

УДК 616.127-002.4-092.4+616-089.844

Н.А. Чиж*, Д.В. Бызов, Т.В. Шканд, А.Г. Бабаева, А.В. Трофимова,
И.П. Михайлова, И.В. Слета, Б.П. Сандомирский

Моделирование некроза миокарда в эксперименте и создание сосудистых ксенопротезов для регенеративной медицины[#]

UDC 616.127-002.4-092.4+616-089.844

N.A. Chizh*, D.V. Byzov, T.V. Shkand, A.G. Babaeva, A.V. Trofimova,
I.P. Mikhaylova, I.V. Sleta, B.P. Sandomirsky

Experimental Model of Myocardial Necrosis and Creation of Vascular Xenoprostheses for Regenerative Medicine[#]

Ключевые слова: аорта, адреналин, коронарная артерия, криовоздействие, некроз миокарда, скаффолд, сосудистый протез.

Ключові слова: аорта, адреналін, коронарна артерія, криовплив, некроз міокарда, скаффолд, судинні протези.

Key words: aorta, adrenaline, coronary artery, cryoexposure, myocardial necrosis, scaffolds, vascular prostheses.

Сердечно-сосудистые заболевания занимают первое место по распространенности и смертности [4]. Основным фактором в развитии ишемической болезни сердца (ИБС) является атеросклероз, который поражает артерии. Нестабильность атеросклеротической бляшки в коронарной артерии приводит к ее закупорке и, как следствие, к формированию одного из грозных осложнений ИБС – инфаркта миокарда (ИМ). Для правильного понимания механизма возникновения, а, следовательно, для разработки методов профилактики и лечения ИМ важное значение имеет его экспериментальное воспроизведение. Сегодня существует множество различных экспериментальных моделей некроза миокарда (НМ). Механическое прекращение притока крови к тому или иному отделу сердца осуществляют лигированием коронарных артерий, моделируя при этом «коронарогенный» НМ [3]. Известно, что действие на организм различных патогенных (стрессорных) факторов приводит к развитию разных по характеру и глубине поражений сердца. Одним из основных патогенетических факторов в развитии повреждений миокарда является избыток катехоламинов [8]. Кроме того, «некоронарогенный» НМ моделируют путем деструкции сердечной мышцы как низкими (криодеструкция), так и высокими (электрокоагуляция) температурами [11].

Радикальный метод лечения ИБС – восстановление кровотока в суженной или закупоренной артерии

Cardiovascular diseases are the most prevailing as well as the most fatal diseases [4]. Coronary artery disease (CAD) is caused mainly by atherosclerosis which affect arteries. Instable atherosclerotic plaque appeared in coronary artery could lead to an arterial blockage result in one of the most severe complications of CAD, myocardial infarction (MI). Proper understanding of MI initiation mechanisms, and thereby implementation of preventive and therapeutic measures are greatly dependent on its experimental simulation. Nowadays there are many experimental models of myocardial necrosis (MN). Mechanical arrest of blood flow to one or other compartment of heart was performed by ligation of coronary arteries, so-called ‘coronarogenic’ MN [3]. It has been known that effect of different pathogenic (stress) factors on organism resulted in development of heart injuries, varying by type and depth. Surplus catecholamines are among the important pathogenic factors in development of myocardial injuries [8]. Moreover, ‘non-coronarogenic’ MN could be modelled by destruction of myocardium both by low (cryodestruction) and high (electrocoagulation) temperatures [11].

Definitive therapy of CAD consists in blood flow recovery in narrowed or blocked arteries by means of arterial bypass with vascular prostheses. Application of bioengineered vascular prostheses represented by acellular xenogenic vascular scaffolds, capable to provide suitable mechanical properties and to support the layered

Отдел экспериментальной криомедицины, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков, Украина

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;
тел.: (+38 057) 372-74-24, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: chizh.kol@mail.ru

[#]Данное исследование было представлено на минисимпозиуме «День стволовой клетки», проходившем 24 мая 2013 года в г. Киеве.

Поступила 15.06.2013
Принята в печать 01.12.2013

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №4. – С. 368–372.
© 2013 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Department of Experimental Medicine, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 372 7424, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: chizh.kol@mail.ru

[#]This research was presented at minisymposium Stem Cell Day, held in Kiev, Ukraine, on the 24th of May, 2013.

Received June, 15, 2013
Accepted December, 1, 2013

Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – Vol. 23, Nr. 4. – P. 368–372.
© 2013 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

путем артериального шунтирования с использованием сосудистых протезов. Перспективным, особенно для протезирования артерий мелкого диаметра (меньше 6 мм), является использование биоинженерных сосудистых протезов на основе бесклеточных ксеногенных сосудистых каркасов, способных обеспечивать адекватные механические свойства и выполнять опорную функцию для наслаиваемых клеточных структур [1]. Такие протезы обеспечивают лучшую адгезию при последующей эндотелизации, способствуют росту эндотелия и в зависимости от метода обработки обладают механическими свойствами, подобными нативным сосудам, что обеспечит полноценную интеграцию трансплантата в организм реципиента.

Цель работы – изучение особенностей развития некроза и ремоделирования сердца после повреждения миокарда, вызванного хирургическим и консервативными способами, и создание сосудистых ксеноскаффолдов в качестве моделей для изучения клеточных технологий в регенеративной медицине.

Все эксперименты были выполнены с соблюдением принципов биоэтики и норм биологической безопасности.

Моделирование НМ проводили на 60-ти беспородных крысах-самцах массой 180–250 г под эфирным наркозом на спонтанном дыхании. Ишемический НМ моделировали путем перевязки нисходящей ветви левой коронарной артерии [7]. Криовоздействие на стенку левого желудочка сердца производили азотным инструментом при температуре рабочей поверхности аппликатора -195°C [5]. Для формирования мелкоочагового НМ подкожно вводили адреналин в дозе 0,5 мг/100 г массы животного [9].

Животных разделили на 5 групп по 10 крыс в каждой: 1 (контроль) – после пробной торакотомии; 2 – после перевязки левой коронарной артерии; 3 и 4 – после криодеструкции сердца в течение 15 и 30 с соответственно; 5 – после введения адреналина. Группы нормы составили 10 животных.

Функциональную способность миокарда исследовали электрокардиографически. Электрокардиограммы (ЭКГ) регистрировали на аппаратно-программном комплексе «Полиспектр-8/В» («Нейрософт», Россия). Морфологическую картину миокарда оценивали по гистологическим срезам, окрашенным гематоксилином и эозином.

Ксенобиопротезы получали из препаратов внутригрудных артерий (*a. thoracica interna*) 6–8-месячных беспородных свиней. Внутренний диаметр выделенных артерий – от 2,5 до 5 мм, длина – от 5 до 10 см. Сосуды помещали в стерильные криостойкие контейнеры («Eurotubo», «Deltalab», Испания) и погружали в жидкий азот. После непродолжительного хранения сосуды отогревали и облучали потоком электронов с помощью линейного ускорителя электронов ЛУЭ-2000 на базе ННЦ «ХФТИ» НАН Украины. В работе применяли два режима облучения с разной величиной

cells, could be prospective, especially in creation of prostheses for small arteries (less than 6 mm) [1]. These prostheses provide better adhesion for further endothelialization, contribute to the endothelium growth and, depending on treatment method, have mechanical properties similar to the native vessels, thereby providing complete integration of transplant into recipient's organism.

The research aim was to study peculiarities of necrosis development and remodelling of heart after myocardium injury induced by both non-surgical and surgical methods and development of vascular xenoscaffolds as a model for studying cell-based technologies in regenerative medicine.

All the experiments were conducted in compliance with the bioethical principles and biosafety regulations.

Modelling of MN was performed in 60 white breedless male rats of 180–250 g weight under ether mask narcosis with spontaneous respiration. Ischemic MN was modelled by ligation of descending branch of left coronary artery [7]. Cryoexposure on left ventricle wall was performed using a nitrogen cryogenic device and the operating temperature of applicator surface of -196°C [5]. Adrenaline of 0.5 mg per 100 g of an animal was subcutaneously introduced to form microfocal MN [9].

The animals were divided into 5 experimental groups of 10 rats each: group 1 (control) were rats after trial thoracotomy; group 2 comprised the animals after left coronary artery ligation; groups 3 and 4 were the rats after heart tissue cryodestruction performed during 15 or 30 sec, correspondingly; group 5 was the animals after adrenaline injection. The norm group consisted of 10 animals.

Function of myocardium was studied using electrocardiography. Electrocardiograms (ECGs) were recorded and analyzed with hardware-software complex Polyspectrum-8/V (Neurosoft, Russia). Morphology of myocardium was assessed in histological sections, stained with hematoxylin and eosin.

Xenobioprostheses were obtained from the internal thoracic arteries of 6–8-month-old breedless male pigs. Internal diameter of isolated arteries varied from 2.5 to 5 mm, length was from 5 to 10 cm. The vessels were placed into sterile cryocontainers (Eurotubo, Deltalab, Spain) and plunged into liquid nitrogen. After short-term storage the flasks were exposed to discrete irradiation of 25 kGy dose with electron beam in LUE-2000 linear electron accelerator at the Kharkov Institute of Physics and Technology. Two regimens of irradiation with different value of absorbed dose were used in the research. Regimen I was 25 kGy and regimen II was 50 kGy. After irradiation the containers were stored in vapours of liquid nitrogen at the temperature from -150 to -170°C .

Morphological structure of vessels was assessed in stained histological sections: silver impregnation of interendothelial boundaries, staining with hematoxylin and eosin, and pyrofuchsin according Van Gieson. Electron microscopic research was performed by the standard



поглощенной дозы: режим I – 25 кГр и режим II – 50 кГр. После облучения контейнеры хранили в парах жидкого азота при температуре от –150 до –170°C.

Морфологическую структуру сосудов оценивали на окрашенных препаратах: импрегнация серебром межэндотелиальных границ, окраска гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизон. Электронно-микроскопические исследования образцов проводили по стандартной методике [6]; ультраструктуру сосудистой стенки изучали при ускоряющем напряжении 75 кВ с помощью электронного микроскопа «ПЭМ-125К», снабженного системой съемки и анализа изображения «САИ-01А» (АО «Selmi», Украина).

Функциональность, гемосовместимость и степень тромбогенности девитализированных артерий *in vivo* проводили на 15 кроликах породы Шиншилла массой 3200–4500 г. Сосуды диаметром 2,5–3,0 мм и длиной 15–25 мм имплантировали в брюшной отдел аорты на 5–10 мм проксимальнее ее бифуркации.

Результаты статистически обрабатывали параметрическим методом Стьюдента-Фишера (t-тест) и непараметрическим – MANOVA. Количественные данные представлены в средних величинах ± средние квадратичные отклонения.

Проведенные исследования показали высокую травматичность хирургических способов моделирования НМ. После наложения лигатуры на коронарную артерию смертность животных составляла 25–30%, а после введения адреналина – 20%.

По результатам ЭКГ у крыс из группы нормы установлены правильный синусовый ритм, отсутствие нарушений проводимости и изменений в комплексе QRS-T. Частота сердечных сокращений (ЧСС) составляла 420 ± 25 ударов в минуту (рис. 1, А). На 1-е сутки после операции у животных группы 1 наблюдали синусовый ритм, незначительное увеличение амплитуды зубца Т в отведении II относительно нормы (рис. 1, В). У животных после криовоздействия на сердце продолжительностью 15 с отмечали снижение амплитуды зубцов R, появление $q \leq 1/4R$ и отрицательных зубцов Т в отведениях I и avL, что свидетельствовало о развитии переднебокового субэпикардального НМ (рис. 1, С). Криовоздействие на сердце в течение 30 с привело к увеличению глубины повреждения сердца. На ЭКГ регистрировали зубец Q и элевацию сегмента ST в отведениях I и avL, при этом ЧСС снижалась до 325 ударов в минуту (рис. 1, D). Изменения на ЭКГ были аналогичными у животных групп 4 и 2 (рис. 1, E). Через сутки после введения адреналина на ЭКГ у крыс группы 5 регистрировали зубец Q и элевацию сегмента ST в отведениях I и avL, а у крыс группы 4 такие изменения наблюдали в отведениях III и avF, что также свидетельствовало о наличии трансмурального переднебокового или верхушечного НМ (рис. 1, F).

Анализ гистологического материала выявил, что при НМ, вызванном низкими температурами, форми-

method [6]; ultrastructure of vessel wall was studied at accelerating voltage of 75 kV in electron microscope PEM-125K equipped with SAI-01A digital imaging and analysis system (Selmi, Ukraine).

Functionality, hemocompatibility and thrombogenicity of devitalized arteries were assessed *in vivo* in 15 Chinchilla rabbits of 3,200–4,500 g. The vessels of 2.5–3.0 mm diameter and 15–25 mm length were implanted into abdominal region of aorta on 5–10 mm proximal of its bifurcation.

The results were statistically processed with parametric Student-Fisher's t-test and MANOVA non-parametric method. Quantitative data are presented as means ± standard deviations.

The conducted investigations showed that surgical modeling of MN was highly traumatic. Following left coronary artery ligation the animal mortality made 25–30%, and after introduction of adrenaline it was 20%.

Analysis of ECGs in rats from the norm group established a regular sinus rhythm, and no disorders in conductivity and no changes in QRS-T complex. Heart rate (HR) was 420 ± 25 beats per min (Fig. 1A). To the 1st day after surgery in animals of group 1 (control) we observed an insignificant increasing of T wave amplitude in lead II (Fig. 1B) if compared to the norm. The animals after 15 sec cryoexposure onto the heart exhibited a decreased R waves amplitude, appearance of $q \leq 1/4R$ wave and negative T waves in leads I and avL, indicating to the presence of anteriolateral subepicardial MN (Fig. 1C). Cryoexposure to the heart during 30 sec resulted in an increase of the heart injury depth. The ECGs had Q wave and elevated ST segment in leads I and avL, herewith the HR reduced down to 325 beats per min (Fig. 1D). The changes in ECG were similar in animals of groups 4 and 2 (Fig. 1E). A day after of adrenaline



Рис. 1. Исследование ЭКГ через сутки после оперативных вмешательств: А – норма; В – пробная торакотомия; С – криовоздействие на сердце 15 с; D – криовоздействие на сердце 30 с; E – перевязка коронарной артерии; F – введение адреналина.

Fig. 1. ECG study a day post treatment: A – norm; b – trial thoracotomy; C – 15 sec of cryoexposure to the heart; D – 30 sec of cryoexposure to the heart; E – ligation of coronary artery; F – introduction of adrenaline;



ровалась зона реактивного воспаления без фазы ишемического повреждения. Формирование соединительнотканного рубца после локальной криодеструкции сердца происходило на 7 суток раньше, чем после перевязки коронарной артерии и адреналиновой интоксикации. Паранекротическая зона при перевязке коронарной артерии была более выражена, чем при криовоздействии на сердце. При введении больших доз адреналина происходило диффузное поражение миокарда левого желудочка с формированием мелких очагов некроза.

Таким образом, перевязка коронарной артерии, криодеструкция сердца и введение токсических доз адреналина достоверно приводили к появлению экспериментального НМ. Вариация параметров криоповреждения сердечной мышцы дает возможность экспериментально получать как субэпикардальный, так и трансмуральный НМ. Поэтому, в зависимости от задачи исследования, возможен выбор той или иной модели для изучения кардиопротекторного влияния новых препаратов и биологически активных веществ или клеточных субстанций на конкретное патогенетическое звено развития воспаления, НМ и ремоделирования сердца.

При моделировании ксеноскаффолдов мы искали новый подход к созданию девитализированных сосудистых ксенопротезов малого диаметра с использованием физических факторов.

Морфологические исследования продемонстрировали, что глубокое замораживание, последующий отогрев и ионизирующее облучение приводили к девитализации артерий свиньи при сохранении эластических мембран и пучков коллагеновых волокон. Комбинированное использование указанных физических факторов обеспечило снижение антигенных свойств ксеноартерий за счет повреждения основных факторов иммуногенности – клеточных элементов (эндотелия и гладкомышечных клеток) [2, 10].

Максимальная длительность наблюдения после трансплантации девитализированных артерий в брюшной отдел аорты кроликам составила 2 года, в течение которых биопротезы адекватно функционировали, обеспечивая достаточное кровоснабжение. При этом на всех сроках наблюдения деструктивно-некротические изменения стенок ксенопротеза и окружающих тканей, признаки отторжения, иммуногенного воспаления, фиброзно-рубцового перерождения соединительно-тканной структуры не отмечены (рис. 2, А) [10].

В процессе морфогенеза происходило ремоделирование девитализированных ксенососудов: образовывался слой собственных эндотелиальных клеток; в средней оболочке

introduction the ECG of group 5 rats had Q wave and elevated ST segment in leads I and avL. In the rats of group 4 these changes were found in leads III and avF, testifying to the presence of transmural anteriolateral or apical MN (Fig. 1F).

Histological analysis revealed that MN initiated by low temperatures was accompanied with formation of the reactive inflammation area without of ischemic damage phase. Connective tissue scar after local heart cryodestruction was formed 7 days earlier if compared with MN initiated by ligation of coronary artery and adrenaline intoxication. Paranecrotic region following ligation of coronary artery was more pronounced than that after cryoexposure of heart. Introduction of large doses of adrenaline led to appearance of diffuse injury of left ventricle myocardium with formation of necrosis foci.

Thus, ligation of coronary artery, cryodestruction of heart and introduction of toxic doses of adrenaline definitely resulted in appearance of experimental MN. Varying the parameters of myocardium cryoinjury could enable the obtaining in experiment of both subepicardial and transmural MN. Therefore, depending on the research aim there is possible to select one or other model for investigation of cardioprotective effect of novel preparations, biologically active substances or cell-based therapies on certain pathogenic link of inflammation development, MN and remodelling of heart.

Modelling of xenoscaffolds was targeted to find a new approach to create using physical factors a devitalized vascular xenoprostheses of small diameter.

Morphological studies demonstrated that deep freezing, following thawing and ionizing irradiation resulted in devitalization of pig arteries alongside with preservation of elastic membranes and collagen fibre bundles. Combination of these physical treatments provided reduction of antigenic properties of xenoarteries due to damage of basic factors of immunogenicity, *i.e.* cell elements (endothelium and smooth muscle cells) [2,10].

Maximum observation term after transplantation of devitalized arteries into abdominal region of rabbits' aorta

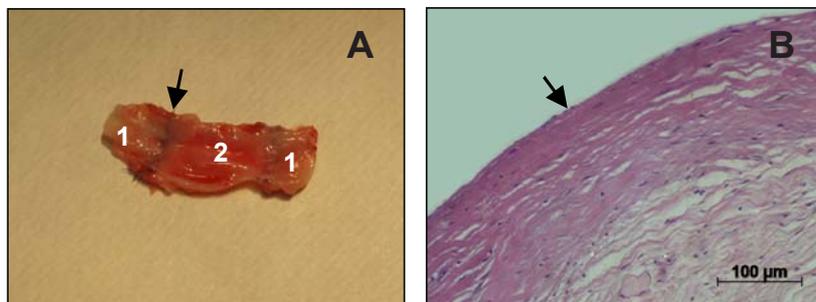


Рис. 2. Девитализированный протез через 9 месяцев после трансплантации: **А** – макроскопическая картина (1 – аорта; 2 – протез; стрелка указывает на анастомоз); **В** – ксенопротез (стрелка указывает на люминальную поверхность). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$.

Fig. 2. Devitalized prosthesis in 9 months post transplantation: **A** – gross impression (1 – aorta; 2 – prostheses; arrow points to anastomosis); **B** – xenoprosthes (arrow points to luminal surface). Hematoxylin and eosin staining, $\times 200$.

наблюдались гладкомышечные клетки и миофибробласты; внешняя оболочка (адвентиция) содержала фибробласты, сеть мелких артерий, связанных с периадвентицией и жировой тканью (рис. 2, В).

Полученные результаты свидетельствуют о полной интеграции девитализированного ксенопротеза в организм реципиента, полноценной функциональности, гемо- и биосовместимости, а также устойчивости к структурной и кальциевой дегенерации, что с точки зрения патофизиологии означает обретение биологической структурой новой функции. Разработанные гипоиммуногенные биопротезы на основе ксеногенных тканей могут быть использованы в качестве как сосудистых протезов, так и экспериментальной модели для изучения процессов клеточного заселения и дифференцировки клеток при создании полноценных многослойных биоинженерных конструкций.

Литература

1. Бызов Д.В., Сынчикова О.П., Пушкова Е.Н. и др. Биотехнологические аспекты создания трансплантатов артерий // Биотехнология. – 2010. – Т. 3, №3. – С. 21–30.
2. Бызов Д.В., Чиж Н.А., Михайлова И.П., Пушкова Е.Н. и др. Девитализированные сосудистые протезы, исследование *in vivo* // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2011. – Т. 13, №4. – С. 81–90.
3. Джиджихия К.М., Каде А.Х., Занин С.А. Получение модели крупноочагового инфаркта миокарда в остром эксперименте на крысах // Фундаментальные исследования. – 2012. – №4 (часть 2). – С. 270–273.
4. Люсов В.А., Волов Н.А. Инфаркт миокарда. – М.: Литтера, 2010. – 240 с.
5. Слета И.В., Чиж Н.А., Гальченко С.Е., Сандомирский Б.П. Моделирование некроза миокарда с помощью криотехнологии // Биотехнология. – 2011. – Т. 4, №4. – С. 73–79.
6. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих / Под ред. В.Ю. Полякова. – М.: Мир, 1975. – 324 с.
7. Чиж Н.А., Бабаева А.Г., Слета И.В. и др. Особенности развития некроза миокарда и ремоделирования сердца после перевязки коронарной артерии и локальной криодеструкции левого желудочка // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. 21, №3 – С. 321–329.
8. Чуваев И.В., Глотова С.В. Оптимизация адреналиновой модели инфаркта миокарда на крысах // Материалы Всероссийского съезда ветеринарных фармакологов и токсикологов: «Эффективные и безопасные лекарственные средства в ветеринарии». – СПб, 2009. – С. 28–31.
9. Пат. 2286606 Российская Федерация МПК G 09 В 23/28. Способ моделирования очаговых повреждений миокарда / С.Л. Богородская, С.С. Голубев, Л.Б. Микашова; заявл. 22.03.2005, опублик. 27.10.2006. Бюл. №30.
10. Byzov D.V., Sandomirsky B.P. Creation of devitalization vascular prostheses of small diameter // Int. J. Artif. Org. – 2011. – Vol. 34, №8. – P. 708.
11. Van den Bos E.J., Mees B.E., de Waard M.C. et al. A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation // J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2005. – Vol. 289. – P. 1291–1300.

made 2 years within which bioprotheses functioned properly with providing a sufficient blood supply. Here-with there were no destructive-necrotic changes of xenoprosthesis walls and surrounding tissues, signs of rejection, immunogenic inflammations, fibrous-cicatricial regeneration of connective-tissue structure observed during whole observation term (Fig. 2A) [10].

Morphogenesis was accompanied with remodelling of devitalized xenovessels: a layer of own endothelial cells was formed; smooth muscle cells and myofibroblasts were present in middle coat; outer coat (adventitia) contained fibres of smooth muscle cells, fibroblasts, and network of arterioles bound with periadventitia and fat tissue (Fig. 2B).

The obtained results testify to a complete integration of a devitalized xenoprosthesis into a recipient organism, full functionality, hemo- and biocompatibility as well as resistance to structural and calcium degeneration, that in terms of pathophysiology means a new function gained by biological structure. Hypoimmunogenic bioprotheses based on xenogenic tissues may be used as both vascular prostheses and experimental model for studying cells populating and differentiation when developing full-valued multilayered bioengineered constructions.

References

1. Byzov D.V., Synchikova O.P., Pushkova E.N. et al. Biotechnological aspects of creation of vascular transplants // Biotechnologiya. – 2010. – Vol. 3, N3. – P.21–30.
2. Byzov D.V., Chizh N.A., Mikhaylova I.P., Pushkova E.N. et al. Devitalized vascular prostheses: in vivo study // Vestnik Transplantologii i Iskusstvennykh Organov. – 2011. – Vol. 12, N4. – P. 81–90.
3. Dzhidzhikhiya K.M., Kade A.Kh., Zanin S.A. Model of large-focal myocardial infarction in acute experiment performed in rats // Fundamentalnye Issledovaniya. – 2012. – N4 (Part 2). – P. 270–273.
4. Lyusov V.A., Volov N.A. Myocardial infarction. – Moscow: Litera, 2010. – 240 p.
5. Sleta I.V., Chizh N.A., Galchenko S.E., Sandomirsky B.P. Modelling of myocardial necrosis with cryotechnology // Biotechnologiya. – 2011. – Vol. 4, №4. – P. 73–79.
6. Weekly B. Electronic microscopy for beginners / Ed. by V.Yu. Polyakov. – Moscow: Mir, 1975. – 324 p.
7. Chizh N.A., Babayeva A.G., Sleta I.V. et al. Peculiarities of myocardial necrosis development and heart remodelling after coronary artery ligation and left ventricle local cryodestruction // Problems of Cryobiology. – 2011. – Vol. 21, №3. – P. 321–329.
8. Chuvaev I.V., Glotova S.V. Optimization of adrenal model of myocardial infarction in rats // Proceeding of All-Russian Meeting of Veterinary Pharmacologists and Toxicologists 'Effective and nonhazardous drugs in veterinary'. – St. Petersburg, 2009. – P. 28–31.
9. Pat.2286606 of Russian Federation, IPC G09B23/28. Modelling of focal myocardial injuries / S.L. Bogorodskaya, S.S. Golubev, L.B. Mikhaylova. – Filed 22.03.2005. – Publ. 27.10.2006. – Bull. 30.
10. Byzov D.V., Sandomirsky B.P. Creation of devitalization vascular prostheses of small diameter // Int. J. Artif. Org. – 2011. – Vol. 34, N8. – P. 708.
11. Van den Bos E.J., Mees B.E., de Waard M.C. et al. A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation // J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2005. – Vol. 289. – P. 1291–1300.

