

# БИОСОВМЕСТИМЫЕ СИНТЕТИЧЕСКИЕ МАТРИКСЫ ТРАХЕИ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРНЫХ УЛЬТРАВЛОКНИСТЫХ МАТЕРИАЛОВ, КОЛОНИЗИРОВАННЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ

DOI: 10.17691/stm2016.8.1.01

УДК 678.01:616.23:576.3/.7

Поступила 25.08.2015 г.



**М.В. Киселевский**, д.м.н., профессор, зав. лабораторией клеточного иммунитета<sup>1</sup>;  
**Н.Ю. Анисимова**, д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета<sup>1</sup>;  
**Е.А. Корнюшенков**, к.б.н., зав. отделением экспериментальной терапии<sup>1</sup>;  
**А.Д. Шепелев**, к.х.н., инженер-исследователь лаборатории биосовместимых матриц<sup>2</sup>;  
**С.Н. Чвалун**, д.х.н., профессор, начальник отдела полимерных материалов<sup>2</sup>;  
**Б.Е. Полоцкий**, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник торакоабдоминального отделения<sup>1</sup>;  
**М.И. Давыдов**, д.м.н., профессор, академик РАН, директор<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина, Москва, 115478, Каширское шоссе, 24;

<sup>2</sup>Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, 123182, пл. Академика Курчатова, 1

**Цель исследования** — оценка биосовместимости и биodeградации синтетических матриц трахеи на основе ультраволокнистых полимерных материалов, заселенных мезенхимальными мультипотентными стромальными клетками (ММСК) реципиентов.

**Материалы и методы.** Исследование выполнено на собаках породы бигль, которым проводилась гетеротопная имплантация синтетических матриц трахеи, полученных из нетканого материала методом электроспиннинга и колонизированных ММСК реципиентов. Биосовместимость имплантатов оценивали методом компьютерной томографии и по данным анализа макро- и микроструктуры извлеченного имплантата и прилегающих тканей.

**Результаты.** Установлено, что разработанные образцы матриц трахеи при гетеротопной имплантации собакам сохраняли целостность, не вызывали местных и системных реакций отторжения, обеспечивали колонизацию клетками реципиента и не обладали общетоксическим эффектом. На основании полученных данных сделано заключение о биосовместимости матриц трахеи на основе полимерных ультраволокнистых материалов и перспективности их использования в качестве биоимплантатов для замещения дефектов трахеи.

**Ключевые слова:** матрикс трахеи; гетеротопная имплантация; биосовместимость; мезенхимальные мультипотентные клетки.

**Как цитировать:** Kiselevskiy M.V., Anisimova N.Y., Kornushenkov E.A., Shepelev A.D., Chvalun S.N., Polotskiy B.E., Davydov M.I. Biocompatible synthetic tracheal matrices based on polymer ultra-fibrous materials colonized by mesenchymal multipotent cells. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2016; 8(1): 6–13, <http://dx.doi.org/10.17691/stm2016.8.1.01>.

## English

## Biocompatible Synthetic Tracheal Matrices Based on Polymer Ultra-Fibrous Materials Colonized by Mesenchymal Multipotent Cells

**M.V. Kiselevskiy**, MD, DSc, Professor, Head of Cell Immunity Laboratory<sup>1</sup>;  
**N.Y. Anisimova**, MD, DSc, Leading Researcher, Cell Immunity Laboratory<sup>1</sup>;

Для контактов: Киселевский Михаил Валентинович, e-mail: kisele@inbox.ru

**E.A. Kornushenkov**, PhD, Head of the Department of Experimental Therapy<sup>1</sup>;  
**A.D. Shepelev**, PhD, Engineer-Researcher, Laboratory of Biocompatible Matrices<sup>2</sup>;  
**S.N. Chvalun**, DSc, Professor, Head of the Department of Polymer Materials<sup>2</sup>;  
**B.E. Polotskiy**, MD, DSc, Professor, Leading Researcher, Thoracoabdominal Department<sup>1</sup>;  
**M.I. Davydov**, MD, DSc, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director<sup>1</sup>

<sup>1</sup>N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russian Federation;

<sup>2</sup>National Research Center "Kurchatov Institute", 1 Academic Kurchatov Square, Moscow, 123182, Russian Federation

**The aim of the investigation** is to study biocompatibility and biodegradation of synthetic tracheal matrices based on ultra-fibrous polymer materials, colonized by mesenchymal multipotent stromal cells (MMSC) of recipient.

**Materials and Methods.** The study was performed on beagle dogs, which underwent heterotopic implantation of synthetic tracheal scaffolds made of a nonwoven material by electrospinning and colonized by the recipient MMSC. Implant biocompatibility was assessed by computed tomography and macro- and microstructure analysis of the extracted implant and adjacent tissues.

**Results.** It was established that the developed trachea matrix specimens implanted heterotopically to the dogs preserved biocompatibility, ensured colonization by recipient cells, did not cause local and systemic reactions of rejection, and had no general toxic effect. According to the data obtained there was made a conclusion on the biocompatibility of tracheal matrices made of the polymer ultra-fibrous materials and their prospective applications as bioimplants for trachea defect replacements.

**Key words:** tracheal matrix; heterotopic implantation; biocompatibility; mesenchymal multipotent cells.

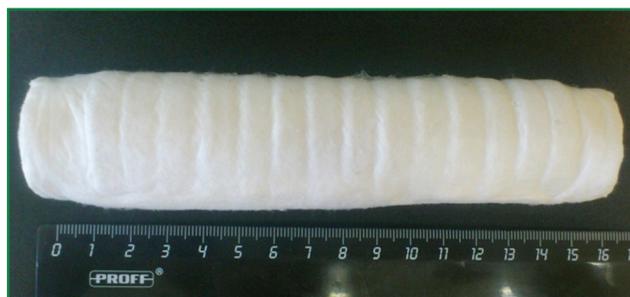
Поражения трахеи, возникающие вследствие злокачественных новообразований, травм и врожденных аномалий, часто требуют ее резекции. При этом формирование первичного анастомоза «конец-в-конец» возможно менее чем у 50% пациентов с данной патологией [1–3]. В остальных случаях для замещения значительных дефектов трахеи требуется использование имплантатов. В настоящее время отсутствуют применяемые в клинической практике протезы, соответствующие по своим биологическим, конфигуративным и механическим свойствам нативной трахее. Наиболее перспективным направлением для создания биоимплантатов трахеи считается использование тканеинженерных подходов [1–6]. Первая успешная трансплантация биоинженерной конструкции, созданной из децеллюляризированной донорской трахеи, заселенной клетками реципиента, была выполнена пациентке с терминальной стадией бронхомаляции в 2008 г. [7]. Поскольку использование донорской трахеи имеет ряд ограничений, а процедура децеллюляризации может приводить к нарушению механических свойств имплантата и достаточно трудоемка, в последние годы для этих целей используют различные синтетические матриксы на основе нанокомпозитных или ультраволокнистых материалов, способных заселяться мезенхимальными мультипотентными стромальными клетками (ММСК) костного мозга [3, 8–10]. Несмотря на несомненный прогресс в данной области, пока не удалось создать конструкцию, сочетающую в себе оптимальные механические свойства, химическую стабильность и структуру, обеспечивающую колонизацию клетками реципиента и межклеточные взаимодействия. Поэтому актуальны дальнейшие исследования, которые направлены на создание гибридных синтетических и природных матриксов, сочетающих оптимальные механические свойства и стабильность с биосовместимостью.

**Цель исследования** — оценка биосовместимости, биodeградации и способности к колонизации клетками реципиента синтетических матриксов трахеи на основе ультраволокнистых полимерных материалов.

**Материалы и методы.** Синтетические матриксы трахеи для исследований на собаках были получены из нетканого материала методом электроспиннинга на оригинальной опытной одноканальной установке для электроспиннинга. В качестве полимера для нетканого материала использовали фторопласт 42В (сополимер тетрафторэтилена с винилиденфторидом) (ОАО «ХимКомбинат», Россия). Кольца, армирующие нетканый полимерный материал, получали методом термопрессования, в качестве исходного материала использовали полиуретан марки Elastollan 1195 A (Elastogran, Германия) (рис. 1).

Оценка механических свойств образцов проведена с помощью универсальной испытательной машины Instron 5965 (Instron, США) с компьютерной системой анализа данных в рабочем режиме.

Исследования выполнены на 6 собаках породы бигль (1 самка и 5 самцов) возрастом  $4,0 \pm 1,2$  года, со-



**Рис. 1.** Образец матрикса трахеи на основе полимерных ультраволокнистых материалов для экспериментов на собаках

державшихся в условиях вивария и отделения экспериментальной терапии РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Все манипуляции с лабораторными животными выполнены в соответствии с Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных, изложенными в Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.), требованиями Хельсинкской декларации (принятой в июне 1964 г. (Хельсинки, Финляндия) и пересмотренной в октябре 2000 г. (Эдинбург, Шотландия)) и Всемирной медицинской ассоциации (2000).

Для улучшения биосовместимости и ускорения интеграции матрикса трахеи заселяли ММСК собак-реципиентов. ММСК генерировали из клеток костного мозга, полученных в результате стерильной пункции. Клетки костного мозга помещали в культуральные стерильные флаконы с питательной средой RPMI 1640 («ПанЭко», Россия), содержащей 10% эмбриональной фетальной сыворотки («ПанЭко», Россия). Проводили два пассажа, удаляя неадгезивные клетки. Анализ культуры ММСК осуществляли с использованием инвертоскопа Axiovert 40 (Carl Zeiss, Германия) в просвечивающем или фазово-контрастном режиме. Гистологическое исследование выполняли по стандартной методике, срезы окрашивали гематоксилин-эозином («ПанЭко», Россия), препараты просматривали и фотографировали с использованием светового микроскопа Axioplan 2 (Carl Zeiss, Германия). Уровень экспрессии поверхностных маркеров ММСК определяли методом проточной цитометрии на цитофлюориметре BD FACS Canto II (Becton Dickinson, США) с помощью антител CD45, CD90, CD105, конъюгированных с флуорохромами (Becton Dickinson, США).

Заселение стерильных матриксов осуществляли посредством их инкубации со взвесью ММСК в питательной среде при 37°C и 4,5% CO<sub>2</sub> в течение 7 сут, периодически встряхивая культуральный флакон. Контроль колонизации матрикса ММСК выполняли посредством снятия отпечатков с поверхности фрагментов имплантата на предметное стекло, покрытое полилизимом (Thermo Scientific, США), и последующего окрашивания по Романовскому–Гимзе [11].

Гетеротопная имплантация матриксов трахеи, заселенных аутологичными ММСК, *ex vivo* проведена 6 собакам породы бигль: матриксы имплантировали в межмышечное пространство бедренной складки. С этой целью у собак формировали межмышечный карман, в который помещали образец матрикса, а затем послойно сшивали края раны с наложением прерывистых хирургических швов и финишной обработкой внешнего шва и окружающего участка кожи антисептиками. Операции проводили под общей анестезией с соблюдением требований асептики и антисептики в условиях операционного блока отделения экспериментальной терапии РОНЦ им. Н.Н. Блохина.

Наблюдение за животными осуществляли в течение 1 мес. В этот период проводили ежедневный визуаль-

ный осмотр области операции, выполняли регулярный анализ гематологических показателей с использованием анализатора (ProCyt Dx, Нидерланды), специально откалиброванного для исследования крови собак. Собак-реципиентов исследовали на компьютерном томографе SOMATOM Sensation 64 (Siemens, Германия). Послойный анализ осуществляли в различных плоскостях пояснично-крестцовой области с захватом области мечевидного отростка грудины. Через 30–35 сут после имплантации образцов матрикса их изымали под общей анестезией для микроскопического и гистологического исследования.

Для установления степени значимости выявленных изменений был проведен анализ множества связанных индивидуализированных выборок с использованием критерия Фридмана, модуля «Непараметрическая статистика» программы Statistica 6.0 (StatSoft). Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Образцы синтетических матриксов трахеи имели трубчатую форму и по своим размерным характеристикам и механическим свойствам существенно не отличались от нативной трахеи собак. Различия не превышали 30% (табл. 1, 2).

Перед имплантацией животным стерильные матриксы колонизировали *ex vivo* ММСК, полученными из клеток костного мозга реципиентов посредством кокультивирования в питательных средах. Целевые клетки были представлены преимущественно крупными клетками полигональной или веретенновидной формы с длинными отростками, контактирующими между собой. Ядра клеток — умеренно оксифильные, округлой или овальной формы с центрально расположенными ядрышками. Вся площадь дна флакона была покрыта относительно равномерным конфлюэнтным клеточным монослоем (рис. 2). Анализ иммунофенотипа клеток 2-го пассажа позволил установить, что субпопуляция CD45<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup>-клеток составляла не менее 65%.

Проведенные морфологические исследования и оценка иммунофенотипа полученных клеток позволили характеризовать их как ММСК.

Анализ отпечатков с поверхностей матриксов позволил охарактеризовать обнаруженные ММСК: они отличаются увеличенными ядрами и формируют очаги колониеобразования, что указывает на сохранение пролиферативного потенциала ММСК в матриксе трахеи (рис. 3).

Заселенные ММСК матриксы трахеи гетеротопно

Таблица 1  
Средние значения размерных характеристик нативной трахеи собак и матриксов, мм

Параметры	Нативная трахея	Матрикс
Ширина полукольца	4,0±0,3	4,0±0,2
Длина полукольца	64,0±2,3	63,0±1,1
Толщина полукольца	2,0±0,3	2,0±0,1
Диаметр	23,0±9,0	26,0±5,0

Таблица 2

Упругость фрагментов матрикса, армированного полукольцами на основе полиуретана, и нативной трахеи

Параметры статистического анализа	Множественное сжатие — показатель падения развиваемой нагрузки, %		Однократное сжатие — показатель кольцевой жесткости, кПа	
	Матрикс	Нативная трахея	Матрикс	Нативная трахея
Медиана	8,2	7,0	43,4	37,2
Минимум	7,6	6,3	38,2	32,2
Максимум	8,6	8,2	47,2	41,0
25-й квартиль	7,8	6,3	39,2	32,2
75-й квартиль	8,6	8,2	44,0	41,0
Сравнение с нативной трахеей, min–max, %	6–20		4–28	

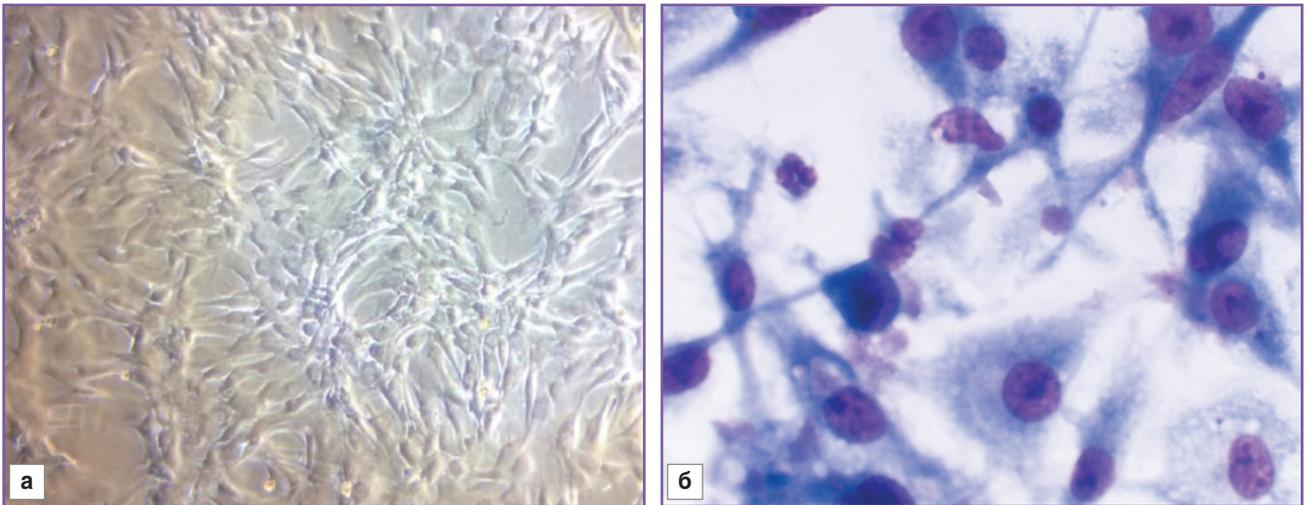


Рис. 2. Морфология ММСК собак в культуре: а — живая культура,  $\times 200$ ; б — окраска клеток по Романовскому–Гимзе,  $\times 900$

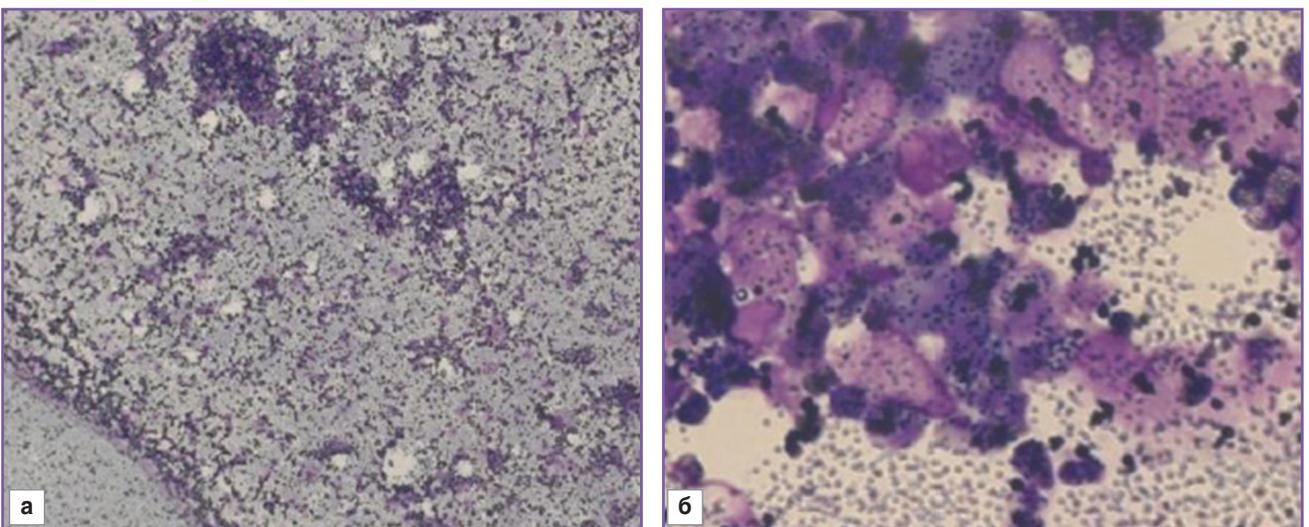
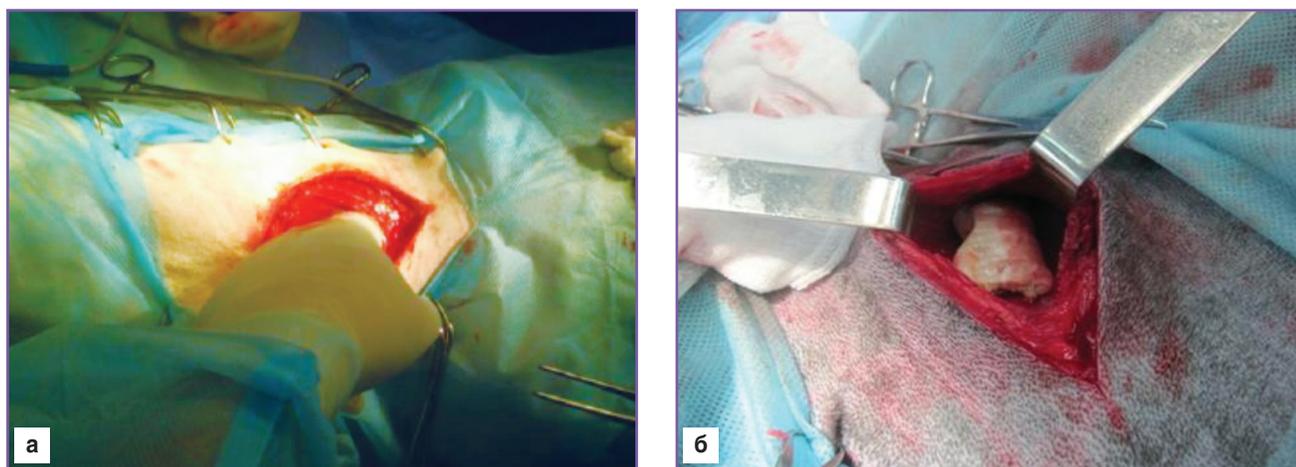


Рис. 3. Клеточный состав поверхности матрикса: а —  $\times 200$ ; б —  $\times 900$ . Окраска клеток по Романовскому–Гимзе



**Рис. 4.** Основные этапы гетеротопной трансплантации собаке образцов матрикса, нагруженных ММСК: а — формирование межмышечного кармана; б — имплантированный образец матрикса трахеи

Таблица 3

**Статистический анализ динамики гематологических показателей собак после гетеротопной трансплантации образцов матрикса трахеи, нагруженных аутологичными ММСК**

Показатели крови	Статистический показатель	До операции	После операции		p (тест Фридмана)
			через 2 нед	через 4 нед	
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	Me	6,2	6,6	7,0	0,441
	min	5,7	6,0	5,9	
	max	8,1	8,0	8,1	
Гемоглобин, г/дл	Me	14,7	14,6	15,9	0,052
	min	13,1	11,7	13,8	
	max	16,4	16,0	17,7	
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	Me	9,5	10,2	11,2	0,097
	min	8,5	9,8	9,4	
	max	9,9	15,4	14,5	
Нейтрофилы, %	Me	69,3	76,7	72,0	0,716
	min	66,3	64,2	64,8	
	max	71,5	79,8	77,3	
Лимфоциты, %	Me	27,6	21,5	24,6	0,717
	min	26,3	16,1	21,6	
	max	31,5	34,6	32,1	
Моноциты, %	Me	0,2	0,2	0,1	0,368
	min	0,1	0,1	0,1	
	max	0,2	0,2	0,2	
Эозинофилы, %	Me	2,0	1,5	3,0	0,497
	min	2,0	1,0	1,0	
	max	4,0	4,0	3,0	
Базофилы, %	Me	0	0,1	0,1	0,135
	min	0	0	0	
	max	0,1	0,2	0,3	

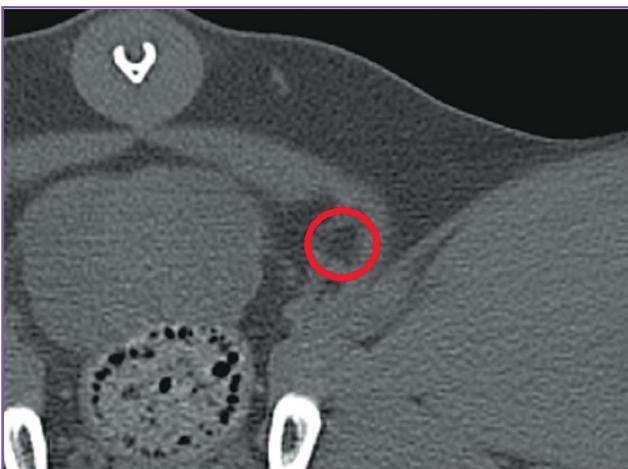
имплантировали собакам в сформированный межмышечный карман в паховой области (рис. 4).

После гетеротопной имплантации экспериментальных образцов с целью контроля за возможным развитием системной реакции отторжения имплантата или воспаления периодически проводили клинический анализ крови собак. Оценивали лейкоцитарную формулу и абсолютное содержание лейкоцитов, поскольку изменение именно этих гематологических показателей прямо коррелирует с развитием каскада клеточных реакций, реализующих отторжение трансплантата [12, 13]. Полученные данные показали, что в течение месяца после имплантации гематологические показатели у животных-реципиентов колебались в пределах физиологической нормы (табл. 3). В частности, у собак не наблюдали лейкоцитоза, моно- или нейтрофилизу, что свидетельствует об отсутствии признаков системной реакции отторжения.

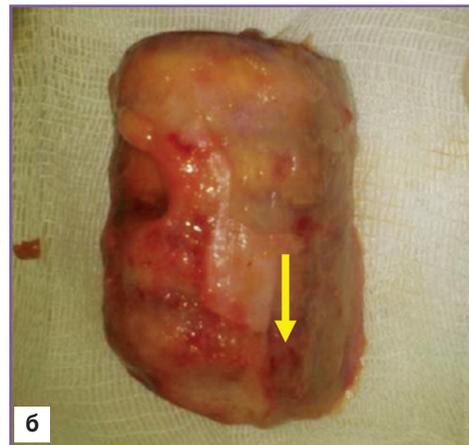
Через 20–25 сут после операции животным под общей анестезией проводили процедуру КТ. Полученные данные позволяют заключить, что экспериментальные образцы в организме животного не потеряли таких важнейших признаков функциональности, как сохранение каркасности матрикса, обеспечивающего внутренний просвет в форме, близкой к окружающей, а также физическую целостность (рис. 5).

При визуальном осмотре области имплантации в течение всего периода наблюдения не выявлено местных реакций отторжения: отека, нагноения, покраснения, появления свищей, массивного разрастания фиброзной ткани в области имплантации (рис. 6, а).

Извлеченный из паховой складки через 1 мес после имплантации матрикс трахеи сохранил форму, а также каркасные свойства и был покрыт интимно связанной с тканью матрикса соединительнотканной капсулой (рис. 6, б). Морфологическое обследование окружающей ткани в области имплантации не выяви-



**Рис. 5.** Данные КТ матрикса трахеи на основе ультраволокнистого фторопласта на 25-й день после гетеротопной трансплантации собаке (краниокаудальная проекция)

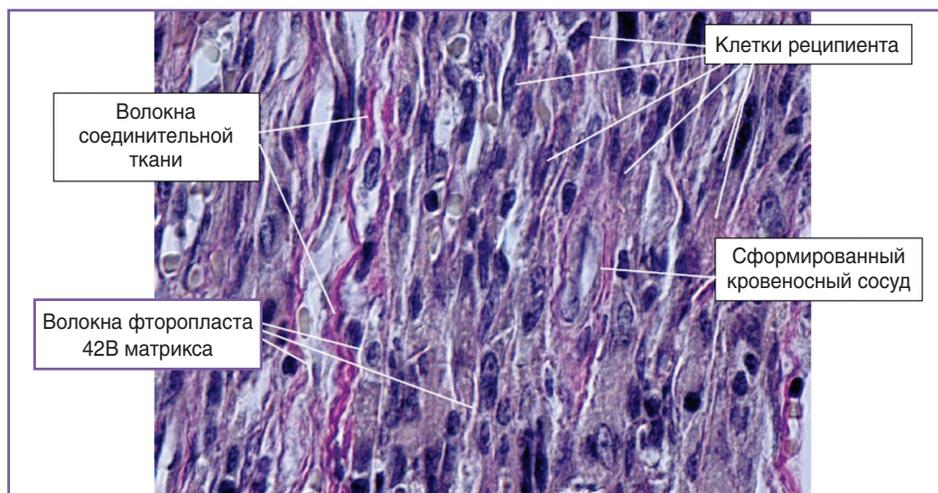


**Рис. 6.** Синтетический матрикс трахеи, колонизированный ММСК, через 35 сут после гетеротопной трансплантации: а — паховая область собаки-реципиента через 35 сут после трансплантации образца матрикса; б — общий вид синтетического матрикса трахеи после извлечения из тканей организма реципиента. Стрелкой отмечена соединительнотканная капсула, покрывающая матрикс трахеи

ло воспалительного экссудата. Не обнаружено признаков воспалительной лейкоцитарной инфильтрации, которая в случае развития острого отторжения формирует «клеточный вал отторжения», реализуя клеточную деструкцию чужеродного имплантата [13].

В извлеченном матриксе трахеи наряду с сохранением ультраволокнистой структуры обнаружена мощная колонизация клетками реципиента, с формированием сосудов и соединительнотканых волокон, распространяющаяся с поверхности в глубь имплантата (рис. 7). Данные КТ и макро-, микроморфологического исследования свидетельствуют о сохранении формы, каркасности и составных элементов (неразрушенные волокна фторопласта и полиуретановые полукольца) синтетических матриксов и об отсутствии признаков биodeградации испытанных экспериментальных образцов.

**Заключение.** Исследование образцов синтетических матриксов трахеи на основе полимерных ультра-



**Рис. 7.** Активная колонизация волокон слоя нетканого матрикса трахеи клетками реципиента

траволокнистых материалов, колонизированных мезенхимальными мультипотентными стромальными клетками, свидетельствует о сохранении физических свойств (размер, конструкционные особенности, целостность), функциональных характеристик (каркадность, прочность, упругость), исходной структуры (упорядоченные волокна основы матрикса, армированные полукольцами) и отсутствии местных и системных признаков отторжения при гетеротопной имплантации их в течение 1 мес. Образцы матриксов сохраняли также целостность и просвет, обеспечивали колонизацию их клетками реципиента, не обладали общетоксическим эффектом и не подвергались биодеградации под воздействием внутренней среды организма. Эти данные позволяют сделать вывод об оптимальной биосовместимости разработанных матриксов и перспективности их использования в качестве биоимплантатов для замещения дефектов трахеи.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (Соглашение №14.604.21.0023 от 17.06.2014 г. о предоставлении субсидии, уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEFI60414X0023).

**Конфликт интересов.** У авторов нет конфликта интересов.

#### Литература/References

1. Киселевский М.В., Ситдикова С.М., Тенчурин Т.Х., Хомченко А.Ю. Современные подходы и перспективы создания биоимплантата трахеи. *Российский биотерапевтический журнал* 2014; 13(3): 127–131. Kiselevsky M.V., Sitdikova S.M., Tenchurin T.Kh., Khomchenko A.U. Contemporary approaches and perspectives to creation of tracheal bioimplants. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* 2014; 13(3): 127–131.
2. Киселевский М.В., Ситдикова С.М., Анисимова Н.Ю., Полоцкий Б.Е., Давыдов М.И. Перспективные синтетические матриксы для реконструкции дефектов трахеи у онко-

логических больных. *Вопросы онкологии* 2015; 61(3): 323–328. Kiselevsky M.K., Sitdikova S.M., Anisimova N.Yu., Polotsky B.E., Davidov M.I. Prospective synthetic matrixes for the reconstruction of defects of the trachea in patients with cancer. *Voprosy onkologii* 2015; 61(3): 323–328.

3. Del Gaudio C., Baiguera S., Ajallouiean F., Bianco A., Macchiarini P. Are synthetic scaffolds suitable for the development of clinical tissue-engineered tubular organs? *J Biomed Mater Res A* 2014; 102(7): 2427–2447, <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.34883>.

4. Киселевский М.В., Анисимова Н.Ю., Лебединская О.В., Полоцкий Б.Е., Давыдов М.И. Гетеротопная трансплантация неиммуногенной трахеи, заселенной костномозговыми стромальными стволовыми клетками реципиента. *Морфология* 2012; 141(1): 66–70. Kiselevskiy M.V., Anisimova N.Yu., Lebedinskaya O.V., Polotskiy B.Ye., Davydov M.I. Heterotopic transplantation of non-immunogenic trachea populated with recipient bone marrow stromal cells. *Morfologiya* 2012; 141(1): 66–70.

5. Копылов А.Н., Анисимова Н.Ю., Тенчурин Т.Х., Григорьев Т.Е., Хоменко А.Ю., Киселевский М.В. Перспективные материалы для создания матрикса имплантата трахеи. *Российский биотерапевтический журнал* 2014; 13(2): 67–71. Kopylov A.N., Anisimova N.Yu., Tenchurin T.Kh., Grigoriev T.E., Khomenko A.U., Kiselevsky M.V. Advanced materials to create a matrix of the trachea implantat. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* 2014; 13(2): 67–71.

6. da Silva T.H., Pazetti R., Aoki F.G., Cardoso P.F., Valenga M.H., Deffune E., Evaristo T., Pêgo-Fernandes P.M., Moriya H.T. Assessment of the mechanics of a tissue-engineered rat trachea in an image-processing environment. *Clinics* 2014; 69(7): 500–503, [http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2014\(07\)11](http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2014(07)11).

7. Macchiarini P., Jungebluth P., Go T., Asnaghi M.A., Rees L.E., Cogan T.A., Dodson A., Martorell J., Bellini S., Parnigotto P.P., Dickinson S.C., Hollander A.P., Mantero S., Conconi M.T., Birchall M.A. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 2008; 372(9655): 2023–2030, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61598-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61598-6).

8. Crowley C., Birchall M., Seifalian A.M. Trachea transplantation: from laboratory to patient. *J Tissue Eng*

*Regen Med* 2015; 9(4): 357–367, <http://dx.doi.org/10.1002/term.1847>.

9. Omori K., Tada Y., Suzuki T., Nomoto Y., Matsuzuka T., Kobayashi K., Nakamura T., Kanemaru S., Yamashita M., Asato R. Clinical application of in situ tissue engineering using a scaffolding technique for reconstruction of the larynx and trachea. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2008; 117(9): 673–678, <http://dx.doi.org/10.1177/000348940811700908>.

10. Ajalloueiian F., Lim M.L., Lemon G., Haag J.C., Gustafsson Y., Sjöqvist S., Beltrán-Rodríguez A., Del Gaudio C., Baiguera S., Bianco A., Jungebluth P., Macchiarini P. Biomechanical and biocompatibility characteristics of electrospun

polymeric tracheal scaffolds. *Biomaterials* 2014; 35(20): 5307–5315, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.03.015>.

11. Колоколов Р.Г., Герасина Е.В., Ананьев О.Л. и др. Анализ. Полный справочник. М: Эксмо; 2007; 786 с. Kolokolov R.G., Gerasina E.V., Anan'ev O.L. *Polnyy spravochnik* [Assays. Full directory]. Moscow: Eksmo; 2007; 786 p.

12. Bastl C.P., Hendler E.D., Finkelstein F.O. Leukocyte responses to acute renal transplant rejection. *Clin Nephrol* 1975; 4(6): 228–233.

13. de Fijter J.W. The impact of age on rejection in kidney transplantation. *Drugs Aging* 2005; 22(5): 433–449, <http://dx.doi.org/10.2165/00002512-200522050-00007>.