

4. Koster A.J., Grimm R., Typke D. et al. Perspectives of molecular and cellular electron tomography. *J. Struct. Biol.*, 1997, v. 120, p. 276–308.
5. Ladinsky M.S., Mastronarde D.N., McIntosh J.R. et al. Golgi structure in three dimensions: functional insights from the normal rat kidney cell. *J. Cell Biol.*, 1999, v. 44, p. 1135–1149.
6. Ladinsky M.S., Wu C.C., McIntosh S. et al. Structure of the Golgi and distribution of reporter molecules at 20 degrees C reveals the complexity of the exit compartments. *Mol. Biol. Cell*, 2002, v. 3, p. 2810–2825.
7. Marsh B.J., Mastronarde D.N., Buttle K.F. et al. Organellar relationships in the Golgi region of the pancreatic beta cell line, HIT-T15, visualized by high resolution electron tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, v. 98, p. 2399–2406.
8. Mironov A.A., Beznousenko G.V., Polishchuk R.S. and Trucco A. Intra-Golgi transport. A way to a new paradigm? *BBA-Mol. Cell Res.*, 2005, v. 1744, p. 340–350.
9. Rambourg A. and Clermont Y. Three-dimensional electron microscopy: structure of the Golgi apparatus. *Eur. J. Cell Biol.*, 1990, v. 51, p. 189–200.
10. Rambourg A. and Clermont Y. Three-dimensional structure of the Golgi apparatus in mammalian cells. In: *The Golgi apparatus*. Basel, Switzerland, Birkhauser Verlag, 1997, p. 37–61.
11. Trucco A., Polishchuk R.S., Martella O. et al. Secretory traffic triggers the formation of tubular continuities across Golgi sub-compartments. *Nat. Cell Biol.*, 2004, v. 6, p. 1071–1081.

Поступила в редакцию 22.12.2005 г.

ELECTRON-TOMOGRAPHIC ANALYSIS OF GOLGI COMPLEX STRUCTURE IN CELLS GROWING IN CULTURE

G.V. Beznousenko, I.S. Sesorova and V.V. Banin

Study of the Golgi complex (GC) in cultured NRK cells using improved method of sample preparation for electron tomography (ET) enabled to detect more fine details of GC structure. With the application of quantitative ET, no numerous vesicles were detected around GC, while most of stacks constantly contained intercisternal connections. It was demonstrated that vesicular-tubular clusters, which serve as the exit sites from endoplasmic reticulum, were composed of two domains: varicose tubules with sparse COPII-coated vesicles and a network of smooth tubules. The data obtained argue against the models of transport, which consider the vesicles as the main or necessary membranous carriers. On the contrary, continuous tubular connections seem to play an important role in traffic joining secretory pathway regions.

Key words: *Golgi complex, intracellular traffic, models of traffic, electron tomography.*

Department of Morphology, Russian State Medical University, Moscow, Department of Biology and Ecology, Shuya State Pedagogical University.

© О.Р. Шангина, Р.Т. Нигматуллин, 2006
УДК 611.018:612.014.482

О.Р. Шангина и Р.Т. Нигматуллин***

ВЛИЯНИЕ РАДИАЦИОННОЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ НА СТРУКТУРУ И СВОЙСТВА БИОМАТЕРИАЛОВ

Лаборатория биоматериалов (зав. — канд. биол. наук О.Р. Шангина) Всероссийского центра глазной и пластической хирургии, г. Уфа

Цель исследования — изучение структурных изменений соединительнотканых биоматериалов при различных сочетаниях их радиационной стерилизации, физико-химической обработки и консервации. С помощью комплекса гистологических методов (поляризационная микроскопия неокрашенных срезов, окраска по ван Гизону, растровая электронная микроскопия) был проведен анализ структурных изменений сухожилий и дермы, прошедших различную физико-химическую обработку и подвергнутых радиационной стерилизации различными видами (гамма-излучение и поток быстрых электронов) и дозами 1,5, 2,5 и 4 Мрад облучения. Выявлена зависимость структурных изменений в биоматериалах от фиброархитектоники самой ткани, физико-химической обработки, а также вида и дозы радиационного излучения. Сухожилия подвергаются отчетливо выраженным изменениям при всех исследованных режимах и дозах радиации. Дерма обладает наиболее высокой устойчивостью к радиационному воздействию.

Ключевые слова: *трупные ткани, фиброархитектоника, радиационная стерилизация.*

Донорские ткани служат исходным материалом в производстве биоматериалов, используемых для аллогенных пересадок. Из них наиболее широко используются кости, хрящи, дерма, сухожилия, фасции и т. д. Соответственно должны предъявляться специальные требования к биологической безопасности донорских тканей, так как они известны своей способностью пе-

редавать различные микроорганизмы, вирусы [6]. Для достижения безопасности трупных тканей используют метод радиационной стерилизации, который считается самым эффективным [7]. Его высокая бактерицидная активность и большая проникающая способность делают этот метод наиболее перспективным по сравнению с другими. В то же время, радиационная стерили-

*E-mail: alloOlga@mail.ru

**E-mail: nigmatullin@mail.ru

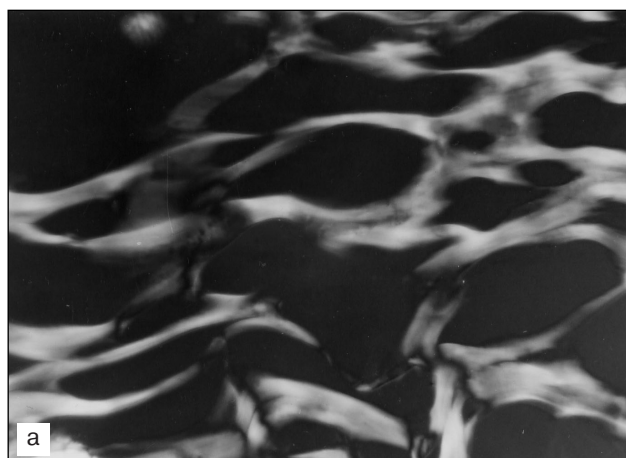


Рис. 1. Структура лиофилизированного сухожилия до радиационной стерилизации (а) и деструкция лиофилизированного сухожилия после радиационной стерилизации гамма-лучами дозой 2,5 Мрад (б).

Поляризационная микроскопия неокрашенного среза. Об. 20, гомаль 3.

лизация часто приводит к нарушению структуры и прочности биоматериалов, изменяет остеоиндуктивные свойства костей. Поэтому проблема радиационной стерилизации биоматериалов остается актуальной в современной трансплантологии [1, 2, 4]. До настоящего времени не разработана единая теория радиационной устойчивости биоматериалов, которая учитывала бы их структуру, химический состав, метод консервации и цель трансплантации. Поэтому весьма перспективной представляется разработка таких методов радиационной стерилизации, которые, с одной стороны, гарантировали бы полную стерильность биоматериалов, с другой — щадяще воздействовали бы на биологические свойства тканей.

Цель настоящего исследования — изучение структурных изменений соединительнотканых биоматериалов при различных сочетаниях их радиационной стерилизации, физико-химической обработке и консервации.

Материал и методы. Для исследования от трупов были взяты 36 образцов сухожилий и дермы. В зависимости от физико-химической обработки ткани были разделены на следующие группы: 1-я — нативные ткани, помещенные в этанол; 2-я — лиофилизированные ткани и 3-я — ткани, обработанные по технологии Аллоплант. Данная технология разработана во Всероссийском центре глазной и пластической хирургии (г. Уфа). Целью технологии Аллоплант являются мембранолиз и экстракция отдельных фракций гликозаминогликанов из волокнистых структур. В результате данной обработки биоматериалы приобретают низкие антигенные свойства и стимулируют регенерацию соединительной ткани. Структура биоматериалов, изготовленных на основе аллогенной дермы и сухожилий, описана в специальной монографии [3]. Радиационную стерилизацию исследуемых тканей проводили на линейном ускорителе электронов ЛУ-10-20 двумя видами излучений: гамма- (тормозное излучение) и потоком быстрых электронов в дозах 1,5, 2,5 и 4 Мрад (1 Мрад=10 кГр). Продолжительность стерилизации образцов зависела от вида и дозы излучения. Так, облучение гамма-лучами дозой 1,5 Мрад имело продолжительность 60 мин, дозой 2,5 Мрад — 1 ч 50 мин, дозой 4 Мрад — 3 ч. Облучение потоком быстрых электронов проходило следующим образом: дозой 1,5 Мрад — в течение 2 с, дозой 2,5 Мрад — 3 с, дозой 4 Мрад — 5 с. Все образцы облучали однократно. Образцы биоматериалов до и после радиационной стерилизации были исследованы с при-

менением комплекса гистологических методов — окраска по ван Гизону, поляризационная микроскопия неокрашенных срезов, растровая электронная микроскопия. Кроме того, все исследуемые ткани были проверены на стерильность.

Результаты исследования. Как показали наши исследования, биоматериалы, состоящие из плотно расположенных пучков коллагеновых волокон с преимущественно однонаправленной ориентацией (сухожилия), консервированные в нативном виде, подвергаются деструкции даже при малых дозах радиационной стерилизации. Данный факт обусловлен, по-видимому, явлением аутолиза за счет ферментов, выделяющихся при разрушении клеток. У лиофилизированных сухожилий структура изменяется уже в процессе лиофилизации (рис. 1, а). Основное вещество между пучками исчезает, и биоматериал приобретает ячеистый вид. После радиационной стерилизации архитектоника волокнистого каркаса сухожилий значительно нарушается (см. рис. 1, б).

Наиболее устойчивыми к облучению, по нашим наблюдениям, оказались сухожилия, обработанные по технологии Аллоплант (рис. 2, а). При стерилизации потоком быстрых электронов не изменились пространственная архитектоника пучков и их тинкториальные свойства, что свидетельствует о сохранности основной структуры сухожилия (см. рис. 2, б). Стерилизация гамма-лучами выявляет незначительные изменения, заключающиеся в слабо выраженном набухании коллагеновых волокон в пучке.

Изучая биоматериалы с трехмерной пространственной ориентацией коллагеновых волокон (дерма), мы пришли к следующему выводу: при радиационной стерилизации нативных биоматериалов дермы изменения обнаружены в виде слабо выраженного мукоидного набухания отдельных волокон, что в целом не влияет на качество биоматериала. Наиболее значительные изменения обнаруживаются после радиационного воздействия на лиофилизированные образцы дермы. В одном случае они представлены в виде фибриноидного набухания до образования гиалиноподобного вещества, в другом — в виде сильно выраженного разрежения пучков коллагеновых волокон. И в том, и в другом случае деструкция волокнистого каркаса очевидна.

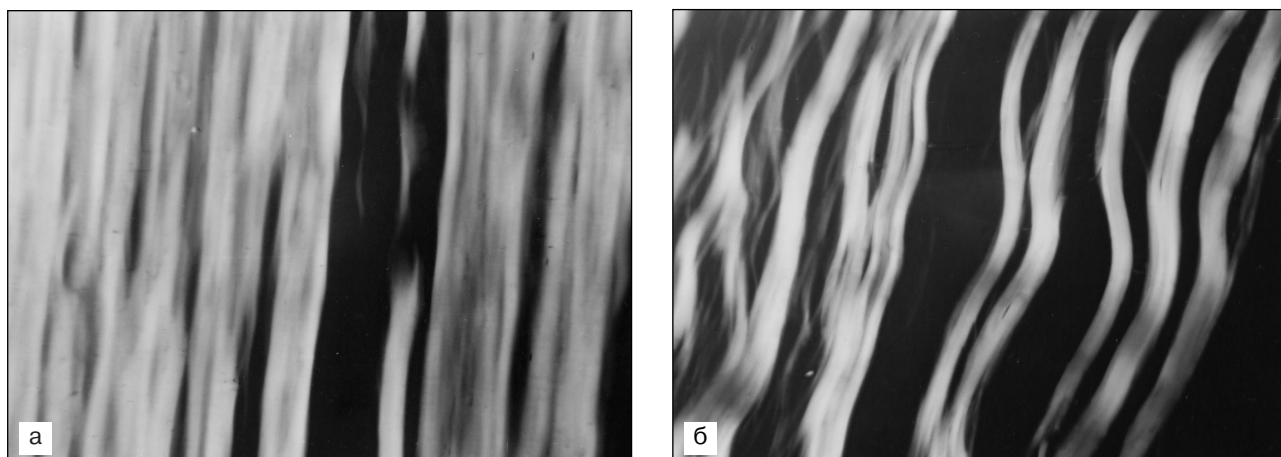


Рис. 2. Структура сухожилия, обработанного по технологии Аллоплант, до радиационной стерилизации (а) и после стерилизации электронами дозой 2,5 Мрад (б).

Поляризационная микроскопия неокрашенного среза. Об. 20, гомаль 3.

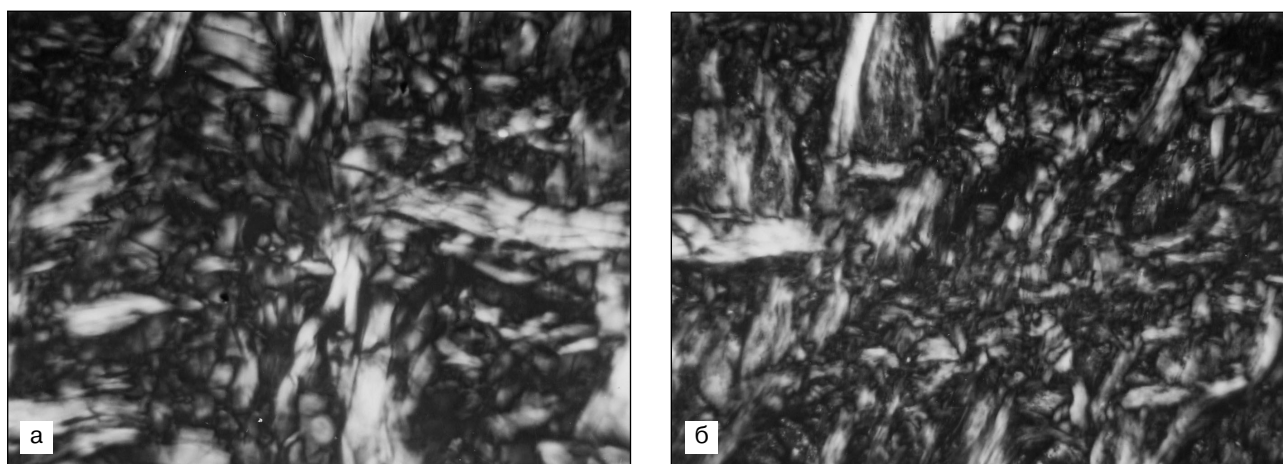


Рис. 3. Структура дермы, обработанной по технологии Аллоплант, до радиационной стерилизации (а) и после стерилизации гамма-лучами, дозой 2,5 Мрад (б).

Поляризационная микроскопия неокрашенного среза. Об. 20, гомаль 3.

После радиационной стерилизации дермы, обработанной по технологии Аллоплант, на всех уровнях проведенного нами исследования структурных изменений не обнаружено (рис. 3, а, б).

Обсуждение полученных данных. Проведенные морфологические исследования позволяют проанализировать зависимость структурных изменений различных видов соединительнотканых биоматериалов при радиационной стерилизации от их фиброархитектоники, вида и дозы облучения, а также сформулировать концепцию о радиационной устойчивости волокнистых структур. Так, сухожилия, в структуре которых преобладают одинаково направленные пучки коллагеновых волокон, подвергаются отчетливо выраженным структурным изменениям при всех исследованных режимах и дозах облучения. Приведенные нами данные согласуются с результатами других исследователей [8], которые выявили деструкцию коллагеновых волокон сухожилия при гамма-стерилизации дозами 4, 6, 8 Мрад. Проведенные нами исследования структуры дермы показали, что она имеет наиболее высокую устойчивость к облуче-

нию. При гамма-стерилизации дозами 1,5, 2,5 и 4 Мрад структура дермы сохраняется. По-видимому, высокий порог радиационной устойчивости дермы связан с тем, что она имеет сложно-переплетенный волокнистый остов. При этом отдельные пучки волокон переходят из одного слоя в другой, формируя разнонаправленную фиброархитектонику. Плотно расположенные и переплетенные пучки волокон дермы позволяют удерживать ее структуру даже при более жестком облучении пучком ускоренных электронов. Как показали наши наблюдения, структура дермы остается неизменной, как при светооптическом, так и при электронно-микроскопическом исследованиях. К сожалению, в литературе мы не нашли данных о радиационной устойчивости дермы. Низкий порог радиационной устойчивости сухожилий связан с их однонаправленной пучковой организацией, при этом пучки первого и второго порядка оплетаются сетью коллагеновых волокон и фибрилл, образуя войлокообразное сплетение [5]. Пучки первого порядка диаметром 2 мкм оплетаются и связываются между собой указанной сетью. Наличие описанной сети и сами пучки первого порядка мы рассматрива-

ем как 1-й уровень структурной стабилизации соединительнотканых биоматериалов. Пучки второго порядка диаметром 20 мкм также оплетаются подобной сетью, которая поддерживает структурную целостность пучков и связывает их между собой. Соответственно наличие пучков второго порядка, с оплетающей их рыхлой сетью коллагеновых волокон, мы рассматриваем как 2-й уровень стабилизации волокнистых структур. Для сухожилия характерны два приведенных уровня стабилизации. Наши исследования показали, что описанные 2 уровня стабилизации в изолированном виде не обеспечивают достаточно надежную защиту сухожилий при радиационном воздействии. Таким образом, в сухожилиях выражены лишь первые 2 уровня стабилизации. В дерме эти уровни выражены слабо. В то же время, сложная пространственная архитектура дермы позволяет выявить 3-й уровень ее стабилизации. Данное сочетание всех трех уровней, при ведущей роли 3-го уровня стабилизации, обеспечивает дерме максимальную устойчивость и сохранение фиброархитектоники при воздействии радиационного облучения во всех исследуемых режимах, дозах и независимо от вида консервантов.

Таким образом, проведенные нами исследования позволили заключить, что в биоматериалах, подвергнутых радиационной стерилизации, происходят структурные изменения, характер и выраженность которых определяются следующими факторами: 1) фиброархитектоникой тканей; 2) способом их физико-химической обработки (вид консерванта, степень дегидратации тканей); 3) типом и мощностью излучения. Анализируя указанные факторы, в каждом конкретном случае представляется возможным прогнозировать структурные изменения в различных биоматериалах и подбирать оптимальную дозу и вид радиационного воздействия для определенного вида ткани.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лекишвили М.В. Варианты деминерализованных костных аллоимплантатов для использования в восстановительной хирургии. В кн.: Клинические и фундаментальные аспекты клеточных и тканевых биотехнологий. Самара, Офорт, 2004, с. 92–94.
2. Лекишвили М.В., Исаева Е.И., Пономарев В.Н. и Васильев М.Г. Лучевая стерилизация деминерализованных костных трансплантатов в свете профилактики инфицирования гепатитом В и С. Вестн. травматол. и ортопед., 2002, № 1, с. 75–77.
3. Нигматуллин Р.Т. Очерки трансплантации тканей. Уфа, ООО Ксерокс СТМ, 2003.
4. Савельев В.И., Корнилов Н.В. и Калинин А.В. Актуальные проблемы трансплантации тканей. СПб., МОРСАР АВ, 2001.
5. Сорокин А.П. Общие закономерности строения опорного аппарата человека. М., Медицина, 1973.
6. Pruss A., Baumann B., Seibold M. et al. Validation of sterilization procedure of allogenic avital bone transplants using peracetic acid-ethanol. Biological, 2001, v. 29, p. 59–66.
7. Pruss A., Kao M., Gohs U. et al. Effect of gamma irradiation on human cortical bone transplants contaminated with enveloped and non-enveloped viruses. Biological, 2002, v. 30, p. 125–133.
8. Salehpour A., Butler D.L., Proch F.S. et al. Dose-dependent response of gamma irradiation on mechanical properties and related biochemical composition of goat bone-patellar tendon-bone allografts. Orthop. Res., 1995, v. 13, № 6, p. 898–906.

Поступила в редакцию 10.11.2005 г.
Получена после доработки 30.01.2006 г.

EFFECT OF RADIATION STERILIZATION ON BIOMATERIAL STRUCTURE AND PROPERTIES

O.R. Shangina and R.T. Nigmatullin

The purpose of the investigation was the study of structural changes connective tissue biomaterials after different combinations of their radiation sterilization, physico-chemical treatment and conservation. Using a complex of histological methods (polarization microscopy of unstained sections, van Gieson's stain, scanning electron microscopy), an analysis was performed to detect the structural changes in tendons and dermis which underwent various physico-chemical treatment and subjected to the radiation sterilization using different types (3- radiation and fast-moving electron stream) and doses (1.5, 2.5 and 4 Mrad) of radiation. The dependence of the structural changes in the biomaterials on the fibroarchitectonics of the tissue as well as on the physico-chemical treatment and radiation type and dose was demonstrated. The tendons underwent clear-cut significant changes in all regimes and radiation doses studied. Dermis was found to be most resistant to radiation challenge.

Key words: *cadaver tissues, fibroarchitectonics, radiation sterilization.*

Laboratory of Biomaterials, All-Russian Center of Eye and Plastic Surgery, Ufa.