

УДК 615.361.11/.13.014.41:612.014.482.31:57.013

И.П. Михайлова\*, А.А. Манченко, Д.В. Бызов, Б.П. Сандомирский

## Физико-механические свойства девитализированных ксеноимплантатов на основе перикарда, створок аортального клапана и артерий

UDC 615.361.11/.13.014.41:612.014.482.31:57.013

I.P. Mikhailova\*, A.A. Manchenko, D.V. Byzov, B.P. Sandomirsky

## Physical and Mechanical Properties of Devitalized Xenografts Based on Pericardium, Aortic Valve Leaflets and Arteries

**Реферат:** Изучали физико-механические свойства ткани перикарда, створок аортального клапана и артерий свиньи на этапах девитализации криорадиационным способом. Для предимплантационной обработки ксенотканей использовали низкие температуры и ионизирующее излучение. Проводили тест одноосного растяжения тканей после замораживания-отогрева, облучения потоком электронов, а также после их сочетанного воздействия. Показано, что экстрацеллюлярный матрикс (ЭЦМ) девитализированных тканей сохраняет свою целостность и обладает физико-механическими свойствами, характерными для нативных тканей как в продольном, так и поперечном направлении. Предварительное замораживание до  $-196^{\circ}\text{C}$  проявляет радиопротекторное действие и нивелирует отрицательные эффекты  $\beta$ -радиации на ЭЦМ. Глубокое замораживание и  $\beta$ -радиация индуцируют образование дополнительных внутри- и межмолекулярных поперечных связей и проявляют синергический эффект: существенно усиливаются упругие свойства тканей. Модифицированная ткань перикарда, створок клапана и артерий с заданными физико-механическими характеристиками может использоваться в качестве тканевых имплантатов: упругие свойства обеспечивают длительное существование в организме реципиента; запас прочности позволяет выдерживать эксплуатационные нагрузки в процессе функционирования; сохраняется каркасность, эластичность, способность к растяжимости, устойчивость к излому и скручиванию.

**Ключевые слова:** девитализация, тканевые имплантаты, ксенотрансплантация, физико-механические свойства биоматериалов, экстрацеллюлярный матрикс, низкие температуры, ионизирующее излучение.

**Реферат:** Вивчали фізико-механічні властивості перикарду, стулок аортального клапана й артерій свині на етапах девіталізації криорадіаційним способом. Для передімплантаційної обробки ксенотканин використовували низькі температури та іонізуюче випромінювання. Проводили тест одноосового розтягування тканин після заморожування-відігріву, опромінення потоком електронів, а також після їх поєднаної дії. Показано, що екстрацелюлярний матрикс (ЕЦМ) девіталізованих тканин зберігає свою цілісність і має фізико-механічні властивості, характерні для нативних тканин як у поздовжньому, так і поперечному напрямку. Попереднє заморожування до  $-196^{\circ}\text{C}$  проявляє радіопротекторну дію та нівелює негативні ефекти  $\beta$ -радіації на ЕЦМ. Глибоке заморожування і  $\beta$ -радіація індукують утворення додаткових внутрішньо- і міжмолекулярних поперечних зв'язків і проявляють синергічний ефект: істотно посилюються пружні властивості тканин. Модифікована тканина перикарду, стулки клапана й артерії з заданими фізико-механічними характеристиками може використовуватися як тканевий імплантат: пружні властивості забезпечують довгостроковий час існування в організмі реципієнта; запас міцності дозволяє витримувати експлуатаційні навантаження в процесі функціонування; зберігається каркасність, еластичність, здатність до розтяжності, стійкість до зламу та скручування.

**Ключові слова:** девіталізація, тканинні імплантати, ксенотрансплантація, фізико-механічні властивості біоматеріалів, екстрацелюлярний матрикс, низькі температури, іонізуюче випромінювання.

**Abstract:** Physical and mechanical properties of the tissues of porcine pericardium, aortic valve leaflets and arteries have been studied following devitalization by cryoradiation method. Low temperatures and ionizing radiation were used for pre-implantation treatment of xenotissues. Uniaxial tension of tissues was tested after freeze-thawing, radiation with flow of electrons, as well as after their combined impact. The extracellular matrix (ECM) of devitalized tissues has been shown to retain its integrity and to possess physical and mechanical properties characteristic for native tissue in both the longitudinal and transverse directions. Pre-freezing to  $-196^{\circ}\text{C}$  exhibits a radioprotective effect and eliminates the negative influences of  $\beta$ -radiation on the ECM. Deep freezing and  $\beta$ -radiation induce the formation of additional intra- and intermolecular cross-linking as well as demonstrate a synergistic effect: elastic properties of tissues are significantly strengthened. Modified tissue of pericardium, valve leaflets and arteries with pre-determined physical and mechanical characteristics can be used as tissue implants and scaffolds: elastic properties provide lasting existence in a recipient's body (allowing the repopulation and formation of new structure); the strength margin to withstand the operational loads during functioning; preserved carcass ability, elasticity, extensibility, breakage and twisting resistance.

**Key words:** devitalization, tissue grafts, xenotransplantation, physical and mechanical properties of biomaterials, extracellular matrix, low temperatures, ionizing radiation.

Отдел экспериментальной криомедицины, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

\*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-30-84,  
электронная почта: irene.mikhailova@gmail.com

Поступила 27.01.2015

Принята в печать 26.06.2015

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, №4. – С. 311–328.  
© 2015 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

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 61016;  
tel.: +380 57 3737435, fax: +380 57 373 3084,  
e-mail: irene.mikhailova@gmail.com

Received January, 27, 2015

Accepted June, 26, 2015

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2015. 25(4): 311–328.

© 2015 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

Одним из способов создания тканевых эквивалентов для реконструктивно-восстановительной хирургии является девитализация ксеногенных тканей. Проблема получения эффективных имплантатов ксеногенного происхождения связана с необходимостью преодоления иммунного конфликта. Для повышения биосовместимости предлагается проводить девитализацию/децеллюризацию ткани (разрушать в них клетки донора до имплантации), таким образом уменьшая иммунную реакцию организма реципиента на трансплантат [16]. После трансплантации бесклеточный ксенокаркас постепенно замещается аутогенным внеклеточным матриксом, формируемым собственными клетками хозяина с последующим ремоделированием и образованием устойчивой долгосрочной структуры. При этом соединительнотканые волокна протеза постепенно лизируются макрофагами, обеспечивая его полноценную интеграцию в организм реципиента [26, 32]. Преимущество девитализированной ксеноткани заключается в сохранении структуры и композиции нативных тканей. Ксеногенный экстрацеллюлярный матрикс (ЭЦМ) представляет собой совокупность коллагеновых и эластиновых волокон – эти фибриллярные матричные белки обеспечивают каркасные функции [27, 28]. Также существует возможность заселения матрикса аутогенными клетками реципиента *in vitro* до имплантации с помощью подходов тканевой инженерии. В последнее время все больше девитализированная ксеногенная ткань используется как основа для изготовления тканеинженерных протезов сердца и сосудов. Такой биотехнологический подход позволяет создать живую аутологичную ткань [3, 24, 29, 36].

Для эффективного ксенопротезирования предимплантационная обработка донорской ткани должна снижать иммуногенность, стабилизировать структуру ткани и сохранять адекватные механические свойства при соблюдении стерилизации биоматериала. Большинство методов девитализации основаны на продолжительной обработке ксеноткани различными детергентно-энзимными и консервирующими растворами (эпоксисоединения различного состава), разнообразными гипо- и гипертоническими буферами, действие которых связано с разрушением иммуногенных компонентов [6]. Методы химической обработки позволяют эффективно снижать антигенные свойства тканей и предупреждать их бактериальное обсеменение за счет антисептических свойств используемых реагентов. Однако при этом наблюдается остаточная цитотоксичность, повышается вероятность дополнительных процессов минерализации в ткани за счет увеличения количества центров нуклеации

One of the ways to create the tissue equivalents for reconstructive surgery is devitalization of xenogeneic tissues. The problem of obtaining effective implants of xenogeneic origin is associated with the need of overcoming an immune conflict. Increase of biocompatibility is possible if to devitalize/decellularize the tissue (to destroy the donor cells prior to implantation), thereby reducing an immune response of a recipient organism to the graft [24]. After transplantation, the cell-free xenoscaffold is gradually replaced by autologous extracellular matrix, formed with own host cells, a stable long-term structure is remodeled/formed. The prosthesis connective tissue fibers are gradually lysed by macrophages, providing its complete integration into a recipient's body [12, 29]. The advantage of devitalized xenotissue consists in preserved structure and composition of native tissues. Xenogenous extracellular matrix (ECM) represents a combination of collagen and elastin fibers, fibrous matrix proteins which provide a scaffold function [13, 20]. There is also a possibility of populating the matrix with the recipient's autologous cells *in vitro* prior to implantation using the tissue engineering approaches. Nowadays, the devitalized xenogenous tissue is often used as the basis for the production of tissue-engineered prostheses of heart and blood vessels. Such a biotechnological approach enables the creation of living autologous tissue [2, 7, 22, 23].

For effective xeno-prosthetics the pre-implantation treatment of donor tissue should reduce an immunogenicity, stabilize a tissue structure and retain adequate mechanical properties in compliance of the biomaterial sterility. Most devitalization methods are based on lasting xenotissue treatment with various enzymatic-detergent and preserving solutions (various epoxy compounds), various hypo- and hypertonic buffers for destruction of immunogenic components [9]. Methods of chemical treatment can effectively reduce the antigenic properties of tissues and prevent them from bacterial contamination due to antiseptic features of the reagents used. However, these result in a residual cytotoxicity, elevated probability of additional mineralization in the tissue due to a rise in the number of the calcification nucleation sites [30], as well as the damage of the tissue matrix structural proteins. Enzymatic treatment and fixation either with glutaraldehyde or epoxy compounds are accompanied with peculiarities of calcium accumulation by biological tissues. Biological tissue deprived of cells, proteoglycans and glycoproteins represents quite a loose and porous structure of collagen fibers with calcium-binding capacity. The formation of calcium-containing deposits either on the surface or in the width of the graft results in a loss of functionality and furthermore the necessity of repeated surgeries. Preserving the integrity of the extracellular matrix is a priority requirement since such a decellu-



кальциноза [33], отмечается повреждение структурных белков тканевого матрикса. Выявлены особенности накопления кальция биологическими тканями после ферментативной обработки и фиксации глутаральдегидом или эпоксисоединениями. Биоткань, лишенная клеток, протеогликанов и гликопротеинов представляет собой достаточно рыхлую и пористую структуру из коллагеновых волокон, которые обладают кальцийсвязывающей способностью. Образование кальцийсодержащих отложений на поверхности или в толще трансплантата приводит к потере функциональных свойств и, в дальнейшем, – к необходимости реопераций. Сохранение целостности межклеточного матрикса является приоритетным требованием, поскольку такая децеллюляризованная ксеногенная ткань представляет собой готовую биологическую матрицу, структурная организация и физико-механические характеристики которой определяют последующее функционирование трансплантата.

В отделе экспериментальной криомедицины ИПКиК НАН Украины был предложен новый подход к созданию девитализированных ксеногенных эквивалентов (тканевых имплантатов) с использованием физических факторов – низких температур ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) и ионизирующего излучения ( $\beta^{-}$ -радиация). Такой способ исключает использование химических реагентов, что способствует повышению качества получаемых тканевых имплантатов и снижению риска осложнений после трансплантации [22]. Предымплантационная обработка низкими температурами и ионизирующим излучением обеспечивает повреждение основных мишеней иммуногенности биоматериала за счет последовательных эффектов крио- и радиационно-химического повреждения, а также активации процессов радиационно-индуцированного апоптоза [4, 9, 30]. Как низкие температуры, так и ионизирующее излучение инициируют образование дополнительных поперечных сшивков, за счет которых коллагеновые фибриллы укрепляются внутри- и межцепочечными ковалентными сшивками [23, 34]. Низкие температуры решают проблему сохранения биологического материала на промежуточных этапах технологического процесса и долгосрочного хранения тканевых эквивалентов. Данный способ обеспечивает полноценную вирусную и бактериальную стерилизацию пластического биоматериала. При морфологических исследованиях перикарда, аортального клапана и артерий свиньи после девитализации криорадиационным способом было показано, что такая обработка вызывает выраженные деструктивные изменения клеточных элементов. При этом сохраняются пространственное расположение и структурная

larized xenogeneic tissue is the ready biological matrix, the structural organization and physical-mechanical characteristics of which determine the following graft functioning. At the Department of Experimental Cryomedicine of the IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine a new approach was proposed to create the devitalized xenogenous equivalents (tissue implants) using physical factors, *i. e.* low temperatures ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) and ionizing radiation ( $\beta^{-}$ -radiation). This method allows to exclude the use of chemical reagents, that contributes to increasing the quality of the tissue implants and reducing the risk of post-transplantation complications [21]. Pre-implantation treatment with low temperatures and ionizing radiation damages the basic targets of biomaterial immunogenicity due to successive effects of cryo- and radio-chemical injury as well as activation of radiation-induced apoptosis [5, 26, 38]. Both low temperatures and ionizing radiation initiate the formation of additional cross-links, due to which the collagen fibrils are strengthened by intra- and inter-chain covalent cross-links [4, 31]. Low temperatures solve the problem of biological material preservation at intermediate stages of technological process and following long-term storage of the tissue equivalents. This method provides a complete viral and bacterial sterilization of plastic biomaterial. Morphological studies of the pericardium, aortic valve and porcine arteries after devitalization with cryoradiation showed that such a treatment caused a manifested destructive changes of cell elements. Herewith the spatial arrangement and structural integrity of the fibrous components of a connective tissue base are preserved [10, 11, 19].

The goal of this research was to study the changes in elastic-strength properties (physical and mechanical deformation indices) of porcine arteries, pericardium and aortic valve leaflets under the influence of low temperatures, ionizing radiation and their combined action.

### Materials and methods

The tissues of pericardium, arteries and aortic valve leaflets were isolated from 6–8-month-old bredless pigs 20 min later their slaughtering at meat processing enterprise (Kharkov region, Ukraine) under aseptic conditions. Under laboratory conditions the tissues were carefully dissected and washed with a cold sterile saline. Inner diameter of the isolated arteries ranged from 2.5 to 5 mm and the length did from 5 to 10 cm. Aortic leaflets remained unchanged. The pericardium was cut into flaps. Cryocontainers with the samples were placed into liquid nitrogen, wherein they were stored until the next processing step. Afterwards (at the Kharkiv Institute of Physics and Technology of the National Academy of Sciences of Ukraine) the samples were irradiated with electron flow of the



целостность волокнистых компонентов соединительнотканной основы [5, 7, 14].

Цель данного исследования – изучение изменений упругопрочностных свойств (физико-механические показатели деформации) артериальных сосудов, перикарда и створок аортального клапана свиньи под влиянием низких температур, ионизирующего излучения и их сочетанного действия.

### Материалы и методы

Ткань перикарда, артерий и аортальные створки клапана выделяли у 6–8-месячных беспородных свинок в течение 20 мин после забоя на мясоперерабатывающем предприятии (г. Богодухов, Харьковская область) при соблюдении правил асептики. В лабораторных условиях ткани тщательно препарировали и промывали охлажденным стерильным физиологическим раствором. Внутренний диаметр выделенных артерий варьировал от 2,5 до 5 мм, длина – от 5 до 10 см. Аортальные створки оставались неизменными. Перикард разрезали на лоскуты. Криоконтейнеры с образцами помещали в жидкий азот, в котором хранили до следующего этапа обработки. Затем (на базе ННЦ «Харьковский физико-технический институт НАН Украины») с помощью линейного ускорителя электронов «ЛУЭ-10» (Украина) образцы облучали потоком электронов с величиной поглощенной дозы в диапазоне 25–30 кГр. Доза 25 кГр является минимально необходимой для обеспечения стерильности медицинских материалов и допустимой для сохранения фибриллярных белков ЭЦМ. С целью предупреждения тепловой денатурации соединительной ткани в процессе облучения (осуществляли дискретно) постоянно контролировали температуру образцов (не более 25°C). После облучения стерильные контейнеры с образцами хранили в парах жидкого азота при температуре от –150 до –170°C.

Упругопрочностные свойства артерий, перикарда и створок клапана свиньи изучали на базе кафедры сопротивления материалов Национального технического университета «Харьковский политехнический институт». Испытания на растяжение материалов проводили на универсальном деформирующем устройстве «FP 100/1» («VEB TIW Rauenstein», Германия). Изучение физико-механических свойств включало в себя определение толщины ( $h$ ), модуля упругости ( $E$ ), предела прочности ( $\lambda$ ), относительного удлинения ( $L$ ), запаса деформативной способности ( $\delta$ ) тканей. Предел прочности определяли по формуле:  $\lambda = F/S$ , где  $F$  – максимальная сила растяжения при нарушении целостности материала,  $S$  – площадь поперечного сечения образца. Модуль упругости определяли по формуле:  $E = (F_2 - F_1)L_0/S(L_2 - L_1)$ ,

absorbed dose within the range of 25–30 kGy with a linear electron accelerator LUE-10 (Ukraine). The dose of 25 kGy is the minimum necessary to ensure the sterility of medical materials and admissible one for the preservation of ECM fibrous proteins. To prevent a connective tissue heat denaturation during irradiation (performed discretely) the sample temperature was constantly monitored (maximum 25°C). After irradiation the sterile containers with samples were stored in liquid nitrogen vapor at a temperatures from –150 down to –170°C.

Stress-strain properties of porcine blood vessels, pericardium and valve leaflets were studied at the Department of Strength of Materials, National Technical University 'Kharkov Polytechnic Institute'. Tensile tests were carried-out with the universal material deforming device FP 100/1 (VEB TIW Rauenstein, Germany). The examining of physical and mechanical properties included the studies on determining the thickness ( $h$ ), elasticity modulus ( $E$ ), tensile strength ( $\lambda$ ), relative elongation ( $L$ ), reserve capacity of deformability ( $\delta$ ) of the tissues. Tensile strength was found with the formula:  $\lambda = F/S$ , where  $F$  was the maximum tensile force at the material disintegrity and  $S$  was the specimen cross-sectional area. The elasticity modulus was determined by the formula:  $E = (F_2 - F_1)L_0/S(L_2 - L_1)$ , where  $F_1$  was the initial tensile force in the zone of elastic deformations,  $F_2$  represented the ultimate tensile strength in the area of elasticity,  $L_1$  was the length of the sample corresponding to  $F_1$ ,  $L_2$  was the one corresponding to  $F_2$ ,  $L_0$  meant an initial sample length. Tissue elongation was calculated using the formula:  $L = (L_2 - L_1)/L_1 \times 100\%$ , where  $L_1$  was sample initial length,  $L_2$  was length of the sample under the load at the moment of the rupture start. Reserve capacity of deformability was determined by the formula:  $\delta = L_2/L_1$ , where  $L_1$  was sample initial length,  $L_2$  was the length of the sample under load at the moment of rupture. The thickness of the samples was measured with a thickness gauge TP-10-60 (Russia). Porcine arteries, pericardium and aortic valve leaflets were divided into 4 groups as follows: 1 – native tissues (control group) (N); 2 – tissues, irradiated in a dose of 25 kGy (R); 3 – tissues after freezing down to –196°C and then thawed (F); 4 – tissues after freeze-thawing and following irradiation at a dose of 25 kGy (FR) (at least 10 samples were tested per group). Tests were performed in 30 mm arterial segments, the segments of 60 mm length and 9 mm width cut from pericardial tissue, and full sized valve leaflets. Tissue samples were firmly fixed by the abrasively coated clamps to the device working parts. To fix the pericardium and valve leaflets an additional special device was developed. Taking into account histological structure of the pericardium and leaflets, the material was considered as



где  $F_1$  – начальная сила растяжения в зоне упругих деформаций,  $F_2$  – конечная сила растяжения в зоне упругости,  $L_1$  – длина образца, соответствующая  $F_1$ ;  $L_2$  – длина образца, соответствующая  $F_2$ ;  $L_0$  – начальная длина образца. Относительное удлинение тканей рассчитывали по формуле:  $L = (L_2 - L_1)/L_1 \times 100\%$ , где  $L_1$  – начальная длина образца,  $L_2$  – длина образца при нагрузке в момент начала разрыва. Запас деформативной способности определяли по формуле:  $\delta = L_2/L_1$ , где  $L_1$  – начальная длина образца,  $L_2$  – длина образца при нагрузке в момент разрыва. Толщину образцов измеряли с помощью толщиномера «ТР-10-60» (Россия). Артерии, перикард и створки аортального клапана свиней были разделены на группы: 1 – нативные ткани (контрольная группа) (N); 2 – ткани, облученные в дозе 25 кГр (R); 3 – ткани после замораживания до  $-196^\circ\text{C}$  и отогрева (F); 4 – ткани после замораживания-отогрева и последующего облучения в дозе 25 кГр (FR) (в группе испытывали не менее 10 образцов). Для испытаний использовали сегменты артерий длиной 30 мм, из ткани перикарда высекали сегменты длиной 60 и шириной 9 мм, створки клапана оставались неизменными. Образцы тканей прочно фиксировали зажимами с абразивным покрытием к рабочим частям устройства. Для фиксации перикарда и створок клапана было разработано дополнительное специальное устройство. Учитывая гистологическую структуру перикарда и створки клапана, материал рассматривался как анизотропный и деформирование проводили в двух направлениях (продольном и поперечном) в зависимости от направления волокон. Скорость деформации  $V = 60$  мм/мин, предельное значение нагрузки  $F = 4,0$  кг. Одноосное растяжение продолжали до момента нарушения целостности ткани, при этом регистрировали предельно приложенную нагрузку и показатель максимального удлинения с одновременной графической регистрацией зависимости «усилие-перемещение». Деформационные кривые обрабатывали и рассчитывали основные физико-механические показатели. Расчеты всех показателей представляли в виде диаграмм. Биомеханические характеристики соответствуют международным стандартам ISO 5840:2005 «Cardiovascular implants – Cardiac valve prostheses», NEQ. Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерных программ «Statistics 17.0» («SPSS Inc.», США) и «Microsoft Excel» («Microsoft», США). Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Длительное и полноценное функционирование биотрансплантата в организме больного зависит от способности данной ткани противостоять

an anisotropic and deformation was performed in two directions (longitudinal and transverse) depending on the fibers orientation. The deformation velocity was  $V = 60$  mm/min, the ultimate load made  $F = 4.0$  kg. Uniaxial tension was applied until the appearance of disorders in tissue integrity, the ultimately applied load and maximal elongation rate were recorded in the process with simultaneous graphic registration of the force vs. translocation dependency. Deformation curves were processed and basic physical and mechanical properties were calculated. All the calculations for all the indices were presented as diagrams. Biomechanical characteristics matched the international standards ISO 5840:2005 ‘Cardiovascular implants – Cardiac valve prostheses’, NEQ. Statistical analysis was performed using the Statistics 17.0 software (SPSS Inc, USA) and Microsoft Excel (MS, USA). Differences were considered as significant at  $p < 0.05$ .

### Results and discussion

Long-time and full-value functioning of biotransplant in a patient's body depends on the tissue ability to resist the damaging load effect. In its turn, physiological aspects of its functioning, including blood circulation, adhesion, proliferation, cell differentiation, phagocytosis *etc.* are determined by physical and mechanical properties and depend largely on structural integrity, architecture and relationship between fiber components [1, 2, 24, 28, 34]. Cells recognize fibers and follow their direction and location when growing. There is a constant relationship and interaction between the cells and ECM during repopulation (remodeling) and the formation of the graft normal structure. The conjugation of population rate and the one of lysis of the devitalized matrix is an essential condition. Connective tissue matrix resulted from decellulirization of xenotissues is the ready biological scaffold, and its initial physical-mechanical parameters determine the following functioning of the transplant. Stress deformation indices characterize the strength, elasticity and plasticity of the material, they are important biomechanical parameters of connective tissue structures and standard biomaterial characteristics [6, 14, 16, 25].

Fig. 1 demonstrates the deformation curve of stress strain characterizing the properties of sample material. With the stress-strain curve it is possible to determine the limit of proportionality (the highest tension whereat the material abides by the Hooke's law), plastic yield (tension at which in the material a noticeable elongation without a load increase appears), strength (maximum tension in the diagram, which could be sustained by the sample) and Young's modulus. Tensile test enables judging on the material behavior for other types of deformation as well.

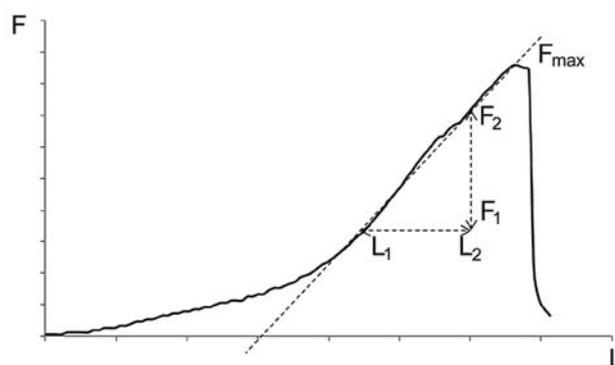
For all research groups the sample wall thickness was measured before each test. Measurements were



разрушающему действию физической нагрузки. В свою очередь, физиологические аспекты его функционирования, включая процессы гемоциркуляции, адгезии, пролиферации, дифференциации клеток, фагоцитоза и др., определяются физико-механическими свойствами и во многом зависят от структурной целостности, архитектоники и взаимосвязи между волокнистыми компонентами [1, 3, 16, 31, 37]. Клетки распознают волокна и ориентируются в своем росте на их направление и расположение. Существует постоянная взаимосвязь и взаимовлияние между клетками и ЭЦМ в процессе репопуляции (ремоделирования) и формирования нормальной структуры имплантата. Необходимым условием является сопряжение скорости заселения и скорости лизиса девитализированного матрикса. Соединительнотканый матрикс, изготовленный путем децеллюляризации ксенотканей, является готовой биологической матрицей, и его исходные физико-механические параметры определяют последующее функционирование трансплантата. Показатели стресс-деформации характеризуют прочность, упругость и пластичность материала, являются важными биомеханическими параметрами соединительнотканых структур и общепринятыми характеристиками биоматериала [11, 15, 19, 21].

На рис. 1 представлена деформационная кривая растяжения, которая характеризует свойства материала образца. Из диаграммы растяжения можно определить предел пропорциональности (наибольшее напряжение, при котором материал следует закону Гука), текучести (напряжение, при котором в материале появляется заметное удлинение без увеличения нагрузки), прочности (максимальное напряжение на диаграмме, которое способен выдержать образец) и модуль Юнга. Испытание на растяжение позволяет судить о поведении материала и при других видах деформации.

Для всех групп исследования перед каждым испытанием проводили измерение толщины стенки образцов. Замеры выполняли в 3-х точках с точностью до 10 мкм и рассчитывали среднее значение. Результаты измерений представлены на рис. 2. Толщина ткани перикарда после всех воздействий значимо увеличивается по сравнению с нативной тканью. Для створок клапана этот показатель в группах 2 и 3 незначительно увеличивается, а для ткани, подвергнутой сочетанному действию замораживания и облучения (группа 4), значимо снижается. После замораживания-облучения ткань перикарда утолщается, створки клапана истончаются, а толщина сосудов не изменяется. Такие отличия в ответ на применяемое воздействие, как мы полагаем, обусловлены гидрофильными



**Рис. 1.** Деформационная кривая одноосного растяжения материала до момента нарушения целостности.

**Fig. 1.** Deformation curve of uniaxial tension until the moment of continuity breakage.

performed in 3 points with an accuracy of up to 10 microns and an average value was calculated. The measurement results are shown in Fig. 2. After all the exposures the thickness of pericardium tissue increases insignificantly if compared to the native tissue. For the valve leaflets this value in groups 2 and 3 increased slightly, while for the tissues subjected to a combined effect of freezing and radiation (group 4) it decreases significantly. After freezing and irradiation the width of pericard tissue was increased, the valve leaflets became thinner, and the dimensions of vessels did not change. These differences in response to applied effect as we believe are stipulated with hydrophilic properties of various connective tissues. Due to the presence of a big amount of glycosaminoglycans in a loose connective tissue the width of arteries was kept at native tissue level.

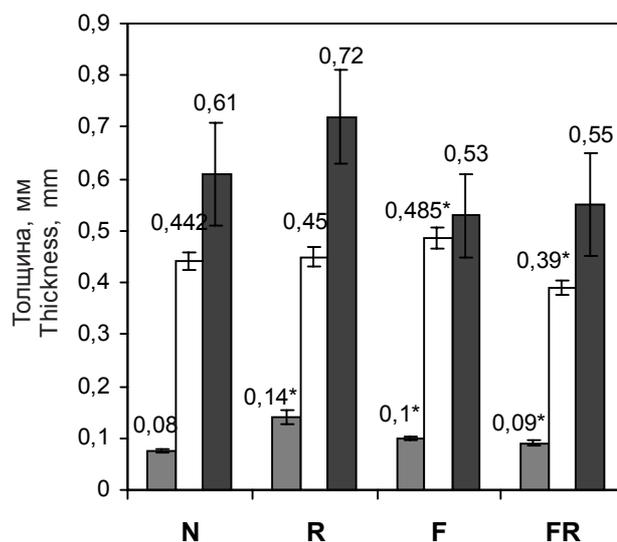
Fig. 3 shows the  $E$  values for the tissues of pericardium, arteries and valve leaflets after each type of impact. This index is determined only by the material elastic properties and is responsible for the tissue stiffness, which is directly proportional to the elasticity modulus. In case of longitudinal strain the  $E$  values for the pericardium tissue subjected to freeze-thawing (group 3), and freeze-irradiation (group 4) increased by 51 and 61%, respectively, and are significantly reduced after irradiation (group 2) by 57%. Similar changes in the  $E$  values were also observed for a transverse load (Fig. 3A). If the valve leaflet was longitudinally stretched, the  $E$  value was also significantly higher for the groups 3 and 4 (46 and 58%, respectively), comparing to the control. In the tissues subjected to irradiation (group 2) the  $E$  value was significantly reduced by 64%. In the radial direction the elasticity modulus of leaflets was quite unchanged and remained at the level of native tissues, except the irradiated



свойствами разных типов соединительной ткани. За счет наличия большего количества гликозаминогликанов в рыхлой соединительной ткани толщина артерий соответствует показателям нативной ткани.

На рис. 3 представлены значения  $E$  для ткани перикарда, артерий и створок клапана после каждого вида воздействий. Данный показатель определяется только упругими свойствами материала и отвечает за жесткость ткани, которая прямо пропорциональна модулю упругости. При продольной деформации  $E$  для ткани перикарда, подвергнутой замораживанию-отогреву (группа 3) и замораживанию-облучению (группа 4), увеличивается на 51 и 61% соответственно и существенно снижается после облучения (группа 2) на 57%. Такие же изменения  $E$  отмечены и при поперечном направлении нагрузки (рис. 3, А). При растяжении створки клапана в продольном направлении значение  $E$  также значимо выше для групп 3 и 4 (на 46 и 58% соответственно) по сравнению с контролем. В тканях, подвергнутых облучению (группа 2),  $E$  значимо снижается на 64%. В радиальном направлении модуль упругости створок практически не меняется и остается на уровне показателя нативных тканей, кроме образцов, подвергнутых облучению, в которых этот показатель снижается (рис. 3, В). Жесткость в сосудистой стенке существенно усиливается после замораживания-отогрева (на 59%) и после комбинированного воздействия (на 47%). Для группы 2 упругие свойства сосудов усиливаются незначительно и находятся в пределах девиаций контроля (рис. 3, С).

Важным свойством деформируемого материала является прочность, характеризующая его способность сопротивляться разрушению при действии внешних сил. Прочность тканей на разрыв при растяжении – основной стандартный показатель, характеризующий механические свойства ткани, для количественной оценки которого используют предел прочности материала (как величину разрушающего механического напряжения), отношение величины разрушающей нагрузки к площади поперечного сечения образца в месте разрушения. При продольной деформации  $\lambda$  перикарда несколько снижается после замораживания-отогрева на 18% (группа 3), но остается на уровне контрольной группы после девитализации (группа 4). При поперечном направлении нагрузки  $\lambda$  снижается для всех опытных групп, но особенно резкое падение прочностных свойств наблюдается в тканях перикарда после ионизирующего излучения на 75% (рис. 4, А). Величина разрушающего механического напряжения возрастает в створках клапана после сочетанного воздействия на ткань как в про-

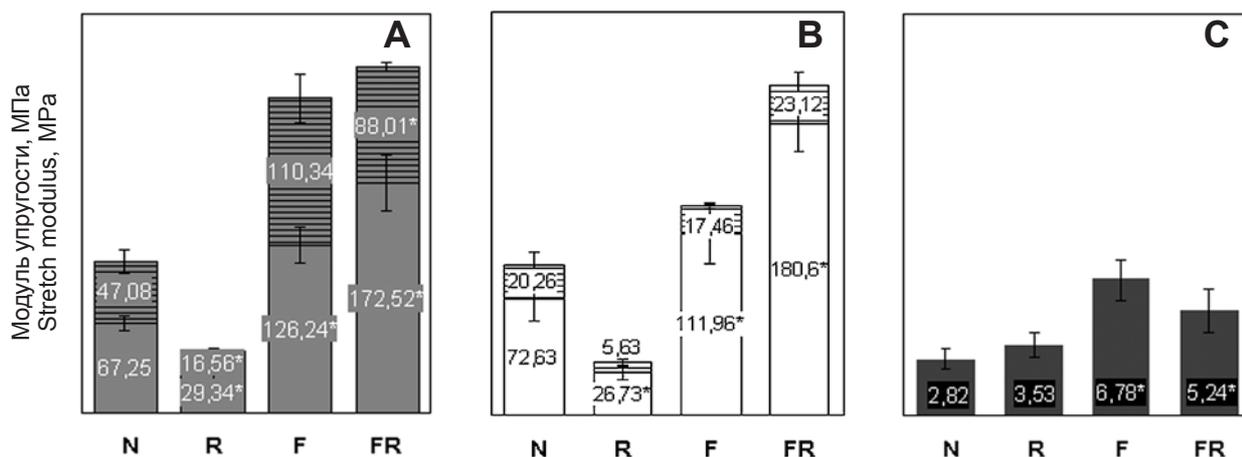


**Рис. 2.** Толщина образцов ткани после различных воздействий: ■ – перикард, □ – створки аортального клапана, ■ – артерии; N – нативные ткани (контроль); R – ткани, облученные в дозе 25 кГр; F – после замораживания до  $-196^{\circ}\text{C}$  и отогрева; FR – ткани после замораживания-отогрева и последующего облучения в дозе 25 кГр; \* – различия статистически значимы относительно контроля,  $p < 0,05$ ,  $n = 200$ .

**Fig. 2.** Thickness of tissue samples after various effects: ■ – pericardium, □ – aortic valve leaflets, ■ – arteries; N – native tissues (control); R – irradiated in a dose of 25 kGy; F – after freezing down to  $-196^{\circ}\text{C}$  and thawing; FR – tissues after freeze-thawing and irradiation at a dose of 25 kGy; \* – statistically significant differences if compared with the control,  $p < 0.05$ ,  $n = 200$ .

samples wherein this index was reduced (Fig. 3C). Stiffness in vascular wall was significantly enhanced after freeze-thawing (59%) as well as after the combined treatment (47%). For group 2 the elastic properties of the vessels were insignificantly enhanced and were within the control range (Fig. 3C).

An important property of deformable material is the strength, characterizing its ability to resist the destruction caused by external forces. The tissue tensile strength during stretching is a basic standard index characterizing the tissue mechanical properties, which could be quantitatively estimated using material stress limit (the value of damaging mechanical stress), the ratio of the breaking load to the sample cross-sectional area at the destruction site. In case of longitudinal deformation the value  $\lambda$  of pericardium was insignificantly reduced after freeze-thawing by 18% (Group 3), but remained at the control group level after devitalization (group 4). The transverse load decreased the  $\lambda$  for all tested groups, but a particularly sharp drop in the tensile strength properties was observed in pericardium tissues after ionizing radiation, by 75% (Fig. 4A). The value of destructive mechanical



**Рис. 3.** Модуль упругости после различных воздействий: **A** – перикард, **B** – створки аортального клапана, **C** – артерии; заштрихованные столбцы – поперечное направление нагрузки; незаштрихованные столбцы – продольное направление нагрузки; N – нативные ткани (контроль); R – ткани, облученные в дозе 25 кГр; F – после замораживания до  $-196^{\circ}\text{C}$  и отогрева; FR – ткани после замораживания-отогрева и последующего облучения в дозе 25 кГр; \* – различия статистически значимы относительно контроля,  $p < 0,05$ .

**Fig. 3.** Elasticity modulus after various treatments: **A** – pericardium, **B** – aortic valve leaflets, **C** – artery; shaded area – transverse load; unshaded area – longitudinal load; N – native tissues (control); R – irradiated in a dose of 25 kGy; F – after freezing down to  $-196^{\circ}\text{C}$  and thawing; FR – tissues after freeze-thawing and irradiation at a dose of 25 kGy; \* – statistically significant differences if compared to the control,  $p < 0.05$ .

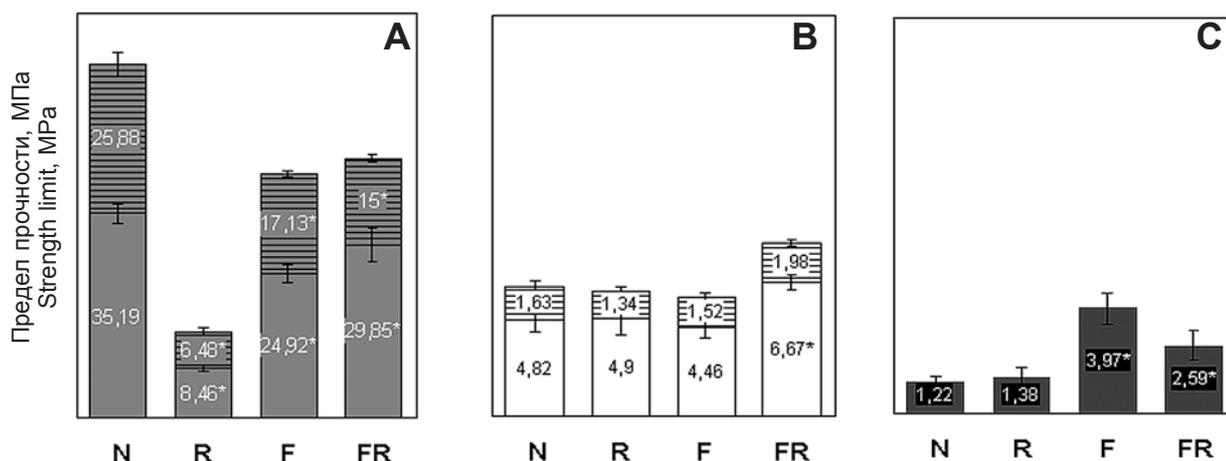
дольном, так и поперечном направлении (на 27 и 20% соответственно). В остальных группах прочностные характеристики образцов сохранялись на уровне контрольной группы (рис. 4, B). Облучение потоком электронов не изменяет прочность сосудистой стенки на разрыв при растяжении (группа 2). Низкие температуры существенно образом изменяют способность артерий к сопротивлению внешней нагрузки. Предел прочности сосудов возрастает в 3,5 раза. После криорадиационной обработки сосудов (группа 4) модуль прочности увеличивается в 2 раза (рис. 4, C).

Пластические свойства материала, т. е. способность к остаточной деформации, отражают показатели относительного удлинения и запас деформативной способности. Величина остаточного удлинения образца при разрыве отображает способность ткани к деформации растяжения. На него оказывает влияние структура и волокнистый состав ткани. На рис. 5, A представлены диаграммы  $L$  перикарда: данный показатель значимо снижается для всех групп испытания. Для группы 4 в продольном направлении волокон  $L$  уменьшается почти в 3 раза, а в поперечном – в 3,5 раза. Таким образом, существует обратная зависимость между упругими свойствами ткани и ее деформационной способностью: за счет усиления жесткости биоматериала следует ограничение возможности к растяжению. Для створок клапана способность к растяжению повышается после облучения (группа 2) на 54% и снижается в группах 3 и 4 на 33 и

stress was increased in the valve leaflets after the combined effect on tissue both in longitudinal and transverse directions (27 and 20% respectively). The strength characteristics in the remaining groups of samples were kept at the level of the control group (Fig. 4B). Electron irradiation did not change the burst strength of vascular wall (group 2). Low temperatures significantly altered the ability of the arteries to resist the external load. Tensile strength of the vessels was increased in 3.5 times. Following cryoirradiation treatment (group 4) the vessels strength module increased twice (Fig. 4C).

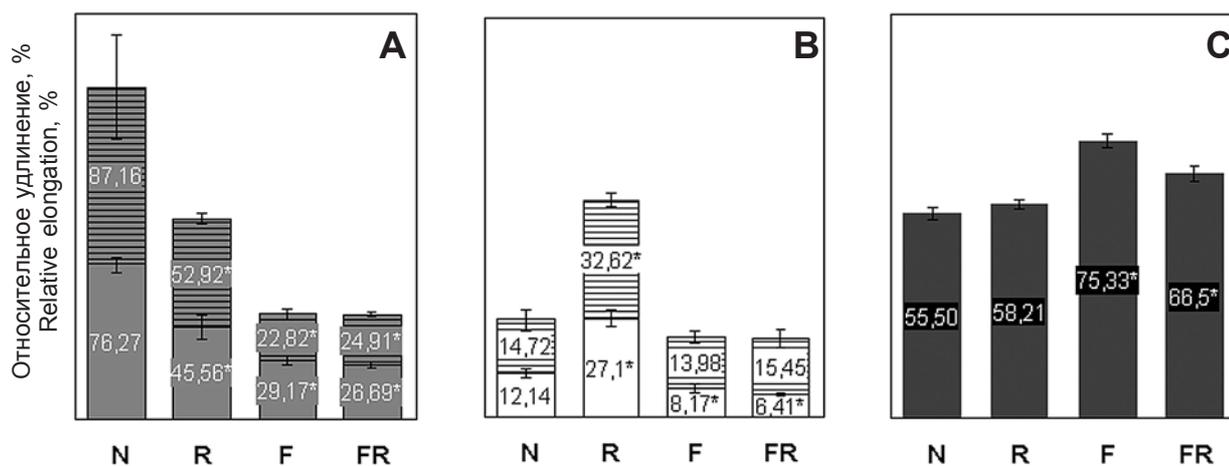
The material plastic properties, *i. e.* the ability to permanent deformation are described by relative elongation and deformability capacity. The value of the sample residual elongation following rupture demonstrates the tissue ability to a tensile strain. It depends on the structure and composition of the tissue fibrous content. Fig. 5A presents the diagram of pericardium  $L$  value, which drops significantly for all the groups tested. For Group 4 in longitudinal direction of fibers the value  $L$  decreases almost thrice and in a transverse it reduces in 3.5 times. Thus, there is an inverse dependence between the tissue elastic properties and its deformability: an increase in biomaterial stiffness leads to a restricted stretching. For the valve leaflets the stretchability increases after irradiation (group 2) by 54% and decreases in groups 3 and 4, by 33 and 47% respectively. Plasticity of the devitalized valve leaflets in radial direction was kept at the control group values (Fig. 5C). The ability of vascular tissue to stretching





**Рис. 4.** Предел прочности после различных воздействий: **A** – перикард, **B** – створки аортального клапана, **C** – артерии; заштрихованные столбцы – поперечное направление нагрузки; незаштрихованные столбцы – продольное направление нагрузки; N – нативные ткани (контроль); R – ткани, облученные в дозе 25 кГр; F – после замораживания до  $-196^{\circ}\text{C}$  и отогрева; FR – ткани после замораживания-отогрева и последующего облучения в дозе 25 кГр; \* – различия статистически значимы относительно контроля,  $p < 0,05$ .

**Fig. 4.** Tensile strength after various treatments: **A** – pericardium, **B** – aortic valve leaflets, **C** – artery; shaded area – transverse load; unshaded area – longitudinal load; N – native tissues (control); R – irradiated in a dose of 25 kGy; F – after freezing down to  $-196^{\circ}\text{C}$  and thawing; FR – tissues after freeze-thawing and irradiation at a dose of 25 kGy; \* – statistically significant differences if compared to the control,  $p < 0.05$ .



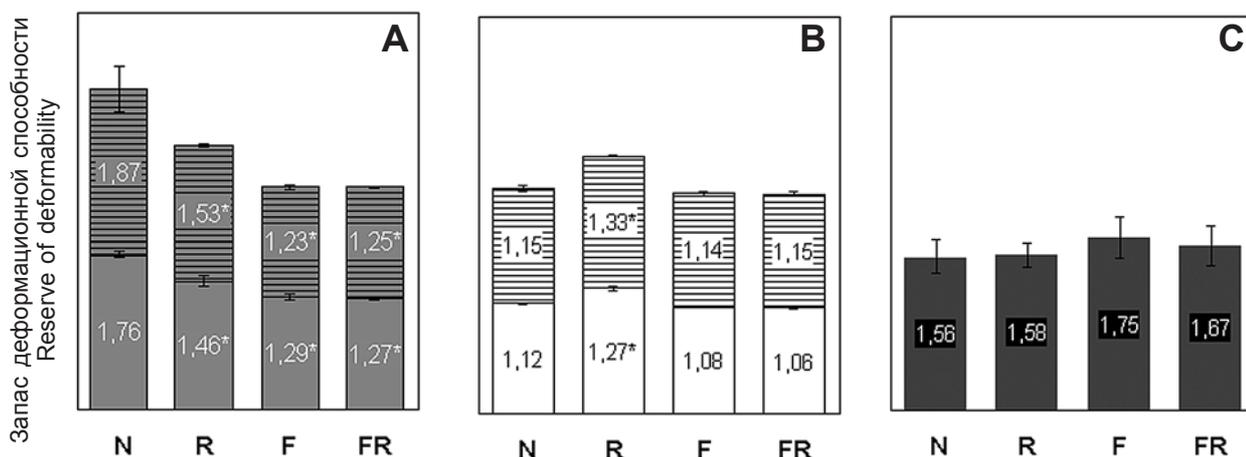
**Рис. 5.** Относительное удлинение после различных воздействий: **A** – перикард, **B** – створки аортального клапана, **C** – артерии; заштрихованные столбцы – поперечное направление нагрузки; незаштрихованные столбцы – продольное направление нагрузки; N – нативные ткани (контроль); R – ткани, облученные в дозе 25 кГр; F – после замораживания до  $-196^{\circ}\text{C}$  и отогрева; FR – ткани после замораживания-отогрева и последующего облучения в дозе 25 кГр; \* – различия статистически значимы относительно контроля,  $p < 0,05$ .

**Fig. 5.** Elongation after various treatments: **A** – pericardium, **B** – aortic valve leaflets, **C** – artery; shaded area – transverse load; unshaded area – longitudinal load; N – native tissues (control); R – irradiated in a dose of 25 kGy; F – after freezing down to  $-196^{\circ}\text{C}$  and thawing; FR – tissues after freeze-thawing and irradiation at a dose of 25 kGy; \* – statistically significant differences if compared to the control,  $p < 0.05$ .

47% соответственно. Пластичность девитализированных створок в радиальном направлении сохраняется на уровне значений контрольной группы (рис. 5, B). Способность ткани сосудов к растяжению после замораживания и девитализации, напротив, повышается (рис. 5, C).

after freezing and devitalization *vice versa* increases (Fig. 5C).

Reserve of deformation capacity characterizes the material's feature to deform within a plastic range before a continuity disruption. The indices  $\delta$  are shown in Fig. 6. The ability to deformation of pericardium was



**Рис. 6.** Запас деформативной способности после различных воздействий: **А** – перикард, **В** – створки аортального клапана, **С** – артерии; заштрихованные столбцы – поперечное направление нагрузки; незаштрихованные столбцы – продольное направление нагрузки; N – нативные ткани (контроль); R – ткани, облученные в дозе 25 кГр; F – после замораживания до  $-196^{\circ}\text{C}$  и отогрева; FR – ткани после замораживания-отогрева и последующего облучения в дозе 25 кГр; \* – различия статистически значимы относительно контроля,  $p < 0,05$ .

**Fig. 6.** Reserve of deformability after various treatments: **A** – pericardium, **B** – aortic valve leaflets, **C** – artery; shaded area – transverse load; unshaded area – longitudinal load; N – native tissues (control); R – irradiated in a dose of 25 kGy; F – after freezing down to  $-196^{\circ}\text{C}$  and thawing; FR – tissues after freeze-thawing and irradiation at a dose of 25 kGy; \* – statistically significant differences if compared to the control,  $p < 0.05$ .

Запас деформативной способности характеризует свойство материала деформироваться в пластической области до момента нарушения целостности. Показатели  $\delta$  представлены на рис. 6. Способность к деформации перикарда снижается значимо после замораживания-отогрева и после замораживания-облучения, однако величина этого показателя свидетельствует о сохранности пластических свойств после указанных воздействий на высоком уровне во всех направлениях (рис. 6, А). Для створок аортального клапана (рис. 6, В) и артерий (рис. 6, С) запас деформативной способности сохраняется после всех воздействий.

Физико-механические показатели позволяют оценить степень повреждения соединительно-тканых структур и клеточных компонентов исследуемых тканей и охарактеризовать их поведение под действием изучаемых физических факторов. Результаты испытаний свидетельствуют о том, что во всех случаях экспериментального воздействия на испытуемые ткани наиболее существенно изменялись упругие свойства, которые отвечают за жесткость ткани и обусловлены структурными особенностями и перестройками внеклеточного матрикса соединительной ткани. Мы полагаем, что изменения упругопрочностных свойств связаны с частичным или полным разрушением клеточных элементов, обеспечивающих в исходном состоянии естественное пространственное распределение и удержание каркаса. Количество фибробластов в

значительно снижались после замораживания-отогрева и замораживания-облучения, но значение параметра указывало на правильное сохранение пластических свойств во всех направлениях постэффекта (рис. 6А). Для створок аортального клапана (рис. 6В) и артерий (рис. 6С) запас деформативной способности сохранялся после всех воздействий.

Физические и механические свойства позволяют оценить степень повреждения соединительно-тканых структур и клеточных компонентов исследуемых тканей и охарактеризовать их поведение под действием изучаемых физических факторов. Результаты испытаний свидетельствуют о том, что во всех случаях экспериментального воздействия на испытуемые ткани наиболее существенно изменялись упругие свойства, которые отвечают за жесткость ткани и обусловлены структурными особенностями и перестройками внеклеточного матрикса соединительной ткани. Мы полагаем, что изменения упругопрочностных свойств связаны с частичным или полным разрушением клеточных элементов, обеспечивающих в исходном состоянии естественное пространственное распределение и удержание каркаса. Количество фибробластов в



разных типах соединительной ткани отличается, особенно много их в рыхлой волокнистой соединительной ткани, которая сопровождает кровеносные сосуды. Клеточных элементов мало в плотной оформленной (перикард) и неоформленной (аортальные створки) соединительной ткани [17]. Разрушение клеток приводит к образованию внутренних полостей в межмембранных пространствах. Вследствие воздействий могут нарушаться зоны прикрепления коллагеновых и эластических волокон на поверхности фибробластов. С точки зрения механики, тем самым нарушается целостность или «сплошность» ткани: при пластической деформации меняются ее биомеханические характеристики. Целостность ткани связана с модулем упругости и определяет ее жесткость. Чем больше разрушенных клеток в матриксе, тем менее жесткая ткань. При одинаковых воздействиях физико-механические свойства сосудистой ткани отличаются от аналогичных показателей ткани перикарда и створок клапана. Кроме того, значительное влияние на прочностные свойства тканей оказывают разрыхление коллагеновых пучков вследствие изменения межбелковых взаимодействий и формирование поперечных сшивок молекул коллагена.

Распределение коллагенового волокна по толщине является одним из важнейших факторов, определяющих механические свойства тканей. Так, устойчивость к пластическим деформациям на изгиб и скручивание связаны с частью фибрилл малого диаметра: чем их больше, тем сильнее взаимодействие с остальными компонентами матрикса. В то же время фибриллы большого диаметра способны противостоять высоким нагрузкам на растяжение, что связано с увеличением количества межмолекулярных сшивок. Фибриллы, оси которых лежат в направлении приложенной нагрузки, обеспечивают растяжимость и повышают предел прочности при напряжении ткани. Расположение фибрилл относительно друг друга отличается в различных тканях. Образовавшиеся фибриллы могут объединяться в волокна, укрепляться внутри- и межцепочечными ковалентными сшивками (встречаются только в коллагене и эластине) [10]. В межклеточном пространстве молекулы эластина образуют волокна и слои, в которых отдельные пептидные цепи связаны множеством жестких поперечных сшивок в разветвленную сеть. В образовании этих сшивок участвуют остатки лизина двух, трех или четырех пептидных цепей. Наличие ковалентных сшивок между пептидными цепями с неупорядоченной конформацией позволяет всей сети волокон эластина растягиваться и

mechanics, a continuity of tissue is thereby disrupted: plastic deformation change its biomechanical characteristics. The tissue continuity is related to the elastic modulus and determines its stiffness. The greater the number of destroyed cells in the matrix, the less stiff is the tissue. These differences were found in physical and mechanical properties of vascular tissue and the indices of pericardium and the valve leaflets assessed following the same exposures. Furthermore, the tissue strength properties are strongly affected by loosening of collagen bundles due to changes in protein-protein interactions and formation of cross-links of the collagen molecules.

The width distribution of collagen fibers is one of the most important factors determining the mechanical properties of tissues. For example, the resistance to plastic deformation to twist and break is associated with some small diameter fibrils: the more their quantity, the stronger is an interaction with the other matrix components. At the same time, the large diameter fibrils are capable of withstanding high tensile strength, that is due to the increased number of molecule-to-molecule cross-links. The fibrils with the axes directed towards the applied load, provide an increased extensibility and ultimate stress limit under tissue stress load. The arrangement of fibrils is various in different tissues. The formed fibrils may be combined into the fibers, be reinforced with intra- and inter-chain covalent cross-linkings (found only in collagen and elastin) [15]. The elastin molecules form the fibers and layers in intercellular space, wherein the individual peptide chains are associated by lots of stiff cross-links into the branched network. The formation of these cross-links involves the lysine residues of two, three or four peptide chains. The presence of covalent cross-links between peptide chains with a disordered conformation allows the entire network of elastin fibers to stretch and contract in all the directions, providing the elasticity in appropriate tissue. The non-enzymatic cross-links formation (glycation) could be influenced by both free radicals (resulted reactive aldehydes form the covalent bonds) and water content in tissue. It has been shown in synthetic polymer networks that when increasing the number of cross-links the physical properties change: permeability reduces, elasticity modulus increases and failure stress value decreases. Body aging is accompanied with a sharp reduction of water content in collagen tissue, resulting in an increase of cross-links number, these effects are manifested in the rise in stiffness, brittleness and loss of elasticity [3].

Furthermore, the formation of cross-links can alter the profile of a surface charge of modified collagen macromolecules due to a reduced number of amino groups in the side chains of amino acid residues, leads



сжиматься в разных направлениях, придавая соответствующим тканям свойство эластичности. Свой вклад в процессы неферментативного образования поперечных связей (гликация) могут вносить как свободные радикалы (образовавшиеся реактивные альдегиды участвуют в формировании ковалентных связей между собой), так и содержание воды в ткани. На примере синтетических полимерных сеток было показано, что от увеличения количества сшивок меняются физические свойства: уменьшается проницаемость, увеличивается модуль упругости и уменьшается величина разрушающего напряжения. При старении организма, когда содержание воды в коллагенсодержащих тканях резко снижается, количество сшивок возрастает, такие эффекты проявляются в увеличении жесткости, хрупкости и потере эластичности [2]. Кроме того, образование сшивок изменяет профиль заряда поверхности модифицированных макромолекул коллагена вследствие уменьшения количества аминокислотных остатков, приводит к снижению их способности к адгезии и ухудшению взаимодействия «внеклеточный матрикс-клетка». Такие изменения нарушают функции соединительной ткани [10].

Наши расчеты показали, что модуль упругости исследуемых тканей резко возрастает под влиянием замораживания-отогрева и комбинированного воздействия. Усиление упругих свойств исследуемых тканей демонстрирует, что указанные воздействия индуцируют образование дополнительных внутри- и межмолекулярных поперечных связей (см. рис. 3). Такие изменения наиболее выражены при одноосном растяжении ткани перикарда и створок клапана в продольном направлении волокон и менее заметны в радиальном направлении: количество поперечных сшивок, которые образуются между молекулами коллагена в данном направлении, значительно больше. После девитализирующей обработки поперечные волокна в аортальных створках клапана малого диаметра сохраняют свой запас прочности и модуль упругости, а в перикардиальной ткани изменяются значительно меньше, чем для фибрилл большого диаметра. Таким образом, устойчивость к пластическим деформациям в тканях обеспечивается за счет сохранности биомеханических характеристик фибрилл малого диаметра.

Принципиальной особенностью действия ионизирующих излучений является способность проникать в биологические ткани, клетки, субклеточные структуры и повреждать их, вызывая непосредственную ионизацию атомов и молекул за счет физических взаимодействий и радиационно-химических реакций. Проникающие в ткани  $\alpha$ - и  $\beta$ -частицы

to a decrease in their ability to adhere and aggravation of the extracellular matrix-cell interaction. These changes lead to a connective tissue dysfunction [15].

Our estimates suggest that the tissue elasticity modulus increases dramatically under the freeze-thawing influence and combined exposure. Strengthening of elastic properties of the studied tissues demonstrate, that the mentioned effects induce the formation of additional intra- and intermolecular cross-links (see Fig. 3). These changes are most pronounced during uniaxial tension of pericardium and valve leaflets tissues in longitudinal direction of the fibers; they are less noticeable in radial direction, the number of cross-links which are formed between the collagen molecules in this direction is considerably bigger. After devitalization the transverse fibers in small diameter aortal leaflets retain their strength reserve and elasticity modulus, and in pericardial tissue they alter in less extent than in large diameter fibrillae. Thus the resistance to plastic deformation in tissues is provided due to the keeping the biomechanical characteristics of small diameter fibrillae.

The principal feature of the effect of ionizing radiation is the ability to penetrate into biological tissues, cells, subcellular structures and damage them, causing a direct ionization of atoms and molecules by physical interactions and radiation-chemical reactions. Penetrating into the tissues  $\alpha$ - and  $\beta$ -particles lose their energy as a result of electrical interactions with electrons of the atoms they are passing. As a result, new molecules are formed, including highly reactive free radicals [38]. Biological effect of ionizing radiation *per se* is not direct but indirect action of the water radiolysis products, being the part of the cell, and at biochemical level leads to the formation of new highly reactive products, causing an additional injury to biologically important macromolecules. These damages concern not only the nuclear components, but the connective tissue extracellular matrix too [35]. The formation of free radicals leads to changes in protein structure: disruption of hydrogen, peptide, and disulfide bonds; destruction of amino acids in the chain; formation of cross-links and aggregates; disordering the protein secondary and tertiary structures [5]. In particular, there are the reports [4, 36] concerning the ionizing radiation effect on collagen fibers, accompanied with the dehydration of collagen fibers (compression), which triggers the cross-links formation. Dehydration could result also in the rupture of collagen chains, that may be a crucial side reaction leading to the denaturation of collagen fibers. It was observed that dehydrated tissue shrunk thrice. Our studies have shown that  $\beta$ -radiation affects destructively the structure of studied connective tissues. These changes are manifested in significantly reduced elasticity and



теряют энергию вследствие электрических взаимодействий с электронами тех атомов, возле которых они проходят. В результате образуются новые молекулы, включая и такие чрезвычайно реакционноспособные, как «свободные радикалы» [9]. Биологическое действие изолированного ионизирующего излучения является не прямым, а опосредованным действием продуктов радиолиза воды, входящей в состав клетки, и на биохимическом уровне приводит к образованию новых химически высокоактивных продуктов, которые вызывают дополнительные повреждения биологически важных макромолекул. Такие повреждения касаются не только ядерных компонентов, но и внеклеточного матрикса соединительной ткани [20]. Образование свободных радикалов влечет за собой изменения структуры белка: разрыв водородных, пептидных, дисульфидных связей; разрушение аминокислот в цепи; образование сшивок и агрегатов; нарушение вторичной и третичной структуры белка [4]. Так, в литературе [23, 38] описывается процесс влияния ионизирующего излучения на волокна коллагена, при котором происходит дегидратация коллагеновых волокон (они сжимаются), и этот процесс инициирует появление поперечных сшивок. Одновременно при дегидратации может произойти разрыв цепей коллагена, что может стать существенной побочной реакцией, приводящей к денатурации коллагеновых волокон. Отмечается, что ткань при дегидратации сжимается в три раза. Собственные исследования продемонстрировали, что  $\beta$ -радиация действует разрушительно на соединительнотканые структуры. Эти изменения проявляются в значимом снижении показателя упругости и предела прочности в группе облученных тканей, что может свидетельствовать о денатурации и конформационных перестройках фибриллярных белков.

Процессы замораживания-отогрева значительно влияют на соединительнотканые структуры за счет процессов кристаллообразования льда. Установлено, что уже при 4°C состояние изолированных белков (особенно с четвертичной структурой) может измениться, поскольку охлаждение влияет на некоторые физико-химические свойства воды в системе, например, на ее плотность и вязкость. Такие трансформации сопровождаются нарушениями внутримолекулярных взаимодействий активных участков биополимера и заключаются в изменении жесткости полипептидных цепей белка и пространственного расположения отдельных его участков. При охлаждении изолированных белков до более низких температур, а также при последующем отогреве наблюдаются агрегация и изменение их конформации – разрыхление белковой

tensile strength in the group of irradiated tissue, which may indicate the denaturation and conformational rearrangement of fibrillar proteins.

The freeze-thawing greatly affects the connective tissue structures due to ice crystal formation. It has been found that already at 4°C the state of isolated proteins (especially with quaternary structure) can alter, since cooling affects some physical and chemical properties of water in the system, such as its density and viscosity. These transformations are accompanied with disorders in molecule-to-molecule interactions of biopolymer active sites and consist in the change of stiffness of the protein polypeptide chains and spatial arrangement of its individual parts. During cooling of isolated proteins down to lower temperatures as well as under subsequent heating there was observed an aggregation and alteration of their conformation, *i.e.* the protein globule loosening [17]. Significant factors in the ice spreading is the interaction of cells with extracellular matrix and the amount of water contained in the tissues. Ice crystallization front causes an increased pressure, rise in osmolarity of the interstitial medium and water release from an interstitial space [8, 18, 27, 31, 32]. In its turn, the thawing provokes the appearance of macroscopic and microscopic lesions. Osmotic effect and ice crystallization alter the microstructure (the cavities appear), mechanical and thermal properties of tissue, and cause irreversible changes (broken cell bonds are not be restored after warming). Moreover, the presence in the system of various types of cells, as well as crystallization in microvessels lead to non-uniform temperature fields in the tissue. As a consequence, thermoelastic stresses appear in the tissues, often resulting in the formation of cracks, affecting the tissue continuity and increasing the risk of devitrification during warming, due to stimulation of heterogeneous nucleation of ice crystals [37].

Collagen fibers in the tissues of valve leaflets, pericardium and vessels form a specific spatial structure, affecting the orderly growth of ice crystals, which occurs through the channels formed by collagen fibers. These processes lead to the formation of additional cavities in the connective tissue matrix. Crystallization processes may damage the individual fibrils. In the zones of their mechanical damage we expect the formation of additional intramolecular cross-links, and the mutual approaching of the collagen fibers (due to internal cavities) initiates the formation of molecule-to-molecule bonds. These effects lead to a deformation load distribution not onto individual collagen fibrils, but to the formed complexes of fibril bundles that ensures the preservation of mechanical strength and enhances the tissue elastic properties.

Effect on the tissues of pericardium and valve leaflets by the flow of electrons in 25 kGy dose after



глобулы [12]. Существенными факторами распространения льда являются взаимодействие клеток с экстрацеллюлярной матрицей и количество содержащейся в тканях воды. Фронт кристаллизации льда приводит к увеличению давления, повышению осмолярности внутритканевой среды и выходу воды из внутритканевого пространства [13, 18, 25, 34, 35]. В свою очередь процесс размораживания влияет на появление макро- и микроскопических повреждений. Осмотический эффект и кристаллизация льда изменяют микроструктуру (появляются пустоты), механические и теплофизические свойства ткани и вызывают необратимые изменения (разрушенные связи клеток не восстанавливаются после отогрева). Кроме того, наличие в системе различных видов клеток, а также кристаллизация в микрососудах приводят к неоднородности температурных полей в ткани. Как следствие, в тканях возникают термоупругие напряжения, часто приводящие к формированию трещин, которые повышают опасность девитрификации при нагреве, поскольку стимулируют гетерогенную нуклеацию кристаллов льда [8].

Коллагеновые волокна в тканях створок клапана, перикарда и сосудах образуют специфическую пространственную структуру, влияющую на упорядоченный рост кристаллов льда, который происходит по каналам, образованным коллагеновыми волокнами. Данные процессы приводят к формированию дополнительных полостей в соединительно-тканном матриксе. Процессы кристаллизации могут повреждать отдельные фибриллы. В зонах их механического повреждения мы предполагаем образование дополнительных внутримолекулярных поперечных связей, а сближение коллагеновых волокон (за счет внутренних полостей) инициирует образование межмолекулярных связей. Указанные воздействия приводят к распределению деформационной нагрузки не на отдельные фибриллы коллагена, а на сформировавшиеся комплексы-пучки фибрилл, что обеспечивает сохранность механической прочности и усиливает упругие свойства ткани.

Воздействие на ткани перикарда и створок клапана потоком электронов в дозе 25 кГр после предварительного замораживания-отогрева приводит к резкому повышению их характеристик упругости. Прочностные свойства усиливаются для ткани створок и сосудов, а предел прочности для ткани перикарда сохраняется на уровне нативных тканей (см. рис. 3, 4). Таким образом, поскольку упругопрочностные характеристики образцов после сочетанного действия низких температур и  $\beta$ -излучения превышают соответствующую

preliminary freeze-thawing results in a sharp rise in their elastic properties. Strength properties are reinforced in the tissues of leaflets and vessels, and the tensile strength for the pericardium remained at the level of native tissues (see. Fig. 3, 4). Thus, since the stress-strain characteristics of the samples after the combined effect of low temperatures and  $\beta$ -radiation exceed the existing indices in the samples subjected only to either freeze-thawing or irradiation, we can emphasize a synergistic effect manifestation on the tissue properties, which is caused by total effect of low temperatures and  $\beta$ -radiation. In their turn, these changes significantly differ from those of the tissue subjected only to ionizing radiation. This result suggests that the pre-freezing has a radioprotective effect for following ionizing radiation. We attribute this effect to a change in the ratio of free and bound water in tissue after freeze-thawing. The radiolysis processes are known to be less pronounced in dehydrated tissue. Water is an essential structural component: the strength of water molecules' binding to biopolymers is of great importance for the structure stabilization and functional activity manifestations. The tendency of water loss in tissues can be intensified at the expense of destruction of proteoglycans, which polysaccharide components have exceptional water adsorption properties.

Results of the findings analysis reveal that the cryoradiation treatment made the scaffold structures (matrix proteins) resistant to the used exposures, their structure do not degrade and preserve their continuity. The outcome of physical and chemical changes in connective tissues after successive effects of low temperature and radiation exposures is a cascade of structural rearrangements, leading to formation of additional intra- and intermolecular cross-links. More compact location and reinforcing fibers provide thereby the graft structural stabilization. Comparison of the findings with the values of the working tension in native tissues suggests that the devitalized tissue may successfully resist physical stress when functioning.

## Conclusions

1. The results of tests have shown that after devitalization the elasticity modulus of tissue increases; the pericardium tensile strength remains at the native tissue level and for the leaflets and vessels it increases. As a consequence the relative elongation of pericardium and aortic valve leaflets decreased, and for the arteries it increases. The disrupted continuity of tissue due to the cell destruction and formation of cavities leads to a slight reduction in the deformability capacity reserve. Herewith all the xenografts retain the ability to deform (stretch) in all the directions and resistance to break and twist.



щие показатели в образцах, подвергнутых только замораживанию-отогреву или облучению, мы можем говорить о проявлении синергического эффекта на свойства ткани, который обусловлен суммарным воздействием низких температур и  $\beta$ -излучения. В свою очередь, такие изменения имеют значимое отличие от показателей ткани, подвергнутой просто ионизирующему излучению. Этот результат дает возможность предположить, что предварительное замораживание оказывает радиопротекторное действие на последующее ионизирующее излучение. Мы объясняем такой эффект изменением соотношения количества свободной и связанной воды в ткани после процесса замораживания-отогрева. Как известно, в дегидратированной ткани процессы радиолитического проявления менее выражены. Вода является важнейшим структурным компонентом: прочность связывания молекул воды с биополимерами имеет большое значение для стабилизации структуры и проявления функциональной активности. Тенденция потери воды в тканях может усиливаться и за счет разрушения протеогликанов, полисахаридные компоненты которых обладают исключительными водоадсорбционными свойствами.

Результаты анализа полученных данных позволяют установить, что после криорadiационной обработки каркасные структуры (матричные белки) устойчивы к используемым воздействиям, не подвергаются структурной деградации и сохраняют свою целостность. Итогом физико-химических изменений в соединительных тканях в результате последовательных эффектов низкотемпературного и радиационного воздействий является каскад структурных перестроек, который приводит к образованию дополнительных внутри- и межмолекулярных поперечных связей. Более компактное расположение и упрочняющиеся волокна таким образом обеспечивают структурную стабилизацию имплантата. Полученные данные при сопоставлении с величинами эксплуатационного напряжения нативных тканей позволяют предположить, что девитализированные ткани могут успешно противостоять физическим нагрузкам в процессе функционирования.

## Выводы

1. Результаты испытаний показали, что после девитализации модуль упругости тканей возрастает; предел прочности перикарда сохраняется на уровне нативных тканей, а для створок клапана и сосудов повышается. Вследствие этого показатель относительного удлинения для перикарда и створок аортального клапана снижается, а для сосудов – повышается. Нарушение целостности

2. Irradiation of the pericardium and valve leaflets with the flow of electrons sharply reduces the mechanical and physical characteristics. Pre-freezing to  $-196^{\circ}\text{C}$  exhibits a radioprotective effect and eliminates the negative effects of  $\beta$ -radiation on the ECM.

3. Deep freezing and  $\beta$ -radiation induce the formation of additional intra- and intermolecular crosslinks and exhibit synergistic effect, *i.e.* elastic properties of tissue are significantly enhanced. More compact location and reinforcing fibers thereby provide structural stabilization of the graft.

4. The ECM of devitalized tissues has been shown to retain its integrity and has physical and mechanical properties which are characteristic for native tissue in both longitudinal and transverse directions.

5. Modified tissue of pericardium, valve leaflets and arteries with certain physical and mechanical characteristics can be used as tissue grafts: elastic properties ensure the long-term existence in a recipient's body (that will allow the implementation of repopulation and formation of a new structure); the strength reserve allows to withstand the operational loads during functioning; the scaffold structure and elasticity are preserved, as well as ability to extensibility, resistance to break and twist.

*We express our special thanks to the head of the Material Strength Chair of the National Technical University 'Kharkiv Polytechnic Institute', V.L. Havin and engineer of the Department S.M. Dergunov for methodological assistance in performing the research.*

## References

1. Akatov V.S., Ryndina N.I., Solovyov V.V. et al. Improving biocompatibility of heart valve and vascular transplants by their devitalization and repopulation by recipient cells. *Cell Technologies in Biology and Medicine* 2006; (3): 166–171.
2. Akhmedov Sh. D., Afanasjev S.A., Dyakova M.L. et al. The use of perfusion decellularized matrix for new blood vessels formation in heart by the method of tissue engineering. *Cell Transplantation and Tissue Engineering* 2009; 4(2): 32–39.
3. Andrianova L.E., Semenova S.N. Biochemistry of extracellular matrix. In: Severin E.S., editor. *Biochemistry*. Moscow: GEOTAR-MED; 2004.
4. Bailey A.J., Rhodes D.N., Cater C.W. Irradiation-induced crosslinking of collagen. *Radiat Res* 1964; 22: 606–621.
5. Bekman I.N. Radiation and nuclear medicine: physical and chemical aspects. In: *Radiochemistry*. Shelkovo; 2012.
6. Bokeria L.A., Kagramanov I.I., Kokshenev I.V. et al., Biological material for prosthesis. Patent of Russian Federation 2430746 IPC AA61L 27/38, A61F2/24, 10.04.2011.
7. Borschel G., Huang Y., Calve S. et al. Tissue engineering of recellularized small-diameter vascular grafts. *Tissue Eng.* 2005; 11(5–6): 778–786.
8. Bujan J., Pascual G., Lopez R. et al. Gradual thawing improves the preservation of cryopreserved arteries. *Cryobiology* 2001; 42(2): 256–265.



ткани за счет разрушения клеток и образования полостей приводит к незначительному снижению запаса деформативной способности. При этом все ксеноимплантаты сохраняют способность к деформированию (растяжению) во всех направлениях, устойчивость к излому и скручиванию.

2. Облучение перикарда и створок клапана потоком электронов резко снижает физико-механические характеристики. Предварительное замораживание до  $-196^{\circ}\text{C}$  проявляет радиопротекторное действие и нивелирует отрицательные эффекты  $\beta$ -излучения на ЭЦМ.

3. Глубокое замораживание и  $\beta$ -радиация индуцируют образование дополнительных внутри- и межмолекулярных поперечных связей и проявляют синергический эффект – существенно усиливаются упругие свойства тканей. Более компактное расположение и упрочняющиеся волокна таким образом обеспечивают структурную стабилизацию имплантата.

4. Показано, что ЭЦМ девитализированных тканей сохраняет свою целостность и обладает физико-механическими свойствами, характерными для нативных тканей как в продольном, так и в поперечном направлении.

5. Модифицированная ткань перикарда, створок клапана и артерий с заданными физико-механическими характеристиками может использоваться в качестве тканевых имплантатов: упругие свойства обеспечивают длительное существование в организме реципиента (что позволит реализоваться процессам репопуляции и формирования новой структуры); запас прочности дает возможность выдерживать эксплуатационные нагрузки в процессе функционирования; сохраняется каркасность, эластичность, способность к растяжимости, устойчивость к излому и скручиванию.

*Выражаем благодарность зав. кафедрой «Сопротивление материалов» Национального технического университета «Харьковский политехнический институт» В.Л. Хавину и инженеру кафедры С.М. Дергуну за методическую помощь в проведении исследований.*

## Литература

1. Акатов В.С., Рындина Н.И., Соловьев В.В. и др. О повышении биосовместимости трансплантатов клапанов сердца и сосудов путем их девитализации и заселения клетками реципиента // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2006. – №3. – С. 166–171.
2. Андрианова Л.Е., Семенова С.Н. Биохимия межклеточного матрикса // Биохимия / Под ред. Е.С. Северина – М.: Изд-во ГЭОТАР-МЕД, 2004. – С. 687–720.
3. Byzov D.V., Mikhailova I.P., Sandomirskiy B.P. et al. A new approach to the creation of small-diameter vascular prostheses. In: Goltsev A.N., editor. Current problems of cryobiology and cryomedicine. Kharkov; 2012. – p. 623–654.
4. Byzov D.V., Repin N.V., Marchenko L.N., et al. Ultrastructure of arteries after devitalization with low temperatures and ionizing irradiation. Probl. Cryobiol. 2011; 21(2): 137–146.
5. Byzov D.V., Synchikova O.P., Mikhaylova I.P. et al. Ionizing irradiation effect on porcine arteries for creation of devitalized scaffolds. Biotechnologiya 2010; 3 (6): 75–79.
6. Gilbert T., Sellaro T., Badylak S. Decellularization of tissues and organs. Biomaterials 2006; 27(19): 3675–3683.
7. Grauss R.W., Hazekamp M.G., Oppenhuizen F. et al. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. Eur J Cardiothorac Surg 2005; 27(4):566–571.
8. Hlusov I.A. Biomechanic basics of biocompatible materials and biological tissues. Tomsk; 2007.
9. Ignatyeva N.U. Collagen – the main protein of connective tissue (review). Esteticheskaya Meditsina 2005; 6(3): 247–256.
10. Leshenko V.G., Ilich G.K. Medical and biological physics: a tutorial. Moscow: INFRA-M; 2012.
11. Nardid O.A. Effect of low temperatures on protein systems. Probl Cryobiol Cryomed 2014; 24(2): 83–101.
12. Ponamarev U.E., Mitasov V.E. Cryopreservation of aortic valves. In: Current problems of Cryobiology and Cryomedicine. Kiev: Naukova dumka; 1981.
13. Repin N.V., Marchenko L.N., Govorukha T.P. et al. Ultrastructure of porcine pericardium and aortic valve tissues, devitalized with cryogenic and irradiation exposures. Probl Cryobiol Cryomed 2015; 25(3): 246–254.
14. Robinson K.A., Li J., Mathison M. et al. Extracellular matrix scaffold for cardiac repair. Circulation 2005; 112(9): 1135–1143.
15. Sandomirsky B.P., Byzov D.V., Mikhaylova I.P. et al. Method for preparation of xenogenous arteries for vascular prosthesis replacement. Patent of Ukraine 68379 IPC A61L27/00 A01N1/02, 26.03.2012.
16. Schmidt C.E., Baier J. M. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. Biomaterials 2000; 21(2): 2215–2231.
17. Serov V.V. Shehter A.B. Connective tissue. Moscow: Medicina; 1981.
18. Sevastyanov V.I., Kirpichikova M.T. Biocompatible materials. Moscow: MIA; 2011.
19. Sevastyanov V.I., Vasin S.L., Perova N.V. Research methods of biomaterials and medical devices. In: Biocompatibility. Moscow; 1999.
20. Solanesa N., Riqola M., Castella A.M. et al. Cryopreservation alters antigenicity of allografts in a porcine model of transplant vasculopathy. Transplant Proc 2004; 1(10): 3288–3294.
21. Spiridonau S.V., Yudina O.A., Shket A.P., et al. Variants of cryopreserved allografts preparation before implantation. Novosti Khirurgii 2013; 21(2): 76–81.
22. Tudorache I., Cebotari S., Sturz G. et al. Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularised heart valves. J Heart Valve Dis 2007; 16(5): 567–573.
23. 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): 1687–1694.
24. Vasin S.L., Rosanova I.B., Sevastianov V.I. The role of proteins in the nucleation and formation of calcium-containing deposits on biomaterials surface. J Biomed Mater Res 1998; 1(39): 491–498.
25. Venkatasubramanian R.T., Grassl E.D., Barocas V.H. et al. Effects of freezing and cryopreservation on the mechanical properties of arteries. Ann Biomed Eng 2006; 34(5): 823–832.
26. Wassenaar C., Wijsmuller E.G., Van Herwerden L.A. et al. Cracks in cryopreserved aortic allografts and rapid thawing. Ann Thorac Surg 1995; 60(2): S165–167.



3. Ахмедов Ш.Д., Афанасьев С.А., Дьякова М.Л. и др. Использование бесклеточного матрикса для формирования новых кровеносных сосудов и сердца методом тканевой инженерии // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т. 4, №2. – С. 32–39.
4. Бекман И.Н. Радиационная и ядерная медицина: физические и химические аспекты // Радиохимия. – Щелково, 2012. – Т. 7. – 400 с.
5. Бызов Д.В., Репин Н.В., Марченко Л.Н. и др. Ультраструктура артерий после девитализации низкими температурами и ионизирующим облучением // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. 21, №2. – С. 137–146.
6. Бызов Д.В., Михайлова И.П., Сандомирский Б.П. и др. Новый подход к созданию сосудистых протезов малого диаметра // Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 623–654.
7. Бызов Д.В., Сынчикова О.П., Михайлова И.П., Сандомирский Б.П. Влияние ионизирующего облучения на артерии свиньи при создании девитализированных скаффолдов // Биотехнология. – 2010. – Т. 3, №6. – С. 75–79.
8. Жмакин А.И. Физические основы криобиологии // Успехи физических наук. – 2008. – Т. 178, №3. – С. 243–266.
9. Жорина Л.В., Змиевской Г.Н. Основы взаимодействия физических полей с биообъектами // Под ред. С.И. Щукина. – М.: Изд-во МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2014. – 376 с.
10. Игнатъева Н.Ю. Коллаген – основной белок соединительной ткани (обзор) // Эстетическая медицина. – 2005. – Т. 6, №3. – С. 247–256.
11. Лещенко В.Г., Ильич Г.К. Медицинская и биологическая физика: учеб. пособие // Минск: Новое знание; Москва: ИНФРА-М, 2012. – С. 84–93.
12. Нардид О.А. Влияние низких температур на белковые системы // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, №2. – С. 83–101.
13. Понамарев Ю.И., Митасов В.И. Криоконсервация аортальных клапанов // Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. Н.С. Пушкаря, А.М. Белоуса. – К.: Наукова думка, 1981. – С. 382–390.
14. Репин Н.В., Марченко Л.Н., Говоруха Т.П. и др. Ультраструктура тканей перикарда и створок аортального клапана свиньи, девитализированных крио- и радиационным воздействием // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, №3. – С. 246–254.
15. Севастьянов В.И., Васин С.Л., Перова Н.В. Методы исследований биоматериалов и медицинских изделий // Биосовместимость / Под ред. В.И. Севастьянова. – М.: ИЦ ВНИИ геосистем. – 1999. – С. 47–87.
16. Севастьянов В.И., Кирпичикова М.Т. Биосовместимые материалы. – М.: МИА, 2011. – 511 с.
17. Серов В.В., Шехтер А.Б. Соединительная ткань. – М.: Медицина, 1981. – 312 с.
18. Спиридонов С.В., Юдина О.А., Шехт А.П. и др. Варианты предимплантационной подготовки криосохраненных аллогraftов // Новости хирургии. – 2013. – Т. 21, №2. – С. 76–81.
19. Хлусов И.А. Основы биомеханики биосовместимых материалов и биологических тканей: Учебное пособие. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2007. – 149 с.
20. Ярмоненко С.П., Вайнсон А.А. Радиобиология человека и животных. – М.: Высшая школа, 2004. – 549 с.
21. Пат. 2430746 РФ, МПК АА61L 27/38, А61F2/24. Биологический материал для протезов / Л.А. Бокерия, И.И. Каграманов, И.В. Кокшенев и др.; заявл. 29.09.2009; опублик. 10.04.2011, Бюл. №14.
22. Пат. 68379, Украина, МПК А61L 27/00, А01N1/02. Спосіб підготовки ксеногенних артерій для судинного протезування / Б.П. Сандомирський, Д.В. Бизов, І.П. Михайлова, О.П. Синчикова. – № u2011 10193; заявл. 19.08.2011; опублик. 26.03.2012, Бюл. №6.
23. Yang J., Yamato M., Shimizu T. et al. Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering. *Biomaterials* 2007; 28(34): 5033–5043.
24. Yannas I.V., Tzeranis D.S., Harley B.A., So P.T. Biologically active collagen-based scaffolds: advances in processing and characterization. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 2010; 368(1917): 2123–2139.
25. Yarmonenko S.P., Vajson A.A. Human and animal radiobiology. Moscow: Vysshaya shkola; 2004.
26. Zeeman R. Cross-linking of collagen-based materials Enschede: Fedodruk BV; 1998.
27. Zhmakin A. I. Physical aspects of cryobiology. *Uspekhi Fizicheskikh Nauk* 2008; 51(3): 231–252.
28. Zhorina L.V., Zmievskoj G.N. Fundamentals of the interaction of physical fields with biologicals. Moscow: N.E. Bauman Moscow State Technical University; 2014.



23. Bailey A.J., Rhodes D.N., Cater C.W. Irradiation-induced crosslinking of collagen // *Radiat. Res.* – 1964. – Vol. 22. – P. 606–621.
24. Borschel G., Huang Y., Calve S. et al. Tissue engineering of recellularized small-diameter vascular grafts // *Tissue Eng.* – 2005. – Vol. 11, №5–6. – P. 778–786.
25. Bujan J., Pascual G., Lopez R. et al. Gradual thawing improves the preservation of cryopreserved arteries // *Cryobiology.* – 2001. – Vol. 42, №2. – P. 256–265.
26. Gilbert T., Sellaro T., Badylak S. Decellularization of tissues and organs // *Biomaterials.* – 2006. – Vol. 27, №19. – P. 3675–3683.
27. Grauss R.W., Hazekamp M.G., Oppenhuizen F. et al. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods // *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* – 2005. – Vol. 27, №4. – P. 566–571.
28. Robinson K.A., Li J., Mathison M. et al. Extracellular matrix scaffold for cardiac repair // *Circulation.* – 2005. – Vol. 112, №9. – P. 1135–1143.
29. Schmidt C.E., Baier J. M. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering // *Biomaterials.* – 2000. – Vol. 21, №2. – P. 2215–2231.
30. Solanesa N., Riqola M., Castella A.M. et al. Cryopreservation alters antigenicity of allografts in a porcine model of transplant vasculopathy // *Transplant. Proc.* – 2004. – Vol. 1, №10. – P. 3288–3294.
31. Tudorache I., Cebotari S., Sturz G. et al. Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularised heart valves // *J. Heart Valve Dis.* – 2007. – Vol. 16, №5. – P. 567–573.
32. 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. – P. 1687–1694.
33. Vasin S.L., Rosanova I.B., Sevastianov V.I. The role of proteins in the nucleation and formation of calcium-containing deposits on biomaterials surface // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1998. – Vol. 1, №39. – P. 491–498.
34. Venkatasubramanian R.T., Grassl E.D., Barocas V.H. et al. Effects of freezing and cryopreservation on the mechanical properties of arteries // *Ann. Biomed. Eng.* – 2006. – Vol. 34, №5. – P. 823–832.
35. Wassenaar C., Wijsmuller E.G., Van Herwerden L.A. et al. Cracks in cryopreserved aortic allografts and rapid thawing // *Ann. Thorac. Surg.* – 1995. – Vol. 60. – Suppl. 2 – P. S165–167.
36. Yang J., Yamato M., Shimizu T. et al. Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering // *Biomaterials* – 2007. – Vol. 28, №34. – P. 5033–5043.
37. Yannas I.V., Tzeranis D.S., Harley B.A., So P.T. Biologically active collagen-based scaffolds: advances in processing and characterization // *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.* – 2010. – Vol. 368, №1917. – P. 2123–2139.
38. Zeeman R. Cross-linking of collagen-based materials. – Enschede: Fedodruk BV, 1998. – 199 p.

