

УДК 616.12-089,616.126

Оценка эффективности децеллюляризации ткани (на примере овечьего митрального клапана)

П.П. Яблонский^{1,2}, С. Чеботарь², И. Тудорахе², О.Н. Резник³, А. Хаверих²

¹ Санкт-Петербургский государственный университет

² Медицинский университет Ганновера

³ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Tissue decellularization quality control in ovine mitral valve model

P.P. Iablonskii^{1,2}, S. Cebotari², I. Tudorache², O.N. Reznik³, A. Haverich²

¹ St. Petersburg State University

² Medical University of Hannover

³ Pavlov First St. Petersburg State Medical University

© Коллектив авторов, 2016 г.

Резюме

Тканевая инженерия в последние годы стала одним из основных разделов медико-биологической науки, и количество исследований в этой области растет постоянно. Децеллюляризация является одним из способов получения тканевых матриц — одного из основных материалов для последующего создания новой ткани. В настоящий момент не существует единого стандарта оценки качества децеллюляризации, что усложняет работу исследователя и делает результаты разных авторов трудными для сопоставления. Изучены результаты децеллюляризации овечьего митрального клапана (n=78) 19 различными растворами, и предложена система оценки качества обработки, включающая три уровня контроля: световая микроскопия (окраска гематоксилин-эозином), ИФА на внутриклеточный антиген — ДНК (окраска DAPI) и ИФА на мембран-ассоциированный антиген α -GAL (Lectin I Isolectin B4). Наилучшие результаты показал протокол с постепенно возрастающими концентрациями детергентов (додецил сульфат натрия и дезоксихолат натрия) и добавлением восстанавливающего агента (β -меркаптоэтанол). При этом было показано, что традиционная световая микроскопия является наименее чувствительным ме-

тодом контроля, а наиболее объективной была окраска на мембран-ассоциированный антиген α -GAL, наиболее сложный для удаления из ткани и, соответственно, позволяющий наиболее точно оценить качество децеллюляризации. Разработанная трехуровневая система контроля децеллюляризации представляется целесообразной и может быть использована в работах с тканями немлекопитающих животных.

Ключевые слова: децеллюляризация, тканевая инженерия, митральный клапан

Summary

Tissue engineering could now be considered as one of the main spheres of the medical basic science and shows a dramatical increase in number of publications. Decellularization is one of the tissue engineering methods that results in non-immunogenic tissue matrix as a basis for future tissue construction. The comparison of multiple decellularization methods is nowadays quite complex as far as there is no standardized approach to the decellularization quality control. 19 different detergent-based decellularizations protocol were analyzed for treatment of whole ovine mitral valves (n=78). The decellularization

quality control included three levels: routine light microscopy (hematoxylin-eosin staining), immunofluorescent analysis for DNA (DAPI staining) and immunofluorescent analysis for α -GAL (Lectin I Isolectin B4 staining). The best decellularization results were shown by the protocol using detergents (sodium dodecyl sulfate and sodium deoxycholate) in rising concentrations with reducing agent (β -mercaptoethanol). The routine light microscopy was

shown to be the least sensitive method, opposite to immunofluorescent analysis for membrane antigen α -GAL. The developed three level decellularization quality control approach was shown to be effective and could be used for non-mammalian tissues.

Keywords: decellularization, tissue engineering, mitral valve

Введение

Тканевая инженерия — раздел науки, посвященный созданию или замещению биологических тканей с использованием различных клеток, биологических или синтетических матриц и соответствующих методов их получения и обработки. В этой области знаний пересекаются практически все медицинские специальности, но наибольший вклад в нее вносит, безусловно, трансплантология, поскольку методы тканевой инженерии в той или иной степени подразумевают перенос структурных элементов одного организма в другой и изучение иммунного ответа на биологические имплантаты.

Одним из наиболее широко распространенных методов создания матриц для последующего построения ткани является децеллюляризация — технология, позволяющая получить тканевую матрицу из донорского материала. Согласно определению S. Badylak, считающегося основоположником теории об использовании межклеточного матрикса в качестве основы для построения в организме реципиента тканей и/или органов, децеллюляризация — процесс удаления из ткани всех клеточных компонентов [1]. С момента публикации его новаторской работы об использовании подслизистой основы тонкой кишки как субстрата для выращивания клеток *in vitro* прошло уже два десятилетия, и за это время идея приобрела множество последователей. Изучены десятки методов разрушения клеток и удаления их из тканей, которые можно условно разделить на три группы (табл. 1).

Наиболее широко используются химические и биологические методы, что объясняется их разно-

образием, сравнительной простотой применения и достаточной эффективностью. Для оптимизации процесса разработаны специальные емкости, биореакторы и другие приспособления, способствующие более полному вымыванию клеток из тканей [2–4]. Однако, несмотря на такое разнообразие технологий, сравнительно малое число авторов успешно внедрило результаты своих исследований в практическую медицину. Кроме того, даже применяемые в клинике матрицы имеют в подавляющем большинстве случаев аллогенное происхождение — ксеногенная трансплантация нефиксированных глутаральдегидом тканей и органов представляется в настоящий момент нереализуемой вследствие мощного иммунного ответа реципиента [5]. Настоящая работа посвящена изучению качества децеллюляризации ткани и анализу описанных в литературе методов оценки эффективности децеллюляризации, как ключевого этапа подготовки тканевой матрицы — ведь именно от информативности этих методов зависит, в конечном счете, качество получаемой матрицы и клинический результат.

Материалы и методы исследования

Работа выполнялась в лабораторных условиях *in vitro* на митральных клапанах овец ($n=78$), эксплантированных в стерильных условиях после забоя животных на бойне. Клапаны забирались целиком, включая створки с фиброзным кольцом и каймой мышц предсердия, хорды и головки папиллярных мышц, и подвергались децеллюляризации по методике, описанной ранее [6]. В ходе работы были использованы

Таблица 1

Классификация методов децеллюляризации

Химические методы	Биологические методы	Физические методы
<ul style="list-style-type: none"> • Кислоты и основания • Гипо- и гипертонические растворы • Детергенты • Спирты • Другие растворители 	<ul style="list-style-type: none"> • Ферменты • Хелатирующие агенты 	<ul style="list-style-type: none"> • Циклическое замораживание/оттаивание • Нетермическая необратимая электропорация

19 протоколов обработки, различающиеся применяемыми детергентами, их концентрациями, временем экспозиции и частотой смены раствора (табл. 2). Кроме того, в последней серии дополнительно к детергентам использовался β-меркаптоэтанол, разрушающий дисульфидные связи в молекулах белков, а четыре клапана были обработаны ДНазой I типа: 24 ч при комнатной температуре в шейкере (GFL-3031, Gesellschaft für Labortechnik mbH), 30 000 Ед ДНазы (Sigma-Aldrich) на один клапан при концентрации 150 Ед/мл [8].

Качество децеллюляризации оценивалось несколькими способами и усложнялось по мере улучшения результата. На первом уровне контроля использовалась световая микроскопия (окраска гематоксилин-эозином); на втором (при отсутствии ядер в ткани по результатам первого этапа), иммунофлуоресцентный анализ (ИФА) — окраска на внутриклеточный антиген — ДНК (4',6-diamidino-2-phenylindole — DAPI, Invitrogen); третий уровень кон-

троля — ИФА на мембран-ассоциированный антиген α-GAL (DyLight 594 Bandeiraea Simplicifolia Lectin I Isolectin B4, Vector Laboratories). Оценивалась также степень повреждения межклеточного матрикса, выполнялась окраска по Мовату и по Ван-Гизону, а также иммунофлуоресцентные окраски на коллаген I и IV типов (соответственно C2345 клон COL-I, Sigma, и M0785 клон C122, DAKO).

Для количественного анализа количества ДНК было использовано по три фрагмента створок каждого из восьми децеллюляризованных митральных клапанов, в качестве контроля выступали два аналогично приготовленных свежих митральных клапана. Для выделения ДНК из ткани использовался набор DNeasy Blood&Tissue Kit (QIAGEN N.V.) в соответствии с рекомендациями производителя. Подсчет количества ДНК в полученных растворах осуществлялся спектрофотометром NanoDrop 1000 с прилагающимся комплектом программного обеспечения (Thermo Scientific).

Таблица 2

Методы, испытанные при децеллюляризации овечьего МК

№	Метод децеллюляризации	Серия 1, n=8
1	0,025% SDS+0,025%SD	2×12 ч
2	0,05% SDS+0,05%SD	2×12 ч
3	0,1% SDS+0,1%SD	2×12 ч
4-6	0,2% SDS+0,2%SD	2×12 ч / 3×12 ч / 5×8 ч
7-9	0,3% SDS+0,3%SD	2×12 ч / 3×12 ч / 5×8 ч
10-12	0,4% SDS+0,4%SD	2×12 ч / 3×12 ч / 5×8 ч
13-15	0,5% SDS+0,5%SD	2×12 ч / 3×12 ч / 5×8 ч
16	Возрастающие концентрации с прекондиционированием Дистиллированная вода 0,2% SDS+0,2%SD 0,3% SDS+0,3%SD 0,4% SDS+0,4%SD 0,5% SDS+0,5%SD 0,5% SDS+0,5%SD	8 ч 8 ч 8 ч 8 ч 8 ч 8 ч
17	0,5% SDS с прекондиционированием Дистиллированная вода 0,5% SDS	8 ч 5×8 ч
18	0,5% SDS+0,5% Triton X100	6×8 ч
19	Возрастающие концентрации с прекондиционированием и восстанавливающим агентом Дистиллированная вода 0,2% SDS+0,2%SD+25 mMβ-ME 0,3% SDS+0,3%SD+25 mMβ-ME 0,4% SDS+0,4%SD+25 mMβ-ME 0,5% SDS+0,5%SD+25 mMβ-ME	6 ч 12 ч 12 ч 12 ч 12 ч

Результаты исследования

Результаты децеллюляризации показаны в табл. 3. Из таблицы видно, что детергенты в концентрациях ниже 0,2% не способны разрушить клетки. При кон-

центрации 0,2% раствор разрушал клеточные ядра только при 36-часовой экспозиции (раствор 5), но не элиминировал фрагменты ядер.

Повышение концентрации и увеличение экспозиции приводило не только к разрушению клеток и

Таблица 3

Влияние метода децеллюляризации на митральный аллогraft

Параметр	Раствор (номер/серия эксперимента)																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Разрушение ядер (СМ)	-	-	-	-	+	+	-	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Удаление фрагментов ядер (СМ)	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
Удаление ДНК (ИФА)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	-	+	+
Удаление α -GAL (ИФА)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

СМ — световая микроскопия; ИФА — иммунофлуоресцентный анализ.

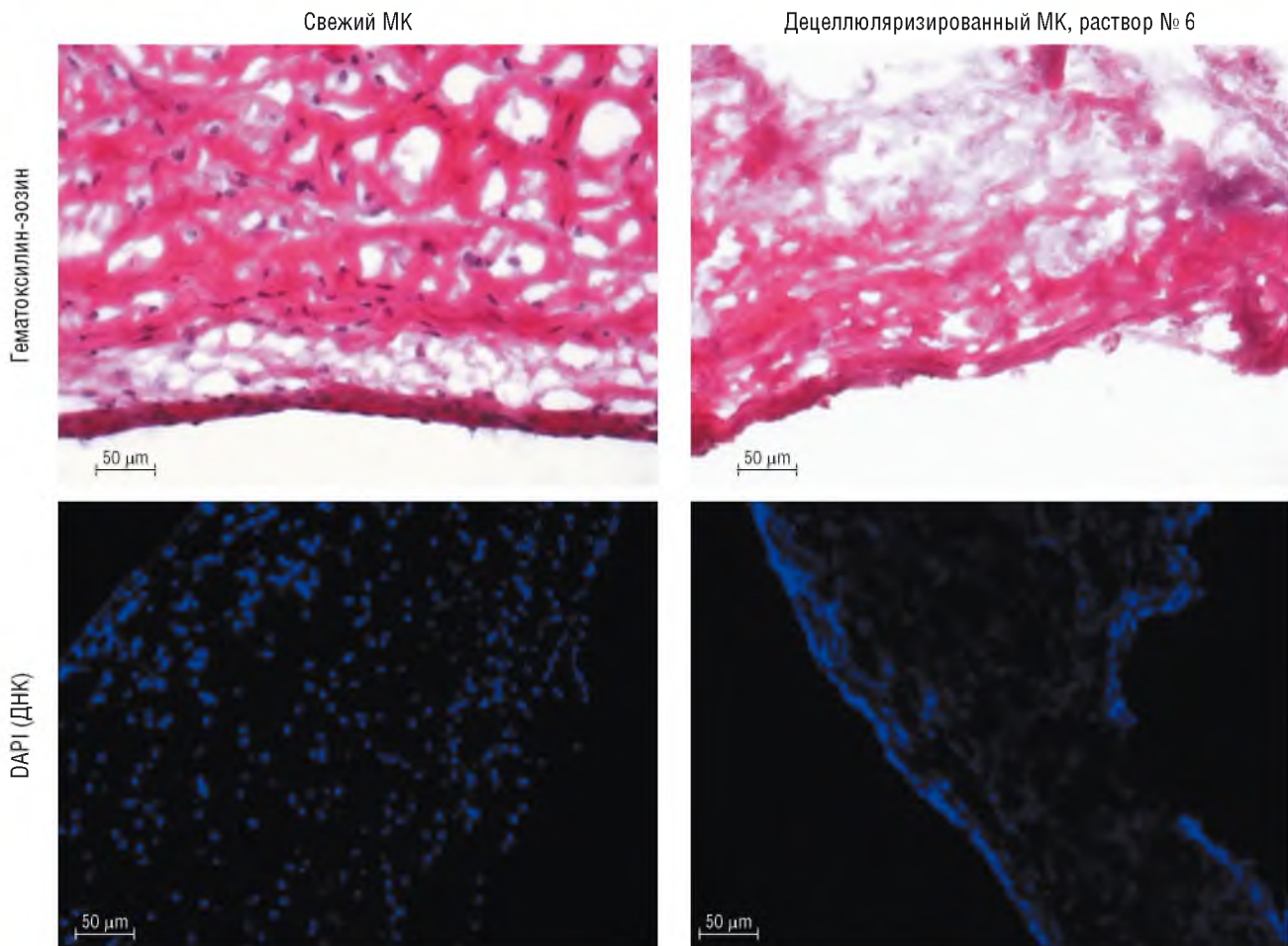


Рис. 1. Световая микроскопия и ИФА свежего и децеллюляризованного раствором № 6 митрального клапана

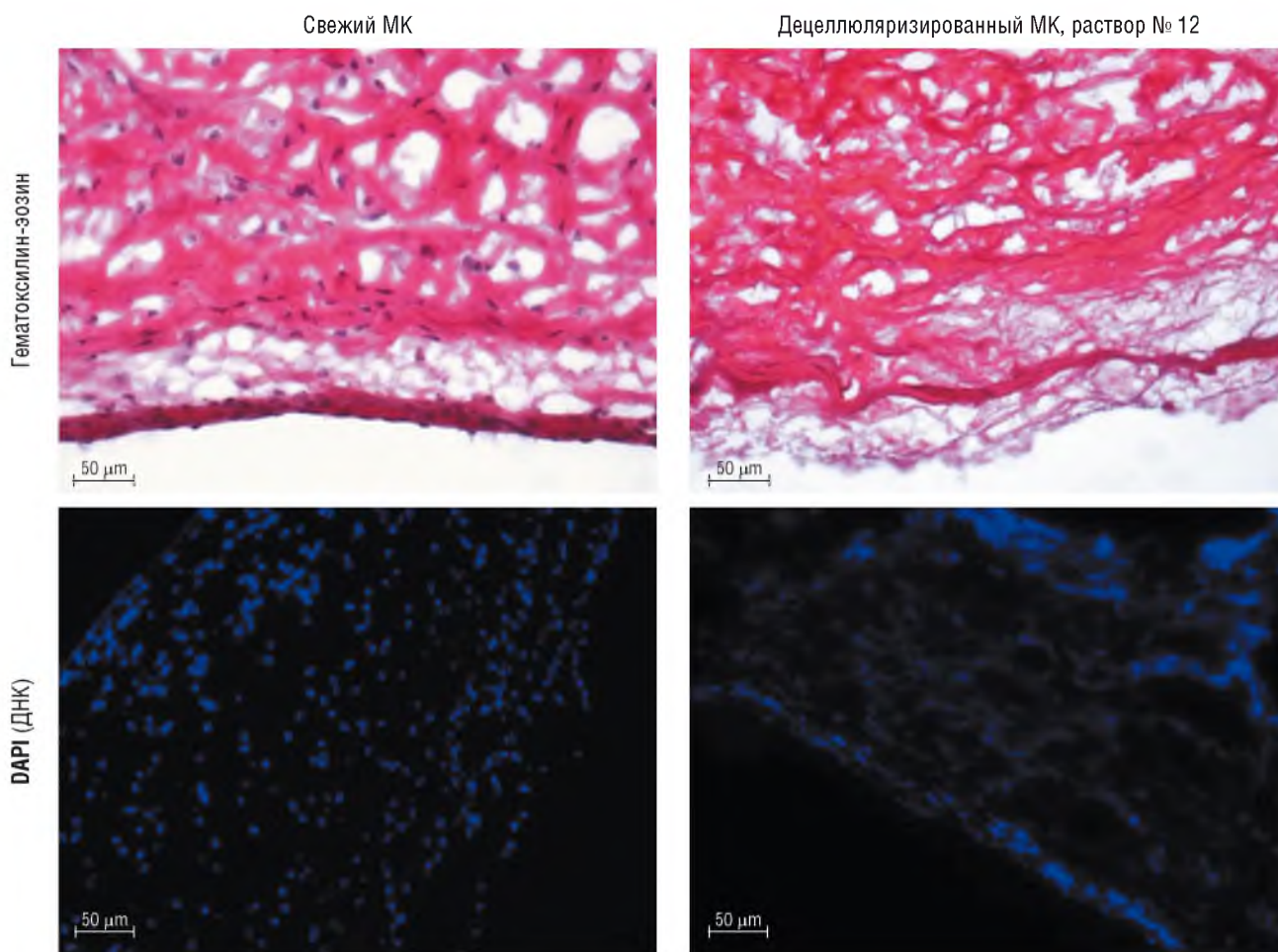


Рис. 2. Световая микроскопия и ИФА свежего и децеллюляризованного раствором № 12 митрального клапана

ядер, но и к вымыванию их видимых при световой микроскопии фрагментов из тканей (растворы 6, 9, 12). Тем не менее при использовании контрольного метода второго уровня — ИФА на ДНК — во всех структурах митрального клапана выявлялось большое количество свободных ДНК (рис. 1, 2). Следующий этап эксперимента подразумевал учащение смены раствора на 1/3 при незначительном, всего на 4 ч (11%), увеличении суммарной экспозиции клапана в растворе детергентов, приводило к существенному повышению эффективности процесса (раствор 15) — ДНК оставалась только вблизи базальных мембран тканей и в толще мышцы.

В следующей серии экспериментов концентрация детергентов постепенно повышалась при каждой смене раствора — с минимально эффективного уровня, на котором мицеллы еще не образуются (для SDS — 0,2%, или 6,94 мМ), до максимально эффективного — 0,5%, после предварительной обработки дистиллированной водой, вызывающей осмотиче-

ский шок. Было достигнуто (раствор 16) практически полное отсутствие визуализируемых при ИФА нуклеиновых кислот (рис. 3). Одновременно замена ионного дезоксихолата натрия на неионный Triton X100 (раствор 18) при их постоянной концентрации (0,5%) дала аналогичные результаты, а изолированное использование додецилсульфата натрия в той же концентрации (раствор 17) было еще менее эффективным. При этом, однако, третий уровень контроля — ИФА на мембран-ассоциированный антиген α -GAL — показал значительное количество визуализируемого эпитопа по результатам использования растворов 16 и 18.

Протокол 19 был основан на наиболее эффективном из ранее изученных растворов, но в него был добавлен восстанавливающий агент — β -меркаптоэтанол, денатурирующий вторичную и третичную структуру белков за счет разрушения дисульфидных связей посредством восстановления образующих их сульфгидрильных групп. Гистологически была

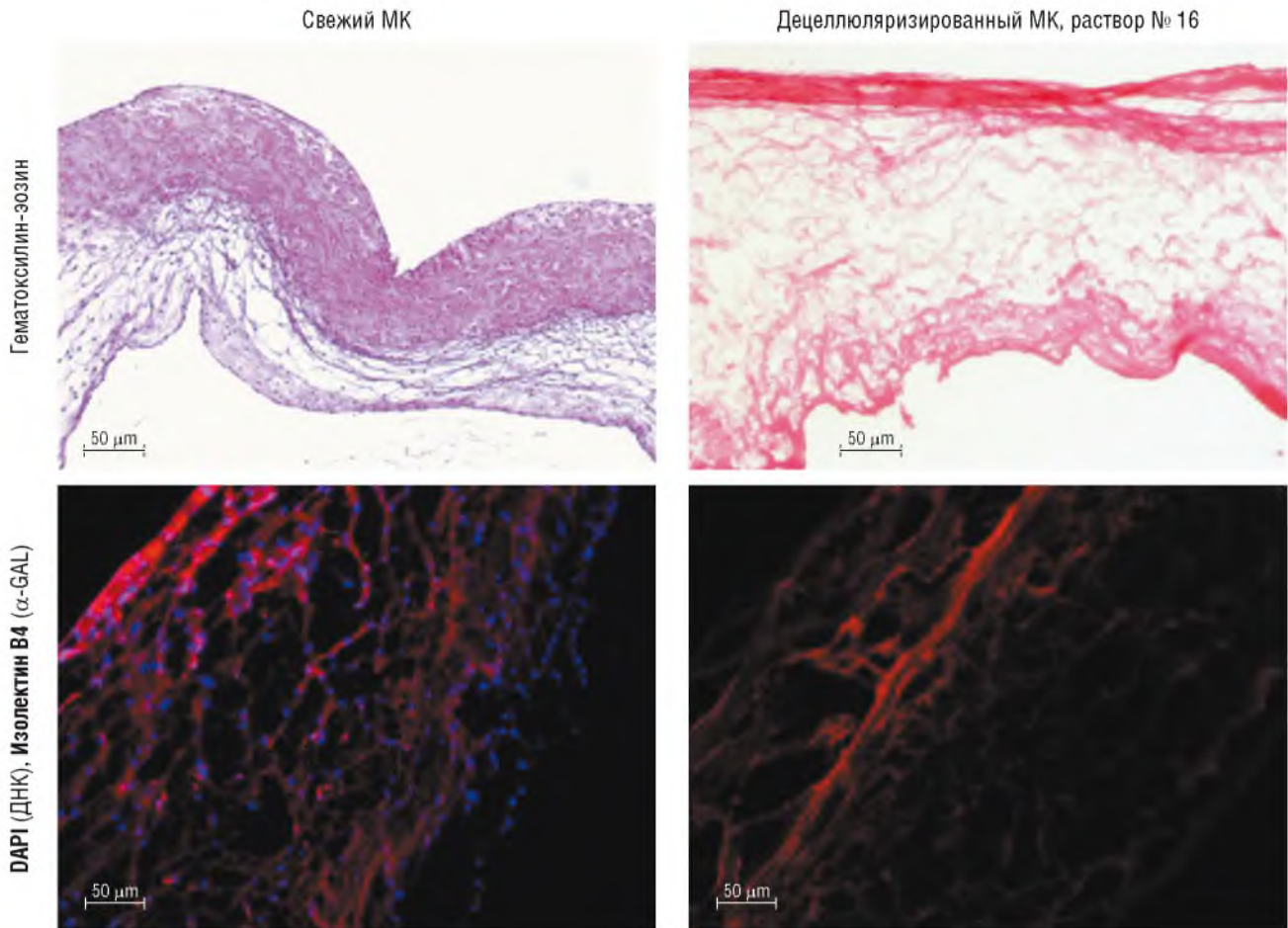


Рис. 3. Световая микроскопия и ИФА свежего и децеллюляризованного раствором № 16 митрального клапана

выявлена полная децеллюляризация с сохранением структуры всех компонентов клапана, а по результатам ИФА срезов ДНК и α -GAL не были обнаружены (рис. 4). Однако ИФА является качественным методом анализа, поэтому в дополнение к нему была выполнена количественная оценка содержания ДНК с помощью спектрофотометра (четвертый уровень контроля). Без использования ДНазы уровень ДНК в децеллюляризованных клапанах снизился на 71,2% ($82,9 \pm 48,2$ против $287,8 \pm 76,5$ нг/мг, $p < 0,01$), а после обработки ферментом — на 96,4% ($10,4 \pm 16,9$ нг/мг, $p < 0,01$).

Межклеточный матрикс по результатам децеллюляризации не претерпел критических изменений: ИФА на коллаген I не выявил различий в сравнении со свежим МК, а по результатам ИФА 3 препаратов с антителами к коллагену IV типа было отмечено некоторое снижение интенсивности окраски, тем не менее флуоресценция АТ к коллагену IV прослеживалась на всем протяжении створки митрального клапана с обеих сторон и хорд (рисунки не представлены).

Обсуждение результатов

Говоря о децеллюляризации, мы понимаем под ней именно удаление из тканей всех клеток и их элементов, а не просто разрушение клеток, поскольку в последнем случае в тканях остаются клеточные элементы, все еще способные вызвать иммунный ответ — фрагменты ДНК, мембраны и ассоциированные с ними антигены. На заре тканевой инженерии единственным методом контроля децеллюляризации была рутинная световая микроскопия препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином. Однако по мере накопления опыта и испытания полученных матриц в хронических экспериментах *in vivo* пришло понимание, что видимые при световой микроскопии ядра клеток (или их отсутствие после обработки ткани) — слишком грубый критерий, поскольку позволяет оценить содержание в ткани только плотно упакованной ядерной ДНК — поскольку другие субклеточные структуры остаются невидимыми для наблюдателя. Так, для изучения децеллюляризован-

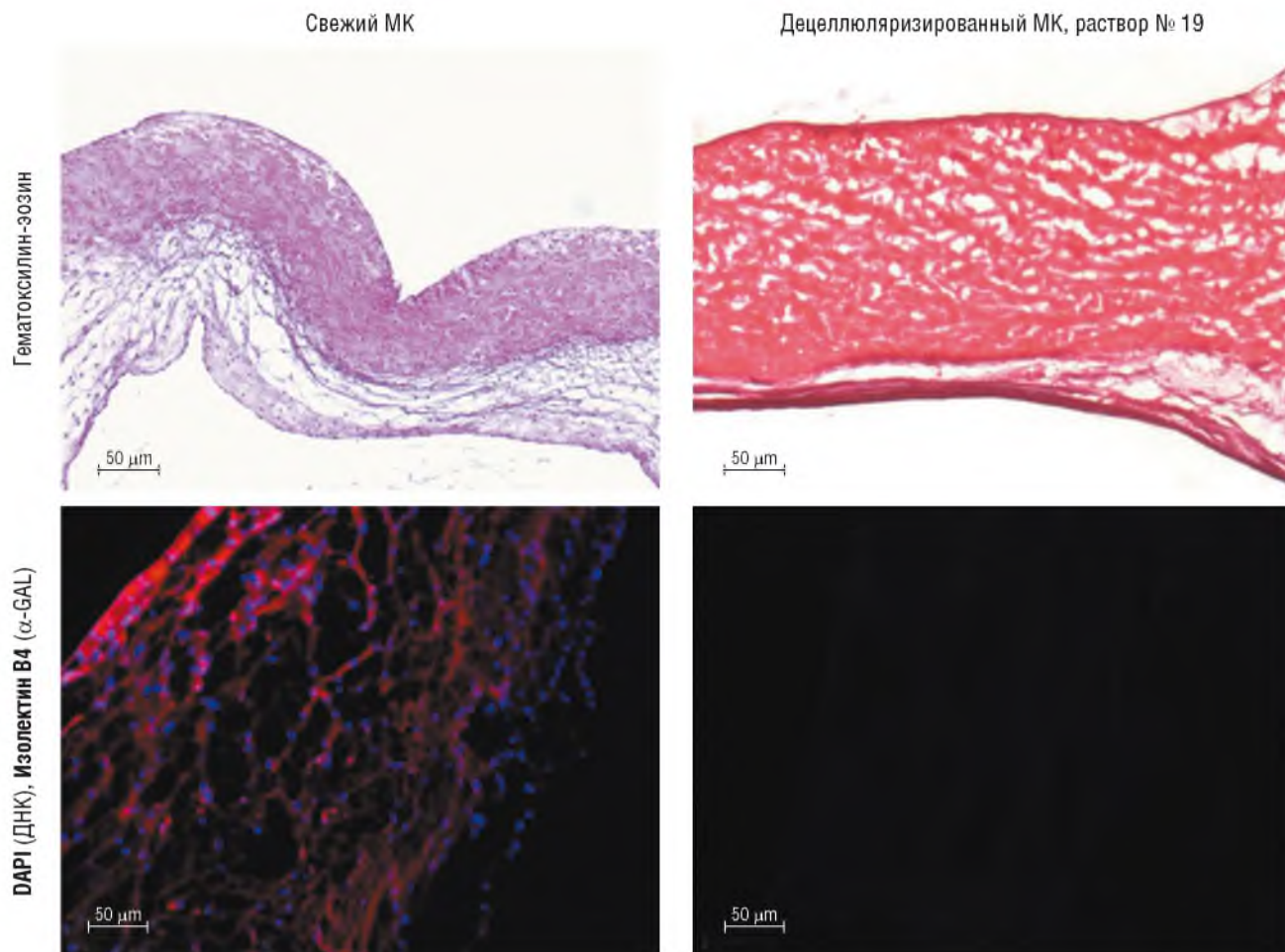


Рис. 4. Световая микроскопия и ИФА свежего и децеллюляризованного раствором № 19 митрального клапана

ной ткани стали применять высокочувствительные иммуногистохимические и иммунофлуоресцентные окраски, а для описания особенно тщательной децеллюляризации, т. е. высокой степени очистки межклеточного матрикса от клеточных элементов, — появился термин «antigen removal» — «удаление антигенов» [8]. С нашей точки зрения, применение этой формулировки не несет какой-либо дополнительной информации, поскольку исходный термин — «децеллюляризация» — сам по себе подразумевает полное удаление всех клеточных структур, включая все клеточные антигены.

Единственный четкий (т. е. количественный) предложенный критерий полноты децеллюляризации тканей в настоящий момент основывается на содержании в них ДНК. Так, в обзорной статье Р. Сгаро и соавт. указывается, что ткань может считаться достаточно очищенной от клеток при содержании двуспиральной ДНК в ней менее 50 нг/мг сухой массы или длина фрагментов ДНК не превышает 200 пар оснований [9]. Эти данные, в свою очередь, основываются на публика-

ции, посвященной изучению механизмов апоптоза, — автором приводятся сведения о возникновении иммунного ответа, в том числе системных аутоиммунных заболеваний, при недостаточности ферментов, разрушающих ДНК клеток после апоптоза [10]. Однако далее в статье Р. Сгаро и соавт. третьим критерием эффективности приводится отсутствие видимого (окрашенного) ДНК в тканях при окраске гематоксилин-эозином (с уточнением, что это недостаточно чувствительный метод) или DAPI [9]. Наш опыт показывает, что эти два метода, по меньшей мере, нельзя объединять в один критерий, поскольку они существенно различаются по своей чувствительности. Так, нами было показано, что видимая при окраске гематоксилин-эозином ДНК исчезает гораздо раньше (т. е. при сравнительно мягкой и неполной обработке), чем при ИФА с использованием DAPI. Приходится констатировать факт, что рутинная световая микроскопия в настоящий момент вообще не может использоваться как конечный критерий эффективности децеллюляризации вследствие своей низкой чувствительности.

Кроме того, по нашим данным, нельзя сопоставлять напрямую приведенные количественные и качественные критерии. Ведь даже те фрагменты створок децеллюляризованного митрального клапана, которые не окрашивались DAPI, содержали в среднем $82,9 \pm 48,2$ нг/мг ДНК (до обработки ДНазой), что формально не отвечает критериям Срао и соавт. Из приведенных нами данных следует, что последние не являются равнозначными и, соответственно, не могут применяться как единая система для оценки результатов, полученных разными группами авторов.

По мере совершенствования технологий и методов изучения иммунного ответа становится очевидно, что последний связан не только с ДНК, но и цитоплазматическими и мембран-ассоциированными антигенами. Именно с этим фактом должна быть связана дальнейшая стандартизация критериев эффективности децеллюляризации и, в конечном счете, улучшение отдаленных результатов экспериментов *in vivo*. В настоящее время используются различные методы оценки качества децеллюляризации. В литературе описаны, помимо ДНК, несколько мембран-ассоциированных антигенов: HLA, МНС 1 класса, α -GAL и некоторые другие. Так, в работе Вёгг и соавт. было показано, что все три перечисленных антигена вымываются при децеллюляризации примерно в одинаковой степени, а последний, α -GAL, удаляется в наименьшей степени, т. е. его использование как критерия качества наиболее оправдано — хотя и применимо только для моделей с использованием тканей ксенотенного происхождения [11].

В исследовании Вёгг и соавт. был отмечен еще один важный момент, который в будущем может в корне изменить подход к децеллюляризации. Авторами показано, что коллаген VI — один из компонентов межклеточного матрикса, также способен вызывать иммунный ответ (на модели мышей линии NMRI).

С другой стороны, крайне важно использование адекватной экспериментальной модели для изучения того или иного изобретения. Так, в начале века на рынок вышли свиные аортальные кондуиты SynerGraft [12]. Они показали сравнительно хорошие доклини-

ческие результаты на овцах, однако необходимо отметить, что в описанном эксперименте была выбрана некорректная модель — невозможна экстраполяция скорости деградации и гемодинамического подведения клапанного заменителя в легочной позиции на его функционирование в аортальной, в частности, из-за различных величин сдвигового напряжения, воспринимаемых протезом, — известно, что биологические клапаны в легочной позиции служат дольше, чем в аортальной, а после выполнения операции Росса легочный клапан в аортальной позиции деградирует существенно быстрее, чем нативный аортальный [7]. Кроме того, ксенотенную модель «от свиньи к овце» нельзя считать эквивалентной клинической ситуации «от свиньи к человеку», поскольку в последнем случае сверхострое отторжение вызывает общий для свиньи и овцы, но чужеродный для человека антиген α -GAL, содержание которого не было изучено после децеллюляризации. И поэтому, к сожалению, недостаточная эффективность обработки (технология предполагала гипотонический лизис клеток и обработку ДНазой) и неадекватная оценка ее качества проявились только на клиническом этапе — больные погибали из-за быстрой дегенерации и разрыва донорской части стенки аорты [12, 13].

Заключение

Таким образом, необходимость разработки единых стандартов очевидна, поскольку позволит различным группам исследователей, работающим, в том числе, в разных областях медицинской науки, одинаково оценивать эффективность децеллюляризации на доимплантационной стадии (что приведет к существенной экономии ресурсов), сравнивать полученные различными способами матрицы и методики децеллюляризации и, в результате, ускорить в глобальном масштабе разработку оптимальных для клинического использования продуктов. Разработанная трехуровневая система контроля децеллюляризации представляется целесообразной и может быть использована в работах с тканями немлекопитающих животных.

Список литературы

1. *Badylak S.F. et al.* Small intestinal submucosa: a substrate for *in vitro* cell growth // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* — 1998. — N 8 (9). — P. 863–878.
2. *Driessen-Mol A. et al.* Transcatheter implantation of homologous «off-the-shelf» tissue-engineered heart valves with self-repair capacity: Long-term functionality and rapid *in vivo* remodeling in sheep // *Journal of the American College of Cardiology.* — 2014. — N 13 (63). — P. 1320–1329.
3. *Dumont K. et al.* Design of a new pulsatile bioreactor for tissue engineered aortic heart valve formation // *Artificial Organs.* — 2002. — N 8 (26). — P. 710–714.
4. *Moreira R. et al.* TexMi — Development of Tissue-Engineered Textile-Reinforced Mitral Valve Prosthesis // *Tissue engineering. Part C, Methods.* — 2014. — N 9 (20). — P. 741–8.
5. *Hilfiker A. et al.* Reduction of xeno-antigens in porcine pulmonary heart valves by decellularization and glycolytic enzymatic treatment // *Xenotransplantation.* — 2014. — N 2 (21). — P. 190–190.

6. *Iablonskii P. et al.* Tissue-engineered mitral valve: morphology and biomechanics // *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*. — 2015. — P. 1–8.
7. *Yacoub M.N. et al.* Fourteen-Year Experience with Homovital Homografts for Aortic Valve Replacement // *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. — 1995.
8. *Wong M.L. et al.* Stepwise solubilization-based antigen removal for xenogenic scaffold generation in tissue engineering // *Acta Biomaterialia*. — 2013. — N 5 (9). — P. 6492–6501.
9. *Crapo P.M., Gilbert T.W., Badylak S.F.* An overview of tissue and whole organ decellularization processes // *Biomaterials*. — 2011. — N 12 (32). — P. 3233–3243.
10. *Nagata S., Hanayama R., Kawane K.* Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells // *Cell*. — 2010. — Vol. 140, N 5. — P. 619–630.
11. *Boeer U. et al.* Immunogenicity of intensively decellularized equine carotid arteries is conferred by the extracellular matrix protein collagen type VI // *PLoS ONE*. — 2014. — N 8 (9).
12. *Brown J.W. et al.* Performance of SynerGraft decellularized pulmonary homograft in patients undergoing a Ross procedure // *Annals of Thoracic Surgery*. — 2011. — N 2 (91). — P. 416–423.
13. *Simon P. et al.* Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients // *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*. — 2003. — N 23. — P. 1002–1006.

Поступила в редакцию 14.11.2016 г.

Сведения об авторах:

Яблонский Павел Петрович — ассистент кафедры госпитальной хирургии Санкт-Петербургского государственного университета, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9; ассистент Клиники кардиоторакальной, сосудистой хирургии и трансплантации Медицинского университета Ганновера, Германия, 30625, Ганновер, Carl-Neuberg-Str. 1, OE 6210; e-mail: pavel.yablonski@gmail.com;

Чеботарь Сергей — приват-доцент, руководитель отдела клапанной хирургии Клиники кардиоторакальной, сосудистой хирургии и трансплантации Медицинского университета Ганновера, Германия, 30625, Ганновер, Carl-Neuberg-Str. 1, OE 6210; e-mail: cebotari.serghei@mh-hannover.de;

Тудорахе Игорь — руководитель отдела трансплантации легких Клиники кардиоторакальной, сосудистой хирургии и трансплантации Медицинского университета Ганновера, Германия, 30625, Ганновер, Carl-Neuberg-Str. 1, OE 6210; e-mail: tudorache.igor@mh-hannover.de;

Резник Олег Николаевич — доктор медицинских наук, руководитель Отдела трансплантологии и органного донорства НИИ хирургии и неотложной медицины Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6/8; e-mail: onreznik@gmail.com;

Хаверих Аксель — профессор, директор Клиники кардиоторакальной, сосудистой хирургии и трансплантации Медицинского университета Ганновера, Германия, 30625, Ганновер, Carl-Neuberg-Str. 1, OE 6210; e-mail: haverich.axel@mh-hannover.de.