

В.А. Брумберг, Т.А. Астрелина, И.В. Кобзева, В.А. Никитина, Т.Ф. Маливанова, Д.Ю. Усупжанова, В.А. Брунчуков, А.А. Расторгуева, С.В. Лишук, А.М. Борбат, Е.А. Дубова, А.Е. Махова, Т.В. Карасёва, Е.И. Добровольская, Е.Е. Ломоносова, М.А. Таратоненкова, А.Ю. Бушманов, А.С. Самойлов

ОЦЕНКА ЭФФЕКТА РАДИАЦИОННОЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ В СВЕРХВЫСОКОЙ ДОЗЕ НА ЦИТОСОВМЕСТИМОСТЬ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННЫХ СОСУДИСТЫХ МАТРИКСОВ

Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России

Контактное лицо: Татьяна Алексеевна Астрелина, t_astrelina@mail.ru

РЕФЕРАТ

Цель: Изучить эффект радиационной стерилизации в сверхвысокой дозе 30 кГр на цитосовместимость децеллюляризованных сосудистых матриксов, заселенных мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) плаценты.

Материал и методы: Материалом исследования явились аорты лабораторных животных (кроликов и крыс, по три сосуда для животного каждого вида), которые подвергались детергентно-ферментативной перфузионной децеллюляризации по двум протоколам, отличающимся составом реагентов. Далее матрикс, децеллюляризованный по наиболее эффективному протоколу, облучали в дозе 30 кГр и заселяли МСК плаценты человека. В качестве контроля необлучённый матрикс заселяли клетками того же типа. Для оценки эффективности децеллюляризации и заселения использовали гистологическую окраску гематоксилином-эозином, ИГХ на коллаген I типа и Ki67, окраску DAPI и количественную оценку содержания геномной ДНК. Оценку заселения матриксов проводили с помощью анализа серийных срезов, взятых на 1-е, 3-е и 4-е сут культивирования.

Результаты: Матрикс, полученные в соответствии с протоколом 1, характеризовались отсутствием определяемых ядер клеток, при этом содержание ДНК в них было достоверно ниже по сравнению с протоколом 2. На оцифрованных изображениях срезов необлучённого матрикса ядра клеток определялись при окрашивании гематоксилином-эозином и DAPI, а в облучённом матриксе были визуализированы ядра клеток на границе между матриксом и фибриновым гелем только при окраске DAPI на 1-е сут культивирования. Частота встречаемости Ki67+ ядер на 4-е сут культивирования была достоверно ниже в облучённом матриксе по сравнению с необлучённым матриксом (7,5% и 29,8% соответственно; $p = 0,0054$).

Заключение: Облучение матриксов с целью радиационной стерилизации приводит к потере цитосовместимости тканеинженерных конструкций.

Ключевые слова: *сосудистый матрикс, фибриновый гель, статичное заселение, сверхвысокие дозы, радиационная стерилизация, тканевая инженерия, регенеративная медицина*

Для цитирования: Брумберг В.А., Астрелина Т.А., Кобзева И.В., Никитина В.А., Маливанова Т.Ф., Усупжанова Д.Ю., Брунчуков В.А., Расторгуева А.А., Лишук С.В., Борбат А.М., Дубова Е.А., Махова А.Е., Карасёва Т.В., Добровольская Е.И., Ломоносова Е.Е., Таратоненкова М.А., Бушманов А.Ю., Самойлов А.С. Оценка эффекта радиационной стерилизации в сверхвысокой дозе на цитосовместимость децеллюляризованных сосудистых матриксов. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020;65(5):5-11.

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-5-11

Введение

В настоящее время в области тканевой инженерии существуют различные способы совмещения носителя (матрикса) с мезенхимальными стволовыми или зрелыми дифференцированными клетками [1]. Динамические способы заселения (вакуумизация, центрифугирование, низкоскоростная перфузия) применимы в основном к синтетическим или композитным матриксам ввиду наличия крупных пор и низкого гидродинамического сопротивления. Статичный способ доставки клеточной суспензии к поверхности матрикса характеризуется низкой эффективностью заселения (не более 10–25%) [1]. Эффективность статичного заселения матрикса может быть повышена за счёт покрытия его поверхности биоактивными молекулами [2].

Основными критериями оценки качества матриксов и тканеинженерных конструкций является безопасность и биосовместимость. Известно, что радиационная стерилизация в сверхвысоких дозах 25–30 кГр используется как метод терминальной стерилизации медицинских изделий, в том числе бесклеточных матриксов [3]. Однако γ -облучение в подобных дозах может оказывать негативный эффект на цитосовместимость, адгезивные свойства матрикса и структурную целостность.

Целью настоящего исследования являлось изучение эффекта радиационной стерилизации в сверхвысокой дозе 30 кГр на цитосовместимость децеллюляризованных заселенных мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) сосудистых матриксов.

Материал и методы

Для получения материала исследования использовали лабораторных животных, полученных из специализированного питомника «Пушино», имеющих соответствующее ветеринарное свидетельство (самцов крыс линии Wistar массой тела до 200 г, прошедших 14-суточный карантин; кроликов породы «Советская шиншилла» с массой тела 3,5 кг, прошедших 21-суточный карантин). Изъятие крысиной аорты осуществляли под общим наркозом при внутримышечном введении препарата «Золетил 100» (Virbac, Франция) в дозе 0,1 мг/кг массы тела животного. Изъятия аорты кролика осуществляли под общим внутривенным наркозом 1% водной эмульсии пропофола из расчёта на 7,5 мг/кг массы тела. Всего в исследовании было использовано 6 животных (по 3 каждого вида) и выделено 6 сосудов. Исследование осуществлялось в соответствии с правилами лабораторной практики при проведении доклинических экспериментов в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96

и 51000.4-96) и с положением Европейской конвенции о защите позвоночных животных.

После изъятия сосуда помещали в стерильные пакеты, заполненные физиологическим раствором с добавлением пенициллина-стрептомицина («ПанЭко», Россия) и амфотерицина В (Bharat Serums & Vaccines, Индия). Аорты лабораторных животных хранили при температуре +4 °С в физиологическом растворе с добавлением пенициллина-стрептомицина.

Детергентно-ферментативная перфузионная децеллюляризация

Для обеспечения перфузии аорту кролика фиксировали в статичной трубчатой стеклянной камере (Ebers Medical, Испания) и помещали в проточный биореактор Ebers ТЕВ500 (Ebers Medical, Испания). Для фиксации аорты крысы проксимальный конец сосуда закрепляли на периферическом венозном катетере 26G VasoFix (Braun, Германия) с помощью шовного материала Prolene 4-0.

Детергентно-ферментативную децеллюляризацию проводили по протоколам 1 и 2, для каждого вида животных (кролика и крысы). Соответственно, всего было получено 4 децеллюляризованных матрикса аорты, по одной аорте кролика и крысы не подвергались децеллюляризации и были использованы в качестве контролей (нативные сосуды). Протоколы 1 и 2 отличались составом детергентов.

Протокол 1:

- (1) перфузия 0,5% Тритон X100 (Santa-Cruz, США), 0,5% деоксихолат натрия (NaDOC) (Sigma-Aldrich) проводилась в течение 2 сут;
- (2) 0,05% Трипсин-ЭДТА (Gibco, Великобритания) в течение 2 ч;
- (3) DMEM с низкой глюкозой (Biological Industries, Израиль) с добавлением эмбриональной бычьей сыворотки (конечная концентрация 10%) с пенициллином в течение 24 ч;
- (4) раствор 300 ЕД/мл ДНКазы I (AppliChem, Германия) с добавлением 2,5 ЕД/мл липазы (Renco, Новая Зеландия) в течение ночи;
- (5) PBS (фосфатный буфер, Sigma-Aldrich) с добавлением пенициллин-стрептомицина и амфотерицина В в течение 2 сут.

Протокол 2:

- (1) PBS с добавлением пенициллин-стрептомицина и амфотерицина В в течение 2 сут;
- (2) гипотоническая среда 10 ммоль Трис-НСl (Santa-Cruz, США) рН 8,0 — в течение 48 ч;
- (3) гипертоническая среда — 10 ммоль Трис-НСl, 500 mM KCl (Sigma Aldrich), 1% Тритон X100 в течение 48 ч;
- (4) 0,75% SDS (Santa-Cruz, США), 10 ммоль Трис-НСl в течение ночи;
- (5) 540 ЕД/мл ДНКазы I в течение 5 ч;
- (6) PBS с добавлением пенициллин-стрептомицина и амфотерицина В в течение 2 сут.

Оценка эффективности децеллюляризации матриксов

Для оценки остаточного количества геномной ДНК из фрагментов нативных сосудов и децеллюляризованных матриксов выделяли ДНК с использованием коммерческого набора Genomic DNA Extraction

Kit (Thermo Fisher, США). Исследование проводили в триплетах. Концентрацию ДНК в полученных препаратах определяли на спектрофотометре SmartSpec (BioRad, США). Значения пересчитывали как концентрацию ДНК в образце ткани (нг/мг ткани).

Для оценки качества децеллюляризации матриксов использовали следующие методы: гистологическое исследование с окрашиванием гематоксилином-эозином для выявления остаточных ядер клеток; иммуногистохимическое исследование (ИГХ) с антителами к коллагену I типа внеклеточного матрикса (моноклональные антитела к коллагену I типа крысы и кролика (Dako, Дания); окрашивание DAPI (MetaSystems Probes, Германия).

Первичный анализ изображения проводили с использованием прямого микроскопа Carl Zeiss Axiovert Imager 2.0 (Carl Zeiss, Германия) с увеличением $\times 5$, $\times 10$, $\times 20$ и $\times 100$. Сканированные изображения препаратов в высоком разрешении получали при увеличении $\times 20$ с использованием сканера гистологических стёкол Ventana iScan HT (Roche Diagnostics, Швейцария). Дальнейший анализ отсканированных изображений выполняли с использованием программного обеспечения QuPath 0.2.0 Quantitative Pathology & Bioimage Analysis. Критерием эффективности децеллюляризации в данном случае являлось отсутствие морфологически различимых ядер в видимом поле зрения, не регистрируемых алгоритмами детекции ПО QuPath [4, 5].

Облучение децеллюляризованного матрикса

Проводили облучение децеллюляризованных матриксов аорты в сверхвысокой дозе 30 кГр в течение 40 мин на установке УЭЛР — 10.0-100-Т-100 (Россия) с номинальной энергией тормозного излучения 7,6 МэВ и частотой 25 Гц.

Заселение децеллюляризованных матриксов

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) плаценты человека были получены при культивировании до 3-го пассажа по стандартной методике [6].

Облучённый матрикс аорты кролика площадью 6,28 см² заселяли МСК в количестве 1млн. 1/3 часть МСК смешивали с тромбином (Omrix Biopharmaceuticals, Израиль) в соотношении 4:1 и вводили в просвет матрикса, после чего добавляли фибриноген (Omrix Biopharmaceuticals, Израиль) в концентрации 35 мг белка/мл. Оставшиеся 2/3 суспензии МСК вводили множественными проколами во внешнюю стенку матрикса. Затем матрикс аорты кролика помещали в бессывороточную среду MesenCult (StemCell Technology, Канада) и переносили в инкубатор при температуре 37 °С в атмосферу 5% CO₂ на 1 ч. Далее матрикс аорты кролика переносили в ротационную трубчатую камеру (Ebers Medical, Испания) и вращали вокруг продольной оси на 360° в течение 2 ч со скоростью 10 об/мин.

Так как расчётный объём матрикса крысиной аорты небольшой, составляя 2 мкл (длина 1 см и площадь поверхности 0,1 см²), заполнение просвета матрикса суспензией МСК с фибриновым гелем трудновыполнимо. Поэтому матрикс крысиной аорты покрывали фибриновым гелем и заселяли МСК в количестве 0,88 млн (0,22 млн смешивали с фибриновым гелем и

вводили несколькими проколами в матрикс; затем 0,20 млн смешивали с тромбином в соотношении 4:1, покрывали поверхность матрикса и затем покрывали фибриногеном; после застывания вновь сформированного слоя геля, оставшиеся 0,46 млн. МСК вводили несколькими проколами в толщу матрикса). Оба матрикса культивировали в течение 4 сут в статичных условиях без перфузии в бессывороточной среде MesenCult.

Заселение матрикса МСК, а также количество выявляемых ядер клеток оценивали с помощью гистологического, ИГХ-исследований и окрашивания DAPI. При этом гистологический анализ с гематоксилином-эозином (Г-Э) и DAPI выполняли для срезов, изъятых на 1-е и 3-е сут культивирования, а ИГХ-реакцию с антителами к Ki67 (Cell Marque, США) ставили для срезов на 4-е сут.

Анализ оцифрованных изображений гистологических срезов и подсчёт ядер клеток проводили с использованием программного обеспечения QuPath 0.2.0.

Статистическая обработка данных

Группы сравнения сформировали в зависимости от метода децеллюляризации матриксов (протокол

1 — протокол 2), от облучения (облученный — не облученный матрикс). Медианы концентраций ДНК представляли как Медиана [25%; 75%]. Для сравнения медиан концентраций ДНК использовали критерий Краскела-Уоллиса (с поправкой Данна на множественные сравнения) [7]. Для сравнения частот встречаемости Ki67+ клеток использовали двусторонний критерий Фишера. Отличия считали достоверными при $p < 0,05$. Статистический анализ полученных данных выполняли в программе Graphpad Prism 8.0.

Результаты

Оценка эффективности децеллюляризации матриксов

При гистологическом исследовании кроличьей и крысиной аорт, децеллюляризованных в соответствии с протоколами 1 и 2, обнаруживался фокус ядер клеток только на срезе крысиной аорты (протокол 2) (рис. 1Д). Можно заключить, что децеллюляризация матриксов по протоколу 1 более эффективна в отношении удаления ядер клеток.

Для качественной оценки сохранности коллагена I после децеллюляризации матрикса проводили ИГХ

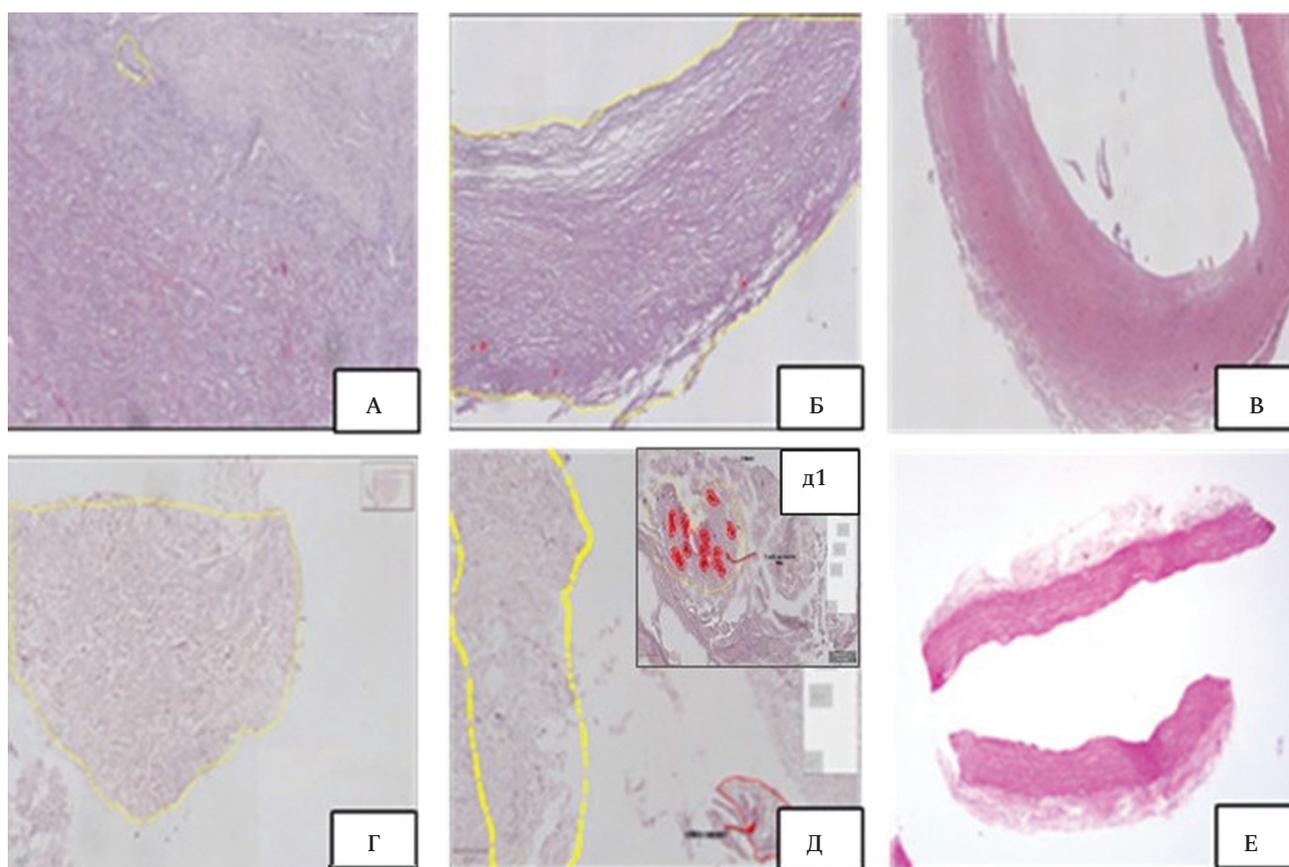


Рис. 1. Результаты гистологического исследования матриксов (окрашивание гематоксилин эозином).

А — децеллюляризованная аорта кролика (протокол 1), $\times 100$; Б — децеллюляризованная аорта кролика (протокол 2) $\times 100$; В — нативная аорта кролика, $\times 20$; Г — децеллюляризованная крысиная аорта (протокол 1), $\times 100$; Д — децеллюляризованная аорта крысы, (протокол 2), в выделенном поле зрения (д1) (красным цветом) препарата выявлено 14 ядер; Е — нативная крысиная аорта, $\times 100$

Fig. 1. H&E staining of scaffolds' slices. А — decellularized rabbit aorta (Protocol 1), $\times 100$; Б — decellularized rabbit aorta (Protocol 2); В — native rabbit aorta, $\times 20$; Г — decellularized rat aorta (Protocol 1), $\times 100$; Д — decellularized rat aorta (Protocol 2), within selected field of view (g1) 14 nuclei identified (depicted in red); Е — native rat aorta, $\times 100$

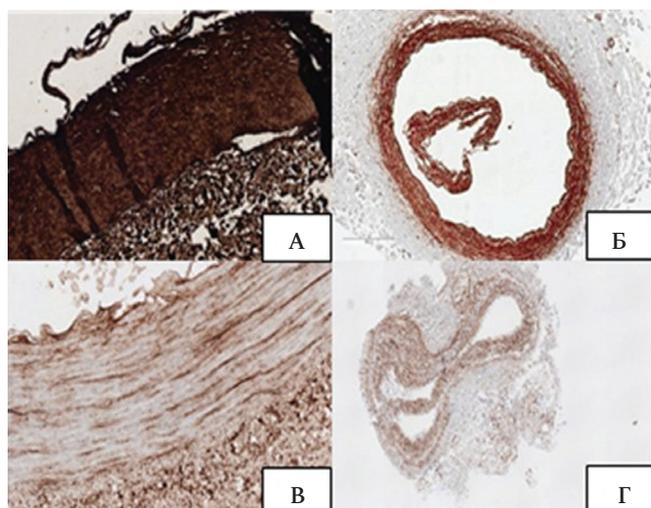


Рис. 2. Иммуногистохимическое исследование децеллюляризованных матриксов на коллаген I типа. А — аорта кролика (протокол 1), $\times 200$; Б — аорта крысы (протокол 1), $\times 100$; В — аорта кролика (протокол 2), $\times 200$; Г — аорта крысы (протокол 2), $\times 40$

Fig. 2. IHC of decellularized scaffolds for collagen I. A — rabbit aorta (Protocol 1), $\times 200$; B — rat aorta (Protocol 1), $\times 100$; C — rabbit aorta (Protocol 2), $\times 200$; D — rat aorta (Protocol 2), $\times 40$

с антителами к коллагену I типа. На рис. 2 выявляется положительная реакция на коллаген I типа во всей толще децеллюляризованного матрикса аорт кролика (рис. 2А и 2В) и крысы (рис. 2Б и 2Г).

С целью визуализации остаточных ядер и хроматина срезы децеллюляризованных матриксов аорт кролика и крыс окрашивали зондом DAPI, тропным к А — Т богатым участкам в минорном желобке двуцепочечной ДНК. Отмечаются единичные слабофлюоресцирующие ядра клеток, при этом фоновая флюоресценция отсутствует. Ядра не определяются, однако выражена фоновая флюоресценция матрикса, что может свидетельствовать о наличии остаточного хроматина в матриксах, децеллюляризованных по протоколу 2. Таким образом, протокол 1 детергентно-ферментативной децеллюляризации обеспечивает более эффективное удаление ядер и хроматина в матриксе.

Содержание остаточной ДНК в матриксах, полученных по протоколам 1 и 2, сравнивали попарно и с нативными сосудами (рис. 3). Медиана концентрации ДНК в матриксах, полученных по протоколу 1, была достоверно ниже, чем в нативном сосуде (контроле) (0,35 [0,25; 0,61] и 5,35 [2,1; 22,9] соответственно, $p < 0,01$ с поправкой на множественные сравнения по Данну).

Таким образом, основываясь на анализе эффективности децеллюляризации матриксов, было решено в дальнейшем использовать сосудистые матриксы лабораторных животных, децеллюляризованных по протоколу 1.

Анализ заселения необлучённого и облучённого сосудистых матриксов

Проводили γ -облучение децеллюляризованных матриксов аорты лабораторных животных в сверхвысокой дозе 30 кГр в течение 40 мин, как и ранее [3].

Результаты заселения оценивали с помощью гистологического, ИГХ-исследований и окрашивания

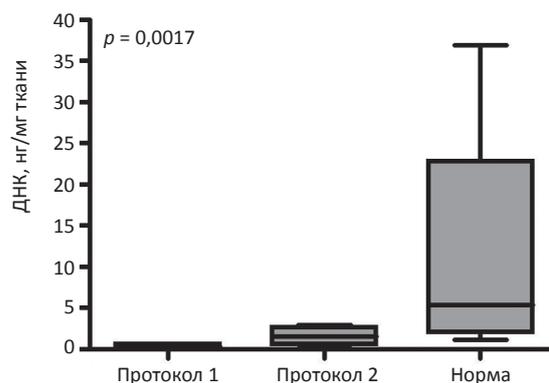


Рис. 3. Результаты оценки содержания остаточной ДНК в сосудах (критерий Краскела-Уоллеса с поправкой Данна на множественные сравнения)

Fig. 3. Evaluation of residual DNA quantification in vascular scaffolds. The data was analysed by use of Kruskal-Wallis non-parametric method and Dunn's post-hoc test

DAPI. При этом гистологический анализ с Г-Э и DAPI выполняли для срезов, изъятых на 1-е и 3-е сут культивирования, а ИГХ-реакцию с антителами к Ki67 ставили для срезов 4-ых сут (рис. 4–5).

Как видно из рис. 5, ядра МСК плаценты распределялись в толще фибринового геля диффузно и крайне неравномерно (рис. 4 А, В, Г). На рис. 4,61 приведён фрагмент необлучённого матрикса крысиной аорты, в котором ядра МСК локализованы исключительно в разрыхлённой адвентиции матрикса, часть ядер определяется в интиме. Общее количество ядер, выявленных при анализе срезов необлучённого матрикса крысиной аорты и фибринового геля, составило 270. Суммарное количество Ki67⁺ ядер, выявленных в результате анализа среза фибринового геля (4-е сут), составило 25 из 84 (29,8%).

На рис. 5 показано, что морфологически различные ядра МСК идентифицируются у границы между облучённым матриксом и фибриновым гелем на препарате, окрашенном DAPI на 1-е сут культивирования (рис. 5В) и на 4-е сут при окрашивании на Ki67 (рис. 5Д, д1). На рис. 5 д1 в выделенном поле зрения обнаружили 41 ядро, при этом 7,5% (3 ядра) характеризовались как Ki67⁺. На рис. 5Б выявлено разрушение и расслоение волокон коллагена.

Таким образом, на срезах облучённого матрикса, изъятых на 3-е сут культивирования и окрашенных Г-Э и DAPI, ядра клеток не определялись (рис. 5Б, Г), в отличие от необлучённого матрикса, в котором морфологически различные ядра выявляли всеми методами.

Частота встречаемости Ki67⁺ ядер на 4-е сут в необлучённом матриксе была достоверно выше по сравнению с облучённым матриксом ($p = 0,0054$) (рис. 6).

Таким образом, наблюдается ассоциация действия облучения в сверхвысокой дозе 30 кГр со снижением количества пролиферирующих Ki67⁺ клеток.

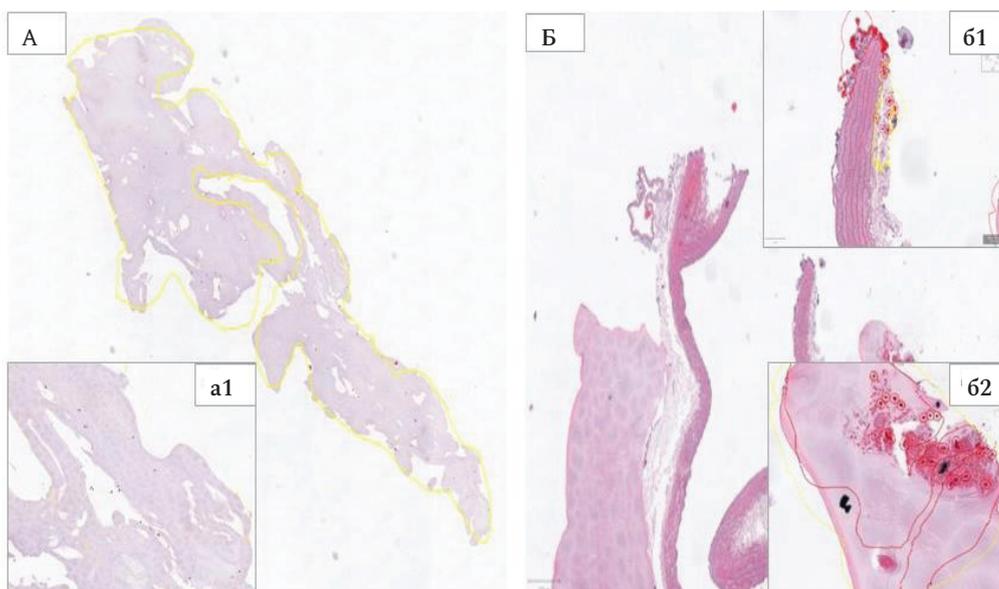


Рис. 4. Результаты заселения МСК плаценты необлучённого матрикса аорты крысы. (А–Б): гематоксилин — эозин, изображения срезов, отсканированных при $\times 20$. А — фибриновый гель (день 1), а1 — выделенное поле зрения, обнаруживаются ядра клеток; Б — срез матрикса, заключённого в фибриновый гель (день 3), б1 — в поле зрения выделен фрагмент матрикса крысиной аорты с выделенными в результате программной обработки ядрами, б2 — в поле зрения выделен фрагмент фибринового геля с обнаруженными ядрами

Fig. 4. Images of the non-irradiated rat aorta scaffold repopulated by hMSCs. (A–B): H&E — staining of scaffold’s slices, obtained by scanning at $\times 20$ magnification. A — fibrin glue (day 1), a1 — selected region of interest, cell nuclei are identified by QuPath algorithm; B — scaffold’s slices (scaffold is embedded within fibrin glue) (day 3), b1 — in the field of view the rat aorta scaffold’s fragment with cell nuclei outlined by QuPath algorithm; b2 — in the field view the fibrin glue region containing nuclei is selected

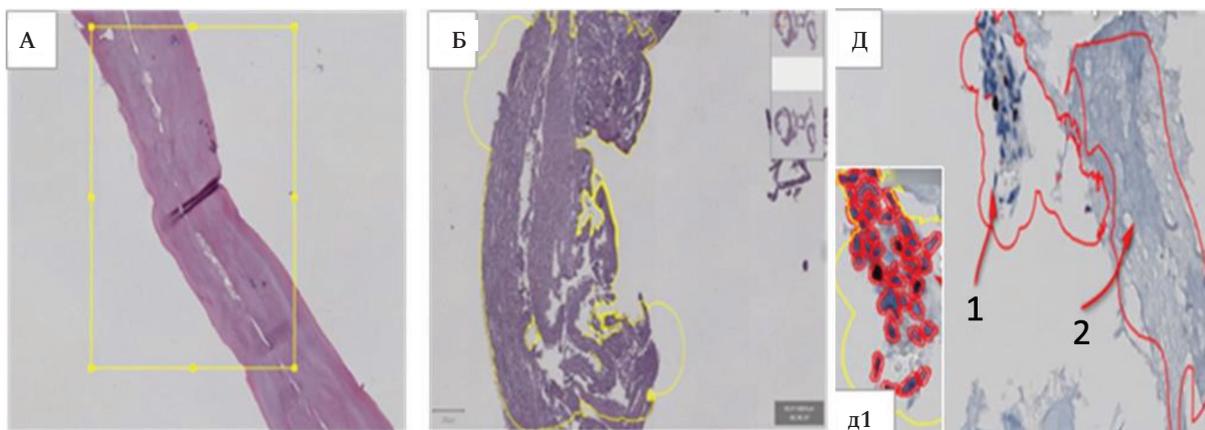


Рис. 5. Результаты заселения МСК плаценты облучённого матрикса крысиной аорты. (А–Б): гематоксилин — эозин, изображения срезов, отсканированных при $\times 20$. А — фибриновый гель (день 1), ядра клеток не обнаруживаются; Б — срез матрикса (день 3). (Д): ИГХ на Ki67. Д — матрикс — фибриновый гель (день 4), д1 — область выделения с фрагментом матрикса после программной обработки, было выявлено 41 ядро, 3 ядра — Ki67+

Fig. 5. Images of the irradiated rat aorta scaffold repopulated by hMSCs. (A–B): H&E — staining of scaffold’s slices, obtained by scanning at $20\times$ magnification. A — fibrin glue (day 1), no cell nuclei can be identified; B — rat aorta scaffold’s slice on day 3. (D): IHC for Ki67. Д — scaffold — fibrin glue interface (day 4), d1 — the selected region of interest including scaffold’s fragment after image processing. 41 cell nuclei were identified and three are Ki67 among them

Обсуждение

В настоящем исследовании показана нерациональность использования додецилсульфата натрия (SDS) как децеллюляризирующего агента: во-первых, протокол 1, основанный на сочетании ионного детергента дезоксихолата натрия (NaDOC) и неионного TritonX100, обеспечивал более эффективное удаление

геномной ДНК по сравнению с SDS-основанным протоколом децеллюляризации (протокол 2); во-вторых, ранее было показано, что SDS обладает цитотоксическим эффектом даже в следовых концентрациях [8].

Фибриновый гель, в отличие от ряда синтетических материалов, характеризуется нетоксичными продуктами деградации, хорошей биосовместимостью и

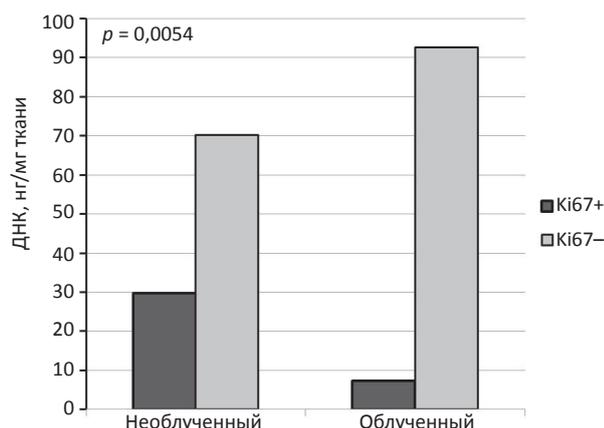


Рис. 6. Частота встречаемости Ki67+ ядер, выявляемых на гистологических срезах (4-е сут) необлученного и облученного матриксов
 Fig. 6. Frequency of Ki67+ nuclei identified on histologic slices (day 4) for both non — irradiated and irradiated scaffolds.

высокой адгезивностью. Было показано сохранение жизнеспособности и пролиферативной активности мышинных фибробластов ЗТЗ, культивируемых в течение 4 сут в фибриновом гидрогеле толщиной не более 2 мм [9]. Поэтому смешивание клеточной суспензии с фибриновым гелем и заполнение полученной смесью просвета трубчатого матрикса, возможно, повышает эффективность заселения полноразмерного каркаса, что следует оценить для необлученных матриксов в дальнейшем исследовании.

Результаты проведенного исследования показывают наличие ассоциации между облучением децеллюляризованного матрикса в сверхвысокой дозе

(30 кГр) и снижением числа пролиферирующих клеток (Ki67+) при последующем заселении матрикса.

Облучение матриксов с целью радиационной стерилизации в сверхвысокой дозе (30 кГр) не обосновано и приводит к потере био- и цитосовместимости тканеинженерных конструкций. Аналогичные эффекты были описаны для низких доз облучения [10]. Так, N. Roognejad et al, которые провели сравнительную оценку влияния 4 методов стерилизации децеллюляризованного ренального матрикса свиньи (гамма-облучение, 70% этанол, 0,2% надуксусная кислота в 1М NaCl и 0,2% надуксусная кислота в 4% этаноле) на сохранность структуры матрикса и его способность поддерживать рост, адгезию и пролиферацию клубочкового эпителия. Авторами было показано, что при культивировании клубочковых эпителиальных клеток на матриксах, облученных в минимальной стерилизующей дозе 3 кГр, наблюдается достоверное снижение количества двухцепочечной ДНК на 1-е и 3-е сут культивирования (непрямой метод оценки пролиферативной активности клеток) [10].

Другими исследователями продемонстрировано, что радиационная стерилизация приводит к необратимым изменениям структурных и реологических свойств гидрогелей децеллюляризованных матриксов и к невозможности гелеобразования [3].

Заключение

Таким образом, результаты настоящего исследования показали, что облучение матриксов в сверхвысокой дозе 30 кГр приводит к потере цитосовместимости тканеинженерных конструкций. Необходимо продолжить изучение воздействия других методов стерилизации медицинских изделий на адгезивные свойства матриксов.

Evaluation of Ultrahigh Dose Irradiation Sterilization Influence on Cytocompatibility of Decellularized Vascular Scaffolds

V.A. Brumberg, T.A. Astrelina, I.V. Kobzeva, V.A. Nikitina, T.F. Malivanova, D.Yu. Usupzhanova, V.A. Brunchukov, A.A. Rastorgueva, S.V. Lischuk, A.M. Borbat, E.A. Dubova, M.L. Ganzhelyuk, A.E. Makhova, T.V. Karaseva, E.I. Dobrovolskaya, E.E. Lomonosova, M.A. Taratonenkova, A.Yu. Bushmanov, A.S. Samoilov

A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia
 E-mail: t_astrelina@mail.ru

ABSTRACT

Purpose: To study the effect of radiation sterilization at an ultra-high dose of 30 kGy on the cytocompatibility of decellularized vascular scaffolds repopulated with placenta MSCs.

Material and methods: The material of the study were aortas of laboratory animals (rabbits and rats, three vessels for each animal species), which were subjected to detergent-enzymatic perfusion decellularization by two protocols differing in reagents composition. Then the scaffold decellularized by the most efficient protocol was irradiated at a dose of 30 kGy and repopulated with placenta MSCs. As a control, the unirradiated matrix was seeded with cells of the same type. Histological staining of hematoxylin-eosin (H&F), IHC for type I collagen and Ki67, DAPI staining and quantitative assessment of genomic DNA were used to evaluate the effectiveness of decellularization and seeding. Scaffolds seeding was assessed by analyzing serial sections taken on day 1st, 3rd, and 4th of culture.

Results: The scaffolds obtained in accordance with Protocol 1 were characterized by the absence of detectable cell nuclei, while the DNA content in them was significantly lower compared to Protocol 2. On the digitized images of sections of the unirradiated matrix, the cell nuclei were determined for routine H&E and DAPI staining while for the irradiated scaffold the cell nuclei were visualized on the border between the scaffold and fibrin gel only on DAPI stained section at 1st day of culture. The frequency of

occurrence of Ki67+ nuclei on the 4th day of culture was significantly lower for the irradiated scaffold in comparison with the non-irradiated scaffold (7.5% and 29.8%, respectively, $p = 0.0054$).

Conclusion: Scaffold irradiation leads to loss of cytocompatibility of tissue-engineering constructs.

Key words: tissue engineering, regenerative medicine, scaffold, fibrin gel, static settlement, ultra-high doses, radiation sterilization

For citation: Brumberg VA, Astrelina TA, Kobzeva IV, Nikitina VA, TF Malivanova, Usupzhanova DYU, Brunchukov VA, Rastorgueva AA, Lischuk SV, Borbat AM, EA Dubova, Ganzhelyuk ML, Makhova AE, TV Karaseva, EI Dobrovolskaya, Lomonosova EE, Taratonenkova MA, Bushmanov AYU, Samoilo AS. Evaluation of Ultrahigh Dose Irradiation Sterilization Influence on Cytocompatibility of Decellularized Vascular Scaffolds Medical Radiology and Radiation Safety. 2020;65(5):5-11 (In Russ.).

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-5-11

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Villalona GA, Udelsman B, Duncan DR, McGillicuddy E, Sawh-Martinez RF, et al. Cell-seeding techniques in vascular tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010 Jun 16;3:341-50. PubMed PMID: 20085439. DOI: 10.1089/ten.TEB.2009.0527.
- Brown AC, Barker TH. Fibrin-based biomaterials: modulation of macroscopic properties through rational design at the molecular level. *Acta Biomater.* 2014 Apr;10(4):1502-14. PubMed PMID: 24056097. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.09.008
- White LJ, Keane TJ, Smoulders A, Zhang L, Castleton A, Badylak SF. The effects of terminal sterilization upon the biological activity and stiffness of extracellular matrix hydrogels. *Front. Bioeng. Biotechnol. Conference Abstract (2016): 10th World Biomaterials Congress.* DOI: 10.3389/conf.FBIOE.2016.01.00032.
- Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep.* 2017 Dec 4;7(1):16878. PubMed PMID: 29203879. DOI: 10.1038/s41598-017-17204-5.
- Loughrey MB, Bankhead P, Coleman HG, Hagan RS, Craig S, McCorry A, et al. Validation of the systematic scoring of immunohistochemically stained tumour tissue microarrays using QuPath digital image analysis. *Histopathology.* 2018;73:327-38. DOI: 10.1111/his.13516.
- Астрелина ТА, Яковлева МВ, Шахпазян НК и др. Значение определения герпесвирусов человека в мезенхимальных стволовых клетках костного мозга и плаценты для клинического применения. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* 2012;7(4):68-72. [Astrelina TA, Yakovleva MV, Shahpazyan NK, Gomzyakov AE, Skorobogatova EV, Karpova EV, Kobzeva IV. Significance of human herpesvirus detection in multipotent mesenchymal stromal stem cells for clinical practice. *Cell Transplantation and Tissue Engineering.* 2012;7(4):68-72. (In Russ.).]
- McHugh ML. Multiple comparison analysis testing in ANOVA. *Biochem Med.* 2011;21(3):203-9.
- Rieder E, Kasimir MT, Silberhumer G, et al. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;127(2):399-405. PubMed PMID: 147623474. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2003.06.017
- Ryzhuk V, Zeng XX, Wang X, Melnychuk V, Lankford L, Farmer D, Wang A. Human amnion extracellular matrix derived bioactive hydrogel for cell delivery and tissue engineering. *Mater Sci Eng C.* 2018;85:191-202. PubMed PMID: 29407148. DOI: 10.1016/j.msec.2017.12.026.
- Poornejad N, Nielsen JJ, Morris RJ, et al. Comparison of four decontamination treatments on porcine renal decellularized extracellular matrix structure, composition, and support of renal tubular epithelium cells. *J Biomaterials Applications.* 2016;30(8):1154-67. PubMed PMID: 26589294. DOI: 10.1177/0885328215615760.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Financing. The study had no sponsorship.

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Поступила: 03.08.2020. **Принята к публикации:** 11.11.2020.

Article received: 03.08.2020. **Accepted for publication:** 11.11.2020.

Information about the authors:

Brumberg V.A. <https://orcid.org/0000-0001-6053-1637>.
 Astrelina T.A. <https://orcid.org/0000-0003-3629-0372>.
 Kobzeva I.V. <https://orcid.org/0000-0002-1499-8954>.
 Nikitina V.A. <https://orcid.org/0000-0002-3150-7686>.
 Malivanova T.F. <https://orcid.org/0000-0001-9699-260>.
 Usupzhanova D.Yu. <https://orcid.org/0000-0002-3894-7182>.
 Brunchukov V.A. <https://orcid.org/0000-0002-5744-5524>.
 Rastorgueva A.A. <https://orcid.org/0000-0003-2159-7304>.
 Karaseva T.V. <https://orcid.org/0000-0001-7369-2931>.
 Samoilo A.S. <https://orcid.org/0000-0002-9241-7238>.