

# Исследование альтернативных биоцидных сред для влажного хранения аллогенного материала для протезирования элементов сердечно-сосудистой системы

© М.Б. Васильева, А.А. Красильникова, Е.В. Кузнецова, М.В. Лунина, Л.М. Самойлова, Я.Л. Русакова, Е.В. Чепелева, А.А. Докучаева, Д.С. Сергеевичев

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Российская Федерация

Поступила в редакцию 28 сентября 2018 г. Исправлена 11 декабря 2018 г. Принята к печати 18 декабря 2018 г.

Для корреспонденции: Мария Борисовна Васильева, m\_vasilyeva@meshalkin.ru

**Цель** Сравнить антимикробную активность шести различных растворов (коктейля антибиотиков, хлоргексидина в двух концентрациях (0,05 и 0,2%), глицерина, смеси глицерина и этанола, а также коммерческого раствора «Оптифен») и оценить влияние данных растворов на механические свойства (прочность на разрыв и модуль Юнга) сосудистой стенки на протяжении 50 сут. хранения.

**Методы** Фрагменты аорт свиней хранили в исследуемых растворах на протяжении 50 сут. Микробиологический анализ образцов проводили через каждые 10 сут. Разрывные испытания для исследования механических свойств образцов проводили на 10, 30 и 50-е сут. при помощи разрывной машины ESM301 (MARK-10, США).

**Результаты** Микробиологический анализ показал, что образцы, которые хранили в растворе «Оптифен» и хлоргексидине 0,2%, были стерильны на протяжении всего срока эксперимента. При хранении в коктейле антибиотиков образцы оставались стерильными на протяжении 40 дней. Раствор хлоргексидина 0,05% и глицерин не обладали необходимыми биоцидными свойствами. На биомеханические свойства в наименьшей степени оказывает влияние хранение в растворе «Оптифен», а наибольшее — в хлоргексидине 0,2%.

**Заключение** На основании данных микробиологического анализа и исследования биомеханических свойств можно сделать вывод, что наиболее предпочтительной средой для длительного влажного хранения сосудов является препарат «Оптифен». Однако для окончательного выбора оптимальной среды хранения необходимы данные тщательного морфологического анализа образцов сосудистой стенки на различных сроках хранения в исследуемых растворах, а также после подкожной имплантации экспериментальным животным.

**Ключевые слова** антимикробные свойства; влажное хранение аллографтов; модуль Юнга; прочность; тканевая инженерия

**Цитировать:** Васильева М.Б., Красильникова А.А., Кузнецова Е.В., Лунина М.В., Самойлова Л.М., Русакова Я.Л., Чепелева Е.В., Докучаева А.А., Сергеевичев Д.С. Исследование альтернативных биоцидных сред для влажного хранения аллогенного материала для протезирования элементов сердечно-сосудистой системы. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2018;22(4):95-102. <http://dx.doi.org/10.21688/1681-3472-2018-4-95-102>

## Введение

Реконструктивная хирургия при патологии восходящего отдела аорты является одной из серьезных проблем сердечно-сосудистой хирургии. Одним из широко используемых методов хирургического лечения данной патологии является протезирование восходящего отдела аорты и аортального клапана клапаносодержащим кондуктом [1–3]. «Золотым стандартом» протезов для замены поврежденных элементов сердечно-сосудистой системы является аллогенный трупный материал, поскольку он обладает превосходными гемодинамическими свойствами, устойчив к инфекции, обладает низкой тромбогеннос-

тью [4], а также при его использовании наблюдается самый высокий уровень свободы от реопераций по поводу структурной дезорганизации ткани [1].

От момента изготовления до имплантации пациенту аллографт либо подвергают криоконсервации, либо хранят в коктейле антибиотиков и противогрибковых препаратов, воздействующих на максимально возможный спектр патогенов. Однако, как показывает практический опыт (в том числе лаборатории экспериментальной хирургии и морфологии ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России), оба метода имеют недостатки. При нарушении сложной и многоступенчатой методики криоконсервации возможно появление микрокристаллов



льда в стенке аллогraftа, что приводит к раннему разрушению соединительнотканного каркаса и кальцификации протеза после имплантации [5, 6]. Показано, что использование свежизготовленных graftов, которые не подвергали криоконсервации, а хранили в коктейле антибиотиков, снижает частоту реопераций, связанных с кальцификацией и разрушением протеза [7]. Однако влажное хранение аллогraftов в коктейле антибиотиков возможно в течение ограниченного периода времени (не более двух недель) [8], после чего аллогraft рекомендуется подвергнуть криоконсервации для более длительного хранения. Также известно, что остаточное количество антибиотиков в ткани аллогraftа является частой причиной аллергических реакций [9].

Таким образом, необходим поиск биоцидной среды для влажного хранения аллогraftов, которая предотвращает рост большинства типичных для человека патогенов и сохраняет механические прочностные свойства обработанной ткани близкими к нативному состоянию в течение длительного времени. Стоит отметить, что как повышение, так и понижение прочности сосудистой стенки в процессе хранения может привести к неблагоприятным последствиям после имплантации, таким как разрушение graftа и нарушение гемодинамики, что повышает вероятность повторной операции по замене graftа. Кроме того, идеальная среда хранения должна полностью удаляться из протеза путем промывания в физиологическом растворе непосредственно перед операцией (в течение 30 мин), и остаточное количество среды не должно оказывать токсического влияния на организм реципиента.

При поиске и разработке оптимальной среды для влажного хранения исследователи сталкиваются с технической трудностью: для экспериментальной работы по подбору оптимального состава биоцидной среды требуется большое количество аллогенного материала, что по понятным причинам невозможно (помимо этических моментов существуют строгие критерии отбора посмертных доноров для изъятия аллогraftов) [10]. Представленное в данной статье экспериментальное исследование по подбору оптимальной биоцидной среды проведено на ксеноматериале (фрагменты аорт свиней). Сравнили антимикробную активность шести различных растворов: коктейля из антибиотиков, хлоргексидина (ХГ) в двух концентрациях (0,05% и 0,2%), глицерина, смеси глицерина и этанола, коммерческого раствора «Оптифен», — а также оценили влияние данных растворов на механические свойства (прочность на разрыв и модуль Юнга) ксеногенных тканей сосудов на протяжении 50 сут. хранения.

## Методы

### Экспериментальный материал

В качестве экспериментального материала использовали выходной фрагмент аорты свиней. Материал забирали максимально возможным чистым способом в цехе убоя скота мясокомбината. Очищенные от свободно прилегающих тканей (адвентиции и жировой ткани) и отсеченные от корня фрагменты аорты помещали в охлажденный стерильный физиологический раствор для последующей транспортировки в лабораторию. Количество необходимого ксеноматериала определяли по следующему расчету: из одной аорты возможна заготовка 4 образцов на поперечные и 4 образцов на продольные прочностные испытания.

Дальнейшие манипуляции с сосудами проводили в стерильном боксе лаборатории экспериментальной хирургии и морфологии ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России. Аорты разрезаны на фрагменты 70×20 мм без видимых повреждений и естественных отверстий.

Образцы исходного поступившего материала (натив) направлены в микробиологическую лабораторию для определения начальной бактериально-грибковой обсемененности, а также исследованы их биомеханические свойства на разрывной машине ESM301 (MARK-10, США). Остальные фрагменты случайным образом распределены по исследуемым растворам и хранились в течение 50 сут. Общая схема эксперимента представлена на рис. 1.

### Исследуемые растворы

Фрагменты аорты случайным образом распределены на 6 групп, каждая из которых помещена в один из растворов:

I — коктейль антибиотиков (АБ): культуральная среда RPMI-1640 (BioloT, Россия), метронидазол 0,27 мг/мл, гентамицин 0,53 мг/мл, цефазолин 6,66 мг/мл, ампициллин 2,22 мг/мл, оксациллин 1,11 мг/мл, флуконазол 0,027 мг/мл. Через 48 ч произведена замена раствора на свежий с теми же концентрациями антибиотиков;

II — «Оптифен»: смесь 1,2-октандиола, феноксиэтанола, сорбиновой кислоты (1%) и этанола (20%) (патент RU 2580621C1 [11]);

III, IV — хлоргексидин 0,05% или 0,2%: раствор ХГ в дистиллированной воде с концентрацией 0,05 или 0,2%;

V — глицерин: глицерин (20%) в культуральной среде RPMI-1640 (BioloT, Россия);

VI — этанол-глицерин: этанол (10%) и глицерин (20%) в культуральной среде RPMI-1640 (BioloT, Россия).

Во всех исследуемых растворах фрагменты аорты хранились в течение 50 сут.

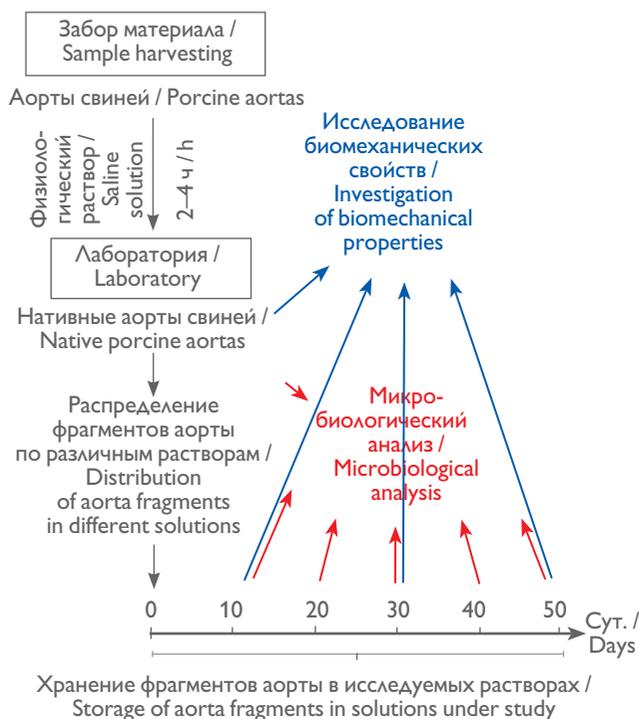


Рис. 1. Дизайн эксперимента Fig. 1. Study design

### Микробиологический анализ

Контроль бактериальной чистоты осуществляли из посева в каждый срок (10, 20, 30, 40 и 50 сут.) по 2 образца ткани из каждой группы (рис. 1). Для этого образцы тканей отрезали от основного фрагмента материала, помещали в стерильную пробирку, маркировали и передавали в бактериологическую лабораторию ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России.

### Исследование биомеханических свойств

Испытания прочности проводили для 10 образцов из каждой группы на 10, 30 и 50-е сут. (рис. 1). Использовали разрывную машину ESM301 (MARK-10, США). Скорость растяжения ткани 30 мм/мин. Растяжение образцов проводили отдельно в продольном и поперечном направлениях относительно оси сосуда. Образцы высекали из заготовок вырубной матрицей. Толщину образца трехкратно измеряли при помощи электронного цифрового толщиномера: ширина и длина образца соответствовала размерам матрицы (10 и 28,5 мм соответственно). Если разрыв происходил по месту закрепления образцов в зажимах, данные этого измерения не учитывали в анализе. Прочность на разрыв (Н/мм<sup>2</sup>) определяли как отношение значения максимальной силы (Н) к площади поперечного сечения (мм<sup>2</sup>) фрагмента аорты.

Модуль Юнга определяли по следующей формуле:

$$E = F \times l / S \times \Delta l,$$

где E — Модуль Юнга (МПа), F — максимальная сила (Н), l — длина матрицы (мм), S — площадь поперечного сечения образца (мм<sup>2</sup>),  $\Delta l$  — максимальное изменение длины фрагмента (мм) до разрыва образца.

### Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и апостериорного сравнения по критериям подлинной значимости LSD (пакет Statistica 8, StatSoft Inc., США). Порог статистической значимости установлен на уровне  $p < 0,05$ .

### Результаты

#### Микробиологический анализ

В исходных фрагментах аорты свиней (нативе) микробиологический анализ обнаружил:

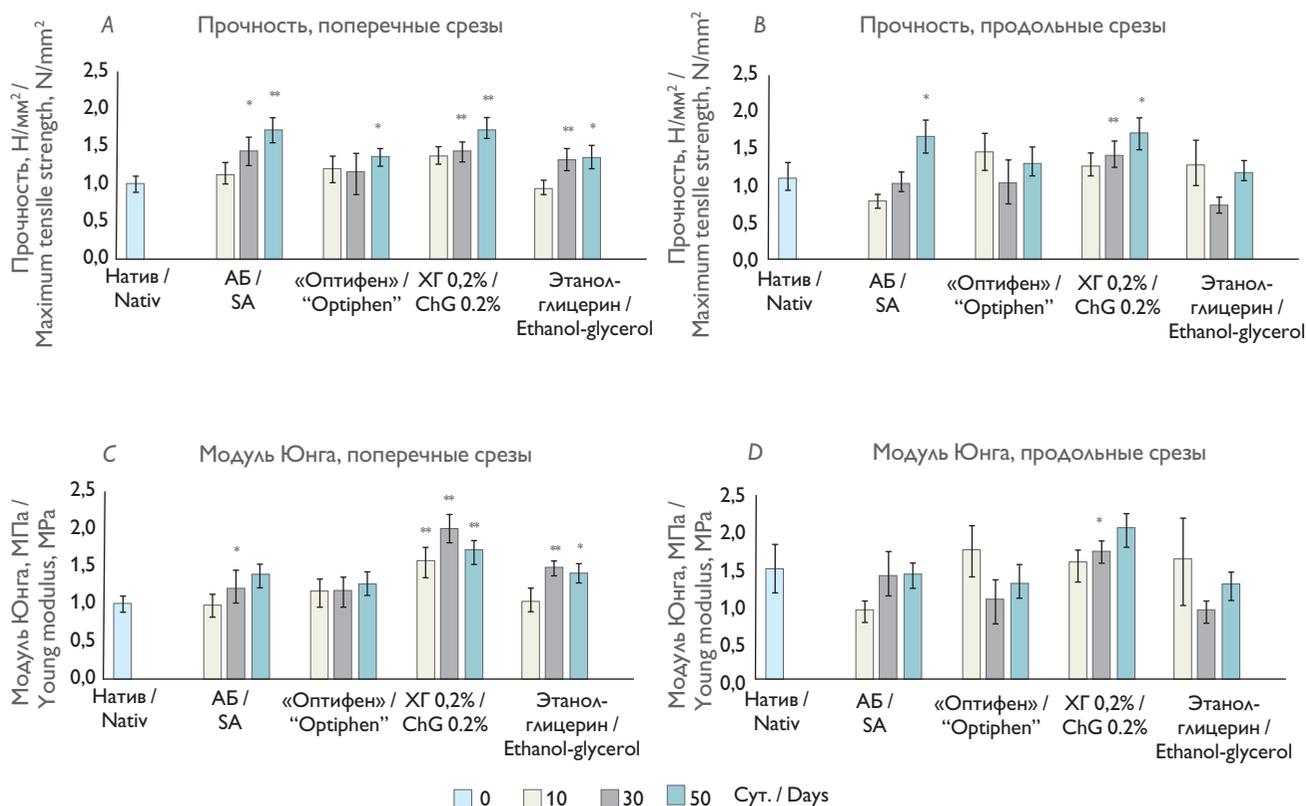
1. грамположительные кокки: *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp.;
2. грамотрицательные палочки: *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Aeromonas hydro*.

После хранения в растворе «Оптифен», ХГ 0,2% и этаноле-глицерине фрагменты аорты стерильны на протяжении всего срока наблюдения. При хранении в растворе АБ образцы остаются стерильными на протяжении 40 дней, на 50-й день хранения по микробиологическому анализу обнаружили *Candida non albicans* (грибы) и *Vacillus* spp. (грамположительная палочка). Раствор ХГ 0,05% и глицерин не обладают необходимыми дезинфицирующими свойствами, поскольку на 10-й день хранения по микробиологическому анализу обнаружили *Citrobacter freundii* (граммотрицательная палочка) в образцах, хранящихся в растворе ХГ 0,05%, и *Pseudomonas aeruginosa* (граммотрицательная палочка) в образцах, хранящихся в глицерине. Эти два раствора исключены из дальнейшего анализа.

Стоит отметить, что начиная с 20–30-х сут. наблюдения происходило помутнение раствора АБ, в растворе ХГ 0,2% после 10-х сут. хранения появилась светлая мелкая хлопьевидная взвесь. «Оптифен», а также смесь, содержащая спирт и глицерин, оставались прозрачными на протяжении всего времени эксперимента.

#### Биомеханические свойства

Прочность поперечных срезов аорты свиней (рис. 2, А) при хранении во всех растворах статистически значимо



**Рис. 2.** Изменение биомеханических свойств фрагментов аорты свиней при хранении в исследуемых растворах: прочность, поперечные срезы (А); прочность, продольные срезы (В); модуль Юнга, поперечные срезы (С); модуль Юнга, продольные срезы (D)  
*Примечание.* АБ — раствор антибиотиков, ХГ — хлоргексидин. ANOVA и LSD-тест, n = 10, при сравнении с нативом: \* — p<0,05, \*\* — p<0,01

**Fig. 2.** Changes of biomechanical properties of porcine aorta fragments when stored in solutions under study. Strength, cross-sections (A); Strength, longitudinal sections (B); Young modulus, cross-section (C); Young modulus, longitudinal sections (D). SA, solution of antibiotics, ChG, chlorhexidine. ANOVA and LSD test, n = 10, when compared with the native one: \* — p<0.05, \*\* — p<0.01

увеличивается к 50-м сут. по сравнению с исходными необработанными фрагментами аорты (нативом). При этом в группах раствора «Оптифен» и этанола-глицерина прочность увеличивается на 26%, а в группах АБ и ХГ на 39 и 41% соответственно. Стоит отметить, что во всех растворах, кроме препарата «Оптифен», увеличение прочности наблюдается уже на 30-е сут. и продолжает увеличиваться к 50-м сут. При хранении в ХГ 0,2% увеличение прочности на 10-е сут. почти достигает статистической значимости (p = 0,0515).

Прочность продольных срезов аорты не изменяется при хранении в растворе «Оптифен» и этанола-глицерине (рис. 2, В). Однако она статистически значимо увеличивается на 35% на 50-е сут. при хранении в растворе АБ, а при хранении в ХГ 0,2% статистически значимо повышается на 24% уже на 30-е сут. (на 36% на 50-е сут.).

Модуль Юнга (модуль упругости) для поперечных срезов аорты (рис. 2, С) при хранении в АБ статистически значимо увеличивается на 50-е сут. (на 28%), при хранении в этанола-глицерине — на 30-е сут. (на 33%), а при хранении в ХГ 0,2% — на 10-е сут. (на 37%). Хранение фрагментов аорты в растворе «Оптифен» не приводит к изменению модуля Юнга по сравнению с нативными образцами на протяжении всего эксперимента.

Для продольных срезов аорты (рис. 2, D) наблюдается большой разброс значений модуля Юнга. Статистической значимости достигает только увеличение модуля упругости при хранении в ХГ 0,2% в течение 30 сут. (на 16%).

Биомеханические параметры для продольных и поперечных фрагментов аорты не изменяются при хранении в глицерине в течение 10 сут. В растворе ХГ 0,05% прочность и модуль Юнга для поперечных фрагментов увеличивается по сравнению с нативными фрагментами на 10-е сут. хранения

на 44 и 32% соответственно. Однако поскольку для этих растворов получены неудовлетворительные результаты микробиологического анализа, исследование биомеханических свойств на более поздних сроках для них не проводили.

Абсолютные значения прочности и модуля Юнга для поперечных и продольных срезов аорты свиней при хранении в исследуемых растворах представлены в *таблице*.

## Обсуждение

Тщательная антимикробная обработка тканей и органов, полученных от посмертных доноров, чрезвычайно важна при изготовлении аллографтов для сердечно-сосудистой хирургии [12]; при этом такая обработка не должна изменять или повреждать структуру ткани. С целью наилучшего сохранения структуры и свойств сосудистых аллографтов при влажном хранении ранее проводили исследования различных соединений с антимикробной активностью, таких как этанол, перуксусная кислота, метиленовый синий, гипохлорит натрия [10, 13–16]. Однако время влажного хранения в этих исследованиях составляло от нескольких дней до двух недель. Существует необходимость в увеличении периода влажного хранения до нескольких месяцев с целью увеличения доступности

донорских тканей в течение более длительного периода времени без криоконсервации. В представленной работе аорты свиней хранили в различных растворах в течение 50 сут. При этом каждые 10 сут. забирали образцы для микробиологического анализа, а исследование биомеханических свойств проводили на 10, 30 и 50-е сут.

В качестве контрольной биоцидной среды использован коктейль из антибиотиков и противогрибковых препаратов (метронидазол, гентамицин, цефазолин, ампициллин, оксациллин и флуконазол). Стоит отметить, что различные банки тканей используют разные составы таких коктейлей [17–21], при этом зачастую отличается не только состав антибиотиков, но также их концентрация и условия хранения (при комнатной температуре или в холодильнике) [12, 15]. Мы использовали коктейль антибиотиков, который традиционно применяется для обработки донорских тканей в ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России и хорошо зарекомендовал себя при кратковременном влажном хранении аллографтов. Согласно результатам, данный коктейль антибиотиков эффективно стерилизует фрагменты аорты на протяжении 40 сут., однако при более длительном хранении антимикробная эффективность снижается. Кроме того, при

Прочность и модуль Юнга фрагментов аорты свиней при хранении в исследуемых растворах

	Натив	Раствор антибиотиков	«Оптифен»	Хлоргексидин 0,2%	Этанол-глицерин
Прочность, поперечные срезы					
0 сут.	1,05±0,07				
10 сут.		1,15±0,13	1,22±0,14	1,42±0,09	0,97±0,06
30 сут.		1,47±0,19*	1,22±0,16	1,47±0,11**	1,35±0,10**
50 сут.		1,74±0,13**	1,42±0,08*	1,78±0,13**	1,41±0,14*
Прочность, продольные срезы					
0 сут.	0,89±0,15				
10 сут.		0,65±0,06	1,18±0,22	1,05±0,10	1,03±0,24
30 сут.		0,84±0,13	0,85±0,23	1,16±0,08**	0,61±0,04
50 сут.		1,36±0,21*	1,05±0,17	1,38±0,15*	0,94±0,11
Модуль Юнга, поперечные срезы					
0 сут.	0,98±0,25				
10 сут.		0,97±0,15	1,15±0,19	1,54±0,23**	1,03±0,15
30 сут.		1,20±0,22*	1,15±0,17	1,99±0,16**	1,46±0,08**
50 сут.		1,36±0,12	1,23±0,14	1,68±0,15**	1,39±0,15*
Модуль Юнга, продольные срезы					
0 сут.	1,17±0,25				
10 сут.		0,71±0,09	1,37±0,27	1,25±0,15	1,25±0,44
30 сут.		1,08±0,27	0,86±0,22	1,38±0,08*	0,71±0,10
50 сут.		1,09±0,15	1,04±0,19	1,59±0,17	0,98±0,15

Примечание. Данные представлены в виде среднего ± ошибка среднего. ANOVA и LSD-тест, n = 10, при сравнении с нативом:

\* — p<0,05, \*\* — p<0,01

длительном влажном хранении происходит увеличение прочности (в поперечном направлении уже на 30-е сут., а в продольном — на 50-е сут. хранения) и модуля Юнга (в поперечном направлении на 50-е сут. хранения), что свидетельствует о негативном влиянии данной среды хранения на структуру сосудистой стенки.

«Оптифен» — это запатентованная биоцидная композиция для асептического хранения консервированного протезного материала из тканей животного происхождения (патент RU 2580621С1). Антимикробный агент представляет собой смесь двухатомного спирта жирного ряда, феноксиэтанола и сорбиновой кислоты. По результатам исследования, данный препарат эффективно дезинфицирует сосуды на протяжении всего срока наблюдения, а также в наименьшей степени, по сравнению с другими исследуемыми растворами, влияет на биомеханические свойства, увеличивая только прочность в поперечном направлении к 50-м сут. наблюдения.

Хлоргексидин — доступный монокомпонентный препарат, в достаточно низких концентрациях обладающий бактерицидными свойствами для широкого спектра патогенов [22, 23]. При хранении в растворе ХГ с концентрацией 0,2% образцы были стерильны на протяжении всего эксперимента, однако наблюдается увеличение прочности и модуля Юнга как в продольном, так и поперечном направлении на 30-е сут. (а в случае модуля Юнга для поперечных срезов — уже на 10-е), что свидетельствует о значительном влиянии данного препарата на структуру сосудистой стенки. При снижении концентрации ХГ до 0,05% наблюдается бактериальная обсемененность образцов на 10-е сут. эксперимента, что свидетельствует о недостаточной бактерицидной эффективности данной концентрации. При этом прочность на разрыв и модуль Юнга в поперечном направлении увеличились по сравнению с нативом. В связи с этим данная концентрация ХГ исключена из дальнейшего анализа. Влияние хлоргексидина на биомеханические свойства сосудистой стенки можно объяснить тем, что в его состав входят положительно заряженные гуанидиновые группы, которые могут связываться с отрицательно заряженными аминокислотами (например, глутаминовой кислотой), входящими в состав коллагеновых волокон. Вследствие такого взаимодействия может изменяться конформация структурных белков, что, по-видимому, приводит к увеличению прочностных свойств стенки сосуда.

Высокие концентрации глицерина (85–98%) традиционно используют для консервации и обеззараживания кожных лоскутов [24, 25]. Данные пилотного эксперимента, проведенного в нашей лаборатории, показали, что глицерин в концентрациях 40 и 80% приводит к излишнему упрочнению сосудистой стенки, в то время как концен-

трация 20% не влияет на биомеханические свойства (неопубликованные данные). В представленной работе мы выявили, что глицерин в концентрации 20% не обладает достаточной бактерицидной эффективностью, поскольку на 10-е сут. эксперимента наблюдалась бактериальная обсемененность образцов аорты. В следствие чего глицерин исключен из дальнейшего анализа.

Мы предположили, что добавление этанола (10%) к глицерину (20%) улучшит бактерицидные свойства смеси. Результаты подтвердили эту гипотезу, поскольку образцы аорты были стерильны при хранении в данной смеси на протяжении всего эксперимента. Кроме того, ранее показано, что этанол способствует девитализации сосудистой стенки, что в дальнейшем должно снизить иммунный ответ реципиента на чужеродную ткань [13]. Однако в ходе анализа изменения биомеханических свойств выявили негативное влияние длительного хранения фрагментов аорты в данной смеси, поскольку увеличиваются прочность и модуль Юнга в поперечном направлении через 30 и 50 сут.

## Заключение

На основании данных микробиологического анализа и исследования биомеханических свойств можно сделать вывод, что предпочтительной средой для длительного влажного хранения сосудов является препарат «Оптифен», поскольку он обладает выраженной антимикробной эффективностью и в наименьшей степени влияет на структуру сосудистой стенки. Однако для окончательного выбора оптимальной среды хранения необходимы данные тщательного морфологического анализа образцов сосудистой стенки на различных сроках хранения в исследуемых растворах, а также после подкожной имплантации экспериментальным животным, что является целью дальнейшего исследования.

## Финансирование

Исследование не имело спонсорской поддержки.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн работы: М.Б. Васильева, Д.С. Сергеевичев

Проведение эксперимента, сбор данных: М.Б. Васильева, Е.В. Кузнецова, Я.Л. Русакова, Е.В. Чепелева, А.А. Докучаева

Микробиологический анализ: М.В. Лунина, Л.М. Самойлова

Анализ и статистическая обработка данных:  
А.А. Красильникова, М.Б. Васильева

Написание статьи: А.А. Красильникова

Редактирование статьи: М.Б. Васильева, Д.С. Сергеевичев

Утверждение окончательного варианта статьи:  
М.Б. Васильева, А.А. Красильникова, Е.В. Кузнецова,  
М.В. Лунина, Л.М. Самойлова, Я.Л. Русакова, Е.С. Чепелева,  
А.А. Докучаева, Д.С. Сергеевичев

## ORCID ID

М.Б. Васильева, <https://orcid.org/0000-0001-8393-8210>

А.А. Красильникова, <https://orcid.org/0000-0001-5511-664X>

Е.В. Кузнецова, <https://orcid.org/0000-0001-5417-6624>

М.В. Лунина, <https://orcid.org/0000-0003-0388-1942>

Л.М. Самойлова, <https://orcid.org/0000-0003-3273-3498>

Я.Л. Русакова, <https://orcid.org/0000-0003-1994-5787>

Е.В. Чепелева, <https://orcid.org/0000-0003-0715-4451>

А.А. Докучаева, <https://orcid.org/0000-0002-3260-6491>

Д.С. Сергеевичев, <https://orcid.org/0000-0002-5027-6561>

## Список литературы / References

1. Takkenberg J.J., Bogers A.J. Allografts for aortic valve and root replacement: veni vidi vici? *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2004;2(1):97-105. PMID: 15038417. <http://dx.doi.org/10.1586/14779072.2.1.97>
2. Arabkhani B., Bekkers J.A., Andrinopoulou E.R., Roos-Hesselink J.W., Takkenberg J.J., Bogers A.J. Allografts in aortic position: Insights from a 27-year, single-center prospective study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2016;152(6):1572-1579.e3. PMID: 27842683. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcvs.2016.08.013>
3. Демидов Д. П., Астапов Д. А., Богачев-Прокофьев А. В., Железнев С.И. Оценка качества жизни после протезирования аортального клапана биологическими протезами у пациентов пожилого возраста. *Патология кровообращения и кардиохирургия.* 2017;21(3):40-47. <http://dx.doi.org/10.21688-1681-3472-2017-3-40-47> [Demidov D.P., Astapov D.A., Bogachev-Prokophiev A.V., Zheleznev S.I. Quality of life after aortic valve replacement with biological prostheses in elderly patients. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya = Circulation Pathology and Cardiac Surgery.* 2017;21(3):40-47. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.21688/1681-3472-2017-3-40-47>]
4. Спиридонов С.В., Одинцов В.О., Щетинко Н.Н., Мозгова Е.А., Гринчук И.И., Островский Ю.П. Аортальные аллографты в мировой кардиохирургии: исторические аспекты внедрения в клиническую практику и обзор результатов использования. *Медицинский журнал.* 2015;1:55-67. [Spiridonov S.V., Odincov V.O., Schetinko N.N., Mozgova E.A., Grinchuk I.I., Ostrovskiy Y.P. Aortic allografts in world cardiac surgery: Historical aspects of implementation in clinical practice and review of results of use. *Medical Journal.* 2015;1:55-67. (In Russ.)]
5. Lisy M., Kalender G., Schenke-Layland K., Brockbank K.G.M., Biermann A., Stock U.A. Allograft heart valves: current aspects and future applications. *Biopreserv Biobank.* 2017;15(2):148-157. PMID: 28151005. <http://dx.doi.org/10.1089/bio.2016.0070>
6. Brockbank K.G.M., Lightfoot F.G., Song Y.C., Taylor M.J. Interstitial ice formation in cryopreserved homografts: A possible cause of tissue deterioration and calcification in vivo. *J Heart Valve Dis.* 2000;9(2):200-6. PMID: 10772037.
7. Cebotari S., Tudorache I., Ciubotaru A., Boethig D., Sarikouch S., Goerler A., Lichtenberg A., Cheptanaru E., Barnaciuc S., Cazacu A., Maliga O., Repin O., Maniuc L., Breyman T., Haverich A. Use of fresh decellularized allografts for pulmonary valve replacement may reduce the reoperation rate in children and young adults: early report. *Circulation.* 2011;124(11 Suppl):S115-23. PMID: 21911800. <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.012161>.
8. Barratt-Boyes B.G., Roche A.H., Subramanian R., Pemberton J.R., Whitlock R.M. Long-term follow-up of patients with the antibiotic-sterilized aortic homograft valve inserted freehand in the aortic position. *Circulation.* 1987;75(4):768-77. PMID: 3829340. <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.75.4.768>
9. Gatto C., Giurgola L., D'Amato Tothova J. A suitable and efficient procedure for the removal of decontaminating antibiotics from tissue allografts. *Cell Tissue Bank.* 2013;14(1):107-115. PMID: 22407218. <http://dx.doi.org/10.1007/s10561-012-9305-5>
10. Cheung D.T., Weber P.A., Grobe A.C., Shomura Y., Choo S.J., Luo H.H., Marchion D.C., Duran C.M. A new method for the preservation of aortic valve homografts. *J Heart Valve Dis.* 2001;10(6):728-34. PMID: 11767178.
11. Журавлева И.Ю. Бицидная композиция для асептического хранения консервированного протезного материала из тканей животного происхождения. Патент РФ на изобретение RU 2580621C1. Бюлл. № 10 (от 10.04.2016). [Zhuravleva I.Y. Biocidal composition for aseptic storage of prosthetic material from animal tissue. RF patent for invention RU 2580621C1. Bull. No. 10 (10.04.2016).]
12. Jashari R., Tabaku M., Van Hoeck B., Cochéz C., Callant M., Vanderkelen A. Decontamination of heart valve and arterial allografts in the European Homograft Bank (EHB): Comparison of two different antibiotic cocktails in low temperature conditions. *Cell Tissue Bank.* 2007;8(4):247-55. PMID: 17440832. <http://dx.doi.org/10.1007/s10561-007-9040-5>
13. Cheung D.T., Suk Jung Choo, Grobe A.C., Marchion D.C., Luo H.H., Pang D.C., Favara B.E., Oury J.H., Duran C.M.G. Behavior of vital and killed autologous pericardium in the descending aorta of sheep. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;118(6):998-1005. PMID: 10595970. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5223\(99\)70093-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5223(99)70093-0)
14. Wallace R.B., Londe S.P., Titus J.L. Aortic valve replacement with preserved aortic valve homografts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1974;67(1):44-52. PMID: 4808912.
15. Pitt T.L., Tidey K., Roy A., Ancliff S., Lomas R., McDonald C.P. Activity of four antimicrobial cocktails for tissue allograft decontamination against bacteria and Candida spp. of known susceptibility at different temperatures. *Cell Tissue Bank.* 2014;15(1):119-125. PMID: 23765096. <http://dx.doi.org/10.1007/s10561-013-9382-0>
16. Paolin A., Trojan D., Carniato A., Tasca F., Massarin E., Tugnoli A., Cogliati E. Analysis of the effectiveness of Sodium Hypochlorite decontamination of cadaveric human tissues at retrieval. *Cell Tissue Bank.* 2016;17(4):611-618. PMID: 27757727; PMCID: PMC5116049. <http://dx.doi.org/10.1007/s10561-016-9589-y>
17. Gall K.L., Smith S.E., Willmette C.A., O'Brien M.F. Allograft heart valve viability and valve-processing variables. *Ann Thorac Surg.* 1998;65(4):1032-8. PMID: 9564923. [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-4975\(98\)00085-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-4975(98)00085-X)
18. Ross D. The Ross operation. *Journal of Cardiac Surgery.* 2002;17(3):188-193. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1540-8191.2002.tb01198.x>
19. Satish A., Chandrasekaran J., Indhumath T., Cherian K.M., Ramesh B. 360° in making acellular and biocompatible xenografts for surgical applications. *J Surg Open Access.* 2016;2(6):1-11.
20. Serafini A., Riello E., Trojan D., Cogliati E., Palù G., Manganelli R., Paolin A. Evaluation of new antibiotic cocktails against contaminating bacteria found in allograft tissues. *Cell Tissue Bank.* 2016;17(4):619-628.

- PMID: 27604467; PMCID: PMC5116045. <http://dx.doi.org/10.1007/s10561-016-9581-6>
21. Germain M., Strong D.M., Dowling G., Mohr J., Duong A., Garibaldi A., Simunovic N., Ayeni O.R. Disinfection of human cardiac valve allografts in tissue banking: systematic review report. *Cell Tissue Bank.* 2016;17:593-601. PMCID: PMC5116039; PMID: 27522194. <http://dx.doi.org/10.1007/s10561-016-9570-9>
22. Mohr J., Germain M., Winters M., Fraser S., Duong A., Garibaldi A., Simunovic N., Alsop D., Dao D., Bessemer R., Ayeni O.R., on behalf of the Bioburden Steering Committee, Appleby A., Brubaker S., Callum J., Dowling G., Eastlund T., Fearon M., Germain M., Johnston C., Lotherington K., McTaggart K., Mohr J., Preiksaitis J., Strong M., Young K., Zhao J., Rockl G., Shaver K., Thibault L., Tremblay J. Disinfection of human musculoskeletal allografts in tissue banking: a systematic review. *Cell Tissue Bank.* 2016;17(4):573-584. PMID: 27665294; PMCID: PMC5116033. <http://dx.doi.org/10.1007/s10561-016-9584-3>
23. Loskutov A.E., Digtar A.V., Stepanskiy D.A. A comparative evaluation of the antimicrobial activity of local antiseptics in revision hip arthroplasty. *Medicni Perspekt = Medical Perspect.* 2017;22(1):25-32. <http://dx.doi.org/10.26641/2307-0404.2017.1.100870>
24. Huang Q., Pegg D.E., Kearney J.N. Banking of non-viable skin allografts using high concentrations of glycerol or propylene glycol. *Cell Tissue Bank.* 2004;5(1):3-21. <http://dx.doi.org/10.1023/B:CATB.0000022234.02322.13>
25. Wood J.M.B., Soldin M., Shaw T.J., Szarko M. The biomechanical and histological sequelae of common skin banking methods. *J Biomech.* 2014;47(5):1215-9. PMID: 24480702. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2013.12.034>

### Alternative biocidal solutions for storage of allogeneic vascular grafts used for the replacement of cardiovascular elements

Maria B. Vasilyeva, Anna A. Krasilnikova, Elena V. Kuznetsova, Maria V. Lunina, Larisa. M. Samoylova, Yanina L. Rusakova, Elena V. Chepeleva, Anna A. Dokuchaeva, David S. Sergeevichev

Meshalkin National Medical Research Center, Ministry of Health of Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation

**Corresponding author.** Maria B. Vasilyeva, [m\\_vasilyeva@meshalkin.ru](mailto:m_vasilyeva@meshalkin.ru)

**Aim.** The aim of this study was to compare the antimicrobial activity of six different solutions: a cocktail of antibiotics, chlorhexidine in two concentrations (0.05% and 0.2%), glycerol, a mixture of glycerin and ethanol, and a commercial decontamination solution "Optiphen". In addition, we evaluated the influence of these solutions on the mechanical properties (tensile strength and Young's modulus) of the vascular wall during 50 days of storage.

**Methods.** Samples of porcine aortas were stored in the solutions under study for 50 days. Microbiological analysis of the samples was carried out every 10 days. The elastic modulus and tensile strength were determined by uniaxial measurements using a tensile testing machine ESM301 (MARK-10, USA) at 10, 30, and 50 days of the experiment.

**Results.** Microbiological analysis has demonstrated that the samples stored in solution "Optiphen" and chlorhexidine 0.2% were sterile throughout the experiment (50 days). When stored in the cocktail of antibiotics, the samples remained sterile for 40 days. The solution of chlorhexidine 0.05% and glycerol had no required disinfecting properties. Biomechanical properties were the least affected by storage in solution "Optiphen", and were the most affected by storage in chlorhexidine 0.2%.

**Conclusion.** Microbiological analysis and the study of biomechanical properties have demonstrated that the most suitable solution for long-term storage of vessels without cryoconservation was solution "Optiphen". However, a detailed morphological analysis of the vascular wall samples is required at different storage times and after subcutaneous implantation in rats, for the final choice of the optimal storage medium.

**Keywords:** decontamination properties; elastic modulus; storage of allografts; tensile strength; tissue engineering

Received 28 September 2018. Revised 11 December 2018. Accepted 18 December 2018.

**Funding:** The study did not have sponsorship.

**Conflict of interest:** Authors declare no conflict of interest.

#### Author contributions

Conception and study design: M.B. Vasilyeva, D.S. Sergeevichev

Experiment performance, data collection: M.B. Vasilyeva, E.V. Kuznetsova, Ya.L. Rusakova, E.V. Chepeleva, A.A. Dokuchaeva

Microbiological analysis: M.V. Lunina, L.M. Samoylova

Statistical analysis: A.A. Krasilnikova, M.B. Vasilyeva

Drafting the article: A.A. Krasilnikova

Critical revision of the article: M.B. Vasilyeva, D.S. Sergeevichev

Final approval of the version to be published: M.B. Vasilyeva, A.A. Krasilnikova, E.V. Kuznetsova, M.V. Lunina, L.M. Samoylova, Ya.L. Rusakova, E.V. Chepeleva, A.A. Dokuchaeva, D.S. Sergeevichev

#### ORCID ID

M.B. Vasilyeva, <https://orcid.org/0000-0001-8393-8210>

A.A. Krasilnikova, <https://orcid.org/0000-0001-5511-664X>

E.V. Kuznetsova, <https://orcid.org/0000-0001-5417-6624>

M.V. Lunina, <https://orcid.org/0000-0003-0388-1942>

L.M. Samoylova, <https://orcid.org/0000-0003-3273-3498>

Ya.L. Rusakova <https://orcid.org/0000-0003-1994-5787>

E.V. Chepeleva, <https://orcid.org/0000-0003-0715-4451>

A.A. Dokuchaeva <https://orcid.org/0000-0002-3260-6491>

D.S. Sergeevichev, <https://orcid.org/0000-0002-5027-6561>

**Copyright:** © 2018 Vasilyeva et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 License.

**How to cite:** Vasilyeva M.B., Krasilnikova A.A., Kuznetsova E.V., Lunina M.V., Samoylova L.M., Rusakova Ya.L., Chepeleva E.V., Dokuchaeva A.A., Sergeevichev D.S. Alternative biocidal solutions for storage of allogeneic vascular grafts used for the replacement of cardiovascular elements. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokirurgiya = Circulation Pathology and Cardiac Surgery.* 2018;22(4):95-102. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.21688/1681-3472-2018-4-95-102>