УДК 616.126.3-007-1-089.844
DOI 10.17802/2306-1278-2020-9-1-63-73

ВЛИЯНИЕ БИОЦИДНЫХ РАСТВОРОВ И ВЛАЖНОГО ХРАНЕНИЯ ТКАНЕЙ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СТЕНКИ АОРТЫ У СВИНЕЙ

М.Б. Васильева[1] ✉, Е.В. Кузнецова[1], Я.Л. Русакова[1], Е.В. Чепелева[1], А.А. Докучаева[1], Л.Н. Букреева[2], Д.С. Сергеевичев[1]

[1]Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Речкуновская 15, Новосибирск, Российская Федерация, 630055; [2]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт геологии и минералогии имени В.С. Соболева Сибирского отделения Российской академии наук, пр. Академика Коптюга 3, Новосибирск, Российская Федерация, 630090

Основные положения

• Исследовано влияние длительного влажного хранения материалов для трансплантации клапана сердца в биоцидных растворах различного состава на выраженность деградации соединительнотканного каркаса образцов.

• В эксперименте *in vivo* оценено накопление кальция в материалах для трансплантации клапана сердца после длительного хранения в биоцидных растворах различного состава.

Цель	Оценить влияние длительного влажного хранения фрагментов стенок аорт свиньи в биоцидных растворах (глутаральдегиде, коктейле антибиотиков, смеси спирта-глицерина, комплексном спиртовом растворе) на выраженность деградации соединительнотканного каркаса образцов и его способность аккумулировать соли кальция при подкожной имплантации мелким лабораторным животным в динамике (1 и 3 мес.).
Материалы и методы	Проведен гистологический анализ свежезабранного материала по истечении 50 сут. хранения в различных биоцидных растворах и после подкожной имплантации образцов крысам WAG на 1 и 3 мес. Количественное определение содержания кальция выполнено методом атомно-абсорбционной спектроскопии после 3 мес. подкожной имплантации экспериментальной ткани.
Результаты	По данным гистологического анализа образцов после хранения в экспериментальных средах выявлено, что в группах глутаральдегида, антибиотиков и комплексного спиртового раствора состояние соединительнотканного каркаса наиболее близко к норме (за исключением некоторой утраты клеточности в образцах). После месяца имплантации отмечалось прогрессирование деградации соединительной ткани, максимально выраженное в группе спирта-глицерина. После 3 мес. имплантации наиболее внешне сохранным соединительнотканный каркас выглядел в образцах группы глутаральдегида, в то время как материал группы спирта-глицерина имел самые выраженные нарушения. Однако именно в группе глутаральдегида кальцификация стромы препарата визуально была максимальной, в группе спирта-глицерина – минимальной. Методом атомно-абсорбционной спектроскопии установлено, что содержание кальция в группах комплексного спиртового раствора и спирта-глицерина статистически значимо ниже, чем в группе глутаральдегида. Содержание кальция в группе антибиотиков не имело статистически значимых отличий от группы глутаральдегида.
Заключение	На основании данных комплексной оценки влияния различных сред хранения на устойчивость соединительнотканного каркаса к последующей деградации и его способности накапливать кальций можно сделать вывод, что предпочтительной средой для длительного влажного хранения ксенопротезной сосудистой ткани является комплексный спиртовой раствор.

Ключевые слова	Ксенографт • Трансплантация • Антимикробные свойства • Минерализация тканей • Соединительнотканный каркас

Поступила в редакцию: *03.12.19;* ***поступила после доработки:*** *27.12.19;* ***принята к печати:*** *19.01.20*

Для корреспонденции: *Мария Борисовна Васильева, m_vasilyeva@meshalkin.ru; адрес: ул. Речкуновская 15, Новосибирск, Россия, 630055*

Corresponding author: *Vasilyeva Maria B., m_vasilyeva@meshalkin.ru; address: 15, Rechkunovskaya St., Novosibirsk, Russian Federation, 630055*

EFFECTS OF BIOCIDAL SOLUTIONS AND WET TISSUE TREATMENT ON THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF PORCINE AORTIC WALL

M.B. Vasilyeva[1] ✉, E.V. Kuznetsova[1], Y.L. Rusakova[1], E.V. Chepeleva[1], A.A. Dokuchaeva[1], L.N. Bukreeva[2], D.S. Sergeevichev[1]

[1]Meshalkin National Medical Research Center of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 15, Rechkunovskaya St., Novosibirsk, Russian Federation, 630055; [2]Sobolev Institute of Geology and Mineralogy Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 3, Academician Koptyug Av., Novosibirsk, Russian Federation, 630090

Highlights

• This article reports the effects of long-term wet treatment of materials for transplantation in biocide solutions of various compositions on the severity of degradation of the connective matrix of samples.

• In vivo experimental assessment of calcium in materials for heart valve transplantation after long-term treatment with biocide solutions of various compositions was performed.

Aim	To evaluate the effects of long-term wet treatment of porcine aortic wall fragments with biocidal solutions (glutaraldehyde, antibiotics, alcohol-glycerin mixture, complex alcohol solution (CAS)) on the severity of degradation of samples' connective matrix and their long-term ability to accumulate calcium during subcutaneous implantation in laboratory rats (1 and 3 months).
Methods	Histological analysis of freshly collected material was performed after 50 days of treatment with various biocidal solutions and after subcutaneous implantation of samples in small laboratory animals at 1 and 3 months. Calcium was measured with the atomic absorption spectroscopy after 3 months of subcutaneous implantation.
Results	Histological analysis reported that connective matrix of samples treated with glutaraldehyde, antibiotics, and CAS was similar to the native one (with the exception of partial loss of cellular components in samples). After 1 month of implantation, a moderate degradation of connective tissue was found. The treatment with the alcohol-glycerin mixture was associated with the most severe degradation. After 3 months of implantation, glutaraldehyde-treated samples had the most preserved connective matrix, while alcohol-glycerin-treated samples demonstrated severe connective matrix injury. However, severe calcific deposits were found in samples treated with glutaraldehyde, whereas mild ones were detected in samples treated with alcohol-glycerin. Atomic absorption spectroscopy reported that calcific deposits in Cas- and alcohol-glycerin-treated samples were 2.3 and 1.8 times lower than those in glutaraldehyde-treated samples. The calcium content in samples treated with antibiotics did not differ significantly from those in glutaraldehyde-treated samples.
Conclusion	The comprehensive analysis of the effects of various treatment media on the stability of connective matrix to subsequent degradation and its ability to accumulate calcium found that CAS was the most preferred medium for long-term wet treatment of xenoprosthetic vascular tissue.

Keywords Xenograft • Transplantology • Antimicrobial properties • Tissue mineralization • Connective tissue matrix

Received: *03.12.19;* ***received in revised form:*** *27.12.19;* ***accepted:*** *19.01.20*

Список сокращений

АБ – антибиотики
ГА – глутаральдегид
КСР – комплексный спиртовой раствор
СГ – спирт-глицерин
СТК – соединительнотканный каркас

Введение

Реконструкция патологически измененного восходящего отдела аорты является одной из сложных проблем современной сердечно-сосудистой хирургии. На сегодняшний день одним из широко используемых методов оперативного лечения патологии клапанов сердца является их протезирование различными клапансодержащими кондуитами [1–3]. Самый физиологичный вариант протезов для замены поврежденных элементов сердечно-сосудистой

системы – аллогенный донорский материал: обладает максимально сходными гемодинамическими характеристиками, устойчив к имеющейся у реципиента инфекции, отличается низкой тромбогенностью [4]. Также при его использовании отмечается самый высокий уровень свободы от повторных операций по поводу структурной дезорганизации ткани [1]. Однако широкое клиническое применение биологических протезов из донорского материала лимитировано ограниченной долговечностью ткани и, как следствие, структурными дисфункциями, большинство из которых обусловлено кальциевой дегенерацией [5].

Современные подходы к решению проблемы продления сроков службы донорских клапанов реализуются в нескольких направлениях, включающих улучшение их конструктивных характеристик, оптимизацию методов предимплантационной обработки и исследование факторов, потенциальное воздействующих на темпы кальцификации биоматериала [5]. До имплантации пациенту аллографт, как правило, либо подвергают криоконсервации, либо хранят в растворе антибактериальных и фунгицидных препаратов, воздействующих на максимально возможный спектр патогенов. Как показывает опыт, оба метода не идеальны. При нарушении методики замораживания и/или оттаивания материала возможно появление зон микро- и макроповреждения структуры аллографта, которые могут быть обнаружены только на хирургическом этапе или же скажутся на скорости деградации соединительнотканного каркаса (СТК) и кальцификации протеза после его установки [6, 7]. Показано, что использование графтов, которые хранились в коктейле антибиотиков без криоконсервации, приводит к снижению частоты реопераций, связанных с кальцификацией и деградацией протеза [8]. При этом влажное хранение аллографтов в растворе смеси антибиотиков возможно в течение ограниченного периода времени (не более двух недель) [9], после чего аллографт рекомендуется заморозить для более длительного хранения. Также известно, что остаточные количества антибиотиков в ткани аллографта являются частой причиной аллергических реакций [10].

Таким образом, по-прежнему существует потребность в поиске универсальной биоцидной среды для хранения аллографтов без замораживания. Такая среда должна предупреждать рост большинства типичных инфекционных агентов, сохранять исходную механическую прочность донорской ткани в течение определенного времени и полностью удаляться из ткани в течение 60 мин. На предыдущем этапе поисковых работ были выбраны растворы для исследования морфологического состояния СТК материала после хранения в данных биоцидных средах и последующей подкожной имплантации мелким лабораторным животным [11].

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 донорских тканей для изъятия аллографтов) [12]. Представленное в статье экспериментальное исследование по подбору оптимальной биоцидной среды, сохраняющей гистологическую структуру исследуемой ткани, проведено на ксеноматериале (фрагментах аорт свиней). Оценено гистологическое состояние экспериментальных тканей в течение 50 сут. хранения в четырех различных средах с биоцидными свойствами – глутаральдегиде (ГА), антибиотиках (АБ), спирте-глицерине (СГ), комплексном спиртовом растворе (КСР) – и при последующей подкожной имплантации образцов мелким лабораторным животным (крысам линии WAG) сроком на 1 и 3 мес.

Материалы и методы

Экспериментальный материал

В эксперименте использовали фрагменты восходящего отдела аорты свиней. Материал забирали чистым способом в цехе убоя скота мясокомбината. Полученные образцы аорт помещали в охлажденный стерильный физиологический раствор и транспортировали в лабораторию. Дальнейшие манипуляции с материалом проводили в стерильном боксе. Материал аорт был очищен от остатков прилегающих тканей и разрезан на фрагменты 5 х 5 мм (без видимых повреждений и естественных отверстий). Полученные фрагменты случайным образом распределены по исследуемым растворам (см. далее) и хранились в них в течение 50 сут. в стерильных условиях при комнатной температуре. Контрольные образцы (для оценки общего гистологического строения нативной экспериментальной ткани) фиксировали в формалине сразу после выделения. Непосредственно перед имплантацией образцы трехкратно промывали в стерильном физиологическом растворе по 20 мин. при комнатной температуре. Схема эксперимента представлена на рис. 1.

Исследуемые растворы

Состав исследуемых растворов:

I – ГА: раствор глутаральдегида с концентрацией 0,625% в дистиллированной воде;

II – АБ: культуральная среда RPMI-1640 (ООО «БиолоТ», 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 первые 48 ч раствор заменен на свежий с такими же концентрациями АБ;

III – СГ: этанол (10%) и глицерин (20%) в культуральной среде RPMI-1640 (ООО «БиолоТ», Россия);

IV – КСР: смесь, содержащая 1,2-октандиол, феноксиэтанол, сорбиновую кислоту и этанол (патент RU 2580621C1) [13].

Условия содержания и правила работы с экспериментальными животными

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России и проведено в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (EST № 123 от 18.03.1986 г., Страсбург), и приказом Минздрава России «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» (№ 199н от 01.04.2016 г.). Крысы линии WAG, самцы (массой 100±10 г), возрастом 3–4 нед. получены из ФИЦ ИЦиГ СО РАН. Животные содержались в стандартных условиях вивария и имели свободный доступ к воде и корму.

Подкожная имплантация образцов крысам

Фрагменты аорт (5 × 5 мм) всех групп имплантировали 19 крысам. Животных погружали в наркоз севофлюраном (Abbott Laboratories Ltd., Великобритания) с использованием аппарата искусственной вентиляции легких для мелких животных (Harvard Apparatus 683, США) и системы газовой анестезии (UgoBasile, Италия). На предварительно обработанной антисептиком спине животного делали четыре параллельных надреза и тупым способом в подкожной клетчатке формировали карманы, в которые помещали исследуемые образцы. Всего каждому животному имплантировали по четыре образца. Через месяц 4 крыс вывели из эксперимента эвтаназией с применением углекислого газа. По 4 образца каждой группы помещены в 10% раствор формалина для последующего гистологического анализа. Через 3 мес. оставшихся 15 животных вывели из эксперимента. По 4 образца из этой партии материала взяты для гистологического анализа, оставшиеся образцы отправлены для определения количественного содержания кальция. Гистологический анализ образцов материала после хранения (50 сут.) в различных типах биоцидных сред забирали на доимплантационном этапе.

Гистологическое исследование

Проводку материалов и приготовление парафиновых блоков выполняли по общепринятой методике. На ротационном микротоме HM 340E (Microm International GmbH, Германия) готовили гистологические срезы толщиной 5 мкм. Материалы окрашивали гематоксилином и эозином (по общепринятой методике) и выполняли окраску по Коссу (ООО «БиоВитрум», Россия) согласно рекомендациям производителя.

Атомно-абсорбционный метод анализа

Высушенные на воздухе образцы растворяли в 5 мл 14M HNO_3 при 70 °C. Далее смешивали 1 мл 12N HCl и 0,1 мл 25% буферного раствора $LaCl_3$. Содержание кальция определяли с использованием атомно-абсорбционного спектрофотометра Solaar M6 (Thermo Fisher Scientific, США). Калибровочную кривую строили по набору из стандартных растворов кальция (в восходящих концентрациях) в дистиллированной воде.

Статистический анализ

Результаты исследования обработаны методом вариационной статистики на программном обеспечении Statistica 8 (StatSoft Inc., США) с использованием критерия Стьюдента. Нормальность распределения и однородность дисперсии проверяли при помощи критерия Шапиро – Уилка и теста Левена. Данные на графике представлены в виде средних значений и ошибки среднего.

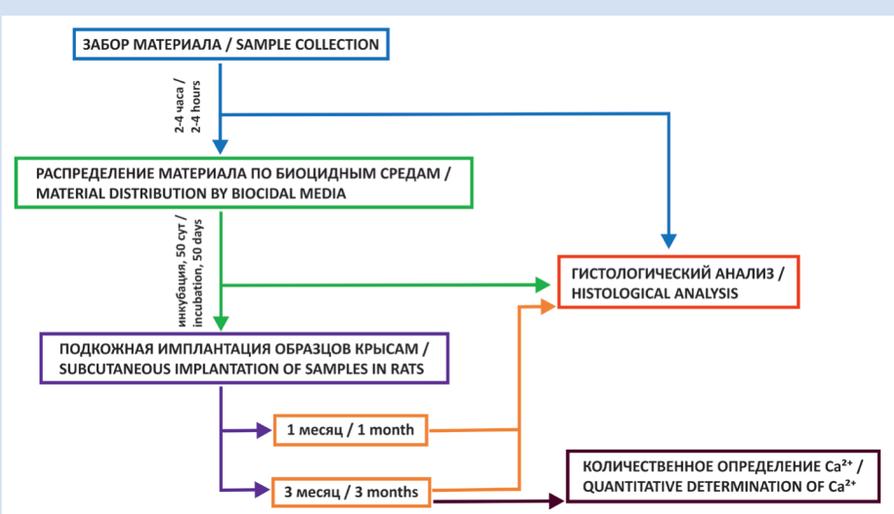

Рисунок 1. Дизайн эксперимента
Figure 1. Experimental design

Результаты

Гистологическое исследование

Гистологический анализ образцов материала после хранения (50 сут.) в различных типах биоцидных сред на доимплантационном этапе показал, что клеточность во всех группах была снижена в сравнении с нативной тканью (рис. 2).

Материал групп ГА, АБ и КСР имел схожую с нативной тканью архитектуру соединительнотканного каркаса. Образцы из группы ГА были несколько уплотнены в сравнении с нативным материалом. СГ-обработанные препараты отличались заметной деградацией СТК, волокна коллагена в препаратах фрагментированы и очагами утрачены, а волокна эластина распрямлены (рис. 3).

Исследование образцов после первого месяца имплантации показало разную степень выраженности деградации СТК эксплантов. Наиболее сохранным матриксом в этот период обладал материал группы ГА, максимально деградированными были препараты группы СГ. Для образцов, обработанных АБ, характерны признаки межволоконного отека, для группы КСР – фрагментация эластиновых пучков на отдельных участках (рис. 4).

При визуальной оценке срезов максимальная кальцификация обнаружена в группе ГА (по глыбчато-рассыпчатому типу), минимальная – в группе СГ (единичные мелкие кристаллы, находящиеся преимущественно с адвентициальной стороны препаратов и контурирующие эластин). Препараты групп КСР и АБ продемонстрировали умеренную степень минерализации по глыбчато-рассыпчатому типу без привязки к локализации.

При анализе гистологических образцов после 3 мес. имплантации во всех группах наблюдалась деструкция СТК, максимально выраженная в группе СГ, где имелась выраженная утрата коллагеновых фибрилл, остатки которых агрегировали на измененные

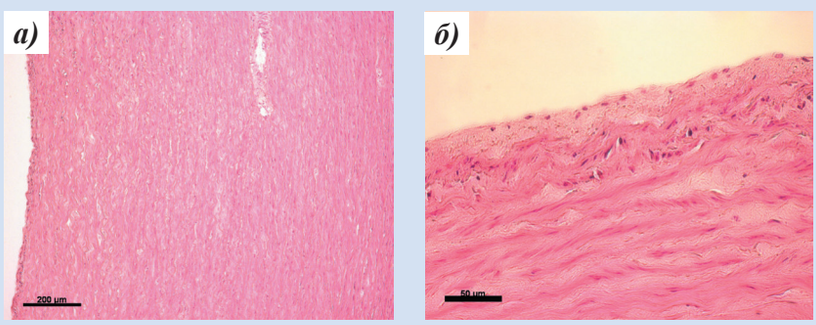

Рисунок 2. Структура соединительнотканного каркаса исходного материала без дополнительных обработок
Примечание: *а) – обзорный снимок препарата, б) – эндотелиальная поверхность, фрагмент. Окраска гематоксилином и эозином.*
Figure 2. Structure of native extracellular matrix without any additional processing
Note: *a) – typical image overview, b) – a fragment of endothelial surface. Hematoxylin - eosin staining.*

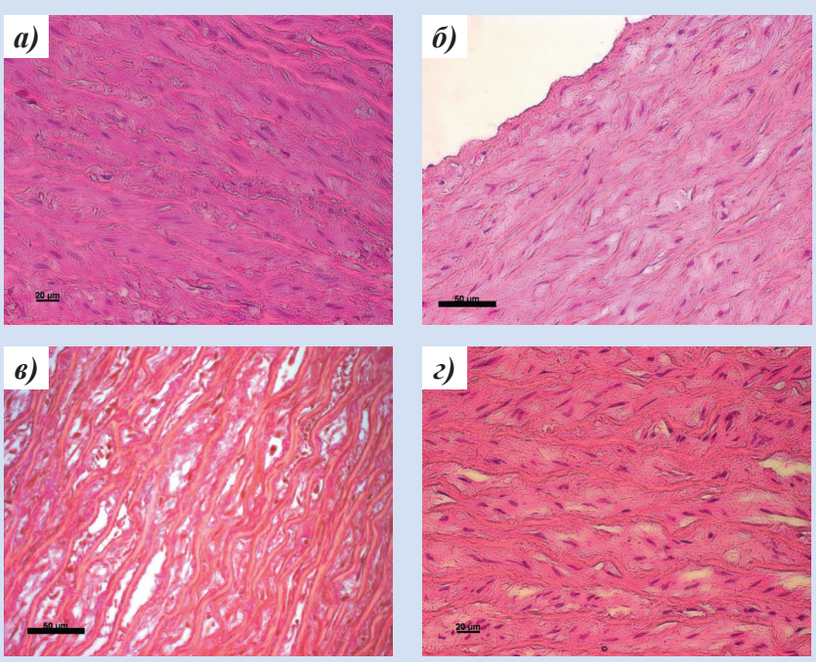

Рисунок 3. Структура соединительнотканного каркаса после 50 дней хранения
Примечание: *а) глутаральдегид, б) антибиотики, в) спирт-глицерин, г) комплексный спиртовой раствор. Окраска гематоксилином и эозином.*
Figure 3. Structure of native extracellular matrix after a 50-day treatment
Note: *a) – glutaraldehyde, b) – antibiotics, c) – alcohol-glycerin mixture, d) – complex alcohol solution. Hematoxylin - eosin staining.*

разглаженные эластиновые нити с формированием характерной картины, напоминающей колючую проволоку. ГА-фиксированные препараты были наиболее близки к нативным по расположению эластиновых волокон (присутствовала их микрофрагментация). Для препаратов групп АБ и КСР были свойственны признаки межволоконного отека и гомогенизации коллагеновой компоненты, однако эти препараты отличались по состоянию эластиновых волокон – в группе АБ они менее фрагментированы, извитость сохранена; в образцах группы КСР ход волокон нарушен, отмечались множественные разрывы (рис. 5).

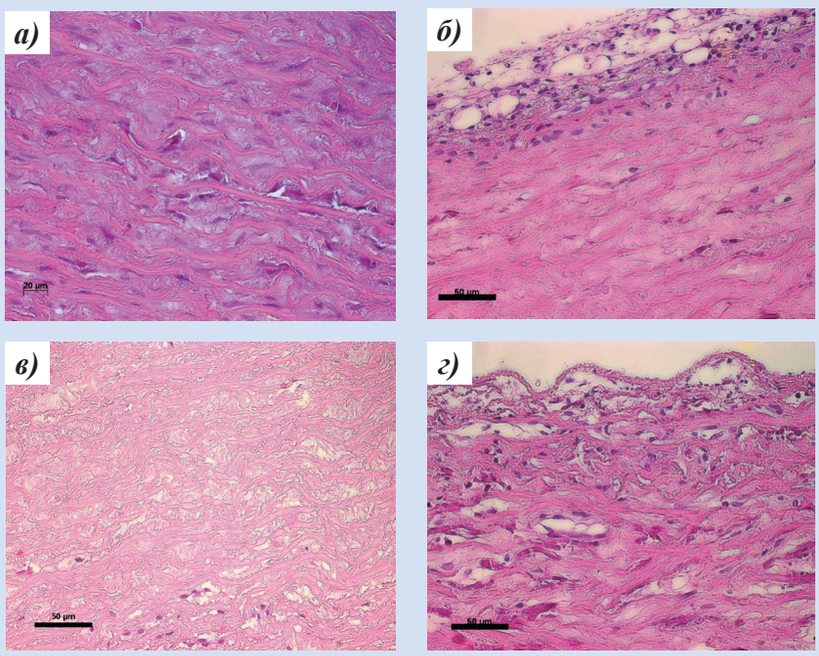

Рисунок 4. Состояние соединительнотканного каркаса после месяца подкожной имплантации экспериментальному животному
Примечание: *а) глутаральдегид, б) антибиотики, в) спирт-глицерин, г) комплексный спиртовой раствор. Окраска гематоксилином и эозином.*
Figure 4. Structure of native extracellular matrix after 1 month of subcutaneous implantation
Note: *a) – glutaraldehyde, b) – antibiotics, c) – alcohol-glycerin mixture, d) – complex alcohol solution. Hematoxylin - eosin staining.*

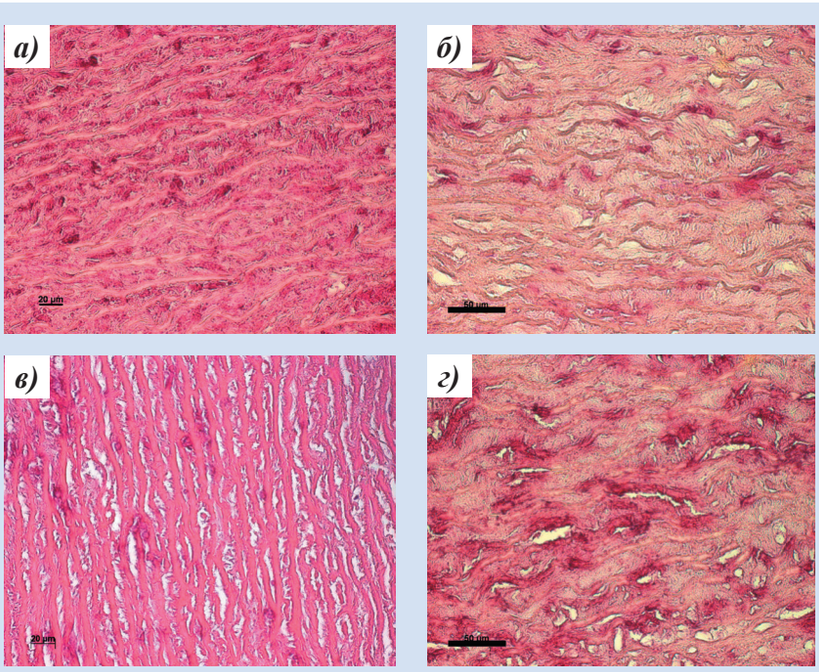

Рисунок 5. Состояние соединительнотканного каркаса спустя 3 мес. имплантации
Примечание: *а) глутаральдегид, б) антибиотики, в) спирт-глицерин, г) комплексный спиртовой раствор. Окраска гематоксилином и эозином.*
Figure 5. Structure of native extracellular matrix after 3 months of subcutaneous implantation
Note: *a) – glutaraldehyde, b) – antibiotics, c) – alcohol-glycerin mixture, d) – complex alcohol solution. Hematoxylin - eosin staining.*

При гистологическом исследовании образцов после 3 мес. имплантации максимальная интенсивность кальцификации стромы отмечалась в группе ГА. Отложения кальция диффузно рассеяны по всей толще препаратов как по глыбчато-рассыпчатому типу, так и в виде пылевидных частиц, что согласуется с работами, опубликованными ранее [14]. Сходные по степени минерализации результаты получены для группы АБ. Для групп КСР и СГ обнаружено наличие диффузно расположенных отложений, контурирующих эластин. Содержание солей кальция в этих группах было значительно ниже, чем в остальных (рис. 6).

Также отличительной чертой группы ГА являлось контурирование отложениями кальция не только эластиновых волокон, но и коллагена (во всех остальных группах кальций откладывался в перифибриллярное пространство и непосредственно на нити эластина).

Лимфоцитарная инфильтрация исследуемых образцов клетками реципиента не характерна для проб со сроком наблюдения месяц и представлена единичными клетками. После 3 мес. имплантации лимфоцитарная инфильтрация была более значительной. Она характерна для образцов, обработанных СГ и АБ, но наиболее выраженна в группе АБ. В группе КСР лимфоцитарная инфильтрация была на уровне наблюдений первого месяца.

Наиболее плотная фиброзная капсула развивалась вокруг образцов групп СГ и АБ на сроке наблюдения 3 мес. Для остальных способов обработки развитие оформленной фиброзной капсулы не характерно в обеих временных точках, она представлена тонкой, просветленной полоской рыхлой соединительной ткани.

Атомно-абсорбционный метод анализа

По данным атомно-абсорбционной спектроскопии определено, что наибольшее содержание кальция свойственно группам ГА и АБ, между которыми не выявлено статистически значимых отличий. Наименьшая степень кальцификации отмечалась в группах СГ и КСР. Статистически значимые отличия получены при сравнении групп ГА и СГ, ГА и КСР, АБ и СГ, АБ и КСР. Между СГ- и КСР -сохраненными образцами отличий не найдено (рис. 7).

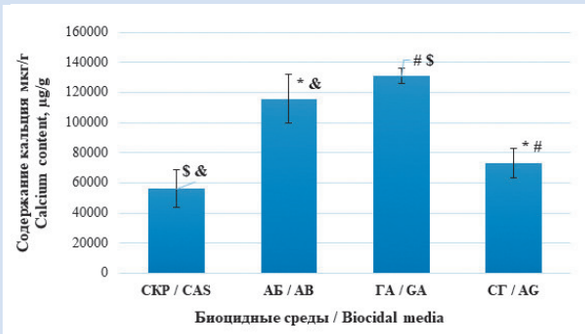

Рисунок 7. Содержание кальция в образцах различных групп фрагментов аорт свиней после трехмесячной подкожной имплантации
Примечание: *АБ – антибиотики; ГА – глутаральдегид; СГ – спирт-глицерин; КСР – комплексный спиртовой раствор; *, #, &, $ – p<0,05*

Figure 7. Calcium content in samples of porcine aortic fragments after a three-month subcutaneous implantation
Note: *AB – antibiotics; AG – alcohol-glycerin; CAS – complex alcohol solution; GA – glutaraldehyde; *, #, &, $ – p<0.05*

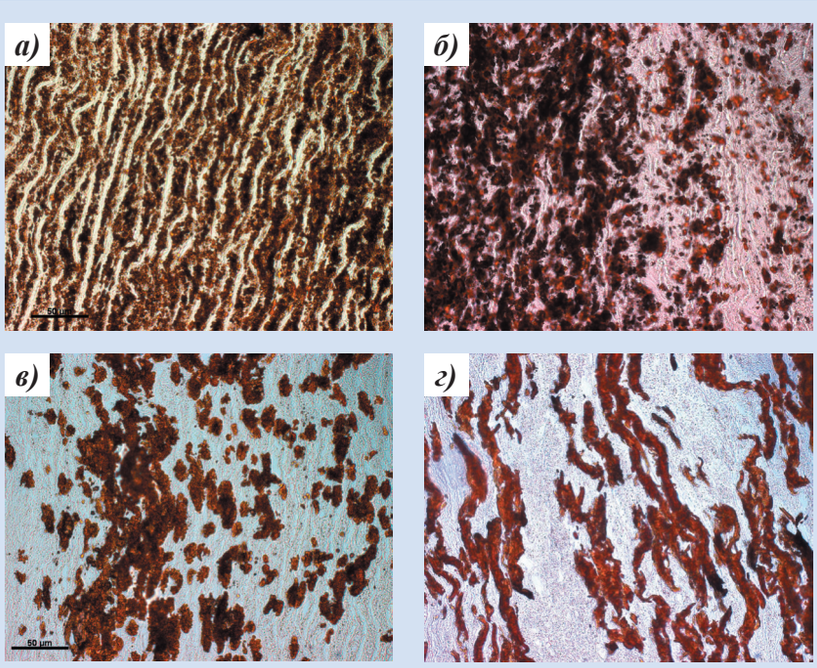

Рисунок 6. Распределение отложений солей Са через 3 мес. имплантации
Примечание: *а) глутаральдегид (контурирование коллагена), б) антибиотики, в) спирт-глицерин, г) комплексный спиртовой раствор. Окраска по Коссу.*

Figure 6. Calcific deposits after 3 months of subcutaneous implantation
Note: *a) – glutaraldehyde, b) – antibiotics, c) – alcohol-glycerin mixture, d) – complex alcohol solution. Von Kossa staining.*

ORIGINAL STUDIES

Обсуждение

Выбор представленных потенциальных сред хранения (с биоцидными свойствами) сделан на основе полученных ранее результатов [10]. Согласно данным микробиологического анализа и исследования биомеханических свойств стенок аорт свиней, наиболее предпочтительной средой для длительного влажного хранения сосудов является КСР, поскольку обладает антимикробным действием и в наименьшей степени влияет на структуру сосудистой стенки. Однако длительное воздействие данного раствора на ткани стенки аорты животных еще не исследовано. Наряду с этим удовлетворительные результаты биоцидной активности и в технических испытаниях проявили растворы АБ и СГ.

Группа ГА включена в исследование как «золотой стандарт» консервации ксеногенных тканей. В первую очередь нам была важна интенсивность накопления кальция в обработанной данным способом ксеноткани в модели подкожной имплантации. По нашим представлениям, идеальная среда должна иметь более низкую способность к кальцификации.

Гистологические исследования тканей проводили в сравнении с контрольной группой (фиксированные фрагменты восходящего отдела аорты свиньи), оценивая ряд основных параметров. При окраске гематоксилином и эозином определяли структурные несоответствия тканей нормальному строению, состояние СТК и взаиморасположение волокон в нем, степень инвазии лимфоцитов реципиента в строму импланта, признаки дегенеративных изменений коллагена и эластина, выраженность (клеточность и фибриллярность) окружающей эксплант капсулы. При окраске по Коссу оценивали структуру и локализацию солей кальция в образцах по отношению к слоям аортальной стенки.

Модель подкожной имплантации у молодых крыс широко используется для скрининга потенциальных стратегий по торможению кальцификации в различных тканях. Благодаря быстрому уровню метаболизма подкожная имплантация является удобным способом оценки скорости кальцификации объектов in vivo [15–18].

Обращает внимание, что в первой контрольной точке (50 сут. хранения до имплантации) заметно худшее состояние СТК в группе СГ, разряжение коллагеновых фибрилл, формирование межэластиновых пустот и снижение степени извитости эластина. После подкожной имплантации в группе СГ также отмечена выраженная и продолжающаяся деградация СТК.

Строма материалов оставшихся групп (после длительного хранения в КСР и АБ) имела в сравнении с нативом меньшее количество клеточных ядер, что объясняется постепенной резорбцией остатков клеток и закономерной деградацией клеточных элементов. Однако значительных визуальных изменений в структуре коллагена и эластина не выявлено. Наши данные согласуются с работой L.C. Wollmann с соавт., в которой авторы указывают на то, что сохранность децеллюляризованного тканевого матрикса не нарушается в течение длительного срока влажного хранения (до 12 мес.) [19].

В группе ГА при окраске срезов по Коссу мы обнаружили кальций не только в проекции эластиновых волокон, но и коллагена. В остальных группах кальций контурировал исключительно эластин. M.E. Tedder с соавт. сообщали, что коллагеновые каркасы из децеллюляризованного и очищенного перикарда свиньи не кальцифицировались in vivo, тогда как обработанные ГА каркасы были значительно минерализованы [20]. Таким образом, ГА может быть в значительной степени ответственен за кальцификацию коллагена.

Снижение интенсивности накопления кальция тканью аорты после хранения в КСР (в сравнении с ГА) совпадает с данными других исследователей [14]. Но в качестве объяснения низкого значения содержания кальция в группе СГ (как визуально на гистологических препаратах, так и при количественном измерении) нам представляется возможным следующий механизм: гидроксильные группы компонентов СГ-смеси взаимодействуют с резидуальными альдегидными группами СТК, что приводит к редукции потенциально активных зон на волокнах СТК [14] и замедлению накопления солей кальция в тканях.

Заключение

Текущее исследование посвящено подбору универсальной биоцидной среды для влажного хранения аллографтов длительное время – 50 сут. с момента забора материала. Исследование показывает, что на данный момент не удалось объединить в одном растворе сочетание биоцидных свойств, а также свойств, препятствующих кальцификации и деградации СТК ксеноматериала. Основным недостатком классической обработки ксеноматериала глутаральдегидом является выраженная минерализация тканей. Применение КСР и СГ продемонстрировало умеренную скорость деградации и среднюю выраженность минерализации СТК (в сравнении с обработкой глутаральдегидом). Хотя СГ-смесь вызывает повышенный клеточный ответ реципиента. Дальнейшее исследование растворов для длительного влажного хранения тканей продолжится подбором оптимальных условий хранения биологических протезов клапанов сердца с последующей имплантацией крупным лабораторным животным.

Конфликт интересов

М.Б. Васильева заявляет об отсутствии конфликта интересов. Е.В. Кузнецова заявляет об отсутствии конфликта интересов. Я.Л. Русакова заявляет об отсутствии конфликта интересов. Е.В. Чепелева заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.А. Докучаева заявляет об отсутствии конфликта интересов. Л.Н. Букреева заявляет об отсутствии конфликта интересов. Д.С. Сергеевичев заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Авторы заявляют об отсутствии финансирования исследования.

Информация об авторах

Васильева Мария Борисовна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории экспериментальной хирургии и морфологии центра новых технологий федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Российская Федерация;

Кузнецова Елена Викторовна, лаборант-исследователь центра новых технологий федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Российская Федерация;

Русакова Янина Леонидовна, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной хирургии и морфологии центра новых технологий федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Российская Федерация;

Чепелева Елена Васильевна, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной хирургии и морфологии центра новых технологий федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Российская Федерация;

Докучаева Анна Андреевна, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной хирургии и морфологии центра новых технологий федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Российская Федерация;

Букреева Лидия Николаевна, ведущий инженер лаборатории геохимии благородных и редких элементов (218) федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт геологии и минералогии имени В.С. Соболева Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Российская Федерация;

Сергеевичев Давид Сергеевич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией экспериментальной хирургии и морфологии центра новых технологий федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Российская Федерация.

Author Information Form

Vasilyeva Maria B., PhD, researcher at the Laboratory of Experimental Surgery and Morphology, Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation;

Kuznetsova Elena V., laboratory assistant at the New Surgical Technologies Center, Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation;

Rusakova Yanina L., research assistant at the Laboratory of Experimental Surgery and Morphology, Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation;

Chepeleva Elena V., research assistant at the Laboratory of Experimental Surgery and Morphology, Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation;

Dokuchaeva Anna A., research assistant at the Laboratory of Experimental Surgery and Morphology, Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation;

Bukreeva Lidiya N., leading engineer at the Laboratory of Noble and Rare Elements, Geochemistry and Ecogeochemistry, Sobolev Institute of Geology and Mineralogy, Novosibirsk, Russian Federation;

Sergeevichev David S., PhD, Head of the Laboratory of Experimental Surgery and Morphology, Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation.

Вклад авторов в статью

ВМБ – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение, анализ и интерпретация данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание;

КЕВ – получение данных исследования, корректировка

Author Contribution Statement

VMB – contribution to the concept and design of the study, data collection, analysis and interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content;

KEV – data collection, editing, approval of the final version,

статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание;

fully responsible for the content;

РЯЛ – получение данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание;

RYaL – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content;

ЧЕВ – анализ и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание;

ChEV – data analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content;

ДАА – анализ и интерпретация данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание;

DAA – data analysis and interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content;

БЛН – получение данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание;

BLN – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content;

СДС – вклад в концепцию и дизайн исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание.

SDS – contribution to the concept and design of the study, editing, approval of the final version, fully responsible for the content.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takkenberg J.J.M., Bogers A.J.J.C. Allografts for aortic valve and root replacement: Veni vidi vici? Expert Rev Cardiovasc Ther. 2004; 2(1):97-105.

2. Arabkhani B., Bekkers J.A., Andrinopoulou E.R., Roos-Hesselink J.W., Takkenberg J.J.M., Bogers A.J.J.C. Allografts in aortic position: Insights from a 27-year, single-center prospective study. J Thorac Cardiovasc Surg. 2016; 152(6):1572-1579. doi: 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. doi: 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.

5. Одаренко Ю.Н., Рутковская Н.В., Рогулина Н.В., Стасев А.Н., Кокорин С.Г., Каган Е.С., Барбараш Л.С. Анализ 23-летнего опыта использования ксеноаортальных эпоксиобработанных биопротезов в хирургии митральных пороков сердца. Исследование факторов реципиента с позиций влияния на развитие кальциевой дегенерации. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2015;(4):17-25.

6. 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. doi: 10.1089/bio.2016.0070

7. 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): 200-206.

8. 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., Breymann 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. 1):115-123. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.012161

9. Barratt-Boyes B.G., Roche A.H.G., Subramanyan 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): 768-777.

10. 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. doi: 10.1007/s10561-012-9305-5

11. 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. doi: 10.21688/1681-3472-2018-4-95-102

12. 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.

13. Журавлева И.Ю. Биоцидная композиция для асептического хранения консервированного протезного материала из тканей животного происхождения. Патент РФ на изобретение RU 2580621C1. Бюлл. No 10 (от 10.04.2016).

14. Журавлева И.Ю., Васильева М.Б., Тимченко Т.П., Ничай Н. Р., Григорьев И. А., Богачев-Прокофьев А.В. Кальцификация эластин-содержащих ксеногенных биоматериалов: влияние консервантов и бисфосфонатов. Сибирский научный медицинский журнал. 2017;37(6):28-37.

15. Zhuravleva IY, Nichay NR, Kulyabin YY, Timchenko TP, Korobeinikov AA, Polienko YF, Shatskaya SS, Kuznetsova EV, Voitov AV, Bogachev-Prokophiev AV, Karaskov AM. In search of the best xenogeneic material for a paediatric conduit: an experimental study. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2018; 26(5):738-744. doi: 10.1093/icvts/ivx445

16. Gallyamov M. O., Chaschin I. S., Khokhlova M. A., Grigorev T. E., Bakuleva N. P., Lyutova I. G., et al. Collagen tissue treated with chitosan solutions in carbonic acid for improved biological prosthetic heart valves. MaterSciEng. 2014; 37:127–40. doi: 10.1016/j.msec.2014.01.017

17. Eliaz N (Ed). Degradation of Implant Materials. New York: Springer Science+Business Media; 2012. 521p.

18. Levy R J, Schoen F J, Levy J T, Nelson A C, Howard S L, Oshry L J. Biologic determinants of dystrophic calcification and osteocalcin deposition in glutaraldehyde-preserved porcine aortic valve leaflets implanted subcutaneously in rats. Am J Pathol 1983; 113:143–55.

19. Wollmann L.C., Suss P.H., Kraft L., Stadler Ribeiro V., Noronha L., da Costa F.D.A., Tuon F.F. Histological and biomechanical characteristics of human decellularized allograft heart valves after eighteen months of storage in saline solution. Biopreserv Biobank. 2020; doi: 10.1089/bio.2019.0106. Готовится к публикации.

20. Tedder M.E., Liao J., Weed B., Stabler C., Zhang H., Simionescu A., Simionescu D.T. Stabilized collagen scaffolds for heart valve tissue engineering. Tissue Eng Part A. 2009; 15:1257–1268.

REFERENCES

1. Takkenberg J.J.M., Bogers A.J.J.C. Allografts for aortic valve and root replacement: Veni vidi vici? Expert Rev Cardiovasc Ther. 2004; 2(1):97-105.

2. Arabkhani B., Bekkers J.A., Andrinopoulou E.R., Roos-Hesselink J.W., Takkenberg J.J.M., Bogers A.J.J.C. Allografts in aortic position: Insights from a 27-year, single-center prospective study. J Thorac Cardiovasc Surg. 2016; 152(6): 1572-1579.

3. 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 Russian). doi: 10.21688/1681-3472-2017-3-40-47

4. 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 Russian).

5. Odarenko Y.N., Rutkovskaya N.V., Rogulina N.V., Stasev A.N., Kokorin S.G., Kagan E.S., Barbarash L.S. Analysis of 23-year experience epoxy treated xenoaortic bioprosthesisin surgery mitral heart disease. Research factors of recipients by positions of influence on the development of calcium degeneration. Complex Issues of Cardiovascular Diseases. 2015;(4):17-25. (in Russian).

6. 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. doi: 10.1089/bio.2016.0070

7. 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): 200-206.

8. 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., Breymann 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(11SUPPL.1):115-124. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.012161

9. Barratt-Boyes B.G., Roche A.H.G., Subramanyan 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):768-777.

10. 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. doi: 10.1007/s10561-012-9305-5

11. Vasilyeva M.B., Krasilnikova A.A., Kuznetsova E.V., Lunina M.V., Samoylova L.M., Rusakova Y.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 kardiokhirurgiya = Circulation Pathology and Cardiac Surgery. 2018;22(4):95-102. (in Russian). doi: 10.21688/1681-3472-2018-4-95-102

12. 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.

13. 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).

14. Zhuravleva I.Y., Vasilieva M.B., Timchenko T.P., Kuznetsova E.V., Polienko Y.F., Nichay N.R., Grigoryev I.A., Bogachev-Prokofiev A.V. Calcification of elastin-containing xenogenic biomaterials: influence of conservants and bisphosphonates The Siberian Scientific Medical Journal. 2017; 37(6):28-37. (in Russian).

15. Zhuravleva I.Y, Nichay N.R, Kulyabin Y.Y, Timchenko T.P, Korobeinikov A.A, Polienko Y.F, Shatskaya S.S, Kuznetsova E.V, Voitov A.V, Bogachev-Prokophiev A.V, Karaskov A.M. In search of the best xenogeneic material for a paediatric conduit: an experimental study. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2018; 26(5):738-744. . doi: 10.1093/icvts/ivx445

16. Gallyamov M. O., Chaschin I. S., Khokhlova M. A., Grigorev T. E., Bakuleva N. P., Lyutova I. G., et al. Collagen tissue treated with chitosan solutions in carbonic acid for improved biological prosthetic heart valves. MaterSciEng. 2014; 37:127–40. doi: 10.1016/j.msec.2014.01.017

17. Eliaz N (Ed). Degradation of Implant Materials. New York: Springer Science+Business Media; 2012.521p.

18. Levy R J, Schoen F J, Levy J T, Nelson A C, Howard S L, Oshry L J. Biologic determinants of dystrophic calcification and osteocalcin deposition in glutaraldehyde-preserved porcine aortic valve leaflets implanted subcutaneously in rats. AmJPathol 1983; 113: 143–55.

19. Wollmann L.C., Suss P.H., Kraft L., Stadler Ribeiro V., Noronha L., da Costa F.D.A., Tuon F.F. Histological and biomechanical characteristics of human decellularized allograft heart valves after eighteen months of storage in saline solution. Biopreserv Biobank. 2020; doi: 10.1089/bio.2019.0106. In press.

20.Tedder M.E., Liao J., Weed B., Stabler C., Zhang H., Simionescu A., Simionescu D.T. Stabilized collagen scaffolds for heart valve tissue engineering. Tissue Eng Part A. 2009; 15:1257–1268.

Для цитирования: *М.Б. Васильева, Е.В. Кузнецова, Я.Л. Русакова, Е.В. Чепелева, А.А. Докучаева, Л.Н. Букреева, Д.С. Сергеевичев. Влияние биоцидных растворов и влажного хранения тканей на биологические свойства стенки аорты у свиней. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2020; 9 (1): 63-73. DOI: 10.17802/2306-1278-2020-9-1-63-73*

To cite: *M.B. Vasilyeva, E.V. Kuznetsova, Y.L. Rusakova, E.V. Chepeleva, A.A. Dokuchaeva, L.N. Bukreeva, D.S. Sergeevichev. Effects of biocidal solutions and wet tissue treatment on the biological properties of porcine aortic wall. Complex Issues of Cardiovascular Diseases. 2020; 9 (1): 63-73. DOI: 10.17802/2306-1278-2020-9-1-63-73*