

WPŁYW PROMIENIOWANIA ULTRAFIOLETOWEGO I ŚWIATŁA WIDZIALNEGO NA STRUKTURĘ TKANKI OSIERDZIA ŚWINI

BEATA C WALINA*, ARTUR TUREK*, JERZY NOŻYŃSKI**, MARIA JASTRZĘBSKA*

*KATEDRA BIOFIZYKI, ŚLĄSKA AKADEMIA MEDYCZNA, OSTROGÓRSKA 30, 41-200 SOSNOWIEC

**FUNDACJA ROZWOJU KARDIOCHIRURGII, WOLNOŚCI 345, 41-800 ZABRZE

Streszczenie

Analizowano wpływ promieniowania ultrafioletowego (UV) i światła widzialnego (VIS) na strukturę tkanek osierdžia świńskiego, wykorzystując badania profili elektroforetycznych białek uwalnianych z tkanek i histologiczne badania struktury tkanek. Wykazano, że tkanki osierdžia poddane naświetlaniu UV lub VIS w czasie 1 h lub dłuższym mogą ulegać procesowi fotodegradacji.

Słowa kluczowe: tkanka, osierdzie świńskie, struktura, naświetlanie, UV, VIS, elektroforeza białek, histologia.

Wprowadzenie

Działanie na tkanki łączne zarówno promieniowania UV, jak i światła widzialnego może powodować sieciowanie białek tkankowych [1-3]. Efekt ten wykorzystano w metodzie fotooksydacji w obecności barwnika, która jest stosowana do wytwarzania bioprotez [4, 5]. Obecność barwnika powoduje zwiększenie dynamiki procesu sieciowania. Jest to jedna z bardziej obiecujących technik preparowania zastawek biologicznych. Uzyskany biomateriał zachowuje fizyczne właściwości tkanki naturalnej: jest stabilny, biologicznie zgodny i nie immunogenny, nie ulega zwapnieniu. Ponadto taki biomateriał wykazuje chemiczną i enzymatyczną stabilność in vivo [6-8].

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu promieniowania ultrafioletowego (UV) i światła widzialnego (VIS) na strukturę bogatych w kolagen tkanek osierdžia świni.

Materiały i metody

Materiałem poddawanym badaniom były tkanki osierdžia włóknistego świni, pobierane bezpośrednio po uboju zwierząt. Tkanki były natychmiast płukane w schłodzonym (4°C) roztworze solanki buforowanej fosforanami (phosphate-buffered saline; PBS; pH 6,5) i następnie umieszczane w butelkach zawierających ten sam bufor. Butelki umieszczano w pojemniku chłodzonym lodem, wykorzystywanym do transportu. Z każdego worka osierdziowego oddzielano mechanicznie osierdzie włókniste, z którego usuwano ostrożnie tkankę tłuszczową. Oczyszczone kawałki tkanki osierdžia naświetlano promieniowaniem UV lub VIS w czasie 1, 2 i 3 h, w temperaturze 15°C. Zmiany w strukturze tkanek oceniano na podstawie badania ekstrakcji białek i badań histologicznych. W tym celu oznaczano masy cza-

EFFECT OF ULTRAVIOLET RADIATION AND VISIBLE LIGHT ON STRUCTURE OF PORCINE PERICARDIUM TISSUE

BEATA C WALINA*, ARTUR TUREK*, JERZY NOŻYŃSKI**, MARIA JASTRZĘBSKA*

*DEPARTMENT OF BIOPHYSICS, MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, OSTROGÓRSKA 30, 41-200 SOSNOWIEC

**FOUNDATION FOR DEVELOPMENT OF CARDIAC SURGERY, WOLNOŚCI 345, 41-800 ZABRZE

Abstract

Analysed was an effect of ultraviolet radiation (UV) and visible light (VIS) on structure of porcine pericardium tissue, by means of investigations of electrophoretic profiles of proteins extracted from tissues as well as histological examinations of the tissue structure. It has been demonstrated that the pericardium tissues treated with UV or VIS-radiation for 1 h or longer may undergo the photodegradation process.

Key words: tissue, porcine pericardium, structure, irradiation, UV, VIS, proteins, electrophoresis, histology.

Introduction

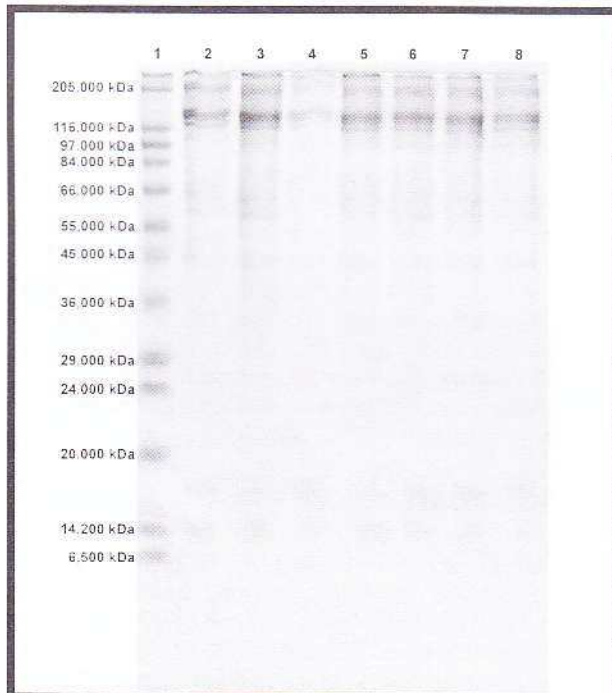
Treating of the connective tissue both with the ultraviolet radiation (UV) and visible light (VIS) may cause crosslinking of tissular proteins [1-3]. This effect has been employed in the dye-mediated photooxidation method, which is used to producing bioprostheses [4, 5]. The presence of the dye causes the higher dynamics of the crosslinking process, being one of more promising methods of biological valves preparing. Obtained biomaterial keeps physical properties of the natural tissue: is stable, biologically adequate and not immunogenic, does not undergo calcifying. Besides, such biomaterial indicates chemical and enzymatic stability in vivo [6-8].

The aim of the present work was to investigate the influence of the ultraviolet radiation (UV) and the visible light (VIS) on the structure of collagen-rich porcine pericardium.

Materials and methods

The material being investigated were the fibrous porcine pericardium tissues sampled directly after slaughtering of animals. Tissues were immediately rinsed in cooled (4°C) solution of phosphate-buffered saline (PBS; pH 6,5) and then placed in bottles containing this same buffer. The bottles were put in ice-cooled container used for transportation. The fibrous pericardium was mechanically separated from each pericardial sac and the fatty tissue was carefully removed. The cleaned pericardium-tissue pieces were UV or VIS-irradiated for 1,2 and 3 h, at temperature 15°C. Changes in the tissue structure were evaluated based on protein extraction assays and histological examinations. For this purpose, the molecular weights of proteins released from the native and modified tissues were determined. Iso-

steczkowe białek uwalnianych z tkanek natywnych i modyfikowanych. Izolowanie białek i analizy elektroforetyczne prowadzono z zastosowaniem procedury Laemmli [9]. Białka rozdzielano z użyciem metody elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (polyacrylamide gel electrophoresis; PAGE) w obecności dodecylo-siarczanu sodowego (sodium dodecyl sulphate; SDS), powszechnie znanej jako metoda SDS-PAGE. Detekcję białek wewnątrz żelu poliakrylamidowego prowadzono stosując metodę barwienia błękitem Coomassie. Dokumentację żeli wykonywano z zastosowaniem systemu Biotec Fischer. Badania histologiczne prowadzono w Fundacji Rozwoju Kardiologii w Zabrze. Próbkę tkanek barwiono hematoksyliną Harrisa, z podbarwieniem tła 1% roztworem erytrozyny. Obserwację preparatów prowadzono w mikroskopie świetlnym Polyvar 2 (Leica) przy powiększeniu 200 \times . Dokumentację preparatów wykonano z zastosowaniem systemu Quantimet 500 Plus.



RYS. 1. Rozdziały elektroforetyczne białek ekstrahowanych z próbek tkanki osierdzia świni. Ścieżki: 1 - wzorzec mas cząsteczkowych; 2 - tkanka natywna; 3-5 - tkanki naświetlane UV odpowiednio w czasie 1, 2 lub 3h; 6-8 - tkanki naświetlane VIS odpowiednio w czasie 1, 2 lub 3h.

FIG. 1. Electrophoretic profiles of proteins extracted from the pericardium pericardium tissues. Lines: 1 - standard of molecular weights; 2 - native tissue; 3-5 - tissues irradiated with UV for 1, 2 or 3h, respectively; 6-8 - tissues irradiated with VIS for 1, 2 or 3h, respectively.

Wyniki

Wpływ naświetlania tkanek osierdzia światłem widzialnym lub ultrafioletowym na profile elektroforetyczne białek ekstrahowanych z badanych tkanek (barwionych kumazyną) uwidocznił na RYS. 1.

W TABELI 1 przedstawiono zmiany mas cząsteczkowych białek ekstrahowanych z tkanek natywnych i tkanek naświetlanych (UV lub VIS).

lation of the proteins and electrophoretic analyses were carried out using the Laemmli procedure [9]. The proteins have been separated using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS), commonly known as SDS-PAGE method. Proteins-detection within polyacrylamide gel has been carried out using the Coomassie blue staining method. The gel-documentation has been performed using Biotec Fischer System. Histological investigations have been carried out in Foundation for Development of Cardiac Surgery in Zabrze. The tissue samples were stained with Harris hematoxylin, using ground-tinting with 1% erythrosine solution. Observation of preparations has been carried out in light-microscope Polyvar 2 (Leica) under magnification 200 \times . The preparations-documentation has been performed using Quantimet 500 Plus system.

Tkanka Tissue	Masy cząsteczkowe białek ekstrahowanych z osierdzia świni Molecular weights of proteins extracted from porcine pericardium [kDa]										
N	213	148	130		65	60	45	35	32	29	16
UV-1	209	150	132		65	60	44	35		25	17
UV-2	205	158	130			60	44			27	14
UV-3	221	154	132		65	60	44	34			14
VIS-1	223	158	134	108	65	60	44	34	31		17
VIS-2	223	154	130		65	60	44	34			17
VIS-3	227	156	132		64	60	44				17

TABELA 1. Masy cząsteczkowe białek ekstrahowanych z tkanek osierdzia: natywnej (N), naświetlanych UV w czasie 1, 2 lub 3 h (UV-1, UV-2, UV-3), naświetlanej VIS w czasie 1, 2 lub 3 h (VIS-1, VIS-2, VIS-3).

TABLE 1. Molecular weights of proteins extracted from the pericardium tissues: native (N), irradiated with the UV-radiation during 1, 2 or 3 h (UV-1, UV-2, UV-3), irradiated with the visible light (VIS) during 1, 2 or 3 h (VIS-1, VIS-2, VIS-3).

Results

The influence of the pericardium tissues irradiating with the ultraviolet (UV) or visible light (VIS) on electrophoretic profiles of proteins extracted from examined tissues (stained with the coomasin) has been shown in the FIG. 1.

Changes in molecular weights of proteins extracted from the native tissue and tissues irradiated with UV or VIS have been presented in TABLE 1.

Histological images of investigated tissues: native and treated with UV or VIS-radiation during 1, 2 or 3h, together with descriptions of tissue preparations have been presented in TABLE 2.

Discussion

Suh et al. [3] investigated the collagen crosslinking-degree in the porcine heart valve under the ultraviolet radiation (UV) in dependence on the exposition time. They demonstrated that the longer the irradiation time the higher the efficiency of the tissue crosslinking. The best results were obtained for 24 hours of the exposition on the UV radiation [3]. It has been stated that the UV treatment improves mechanical properties of the porcine aortal valve. It may be a

Obrazy histologiczne badanych tkanek: natywnej i poddanych działaniu promieniowania UV lub VIS w czasie 1,2 lub 3h, wraz z opisami preparatów tkankowych przedstawiono w TABELI 2.

result of crosslinking of the collagen present in tissues.

In the present work one ascertained that the same proteins were extracted from all investigated pericardium tissues - both native and treated with the ultraviolet radiation (UV) or with the visible light (VIS) (FIG. 1, TABLE 1). The


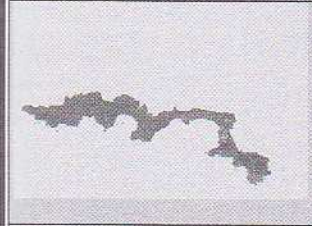
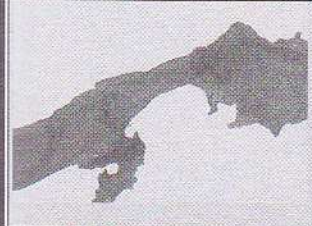
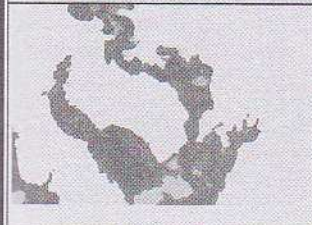
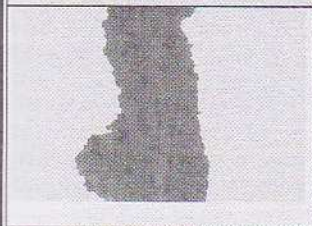
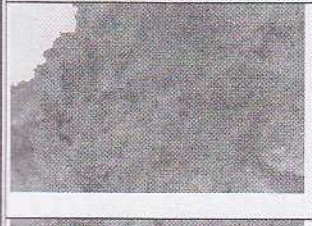

Obrazy histologiczne tkanek Histological images of tissues	Opisy preparatów tkankowych Descriptions of the tissue preparations
	<p>Tkanka natywna (N). Zwarta struktura tkankowa. Drobne szczeliny istoty pozakomórkowej. Obecne fibroblasty.</p> <p>The tissue native (N). The compact tissue structure. Small crevices of the extracellular matrix. Present fibroblasts.</p>
	<p>Tkanka traktowana światłem ultrafioletowym w czasie 1 h (UV-1h). Pojedyncze fragmenty włókien łącznotkankowych. Brak fibroblastów.</p> <p>The tissue treated with the ultraviolet light during 1 h (UV-1h). Single fragments of connective tissue fibres. The lack of fibroblasts.</p>
	<p>Tkanka traktowana światłem ultrafioletowym w czasie 2 h (UV-2h). Pojedyncze bezpostaciowe włókna tkanki łącznej o wzmożonej zasadochłonności. Brak fibroblastów.</p> <p>The tissue treated with the ultraviolet light during 2 h (UV-2h). Single amorphous fibres of the connective tissue with the intensive basophilia. The lack of fibroblasts.</p>
	<p>Tkanka traktowana światłem ultrafioletowym w czasie 3 h (UV-3h). Pojedyncze bezpostaciowe włókna tkanki łącznej o wzmożonej zasadochłonności.</p> <p>The tissue treated with the ultraviolet light during 3 h (UV-3h). Single amorphous fibres of the connective tissue with the intensive basophilia.</p>
	<p>Tkanka traktowana światłem widzialnym w czasie 1 h (VIS-1h). Zwarta struktura tkankowa. Zachowana komórkowość.</p> <p>The tissue treated with the visible light during 1 h (VIS-1h). The compact tissue structure. Kept cellularity.</p>
	<p>Tkanka traktowana światłem widzialnym w czasie 2 h (VIS-2h). Zachowana struktura tkanki. Rozpadające się fibroblasty. Wzrost zasadochłonności.</p> <p>The tissue treated with the visible light during 2 h (VIS-2h). Kept structure of the tissue. Breaking up fibroblasts. The growth of the basophilia.</p>
	<p>Tkanka traktowana światłem widzialnym w czasie 3 h (VIS-3h). Zachowana struktura tkanki. Rozpadające się fibroblasty. Wzrost zasadochłonności.</p> <p>The tissue treated with the visible light during 3 h (VIS-3h). Kept structure of the tissue. Breaking up fibroblasts. The height of the basophilia.</p>

TABELA 2. Obrazy histologiczne i opisy preparatów tkankowych.

TABLE 2. Histological images and descriptions of the tissue preparations.

Suh i wsp. [3] badali stopień usieciowania kolagenu w świńskiej zastawce serca pod wpływem promieniowania ultrafioletowego (UV) w zależności od czasu naświetlania. Wykazali oni, że im dłuższy był czas naświetlania, tym większa była efektywność sieciowania tkanki. Najlepsze wyniki uzyskano po 24 godzinach ekspozycji na promieniowanie UV [3]. Stwierdzono, że działanie promieniowania UV polepsza właściwości mechaniczne świńskiej zastawki aortalnej, co może być wynikiem sieciowania kolagenu zawartego w tkankach.

W niniejszej pracy wykazano, że po naświetlaniu tkanek osierdzia świni promieniowaniem ultrafioletowym (UV) lub światłem widzialnym (VIS) następowała ekstrakcja z nich takich samych białek, co z tkanki natywnej (RYS. 1, TABELA 1). Łatwość ekstrakcji białek przez roztwór lizujący Laemmli [9] można wiązać z procesem ich fotodegradacji.

W obrazie histologicznym, próbki naświetlane promieniowaniem UV wykazywały zanik struktury tkankowej, przy wzmożonej zasadochłonności (TABELA 2). Podobne efekty obserwowano w przypadku próbek naświetlanych światłem widzialnym (VIS) w czasie 2 h lub dłużej. W obrazach tych obserwowano również zanik komórkowości, z rozpadającymi się fibroblastami. Wydłużeniu czasu naświetlania towarzyszyło zmniejszenie komórkowości i rozluźnienie struktury tkanki (TABELA 2). Wszystkie te zmiany wskazują na fotodegradację tkanek naświetlanych bez ochronnego działania pewnych barwników.

W konkluzji można stwierdzić, że tkanki osierdzia świńskiego poddane działaniu promieniowania ultrafioletowego (UV) lub światła widzialnego (VIS) w czasie 1 h lub dłuższym mogą ulegać procesowi fotodegradacji.

Podziękowania

Praca finansowana przez Śląską Akademię Medyczną.

ease of the proteins extraction by the Laemmli [9] lizing-solution may be connected with the tissue photodegradation.

In the histological images, the UV-irradiated samples showed the disappearance of tissue structure and the intensive basophilia (TABLE 2). Similar effects have been observed in the case of the VIS-treated samples, irradiated for 2 h or longer. In these images we observed also the cellularity disappearance, with breaking up of fibroblasts. Prolongation of the irradiation time was followed by the cellularity reduction and the looseness of the tissue structure (TABLE 2).

All these changes point to the process of the tissue photodegradation during its irradiation without the protective action of some dyes.

In conclusion it may be stated that the porcine pericardium tissues treated with the ultraviolet radiation (UV) or with the visible light (VIS) for 1 h and longer may undergo the photodegradation process.

Acknowledgements

This work was financially supported by Medical University of Silesia.

Piśmiennictwo

References

- [1] Weadock K. S., Miller E. J., Keuffel E. L., Dunn M. G. (1996) Effect of physical crosslinking methods on collagen-fiber durability in proteolytic solution. *J. Biomed. Mater. Res.* 32: 221-226.
- [2] Suh H., Park J. Ch., Lee K. W., Cho B. K. (1998) Mechanical properties of the UV irradiated porcine valves. *Biomater. Res.* 2 (3): 95-99.
- [3] Suh H., Lee W. K., Park J-Ch., Bum K. B. (1999) Evaluation of the cross-linking in UV irradiated porcine valves. *Yonsei Med. J.* 40 (2): 159-165.
- [4] Moore M. A. (1997) Pericardial tissue stabilized by dye-mediated photooxidation: a review article. *J. Heart Valve Dis.* 6: 521-526
- [5] Khor E. (1997) Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprostheses. *Biomaterials*, 18: 95-105.
- [6] Westaby S., Bianco R., Katsumata T., Termin P. (1999) The Carbomedix "Oxford" Photofix Stentless Valve (PSV). *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 11 (4): 206-209.
- [7] Svendsen Ch. A., Kreykes N. S., Butany J., Bianco R. W. (2000) In vivo assessment of a photofixed bovine pericardial valve. *J. Heart Valve Dis.* 9: 813-821.
- [8] Flameng W., Ozaki S., Meuris B., Herijgers P., Yperman J., Van Lommel A., Verbeken (2001) Antimineralization treatments in stentless porcine bioprostheses: an experimental study. *J. Heart Valve Dis.* 10: 489-494.
- [9] Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.