

Received: 27.10.2016
Accepted: 24.07.2017
Published: 29.12.2017

Zastosowanie antybiotyków w sterylizacji homogennych zastawek serca

Application of antibiotics in the sterilization of homogeneous heart valves

Artur Turek^{1,2,3}, Justyna Wilińska¹, Aleksandra Borecka³, Lucyna Pawlus-Łachecka⁴

¹Katedra i Zakład Biofarmacji, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

²Fundacja Rozwoju Nauki i Przedsiębiorczości Nobilia, Dąbrowa Górnicza

³Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych Polskiej Akademii Nauk, Zabrze

⁴Fundacja Rozwoju Kardiologii, Zabrze

Streszczenie

Istotny brak dostępnych tkanek ludzkich nie zmniejszył zainteresowania homogenymi zastawkami serca. Wykorzystanie homograftów to nadal najkorzystniejsze rozwiązanie w leczeniu chirurgicznym wad nabytych i wrodzonych serca. Uzyskanie optymalnych właściwości takich zastawek następuje w wyniku procesu przetwarzania, w tym sterylizacji za pomocą roztworów antybiotyków. Metoda zapewnia jałowość, a zarazem odpowiednią zdolność do życia komórek oraz zachowanie natywnych cech tkanek. Otrzymany materiał ma odpowiednie właściwości strukturalne i powierzchniowe, co wiąże się z jego prawidłowym funkcjonowaniem *in vivo*. W ciągu kilku dekad warunki sterylizacji i skład mieszanin antybiotyków znacząco się zmieniały. Osiągnięto duży postęp w rozwoju omawianej metody, jednak w ostatnich latach wskazano na istnienie różnych wad sterylizacji homograftów antybiotykami. Do najważniejszych należy uwolnienie się antybiotyków w czasie analiz mikrobiologicznych kwalifikujących tkanki do wszczepienia oraz możliwość wystąpienia objawów niepożądanych wskutek uwolnienia się antybiotyków z tkanek po wszczepieniu. W artykule scharakteryzowano stosowane mieszaniny antybiotyków.

Słowa kluczowe:

sterylizacja • antybiotyki • homografty • zastawki serca

Summary

A significant deficit in the availability of human tissues has not resulted in less general interest in homogeneous heart valves. The application of homografts still remains the optimal solution in the surgical treatment of congenital and acquired defects. Obtaining the optimal properties of these valves is followed by processing, including sterilization. This method provides sterility with rewarding cell viability and maintenance of the tissues' native features. The prepared material possesses appropriate properties at the level of structure and surface, which results in correct functioning *in vivo*. During the past several decades, sterilization conditions and the compositions of antibiotic mixtures have changed significantly. In this period, significant progress in the development of this method was achieved; however, in the last few years, various flaws in antibiotic sterilization of homografts have been revealed. The release of the antibiotic during microbiological tests of tissue evaluated for implantation or the possibility of side effects as a result of antibiotic release after implantation remain the most important issues here. In this work we characterized the main antibiotic mixtures that are currently in use.

Keywords:

sterilization • antibiotics • homografts • heart valves

GICID:	01.3001.0010.7669
DOI:	10.5604/01.3001.0010.7669
Word count:	5907
Tables:	3
Figures:	5
References:	90

Adres autora: dr n. farm. Artur Turek, Katedra i Zakład Biofarmacji, 41-208 Sosnowiec, ul. Jedności 8, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach; e-mail: a.turek75@gmail.com

Wykaz skrótów: **CLWPA** – cefoksytyna, linkomycyna, wankomycyna, polimyksyna B i amfoterycyna B; **DANYNM** – rozcieńczone antybiotyki z nystatyną w podłożu hodowlanym (dilute antibiotics with nystatin in nutrient medium); **HANYNM** – antybiotyki z Harefield z nystatyną w podłożu hodowlanym (Harefield antibiotics with nystatin in nutrient medium); **MGEN** – metycylina, gentamycyna, erytromycyna i nystatyna; **MGEN** – metycylina, gentamycyna, streptomycyna, erytromycyna i nystatyna; **NYDANM** – nystatyna z rozcieńczonymi antybiotykami w podłożu hodowlanym (nystatin with dilute antibiotics in nutrient medium); **PKSA** – penicylina, kanamycyna, streptomycyna i amfoterycyna B; **PSA** – penicylina, streptomycyna i amfoterycyna B.

WPROWADZENIE

Ryzyko wystąpienia powikłań u pacjentów po wszczepieniu homogennej zastawki serca zależy od wielu zmiennych. Główną rolę odgrywają czynniki o podłożu klinicznym, a także wiek pacjenta. Ponadto istotną zmienną warunkującą skuteczność leczenia jest brak powikłań spowodowanych wystąpieniem infekcji pooperacyjnych.

Obecnie w leczeniu chirurgicznym wad wrodzonych i nabytych zastawek serca stosuje się zarówno tkanki ludzkie (homografty) [19, 20, 40], jak i zwierzęce (heterografty) [10, 24, 64]. Według danych za lata 1991-2013 ogłoszonych przez Amerykański Departament Zdrowia i Opieki Społecznej (U.S. Department of Health & Human Services) obserwuje się rosnący deficyt tkanek i organów ludzkich do celów transplantacji [73]. Mimo wykorzystania we względnie dużym zakresie tkanek zwierzęcych powszechnie uważa się zastosowanie homograftów za zdecydowanie lepsze rozwiązanie w leczeniu chirurgicznym w porównaniu do heterograftów. Wprawdzie ksenotransplantologia staje się coraz pospolitsza w praktyce klinicznej, a w przypadku zastawek serca opracowywane są nawet materiały hybrydowe oparte na rusztowaniach uzyskanych z tkanek zwierzęcych i komórkach homogennych pobranych od pacjentów lub dawców [17], jednak wiele problemów wciąż nie zostało rozwiązanych.

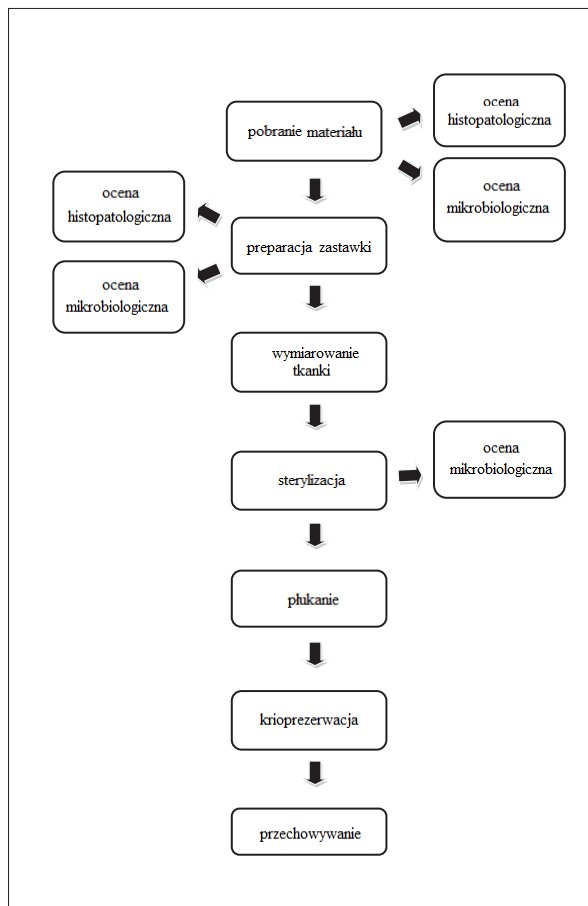
Do koronnych argumentów przemawiających za przewagą tkanek ludzkich należy znacznie mniejsza immunogenność [17, 42]. Zachowanie żywych komórek na ich powierzchni sprawia, że są nietrombogeniczne oraz mniej podatne na infekcje [21, 90]. Natomiast zachowanie takich komórek wewnątrz struktury niewątpliwie sprzyja szybszym procesom regeneracyjnym. Jednak obecność martwych komórek i/lub ich pozostałości

powstałych w następstwie procesu przetwarzania może być źródłem kalcyfikacji, która jest jedną z częstszych przyczyn reoperacji zastawek serca [12, 15, 61].

Produkcja biologicznych zastawek serca wiąże się z podaniem pobranych tkanek wielu czynnościom, czyli wspomnianemu już przetwarzaniu. W polskim prawodawstwie zdefiniowano je w przepisach Ustawy z dnia 1 lipca 2005 roku o pobieraniu, przechowywaniu i przeszczepianiu komórek, tkanek i narządów, a także w jej późniejszych zmianach. Zgodnie z tą ustawą omawiane czynności obejmują przygotowanie, transportowanie, konserwowanie i pakowanie tkanek lub narządów przeznaczonych do stosowania u ludzi. Przepisy definiują również pojęcie sterylizacji zarówno tkanek, jak i komórek. W myśl powyższej ustawy sterylizacja oznacza proces, w którym zastosowanie odczynników chemicznych, czynników biologicznych i czynników fizycznych ma na celu unieszkodliwienie patogenów w komórkach i tkankach [76, 77].

Sterylizacja to jeden z głównych etapów przygotowywania homogennych zastawek serca. Wybór optymalnej metody musi uwzględniać osiągnięcie jałowego produktu przy utrzymaniu jego właściwości. Najistotniejsze jest zachowanie żywotności komórek oraz cech strukturalnych tkanek. W największym stopniu pozwalają na to mieszaniny zawierające antybiotyki i inne chemioterapeutyki. Obecnie do sterylizacji, jak również w pozostałych etapach przetwarzania tkanek ludzkich, proponuje się i stosuje różne tego typu mieszaniny, a tendencja taka utrzymuje się od końca lat sześćdziesiątych ub.w. [4, 18, 19, 20, 25, 33, 35, 40].

W artykule omówiono literaturę z zakresu wykorzystania antybiotyków w procesie sterylizacji homogennych zastawek serca.

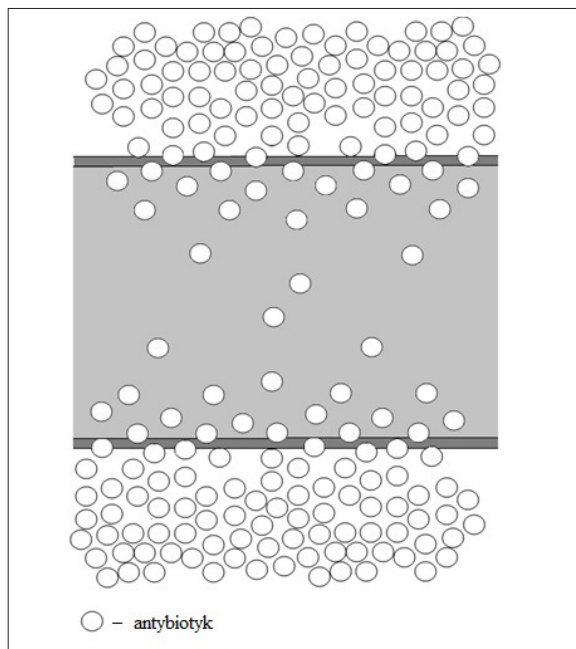


Ryc. 1. Proponowany schemat postępowania w procesie przetwarzania tkanek zastawki serca

ZASTAWKI JAKO ZAGROŻENIE MIKROBIOLOGICZNE?

Znaczący wpływ na zwiększenie skuteczności uzyskiwania pełnowartościowych biomateriałów ma zastosowanie zasad aseptyki oraz jak najkrótszy czas między zgonem dawcy a pobraniem tkanek. Banki tkanek wdrażają różne schematy postępowania w procesie ich przetwarzania. W pracy proponuje się również tego rodzaju schemat do przetwarzania tkanek zastawki serca (ryc. 1). W praktyce rozwiązania te są jednak indywidualne i uwarunkowane florą bakteryjną zależną od czynników środowiskowych.

Początkowo tkanki pobierano w salach prosektoryjnych; współcześnie optymalne warunki gwarantuje sala operacyjna. Zasady pobierania takich materiałów zostały ściśle określone na początku lat osiemdziesiątych ub.w. [62]. Od tej pory standardy się zmieniały, w istocie jednak zapewnienie jałowości często jest dość trudne i złożone [28, 40, 79]. Już na stosunkowo wczesnym etapie bankowania tkanek Yacoub i Kittle [40] odnotowali, że krew pobrana z serca schłodzonych zwłok była skażona, co dotyczyło nawet 85% analizowanych przypadków po autopsji wykonanej 6-48 godzin po zgonie. Wyka-



Ryc. 2. Uproszczony schemat dyfuzji roztworu antybiotyku do tkanki zastawki podczas sterylizacji

zono również, iż skuteczność sterylizacji rośnie wraz ze skróceniem okresu liczonego od chwili śmierci dawcy do pobrania tkanek [87]. Optymalnie czas ten wynosi 6 godzin (maksymalnie 24 godziny), a sama procedura powinna być przeprowadzona jak najszybciej [40].

Zastosowanie antybiotyków w procesie przetwarzania zastawek, zwłaszcza w sterylizacji, jest uzasadnione zarówno z powodu możliwych źródeł skażenia materiału tkankowego, jak i właściwości tkanek. Ich strukturę budują białka z rodziny kolagenów (głównie kolagen I i III), czyli białka o charakterze silnie hydrofilowym. Zastawki mogą być zatem skutecznie sterylizowane za pomocą wodnych roztworów antybiotyków, zdolnych do przenikania struktury tkanek w wyniku dyfuzji (ryc. 2). Tkanki są zazwyczaj skażone mieszaną florą bakteryjną, trudną do ilościowej i jakościowej oceny przed sterylizacją. Z danych literaturowych wynika, że do mikroorganizmów często występujących w pobieranych tkankach ludzkich należą m.in. paciorkowce tlenowe grup A, B, C i D (α -hemolityczne i β -hemolityczne), paciorkowce beztlenowe, gronkowce (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus salivarius*), a także wiele innych bakterii, wśród nich *Achromobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Aerococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Citrobacter* spp., *Clostridium* spp., *Corynebacterium* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Flavobacterium* spp., *Haemophilus* spp., *Klebsiella* spp., *Micrococcus* spp., *Mycobacteria* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., ponadto też grzyby z rodzaju *Candida albicans* [33, 69, 78, 79, 84, 85, 87].

Tabela 1. Ogólna charakterystyka najczęściej stosowanych metod sterylizacji biomateriałów tkankowych z uwzględnieniem wpływu na właściwości strukturalne i biochemiczne [7, 22, 28, 34, 50, 52, 67]

Czynnik sterylizujący	Charakterystyka metody	Zalety sterylizacji	Wady sterylizacji
Tlenek etylenu	Proces chemiczny polegający na wiązaniu tlenu etylenu z cząsteczkami białek mikroorganizmów	Denaturacja w małym stopniu; zwiększenie oporności na działanie kolagenazy	Możliwość reakcji między tlenkiem etylenu a grupami aminowymi białek; możliwość wywoływania silnego działania cytotoksycznego i rakotwórczego przez produkty reakcji tlenu etylenu z wodą i chlorkami; rozdzieranie i pęknięcie; zanik komórek; denaturacja białek
Promieniowanie gamma	Proces fizyczny wykorzystujący silne właściwości biobójcze promieniowania gamma	Duża skuteczność; dobra penetracja; nieznacznie podniesiona temperatura procesu; wyjaławianie biomateriałów w zamkniętych opakowaniach	Fragmentacja włókien macierzy pozakomórkowej spowodowana przez wysokie dawki promieniowania; możliwość oporności bakterii
Antybiotyki	Kąpiel zawierająca antybiotyki (4-37°C, 30 min–72 godz.)	Dobrze zachowana macierz pozakomórkowa i żywotność komórek	Skuteczność działania uzależniona od składu roztworu antybiotyków i temperatury; możliwość oporności mikroorganizmów – konieczność częstych zmian składu mieszaniny sterylizującej; komplikacje związane z doбором właściwego składu

ZAPEWNIENIE STERYLNOŚCI A OPTIMALNE WŁAŚCIWOŚCI HOMOGRAFTÓW

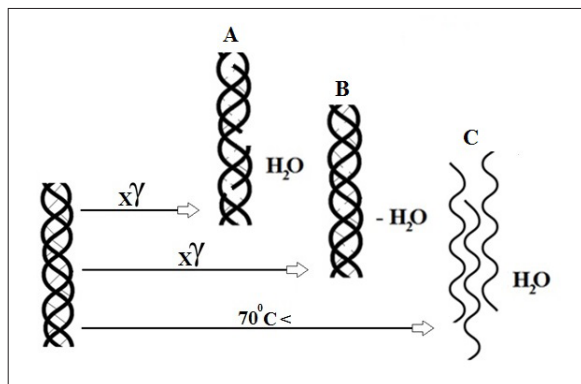
Wszystkie typy kolagenów zaliczane są do białek zawierających wiele aktywnych grup funkcyjnych, co decyduje o ich stosunkowo silnej reaktywności [26, 74, 79]. Ponadto, kolageny charakteryzują się termolabilnością, a ich znaczne uwodnienie w tkankach nie sprzyja gazoprzepuszczalności. Większość rutynowych metod sterylizacji, wymienianych m.in. w farmakopeach, nie może w tym wypadku zostać zastosowana, ze względu na duże ryzyko spowodowania niepożądanych zmian właściwości biologicznych, strukturalnych i powierzchniowych. Nadrzędną przyczyną wykluczenia wielu metod wyjaławiania jest konieczność zachowania żywych komórek w materiale tkankowym. Należy podkreślić, że w literaturze żywotność fibroblastów w zastawkach podaje się jako cechę determinującą ich trwałość. Ponieważ tkanki ludzkie są wykorzystywane głównie do otrzymywania wszczepów biowitalnych, wszystkie etapy przetwarzania tkanek, włączając w to sterylizację, mają na celu uzyskanie jałowego produktu przy utrzymaniu żywotności komórek dawcy [1, 7, 27, 39, 43, 50, 51, 54, 67, 71].

Do powszechnie znanych metod osiągnięcia sterylności należy użycie takich czynników jak promieniowanie jonizujące, wysoka temperatura, tlenek etylenu, aldehyd mrówkowy, aldehyd glutarowy i lakton kwasu β-hydroksypropionowego. Tylko część z nich znalazła zastosowanie w inżynierii biomateriałów, niemniej żadna nie pozwala na zachowanie żywotności komórek. W biomateriałach tkankowych proces sterylizacji może również wpływać niekorzystnie na wiele ich właściwości w razie wyboru nieodpowiedniej metody. Dlatego od lat analizuje się metody sterylizacji nie tylko pod kątem działania bakteriobójczego, ale także oddziaływania na tkanki. Zmiany zachodzące w obrębie struktury i powierzchni biomateriałów są rozpatrywane zarówno

w aspekcie pozytywnym, jak i negatywnym (tabela 1) [7, 22, 27, 34, 50, 52, 67].

Szczególną wagę przywiązuje się do możliwości skutecznej sterylizacji tkanek z jednoczesnym zachowaniem ich cech natywnych. Chociaż istnieje wiele sposobów ich wyjaławiania, mają znacząco ograniczony zakres aplikacji ze względu na labilność składników macierzy pozakomórkowej [7, 22, 46, 50, 51, 67]. Wśród wyrobów medycznych najczęściej wykorzystuje się metodę radiacyjną (⁶⁰Co, 25 kGy) [22]. Zastosowanie standardowych, wysokich dawek promieniowania zapewniających skuteczność sterylizacji wywołuje jednak niekorzystne zmiany właściwości fizycznych białka. Należy zaznaczyć, że zależy to od stopnia uwodnienia białka. Do fragmentacji włókien, ich rozszczepienia, zaburzeń struktury oraz pogorszenia właściwości mechanicznych dochodzi w większym stopniu w kolagenie uwodnionym niż w kolagenie odwodnionym przy zastosowaniu identycznych dawek promieniowania (ryc. 3). Po działaniu promieniowania stwierdzono również spadek rozpuszczalności kolagenu uwodnionego i wzrost rozpuszczalności kolagenu odwodnionego [58]. Ponadto, sterylizacja radiacyjna nie pozwala na zachowanie żywotności komórek [22], dlatego nie jest właściwą metodą w przypadku takich materiałów jak tkanki o dużej zawartości wody, tj. właśnie zastawki, osierdzie czy też rogowki.

Znaczne uwodnienie tkanek jest także przeciwwskazaniem do stosowania metod termicznych. Kolagen w wysokiej temperaturze bez kontrolowania jego uwodnienia ulega szybkiej denaturacji. Warunki te prowadzą do zniszczenia struktury helikalnej i naruszenia stabilności całego układu (ryc. 3). Eliminację niekorzystnego wpływu wysokiej temperatury osiąga się przez całkowite odwodnienie kolagenu, co jednak sprzyja powstaniu dodatkowych wiązań (ryc. 4 i 5), a w konsekwencji – utracie natywnych właściwości tkanek [75].



Ryc. 3. Działanie promieniowania gamma ($X\gamma$) w różnych stanach uwodnienia tkanki: uwodniona (A); odwodniona (B); a także wpływu podwyższonej temperatury ($70^{\circ}\text{C} <$) na strukturę kolagenu w uwodnionej tkance (C)

ZASTOSOWANIE ANTYBIOTYKÓW W STERYLIZACJI BIOLOGICZNYCH ZASTAWEK SERCA

Antybiotyki zaczęto stosować do sterylizacji homograftów w celu wyeliminowania najczęstszych wad pozostałych metod, wykorzystujących tlenek etylenu, lakton kwasu β -hydroksypropionowego, aldehyd mrówkowy czy też promieniowanie gamma. Powodowały, występowanie rozdarć i pęknięć tkanek, a przede wszystkim zmniejszały żywotność komórek [7, 50, 51, 67].

W historii produkcji homogennych zastawek serca można wyróżnić dwa przełomowe momenty. Pierwszy z nich jest związany z wprowadzeniem antybiotyków do procesu przetwarzania, a zwłaszcza do sterylizacji. Zespół kierowany przez Barratta-Boyesa (1969) jako pierwszy spopularyzował zastosowanie kąpeli zawierającej antybiotyki już pod koniec lat sześćdziesiątych ub.w. [5, 6]. Metoda szybko zyskała na znaczeniu dzięki właściwościom uzyskanych homograftów. Jak podają Wain i wsp., Barratt-Boyes i Roche w wyniku sterylizacji początkowo osiągnęli efekty bakteriobójcze i grzybobójcze przez synergistyczne działanie penicyliny, kanamycyny, streptomycyny i amfoterycyny B (PKSA) [83]. Niezależnie przeprowadzone badania wykazały

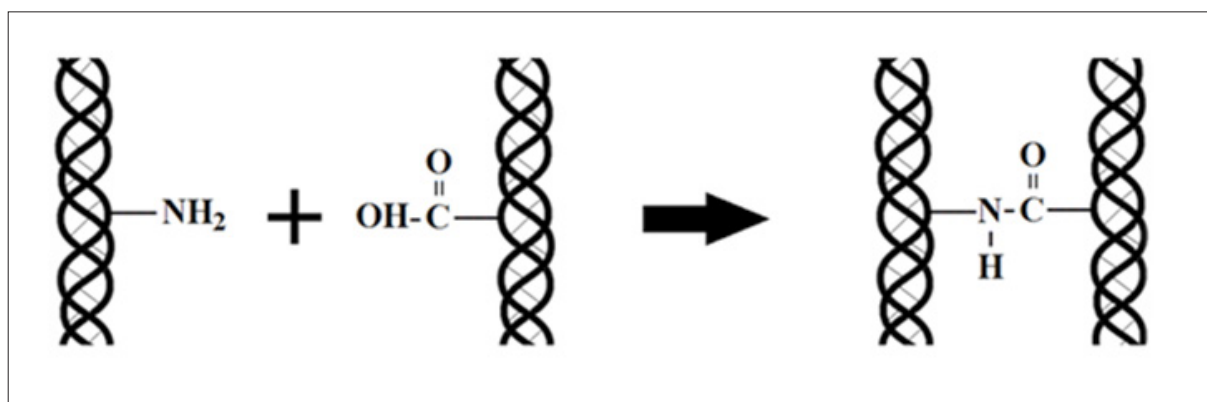
optymalny wskaźnik żywotności fibroblastów po sterylizacji z użyciem powyższej mieszanki [2]. Wkrótce potem inne mieszanki zaproponowało wiele zespołów [48, 83, 85, 87].

Drugim istotnym wydarzeniem było wprowadzenie na początku lat osiemdziesiątych ub.w. mieszanki o innym składzie. Zmiana miała umożliwić infiltrację wszczepu komórkami gospodarza. Nowa kąpiel sterylizująca zawierała cefoksytynę, linkomycynę, wankomycynę, poliomyksynę B i amfoterycynę B (CLWPA) w najniższych skutecznych dawkach. Ze składu wyeliminowano penicylinę i streptomycynę, ze względu na możliwość interakcji ze składnikami macierzy pozakomórkowej [69].

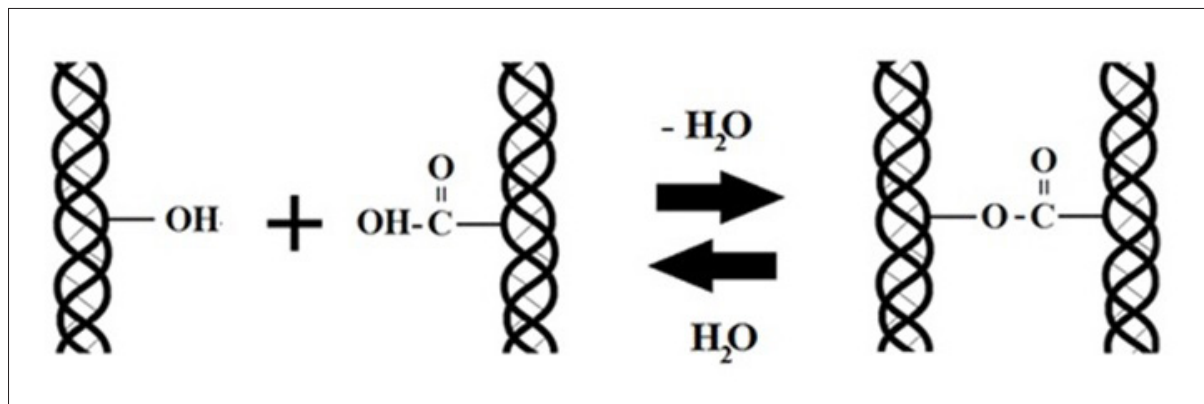
W następnych latach sterylizacja za pomocą antybiotyków została znacząco udoskonalona i dzięki temu jest stosowana do dziś [18, 19, 25, 35, 38, 59, 65, 66, 78, 80, 89]. Można jednak przyjąć, że mieszanki wprowadzone i upowszechnione przez zespoły Barratta-Boyesa oraz Strickett zapoczątkowały szybki postęp w przetwarzaniu homogennych zastawek serca.

SKŁAD MIESZANIN ANTYBIOTYKÓW DO STERYLIZACJI HOMOGRAFTÓW

Według powszechnie przyjętych standardów w farmakoterapii nie używa się jednocześnie substancji o działaniu bakteriobójczym i bakteriostatycznym. Stosuje się antybiotyki o możliwie najwęższym zakresie działania. Ponadto, ze względu na ryzyko interakcji farmaceutycznych, w przypadku podawania antybiotyków parenteralnie nie są one przeważnie przygotowywane w jednej mieszance. Odmiennie reguły obowiązują jednak w kąpielach antybiotykowych służących do wyjąławiania zastawek serca. Częste odchodzenie od wielu ogólnie panujących zasad wynika z tego, że po pobraniu wielonarządowym występuje wysokie ryzyko skażenia tkanek mieszaną florą bakteryjną. Dlatego też w dekontaminacji homogennych zastawek serca są wykorzystywane antybiotyki bakteriobójcze i bakteriostatyczne w jednej mieszance o możliwie najszerszym zakresie działania. Mieszanki zawierają antybiotyki grzybobój-



Ryc. 4. Reakcja powstawania wiązań peptydowych w wyniku reakcji kondensacji w odwadnianej tkance



Ryc. 5. Reakcja powstawania wiązań estrowych w wyniku reakcji estryfikacji w odwadnianej tkance

Tabela 2. Przykłady przedstawicieli poszczególnych grup antybiotyków wchodzących w skład mieszanin do sterylizacji biomateriałów tkankowych z uwzględnieniem rodzaju działania [3, 5, 6, 16, 27, 28, 34, 36, 48, 83, 85, 87]

Grupa	Przedstawiciele	Rodzaj działania
β-laktamy	Penicylina, metacylina, oksacylina, karbenicylina, cefalotyna, cefotaksym, cefalorydyna, cefoksytyna	Bakteriobójcze
Aminoglikozydy	Amikacyna, gentamycyna, kanamycyna, netylmycyna, neomycyna, streptomycyna	Bakteriobójcze
Makrolity	Erytromycyna	Bakteriostatyczne
Linkozamidy	Linkomycyna, klindamycyna	Bakteriostatyczne
Rifamycyny	Ryfampicyna	Bakteriobójcze
Polimiksyny	Polimiksyna B, polimiksyna E	Bakteriobójcze
Glikopeptydy	Wankomycyna	Bakteriobójcze
Polieni	Amfoterycyna B, nystatyna	Grzybobójcze

cze oraz inne chemioterapeutyki wykazujące takie właściwości (tabela 2) [3, 4, 5, 16, 27, 29, 34, 36, 48, 83, 85, 87]. W ostatnich latach w kąpielach do sterylizacji tkanek używa się składników, które zaproponowano w okresie intensywnego rozwoju tej metody [4, 5, 69, 83, 85, 87]. Niektóre z nich zastępuje się innymi, najczęściej z tej samej grupy lub o podobnym działaniu [14, 18, 19, 20, 28, 33, 40, 44, 45, 56, 63].

Początkowo w bankowaniu tkanek antybiotyki znajdowały zastosowanie nie tylko podczas sterylizacji, ale także innych etapów przetwarzania tkanek (płukanie i przechowywanie) [6, 30, 55]. Postępowanie takie miało na celu eliminację lub ograniczenie ich skażenia mikrobiologicznego. Od końca lat sześćdziesiątych ub.w. do obecnej dekady przeprowadzono wiele badań nad możliwością stosowania różnych antybiotyków w przetwarzaniu tkanek. Uwzględniono wiele parametrów, z których najważniejsze to skład mieszaniny, stężenie substancji oraz czas i temperatura sterylizacji. Zawartość składu kąpeli była uzależniona od skuteczności procesu sterylizacji przeprowadzanego w jednostkach badawczo-wdrożeniowych, takich jak banki tkanek czy szpitale (tabela 3) [3, 4, 5, 16, 18, 19, 27, 28, 29, 32, 41, 47, 48, 49, 69, 79, 81, 83, 85, 87, 88].

Skuteczność sterylizacji biomateriałów wynika bezpośrednio z mechanizmu i zakresu działania substancji aktywnych, co pozwala osiągnąć efekt synergistyczny użytych antybiotyków [28, 83, 85]. Na przykład Barratt-Boyes i Roche zaproponowali wyjaławianie tkanek z wykorzystaniem mieszaniny zawierającej PKSA [83]. Hamowanie syntezy ściany komórkowej przez penicylinę ułatwiało działanie kanamycyny i streptomycyny wewnątrz komórki. Zastosowanie tego składu wydaje się całkowicie zasadne, mimo wątpliwości związanych z wrażliwością penicyliny na działanie β-laktamaz. Penicylina jednak, należy do antybiotyków o dużej skuteczności terapeutycznej, zwłaszcza przeciwko paciorkowcom oraz innym bakteriom Gram-dodatnim. Natomiast kanamycyna i streptomycyna wykazują aktywność przeciwko takim bakteriom, jak *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., których obecność stwierdza się często w pobranym materiale. Analiza 121 przypadków umożliwiła ocenę przydatności klinicznej tkanek wyjałowionych za pomocą mieszaniny PKSA. Wyniki wykazały niewątpliwie zalety tak przygotowanego biomateriału. Przede wszystkim operowane osoby nie wymagały terapii przeciwzakrzepowej, nie zaobserwowano zmian zatorowych ani hemolizy. Omawiana metoda wpłynęła na istotne ograniczenie komplikacji i śmiertelności wśród pacjentów – sześćoletnia przeżywalność wynosiła 69% [6].

Tabela 3. Skład wybranych mieszanin antybiotyków stosowanych do sterylizacji biomateriałów tkankowych w bankach tkanek i szpitalach

Autor	Barratt- -Boyes i Roche [4]	Yacoub i Kittle [87]	Lockey i wsp. [48]	Gavin i wsp. [30-32]		Yacoub i wsp. [88]	Waterworth i wsp. [85]	Wain i wsp. [83]			Strickett i wsp. [69]
				1973	1973			HANYNM	NYDANM	DANYM	
Rok	1969	1970	1972	1973	1973	1973	1974	1977			1983
Amfoterycyna B	0,025	50,000*	-	-	0,010	0,250	-	-	-	-	0,025
Amikacyna	-	-	-	25,000*	-	-	-	-	-	-	-
Ampicylina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefalorydyna	-	10,000	-	-	-	10,000	-	10,000	0,040	0,040	-
Cefoksytyna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,240
Cefoperazon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefotaksym	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ceftazydym	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefuroksym	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cyprofloksacyna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Erytromycyna	-	-	6,000	-	-	-	-	-	-	-	-
Flucytozyna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flukonazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentamycyna	-	-	4,000	-	0,050	-	1,000	-	-	-	-
Imipenem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kanamycyna	1,000	-	-	1,000	0,050	-	-	-	-	-	-
Karbenicylina	-	-	-	-	-	10,000	-	10,000	10,000	10,000	-
Ketokonazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Klotrimazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linkomycyna	-	-	-	-	0,050	-	-	-	-	-	0,120
Metronidazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metycylina	-	-	10,000	-	-	-	-	-	-	-	-
Neomycyna	-	5,000	-	-	-	5,000	-	5,000	1,000	1,000	-
Nystatyna	-	-	2500,000*	-	-	-	-	0,500	0,100	0,500	-
Penicylina	50,000*	-	-	50,000*	-	-	1,000	-	-	-	-
Polimiksylna B	-	-	-	-	-	0,070	0,010	0,700	0,700	0,700	0,100
Polimiksylna E	-	-	-	-	0,050	-	-	-	-	-	-
Streptomycyna	1,000	-	-	1,000	-	-	-	-	-	-	-
Tykarcylina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tobramycyna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Wankomycyna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,050

Stężenie dla substancji czynnych w mieszaninach podano w 1 mg/ 1ml, z wyjątkiem substancji oznaczonych *, dla których stężenie wyrażono w j.m./ 1 ml [3, 5, 6, 16, 18, 19, 27, 28, 31, 32, 41, 48, 49, 70, 79, 81, 83, 85, 87, 88].

Autor	Virdi i wsp. [81]	Jonas i wsp. [41]	Angell i wsp. [3]	Gall i wsp. [27, 28]		Mestres i wsp. [53]	Da Costa i wsp. [16]	Verghese i wsp. [79]	Pompilio i wsp. [59]	Leeming i wsp. [47]	
				1995	1998					2000	2001
Rok	1986	1988	1989	1995	1998	2000	2001	2004	2004	2005	
Amfoterycyna B	-	25,000	0,005	0,010	-	0,010	-	0,025	-	-	0,050
Amikacyna	-	-	-	-	-	-	-	0,100	-	-	-
Ampicylina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefalorydyna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefoksytyna	-	240,000	-	-	-	-	0,240	0,240	-	-	-
Cefoperazon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefotaksym	-	-	-	-	-	-	-	0,250	-	-	-
Ceftazydym	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefuroksym	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cyprofloksacyna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,200
Erytromycyna	6,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flucytozyna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flukonazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentamycyna	4,000	-	0,025	-	-	-	-	0,120	-	4,000	4,000
Imipenem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,240	-
Kanamycyna	-	-	0,025	-	-	-	-	-	-	-	-
Karbenicylina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ketokonazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Klotrimazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linkomycyna	-	120,000	0,025	-	-	-	0,120	-	0,120	-	-
Metronidazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metycylina	10,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neomycyna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nystatyna	0,833	-	-	-	-	-	-	-	-	0,050	-
Penicylina	-	-	-	0,030	0,030	50,000*	-	-	-	-	-
Polimyksyna B	-	100,000	-	-	-	-	0,100	-	0,100	0,200	-
Polimyksyna E	-	-	0,025	-	-	-	-	-	-	-	-
Streptomycyna	0,200	-	-	0,050	0,050	0,050	-	-	-	-	-
Tykarcylina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tobramycyna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Wankomycyna	-	50,000	-	-	-	-	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050

Autor	Schenke-Layland i wsp. [66]	Van Kats i wsp. [78]	Jashari i wsp. [40]	de By i wsp. [18]					Villalba i wsp. [80]
				Barcelona, BST	Barcelona, TSF	Berlin	Bristol	Bruksela	
Rok	2006	2010	2011	2012					2012
amfoterycyna B	-	-	-	0,005	0,010	-	0,050	-	0,005
amikacyna	1,200	0,012	-	-	-	0,600	-	-	0,050
ampicylina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cefalorydyna	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cefoksytyna	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cefoperazon	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cefotaksym	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ceftazydym	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cefuroksym	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cyprofloksacyna	0,300	0,003	-	-	-	0,600	0,200	-	-
erytromycyna	-	-	-	-	-	-	-	-	-
flucytozyna	3,000	0,030	-	-	-	1,500	-	-	-
flukonazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gentamycyna	-	-	-	-	-	-	4,000	-	-
Imipenem	-	-	-	-	-	-	-	-	-
kanamycyna	-	-	-	-	-	-	-	-	-
karbenicylina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ketokonazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
klotrimazol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,050
linkomycyna	-	-	0,120	0,100	-	-	-	0,120	-
metronidazol	1,200	0,012	-	-	-	0,600	-	-	0,050
metycylina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
neomycyna	-	-	-	-	-	-	-	-	-
nystatyna	-	-	-	-	-	-	-	-	-
penicylina	-	-	-	-	50,000*	-	-	-	-
polimyksyna B	-	-	0,124	0,120	-	-	-	0,124	-
polimyksyna E	-	-	-	-	-	-	-	-	-
streptomycyna	-	-	-	-	0,050	-	-	-	-
tykarcylina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tobramycyna	-	-	-	-	-	-	-	-	0,050
wankomycyna	1,200	0,012	0,050	0,050	0,050	0,600	0,050	0,050	0,050

Autor	de By i wsp. [18]							Delmo Walter i wsp. [19]
	Linz	Londyn	Lund	Mediolan	Paryż	Rotterdam	Treviso	
Rok	2012							2012
Amfoterycyna B	0, 125	0, 100	0, 250	-	-	-	-	-
Amikacyna	-	-	-	-	-	0, 600	-	0, 600
Ampicylina	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefalorydyna	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefoksytyna	-	-	-	0, 240	-	-	-	-
Cefoperazon	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefotaksym	-	-	-	-	-	-	-	-
Ceftazydym	-	-	-	-	-	-	240, 000	-
Cefuroksym	-	0, 250	-	-	-	-	-	-
Cyprofloksacyna	0, 150	0, 200	-	-	-	0, 150	-	0, 150
Erytromycyna	-	-	-	-	-	-	-	-
Flucytozyna	-	-	-	-	-	1, 500	-	1, 500
Flukonazol	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentamycyna	0, 600	0, 080	0, 500	-	0, 320	-	-	-
Imipenem	-	-	-	-	-	-	-	-
Kanamycyna	-	-	-	-	-	-	-	-
Karbenicylina	-	-	-	-	-	-	-	-
Ketokonazol	-	-	0, 100	-	-	-	-	-
Klotrimazol	-	-	-	-	-	-	-	-
Linkomycyna	-	-	-	0, 120	0, 600	-	120, 000	-
Metronidazol	0, 600	-	-	-	-	0, 600	-	0, 600
Metacylina	-	-	-	-	-	-	-	-
Neomycyna	-	-	-	-	-	-	-	-
Nystatyna	-	-	-	-	-	-	-	-
Penicylina	-	-	-	-	-	-	-	-
Polimyksyna B	-	-	-	0, 100	-	-	100, 000	-
Polimyksyna E	-	1000, 000*	0, 200	-	-	-	-	-
Streptomycyna	-	-	-	-	-	-	-	-
Tykarcyklina	-	-	-	-	-	-	-	-
Tobramycyna	-	-	-	-	-	-	-	-
Wankomycyna	0, 600	0, 500	0, 500	0, 050	0, 500	0, 600	100, 000	0, 600

Dane opublikowane przez Galla i wsp. [27] jednoznacznie potwierdzają słuszność stosowania mieszaniny zawierającej penicylinę i streptomycynę. Wykorzystuje się ją od 1969 r. Należy jednak dodać, iż od 1975 r. tkanki były krioprezerwowane, od 1988 r. ze składu wyłączono amfoterycynę B.

Natomiast z dziesięcioletnich badań przeprowadzonych przez Mestresa i wsp. wynika, że wystarczająca jest sterylizacja w mieszaninie PSA [53]. Połączenie antybiotyków β -laktamowych i aminoglikozydowych stosuje się do dzisiaj, np. cefoksytyny i gentamycyny [33], penicyliny i streptomycyny czy też ampicyliny i gentamycyny [18].

Dobór składników mieszaniny do wyjaławiania zależał często od sposobu i warunków pobierania tkanek. Przyczyną rezygnacji przez Lockey i wsp. z metody wprowadzonej przez Barratta-Boyesa i Roche'a było pobieranie tkanek w czasie sekcji w miejscowym prosektorium bez zachowania sterylnych warunków w czasie 24-72 godzin od zgonu [4, 5, 48]. Zaproponowano alternatywną kąpiel zawierającą metycylinę, gentamycynę, erytromycynę i nystatynę (MGEN); skład zapewniał szersze pole działania [48]. Metycylina – penicylina półsyntetyczna o wąskim zakresie działania – charakteryzuje się dużą skutecznością w zwalczaniu zakażeń spowodowanych obecnością gronkowców opornych na penicyliny naturalne. Gentamycyna wykazuje znaczną skuteczność w likwidacji bakterii Gram-ujemnych, erytromycyna – właściwości zbliżone do penicyliny, a nystatina – skuteczność w zwalczaniu drożdżaków. Lockey i wsp. [48] uzyskali jałowość biomateriałów w każdym badanym przypadku dla mieszaniny zawierającej MGEN oraz w 53% przypadków dla mieszaniny zawierającej PKSA. Natomiast przeżywalność fibroblastów podczas sterylizacji w obydwu mieszaninach była podobna i wynosiła około 70%.

Tymczasem Waterworth i wsp. jako optymalne składniki mieszaniny sterylizującej zastosowali penicylinę, gentamycynę, polimiksynę B i nystatynę [85]. Nieco wcześniej Yacoub i wsp. z Harefield Hospital wprowadzili kąpiel antybiotykową zawierającą cefalorydynę, karbenicylinę, neomycynę, polimiksynę B i amfoterycynę B [88]. Z czasem amfoterycynę B, z powodu cytotoksyczności, zastąpiono nystatyną w mieszaninie nazywanej HANYNM (Harefield antibiotics with nystatin in nutrient medium). Biorąc pod uwagę szkodliwość wysokich stężeń antybiotyków, w innej mieszaninie obniżono stosowane dawki. W mieszaninie określanej jako NYDANM (nystatin with dilute antibiotics in nutrient medium) zmniejszono stężenie cefalorydyny, neomycyny, nystatyny, natomiast w mieszaninie DANYNM (dilute antibiotics with nystatin in nutrient medium) wrócono do wyższego stężenia nystatyny przy zachowaniu stężenia pozostałych antybiotyków [83].

Dodatek cefalorydyny, neomycyny i amfoterycyny B do mieszaniny antybiotyków pozwolił osiągnąć 97% sku-

teczność procesu sterylizacji. Użycie cefalotyny, gentamycyny i amfoterycyny B umożliwiło zachowanie komórek, a także włókien łącznotkankowych [9]. Zastosowanie metycyliny, gentamycyny, streptomycyny, erytromycyny i nystatyny (MGSEN) w mieszaninie do sterylizacji biologicznych zastawek serca doprowadziło do wyeliminowania m.in. zapalenia wsierdza o różnej etiologii, a także hemolizy, kalcyfikacji i stenozy [81]. Langley i wsp. [44] wykorzystali mieszaninę MGSEN do wyjaławiania tkanek w czasie 24 godzin w temperaturze pokojowej, a następnie do ich przechowywania w temperaturze 4°C do trzech miesięcy. Dzięki zastosowaniu tej procedury udało się uzyskać niską śmiertelność (tj. około 21% po dziesięciu latach), redukcję przypadków zapalenia wsierdza do zaledwie 2,80% oraz trombo-genności do poziomu prawie nieistotnego. Alternatywą była także kąpiel zawierająca amikacynę, gentamycynę, cefotaksym i amfoterycynę B, wzbogaconą o wankomycynę, która zapewniała sterylność biomateriału i jednocześnie przeżywalność fibroblastów [79].

Zupełnie odmienny skład mieszaniny do wyjaławiania zastawek przedstawili Strickett i wsp. (tabela 3). Całkowita zmiana komponentów była spowodowana podejrzaniem dotyczącymi ewentualnych oddziaływań antybiotyków ze składnikami macierzy pozakomórkowej, tj. glikozoaminoglikanów z antybiotykami aminoglikozydowymi, a także kolagenu błony podstawnej z penicyliną [69]. Po zaobserwowaniu zadowalających wyników sterylizacji zaczęto stosować mieszaninę lub mieszaniny o zmodyfikowanym składzie ilościowym i jakościowym w innych ośrodkach [16, 41]. Mieszanina CLWPA była kąpielą o szerokim zakresie działania i mimo niskiego stężenia antybiotyków okazała się skuteczniejsza w wyjaławianiu tkanek od wcześniejszej, zawierającej PSA. Uzyskano to, dzięki synergistycznemu oddziaływaniu składników, polimiksyna B wykazuje bowiem aktywność przeciwko *Pseudomonas* spp. i pałeczkom Gram-ujemnym, wankomycynę zaś dodano w celu zniszczenia *Enterococcus faecalis* opornych na cefoksytynę i linkomycynę oraz ze względu na aktywność przeciwko innym bakteriom Gram-dodatnim. Cefoksytynę zastosowano w celu unieszkodliwiania bakterii Gram-ujemnych i beztlenowców, a linkomycynę przeciwko bakteriom Gram-dodatnim [69]. Przeprowadzone badania nie wykazały wyraźnych różnic między tkankami sterylizowanymi w mieszaninie CLWPA poddawanymi i niepoddawanymi krioprezerwacji [41]. W badaniach porównawczych tkanek sterylizowanych za pomocą kąpeli opracowanych przez zespoły Barratta-Boyesa i Roche'a oraz Strickett nie stwierdzono istotnych różnic we właściwościach mechanicznych tkanek poddanych działaniu PKSA i CLWPA [13].

Jednak zastosowanie amfoterycyny B w sterylizacji wydawało się z czasem coraz bardziej kontrowersyjne. Była często uznawana za skuteczną w mieszaninach z innymi antybiotykami, jak w przypadku połączenia z gentamycyną, polimiksyną B, wankomycyną i klinkamycyną. Metoda pozwalała na zachowanie integralności

struktury tkanek [43]. Podkreślano jednak niekorzystny wpływ amfoterycyny B na zachowanie żywotności fibroblastów [1, 11] przy jej niewystarczającej skuteczności [28]. Doprowadziło to do zastąpienia jej innymi substancjami grzybobójczymi, takimi jak nystatyna, flukonazol czy flucytozyna [29, 63, 65, 81, 86]. Niemniej, mimo niepożądanych skutków stosowania amfoterycyny B do sterylizacji tkanek, była nadal używana w niektórych ośrodkach [18, 47, 60].

Z danych literaturowych ostatniej dekady wynika, że skład mieszaniny sterylizacyjnej stale ulega modyfikacjom. W wielu mieszaninach pojawiły się amikacyna [60, 65, 79, 86], cyprofloksacyna [65, 68, 86], metronidazol [60, 65, 68, 86] czy też inhibitory β -laktamaz [18]. Do dobrze znanych kąpeli antybiotykowych stanowiących nowe rozwiązania należą mieszaniny nazywane potocznie „Cambridge” i „Bristol”. „Cambridge” zawiera gentamycynę, wankomycynę, polimyksynę B, imipenem i nystatynę [37], a „Bristol” – gentamycynę, wankomycynę, cyprofloksacynę i amfoterycynę B [47].

DWIE MIESZANINY ZAMIAST JEDNEJ

Niektóre ośrodki proponowały stosowanie dwóch mieszanin antybiotyków w czasie przetwarzania tkanek w celu zwiększenia skuteczności ich dekontaminacji [3, 52, 63]. Angell i wsp. [3] w pierwszym etapie użyli gentamycyny, linkomycyny, polimyksyny E, kanamycyny i amfoterycyny B (3 h, 37°C), a w drugim gentamycyny, linkomycyny i amfoterycyny B (21 h, 37°C).

McNally i Brockbank [52] wprowadzili sterylizację zastawki przez umieszczenie jej w pierwszej kolejności w mieszaninie zawierającej cefoksytynę, linkomycynę, wankomycynę, polimyksynę B (24 h, 4°C), a następnie przeniesienie do roztworu zawierającego cefoksytynę, wankomycynę, linkomycynę, cefotaksym, netylmycynę i ryfampicynę w 37°C przed krioprezerwacją. Zastosowanie dwóch kąpeli okazało się skuteczniejsze w eliminacji skażenia niż sterylizacja z wykorzystaniem tylko pierwszej mieszaniny. Aplikacja obydwu nie zabezpieczyła wprawdzie przed skażeniem drożdżakami, ze względu na brak w roztworach składnika przeciwwgrzybiczego, jednak ten sposób wyjaławiania został zaprojektowany w celu eliminacji paciorkowców, gronkowców i *Propionibacterium* spp.

Sadowski i wsp. [63] również stosowali dwie odmienne mieszaniny antybiotyków. Do sterylizacji wykorzystywali amfoterycynę B, neomycynę, cefotaksym, polimyksynę B i karbenicylinę, a roztwór do przechowywania tkanek zawierał streptomycynę, penicylinę i flukonazol. Taka procedura pozwoliła na osiągnięcie średniej trwałości homografu po wszczepieniu w wymiarze 12,4 \pm 4,54 roku.

Użycie dwóch mieszanin jest w pełni uzasadnione ze względu na wstępną dekontaminację i finalną sterylizację. Ponadto, trzeba zaznaczyć, iż w różnych etapach przetwarzania tkanek jest właściwe zastosowanie róż-

nych kompozycji antybiotyków. Zatem można rozważyć aplikowanie nawet trzech mieszanin:

- we wstępnym oczyszczaniu po pobraniu,
- we właściwej sterylizacji i
- do krótkoterminowego przechowywania przed krioprezerwacją.

INNE ASPEKTY STERYLIZACJI

Leeming i wsp. [47] badali możliwość uwalniania się antybiotyków po sterylizacji homogennych zastawek serca w wymienionych wcześniej mieszaninach „Cambridge” i „Bristol”. Na szczególną uwagę zasługuje to, że mieszaniny zawierają dużo wyższe stężenia gentamycyny w porównaniu z innymi. Jej oddziaływania z kolagenem są stosunkowo dobrze poznane: gentamycyna łączy się z kolagenem wiązaniem jonowym między grupami aminowymi antybiotyku, a karboksylowymi białka [82]. Interakcje gentamycyna-kolagen są powszechnie wykorzystywane do wytwarzania implantowanych postaci leku, takich jak gąbki kolagenowe zawierające gentamycynę. Kolagen służy także jako nośnik leków w produktach leczniczych stosowanych zewnętrznie i mających czasowy kontakt z tkankami, np. insertach czy osłonach kolagenowych [75].

Nie należy zapominać, iż przy tak dużym stężeniu gentamycyny w mieszaninach sterylizujących, jak w „Cambridge” i „Bristol”, w tkance niewątpliwie występują dwie frakcje antybiotyku – związana i niezwiązana z jej strukturą. Nie można wykluczyć powstawania oddziaływań gentamycyny z kolagenem oraz pułapowania jej przez strukturę tkanki. Skutkiem tego jest możliwość uwalniania się gentamycyny w warunkach *in vivo* po wszczepieniu zastawki. Badania Leeminga i wsp. [47] jednoznacznie wykazały obecność gentamycyny i wankomycyny w tkankach po ich sterylizacji. Jednak ilość antybiotyku związanego z tkanką była ściśle uzależniona od jego właściwości fizykochemicznych, a także od składu tkanki i jej struktury. Trzeba również nadmienić o potencjalnym występowaniu innych oddziaływań.

Niedawne badania dekontaminacji zastawek serca właściwie nie dotyczą rozwoju nowych mieszanin do sterylizacji, skuteczności tej procedury oraz zapewnienia przeżywalności komórek. Analizuje się natomiast efektywność usuwania antybiotyków ze struktury tkanek po ich przetwarzaniu [29]. Jest to szczególnie istotne zagadnienie ze względu na to, iż obecność antybiotyków w tkance może maskować skażenie mikrobiologiczne analizowane podczas oceny skuteczności procesu sterylizacji [23].

Z powodu zwiększenia trwałości materiału tkankowego na uwagę zasługuje ewentualne zastosowanie w przetwarzaniu tkanek antybiotyków o właściwościach inhibitorów metaloproteaz. Właściwości takie wykryto dla tetracyklin [72], ponadto wskazano na możliwość wykorzystania doksycykliny do przedłużenia żywot-

ności komórek [70]. Doksycyklina była badana również jako inhibitor odpowiedzi immunologicznej. Usiłowano wykazać hamowanie odpowiedzi immunologicznej u myszy po transplantacji serca. Uzyskane wyniki okazały się jednak mało skuteczne [8].

PODSUMOWANIE

Zastosowanie antybiotyków do sterylizacji biologicznych zastawek serca odgrywa ważną rolę. Niewątpliwie antybiotyki wpływają w istotny sposób na przeżywalność komórek i elementy macierzy pozakomórkowej. Skład mieszanin sterylizujących oraz warunki tego

procesu podlegały od ich wprowadzenia nieustannym modyfikacjom.

Obecnie, właściwie wydaje się zastosowanie antybiotyków również w takich etapach przetwarzania tkanek, jak transport po ich pobraniu, preparatyka, przechowywanie czy rozmrażanie. Stosowane metody i procedury są zasadniczo zoptymalizowane w zakresie działania przeciwbakteryjnego. W ostatnich latach wskazano jednak na konieczność usuwania pozostałości antybiotyków w przygotowanych biomateriałach ze względu na działania niepożądane oraz fałszowanie wyników badań mikrobiologicznych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Aguirregoicoa V., Kearney J.N., Davies G.A., Gowland G.: Effects of antifungals on the viability of heart valve cusp derived fibroblasts. *Cardiovasc. Res.*, 1989; 23: 1058-1061
- [2] Al-Janabi N., Gonzalez-Lavin L., Neirotti R., Ross D.N.: Viability of fresh aortic valve homografts: a quantitative assessment. *Thorax*, 1972; 27: 83-86
- [3] Angell W.W., Oury J.H., Duran C.G., Infantes-Alcon C.: Twenty-year comparison of the human allograft and porcine xenograft. *Ann. Thorac. Surg.*, 1989; 48: S89-S90
- [4] Barratt-Boyes B.G., Roche A.H.: A review of aortic valve homografts over a six and one-half year period. *Ann. Surg.*, 1969; 170: 483-492
- [5] Barratt-Boyes B.G., Roche A.H., Brandt P.W., Smith J.C., Lowe J.B.: Aortic homograft valve replacement. A long-term follow-up of an initial series of 101 patients. *Circulation*, 1969; 40: 763-775
- [6] Barratt-Boyes B.G., Roche A.H., Whitlock R.M.: Six-year review of the results of freehand aortic valve replacement using an antibiotic sterilized homograft valve. *Circulation*, 1977; 55: 353-361
- [7] Beech P.M. Jr., Bowman F.O. Jr., Kaiser G.A., Malm J.R.: Frozen irradiated aortic valve homografts. Long-term evaluation. *N. Y. State J. Med.*, 1973; 73: 651-654
- [8] Bellahsene A., Forsgren A.: Effect of doxycycline on immune response in mice. *Infect. Immun.*, 1985; 48: 556-559
- [9] Bolooki H., Rubinson R.M., Prochazka J., Jude J.R.: A simple method of aortic homograft valve sterilization and preservation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1972; 63: 249-257
- [10] Breitenbach I., Wimmer-Greinecker G., Bockeria L.A., Sadowski J., Schmitz C., Kapelak B., Bartus K., Muratov R., Harringer W.: Sutureless aortic valve replacement with the Trilog Aortic Valve System: multicenter experience. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2010; 140: 878-884
- [11] Brockbank K.G., Dawson P.E.: Cytotoxicity of amphotericin B for fibroblasts in human heart valve leaflets. *Cryobiology*, 1993; 30: 19-24
- [12] Chitsaz S., Gundiah N., Blackshear C., Tegegn N., Yan K.S., Azadani A.N., Hope M., Tseng E.E.: Correlation of calcification on excised aortic valves by micro-computed tomography with severity of aortic stenosis. *J. Heart Valve Dis.*, 2012; 21: 320-327
- [13] Christie G.W., Barratt-Boyes B.G.: Biaxial mechanical properties of explanted aortic allograft leaflets. *Ann. Thorac. Surg.*, 1995; 60: S160-S164
- [14] Christie G.W., Barratt-Boyes B.G.: Identification of a failure mode of the antibiotic sterilized aortic allograft after 10 years: implication for their long-term survival. *J. Card. Surg.*, 1991; 6: 462-467
- [15] Corrao S., Messina S., Pistone G., Calvo L., Scaglione R., Licata G.: Heart involvement in Rheumatoid Arthritis: Systematic review and meta-analysis. *Int. J. Cardiol.*, 2013; 167: 2031-2038
- [16] da Costa F.D., da Costa M.B., da Costa I.A., Poffo R., Sardeto E.A., Matte E.: Clinical experience with heart valve homografts in Brazil. *Artif. Organs*, 2001; 25: 895-900
- [17] Dainese L., Biglioli P.: Human or animal homograft: could they have a future as a biological scaffold for engineered heart valves? *J. Cardiovasc. Surg.*, 2010; 51: 449-456
- [18] de By T.M., Parker R., Delmo Walter E.M., Hetzer R.: Cardiovascular tissue banking in Europe. *HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth.*, 2012; 4: 251-260
- [19] Delmo Walter E.M., de By T.M., Meyer R., Hetzer R.: The future of heart valve banking and of homografts: perspective from the Deutsches Herzzentrum Berlin. *HSR Proc. Intensive Care Cardiovasc. Anesth.*, 2012; 4: 97-108
- [20] Díaz Rodríguez R., Van Hoeck B., Mujaj B., Ngakam R., Fan Y., Bogaerts K., Jashari R.: Bacteriology testing of cardiovascular tissues: comparison of transport solution versus tissue testing. *Cell Tissue Bank*, 2016; 17: 211-218
- [21] Doty J.R., Salazar J.D., Liddicoat J.R., Flores J.H., Doty D.B.: Aortic valve replacement with cryopreserved aortic allograft: ten-year experience. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1998; 115: 371-379
- [22] Dziejcz-Gocławska A., Stachowicz W.: Sterylizacja radiacyjna przeszczepów tkankowych. W: Pawlicki G., Pałko T., Gólnik N., Gwiazdowska B., Królicki L. (red. tomu). *Fizyka medyczna*. Tom 9. W: Nałęcz M. (red. serii). *Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna*. 2000. Akademicka Oficyna Wydawnicza Exit, Warszawa 2002, 329-347
- [23] Easlund T.: Bacterial infection transmitted by human tissue allograft transplantation. *Cell Tissue Bank*, 2006; 7: 147-166
- [24] Englberger L., Carrel T.P., Doss M., Sadowski J., Bartus K., Eckstein F.F., Asch F.M., Martens S.: Clinical performance of a sutureless aortic bioprosthesis: five-year results of the 3f Enable long-term follow-up study. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2014; 148: 1681-1687
- [25] Fan Y.D., Van Hoeck B., Holovska V., Jashari R.: Evaluation of decontamination process of heart valve and artery tissues in European Homograft Bank (EHB): a retrospective study of 1,055 cases. *Cell Tissue Bank*, 2012; 13: 297-304
- [26] Friess W.: Collagen – biomaterial for drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 1998; 45: 113-136
- [27] 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: 1032-1038

[28] Gall K., Smith S., Willmette C., Wong M., O'Brien M.: Allograft heart valve sterilisation: a six-year in-depth analysis of a twenty-five-year experience with low-dose antibiotics. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1995; 110: 680-687

[29] 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: 107-115

[30] Gavin J.B., Barratt-Boyes B.G., Hitchcock G.C., Herdson P.B.: Histopathology of "fresh" human aortic valve allografts. *Thorax*, 1973; 28: 482-487

[31] Gavin J.B., Herdson P.B., Monro J.L., Barratt-Boyes P.G.: Pathology of antibiotic-treated human heart valve allografts. *Thorax*, 1973; 28: 473-481

[32] Gavin J.B., Monro J.L., Wall F.M., Chalcraft S.C.: Fine structural changes in the fibroblasts of canine heart valves prepared for grafting. *Thorax*, 1973; 28: 748-755

[33] Germain M., Thibault L., Jacques A., Tremblay J., Bourgeois R.: Heart valve allograft decontamination with antibiotics: impact of the temperature of incubation on efficacy. *Cell Tissue Bank*, 2010; 11: 197-204

[34] Goffin Y.A., Hoeck van B., Jashari R., Soots G., Kalmar P.: Banking of cryopreserved heart valves in Europe: assessment of a 10-year operation in the European Homograft Bank (EHB). *J. Heart Valve Dis.*, 2000; 9: 207-214

[35] Heng W.L., Seck T., Tay C.P., Chua A., Song C., Lim C.H., Lim Y.P.: Homograft banking in Singapore: two years of cardiovascular tissue banking in Southeast Asia. *Cell. Tissue Bank*, 2013; 14: 187-194

[36] Hickey E., Langley S.M., Allemby-Smith O., Livesey S.A., Monro J.L.: Subcoronary allograft aortic valve replacement: parametric risk-hazard outcome analysis to a minimum of 20 years. *Ann. Thorac. Surg.*, 2007; 84: 1564-1570

[37] Hunt C.J., Caffrey E.A., Large S.R.: Factors affecting the yield of cardiac valve allografts from living unrelated donors. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 1998; 13: 71-77

[38] Jashari R., Faucon F., Hoeck B.V., Gelas S.D., Fan Y., Vandembulcke S.: Determination of residual antibiotics in cryopreserved heart valve allografts. *Transfus. Med. Hemother.*, 2011; 38: 379-386

[39] 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: 247-255

[40] Jashari R., Van Hoeck B., Ngakam R., Goffin Y., Fan Y.: Banking of cryopreserved arterial allografts in Europe: 20 years of operation in the European Homograft Bank (EHB) in Brussels. *Cell Tissue Bank*, 2013; 14: 589-599

[41] Jonas R.A., Ziemer G., Britton L., Armiger L.C.: Cryopreserved and fresh antibiotic-sterilized valved aortic homograft conduits in a long-term sheep model. Hemodynamic, angiographic, and histologic comparisons. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1988; 96: 746-755

[42] Kosuga T.: The effect of allogeneic or xenogeneic immune responses and preservation techniques on transplanted aortic valve grafts. *Kurume Med. J.*, 2000; 47: 13-23

[43] Lang S.J., Giordano M.S., Cardon-Cardo C., Summers B.D., Staiano-Coico L., Hajjar D.P.: Biochemical and cellular characterization of cardiac valve tissue after cryopreservation or antibiotic preservation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1994; 108: 63-67

[44] Langley S.M., Livesey S.A., Tsang V.T., Barron D.J., Lamb R.K., Ross J.K., Monro J.L.: Long-term results of valve replacement using antibiotic-sterilised homografts in the aortic position. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 1996; 10: 1097-1106

[45] Langley S.M., McGuirk S.P., Chaudhry M.A., Livesey S.A., Ross

J.K., Monro J.L.: Twenty-year follow-up of aortic valve replacement with antibiotic sterilized homografts in 200 patients. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1999; 11: 28-34

[46] Lee H.B., Khang G., Lee J.H.: Polymeric biomaterials. W: Park J.B., Bronzino J.D. (red.). *Biomaterials. Principles and applications*. CRC Press, Boca Raton 2003

[47] Leeming J.P., Lovering A.M., Hunt C.J.: Residual antibiotics in allograft heart valve tissue samples following antibiotic disinfection. *J. Hosp. Infect.*, 2005; 60: 231-234

[48] Lockey E., Al-Janabi N., Gonzalez-Lavin L., Ross D.N.: A method of sterilizing and preserving fresh allograft heart valves. *Thorax*, 1972; 27: 398-400

[49] Lockey E., Gonzalez-Lavin L., Ray I., Chen R.: Bacteraemia after open-heart surgery. *Thorax*, 1973; 28: 183-187

[50] Longmore D.B., Lockey E., Ross D.N., Pickering B.N.: The preparation of aortic-valve homografts. *Lancet*, 1966; 2: 463-464

[51] Manhas D.R., Mohri H., Merendino K.A.: Late results of beta-propiolactone sterilized aortic homograft valves. A study of fifty-one patients followed up five to seven and a half years. *Am. J. Surg.*, 1973; 126: 255-262

[52] McNally R.T., Brockbank K.G.: Issues surrounding the preservation of viable allograft heart valves. *J. Med. Eng. Technol.*, 1992; 16: 34-38

[53] Mestres C.A., Agusti E., Martinez A., Cabrer C., Manyalich M., Caraña R., Pomar J.L.: Cardiovascular tissue banking in the non-cadaveric setting: ten-year experience of a university hospital-based bank with active organ donation program. *J. Heart Valve Dis.*, 2000; 9: 523-529

[54] Mirabet V., Carda C., Solves P., Novella-Maestre E., Carbonell-Uberos F., Caffarena J.M., Hornero F., Montero J.A., Roig R.J.: Long-term storage in liquid nitrogen does not affect cell viability in cardiac valve allografts. *Cryobiology*, 2008; 57: 113-121

[55] O'Brien M.F.: Heterograft aortic valves for human use. Valve bank, techniques of measurement, and implantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1967; 53: 392-397

[56] O'Brien M.F., Harrocks S., Stafford E.G., Gardner M.A., Pohlner P.G., Tesar P.J., Stephens F.: The homograft aortic valve: 29-year, 99.3% follow up of 1,022 valve replacements. *J. Heart Valve Dis.*, 2001; 10: 334-344

[57] O'Brien M.F., McGiffin D.C., Stafford E.G., Gardner M.A., Pohlner P.G., McLachlan G.J., Gall K., Smith S., Murphy E.: Allograft aortic valve replacement: long term comparative clinical analysis of the viable cryopreserved and antibiotic 4°C stored valves. *J. Card. Surg.*, 1991; 6: 534-543

[58] Paluch D.: Polimery naturalne. W: Kuś H. (red. tomu). *Biomateriały. Tom 4. W: Nałęcz M. (red. serii). Problemy biocybernetyki i inżynierii biomedycznej*. Wydawnictwa Komunikacji i Łączności, Warszawa 1990, 44-57

[59] Pompilio G., Polvani G., Piccolo G., Guarino A., Nocco A., Innocente A., Porqueddu M., Dainese L., Veglia F., Sala A., Biglioli P.: Six-year monitoring of the donor-specific immune response to cryopreserved aortic allograft valves: implications with valve dysfunction. *Ann. Thorac. Surg.*, 2004; 78: 557-563

[60] Rendal Vázquez M.E., Román T.D., Cuesta M.G., Botta C.Z., Ibáñez J.S., Díaz S.P., Nuñez C.A.: Viability and histologic structure of porcine valves after cryopreservation. *Ann. Thorac. Surg.*, 2004; 77: 186-190

[61] Renneberg R.J., Kessels A.G., Schurgers L.J., van Engelshoven J.M., de Leeuw P.W., Kroon A.A.: Vascular calcifications as a marker of increased cardiovascular risk: a meta-analysis. *Vasc. Health Risk Manag.*, 2009; 5: 185-197

[62] Rosenthal J.T., Shaw B.W. Jr, Hardesty R.L., Griffith B.P., Starzl T.E., Hakala T.R.: Principles of multiple organ procurement from cadaver donors. *Ann. Surg.*, 1983; 198: 617-621

- [63] Sadowski J., Kapelak B., Bartus K., Podolec P., Rudzinski P., Myrdko T., Wierzbicki K., Dziatkowiak A.: Reoperation after fresh homograft replacement: 23 years' experience with 655 patients. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 2003; 23: 996-1000
- [64] Sadowski J., Kapelak B., Pfitzner R., Bartus K.: Sutureless aortic valve bioprosthesis '3F/ATS Enable' - 4.5 years of a single-centre experience. *Kardiol Pol.*, 2009; 67: 956-963
- [65] Schenke-Layland K., Madershahian N., Riemann I., Starcher B., Halhuber K.J., König K., Stock U.A.: Impact of cryopreservation on extracellular matrix structures of heart valve leaflets. *Ann. Thorac. Surg.*, 2006; 81: 918-926
- [66] Schenke-Layland K., Xie J., Heydarkhan-Hagvall S., Hamm-Alvarez S.F., Stock U.A., Brockbank K.G., MacLellan W.R.: Optimized preservation of extracellular matrix in cardiac tissues: implications for long-term graft durability. *Ann. Thorac. Surg.*, 2007; 83: 1641-1650
- [67] Smith J.C.: The pathology of human aortic valve homografts. *Thorax*, 1967; 22: 114-138
- [68] Stock U.A., Degenkolbe I., Attmann T., Schenke-Layland K., Freitag S., Lutter G.: Prevention of device-related tissue damage during percutaneous deployment of tissue-engineered heart valves. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2006; 131: 1323-1330
- [69] Strickett M.G., Barratt-Boyes B.G., MacCulloch D.: Disinfection of human heart valve allografts with antibiotics in low concentration. *Pathology*, 1983; 15: 457-462
- [70] Stuart P.M., Pan F., Yin X., Haskova Z., Plambeck S., Ferguson T.A.: Effect of metalloprotease inhibitors on corneal allograft survival. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2004; 45: 1169-1173
- [71] Suh H., Lee J.E., Park J.C., Han D.W., Yoon C.S., Park Y.H., Cho B.K.: Viability and enzymatic activity of cryopreserved porcine heart valve. *Yonsei Med. J.* 1999; 40: 184-190
- [72] Sypniewski D., Bednarek I., Gałka S., Bryła A., Machnik G., Loch T., Sołtysik D., Błaszczak D.: Expression of gelatinases A and B and the invasiveness of *in vitro* cultured lung cancer and bladder cancer cells treated with selected tetracyclines. *Farm. Przegł. Nauk.*, 2009; 8: 17-23
- [73] The need is real: Data. <http://organdonor.gov/about/data.html> (20.05.2016)
- [74] Turek A., Cwalina B., Kobiela M.: Radioisotopic investigation of crosslinking density in bovine pericardium used as a biomaterial. *Nukleonika*, 2013; 58: 511-517
- [75] Turek A., Kasperczyk J., Dzierżewicz Z.: Collagen application in drug formulation technology. Achievements and perspectives. *Chemik*, 2010; 64: 229-237
- [76] Ustawa z dnia 1 lipca 2005 r. o pobieraniu, przechowywaniu i przeszczepianiu komórek, tkanek i narządów. *Dziennik Ustaw*, 2005; nr 169: poz. 1411
- [77] Ustawa z dnia 17 lipca 2009 r. o zmianie ustawy o pobieraniu, przechowywaniu i przeszczepianiu komórek, tkanek i narządów oraz o zmianie ustawy - Przepisy wprowadzające Kodeks Karny. *Dziennik Ustaw*, 2009; nr 141: poz. 1149
- [78] van Kats J.P., van Tricht C., van Dijk A., van der Schans M., van den Bogaert A., Petit P.L., Bogers A.J.: Microbiological examination of donated human cardiac tissue in heart valve banking. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 2010; 37: 163-169
- [79] Verghese S., Padmaja P., Sindhu B., Elizabeth S.J., Lesley N., Cherian K.M.: Homograft valve bank: our experience in valve banking. *Indian Heart J.*, 2004; 56: 299-306
- [80] Villalba R., Solis F., Fornés G., Jimenez A., Eisman M., González Al., Linares M.J., Casal M., Gómez Villagrán J.L.: In vitro susceptibility of high virulence microorganisms isolated in heart valve banking. *Cell Tissue Bank*, 2012; 13: 441-445
- [81] Virdi I.S., Monro J.L., Ross J.K.: Eleven year experience of aortic valve replacement with antibiotic sterilized homograft valve in Southampton. *Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1986; 34: 277-282
- [82] Wachol-Drewek Z., Pfeiffer M., Scholl E.: Comparative investigation of drug delivery of collagen implants saturated in antibiotic solutions and a sponge containing gentamicin. *Biomaterials*, 1996; 17: 1733-1738
- [83] Wain W.H., Pearce H.M., Riddell R.W., Ross D.N.: A re-evaluation of antibiotic sterilisation of heart valve allografts. *Thorax*, 1977; 32: 740-742
- [84] Warwick R.M., Magee J.G., Leeming J.P., Graham J.C., Hannan M.M., Chadwick M., Crook D.W., Yearsley C.P., Rayner A., Parker R.: Mycobacteria and allograft heart valve banking: an international survey. *J. Hosp. Infect.*, 2008; 68: 255-261
- [85] Waterworth P.M., Lockey E., Berry E.M., Pearce H.M.: A critical investigation into the antibiotic sterilization of heart valve homografts. *Thorax*, 1974; 29: 432-436
- [86] Welters M.J., Oei F.B., Witvliet M.D., Vaessen L.M., Cromme-Dijkhuis A.H., Bogers A.J., Weimar W., Claas F.H.: A broad and strong humoral immune response to donor HLA after implantation of cryopreserved human heart valve allografts. *Hum. Immunol.*, 2002; 63: 1019-1025
- [87] Yacoub M., Kittle C.F.: Sterilization of valve homografts by antibiotic solutions. *Circulation*, 1970; 41: II29-II32
- [88] Yacoub M., Knight E., Towers M.: Aortic valve replacement using fresh unstented homografts. *Thoraxchir. Vask. Chir.*, 1973; 21: 451-457
- [89] Yang J.H., Jun T.G., Sung K., Kim W.S., Lee Y.T., Park P.W.: Mid-term results of size-reduced cryopreserved homografts for right ventricular outflow tract reconstruction. *Ann. Thorac. Surg.*, 2010; 89: 1821-1826
- [90] Yankah A.C., Klose H., Petzina R., Musci M., Siniawski H., Hetzer R.: Surgical management of acute aortic root endocarditis with viable homograft: 13-year experience. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 2002; 21: 260-267

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.