

Децеллюляризованные артерии пуповины человека как основа тканеинженерных кровеносных сосудов малого калибра

А.С. Насрединов, А.В. Лаврешин, С.В. Анисимов, В.Н. Вавилов, Д.И. Курапеев

Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург

Decellularized human umbilical arteries as a potential scaffold for small diameter tissue engineered vascular grafts

A.S. Nasredinov, A.V. Lavreshin, S.V. Anisimov, V.N. Vavilov, D.I. Kurapeev

V.A. Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg

Достижения тканевой инженерии во многом связаны с появлением возможности получения соединительнотканых матриксов тканей и органов методом децеллюляризации. Децеллюляризованные ткани сохраняют механическую прочность и нативную структуру, что делает их подходящим субстратом для последующего заселения клетками реципиента. Методики децеллюляризации сильно различаются в зависимости от вида обрабатываемой ткани. Нами разработан оригинальный способ децеллюляризации сосудов малого калибра, в качестве которых использовали артерии пуповины человека. Эффективность децеллюляризации артерий оценивали с помощью гистологических и иммуногистохимических исследований, в ткани сосуда определяли количество нуклеиновых кислот. Полученные децеллюляризованные кровеносные сосуды могут быть использованы в качестве носителей для клеток в рамках создания тканеинженерных сосудистых графтов, востребованных в реконструктивной сердечно-сосудистой хирургии.

Ключевые слова: децеллюляризация, экстрацеллюлярный матрикс, тканевая инженерия, кровеносные сосуды.

Сердечно-сосудистые заболевания являются ведущей причиной смертности во всем мире [1]. «Золотым стандартом» лечения сердечно-сосудистых заболеваний, обусловленных окклюзией сосудов, являются шунтирующие операции. В настоящее время существует острая потребность в сосудистых протезах, идентичных по свойствам нативным артериям человека [2–5]. Тканевая инженерия, быстро развивающаяся в последнее десятилетие, способна «предложить» способы создания сосудов, альтернативных используемым в настоящее время синтетическим протезам и аутовенозным шунтам [5–7]. Такие «искусственные артерии», созданные при помощи методов тканевой инженерии, должны отвечать всем требованиям, предъявляемым к сосудистым заменителям сегодня, а именно: биосовместимость и биостабильность, тромбрезистентность, устойчивость к инфекциям, нулевая хирургическая порозность, вазоактивность, оптимальные механические свойства, такие как прочность, эластичность, гибкость [2, 5]. Как ожидается, они будут хорошо приживляться, заселяться клетками реципиента, подвергаться ремоделированию, становясь фактически собственной артерией. К настоящему времени ни один из разработанных заменителей сосудов не обладает этими характеристиками в полной мере [2, 3, 8].

Last advances in tissue engineering are connected with the possibility of obtaining decellularized organs and tissues. Their remaining mechanical strength and native structure make them convenient for subsequent recellularization. Decellularization methods vary a lot depending on the kind of the source tissue. We have developed original decellularization method for human umbilical arteries as a potential scaffold for small diameter tissue engineered vascular graft. Effectiveness of decellularization was evaluated by the means of histological and immunohistochemical assays, also by estimation of DNA and RNA quantities. These decellularized vessels can be used as scaffolds for cells in frame of tissue engineering vascular grafts making, which demanded in reconstructive cardiovascular surgery.

Key words: decellularization, extracellular matrix, tissue engineered vascular graft.

В качестве основы для создания будущего сосуда возможно использование как синтетических, так и естественных полимеров. Из естественных, преимущества которых очевидны, наиболее часто используют коллаген [9]. Однако синтезировать протяженную конструкцию из коллагена со структурой естественного сосуда до настоящего времени не удается [5]. С другой стороны, при элиминации клеточного компонента из стенки интактной донорской артерии останется только внеклеточный матрикс, состоящий из коллагена и эластина, с сохраненной естественной структурой, которая будет максимально благоприятной для последующей колонизации клетками реципиента, а отсутствие «чужих» клеток нивелирует возможный иммунный ответ после трансплантации тканеинженерного сосуда реципиенту [5, 10, 11]. В настоящее время большинство стратегий получения такого матрикса направлены как раз на разработку методов децеллюляризации донорского сосуда [2, 4, 12], то есть на полное удаление клеток и их остатков (клеточного дебриса) с минимальным повреждением экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) сосуда. Децеллюляризованные сосуды должны быть лишены иммуногенных свойств, при этом сохранять структуру и механические свойства ЭЦМ, который

e-mail: vsurg@yandex.ru

может быть использован как носитель для клеток тканеинженерного графта. [7, 13–16].

Многочисленные опубликованные протоколы децеллюляризации [5, 15, 17–19] оказались неэффективны при обработке кровеносных сосудов малого калибра, так как они либо не полностью удаляют клетки из ткани, либо серьезно повреждают ЭЦМ, поэтому требуют серьезных доработок. В этой связи продолжают поиски новых методов удаления клеток из нативных тканей. В результате испытания различных вариантов протоколов, в нашей лаборатории был разработан оригинальный способ децеллюляризации кровеносных сосудов малого калибра (3–4 мм), в качестве которых в эксперименте использовали артерии пуповины человека.

Материал и методы

Получение материала

Для изготовления внеклеточного матрикса кровеносного сосуда малого калибра использовали артерию пуповины человека. Материал получали в родильном зале Федерального специализированного перинатального центра ФГБУ «ФЦСКЗ им. В.А. Алмазова». Пуповину транспортировали в лабораторию в охлажденном фосфатно-солевом буферном растворе (Росмедбио, Россия) при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Время доставки составило 1–2 ч. В стерильных условиях с помощью пинцета и ножниц из пуповины выделяли обе артерии, которые затем разделяли на участки длиной 5–6 см. Далее часть материала подвергали децеллюляризации, часть замораживали и хранили при температуре -80°C .

Методика децеллюляризации артерий пуповины

Разработанный способ удаления клеток из стенки кровеносных сосудов состоит из нескольких этапов со сменой децеллюляризирующих растворов (ДР), в составе которых используются детергенты и ферменты. После каждого этапа участок артерии трижды промывали в фосфатно-солевом буфере с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ФСБ-ЭДТА, Росмедбио, Россия) по 10–15 мин.

Все этапы децеллюляризации проводили при постоянном вращательном движении ДР в рабочей емкости, для чего последнюю устанавливали на орбитальном шейкере со скоростью 30 об/мин и амплитудой движений 10 мм (орбитальный шейкер GFL 3005, GFL, Германия), подвергали вибрации с помощью небольшого мотора с эксцентриком (вибромотор QX-6A-1, QX Motor, Китай).

Предварительно замороженные фрагменты артерий размораживали на водяной бане при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 10 мин. Первым этапом производили отмывание участка кровеносного сосуда от крови в деионизированной воде (Milli-Q, Millipore, Франция) в течение 1 ч при температуре $+5^{\circ}\text{C}$. Затем материал на 1 ч при температуре 37°C помещали в 0,05% раствор трипсина (Самсон-Мед, Россия) в ФСБ-ЭДТА. Далее артерии обрабатывали в течение 22 ч. при комнатной температуре в 0,075% растворе додецилсульфата натрия (Amresco, США) в ФСБ-ЭДТА, затем еще в течение 22 ч также при комнатной температуре обрабатывали 0,25% раствором Тритон X-100 (Amresco, США) в ФСБ-ЭДТА. На последнем этапе, в течение 6 ч при температуре

$+37^{\circ}\text{C}$ материал подвергали воздействию нуклеаз (РНКаза А 20 мкг/мл, ДНКаза I 200 мкг/мл, Росмедбио, Россия) в питательной среде M199 (Sigma-Aldrich, США).

Изготовление микропрепаратов артерий для гистологического и иммуногистохимического исследования

Участки исследуемых артерий помещали в 4% формалин на 4 ч, дегидратировали в спиртах и заливали в парафиновые блоки по стандартной программе на автоматическом тканевом процессоре Leica TP 1020 (Leica, Германия). С помощью микротомы делали серии из трех поперечных срезов артерий толщиной 5–10 мкм. Для определения равномерности проведенной децеллюляризации исследовали срезы, сделанные по краям и в центре препарата (рис. 1).

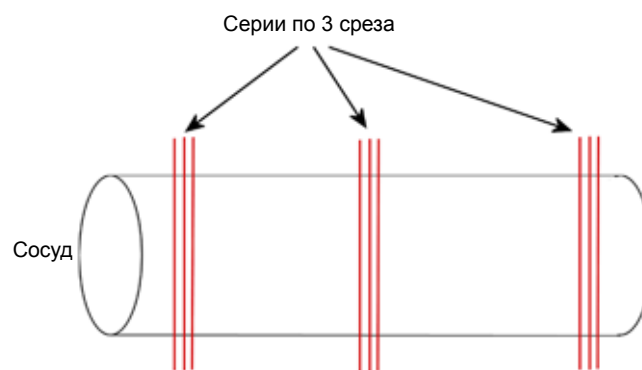


Рис. 1. Схема изготовления микросрезов исследуемой артерии

Приготовленные срезы депарафинировали и стандартно окрашивали гематоксилином и эозином для общей оценки препарата и визуализации ядер клеток. Для определения сохранности ЭЦМ срезы окрашивали по Ван Гизону. Изучение микропрепаратов проводили на световом микроскопе Leica DM1000 с фотокамерой с увеличением от $\times 10$ до $\times 1000$ (Leica, Германия).

Приготовленные срезы подвергали также иммуногистохимическому анализу, используя непрямой двойной метод визуализации EnVision (Dako, Дания). В качестве первичных антител были выбраны моноклональные антитела к антигенам CD31 (PECAM-1) и к α -гладкомышечному актину (α -SMA) (Dako, Дания). Для визуализации ядер клеток препараты дополнительно докрашивали гематоксилином. Изучение микропрепаратов проводили на световом микроскопе Leica DM1000 с фотокамерой с увеличением от $\times 10$ до $\times 1000$ (Leica, Германия).

Определение содержания ДНК в децеллюляризованных артериях

Исследовали 3 фрагмента децеллюляризованных артерий, фрагмент нативной артерии в качестве положительного контроля и фосфатно-солевой буферный раствор в качестве отрицательного контроля. Для экстракции ДНК фрагменты исследуемых артерий массой 250–300 мг гомогенизировали в аппарате TissueLyser (QIAGEN, США). Выделение

ДНК из гомогенизата проводили с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit (QUAGEN, США), согласно протоколу производителя. Количественный анализ ДНК проводили на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Определение содержания и состава РНК в децеллюляризованных артериях

Для экстракции РНК фрагменты исследуемых артерий массой 100–120 мг гомогенизировали с тризолом (Ambion, США) в аппарате TissueLyser (QIAGEN, США). После хлороформной экстракции, РНК преципитировали изопропанолом из водной фазы, отмывали 75% этанолом и сушили воздухом при комнатной температуре. После растворения РНК в чистой воде проводили количественный анализ на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США) и качественный — на анализаторе BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, США) с использованием системы RNA nano chip (Agilent Technologies, США).

Результаты

Макроскопическая характеристика артерий пуповины человека

Всего было изготовлено 26 фрагментов децеллюляризованных артерий пуповины. В ходе морфологического исследования образцов артерий было отмечено, что после удаления клеток сосуды теряют свой естественный цвет, становятся белесыми, что характерно для всех децеллюлированных тканей [15, 17, 18, 20, 21]. Просвет артерий становился более широким из-за отсутствия гладкомышечных клеток. При этом интактные артерии пуповины имеют диаметр 2–3 мм, в норме они спазмированы.

Результаты гистологического и иммуногистохимического исследования артерий пуповины человека

При световой микроскопии нативная артерия пуповины имела характерное для артерий мышечного типа строение, но у сосуда отсутствовала адвентиция — ее роль выполнял Вартонов студень (рис. 2А).

Просвет артерий был сужен из-за спазма гладкомышечных клеток, имел неправильную звездчатую форму. Внутренняя поверхность сосуда покрыта эндотелием. Средняя оболочка достаточно толстая, состояла из слоя продольно расположенных гладкомышечных клеток и внешнего слоя радиально ориентированных лейомиоцитов (рис. 2Б). После децеллюляризации сосуда клетки не определялись, артерии были дилатированы, а толщина сосудистой стенки несколько уменьшалась (рис. 3).

Гистологические препараты, окрашенные обзорными красителями (гематоксилином и эозином) дают наиболее наглядную картину состояния артерий: стенка нативного сосуда богата клетками с хорошо прокрашенными ядрами (рис. 3А), а в стенке децеллюляризованной артерии (рис. 3Б) ядра клеток не визуализированы, стенка сосуда имеет характерную пористую структуру. Серии поперечных срезов, сделанных по краям и в центре исследуемых артерий (см. рис. 1), позволяют говорить о равномерности проведенной децеллюляризации.

При окраске по Ван Гизону (рис. 3В, Г), тропной к соединительнотканым волокнам, было показано, что ЭЦМ, состоящий преимущественно из коллагена, оставался неизменным.

Антиген CD31 (PECAM-1), экспрессирующийся эндотелиальными клетками, использовали в качестве маркера их остатков при иммуногистохимическом исследовании. На внутренней поверхности нативной артерии определялось специфическое окрашивание эндотелиального слоя в коричневый цвет (рис. 3Д). После обработки сосудов по разработанному нами протоколу этот антиген не определяется, что говорит о полной элиминации эндотелиоцитов и их остатков (рис. 3Е).

В качестве маркера гладкомышечных клеток использовали α -SMA. Артерия пуповины, являясь типичной артерией мышечного типа, богата гладкомышечными клетками (рис. 3Ж). После децеллюляризации (рис. 3З) α -SMA не обнаруживается, что косвенно подтверждает не только лизис гладкомышечных клеток, но и удаление клеточного дебриса из всей толщи сосудистой стенки.

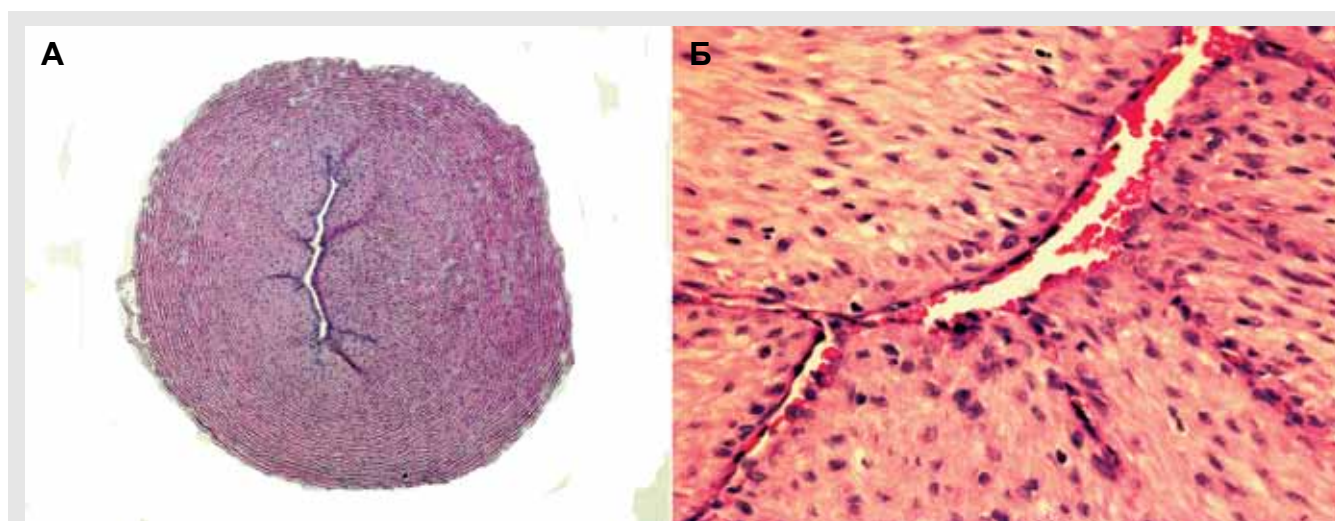


Рис. 2. Артерия пуповины человека, поперечный срез. Окраска: гематоксилин и эозин.
Ув.: А $\times 50$; Б $\times 400$

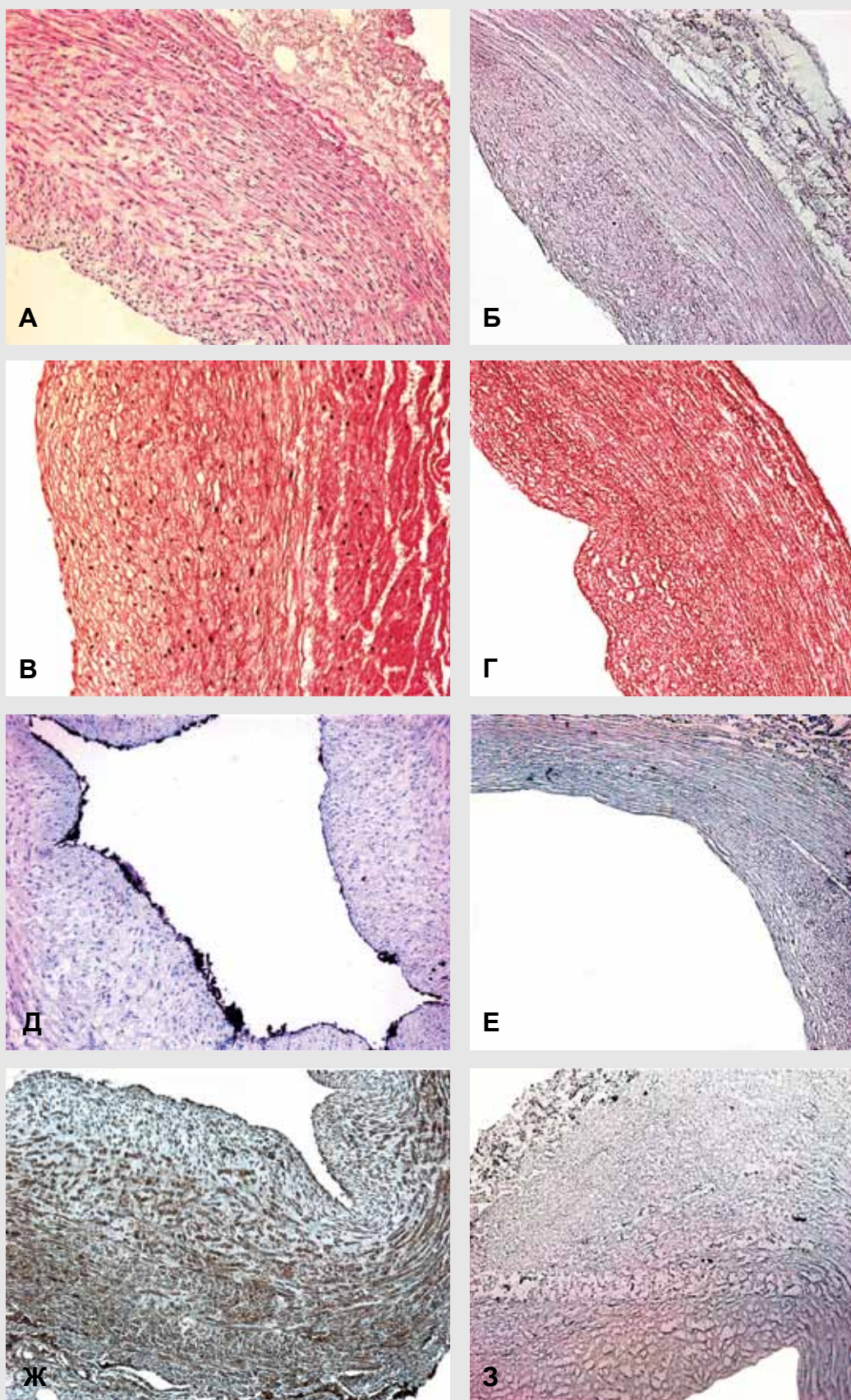


Рис. 3. Артерии пуповины человека, поперечные срезы:
 А, В, Д, Ж – нативный сосуд; Б, Г, Е, З – децеллюляризованный сосуд.
 Окраска: А, Б – гематоксиллин и эозин; В, Г – по Ван Гизону; Д, Е – иммуногистохимическая реакция с антителами к CD31; Ж, З – иммуногистохимическая реакция с антителами к α -SMA.
 Ув.: А–Г, Ж, З $\times 200$; Д, Е $\times 100$

Результаты исследования нуклеиновых кислот в децеллюляризованных артериях

Исследования содержания нуклеиновых кислот в образцах показало, что в нативной артерии уровень ДНК составляет 81,9 нг/мкл элюата, а во фрагментах децеллюляризованных артерий ДНК не определялось. В необработанной артерии уровень РНК был ожидаемо высоким и составил 98,4 нг/мкл элюата. После децеллюляризации определялись лишь следовые концентрации РНК, а в ряде случаев не детектировались вовсе. При качественном анализе РНК нативной артерии показатель уровня сохранности РНК (RNA Integrity number, RIN) составил 2,3, в то время как в образцах децеллюляризованных артерий RIN не определялся (т.е. был равен нулю).

Обсуждение

Последние достижения тканеинженерного направления биотехнологий во многом связаны с появлением возможности создания ЭЦМ органов и тканей методом децеллюляризации. Децеллюляризованные ткани сохраняют механическую прочность и нативную структуру, что делает их подходящим субстратом для последующего заселения клетками реципиента. Качеству удаления клеток из ткани уделяется огромное внимание, поскольку именно это обеспечивает отсутствие иммунного ответа у реципиента [12]. Выбор оптимальной методики децеллюляризации сильно отличается в зависимости от вида обрабатываемой ткани. В нашей лаборатории разработан оригинальный способ удаления клеток из стенки кровеносных сосудов малого калибра, в качестве которых в эксперименте использовали артерии пуповины человека.

Артерии пуповины в качестве субстрата для изготовления ЭЦМ кровеносных сосудов малого калибра человека недостаточно изучены, однако имеют ряд достоинств, что делает их использование очень перспективным [22]. Прежде всего, пуповина легко доступна и может быть получена в стерильном виде, длина её достигает 40–80 см, артерии пуповины не имеют боковых ветвей, а диаметр их равен 3–4 мм. При выделении артерий из пуповины их стенка может быть легко повреждена, поэтому этот этап следует проводить с осторожностью. Нам удалось успешное препарирование артерий, несмотря на их «нежность» и малый диаметр, с использованием стандартного хирургического инструментария — пинцета и ножниц. Известна работа, в которой описан оригинальный способ автоматического выделения вен из пуповины [23], однако этот способ не применим к артериям, хотя автоматизация выделения артерии несомненно увеличила бы доступность этого материала.

Для децеллюляризации использована комбинация детергентов и ферментов, что не является новым, однако описанный нами способ отличается составом, последовательностью и длительностью применения децеллюляризирующих агентов, их более низкой концентрацией и наличием дополнительного физического воздействия — вибрации, что ранее не описано, но по нашему мнению повлияло на результат.

На первом этапе, при отмывании участка кровеносного сосуда от крови в деионизированной воде, которая является гипотоническим раствором, происходит осмотический шок и частичный лизис клеток.

Непродолжительное трехкратное (по 10–15 мин после каждого этапа) промывание обрабатываемой артерии в буферном растворе направлено на механическое удаление свободного клеточного дебриса. На втором этапе использован 0,05% раствор трипсина с ЭДТА, который широко применяется в клеточной биологии для отделения клеток от поверхности субстрата (пластик, стекло). Обычно для этих целей пользуются трипсином в концентрации 0,05% или 0,25%. Нами применена более низкая концентрация этого фермента для предотвращения протеолиза белков ЭЦМ. Трипсин приводит к отделению клеток от ЭЦМ и «разрыхлению» его микроструктуры, способствует глубокому проникновению детергентов и улучшению удаления клеток из толщ сосудистой стенки на дальнейших этапах децеллюляризации. ЭДТА связывает ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} , которые, во-первых, могут ингибировать действие трипсина, во-вторых, необходимы для адгезии клеток на ЭЦМ, и, в-третьих, ЭДТА неселективно ингибирует металлопротеиназы матрикса, что предотвращает саморазрушение ЭЦМ.

На третьем этапе обработки материала использовали 0,075% раствор додецилсульфата натрия. Лаурилсульфат натрия (SLS; также додецилсульфат натрия, SDS) — сильное анионоактивное поверхностно-активное вещество (ПАВ), которое применяется для солюбилизации белков клеточных мембран и лизиса клеток с последующим вымыванием клеточного дебриса из матрикса. В литературе для проведения эффективной децеллюляризации описано применение SDS в концентрации от 0,075% до 1%. В нашей работе отдано предпочтение минимально эффективной концентрации этого детергента с целью сохранения ЭЦМ и оказания минимального возможного токсического эффекта при последующем совмещении клеток реципиента и полученного матрикса.

Четвертый этап обработки материала 0,25% раствором Тритон X-100 направлен также на солюбилизацию клеточных белков и лизис клеток с последующим вымыванием клеточного дебриса из матрикса, а также для удаления остатков SDS, который может проявить цитотоксичность при последующей децеллюляризации. По данным литературы, рекомендуется использовать Тритон X-100 в концентрации 1% [5, 13, 16, 21]. Мы установили, что минимально эффективная концентрация данного реагента при прочих равных условиях составляет 0,25%. Эффективность децеллюляризации с применением только 1% раствора Тритон X-100, либо только раствора SDS в различных концентрациях оказалась недостаточной, что соответствует данным литературы [14, 15]. Комбинация анионного и неионного ПАВ является оптимальной [5, 15, 21]

Техника заключительного этапа децеллюляризации одинакова практически во всех вариантах протокола: этот этап направлен на разрушение нуклеиновых кислот с помощью нуклеаз, которые ответственны за иммунный ответ у реципиента [11, 12, 14, 15, 18, 21]. Результаты гистологического и иммуногистохимического исследований, а также отсутствие ДНК и РНК в децеллюляризованных артериях свидетельствуют о полном удалении клеток и клеточного дебриса из обрабатываемой ткани в нашем варианте протокола децеллюляризации.

Заключение

Разработанный нами способ децеллюляризации сосудов малого калибра обеспечивает эффективное удаление клеток, их «остатков» и нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) из ЭЦМ без его повреждения. Эффективность описанного способа проверена в серии из 26 последовательных экспериментов, при этом достигнуты воспроизводимые результаты. Полученные таким образом децеллюляризованные ткани

могут использоваться в качестве матриц для клеток тканеинженерных сосудистых графтов, пригодных для использования и востребованных в практике сердечно-сосудистой хирургии.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение № 8161).

ЛИТЕРАТУРА:

1. World Health Organization. World health statistics 2012. WHO Press 2012: 176.
2. Campbell G.R., Campbell J.H. Development of Tissue Engineered Vascular Grafts. Current Pharmaceutical Biotechnology 2007; 8: 43–50.
3. Naito Y., Shinoka T., Duncan D. et al. Vascular tissue engineering: towards the next generation vascular grafts. Advanced Drug Delivery Reviews 2011; 63(4–5): 312–23.
4. Thomas A.C., Campbell G. R., Campbell J.H. Advances in vascular tissue engineering. Cardiovascular Pathology 2003; 12: 271–6.
5. Ахмедов Ш.Д., С.А. Афанасьев, М.Л. Дьякова и др. Использование бесклеточного матрикса для формирования новых кровеносных сосудов и сердца методом тканевой инженерии. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2009; IV(2): 32–9.
6. Quint C., Kondo Y., Manson R.J. et al. Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit. PNAS USA 2011; 108(22): 9214–9.
7. Nerem R.M., Seliktar D. Vascular tissue engineering. Annu. Rev. Biomed. Eng. 2001; 3: 225–43.
8. Baguneid M.S., Seifalian A.M., Salacinski H.J. Tissue engineering of blood vessels. Brit. J. Surg. 2006; 93: 282–90.
9. Boccafroschi F., Habermehl J., Vesentini S. et al. Biological performances of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering. Biomaterials 2005; 26(35): 7410–7.
10. Erdbrügger W., Konertz W., Dohmen P.M. et al. Decellularized xenogenic heart valves reveal remodeling and growth potential in vivo. Tissue Engineering 2006; 12(8): 2059–68.
11. Zhao Y., Zhang S., Zhou J. et al. The development of a tissue-engineered artery using decellularized scaffold and autologous ovine mesenchymal stem cells. Biomaterials 2010; 31: 296–307.
12. Crapo P.M., Gilbert T.W., Badyak S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials 2011; 32: 3233–43.

13. Zou Y., Zhang Y. Mechanical evaluation of decellularized porcine thoracic aorta. J. Surg. Res. 2012; 2(175): 1–10.
14. Fitzpatrick J.C., Clark P.M., Capaldi F.M. Effect of decellularization protocol on the mechanical behavior of porcine descending aorta. Int. J. Biomat. 2010: 1–11.
15. Rieder E., M.-T. Kasimir, G. Silberhumer et al. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. J. Thor. Cardiovasc. Surg. 2004; 127(2): 399–405.
16. Williams C., Liao J., Joyce E.M. et al. Altered structural and mechanical properties in decellularized rabbit carotid arteries. Acta Biomaterialia 2009; 5: 993–1005.
17. Ott H.C, Matthiesen T.S, Goh S. et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. Nature Medicine 2008; 14(2): 213–21.
18. Guo-feng L., Zhi-juan H.E., Da-ping Y. et al. Decellularized aorta of fetal pigs as a potential scaffold for small diameter tissue engineered vascular graft. Chin. Med. J. 2008; 121(15): 1398–406.
19. Smith A.N. Characterization and implementation of a decellularized porcine vessel as a biologic scaffold for a blood vessel mimic [dissertation]. San Luis: California Polytechnic State Univ. 2011, 196 p.
20. Dong J., Huang J. Mesenchymal stem cell-based tissue engineering of small-diameter blood vessels. Vascular 2011; 19(4): 206–13.
21. Roy S., Silacci P., Stergiopoulos N. Biomechanical proprieties of decellularized porcine common carotid arteries. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2005; 289: 1567–76.
22. Gui L., Muto A., Chan S.A. et al. Development of decellularized human umbilical arteries as small-diameter vascular grafts. Tissue engineering 2009; 15(Pt A): 2665–76.
23. Daniel J., Abe K., McFetridge P.S. Development of the human umbilical vein scaffold for cardiovascular tissue engineering applications. ASAIO 2005; 3: 251–62.

Поступила 10.12.2012