виражену деструкцію ГМК. Виявлено, що опромінення в дозі 25 кГр не чинить суттєвого впливу на структуру колагенових волокон і еластичних мембран. При опроміненні в дозі 50 кГр формуються поодинокі осередки початкових деструктивних змін сполучнотканинних волокон, що не викликають порушення їх цілісності.

3. Попереднє заморожування до -196°C -відігрів артерій свині зменшує ушкоджуючу дію іонізуючого опромінення на колагенові волокна та еластичні мембрани, що підтверджується відсутністю осередків деструктивних змін і набухання сполучнотканинних волокон після заморожування-відігрівання та опромінення в дозі 50 кГр. Виявлений факт дозволяє варіювати дозу опромінення від 25 до 50 кГр без розвитку виражених пошкоджень сполучнотканинної структури артерії.

4. Механічна міцність артерій після досліджуваних фізичних впливів не знижується. Заморожування до -196°C -відігрів призводить до підвищення міцності судин у поздовжньому напрямку в 2 рази і не впливає на міцність в радіальному напрямі. При цьому пружність заморожених-відігрітих артерій в межах фізіологічних навантажень залишається на рівні нативних судин.

5. Іонізуюче опромінення призводить до підвищення біомеханічної міцності артерій у взаємно-перпендикулярних напрямках. Причому більша доза опромінення викликає формування більш міцної, стійкої сполучнотканинної структури. Пружність опромінених артерій в межах фізіологічних навантажень зберігається на рівні нативних судин.

6. Артерії свині після заморожування до -196°C -відігріву викликають менш виражені імуногенні клітинні реакції при ксеноімплантації у порівнянні з нативними судинами, які характеризуються гострим запаленням і формуванням кальцинозу. Подальше опромінення артерій потоком електронів в дозах 25 і 50 кГр призводить до гіпоімуногенності ксеноартерій, що обумовлено руйнуванням клітинних компонентів судинної стінки.

Протезування аорти девіталізованими ксенографтами без використання антикоагулянтних і антиагрегантних препаратів продемонструвало відсутність тромбогенності і реакцій відторгнення. Девіталізовані ксеногенні артерії повноцінно інтегруються в організм реципієнта і адекватно функціонують протягом 12 міс, при цьому стінка біопротезу зазнає ремоделювання, що проявляється заселенням клітинами реципієнта, заміщенням власною сполучною тканиною, формуванням *vasa vasorum* і численних осередків ендотелізації.

ПЕРЕЛІК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Бызов Д. В. Применение низких температур для создания ксеногенных сосудистых скаффолдов / Д. В. Бызов, О. П. Сынчикова, И. П. Михайлова, Б. П. Сандомирский // Біотехнологія. – 2010. – Т. 3, № 1. – С. 41-45.
2. Бызов Д. В. Биотехнологические аспекты создания трансплантатов артерий / Д. В. Бызов, О. П. Сынчикова, Е. Н. Пушкова [и др.] // Біотехнологія. – 2010. – Т. 3, № 3. – С. 21-30.
3. Бызов Д. В. Влияние ионизирующего облучения на артерии свиньи при создании девитализированных скаффолдов / Д. В. Бызов, О. П. Сынчикова, И. П. Михайлова, Б. П. Сандомирский // Біотехнологія. – 2010. – Т. 3, № 6. – С. 75-79.
4. Бызов Д. В. Ультраструктура артерий после девитализации низкими температурами и ионизирующим облучением / Д. В. Бызов, Н. В. Репин, Л. Н. Марченко [и др.] // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. 21, № 2. – С. 137-146.
5. 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.
6. Бызов Д. В. Низкотемпературная обработка как первый этап создания бесклеточных ксеногенных сосудистых скаффолдов / Д. В. Бызов, И. П. Михайлова, О. П. Сынчикова, Б. П. Сандомирский // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, № 2. – С. 214.
7. Бызов Д. В. Низкотемпературная обработка и гамма-облучение применительно к созданию девитализированных ксеногенных сосудистых скаффолдов / Д. В. Бызов, Е. Н. Пушкова, О. П. Сынчикова [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – Т. 12 (приложение). – С. 304-305.
8. Бызов Д. В. Применение замораживания и гамма-облучения для создания сосудистых ксеноскаффолдов / Д. В. Бызов, Б. П. Сандомирский // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, № 2. – С. 208.
9. Бызов Д. В. Низкие температуры и гамма-облучение применительно к созданию девитализированных сосудистых скаффолдов / Д. В. Бызов, Е. Н. Пушкова, О. П. Сынчикова [и др.] // XIX Международная конференция по физике радиационных явлений и радиационному материаловедению, 6-11 сентября 2010г.: тезисы докл. – Алушта, 2010. – С. 471-472.
10. Бызов Д. В. Применение физических факторов при создании девитализированных сосудистых скаффолдов / Д. В. Бызов, Б. П. Сандомирский // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. 21, № 2. – С. 219.
11. Byzov D. Cryobiological stage of creation of vascular scaffolds / D. Byzov, O. Synchykova, I. Mikhaylova [et al.] // Український біохімічний журнал. – 2009. – Т. 81, № 4 (спеціальний випуск). – С. 287.
12. Sandomirsky B. P. Cryodamage as the first stage in creation of biological vascular prostheses / B. P. Sandomirsky, D. V. Byzov, O. P. Synchykova [et al.] // CryoLetters. – 2010. – Vol. 31, № 2. – P. 192.
13. Byzov D. V. Freezing and gamma-radiation for devitalization of vascular scaffolds / D. V. Byzov, O. P. Synchykova, I. P. Mikhaylova [et al.] // Cryobiology. – 2010. – Vol. 61, № 3. – P. 389.

14. Byzov D. V. Creation of devitalized vascular prostheses of small diameter / D. V. Byzov, B. P. Sandomirsky // Int. J. Artif. Org. – 2011. – Vol. 34, - № 8. – P. 708.

За матеріалами роботи був оформлений та поданий до публікації патент на корисну модель (заява № u201110193 від 19.08.2011).

АНОТАЦІЇ

Бизов Д.В. Застосування низьких температур для створення девіталізованих судинних скафолдів. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.35 – кріомедицина. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2012.

Дисертаційна робота присвячена вивченню впливу низьких температур у комбінації з іонізуючим опроміненням на ксеногенні артерії малого діаметру (≤ 6 мм), що застосовані з метою їх девіталізації для подальшого використання у якості судинних біопротезів.

Розроблено методику девіталізації артерій зазначеними фізичними факторами. Показано перевагу їх комбінованої дії. Встановлено, що заморожування-відігрівання і подальше опромінення в дозах 25-50 кГр призводять до повної деендотелізації артерій і руйнування гладеньком'язових клітин судинної медії, при збереженні структурної цілісності сполучнотканинного каркасу і біомеханічної міцності артеріальної стінки.

Девіталізовані артерії не викликали реакцій відторгнення при ксеноімплантації та зазнавали поступового ремоделювання. Показано повноцінне їх функціонування у якості протезів черевної аорти кроликів протягом 12 міс. Гострі тромбози, викликані властивостями ксенографтів, та реакції відторгнення були відсутні на всіх строках спостереження.

Ключові слова: судинні протези, девіталізація, скафолди, ксенотрансплантація, низькі температури, кріопшкодження, низькотемпературне зберігання, біоінженерія.

Бызов Д.В. Применение низких температур для создания девитализированных сосудистых скаффолдов. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.35 – криомедицина. – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 2012.

Диссертационная работа посвящена изучению влияния низких температур в комбинации с ионизирующим облучением на ксеногенные артерии малого диаметра (≤ 6 мм), применяемых для их девитализации с целью последующего использования в качестве сосудистых биопротезов.

Разработана методика девитализации ксеногенных артерий указанными физическими факторами с целью снижения их иммуногенности. Преимущество

комбинированного действия низких температур и ионизирующего облучения заключается в четком дозировании, возможности стандартизации, стерилизации, длительного хранения биоматериала и отсутствии пролонгации цитотоксического действия.

Установлено, что замораживание-отогрев и последующее облучение потоком электронов в дозах 25-50 кГр приводит к полной дезнотелизации артерий и разрушению гладкомышечных клеток сосудистой стенки. Структурная целостность соединительнотканного каркаса артериальной стенки не повреждается, волокна сохраняют упорядоченность и пространственное ориентирование. По результатам исследования показано радиопротекторное действие замораживания-отогрева на соединительнотканную структуру артериальной стенки.

Впервые установлено, что комбинация замораживания-отогрева и ионизирующего облучения повышает прочность артерий в продольном и радиальном направлениях, при отсутствии существенного влияния на упругость артериальной стенки в области физиологических нагрузок.

Экспериментально показано, что замораживание-отогрев снижает степень иммуногенности ксеногенных артерий, а последующее облучение потоком электронов приводит к их гипоиммуногенности, способствуя полноценной интеграции в организм реципиента и постепенному ремоделированию.

По результатам исследований разработана экспериментальная хирургическая модель для изучения артерий малого диаметра в системном кровотоке, особенностью которой является возможность длительного пережатия брюшной аорты кролика без развития клинически значимых ишемических повреждений спинного мозга.

Впервые показано адекватное функционирование девитализированных изучаемыми физическими факторами артерий в системном кровотоке в течение 12 мес. Острые тромбозы, вызванные свойствами протезов, реакции отторжения, стенотические изменения и аневризматические дилатации отсутствовали в течение всего периода наблюдения. Биопротезы сохраняли целостную и упорядоченную соединительнотканную структуру, при этом происходило постепенное заселение трансплантата клетками реципиента и замещение собственными тканями.

Ключевые слова: сосудистые протезы, девитализация, скаффолды, ксенотрансплантация, низкие температуры, криоповреждение, низкотемпературное хранение, биоинженерия.

Byzov D.V. Application of low temperatures to create devitalized vascular scaffolds. – Manuscript.

Dissertation for the candidate of medical science degree in specialty 14.01.35 – cryomedicine. – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2012.

The thesis is devoted to investigation of the effect of low temperatures in combination with ionizing irradiation on xenogenous arteries of small diameter ($\leq 6\text{mm}$), used with the aim of their devitalization for further application as vascular bioprotheses.

There have been developed the methods of devitalizing the arteries with the determined physical factors. The advantage of their combined effect was shown. It has been established that freeze-thawing and following irradiation in the doses of 25-50 kGy lead to a complete de-endothelization of arteries and destruction of smooth muscle cells of vascular media when preserving the structural integrity of connective tissue carcass and biomechanical strength of arterial wall.

Devitalized arteries did not cause the rejections during xenotransplantation and were not subjected to gradual remodeling. There has been shown their integral functioning as the prostheses of rabbit's abdominal aorta during 12 months. Acute thromboses resulted from the properties of xenografts and rejections were absent at all the observation terms.

Key words: vascular prostheses, devitalization, scaffolds, xenotransplantation, low temperatures, cryodamage, low temperature storage, bioengineering.

Автор висловлює щиру подяку директору Інституту фізики високої енергії і ядерної фізики ННЦ ХФТІ, професору Довбні А.М.; зав. кафедрою опору матеріалів ХНТУ «ХПІ» Хавіну В.Л.; Пугачову Г.Д. та Дергуну С.М. за консультативну і технічну допомогу при виконанні окремих розділів дисертаційної роботи.

Відповідальний за випуск д.б.н., проф. Бабійчук Г.О.