

Новий підхід до створення біологічних судинних графтів

Бизов Д.В., Михайлова І.П., Дергун С.М., Хавін В.Л.,

Сандомирський Б.П.

Інститут Проблем Кріобіології та Кріомедицини Національної Академії Наук України,
м.Харків, Тел. +38(057)3734143, +38(057)3733084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Національний Технічний Університет «Харківський Політехнічний Інститут»

Судинні протези малого діаметру (\leq 6мм), що використовуються на сьогоднішній день, мають цілий ряд серйозних недоліків. Кількість аутологічних артерій та вен обмежена, а травматичність їх виділення підвищує ризики розвитку післяопераційних інфекційно-запальних ускладнень. Одним з найбільш перспективних напрямів є використання у якості судинних протезів ксеногенних артерій. У даній роботі приведені результати комбінованої дії низьких температур і іонізуючого опромінювання для зниження імуногенності ксеногенних артерій малого діаметру. Показано, що артерії після девіталізації розробленим методом адекватно функціонують при експериментальній ксенотрансплантації щонайменш протягом 16 міс.

Сосудистые протезы малого диаметра (\leq 6мм), использующиеся на сегодняшний день, имеют целый ряд серьезных недостатков. Количество аутологических артерий и вен ограничено, а травматичность их выделения повышает риски развития послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений. Одним из наиболее перспективных направлений является использование в качестве сосудистых протезов ксеногенных артерий. В данной работе приведены результаты комбинированного действия низких температур и ионизирующего облучения для снижения иммуногенности ксеногенных артерий малого диаметра. Показано, что артерии после девитализации разработанным методом адекватно функционируют при экспериментальной ксенотрансплантации по меньшей мере в течение 16 мес.

Small diameter vascular grafts (\leq 6мм) that are used for today have some serious disadvantages. Autological arteries and veins are limited, and the traumaticity of their deriving increases the infectious and inflammatory complications after the surgery. One of the most perspective approach is using xenogenic arteries as vascular grafts. In current work we showed the results of combining influence of low temperatures and ionizing

irradiation for decreasing of small diameter xenogenic arteries immunogenicity. It is shown that arteries after devitalization by the developed method were all patent after experimental xenotransplantation for 16 months at least.

Судинні протези малого діаметру (≤ 6 мм) дуже широко застосовуються при різноманітних судинних патологіях, зокрема при ішемічній хворобі серця, критичній ішемії судин нижніх кінцівок, гострій судинній травмі, для формування гемодіалізного судинного доступу тощо [14, 17, 8, 4, 13]. «Золотим стандартом» протезування судин малого калібру є аутологічні вени та артерії (*v.saphena*, *a.radialis*, *a.thoracica interna*) [16, 9, 1]. Проте слід зауважити, що їх повсюдне застосування пов'язане з деякими недоліками: необхідність додаткових хірургічних маніпуляцій, що підвищує травматизм операції та ризики інфекційно-запальних ускладнень; невідповідність біомеханічних властивостей аутоген артеріальним навантаженням, що сприяє формуванню аневризматичних дилатацій [10, 12]. Крім того, згідно з літературними даними, близько 30% пацієнтів з різних причини не мають відповідних для трансплантації аутосудин [19, 3]. Перспективним напрямом вважається застосування біологічних судинних протезів на основі ксеногенних тканин. Проте технології їх обробки для зниження імуногенності та запобігання ранніх оклюзій до теперішнього часу неефективні. Запропоновані методи з використанням різноманітних цитотоксичних хімічних реагентів характеризуються зниженням біомеханічних властивостей судин та наявністю залишків використаних агресивних речовин, що сприяє формуванню тромбозів [2]. Концепцією нашого дослідження було використання двох фізичних чинників: низьких температур та іонізуючого опромінення для девіталізації ксеногенних артерій з метою створення анімуногенних біологічних судинних протезів.

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження були внутрішньогрудні артерії свиней, які виділялися у статевозрілих тварин протягом 30 хвилин з моменту забою, при урахуванні біоетичних протоколів. Ізольовані судини дбайливо препарувалися з метою видалення жирових привісків та зайвої адвентиціальної оболонки. Скелетовані судини ретельно промивалися охолодженим до 4°C фізіологічним

розчином з додаванням антибіотиків та протигрибкових препаратів (100 МЕ/мл пеніциліну, 100 мг/мл стрептоміцину, 6 мг/мл флуконазолу), ретельно видалялися залишки крові. Промиті артерії поміщали в стерильні криостійкі контейнери («Deltalab», Іспанія), які потім погрузали в пари рідкого азоту. Після відігріву на водяній бані (+37°C), пробірки з артеріями транспортувалися до Національного наукового центру «Харківського фізико-технічного інституту», де за допомогою атестованої промислової радіаційної установки на базі лінійного прискорювача електронів (ЛУЕ-10) з енергією 10МеВ і середнім током 1мА їх обробляли опроміненням потоками електронів в експериментальних режимах.

В дослідженні було виділено 2 експериментальні групи судин: артерії після заморожування та артерії після комбінованої дії заморожування та опромінення (девіталізовані артерії). Слід зауважити, що при визначенні параметрів міцності артерій, ми додатково виділили групу ізольовано опромінених артерій з метою виявлення ступеню впливу цього фактора на біомеханічні властивості судинної стінки. Групою контролю вважали нативні артерії свині.

Біомеханічну міцність та пружність артерій вимірювали на базі кафедри опору матеріалів Національного технічного університету «Харківського політехнічного інституту» за допомогою універсального деформуючого пристрою FP 100/1 («Rauenstein», Германія). Для цього обидва краї судини фіксували затискачами на робочих частинах апарату. Для дослідження виконували поступове розтягування артерії у подовжньому напрямі з фіксацією прикладеного навантаження та відносної деформації, які виводилися на ПК. З метою зменшення можливих похибок вимірювань, викликаних неоднорідністю судинної стінки на різних ділянках одної артерії, на основі абсолютних значень прикладеної в певну одиницю часу сили деформації був вирахований відповідний показник напруги за формулою:

$$\sigma = F/S \quad ,$$

де: σ – напруга, МПа;

F – сила деформації, Н

S – площа поперечного перетину артеріальної стінки, м².

Для визначення останнього, поперечний перетин кожного артеріального сегменту, який було взято перед проведенням випробування, вимірювали з точністю до 10мкм на мікроскопі Meiji Techno (Японія) у 10 точках впродовж периметру та вираховували середній показник.

Відповідне кожному показнику напруги значення відносної деформації судинної стінки вираховували за формулою:

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

де: e – відносна деформація, %;

L – початкова довжина артеріального сегменту, мм;

L_1 – довжина деформованого артеріального сегменту при визначеній напрузі, мм.

Міцність артерій в радіальному напрямку вимірювали за допомогою ресивера з електронним датчиком тиску *MPX-5700DP* («Freescale Semiconductor», Китай). В просвіт досліджуваної судини поступово нагнітали повітря до порушення цілісності судинної стінки. Фіксували максимальний тиск, який визиває розрив артерії. Біомеханічні властивості вимірювали на 25 зразках для кожної досліджуваної групи артерій. Статистичні дані оцінювали по універсальному критерію Мана-Уїтні за допомогою програми *SPSS Statistics 17.0*. Відмінності вважали достовірними при $p < 0,05$. Діаграми та графіки вистроювали та обробляли за допомогою програмного забезпечення *Origin Pro 8* и *Microsoft Excel 2007*.

Для вивчення біосумісності та ступеню імуногенності виконували підшкірну імплантацію ділянок судинної стінки розмірами 20x20мм лабораторним крисам лінії Вістар. Операції проводили під масочним ефірним наркозом. Строки спостереження – 3, 7 діб, 2, 4 та 8 неділь, у які імпланти витягували та оцінювали клітинну реакцію за допомогою оптичної мікроскопії при окрасці гематоксиліном та еозином. Для кожного строку в кожній групі було виконано 5 операцій.

Вивчення функціональності та ступеню тромбогенності девіталізованих судин проводили *in vivo*, для чого були виконані експериментальні операції протезування сегменту черевної аорти кролика з використанням у якості судинних графтів девіталізованих артерій. Довжина використаних судинних вставок складала 30мм.

Тривалість ішемічного періоду пере давлення аорти була близько 30-45хв. Операції виконували під комбінованим ін'єкційно-інгаляційним наркозом. Слід зауважити, що на відміну від загальної практики судинних операцій, антикоагулянтні препарати використовували лише інтраопераційно, і не застосовували у післяопераційному періоді, що дозволило вивчити функціонування біопротезу в умовах напруженої гемостатично-антигемостатичної системи крові, активованої операційною травмою та розкриттям судинного просвіту. Всього було виконано 8 подібних експериментальних операцій. Всі експерименти були виконані при чіткому дотриманні правил біоетики з урахуванням «Загальних принципів експериментів на тваринах», схваленими на III Національному конгресі з біоетики (Київ, 2007) та узгодженими з положеннями «Європейської Конвенції по захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985).

Отримані результати. Адекватні біомеханічні якості судинних протезів є дуже важливим компонентом їх функціональності, що корелює з міцністю швів судинного анастомозу та резистентністю артерій к ділятації *in vivo*. Саме тому ми приділили значну увагу до визначення цих показників. Механічні властивості грають значну роль у функціонуванні артерій та залежать, в основному, від взаєморозташування та структурної цілісності колагенових та еластинових волокон судинної стінки.

Біомеханічні властивості артерій у поздовжньому напрямі представлені у вигляді графіків (рис.1). Як видно, всі криві мають характерну для сполучнотканинних структур "S"- подібну форму [5], з чітко визначеними сегментами в'язкої течії, пружної деформації та напруги руйнування тканини.

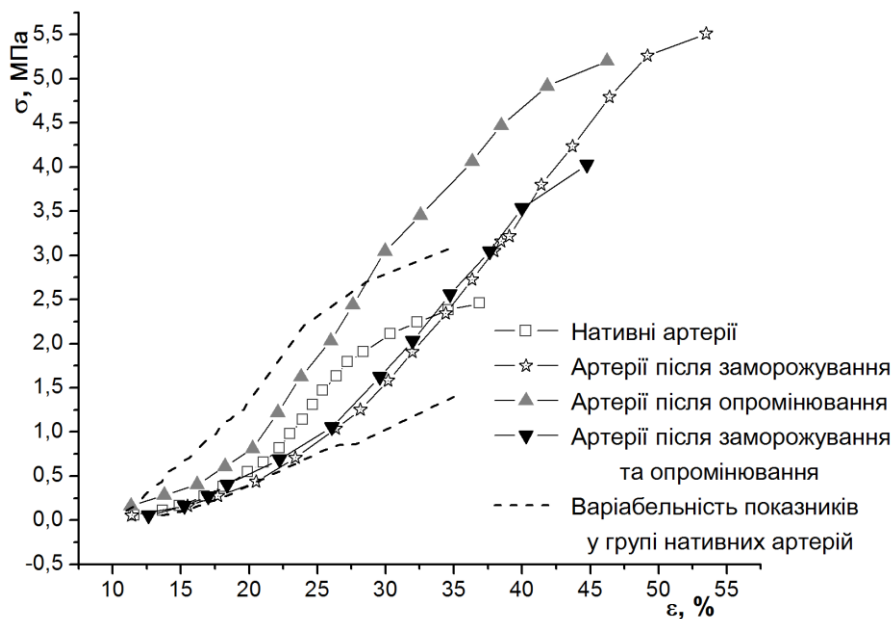


Рис. 1. Залежність відносної деформації артерій від прикладеного навантаження

Початкові відрізки кривих характеризують ковзання окремих фібрил у волокні відносно одна одної. Ці ділянки графіків деформації оброблених судин відповідають області фізіологічних навантажень на артерії та знаходяться в границях варіабельності показників нативних судин. Кути нахилу кривих в області пружної деформації являють собою графічним відображенням модулю Юнга та збігаються у всіх групах. Проте тривалість цих ділянок у всіх групах оброблених артерій у значної мірі перевищує даний показник у нативних судин, тобто прикладене навантаження, що викликає початкову деструкцію окремих сполучнотканинних фібрил в групі нативних артерій призводить лише до їх додаткового подовження після дії фізичних факторів, що вивчаються. Слід також зазначити, що ділянка пружної деформації артерій після комбінованої дії заморожування та іонізуючого опромінення розташована лівіше кривої деформації нативних артерій та характеризується меншою деформацією при ідентичному навантаженні, що свідчить про тенденцію до підвищення пружності артеріальної стінки у цієї групі.

Іонізуюче опромінення артерій також призводить до підвищення пружних властивостей та їх відносного подовження. Механізм цього явища докладно вивчений та полягає у формуванні додаткових внутрішньо- та міжмолекулярних крослінк-зшивок між окремими фібрилами колагену [11]. Слід зазначити, що згідно з правилом «слабкої ланки», яке характеризує структуру сполучнотканинних

волокон, збереження підвищеної міцності артерій підтверджує відсутність значущої руйнації колагенових фібрил після опромінення.

Опромінення артерій після попереднього заморожування-відігріву зберігає підвищену міцність артеріальної стінки. Проте цей показник є меншим у порівнянні з ізольованим опроміненням. Вищезазначене явище може бути пов'язане з наявністю радіопротекторної дії процесу заморожування-відігріву, що зменшує ефект опромінювання на сполучнотканинну структуру судинної стінки.

Міцність артерій у радіальному напрямі є більш значущим показником у зв'язку з фізіологічним багатонаправленим векторним розподілом навантаження, що імітує тиск крові. Крім того, при двохосній деформації, на відміну від одноосної поздовжньої, навантаження рівномірно розподіляється на колагенові та еластинові волокна судинної стінки. При цьому менша міцність еластичних волокон обумовлює більш низькі показники максимального напруження артеріальної стінки при біаксіальному навантаженні у порівнянні з моноаксіальним. Результати вимірювань наведені у вигляді діаграм (рис.2). Як видно, міцність артерій у радіальному напрямі достовірно підвищується після опромінення. Механізм цього явища вбачається східним з одноосною деформацією. Проте процес заморожування-відігріву не впливає на цей показник, що напевно пов'язано з мінімальними змінами еластичних волокон під дією низьких температур.

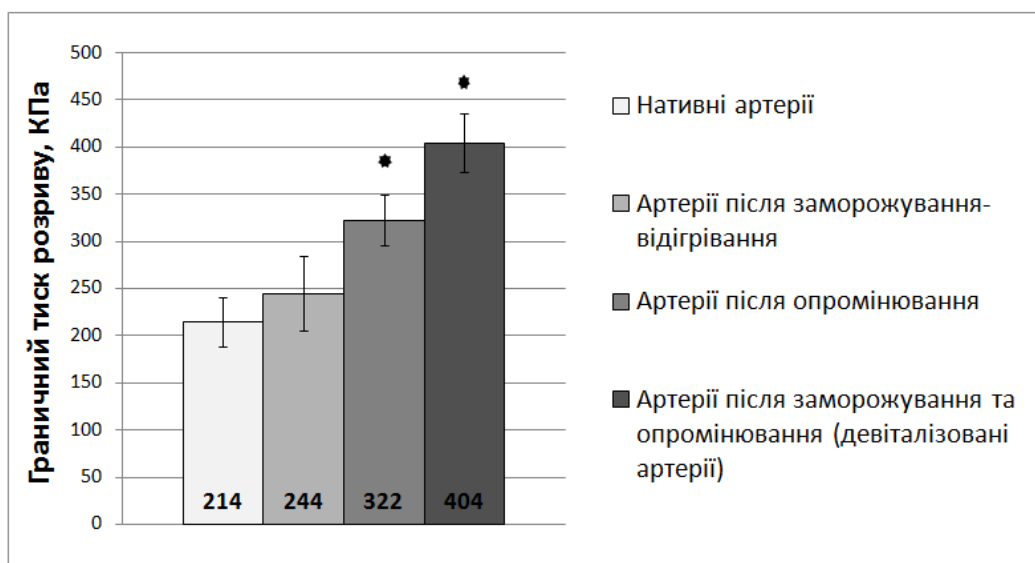


Рис. 2. Біомеханічна міцність артерій у радіальному напрямі.

*** - достовірно ($p < 0,05$) відносно групи контролю (нативні артерії)**

При аналізі ступеню реакції на підшкірно імплантовані ділянки ксеноартерій отримані наступні дані. На 3 добу післяопераційного періоду в усіх досліджуваних групах артерій було виявлено повний ферментний лізис власних клітинних елементів судинної стінки при збереженні її сполучнотканинної структури. Проте в групах нативних артерій та артерій після заморожування спостерігалися ознаки початкової лейкоцитарної адгезії, які були повністю відсутні в групі девіталізованих артерій (рис.3).

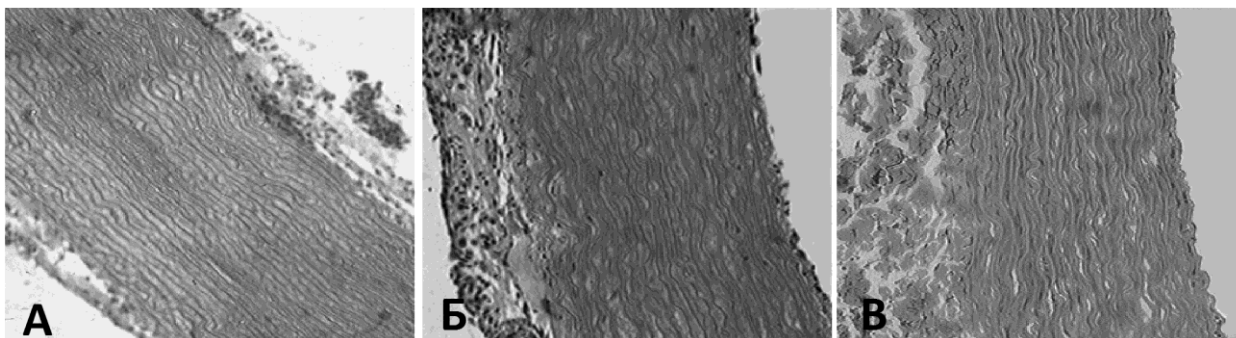


Рис. 3. Імплантація під шкіру, 3 доба післяопераційного періоду. Забарвлення гематоксиліном та еозином, X200.

А – нативні артерії;

Б – артерії після заморожування;

В – артерії після заморожування та опромінення (девіталізовані артерії).

На 7 добу спостереження була виявлена наявність вираженого запалення у вигляді формування масивного лейкоцитарного валу навколо імплантату в групі нативних артерій. Артерії після заморожування характеризувалися наявністю чітко вираженої лейкоцитарної адгезії переважно впродовж внутрішньої поверхні судинної стінки та формуванням поодиноких ділянок інфільтрації в судинній медії (рис.4). Скоріше за все, антигенними детермінантами у даному випадку є збережений ендотелій та ГМК. Артерії після заморожування та опромінення характеризувалися відсутністю будь-яких інфільтративних явищ в судинній стінці та оточуючих тканинах.

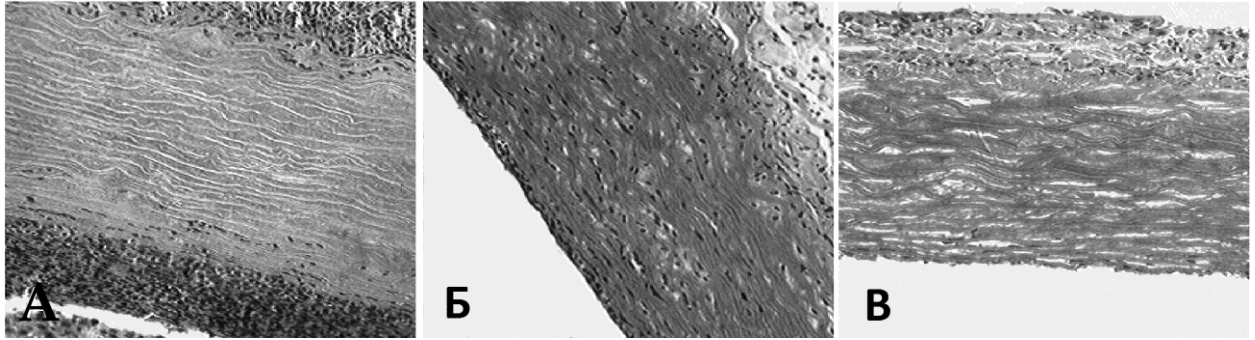


Рис. 4. Імплантація під шкіру, 7 доба післяопераційного періоду. Забарвлення гематоксиліном та еозином, X200.

А – нативні артерії;

Б – артерії після заморожування;

В – артерії після заморожування та опромінення (девіталізовані артерії).

Через 2 неділі після імплантації нативні артерії характеризувалися збереженням масивного лейкоцитарно-макрофагального валу, оточуючого ксеногенні тканини. В групі артерій після заморожування виявлялася помірна інфільтрація оточуючих тканин та формування тонкої сполучнотканинної капсули навколо імплантату. В групі артерій після заморожування та опромінення гострі клітинні реакції не спостерігалися. Проте були виявлені окремі макрофаг альні «острівки» в судинній медії та деяке розрихлення сполучнотканинних волокон. Ці зміни пов'язані з початком процесу ремоделювання імплантату, оскільки макрофаги є невід'ємною ланкою цього процесу, а також з відсутністю адекватного забезпечення поживними речовинами біологічної тканини у зв'язку з афізіологічною локалізацією (рис.5).

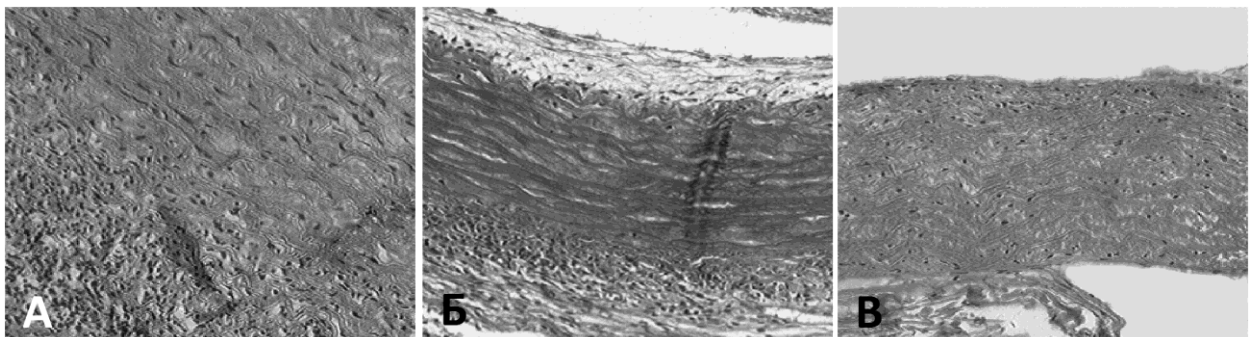


Рис. 5. Імплантація під шкіру, 2 тижні після операції. Забарвлення гематоксиліном та еозином, X200.

А – нативні артерії;

Б – артерії після заморожування;

В – артерії після заморожування та опромінення (девіталізовані артерії).

Через 8 неділь після імплантації в групі нативних артерій була виявлена повна інкапсуляція імплантату. Спостерігалось виражене розволокнення колагенових та еластинових волокон судинної стінки, що свідчить про завершення біодеградації імплантату. Була виявлена помірна макрофагальна реакція оточуючих тканин реципієнта та формування вогнищ кальцинації. Ці зміни характеризують розвиток хронічної імуногенної запальної реакції. Артерії після заморожування характеризувалися склеротичними змінами судинної стінки при збереженні помірної клітинної інфільтрації оточуючих тканин та масивного розростання сполучної тканини навколо імплантату. Сполучнотканинні волокна судинної стінки були ущільнені та конденсовані. Девіталізовані артерії зберігали структурну цілісність. Розрихлені сполучнотканинні волокна, які були виявлені на більш ранніх термінах спостереження, були організовані, зберігали цілісність та безперервність. Спостерігалось заселення судинної стінки макрофагами та клітинами фібробластичного ряду. Вищезазначені зміни свідчать про поступове завершення процесу ремоделювання біологічної тканини. Реакції відторгнення та запалення в зоні імплантації були відсутні (рис.6).

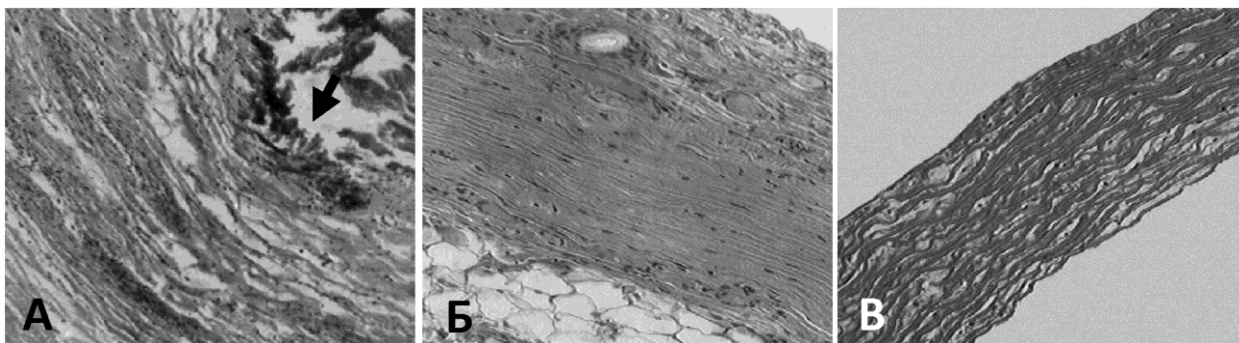


Рис. 6. Імплантація під шкіру, 8 тиждень післяопераційного періоду. Забарвлення гематоксиліном та еозином, X200.

А – нативні артерії;

Б – артерії після заморожування;

В – артерії після заморожування та опромінення (девіталізовані артерії).

Стрілка – ділянка кальцинації.

Таким чином, результати ксеноімплантації продемонстрували наявність вираженого гострого імуногенного запалення, яке переходить у хронічний процес в групі нативних артерій, що призводить до деструкції сполучнотканинних волокон

судинної стінки та ранньої біодеградації імплантату. Реакція на артерії після заморожування була в значній мірі менш вираженою та проявлялася лише у помірній лейкоцитарній інфільтрації на ранніх термінах спостереження, що призводило до ущільнення та склерозування волокон, розростання сполучної тканини навколо імплантату на 8 неділі спостереження. Зниження імуногенності біологічної тканини під впливом низьких температур пов'язано зі змінами поверхневих клітинних антигенів, що відбуваються під час заморожування-відігріву [18]. Проте повна інтеграція в організм реципієнта навіть алогенних судин після дії низьких температур можлива лише за умови прийому імуносупресорних препаратів [6]. Отримані нами результати збігаються з вищезазначеними даними. Так, реакція тканин реципієнта на імпантовані заморожені-відігріті артерії значно менш виражена у порівнянні з нативними ксеносудинами. Проте з часом, спостерігались ознаки хронічного імуногенного запалення.

Більшість дослідників вказують на необхідність повного видалення всіх клітинних фрагментів при створенні біологічних скафолдів з метою запобігання можливого імуногенного запалення [7, 20]. Проте незважаючи на присутність фрагментів зруйнованих ГМК в товщі судинної стінки, ми не спостерігали будь-яких реакцій відторгнення чи запалення в групі девіталізованих артерій. Це може бути пов'язано з руйнуванням антигенних комплексів під впливом іонізуючого опромінення. Отримані нами результати збігаються з даними Ota T. [15], який показав, що опромінення ксеногенних тканин може викликати руйнацію *aGal*-епітопу, що відповідає за гіперергічну запальну реакцію, та інших антигенних структур.

Для вивчення біосумісності та функціональності девіталізованих артерій нами були виконані експериментальні операції судинного протезування (рис.7). Слід зазначити, що у якості судинних протезів використовували лише артерії після заморожування та опромінення, що обумовлене вищевказаними результатами підшкірної імплантації та правилами біоетики. Всього було виконано 10 подібних операцій. Максимальний термін спостереження на теперішній час складає 16 міс. Будь-які ознаки тромбозів та стенозів в ранньому та віддаленому післяопераційному періодах були відсутні. Всі експериментальні тварини в повному обсязі зберігали

фізіологічну активність. Слід також зазначити, що прооперована самка кролика успішно завагітніла через 1 місяць після операції. Періоди виношування та пологів перебігали без ускладнень, що свідчить про повноцінне функціонування тазових органів та збереженні адекватного кровотоку в умовах високого фізіологічного напруження.

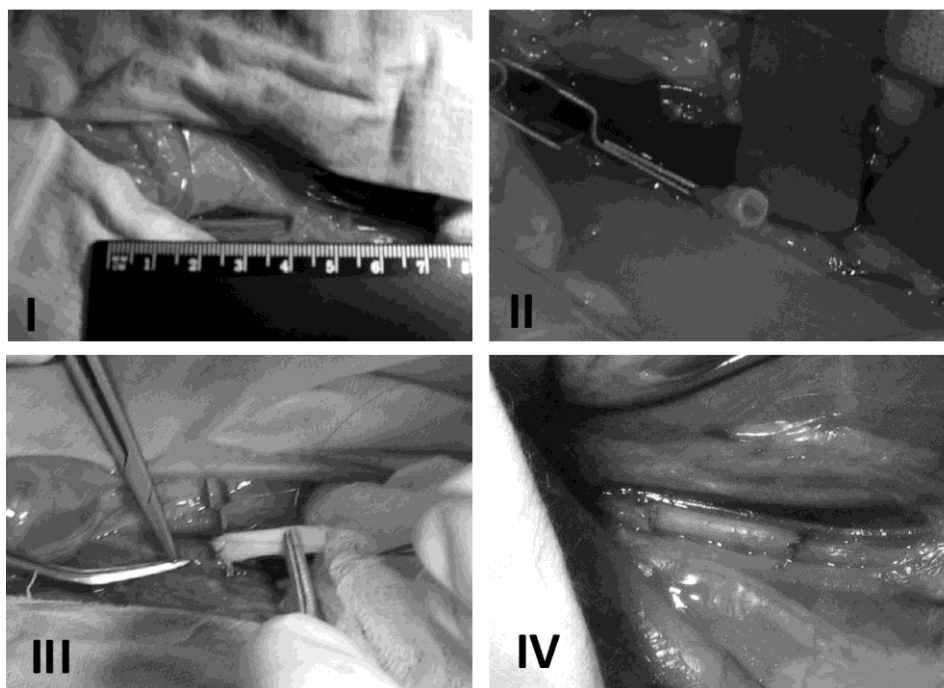


Рис. 7. Основні етапи оперативного втручання:

I. Виділення інфраренального відділу аорти кролика;

II. Передавлення та перетин аорти;

III. Накладання проксимального та дистального судинних анастомозів;

IV. Зняття мікросудинних кліпс та забезпечення остаточного гемостазу.

Таким чином було встановлено, що девіталізовані артерії при ксенопротезуванні адекватно та повноцінно функціонують щонайменше протягом року. Оскільки на теперішній час триває спостереження за експериментальними тваринами, результати гістологічного дослідження біопротезів на різних термінах спостереження будуть нами наведені пізніше.

Висновки:

1. Комбінована дія низьких температур та іонізуючого опромінення призводять до повної девіталізації ксеногенних артерій при збереженні структури колагенових волокон та еластинових мембран судинної стінки;

2. Досліджувані фізичні фактори не призводять до зменшення міцності судинної стінки та не викликають значних змін її пружності;
3. Описана обробка призводить до зниження імуногенних властивостей ксеногенних артерій;
4. Результати ксенотрансплантації продемонстрували відсутність тромбогенності та реакцій відторгнення. Девіталізовані ксеноартерії адекватно та повноцінно функціонують щонайменше протягом 1 року.

Література

1. Бокерия Л.А., Гасанов А.Ф., Каграманов И.И. и др. Экспериментальное обоснование возможности применения артерии и вены пуповины человека в качестве кондуитов // Здоровье. Баку. 2007. №10. С. 147-156.
2. Бызов Д. В. Биотехнологические аспекты создания трансплантатов артерий / Д. В. Бызов, О. П. Сынчикова, Е. Н. Пушкова [и др.] // Биотехнология. – 2010. – Т. 3, № 3. – С. 21-30.
3. Гасанов А.Ф. Экспериментальное обоснование и клиническое использование артерий и вен пуповины новорожденного в качестве сосудистого шунта для хирургического лечения ИБС: Автореф. дис.... канд. мед. наук. Москва, 2008.
4. Готье С.В. Трансплантация печени: современное состояние проблемы // Альманах института хирургии им.Вишневского. 2008. Т.3, №3. С. 9-17.
5. Эль Та`алау Аббас. Связь между возрастными изменениями белково-полисахаридного состава и биомеханическими свойствами кожи / Аббас Эль Та`алау, Ю.Г. Кот, Е.Э. Перский [и др.] // Вестник Харьковского национального университета им. В.Н.Каразина. – 2010. – Т. 11, № 905. – С. 37-42.
6. Augelli N. V. Allograft vein patency in a canine model: additive effects of cryopreservation and cyclosporine / N. V. Augelli, F. M. Lupinetti, H. el Khatib [et al.] // Transplant. – 1991. – Vol. 52, № 3. – P. 466-470.
7. Badylak S. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function / S. Badylak, D. Freytes, T. Gilbert // Acta Biomater. – 2009. – Vol. 5, № 1. – P. 1-13.

8. *Cernadas M., Grandjean M., Tossi M.* Vascular access patency and complications: a comparison of brachiobasilic AV fistulas and PTFE brachioaxillary bridge AV fistulas in hemodialysis patients // *Dialysis and Transplant.* 2003. Vol.32. P.694-697.
9. Collins P. Radial artery versus saphenous vein patency randomized trial: five-year angiographic follow-up / P. Collins, C. Webb, C. Chong [et al.] // *Circulation.* – 2008. – Vol. 117, № 22. – P. 2859-2864.
10. *Elazer R. Edelman.* Vascular tissue engineering: designer arteries // *Circ Res.* 1999. № 85. P.1115-1117.
11. Fratzl P. Collagen, structure and mechanics / P. Fratzl. – Springer. – 2008. – 506p.
12. Kannan R. Y. Current status of prosthetic bypass grafts: A review / R. Y. Kannan, H. J. Salacinski, P. E. Butler [et al.] // *J.Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* – 2005. – Vol. 74, № 1. – P. 570-581.
13. *Marubashi S., Dono K., Nagano H. et al.* Living-donor liver transplantation with renoportal anastomosis for patients with large spontaneous splenorenal shunts // *Transplant.* 2005. Vol.80, №12. P.1671-1675.
14. *Nakata K., Sankai Y., Akiyama K. et al.* Evaluation of a new device for the intraoperative assessment of coronary artery bypasses grafting // *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2011. Vol.17, №2. P.160-165.
15. Ota T. Novel method of decellularization of porcine valves using polyethylene glycol and gamma irradiation / T. Ota, S. Taketani, S. Iwai // *Ann Thorac Surg.*– 2007. – Vol. 83, № 4. – P. 1501-1507.
16. Rashid S. T. Engineering of bypass conduits to improve patency / S. T. Rashid, H. J. Salacinski, B. J. Fuller [et al.] // *Cell Prolif.* – 2004. – Vol. 37, № 5. – P. 351-366.
17. *Singh N., Sidawy A., DeZee K., et al.* Factors associated with early failure of infrainguinal lower extremity arterial bypass // *J Vasc Surg.* 2008. Vol.47, №3. P.556-561.
18. Solanesa N. Cryopreservation alters antigenicity of allografts in a porcine model of transplant vasculopathy / N. Solanesa, M. Riqola, M. Castellaa [et al.] // *Transplant Proc.* – 2004. – Vol. 36, № 10. – P. 3288-3294.

19. Teebken O. E., Haverich A. Tissue engineering of small diameter vascular grafts / O. E. Teebken, A. Haverich // Eur J Vasc Endovasc Surg. – 2002. – Vol. 23, № 6. – P. 475-485.

20. Walles T. Acellular scaffold implantation – no alternative to tissue engineering / T. Walles, C. Puschmann, A. Haverich [et al.] // Int J Artif Organs. – 2003. – Vol. 26, № 3. – P. 225-234.