

На правах рукописи



Соколов Алексей Ильясович

**Пролиферативный потенциал фибробластов в структуре клеточно-инженерных
наноуглеродных конструкций и лазерных технологий в хирургии
(экспериментальное исследование)**

3.1.9. Хирургия

1.5.22. Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева» и федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор
доктор технических наук, доцент

Дыдыкин Сергей Сергеевич
Герасименко Александр Юрьевич

Официальные оппоненты:

Бежин Александр Иванович – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра оперативной хирургии и топографической анатомии, заведующий кафедрой

Голубцова Наталья Николаевна – доктор биологических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», кафедра общей и клинической морфологии и судебной медицины, заведующий кафедрой

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «18» ноября 2024 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.28 на базе ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2).

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации: www.sechenov.ru

Автореферат разослан «___» _____ 20 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор



Семиков Василий Иванович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Клеточно-ассоциированные технологии сформировались и развиваются как передовое направление фундаментальной и клинической медицины. В настоящее время с применением биоматериалов, заселенных клетками, связаны успехи регенеративной медицины в лечении широко спектра патологических состояний, связанных с повреждениями тканей и органов, а суммарный объем инвестиций в эту область знаний оценивается в 1 млрд. долларов США [Capella-Monsonis et al., 2020].

Несмотря на значительные достижения применения клеточно- и тканеинженерных технологий в медицинской практике, остается нерешенным ряд существенных проблем, сдерживающих темпы роста клинического использования технологий. Среди них – нередко неудовлетворительная совместимость используемых клеточных популяций и каркасных тканеинженерных конструкций, необходимость очень большого количества клеток для получения клинических результатов [Heathman et al., 2015].

Биоматериалы, используемые в клинической хирургии, должны, с одной стороны, создавать оптимальные условия для колонизации целевыми клеточными популяциями, а, с другой стороны, обеспечивать необходимые для имплантации клеток условия в послеоперационном периоде. В этой связи идеальный биоматериал должен быть клеточно-совместимым, обеспечивать механическую поддержку и функциональную активность клеток после трансплантации, активировать инфильтрацию аутологичными клетками и обладать свойствами управляемой или прогнозируемой биорезорбции [Блинова и соавт., 2021].

Исследования последних лет показывают, что наиболее привлекательными биологическими материалами, для разработки и производства клеточных конструкций являются тканеинженерные конструкции на основе природных компонентов, в том числе и межклеточного матрикса (коллаген, хитозан, гиалуроновая кислота, эластин) вследствие их высокой цитосовместимости, низких иммуногенных свойств и управляемых биомеханических свойств [Блинова и соавт., 2021; Дракина и соавт., 2022]. Вместе с тем, результаты клинических исследований, опубликованные за последние 5-7 лет, показывают противоречивые данные [Catena et al., 2007; Abdelfatah et al., 2015; Lee et al., 2015; Adeel et al., 2017; Kelley et al., 2017; Hillberg et al., 2018]. В исследованиях других авторов, напротив, показано, что клеточно-ассоциированные тканеинженерные конструкции могут с успехом применяться в регенеративной хирургии костей [Salzberg et al., 2013], молочной железы [Kim et al., 2022], хрящевой ткани [Sobti et al., 2022], раневых дефектов различного происхождения [Hansson et al., 2021].

Все это обуславливает несомненную актуальность изыскания новых подходов к совершенствованию технологии получения клеточных ТК и делает проведение настоящего исследования обоснованным и своевременным.

Степень ее разработанности

Трехмерные тканеинженерные конструкции были разработаны сотрудниками ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет «Московский институт электронной техники» [Ичкитидзе и соавт., 2020]. Опытные образцы тканеинженерных конструкций, предназначенные для последующего заселения *in situ* клетками с высоким потенциалом адгезии, пролиферации и дифференцировки в зрелые клетки, формирующие структурно-функциональные компоненты миокарда были подробно изучены в экспериментально-хирургическом исследовании А.Ю. Герасименко [Герасименко, 2023].

По своей природе тканеинженерные конструкции представляют собой гибридную структуру, в которой природный компонент является жидким тканевым матриксом в виде протеиновой смеси альбумина и коллагена человека, а также хитозана; опорно-скрепляющий нанougлеродный каркас (синтетический компонент) выполнен из углеродных нанотрубок с высокой степенью чистоты (до 99,0 – 99,9%).

В нашей лаборатории совместно с сотрудниками ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет «Московский институт электронной техники» ранее было показано, что заселение тканеинженерного каркаса фибробластами кролика и крысы с последующей его имплантацией к области острого ишемического повреждения миокарда позволяет восстанавливать структурно-функциональное состояние органа животных. Также была установлена фенотипическая трансформация имплантированных клеток в зрелые кардиомиоциты животных [Шматок, 2023].

Цели и задачи

Изучить биомеханические свойства, эффективность и безопасность биodeградируемой тканеинженерной конструкции, населенной фибробластами с потенциалом к сосудистой дифференцировке, при восстановлении дефектов сосудов в эксперименте.

1. Определить цитотоксичность тканеинженерной конструкции на основе углеродных нанотрубок при ее ингибировании в культуре фибробластов крысы, а также установить влияние ее компонентов на внутриклеточную активность естественного фермента – антиоксиданта - супероксиддисмутазы.

2. С помощью флуоресцентной микроскопии клеток на поверхности тканеинженерной конструкции на основе углеродных нанотрубок изучить клеточную совместимость конструкции, а также установить потенциал сохранения жизнеспособности клеток в течение 96 часов инкубации на ее поверхности.

3. Оценить герметичность, прочность на разрыв и безопасность хирургической технологии восстановления сосудистой стенки с применением тканеинженерной конструкции на основе углеродных нанотрубок, заселенной фибробластами в эксперименте на крысах.

4. Изучить морфологические закономерности восстановления сосудистой стенки при имплантации заселенной фибробластами тканеинженерной конструкции на основе углеродных нанотрубок в эксперименте на крысах.

5. Установить биомеханические свойства лазерного соединения стенки брюшной аорты минипигов с использованием биологического состава на основе водной дисперсии 25 масс. % альбумина, 0,001 масс.% индоцианина зеленого и 0,1 – 0,001 масс. % одностенных углеродных нанотрубок и тканеинженерной конструкции в сравнении с узловым швом в эксперименте.

Научная новизна

Впервые проведено комплексное исследование возможности оценки клеточной совместимости, выживаемости и экспериментально-хирургического применения тканеинженерной конструкции на основе углеродных нанотрубок для лазерного восстановления целостности сосудистой стенки.

Предложен способ заселения клеточной культурой фибробластов тканеинженерной конструкции на основе углеродных нанотрубок. В экспериментах на основе определения внутриклеточной ферментативной активности установлено, что инкубация фибробластов крысы в присутствии компонентов тканеинженерной конструкции на основе углеродных нанотрубок не вызывает лизиса клеток, не подавляет их пролиферативный потенциал, способствует продолжающейся пролиферации и росту клеточной популяции, в концентрациях 0,01 – 10,0 мг/мл не повышает ферментативную активность супероксиддисмутазы и, следовательно, не активирует избыточную продукцию реактивных форм кислорода.

В работе установлено, что при флуоресцентной микроскопии окрашенных иодидом этидия и флуоросцеина диацетатом клеток на поверхности тканеинженерной конструкции на основе углеродных нанотрубок на сроках 24, 48 и 72 часа фиксируется наличие благоприятных условий для адгезии фибробластов на поверхности тканеинженерной конструкции, формирование равномерного клеточного слоя с плотными межклеточными контактами и высоким потенциалом сохранения жизнеспособности клеток в течение 96 часов инкубации. Проведением теста с трифенилтетразолия хоридом показано отсутствие цитотоксических свойств самой конструкции и отдельных его структурных компонентов.

В экспериментах на лабораторных крысах показано, что использование узлового сосудистого шва с имплантацией заселенной фибробластами тканеинженерной конструкции на основе углеродных нанотрубок, обеспечивает безопасное, герметичное и прочное соединение линейной проникающей раны брюшной аорты лабораторной крысы, не сопровождается

формированием тромбогеморрагических, окклюзионных или аневризматических осложнений на протяжении 8 недель послеоперационного периода.

Впервые показано, что в основе установленных закономерностей лежит тканевой ответ на ангиопластику, выражающийся формированием воспалительной реакции. Асептическое воспаление сопровождается пролиферацией заселенных фибробластов и образованием межклеточного матрикса, активацией дифференцировки собственных сосудистых миофибробластов в гладкомышечные клетки, образованием неоинтимы, и разрешается к 8 неделе полным восстановлением структурной организации сосудистой стенки и резорбцией тканеинженерной конструкции. На элементы заселенной аутологичными клетками тканеинженерной конструкции не формируется местных и системных иммунных реакций.

Впервые доказано, что в условиях *ex vivo* применение инновационной технологии лазерного соединения стенки брюшной аорты минипига с использованием биологического состава на основе водной дисперсии 25 масс. % альбумина, 0,001 масс.% индоцианина зеленого и 0,1 – 0,001 масс. % одностенных углеродных нанотрубок и тканеинженерной конструкции, обеспечивает формирование герметичного соединения, несколько уступающего по прочности узловому шву; при этом тканеинженерная конструкция при ее муфтообразной фиксации в опытах на минипигах *in vivo* обеспечивает оптимальные условия герметизации лазерного шва сосудистой стенки.

Теоретическая и практическая значимость работы

В результате проведения исследований определены оптимальные условия получения, заселения тканеинженерной конструкции на основе углеродных нанотрубок фибробластами для последующего их использования в экспериментальной реконструктивной хирургии, установлены показатели сохранения жизнеспособности и трансплантационной пригодности клеточной тканеинженерной конструкции.

Установлено, что при хирургическом вмешательстве на артериальном кровеносном сосуде применение технологии лазерного излучения с использованием биологического состава на основе водной дисперсии 25 масс. % альбумина, 0,001 масс.% индоцианина зеленого и 0,1 – 0,001 масс. % одностенных углеродных нанотрубок позволяет осуществлять безопасное и герметичное восстановление целостности сосудистой стенки.

Полученные результаты о безопасности применения, заселенного фибробластами тканеинженерной конструкции на основе углеродных нанотрубок и биологического состава для стабилизации лазерного соединения сосудистой стенки могут быть использованы в дальнейших доклинических исследованиях реконструктивно-хирургических технологий шва сосудов, кожи и полых органов.

Методология и методы исследования

В методологическую основу настоящего диссертационного проекта были положены принципы комплексности, целостности, многоэтапности, при этом для успешной разработки тканеинженерной конструкции, выполнения исследований его биосовместимости, оценки адгезивности и пролиферации клеток, операции имплантации, моделирования патологического состояния и последующего изучения эффективности и безопасности использования тканеинженерной конструкции у экспериментальных животных были привлечены методы клеточной и молекулярной биологии, биохимии, экспериментальной хирургии, тканевой инженерии, молекулярной иммунологии, визуализации, биоинформатики.

Фибробласты для изучения пролиферации, адгезии и выживаемости на поверхности тканеинженерной конструкции получали из первично-трипсинизированных культур новорожденных крыс. Для лазерного соединения ранения / повреждения / дефекта артериального сосуда применяли аппарат лазерного сшивания оригинальной конструкции, разработанный в ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет «Московский институт электронной техники». Для достижения наилучшего соединения при лазерном сшивании были использованы биологический состав на основе водной дисперсии 25 масс. % альбумина, 0,001 масс.% индоцианина зеленого и 0,1 – 0,001 масс. % одностенных углеродных нанотрубок.

Для изучения жизнеспособности клеток *ex vivo* в присутствии компонентов объемной тканеинженерной конструкции на основе углеродных нанотрубок использовали метод с тетразолием хлоридом. Адгезивный потенциал клеток, способность к формированию плотного слоя на поверхности конструкции изучали методом флуоресцентной микроскопии при окрашивании клеток йодидом этидия и флуоросцеина диацетатом.

Прочность и герметичность лазерного соединения стенок аорты минипига с использованием биосостава проверяли динамометрически при оценке силы разрыва соединения.

Экспериментально-хирургическое пособие на лабораторных крысах и минипигах проводили под ингаляционной анестезией, в соответствии с собственной методикой постановки опыта: на первом этапе проводили выделение и рассечение сосудистой стенки на протяжении, затем выполняли сшивание стенок с последовательной фиксацией тканеинженерной конструкции, заселенной фибробластами, в виде заплатки (лабораторные крысы), лазерное сшивание сосуда с последовательной фиксацией тканеинженерной конструкции, незаселенной фибробластами муфтообразно (минипиги). О безопасности судили по экспериментальной послеоперационной летальности, частоте развития тромбгеморрагических и окклюзионных или аневризматических изменений. Эффективность оценивали морфологически, а также путем

определения прочностных характеристик соединения на 4 и 8 неделях после проведения вмешательства.

Анализ результатов проводили методами вариационной статистики с использованием параметрических критериев, пакета программ по статистике BioStat.

Связь диссертации с основными научными темами

Диссертационная работа выполнена при частичной финансовой поддержке договора на выполнение работ в рамках составной части прикладных научных исследований и экспериментальных разработок (СЧ ПНИЭР) ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) по НИР «Экспериментальные исследования по имплантации и неоваскуляризации трехмерных клеточно- и тканеинженерных конструкций», гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации НШ-843.2022.3. Крупного научного проекта Минобрнауки России «Микроэлектронные технологии формирования мультимасштабных имплантируемых нейроинтерфейсов живых - технических систем для управления передачей болевых сигналов в мозг» (Соглашение № 075-15-2024-555 от 25.04.2024 г.), Государственного задания Минобрнауки России, научный проект «Биоинтегрированная электроника на основе углеродных нанотрубок и графена» (Проект FSMR-2024-0003).

Положения, выносимые на защиту

1. Тканеинженерная конструкция на основе углеродных нанотрубок создает благоприятные условия для пролиферации и дифференцировки фибробластов крысы, обеспечивает оптимальные адгезивные свойства для формирования плотного клеточного слоя.

2. Соединения дефектов стенки брюшной аорты в эксперименте с применением заселенной фибробластами тканеинженерной конструкции на основе углеродных нанотрубок приводит к герметичному и безопасному восстановлению целостности сосудистой стенки, при этом при сравнении с узловым швом сосуда не наблюдается сужения и послеоперационных осложнений в виде тромбоза.

3. В основе установленных закономерностей лежит тканевой ответ на ангиопластику, выражающийся формированием воспалительной реакции. Асептическое воспаление сопровождается пролиферацией фибробластов и дифференцировкой, активацией дифференцировки сосудистых миофибробластов в гладкомышечные клетки, образованием неоинтимы, и разрешается к 8 неделе полным восстановлением структурной организации сосудистой стенки и резорбцией тканеинженерной конструкции.

4. Использование лазерного соединения дефектов стенки брюшной аорты у минипигов с биологическим составом на основе водной дисперсии 25 масс. % альбумина, 0,001 масс.% индоцианина зеленого и 0,1 – 0,001 масс. % одностенных углеродных нанотрубок и

тканеинженерной конструкции на основе углеродных нанотрубок приводит к восстановлению целостности сосудистой стенки, при этом при сравнении с узловым швом сосуда отмечается уменьшенное значение прочности на разрыв соединения и снижение развития послеоперационных осложнений.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность сформулированных по результатам выполненной диссертационной работы выводов и положений обосновывается строгим следованием протоколу исследования и принципам биоэтики, неукоснительным соблюдением процедур получения исходных данных, их регистрации и учета, использованием в исследовании лицензионного программного обеспечения, валидированных методов получения доказательств, сертифицированного и поверенного оборудования, лабораторных животных, приобретенных в сертифицированных питомниках, формированием объема выборки необходимого и достаточного для получения репрезентативных результатов, корректных и современных методов медико-биологической статистики.

Апробация диссертационной работы проведена на совместном межучрежденческом заседании кафедр оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и кафедры факультетской хирургии с курсами урологии, топографической анатомии и оперативной хирургии и детской хирургии медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева», протокол №1 от 22.05.2024 г.

Результаты представленного диссертационного исследования докладывались и обсуждались на Поволжском семинаре «Осложнения эндоваскулярных вмешательств», Самара, 2021, II Межрегиональной научно-практической конференции, посвященной памяти С.В. Каткова, Саранск, 2022, VI Всероссийском саммите по кардиоваскулярным осложнениям «САМКО 2022», Москва, 2022.

Внедрение результатов диссертационного исследования

Основные научные положения, выводы и рекомендации внедрены в учебный процесс кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплины «Топографическая анатомия и оперативная хирургия», читаемой студентам по направлению подготовки 31.05.01 «Лечебное дело», а также в учебный процесс кафедры факультетской хирургии с курсами урологии, топографической анатомии и оперативной хирургии и детской хирургии медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева» при изучении дисциплины «Топографическая анатомия и оперативная хирургия», читаемой студентам по направлению подготовки 31.05.01 «Лечебное дело», используются в

исследовательской работе лаборатории физиологии и патологии стволовых клеток ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

Личный вклад

Автор выдвинул идею выполнения настоящего исследования, самостоятельно провел глубокий анализ зарубежных и отечественных литературных источников, сформулировал и обосновал научную гипотезу, лично автором обоснована необходимость привлечения всего спектра методологических инструментов для ответа на поставленные задачи. Автор лично выполнял работы по заселению клеточными культурами тканеинженерных конструкций. Автор непосредственно участвовал в оценке жизнедеятельности и адгезивного потенциала клеток, самостоятельно выполнил все экспериментально-хирургические вмешательства с использованием лазерных технологий соединения стенки сосуда. Автор лично участвовал в определении прочностных характеристик лазерного соединения. При непосредственном участии автора проведены морфологические и иммуногистохимические исследования. Автор самостоятельно провел обобщение и анализ результатов. Диссертант принял самое деятельное участие в подготовке научных публикаций по теме диссертации, самостоятельно написал рукопись и автореферат работы.

Соответствие диссертации паспортам научных специальностей

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.1.9. Хирургия, области исследований «Экспериментальная и клиническая разработка современных высокотехнологичных методов хирургического лечения, в том числе эндоскопических и роботических», паспорту научной специальности. 1.5.22. Клеточная биология, области исследований «Системный анализ взаимоотношений клеток, тканей и функциональных систем организмов – представителей всех царств», «Исследование адаптации тканевых элементов к действию различных биологических, физических, химических и других факторов».

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 7 работ, в том числе 3 научные статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 4 публикаций в сборниках материалов всероссийских научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация написана по традиционному плану, включает следующие разделы: введение, главу 1 – литературный обзор, главу 2 с описанием материалов и методов исследования, главу 3 с результатами исследований жизнеспособности фибробластов и их биосовместимости с компонентами тканеинженерной конструкции, прочности лазерного

соединения сосудов, главу 4 с результатами экспериментально-хирургического исследования и морфологического анализа процесса восстановления целостности сосудистой стенки при использовании лазерного излучения, главу 5, обобщающую результаты и заключающую исследование.

Диссертация изложена на 123 страницах компьютерного текста, иллюстрирована тридцатью рисунками и четырьмя таблицами. Список литературы содержит выходные данные 142 работ, из которых 11 работ отечественных и 131 – зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Настоящее диссертационное исследование выполнено в соответствии с требованиями приказа Минздрава России №199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики», регламентирующими доклинические лабораторные исследования, основываясь на принципах гуманного обращения с подопытными животными.

Дизайн исследования

Представленное диссертационное исследование включало ряд последовательных этапов, общий дизайн которых проиллюстрирован на рисунке 1.



Рисунок 1 – Общий дизайн выполнения исследования

На первом этапе сотрудниками лаборатории «Биомедицинские нанотехнологии» НИУ МИЭТ под руководством Герасименко А.Ю были проведены биомеханические испытания тканеинженерной конструкции с определением ее общих прочностных характеристик и предоставлены для исследования. В опытах *in vitro* оценивали биосовместимость элементов тканеинженерной конструкции с фибробластами, а также изучали адгезивность клеток, их

пролиферацию и степень дифференцировки на тканеинженерной конструкции. Помимо этого, в опытах *ex vivo* устанавливали способность клеток образовывать внутренний клеточный слой на цилиндрических элементах тканеинженерной конструкции. На экспериментально-хирургическом этапе работы провели сравнительное исследование эффективности применения заселенной и незаселенной фибробластами тканеинженерной конструкции и лазерного соединения стенки сосуда в экспериментах на лабораторных животных.

Биосовместимость тканеинженерной конструкции на основе углеродных нанотрубок

В качестве одного из объектов настоящей диссертационной работы выступали тканеинженерные конструкции, пригодные для экспериментально-хирургической имплантации на область сосудистого дефекта лабораторного животного (рисунок 2), разработанные и предоставленные сотрудниками ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет «Московский институт электронной техники» [Герасименко А.Ю и соавт., 2020]. Опытные образцы тканеинженерной конструкции заселялись фибробластами крысы *in situ*.

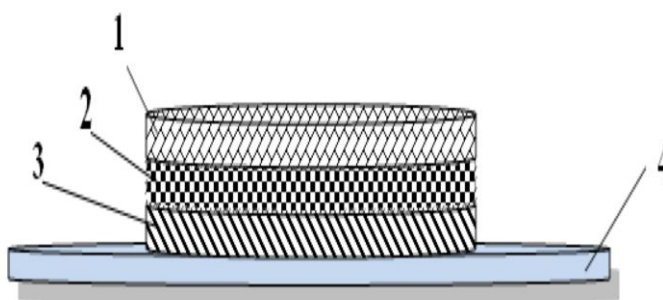


Рисунок 2 – А. Структура объемной тканеинженерной конструкции на основе углеродных нанотрубок: 1 – наноуглеродный каркас, заключенный в альбуминовый матрикс, 2 – наноуглеродный каркас, заключенный в коллагеновый матрикс, 3 – наноуглеродный каркас, заключенный в хитозановый матрикс, 4 – подложка для создания тканеинженерного конструкта Б. Электронные микрофотографии поверхностной структуры образца объемного тканеинженерного конструкта на основе углеродных нанотрубок (рисунок используется с разрешения авторов, Герасименко А.Ю., 2023)

По своей природе тканеинженерная конструкция представляет собой гибридную структуру, в которой природный компонент является жидким тканевым матриксом в виде протеиновой смеси альбумина и коллагена человека, а также хитозана; опорно-скрепляющий наноуглеродный каркас (синтетический компонент) выполнен из углеродных нанотрубок с высокой степенью чистоты до 99,0 – 99,9% (Таблица 1).

Таблица 1 – Состав и основные характеристики тканеинженерной конструкции на основе углеродных нанотрубок

Основная характеристика	Показатель
Толщина, мм	0,25-0,45
Концентрация углеродных нанотрубок (УНТ), масс.%	0,001
Длина УНТ, мкм	0,31-0,79
Диаметр УНТ, нм	1,39-1,59
Концентрация альбумина, концентрация, масс.%	25
Концентрация коллагена, масс.%	1
Концентрация сукцината хитозана, масс.%	2
Длина волны лазерного облучения, нм	1064

Клеточные культуры и оценка пролиферативного потенциала фибробластов

Фибробласты были получены из извлеченных из сердец новорожденных 3-суточных крысят белых беспородных лабораторных крыс. Взвесь клеток, извлеченных из сердца в результате 5 раундов трипсинизации центрифугировали при скорости 1000 об/мин на протяжении 20 минут и проводили ресуспензирование клеточного осадка в питательной «Среде 199» в соотношении 1:10. Забирали 2 пробы объемом по 0,5 мл сразу же после перемешивания клеточной суспензии. Для создания оптимальных условий формирования качественного клеточного монослоя полученные образцы клеточных суспензий тщательно оценивались количественно и использовались в необходимой «посевной дозе». В питательную среду культивирования вносили телячью эмбриональную сыворотку и антибиотики – бензилпенициллина натриевую соль и стрептомицин. На 5 сутки инкубирования проводили снятие клеточной культуры фибробластов. Инкубационные флаконы (культуральные матрасы) с фибробластами тщательно оценивали под световым микроскопом с увеличением $\times 70$, после чего отбирали только культуры с прозрачной питательной средой полноценным монослоем. Экспериментальные исследования с клеточной культурой проводили с применением среды ДМЕМ/f12. После получения клеточной культуры в достаточном объеме для создания оптимальной посевной дозы проводили заселение тканеинженерной конструкции фибробластами, для чего конструкцию после обработки ультрафиолетом помещали на 72 часа в культуральный планшет и засеивали его клетками.

Оценку жизнеспособности клеток определяли в тесте с трифенилтетразолием бромидом (МТТ, Merck Sigma-Aldrich, Швейцария). Пролиферативный потенциал фибробластов, заселенных на тканеинженерную конструкцию, определяли методом флуоресцентной микроскопии.

Лабораторные животные

Эксперименты проведены на беспородных лабораторных белых крысах обоего пола весом 200-220 г, приобретенных в филиале «Электрогорский» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, и минипигах весом 20 кг, приобретенных в специализированной фирме «Машкино». Животные содержались в виварии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарёва» в соответствии с требованиями национального регулятора.

В ходе выполнения исследования формировали экспериментальные группы для наблюдения за животными и сравнения эффективности и безопасности инновационных интервенций по поводу модельной травмы сосуда. Каждая группа крыс включала не менее 5 животных для получения репрезентативных результатов. При этом под группой понимали совокупность особей, в отношении которых использовался тот или иной метод исследования (или их совокупность) в определенной временной точке. Группы животных, в отношении которых были проведены одни и те же интервенции объединяли в исследовательские серии.

Моделирование экспериментальной хирургической патологии

Экспериментальное хирургическое вмешательство проводили в экспериментальных операционных кафедрах факультетской хирургии ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарёва» (лабораторные крысы) и оперативной хирургии и топографической анатомии ИКМ им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (минипиги). Наркотизированную изофлураном крысу укладывали на операционный стол на подогреваемую платформу от системы неинвазивного мониторингирования АД CODA (Kent Scientific, США) в положении на спине и фиксировали резиновыми силиконизированными держалками за лапки. Шерсть на передней брюшной стенке состригали и сбривали, обрабатывали раствором антисептика. После проведения срединной лапаротомии с применением операционного микроскопа Zeiss pico (Германия) острым способом рассекали париетальную брюшину, выделяли брюшную аорту и брали ее на микрососудистые клипсы каудальнее места отхождения почечных артерий так, чтобы между клипсами оставался участок сосуда 7-9 мм длиной. После этого наносили продольный проникающий разрез сосуда протяженностью 4 мм. Животным контрольной серии смоделированную сосудистую травму ушивали 3 узловыми швами с использованием шовного материала Пролен 5,0. Животным опытной серии концы раны сближали, после чего на рану в

виде заплатки накладывали предварительно подготовленный фрагмент тканеинженерной конструкции на основе углеродных нанотрубок, заселенной фибробластами крысы так, чтобы полностью перекрыть рану на протяжении (рисунок 3).



Рисунок 3– Ушивание сосуда крысы с наложением тканеинженерной конструкции, заселенной фибробластами

Тканеинженерную конструкцию фиксировали к интима брюшной аорты узловыми швами с использованием шовного материала Пролен 7,0. После удаления из участка между клипсами скопившегося объема воздуха восстанавливали кровоток по брюшной аорте. В течение 10 минут контролировали герметичность соединения. Общая продолжительность блока кровотока по брюшной аорте во время всех операционных пособий не превышала 15 мин.

Контролировали общее состояние животных, летальность в группах. На 4 и 8 неделе выживших животных выводили из эксперимента под общей ингаляционной анестезией. Участок брюшной аорты иссекали для выполнения исследований биомеханических (прочностных свойств) соединения и морфологических исследований.

Экспериментальное хирургическое вмешательство у минипигов проводили аналогично за исключением того, что выделяли брюшную аорту так, чтобы между клипсами оставался участок сосуда 5-6 см длиной. После этого наносили продольный проникающий разрез на сосуд протяженностью 2 см. Контрольным животным сосудистую травму ушивали 10 узловыми швами с использованием шовного материала Пролен 4,0. Животным опытной серии концы раны сближали, по краям наносили биологический состав при помощи одноразового стерильного инсулинового шприца, в течение до 60 секунд проводили лазерное соединение краев сосудистой раны. После чего на рану накладывали предварительно подготовленный фрагмент незаселенной тканеинженерной конструкции на основе углеродных нанотрубок муфтообразно так, чтобы полностью перекрыть рану на протяжении. Конструкцию фиксировали к интима брюшной аорты узловыми швами (Пролен 5,0).

Методы морфологического исследования. Иммуногистохимия

Иссеченные участки сосуда в месте его шва у крысы или минипига, выведенных из эксперимента, фиксировали в забуференном 10% растворе формальдегида. Гистологическую проводку секционного материала проводили с применением станции марки «STP – 120» типа «Карусель» (Германия) в режиме автоматической работы. Заливку гистологических блоков в медицинский парафин проводили автоматически на станции «EC350» (Германия). На ротационном микротоме HM340E (Microm Laborgerate GmbH, Германия) изготавливали микропрепараты толщиной 4-5 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином по методу Хеллендахелю. Микропрепараты просматривали на световом микроскопе марки «OLYMPUS BX-51» (Япония) при фиксации изображений камерой цифровой «OLYMPUS X COLYMPUS XC-30» (Япония), установленной на базе микроскопа «OLYMPUS BX51» (Япония) при увеличении окуляра SWHx10 и объективов UPLanFL x200, x400. Определяли структуру и зрелость сосудистой стенки.

Методом иммуногистохимического (ИГХ) исследования определяли экспрессию маркеров активности пролиферативно-регенераторных процессов и неоангиогенеза – Ki-67, PCNA и VEGF. Неокрашенные срезы толщиной 3-4 мк от каждого случая обрабатывали с помощью стандартного метода ИГХ с термической демаскировкой антигенов. Демаскировку проводили в водяной бане с микропроцессором BioOptica (Италия): срезы были депарафинированы в ксилене, затем подвергались регидратации в серии спиртов различной концентрации и затем инкубированы в 3% перекиси водорода. Все дальнейшие этапы проведения ИГХ реакции, для предотвращения высыхания срезов, проводились во влажной камере Slide Master (BioOptica, Италия). Для блокировки эндогенной пероксидазы стекла инкубировали в течение 15 минут с 3% раствором H_2O_2 , после чего для блокирования неспецифических белковых взаимодействий инкубировали с Ultra-V-Block (LabVision, США) в течение 30 минут. В качестве первичных антител использовали мышиные антитела к Ki-67 (клон MM1) (NovoCastra, Великобритания), VEGF Monoclonal Antibody (клон JH121) (Invitrogen, США) и PCNA (клон PC10) (Dako, разведение 1:100, США). Срезы инкубировали с первичными антителами в течение 30 минут согласно инструкции фирмы-производителя. Для выявления первичных антител использовали универсальную полимерную систему Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI) (Nichirei, Япония) в течение 30 минут. В зависимости от необходимой (желаемой) интенсивности окрашивания срезы инкубировали с 3,3'-диаминобензидина (ДАБ) в течение 5-10 минут. Далее, стекла ополаскивали в дистиллированной воде и подкрашивали ядра гематоксилином в течение 2-3 минут. После дегидратации срезы покрывали покровными стеклами с использованием синтетической среды BioMount.

При постановке ИГХ реакций в обязательном порядке ставили положительные и отрицательные контроли. В качестве отрицательных контролей брали образцы исследуемых срезов, которые подвергались стандартной процедуре ИГХ исследования, но без добавления первичных антител. Положительные контроли для каждого антитела выбирали в соответствии со спецификациями от фирмы производителя. Анализ ИГХ реакции производили в 6 полях зрения (по 3 поля из зоны имплантации клеточно- и тканеинженерной конструкции и по 3 – из периферических отделов сосудов) при увеличении $\times 400$. Для оценки ИГХ реакции на Ki-67, PCNA и VEGF определяли индекс пролиферации, для чего подсчитывали количество позитивно окрашенных ядер фибробластов в полях зрения, определяли их отношение к общему числу ядер в исследуемых областях, и полученное отношение выражали в процентах.

Методы статистического анализа полученных данных

Для проведения статистической сводки, группировки, обработки и математического анализа полученных в исследовании экспериментальных результатов использовали современные и валидные методы статистического анализа (Гланц, 1999). При сравнении количественных признаков проводили дисперсионный анализ для оценки нормальности распределения с последующим использованием критерия Даннета. Для сравнения результатов на различных сроках выведения животных из опыта использовали методы оценки повторных измерений. В расчетно-аналитическом разделе работы применяли портативный компьютер iMac Retina (США) с лицензионным интерфейсом и стандартным пакетом программ по статистике BOISTAT и SPSS (версия 9.2).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При определении жизнеспособности клеток в присутствии компонентов тканеинженерной конструкции с использованием в МТТ-теста во всех исследуемых лунках пролиферативный потенциал фибробластов после добавления компонентов не подавлялся, напротив, наблюдали продолжающуюся пролиферацию и рост клеточной популяции. Это свидетельствовало о том, что ни сама тканеинженерная конструкция, ни компоненты ее каркаса, ни отдельные компоненты природного матрикса не оказывают цитотоксического действия на культуры фибробластов крысы (рисунок 4В).

К завершению периода инкубации фибробласты сохраняли веретенообразную форму, что свидетельствовало об удовлетворительном состоянии их жизнедеятельности (Рисунок 4А, 4Б). Также показано, что добавление в клеточную культуру компонентов тканевой конструкции на основе углеродных нанотрубок в концентрациях 0,01, 0,1, 1,0, 10,0 мг/кг не сопровождалось статистически значимым изменением активности СОД, что косвенно может

свидетельствовать о сохранении продукции реактивных форм кислорода в рамках естественных для клетки диапазонов (рисунок 4 Г).

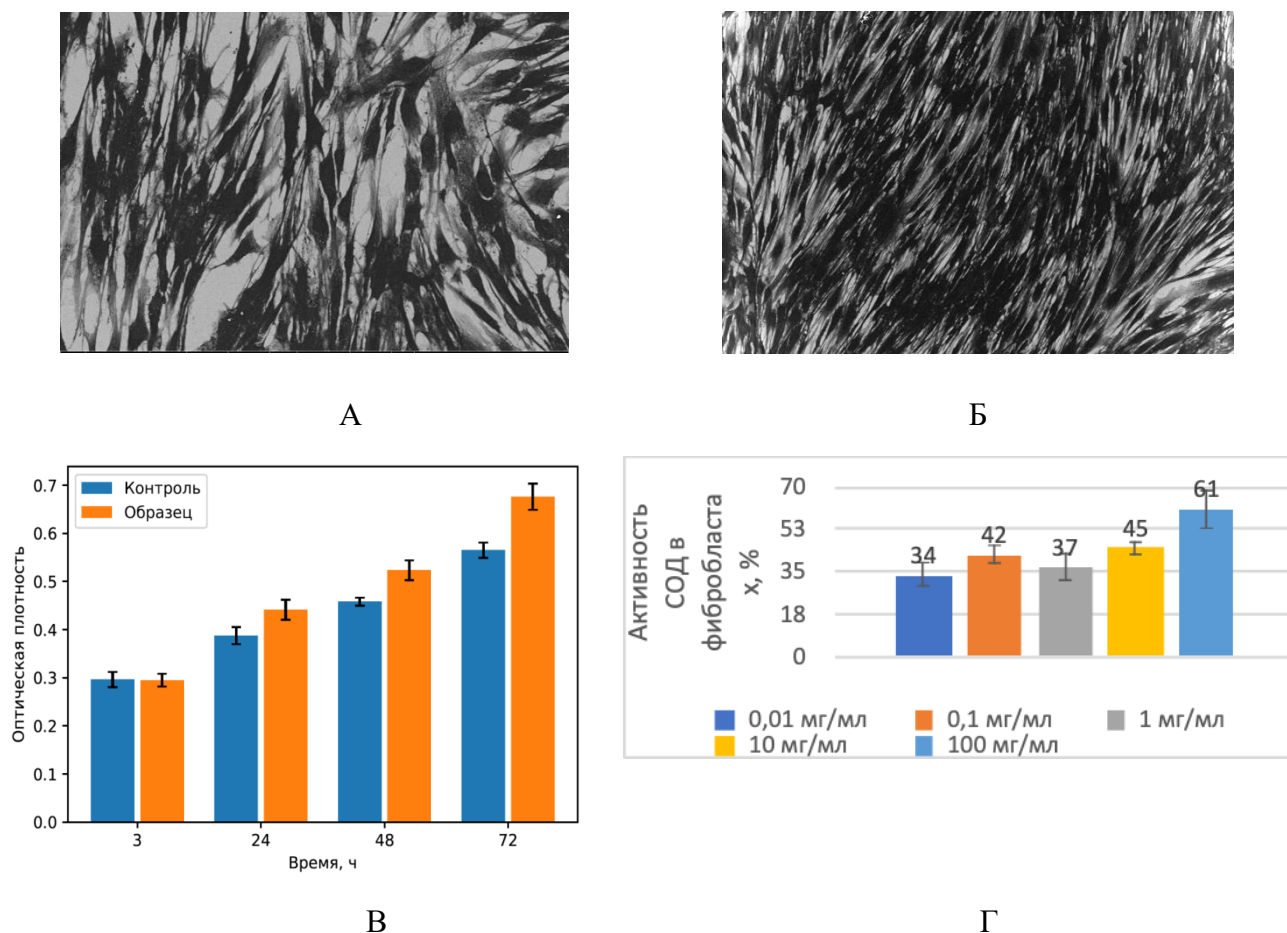


Рисунок 4 – Оценка состояния фибробластов: А – Микроскопические изображения клеток фибробластов после культивирования в течение 48 ч (А), 72 ч (Б); В – оценка жизнеспособности клеток; Г – активность супероксиддисмутазы (* $p < 0,05$ при сравнении с культурой без компонентов ТК, тест Крускала-Уоллиса)

Экспериментальный *in vivo* раздел экспериментального исследования включал два больших фрагмента. Первый был выполнен на лабораторных крысах, второй – на мини-пигах. У животных обоих видов формировали повреждение сосуда – участка брюшной аорты – путем нанесения проникающего продольного разреза с последующим его ушиванием. Во всех исследуемых группах в течение первых недель наблюдения не регистрировали экспериментальной летальности, что свидетельствовало об удовлетворительной герметичности сформированных сосудистых соединений как при применении классического шва сосуда, так и на фоне применения заселенного фибробластами крысы тканеинженерной конструкции (в экспериментах на крысах) и бесклеточной тканеинженерной конструкции (в экспериментах на мини-пигах).

Исследование прочности соединения, проведенное на 4 неделе послеоперационного

периода показало, что в исследуемой временной точке прочность шва значительно уступала прочности интактного сосуда (рисунок 5А). Последняя составляла в среднем $1,2 \pm 0,2$ МПа. Прочность узлового шва поврежденного сосуда на 4 неделе послеоперационного периода равнялась $0,42 \pm 0,05$ МПа ($p = 0,001$ при сравнении с интактной брюшной аортой). Прочность узлового шва с последующим закрытием тканеинженерной конструкцией на основе углеродных нанотрубок, заселенного фибробластами уступала прочности на разрыв стенке интактной артерии, и превышала прочность узлового соединения и составляла $0,89 \pm 0,04$ МПа ($p = 0,001$ при сравнении с интактной брюшной аортой; $p = 0,005$ при сравнении с узловым швом). К 8 недели наблюдения отмечали значительное увеличение прочности сосудистого соединения, что, вероятно, обусловлено завершением процесса морфологической целостности артериального проводника (Рисунок 5А).

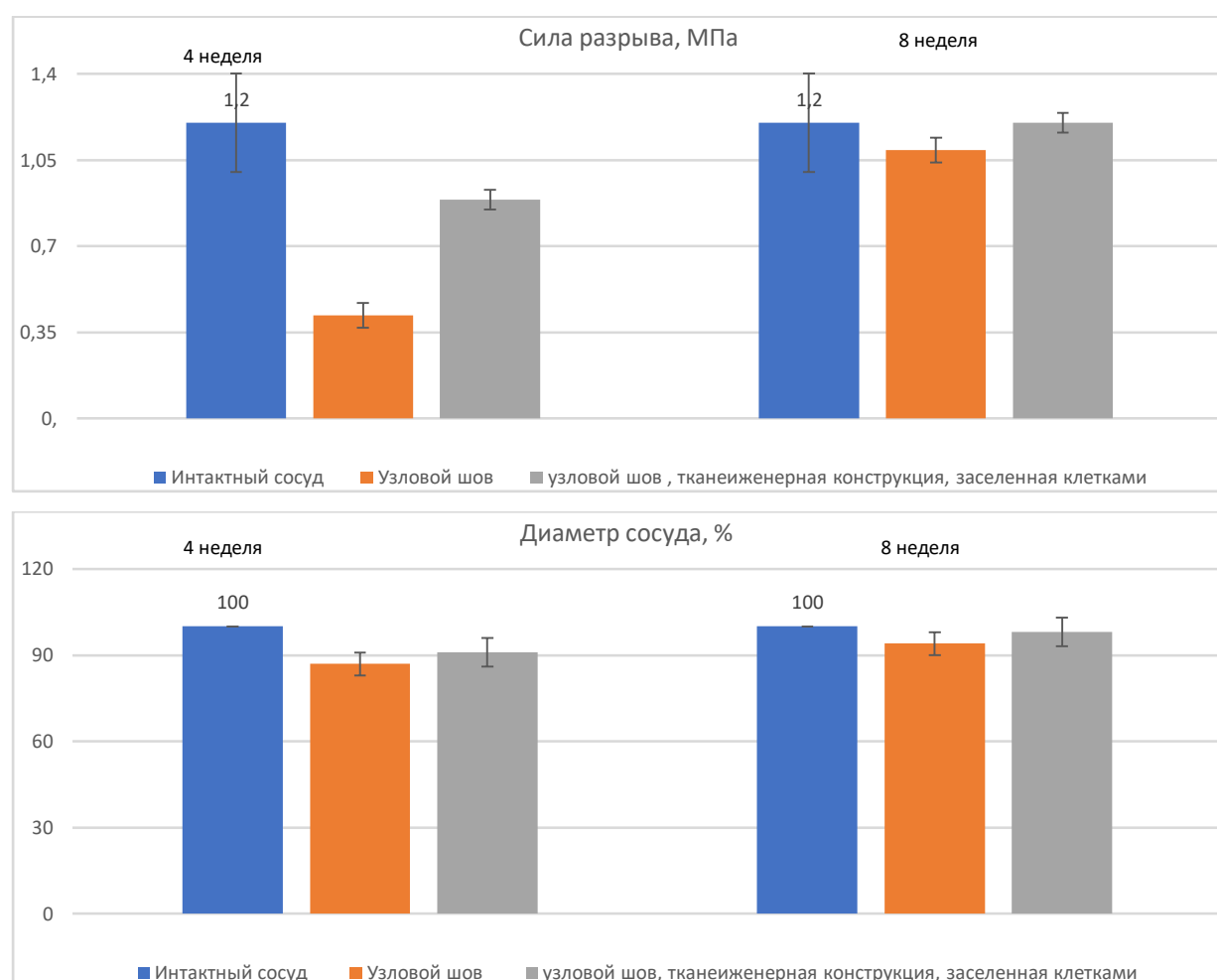


Рисунок 5 – А. Прочность на разрыв различных видов соединений между стенкой брюшной аорты крысы и тканеинженерной конструкцией, заселенным фибробластами: Б. Диаметр брюшной аорты крысы при различных методах сосудистого соединения: * $p < 0,05$ при сравнении с интактным сосудом (одномерный дисперсионный анализ, ANOVA, критерий Тьюки)

В области соединения продольного сосудистого дефекта с применением для укрепления заселенного фибробластами крысы тканеинженерной конструкции также регистрировали

сужение просвета артерии – до $84 \pm 5\%$ от диаметра неповрежденных отделов сосуда ($p < 0,05$ при сравнении с интактным сосудом). К восьмой неделе относительные значения артериального диаметра в обеих исследуемых группах животных (контрольной и экспериментальной) приходили к значениям, не отличающимся от интактных областей.

При оценке в динамике микроморфологической картины сосудистой стенки в месте ее соединения с помощью шва и заселенной клетками тканеинженерной конструкции отмечалась положительная динамика в области повреждения интимы брюшной аорты, эволюция воспалительной реакции от умеренной до полностью купированной, формирование неоинтимы с сохранением гиперплазии гладкомышечных клеток в стенке артериального сосуда. Экспрессия ИГХ маркеров клеточной пролиферации и дифференцировки Ki-67 и PCNA в эндотелии, особенно в неоинтимае и миофибробластах свидетельствуют об активации, а затем завершении пролиферации и дифференцировки гладкомышечных клеток (Рисунок 6 Б, В). Регистрировали активацию неоангиогенеза в интимае аорты (экспрессия фактора роста эндотелия сосудов – VEGF) (Рисунок 6Г). Клеточно-инженерная конструкция в области фиксации подвергалась почти полной резорбции, этот процесс был синхронизирован с дифференцировкой заселяющих его клеток и восстановлением структурно-функциональной целостности сосуда (Рисунок 6А).

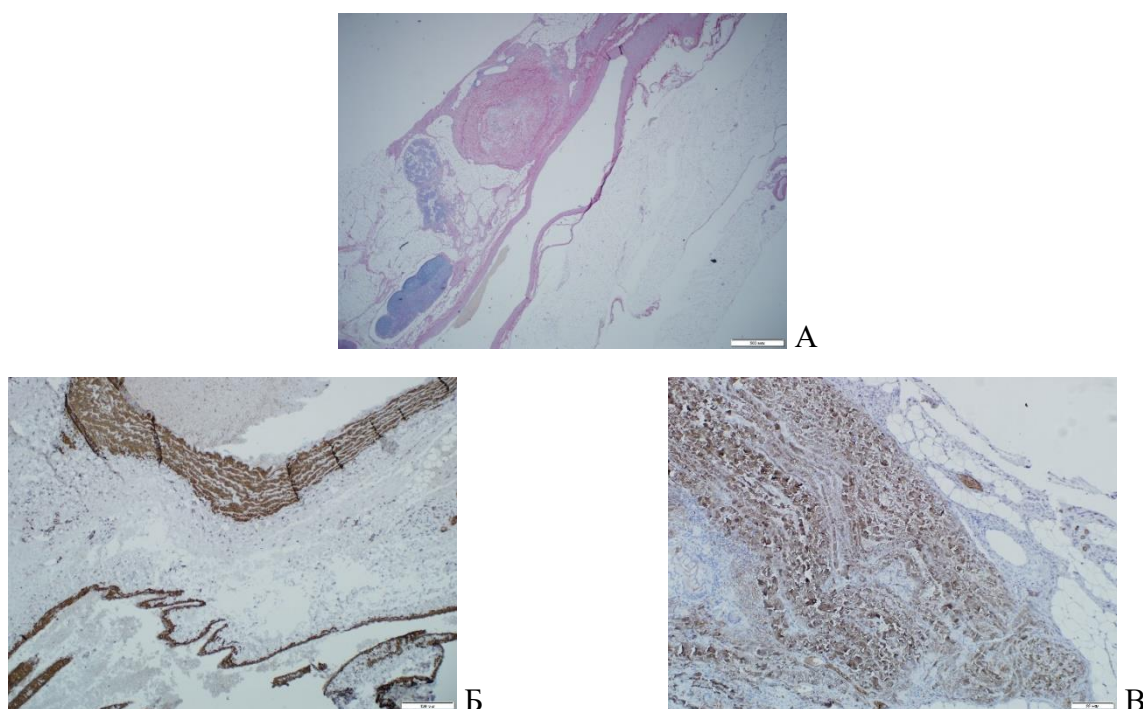


Рисунок 6 – Эффективность заселенного клетками скаффолда в коррекции повреждения аорты:
А – место фиксации скаффолда (гематоксилин и эозин, 100х); Б – экспрессия PCNA; В – экспрессия VEGF (ИГХ, 200х)

Эксперименты на минипигах показали аналогичные результаты, что свидетельствует о воспроизводимости технологии и отсутствии ее видоспецифичности с точки зрения природы и биологических свойств тканеинженерной конструкции. При оценке иммунологической реактивности крыс и мини-пига на компоненты тканеинженерной конструкции на основе углеродных нанотрубок и биоматрикса в реакции торможения миграции лейкоцитов, поставленной на 8 неделях послеоперационного периода зафиксировано полное отсутствие аутоиммунной реакции как на отдельные образцы скаффолда, так и на его элементы – 0,001% дисперсию углеродных нанотрубок, 25% раствор альбумина, 2% раствор хитозана сукцината.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием технологий получения первичных культур фибробластов крысы были получены клеточно-заселенные образцы тканеинженерных биodeградируемых конструкций. Тканеинженерная конструкция на основе углеродных нанотрубок в размельченном виде создает благоприятные условия для пролиферации и дифференцировки фибробластов крысы, обеспечивает оптимальные адгезивные свойства для формирования плотного клеточного слоя. Использование тканеинженерной конструкции, заселённой фибробластами на основе углеродных нанотрубок, приводит к герметичному, прочному и безопасному восстановлению целостности сосудистой стенки к 8 неделе послеоперационного периода. В основе установленных закономерностей лежит тканевой ответ на ангиопластику, выражающийся формированием воспалительной реакции. Асептическое воспаление сопровождается пролиферацией и дифференцировкой фибробластов, активацией конверсии собственных миофибробластов сосудов в гладкомышечные клетки, образованием неоинтимы, и разрешается к 8 неделе полным восстановлением структурной организации сосудистой стенки и резорбцией конструкции. На элементы тканеинженерной конструкции не формируется местных и системных иммунных реакций. Применение инновационной технологии лазерного соединения стенки брюшной аорты минипига с использованием биологического состава на основе водной дисперсии 25 масс. % альбумина, 0,001 масс.% индоцианина зеленого и 0,1 – 0,001 масс. % одностенных углеродных нанотрубок и тканеинженерной конструкции, обеспечивает формирование герметичного соединения, несколько уступающего по прочности узловому шву; при этом тканеинженерная конструкция при ее муфтообразной фиксации в опытах на минипигах *in vivo* обеспечивает оптимальные условия герметизации лазерного шва сосудистой стенки.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Установленные оптимальные условия получения, заселения тканеинженерной конструкции на основе углеродных нанотрубок фибробластами, показатели сохранения

жизнеспособности и трансплантационной пригодности клеточной тканеинженерной конструкции, могут в последующем быть использованы в реконструктивной хирургии.

2. При реконструктивном хирургическом вмешательстве на артериальном кровеносном сосуде безопасное и герметичное восстановление целостности сосудистой стенки может достигаться применением технологии лазерного излучения с использованием биосостава на основе водной дисперсии 25 масс. % альбумина, 0,001 масс.% индоцианина зеленого и 0,1 – 0,001 масс. % одностенных углеродных нанотрубок.

3. Полученные результаты о безопасности применения заселенного фибробластами тканеинженерной конструкции на основе углеродных нанотрубок и биоматрикса для стабилизации лазерного соединения сосудистой стенки могут быть использованы в дальнейших доклинических исследованиях реконструктивно-хирургических технологий шва сосудов, кожи и полых органов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Разработанная в рамках настоящего диссертационного проекта тема обладает несомненным потенциалом для дальнейшего развития. Оно видится в трех главных направлениях. Первое – сопряжено с дальнейшим проведением исследований в области клеточной биологии элементов, использующихся при изготовлении тканеинженерных конструкций. Чрезвычайно важно в этой связи установить закономерности и наметить пути решения вопроса синхронизации клеточной дифференцировки и созревания тканей и резорбции конструкции, выполняющего каркасную функцию без потери функциональных характеристик биоматериала. Второе направление обусловлено необходимостью поиска новых стратегий направленной фенотипической трансформации применяемых клеток с тем, чтобы обеспечить оптимальный процесс восстановления целостности / функциональности замещаемых тканей. И, наконец, третье направление развития исследований связано с клиническим применением изученной лазерной технологии в хирургии.

ВЫВОДЫ

1. Инкубация фибробластов крысы в присутствии тканеинженерной конструкции на основе углеродных нанотрубок и ее отдельных компонентов не оказывает цитотоксического действия и не подавляет пролиферативный потенциал клеток, в концентрациях в диапазоне 0,01 – 10,0 мг/мл не повышает активность супероксиддисмутазы внутри клеток, следовательно не активирует внутриклеточные свободнорадикальные процессы.

2. Флуоресцентная микроскопия клеток на поверхности тканеинженерной конструкции на основе углеродных нанотрубок подтвердила наличие благоприятных условий для адгезии

фибробластов на поверхности конструкции, формирование равномерного клеточного слоя с плотными межклеточными контактами и высоким потенциалом сохранения жизнеспособности клеток в течение 96 часов инкубации.

3. В экспериментах на лабораторных крысах показано, что имплантацией заселенного фибробластами тканеинженерной конструкции на основе углеродных нанотрубок обеспечивает безопасное, герметичное и прочное соединение линейной проникающей раны брюшной аорты лабораторной крысы, не сопровождается формированием тромбгеморрагических, окклюзионных или аневризматических осложнений на протяжении 8 недель послеоперационного периода.

4. В основе закономерностей восстановления сосудистой стенки лежит тканевой ответ на ангиопластику, выражающийся формированием воспалительной реакции. Асептическое воспаление сопровождается пролиферацией и дифференцировкой фибробластов в миофибробласты и гладкомышечные клетки, образованием неointимы, и разрешается к 8 неделе полным восстановлением структурной организации сосудистой стенки и резорбцией тканеинженерной конструкции. На элементы заселенного аутологичными клетками тканеинженерной конструкции та формируется слабая местная воспалительная реакция.

5. В условиях *in vivo* лазерное соединение стенки брюшной аорты минипига с использованием биологического состава на основе водной дисперсии 25 масс. % альбумина, 0,001 масс.% индоцианина зеленого и 0,1 – 0,001 масс. % одностенных углеродных нанотрубок и тканеинженерной конструкции в сравнении с узловым швом в эксперименте, обеспечивает формирование соединения, несколько уступающего по прочности узловому шву.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Оценка эффективности тканеинженерных конструкций при ишемическом повреждении сердца в эксперименте / Блинова Е.В., Герасименко А.Ю., **Соколов А.И.**, Шматок Д.О., Николаев А.В., Галицкий Е.В., Коган Е.А., Кытько О.В., Миронцев А.В. // **Оперативная хирургия и топографическая анатомия (Пироговский научный журнал)**. 2021. Т.5. №2. С.12-18
2. Применение клеточно-инженерных конструкций в хирургическом лечении повреждений артерий крупного диаметра в эксперименте / Дракина О.В., **Соколов А.И.**, Шматок Д.О., Блинова Е.В., Истранов А.Л., Герасименко А.Ю.// **Вестник новых медицинских технологий**. 2022. Т.2. С. 23-29
3. Биологическая совместимость и пролиферативный потенциал фибробластов, заселенных на биокompозит, сформированный с использованием лазерного излучения и припоев Рябкин Д.И.,

Соколов А.И., Дыдыкин С.С., Блинов Д.С., Курилова У.Е., Блинова Е.В., Тимошкин С.П., Герасименко А.Ю. // **Acta Medica Eurasica.** 2023. № 1. С. 93-100.

4. Экспериментальное обоснование применения клеточно-инженерных конструкций в хирургическом лечении повреждений артерий крупного диаметра / Соколов А.И., Блинова Е.В., Шматок Д.О., Дракина О.В., Герасименко А.Ю., Черепанова А.Е., Байдин С.П., Фельдман А.О., Мальмина А.И., Лиждиева Э.А. // В сборнике: Современные лечебно-диагностические технологии в хирургии и интенсивной II межрегиональная научно-практическая конференция, посвященная памяти С.В. Каткова. Саранск, 2022. С. 148-152.

5. «Сам сломал - сам почини», или успешное применение стент-графта для лечения перфорации коронарной артерии / **А.И. Соколов** // Кардиологический вестник. 2022. Т. 17. спец. вып. №3. С. 98-100.

6. «Снежный ком», или успешная реканализация коронарной артерии при ОКС с большими техническими трудностями / **А.И. Соколов** // Кардиологический вестник. 2022. Т. 17. спец. вып. №3 С. 100-102

7. «Помощь другу», или успешное извлечение инородного тела из легочной артерии **А.И. Соколов** // Кардиологический вестник. 2022. Т. 17. спец. вып. №3. С. 96-98.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДАБ – 3,3-диаминобензидин

ИВЛ – искусственная вентиляция легких

ИГХ – иммуногистохимия

МТТ-тест – тест с трифенилтетразолием бромидом

СОД – супероксиддисмутаза

ТК – тканеинженерные конструкции

УНТ – углеродная нанотрубка

УОНТ – углеродные однослойные нанотрубки