

## Сравнительное исследование четырех методик девитализации аортальных аллографтов

Щетинко Н. Н.<sup>1</sup>, Спиридонов С. В.<sup>1</sup>, Одинцов В. О.<sup>1</sup>, Шкет А. П.<sup>1</sup>, Юдіна О. А.<sup>2</sup>, Смолякова Р. М.<sup>3</sup>, Субоч Е. И.<sup>3</sup>, Дрык С. І.<sup>4</sup>, Юркштович Н. К.<sup>5</sup>, Островський Ю. П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Республиканский научно-практический центр «Кардиология» (Минск, Беларусь)

<sup>2</sup> УЗ «Городское клиническое патологоанатомическое бюро» (Минск, Беларусь)

<sup>3</sup> Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (Минск, Беларусь)

<sup>4</sup> УЗ «9-я городская клиническая больница» (Минск, Беларусь)

<sup>5</sup> Белорусский государственный университет (Минск, Беларусь)

**Цель исследования** – провести оценку эффективности четырех методик девитализации аортальных аллографтов.

**Материалы и методы.** Выполнена девитализация 40 аллографтов, которые были разделены на 4 группы (n=10 в каждой группе) по применяемым реагентам: 1) 1% дезоксихолева кислота; 2) 0,5% дезоксихолат натрия, 0,5% додецилсульфат натрия; 3) 1% дезоксихолат натрия, 1% Triton X-100; 4) 3% Triton X-100, 0,04% ЭДТА. После девитализации образцы подвергались гистологическому (окраска гематоксилином и эозином) и гистохимическому (окраска MSB, орсеином по Харту) исследованиям; проводилось определение содержания остаточной ДНК и прочностные испытания.

**Результаты и обсуждение.** В результате девитализации с использованием 0,5% дезоксихолата натрия, 0,5% додецилсульфата натрия отмечалось полное удаление клеточных элементов с сохранением структуры соединительнотканного матрикса аллографта. Выявлено достоверное снижение содержания ДНК в образцах аорты (31,05 против 2,58 нг/мг,  $p < 0,01$ ) и створки аортального клапана (39,7 против 1,36 нг/мг,  $p < 0,05$ ) после проведения девитализации. При изучении прочностных характеристик не было выявлено достоверных различий между свежими, криоконсервированными и девитализированными аллографтами.

**Выводы.** Наиболее эффективная девитализация была достигнута при использовании 0,5% дезоксихолата натрия, 0,5% додецилсульфата натрия, что сопровождалось статистически значимым снижением содержания донорской ДНК без изменения прочностных характеристик аллографтов.

**Ключевые слова:** аортальный аллографт, девитализация, тканевая инженерия.

В 50–60 гг. XX века рядом авторов были проведены исследования на животных с целью оценки возможности использования аортальных аллографтов для хирургического лечения заболеваний аорты и аортального клапана. Conrad Lam и соавт. в 1952 г. впервые в эксперименте на собаках продемонстрировали техническую возможность имплантации аортальных аллографтов в нисходящий отдел аорты [1]. Обширные исследования на животных провели Gordon Murray, Arthur Beall, C. Duran, A. Gunning и др. [2]. В 1956 г. Gordon Murray сообщил о первом случае успешной имплантации аортального аллографта в нисходящий отдел аорты у человека [3]. Donald Ross в 1962 г., а Brian Barratt-Boyes в 1964 г. независимо друг от друга информировали о начале клинического применения аортальных аллографтов в ортотопической позиции [4, 5]. Впоследствии Wilford Bigelow и Mark O'Brien провели исследования с использованием субкоронарной техники имплантации аортальных аллографтов [6, 7].

В Республике Беларусь аортальные аллографты применяются с 2009 г., когда д. м. н., проф. Ю. П. Островский впервые имплантировал гомовитальный аллографт по методике «полный корень» [8]. С 2012 г. активно используются криосохраненные аллографты, которые перед использованием хранятся в парах жидкого азота при температуре  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  в условиях специально созданного криобанка. Всего было имплантировано более 120 аортальных аллографтов. Основными показаниями для использования донорских аортальных клапанов были: 1) инфекционный эндокардит; 2) протезный эндокардит; 3) узкое кольцо аортального клапана; 4) дисфункция протеза аортального клапана и др. [9]. Аллографты обладают рядом преимуществ перед механическими и биологическими протезами, которые применяются для замещения аортального клапана. Так, для них характерны высокая устойчивость к инфекционным процессам, близкие к натив-

ным значения трансклапанного градиента и площади эффективного отверстия клапана, отсутствие необходимости в проведении антикоагулянтной терапии, низкая частота тромбоэмболических и геморрагических осложнений в послеоперационном периоде [10]. Главным недостатком аллографтов является ограниченный срок их функционирования, связанный с дегенерацией створок клапана. Результаты исследований иммуногенности, проведенных как на животных, так и у человека, указывают на то, что дегенерация клапана в значительной степени обусловлена иммунным ответом организма реципиента в отношении имплантированной аллогенной ткани. Различными исследователями было продемонстрировано развитие как клеточного, так и гуморального иммунного ответа [11–14]. С целью снижения иммуногенности имплантируемых аллографтов была разработана концепция девитализации, которая предполагает удаление из аллографтов донорских клеток и донорского генетического материала.

В мире было предложено большое количество методик девитализации, различающихся по длительности, природе воздействия (физическое, химическое и комбинированное), применяемым реагентам и их концентрациям [15–18]. Вместе с тем в большинстве случаев авторами не было проведено всесторонней оценки полноты процесса девитализации, а именно— определения остаточного содержания донорского генетического материала, оценки сохранности соединительнотканного матрикса, изучения механических свойств девитализированных тканей [19].

**Цель исследования** — провести оценку эффективности четырех методик девитализации аортальных аллографтов, для которых имеется наиболее обширная база литературных данных.

**Материалы и методы.** Забор аортальных аллографтов осуществлялся в условиях УЗ «Городское клиническое патологоанатомическое бюро» (Минск, Беларусь), после чего они помещались в раствор для стерилизации на 24 часа при температуре 4 °С. Раствор для стерилизации содержал следующие антибактериальные и противогрибковые препараты: ципрофлоксацин (3 мкг/мл); амикацин (12 мкг/мл); метронидазол (12 мкг/мл); ванкомицин (12 мкг/мл); флуконазол (0,1 мг/мл). Девитализация аллографтов проводилась в динамических условиях непрерывного перемешивания, для чего использовался орбитальный шейкер-инкубатор ES-20 (BioSan, Латвия). В качестве биореактора применялся пластиковый контейнер объемом 100 мл с закручивающейся крышкой. Перемешивание жидкости достигалось вращательными движениями платформы шейкера с частотой 200 об./мин. (рис. 1).

Сравниваемые группы предполагали использование следующих химических реагентов (n=10 аорталь-



**Рис. 1.** Девитализация аллографтов с использованием орбитального шейкера-инкубатора ES-20 (BioSan, Латвия)

ных аллографтов в каждой группе): 1) 1% дезоксиголевая кислота (группа 1); 2) 0,5% дезоксихолат натрия, 0,5% додецилсульфат натрия (группа 2); 3) 1% дезоксихолат натрия, 1% Triton X-100 (т-октилфеноксиполиэт оксизтанол) (группа 3); 4) 3% Triton X-100, 0,04% этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (группа 4). Помимо этого, во всех группах обработка аллографтов проводилась с использованием дистиллированной воды, а также растворов ДНКазы (200 ЕД/мл) и РНКазы А (100 мкг/мл).

*Процедура девитализации включала следующие этапы.*

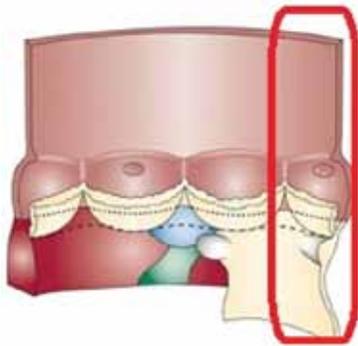
**Этап 1.** Обработка клапанов раствором химических реагентов. Длительность этапа — 48 часов при стандартной температуре +25 °С. Замена раствора реагентов осуществлялась через 12 часов.

**Этап 2.** Обработка клапанов комбинированным раствором ДНКазы и РНКазы А. Длительность этапа — 20 минут при температуре +37 °С.

**Этап 3.** Отмывание клапанов с использованием дистиллированной воды. Длительность этапа — 24 часа при стандартной температуре +25 °С. Замена раствора Рингера осуществлялась через 12 часов.

**Этап 4.** Отмывание клапанов с использованием раствора Рингера. Длительность этапа — 72 часа при стандартной температуре +25 °С. Замена раствора Рингера осуществлялась через 12 часов.

В дальнейшем проводилось гистологическое и гистохимическое исследование аллографтов, определение остаточного количества донорской ДНК в образцах до и после девитализации, а также сравнительная оценка прочностных свойств свежих, кри-



**Рис. 2.** Схема вырезки фрагмента аллогraftа для гистологического и гистохимического исследования

оконсервированных и девитализированных аллогraftов.

#### Гистологическое и гистохимическое исследования

Морфологическое исследование проводилось на гистологическом материале свежих и девитализированных аллогraftов. Из каждого аллогraftа по стандартной схеме вырезали шесть фрагментов, включающих аорту, артериальный слой синуса Вальсальвы, зону соединения со свободной створкой аортального клапана и собственно свободную створку аортального клапана (рис. 2).

Все образцы подвергались светооптической микроскопии при стандартной окраске гематоксилином и эозином для оценки полноты девитализации (элиминация ядер донорских клеток). Контрастирование ядер осуществлялось гематоксилином, цитоплазмы — эозином. Стандартная окраска (окраска гематоксилин и эозин): ядра — фиолетовые, цитоплазма — розовая. Также проводилось гистохимическое исследование при окраске MSB (Martius Scarlet Blue) и орсеином по Харту для оценки сохранности волокон коллагена и эластина в составе соединительнотканного матрикса. Окраска орсеином по Харту: эластические волокна и ядра клеток — серые, коллагеновые волокна — красные, мышечная ткань — желтовато-коричневая. Окраска MSB: экстрацеллюлярный матрикс — голубой, соединительная ткань — синяя, ядра клеток — розовые, фибрин (в зависимости от зрелости) — от оранжево-красного до голубого, мышечная ткань — сиреневая, некротизированная мышечная ткань — красная.

Для оценки полноты девитализации аортальных аллогraftов были проанализированы остаточные количества донорского генетического материала (двухцепочечной ДНК) в тестируемых образцах. Для выделения ДНК из тканей аллогraftа использовали набор реагентов «Pure Link Genomic DNA Mini Kit» (Life Technologies, США) с применением элюирующих микроколонок. В каждом случае ДНК выделяли из серийных образцов ткани аллогraftа (клапан и аорта) до и после девитализации. Для количественной оценки двухцепочечной ДНК использовали набор реагентов «Quant-iT™

PicoGreen® dsDNA Assay Kit» (Life Technologies, США). Выделенную ДНК разводили 1х раствором ТЕ-буфера до конечного объема 1 мл, добавляли к образцу 1 мл рабочего водного раствора реагента Quant-iT™ PicoGreen и инкубировали при комнатной температуре в защищенном от света месте в течение 5 мин., после чего измеряли уровень флуоресценции для каждого образца при равном времени экспозиции на спектрофлуориметре «Agilent Cary Eclipse» (Agilent Technologies, Inc., США) при длине волны 460–600 нм. Концентрацию искомой двухцепочечной ДНК рассчитывали исходя из стандартных калибровочных кривых.

Оценка прочностных свойств свежих, криоконсервированных и девитализированных аллогraftов (исследование наибольшего напряжения при растяжении образца до его разрушения и исследование наибольшего растяжения) проводилась на универсальной испытательной разрывной машине Tinius Olsen H150KU (Tinius Olsen, Великобритания) при нагрузке 200 кгс и скорости нагружения 5 мм/мин. Погрешность измерения при этом составляла 1% (рис. 3).

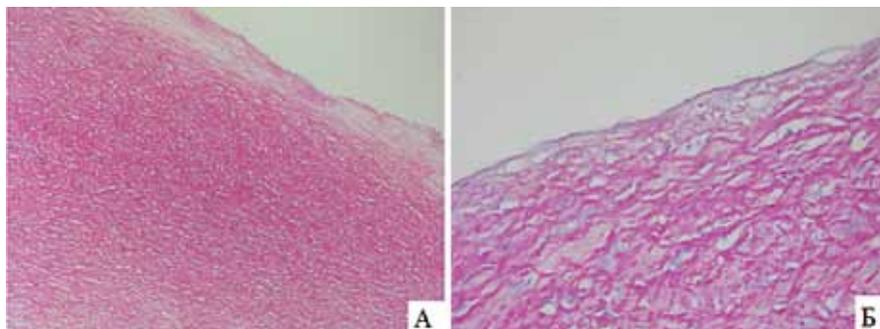
Испытания проводились при температуре  $23 \pm 2$  °С и относительной влажности  $50 \pm 5$ %. Для предотвращения дегидратации тканей аллогraftа во время теста осуществлялось его увлажнение 0,9% физиологическим раствором. Прочность при растяжении, или предел прочности (англ. *tensile strength*), — наибольшее напряжение, которое регистрируется при растяжении образца до его разрушения. Прочность имеет размерность напряжения МегаПаскаль, которое определяется отношением максимальной силы к площади поперечного сечения:

$$\sigma_b = F_{\max} / S,$$

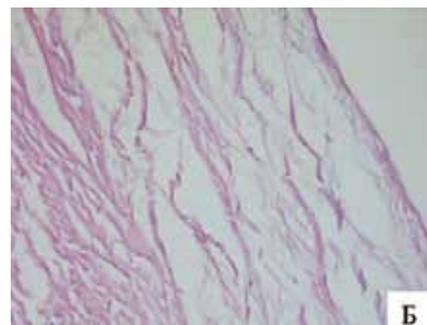
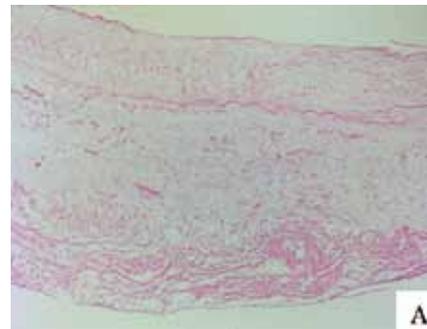
где  $F_{\max}$  — максимальная нагрузка при испытании на растяжение (Ньютоны),  $S$  — начальное поперечное сечение образца (мм<sup>2</sup>).



**Рис. 3.** Прочностные испытания аллогraftов с использованием испытательной разрывной машины Tinius Olsen H150KU (Tinius Olsen, Великобритания)



**Рис. 4.** Микроскопическая картина аллографта после девитализации (группа 1), окраска гематоксилин и эозин: А – аорта при увеличении  $\times 100$ ; Б – аорта при увеличении  $\times 400$



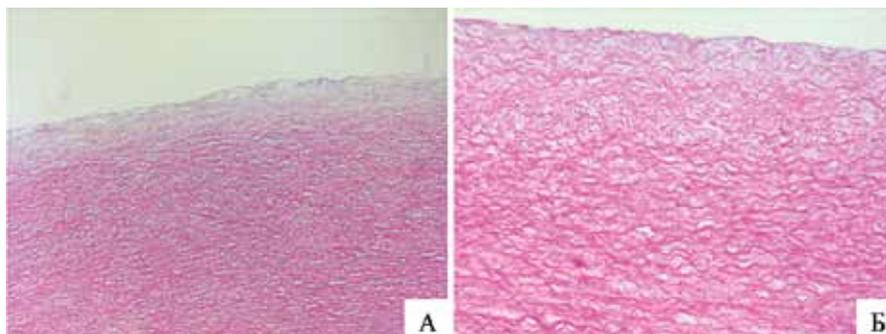
**Рис. 5.** Микроскопическая картина аллографта после девитализации (группа 1), окраска гематоксилин и эозин: А – свободная створка аортального клапана при увеличении  $\times 50$ ; Б – свободная створка аортального клапана при увеличении  $\times 400$

**Результаты и обсуждение.** По данным объективного осмотра аллографтов после завершения процедуры девитализации не отмечалось изменения диаметра аллографтов, их конфигурации и консистенции. Девитализация не приводила к появлению трещин, разрывов либо разволокнутию тканей аллографта. Единственным макроскопически видимым изменением являлось изменение окраски тканей аллографтов, которая становилась более бледной.

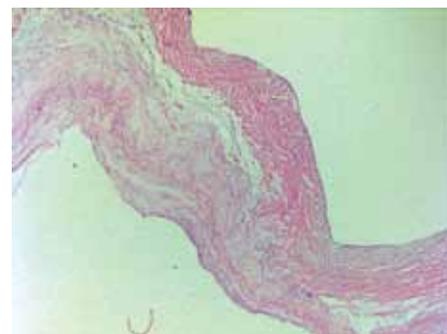
По результатам гистологического исследования 10 образцов аортальных аллографтов группы 1 (1% дезоксиолевая кислота, ДНКаза, РНКаза), после девитализации аорта и артериальная зона синусов Вальсальвы сохраняют соотношение оболочек и волокнистую структуру в слоях. В медию аорты определяется сохранение гладкомышечных клеток и фибробластов – от 0–5% до 40–50% в различных полях зрения. Свободная створка аортального клапана сохраняет соотношение слоев, пространственное и количественное соотношение волокон в слоях также сохранено. Ядра клеточных

элементов не определяются – достигнута полная девитализация створки аортального клапана (рис. 4, 5).

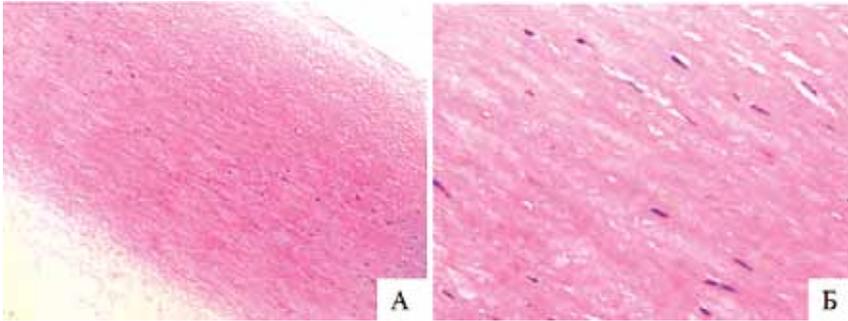
По результатам гистологического исследования 10 образцов аортальных аллографтов группы 2 (0,5% дезоксиолевая кислота, ДНКаза, РНКаза), после девитализации аорта и артериальная зона синусов Вальсальвы сохраняют соотношение оболочек и волокнистую структуру в слоях. Во всех полях зрения исследованных слоев (интима, медиа, адвентиция) ядра эндотелиоцитов, гладкомышечных клеток, фибробластов, нервных клеток не определяются – достигнута полная девитализация. Свободная створка аортального клапана сохраняет соотношение слоев, пространственное и количественное соотношение волокон в слоях сохранено. Ядра клеточных элементов (эндотелиоцитов и



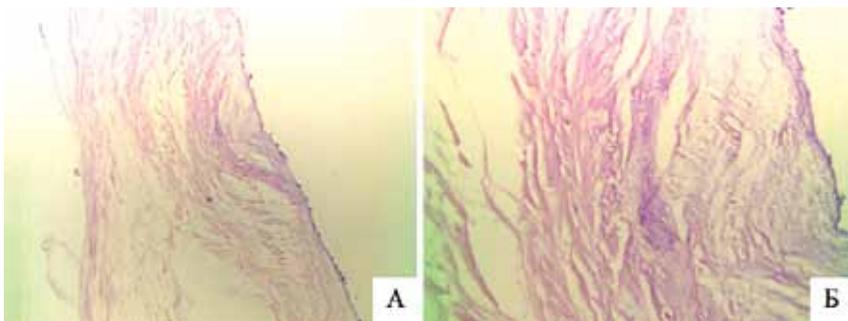
**Рис. 6.** Микроскопическая картина аллографта после девитализации (группа 2), окраска гематоксилин и эозин: А – аорта при увеличении  $\times 100$ ; Б – аорта при увеличении  $\times 200$



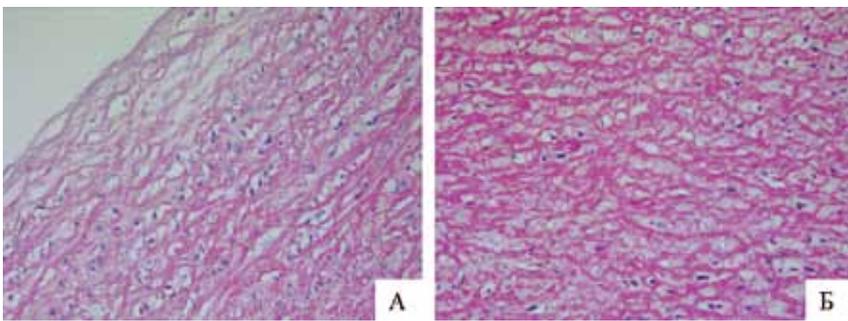
**Рис. 7.** Микроскопическая картина аллографта после девитализации (группа 2), окраска гематоксилин и эозин: свободная створка аортального клапана при увеличении  $\times 25$



**Рис. 8.** Микроскопическая картина аллогraftа после девитализации (группа 3), окраска гематоксилин и эозин: А – аорта при увеличении  $\times 100$ ; Б – аорта при увеличении  $\times 400$



**Рис. 9.** Микроскопическая картина аллогraftа после девитализации, окраска гематоксилин и эозин (группа 3): А – свободная створка аортального клапана при увеличении  $\times 100$ ; Б – свободная створка аортального клапана при увеличении  $\times 400$



**Рис. 10.** Микроскопическая картина аллогraftа после девитализации, окраска гематоксилин и эозин (группа 4): А – аорта при увеличении  $\times 100$ ; Б – аорта при увеличении  $\times 400$

фибробластов) не определяются – достигнута полная девитализация (рис. 6, 7).

По результатам гистологического исследования 10 образцов аортальных аллогraftов группы 3 (1% Triton X-100, 1% дезоксихолат натрия, ДНКазы, РНКазы), после девитализации аорта и артериальная зона синусов Вальсальвы сохраняют соотношение оболочек и волокнистую структуру в сло-

ях. Преимущественно в меди аорты определяется сохранение гладкомышечных клеток и фибробластов – от 10–15% до 80–90% в различных полях зрения. Свободная створка аортального клапана сохраняет соотношение слоев, пространственное и количественное соотношение волокон в слоях также сохранено. Ядра клеточных элементов (эндотелиоцитов и фибробластов) не определяются: достигнута полная девитализация створки аортального клапана (рис. 8, 9).

По результатам гистологического исследования 10 образцов аортальных аллогraftов группы 4 (3% Triton X-100, 0.04% ЭДТА, ДНКазы, РНКазы), после девитализации аорта и артериальная зона синусов Вальсальвы сохраняют соотношение оболочек и волокнистую структуру в слоях. В меди аорты, в эндотелии и в артериальной зоне синусов Вальсальвы определяется сохранение гладкомышечных клеток и фибробластов – от 30% до 70–80% в различных полях зрения. Свободная створка аортального клапана сохраняет соотношение слоев, пространственное и количественное соотношение волокон в слоях также сохранено. В свободной створке также определяется сохранение ядер клеточных элементов (эндотелиоцитов и фибробластов) – до 20% исходного количества (рис. 10, 11).

По результатам гистохимического исследования образцов аортальных аллогraftов после девитализации были получены схожие данные для всех четырех групп. Аорта сохраняла волокнистую структуру в слоях. При окраске по Харту эластические волокна сохраняли свойственную зонам компоновку. При окраске MSB эластические волокна сохраняли плотную компоновку в пучки во всех полях зрения, отмечалось отсутствие фибриноидного некроза. Свободная створка аортального клапана сохра-

няла соотношение слоев, пространственное и количественное соотношение. Ориентация коллагеновых и эластических волокон в слоях также была сохранена (рис. 12, 13).

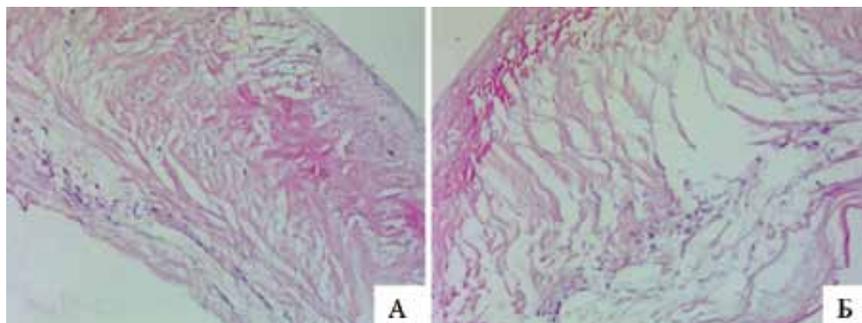
Дальнейшие исследования проводились с образцами аллогraftов группы 2 (0,5% дезоксихолат натрия, 0,5% додецилсульфат натрия, ДНКазы, РНКазы), в которой, по данным гистологического исследования,

была достигнута наиболее полная девитализация.

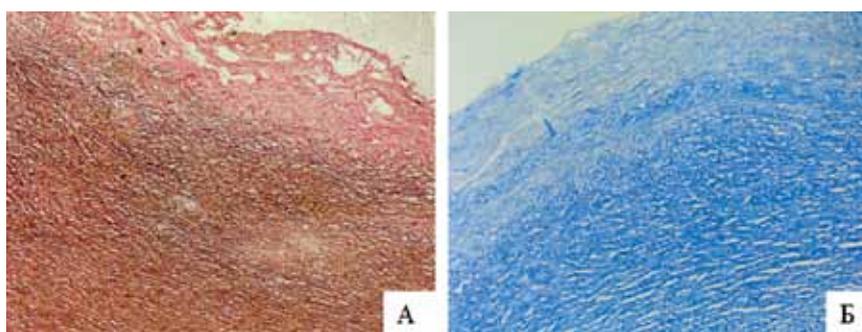
В ходе исследования содержания донорского генетического материала было протестировано 10 образцов аллографтов на предмет наличия остаточной двухцепочечной ДНК. Исследование проводили двукратно: до проведения девитализации (контрольная группа) и после обработки аллографтов в группе 2 (0,5% дезоксихолат натрия, 0,5% додецилсульфат натрия, ДНКаза, РНКаза). Согласно полученным результатам, выявлено достоверное снижение содержания ДНК в образцах аорты аортального аллографта после проведения девитализации (31,05 (26,1–43,8) нг/мг против 2,58 (0,84–7,3) нг/мг, критерий Wilcoxon,  $p < 0,01$ ). Также установлено статистически значимое снижение содержания ДНК в образцах створки аортального клапана после проведения девитализации (39,7 (21,3–52,5) нг/мг против 1,36 (0,0–13,3) нг/мг, критерий Wilcoxon,  $p < 0,05$ ) (рис. 14).

Согласно результатам исследования механических свойств 10 образцов аллографтов, полученных с использованием испытательной разрывной машины Tinius Olsen H150KU (Tinius Olsen, Великобритания), не было выявлено достоверных различий в прочностных характеристиках девитализированных, криосохраненных и свежих аллографтов. Так, в группе свежих аллографтов значения  $F_{max}$  составляли  $31,3 \pm 2,0$  N,  $\sigma_b$  – 0,9 МПа (0,7–1,2 МПа); в группе криоконсервированных аллографтов:  $F_{max}$  – 33,4 N (29,4–37,3 N),  $\sigma_b$  – 0,9 МПа (0,8–1,1 МПа); в группе девитализированных аллографтов:  $F_{max}$  – 33,1 N (18,2–38,9 N),  $\sigma_b$  – 0,9 МПа (0,6–1,1 МПа) ( $p > 0,05$ ) (табл. 1).

**Выводы.** В соответствии с данными объективного осмотра, процедура девитализации аллографтов во второй группе (0,5% дезоксихолат натрия, 0,5% додецилсульфат натрия, ДНКаза, РНКаза) не приводила к появлению в них макроскопических изменений, за исключением изменения цвета. Указанная методика девитализации, по данным гистологического исследования, приводит к полному удалению донорских клеток из аортальных аллографтов (отсутствие ядер эндотелиоцитов, гладкомышечных клеток, фибробластов, нервных клеток) и

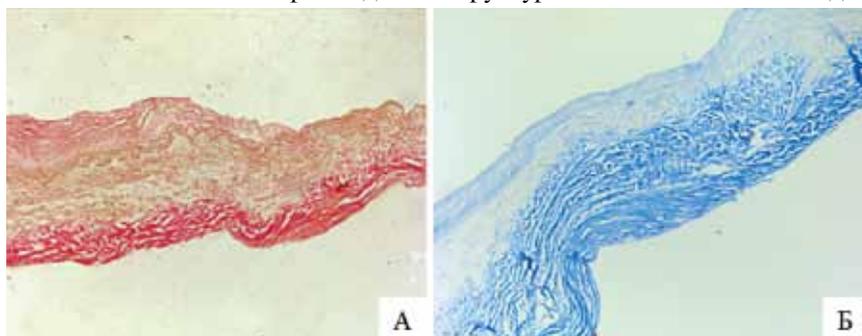


**Рис. 11.** Микроскопическая картина аллографта после девитализации, окраска гематоксилин и эозин (группа 4): А – свободная створка аортального клапана при увеличении  $\times 100$ ; Б – свободная створка аортального клапана при увеличении  $\times 400$



**Рис. 12.** Микроскопическая картина аллографта после девитализации: А – аорта, окраска орсеин по Харту, увеличение  $\times 100$ ; Б – аорта, окраска MSB, увеличение  $\times 100$

не сопровождается структурными изменениями соеди-



**Рис. 13.** Микроскопическая картина аллографта после девитализации: А – свободная створка аортального клапана, окраска орсеин по Харту, увеличение  $\times 25$ ; Б – свободная створка аортального клапана, окраска MSB, увеличение  $\times 25$

нительнотканного каркаса аллографта (сохраняется соотношение слоев, пространственное и количественное соотношение и ориентация коллагеновых и эластических волокон). Выявлено статистически значимое снижение концентрации донорской ДНК как в образцах аорты, так и в образцах створок аортальных аллографтов. По результатам прочностных испытаний не выявлено достоверных различий между свежими, криокон-

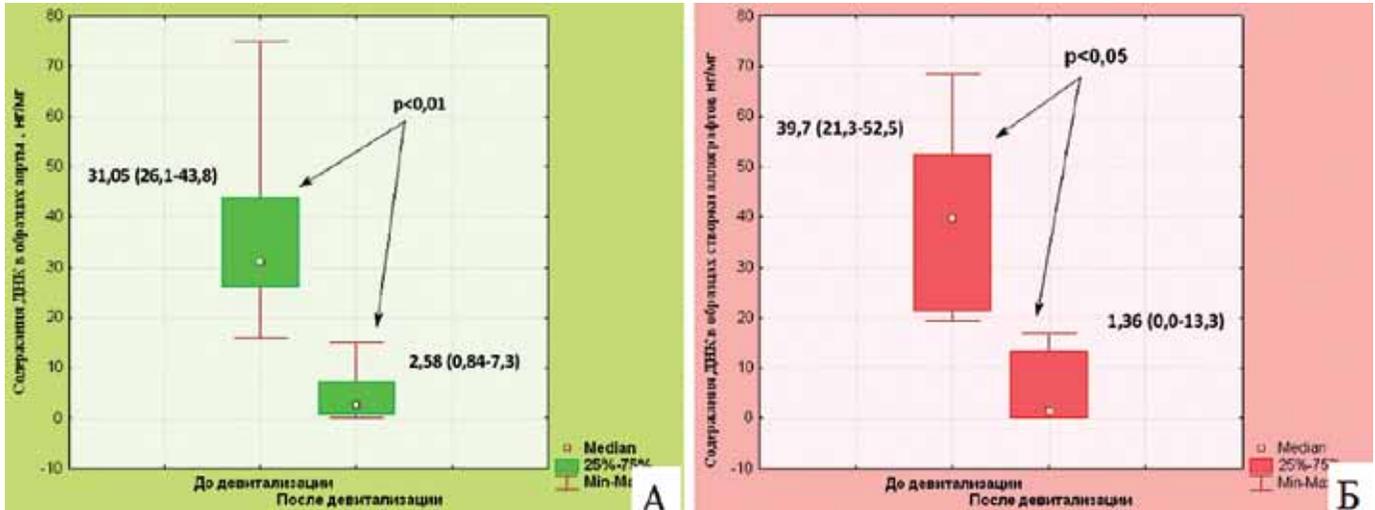


Рис. 14. Снижение содержания ДНК в образцах аортальных аллографтов: А – образцы аорты; Б – образцы створки аортального клапана

Таблица 1

Сравнительные результаты прочностных характеристик свежих, криоконсервированных и девитализированных аллографтов

Участок исследования	Свежий аллографт		Криоконсервированный аллографт		Девитализированный аллографт		p
	$F_{\max}$ , N	$\sigma_v$ , МПа	$F_{\max}$ , N	$\sigma_v$ , МПа	$F_{\max}$ , N	$\sigma_v$ , МПа	
Восх. аорта, продольное направление	31,3±2,0	0,9 (0,7–1,2)	33,4 (29,4–37,3)	0,9 (0,8–1,1)	33,1 (18,2–38,9)	0,9 (0,6–1,1)	>0,05

сервированными и девитализированными аллографтами. Дальнейшие направления исследования включают морфометрическую оценку девитализированных аллографтов, оценку остаточного содержания химических реагентов после завершения девитализации, а также оценку возможности криоконсервации девитализированных аллографтов с определением оптимальных режимов их замораживания и размораживания.

### Литература

1. An experimental study of aortic valve homografts / C. R. Lam, H. H. Aram, E. R. Monnell // Surg Gynec Obstet. – 1952. – Vol. 94. – P. 129–35.
2. Duran C., Gunning A. J. Aortic homograft valve transplantation // Ann R Coll Surg Engl. – 1966. – Vol. 39 (2). – P. 190–2.
3. Murray G. Homologous aortic-valve-segment transplants as surgical treatment for aortic and mitral insufficiency // Angiology. – 1956. – Vol. 7 (5). – P. 466–71.
4. Ross D. N. Homograft replacement of the aortic valve // Lancet. – 1962. – Vol. 2. – P. 487.
5. Barratt-Boyes B. Homograft aortic valve replacement in aortic incompetence and stenosis // Thorax. – 1964. – Vol. 19. – P. 131–50.
6. The problem of insufficiency following homograft replacement of the aortic valve / W. G. Bigelow [et al.] // J Thorac Cardiovasc Surg. – 1967. – Vol. 54. – P. 478–90.
7. A comparison of aortic valve replacement with viable cryopreserved and fresh allograft valves, with a note on chromosomal studies / M. F. O'Brien [et al.] // J Thorac Cardiovasc Surg. – 1987. – Vol. 94. – P. 812–23.
8. Непосредственные результаты протезирования аортального клапана с использованием аллографтов / С. В. Спиридонов [и др.] // Новости хирургии. – 2014. – Т. 22, № 4. – С. 443–448.
9. Использование аллографтов в лечении инфекционного и протезного эндокардита аортального клапана / С. В. Спиридонов [и др.] // Кардиология в Беларуси. – 2015. – №6 (43). – С. 34–46.
10. Сравнение аллографтов и механических протезов в лечении инфекционного и протезного эндокардита / С. В. Спиридонов [и др.] // Кардиология в Беларуси. – 2016. – № 2 (8). – С. 182–198.
11. Early systemic cellular immune response in children and young adults receiving decellularized fresh allografts for pulmonary valve replacement / A. Neumann [et al.] // Tissue engineering: Part A. – 2014. – Vol. 20. – P. 1003–11.
12. Bioengineered human and allogeneic pulmonary valve conduits chronically implanted orthotopically in baboons: hemodynamic performance and immunological consequences / R. A. Hopkins [et al.] // JTCVS. – 2013. – Vol. 145. – P. 1098–1107.
13. Performance and morphology of decellularized pulmonary valves implanted in juvenile sheep / R. W. Quinn [et al.] // Ann Thorac Surg. – 2011. – Vol. 92. – P. 131–7.

14. Inflammatory responses of tissue-engineered xenografts in a clinical scenario / S. Mathapati [et al.] // ICVTS. – 2011. – Vol. 12. – P. 360–5.
15. Initial pediatric cardiac experience with decellularized allograft patches / G. K. Lofland [et al.] // Ann Thorac Surg. – 2012. – Vol. 93. – P. 968–71.
16. Decellularized homologous tissue-engineered heart valves as off-the-shelf alternatives to xeno- and homografts / P. E. Dijkman [et al.] // Biomaterials. – 2012. – Vol. 33 (18). – P. 4545–54.
17. Tissue-engineered mitral valve: morphology and biomechanics / P. Iablonskii [et al.] // ICVTS. – 2015. – Vol. 20. – P. 712–9.
18. Structural integrity of collagen and elastin in SynerGraft® decellularized-cryopreserved human heart valves / C. J. Gerson [et al.] // Cryobiology. – 2012. – Vol. 64. – P. 33–42.
19. Девитализация клапанных аллографтов – исторические аспекты и опыт РНПЦ «Кардиология» / Н. Н. Щетинко [и др.] // Инновационные технологии в медицине. – 2016. – № 1–2. – С. 48–67.

### Comparative study of four aortic allograft decellularization techniques

Shchatsinka M. M.<sup>1</sup>, Spiridonau S. V.<sup>1</sup>, Adzintsov V. A.<sup>1</sup>, Shket A. P.<sup>1</sup>, Yudzina V. A.<sup>2</sup>, Smaliakova R. M.<sup>3</sup>, Suboch A. I.<sup>3</sup>, Dryk S. I.<sup>4</sup>, Yurkshtovich M. K.<sup>5</sup>, Ostrovsky Y. P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Republican Scientific and Practical Center “Cardiology”, Minsk, Belarus

<sup>2</sup> City Clinical Pathologoanatomic Bureau, Minsk, Belarus

<sup>3</sup> N. N. Alexandrov National Cancer Centre, Minsk, Belarus

<sup>4</sup> 9<sup>th</sup> City Clinical Hospital, Minsk, Belarus

<sup>5</sup> Belarusian State University, Minsk, Belarus

**Objective:** to assess four aortic allograft decellularization techniques.

**Materials and methods.** 40 aortic allografts were decellularized using 4 techniques (n=10 in each group), depending on reagents used: 1) 1% deoxycholic acid; 2) 0,5% sodium deoxycholate, 0,5% sodium dodecylsulfate; 3) 1% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100; 4) 3% Triton X-100, 0,04% EDTA. On decellularization completion, specimens were subjected to histologic (hematoxylin and eosin) and histochemic (MSB, orcein) studies; residual DNA content was assessed, as well as mechanical testing.

**Results and discussion.** Decellularization with 0.5% sodium deoxycholate, 0.5% sodium dodecylsulfate resulted in complete cell removal with good preservation of connective tissue matrix. Statistically significant reduction of DNA content in aorta (31,05 vs 2,58 ng/mg, p<0,01) and aortic valve leaflet (39,7 vs 1,36 ng/mg, p<0,05) was revealed. According to mechanical testing results, there were no significant differences between fresh, cryopreserved and decellularized allografts.

**Conclusions.** Complete allograft decellularization was achieved using 0.5% sodium deoxycholate, 0.5% sodium dodecylsulfate, with statistically significant DNA reduction and without affecting mechanical properties of the valve.

**Key words:** aortic allograft, decellularization, tissue engineering.

### Порівняльне дослідження чотирьох методик девіталізації аортальних алографтів

Щетинко М. М.<sup>1</sup>, Спиридонов С. В.<sup>1</sup>, Одинцов В. О.<sup>1</sup>, Шкет О. П.<sup>1</sup>, Юдіна О. А.<sup>2</sup>, Смолякова Р. М.<sup>3</sup>, Субоч О. І.<sup>3</sup>, Дрик С. І.<sup>4</sup>, Юркштович М. К.<sup>5</sup>, Островський Ю. П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Республіканський науково-практичний центр «Кардіологія», Мінськ, Білорусь

<sup>2</sup> УЗ «Міське клінічне патологоанатомічне бюро», Мінськ, Білорусь

<sup>3</sup> Республіканський науково-практичний центр онкології та медичної радіології ім. М. М. Александрова, Мінськ, Білорусь

<sup>4</sup> УЗ «9-а міська клінічна лікарня», Мінськ, Білорусь

<sup>5</sup> Білоруський державний університет, Мінськ, Білорусь

**Мета дослідження** – провести оцінку ефективності чотирьох методик девіталізації аортальних алографтів.

**Матеріали та методи.** Виконана девіталізація 40 алографтів, які були розділені на 4 групи (n=10 у кожній групі) за застосуваннями реагентами: 1) 1% дезоксиолева кислота; 2) 0,5% дезоксихолат натрію, 0,5% додецилсульфат натрію; 3) 1% дезоксихолат натрію, 1% Triton X-100; 4) 3% Triton X-100, 0,04% ЕДТА. Після девіталізації зразки піддавалися гістологічному (забарвлення гематоксиліном та еозином) і гістохімічному (забарвлення MSB, орсеїном за Хартон) дослідженням; проводилося визначення вмісту залишкової ДНК і міцності випробування.

**Результати та обговорення.** В результаті девіталізації з використанням 0,5% дезоксихолат натрію, 0,5% додецилсульфату натрію визначалося повне видалення клітинних елементів зі збереженням структури сполучнотканинного матриксу алографта. Виявлено достовірне зниження вмісту ДНК у зразках аорти (31,05 проти 2,58 нг/мг, p<0,01) і стулки аортального клапана (39,7 проти 1,36 нг/мг, p<0,05) після проведення девіталізації. При вивченні міцності не було виявлено достовірних відмінностей між свіжими, консервованими та девіталізованими алографтами.

**Висновки.** Найбільш ефективна девіталізація була досягнута при використанні 0,5% дезоксихолат натрію, 0,5% додецилсульфату натрію, що супроводжувалося статистично значущим зниженням вмісту донорської ДНК без зміни міцності алографтів.

**Ключові слова:** аортальний алографт, девіталізація, тканинна інженерія.