

<https://doi.org/10.34883/PI.2023.13.3.031>



Рыженкова Т.И. ✉, Хоров О.Г.

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Производные гуанидина в качестве консервантов аллотрансплантатов

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, редактирование – Хоров О.Г.; обзор литературы, подбор и анализ данных, концепция и дизайн исследования, сбор материала, обработка, написание текста – Рыженкова Т.И.

Подана: 04.05.2023

Принята: 11.09.2023

Контакты: tatianaryzenkova@mail.ru

Резюме

Введение. В практике реконструктивной хирургии в оториноларингологии существует потребность в пластических материалах, обладающих комплексом свойств, способных заместить дефект. Для этих целей чаще всего применяют хрящевую, реже – костную ткань. Дискутабельным вопросом остается процесс консервации ткани для трансплантации.

Цель. Оценить существующие способы консервации аллогенного хряща. Провести оценку антимикробной и антисептической активности растворов на основе гуанидина. Изучить жизнеспособность и микробиологическую чистоту хряща в разработанной композиции биоцидной субстанции на основе производных гуанидина в экспериментальном исследовании на животных.

Материалы и методы. Произведен ретроспективный анализ мировых литературных данных на базе Google Scholar, PubMed по проблеме консервации органов и тканей. Также изучены свойства потенциальных веществ для возможной консервации аллотрансплантатов. Среди них были выделены растворы на основе производных гуанидина. Для оценки антимикробной и антисептической активности растворов на основе гуанидина была проведена оценка их активности в отношении типовых культур *E. coli*, *St. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* и *Asp. niger*. Произведена консервация хрящей в разработанной композиции биоцидной субстанции на основе производных гуанидина с дальнейшим гистологическим исследованием хряща.

Результаты. На сегодняшний день консервация органов и тканей – это довольно трудоемкий и финансово затратный процесс, имеющий определенные ограничения. По результатам микробиологического исследования растворов на основе гуанидина выявлено, что они обладают достаточным спектром антимикробной активности с длительным дезинфицирующим действием (продолжительным действием) в малых концентрациях действующего вещества к широкому спектру бактерий, плесневых грибов и дрожжевых культур. Оптимальной концентрацией композиции биоцидной субстанции на основе производных гуанидина для консервации хрящей является 0,1%.

Выводы. Совершенствование раствора для консервации аллотрансплантатов и аутоотрансплантатов на основе производных гуанидина может позволить упростить процесс консервации тканей и органов и снизить затраты на него. Также позволит создать банк органов и тканей.

Ключевые слова: хрящ, аллотрансплантат, аутоотрансплантат, консервация, трансплантология, гуанидин, формалин

Tatyana I. Ryzhankova ✉, Aleh G. Khorau
Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

Guanidine Derivatives as Allograft Preservatives

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: study concept and design, editing – Aleh G. Khorau; literature review, selection of analytical data and analysis, study concept and design, material collection, processing, writing – Tatyana I. Ryzhankova.

Submitted: 04.05.2023

Accepted: 11.09.2023

Contacts: tatianaryzenkova@mail.ru

Abstract

Introduction. There is a need in alloplastic materials in the reconstructive surgery in otorhinolaryngology. Cartilaginous tissue is the most used. The process of preservation of tissue for transplantation remains a controversial issue.

Purpose. Evaluate state of the art methods of allogeneic cartilage conservation. Evaluate antiseptic activity of guanidine-based solutions. Study viability and microbiological purity of cartilage in the developed composition of a biocidal substance based on guanidine derivatives in an experimental study in animals.

Materials and methods. A systematic review of the literature on the problem of organ and tissue conservation was performed in Google Scholar and PubMed. The properties of the substances for preservation of allografts have been studied. Our study was focused on guanidine hydrochloride solutions. The antimicrobial and antiseptic activity of the developed guanidine hydrochloride solution (*E. coli*, *St. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* and *Asp. niger*) was performed. Cartilage was preserved in the developed guanidine hydrochloride solution and with its further histological examination was performed.

Results. The preservation of organs and tissues is a time-consuming and financially costly process that has certain restrictions. It was found that solutions based on guanidine have a sufficient prolonged antimicrobial activity. The optimal concentration of the composition of the biocidal substance based on guanidine derivatives for cartilage preservation is 0.1%.

Conclusions. The improvement of the guanidine derivative-based solution for allograft and autograft preservation may simplify and reduce the costs of tissue and organ preservation. It will also allow to create a bank of organs and tissues.

Keywords: cartilage, allograft, autograft, preservation, transplantology, guanidine, formalin

■ ВВЕДЕНИЕ

В практике реконструктивной хирургии в оториноларингологии существует потребность в пластических материалах, обладающих комплексом свойств, способных заместить дефект. Для этих целей чаще всего применяют хрящевую, реже – костную

ткань. Она необходима для тимпанопластики, мастоидопластики, септоринопластики, коррекции ушных раковин, замены хрящей трахеи, при оперативных вмешательствах на параназальных синусах и т. д.

На сегодняшний день для реконструктивной хирургии в оториноларингологии в большинстве случаев используют аутоотрансплантат. Это связано с возможным риском отторжения аллотрансплантата. Основной проблемой трансплантационной хирургии и причиной большинства вызываемых пересадкой органов осложнений является отторжение трансплантата. Но большое преимущество пересадки аллотрансплантата заключается не только в том, что пациент избавляется от излишней операционной травмы, но и в том, что хрящ удастся консервировать и иметь его в банке тканей.

Дискутабельным вопросом остается процесс консервации ткани.

До недавнего времени основными способами консервации тканей и органов были:

1. Кριοконсервирование – консервирование при низкой температуре с быстрым замораживанием (от -183°C до -273°C) и хранением при температуре от -25°C до -30°C .
2. Консервирование в специальных растворах, содержащих антибиотики или антисептики, с последующим хранением в плазме или крови реципиента или охлажденном растворе.
3. Лиофилизация – замораживание с последующей сушкой в условиях вакуума. Используется для консервирования костей и сухожилий. Метод достаточно широко распространен, вместе с тем его недостатком является неполное подавление антигенных свойств ткани.
4. Консервирование в парафине.
5. Консервирование в растворе альдегида (глутаральдегид, формальдегид) [6].

После консервирования материал хранят в специальных условиях в центрах трансплантологии, создавая банк органов и тканей. Доставка органов для трансплантации в хирургические клиники и отделения осуществляется в специальных контейнерах в растворе при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ [6].

В последнее время способ консервации в формалине подвергся критике, так как стала популяризоваться версия о его канцерогенных свойствах, и этот способ консервации был исключен из списка. Соответственно, снова возник вопрос о создании раствора, обладающего такими же идеальными свойствами для консервации, как формалин.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить существующие способы консервации аллогенного хряща. Провести оценку антимикробной и антисептической активности растворов на основе гуанидина. Изучить жизнеспособность и микробиологическую чистоту хряща в разработанной композиции биоцидной субстанции на основе производных гуанидина в экспериментальном исследовании на животных.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Произведен ретроспективный анализ мировых литературных данных на базе Google Scholar, PubMed по проблеме консервации органов и тканей. Также изучены

свойства потенциальных веществ для возможной консервации аллотрансплантатов. Среди них были выделены растворы на основе производных гуанидина. Для оценки антимикробной и антисептической активности растворов на основе гуанидина была проведена оценка их активности в отношении типовых тест-культур *E. coli*, *St. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* и *Asp. niger* в соответствии с инструкцией по применению Министерства здравоохранения Республики Беларусь «Методы проверки и оценки антимикробной активности дезинфицирующих и антисептических средств» (Регистрационный № 11-20-204-200, утв. 22.12.2003 гл. гос. сан. врачом МЗ Республики Беларусь).

Микроорганизмами инфицировали тестовые объекты, которые затем погружали в растворы субстанций различной концентрации. По истечении времени выдержки (5–10–15–20–25–30–35–40–45–50–55–60 минут) извлекали из раствора, нейтрализовали, промывали в воде и засекали на дифференциально-диагностические питательные среды. Исследования выполнены как по истечении времени выдержки в растворе, так и во время (1–7-й день после обработки) для оценки пролонгации действия активного вещества без дополнительной обработки. Учет результатов исследования производили в течение и после инкубации в термостате при температуре 25–37 °C со второго дня инкубации в течение 20 суток. Выполнено 96 экспериментальных микробиологических исследований. Были изготовлены растворы на основе производных гуанидина в концентрации 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1%. Произведена консервация хрящей в разработанной композиции биоцидной субстанции на основе производных гуанидина с дальнейшим гистологическим исследованием хряща.

Забор хрящей был произведен у экспериментальных животных: крысы линии Wistar в количестве 15 штук (самцы массой 200–300 г). База забора – стационарный виварий Гродненского государственного медицинского университета. Под общей анестезией кетамина путем внутримышечного введения после обработки операционного поля раствором антисептика (раствор 96%-го спирта) производилось удаление хряща мечевидного отростка (рис. 1). По окончании операции экспериментальные животные выведены из эксперимента путем создания воздушной эмболии.



Рис. 1. Мечевидный отросток крысы

Fig. 1. Rat xiphoid process

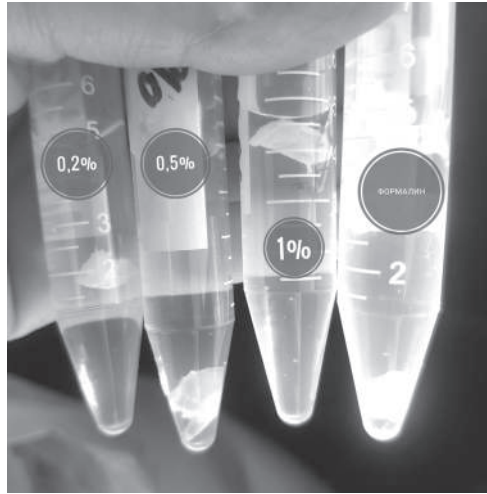


Рис. 2. Пробирки с различными концентрациями раствора гуанидина
Fig. 2. Test tubes with different concentrations of guanidine solution

После изъятия хрящи были помещены в пробирки с различными концентрациями раствора (рис. 2). Контрольная группа хрящей помещена в раствор формалина. В дальнейшем пробирки отправились на хранение в холодильник при температуре $+3-4^{\circ}\text{C}$. По истечении двух, четырех и шести месяцев было произведено гистологическое исследование хрящей. Вся работа выполнялась согласно нормативным требованиям и законодательству по биомедицинской этике Республики Беларусь.

Спустя указанный временной период было проведено гистологическое исследование хрящей, консервированных в разработанной композиции биоцидной субстанции на основе производных гуанидина. После обезвоживания хрящей и пропитки парафином в специальных формах, которые при комнатной температуре представляют собой твердые кубики, с помощью микротомы с вмонтированным острым ножом выполнены срезы, в последующем срезы смонтированы на стекло, проведена подготовка для окраски, окрашивание гематоксилин-эозином. Анализ гистологических препаратов выполняли с помощью микроскопа биологического лабораторного «Биомед 3» (Россия) при увеличении 4,0; 10. Микрофотографирование проводили микроскопом Axio Imager (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) в комплекте с цифровой камерой с помощью программного обеспечения Image-Pro (Германия).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В 1935 г. Н.М. Михельсон впервые применил и ввел в широкую практику восстановительной хирургии пересадку свежего трупного хряща. Хрящ забирался вместе с надхрящницей через 2–3 часа после смерти людей, умерших в результате неинфекционного заболевания. Он хранился 4–15 дней в растворе Рингера – Локка при температуре от 4°C до 5°C [2].

В 1939 году Peer пересаживал трупный хрящ без перихондрия, хранившийся в 50-градусном спирте, и свежий хрящ больного. Макроскопическое исследование показало, что в трупном хряще спустя 9 с половиной месяцев наблюдались явления рассасывания и организации. При аутопластике вплоть до 6 лет трансплантаты оставались живыми, при этом восстанавливалась надхрящница [3].

Mowlem (1941) описал 40 случаев ауто- и аллотрансплантации свежего реберного хряща в целях ринопластики, с хорошими клиническими и морфологическими результатами. Применение хряща, обработанного растворами мертиолата, часто приводило к деформации трансплантата [3].

O'Connor (1942) сообщил о положительных исходах трансплантации трупного хряща 100 пациентам и рекомендовал мертиолат в качестве консервирующего средства. Однако Pellicieri (1942) возражал против такого метода консервирования, поскольку хрящ подвержен рассасыванию, требует хорошей подготовки ложа, делается твердым и нестойким к инфекции [3].

В связи с неудобствами применения свежего хряща предлагались различные методы консервирования. Peer (1944); А.Г. Фетисов (1946), Е.З. Киселева (1952), А.Г. Лапчинский (1953, 1954), Г.И. Каламбаров (1946) рекомендовали пользоваться спиртом в различных концентрациях; В.Н. Попов (1946), В.С. Семенов (1946), А.М. Рейнус (1948), В.В. Войно-Ясенецкий (1961) – концентрированными растворами формалина; П.П. Коваленко (1951) – растворами карболовой кислоты, А.Г. Федотенков (1953) – сульфацило-сахарной жидкостью с антицитотизирующими веществами; Л.С. Левина (1947) – растворами меда; А.П. Надеин (1969) – парафином [3].

Хрящ стали выдерживать в условиях низких температур при различных режимах (Г.И. Барков, 1955; Р. Беллингем, 1956; А.С. Силаева, 1957; И. Кренар, 1958; А.Н. Филатов, 1958; Й.В. Берингер и А. А.Зыков, 1959; М.И. Панова, 1960; П.П. Коваленко, В.А. Емельянов, 1966; и др.), а также лиофилизировать (Медведев и соавт., 1970; и др.) [3].

Для улучшения пластических качеств хрящевой ткани и продления сроков жизнеспособности при консервировании методом замораживания ее стали хранить либо в холодоустойчивой жидкости (А.Д. Белякова, 1958), либо в 15–30%-ных растворах глицерина (Rey, 1962; Р. Клен, 1962; и др.) [3].

В 1955 году советские ученые А.Н. Надеин, А.М. Сазонов, А.Ф. Павлова предложили абсолютно новую оригинальную методику консервации костей в твердом парафине. Их исследования подтвердили, что кости после этого послушно «вживаются» в организм. Но добиться 100-процентного выздоровления пациентов не удавалось. В 1966 году В.Ф. Парфентьевой, В.Д. Развадовским, В.И. Дмитриенко был предложен способ консервации в формалине в слабых концентрациях (0,25–0,75%). Он оказался сравнительно дешевым, не требующим сложной аппаратуры и достаточно универсальным. Многочисленные исследования показали, что кости, обработанные формалином, долго не утрачивают жизнеспособность. В 2000 году С.И. Болтрукевич впервые в мире разработал новый способ подготовки и консервирования статических тканей в смеси растворов альдегидов: 0,2%-ный раствор формальдегида и 0,05%-ный глутарового альдегида с добавлением глицерина (1:4). Данный раствор помещался в герметичный стеклянный сосуд с последующим хранением аллоимплантата в холодильнике при температуре +4 °С до его клинического использования. Срок хранения был ограничен 6–12 месяцами [1].

В оториноларингологии аллогенные хрящи, консервированные в слабых растворах альдегидов по методике профессора С.И. Болтрукевича, использовались для заполнения мастоидальной полости после санирующей операции и при тимпано-пластике. Основоположник аллотрансплантации формализованных тканей в советской оториноларингологии профессор В.Д. Меланьин с соавторами сообщил об опыте применения таких тканей при более 3000 операций при хронических средних отитах со значительной деструкцией среднего уха [4]. Все пациенты перенесли оперативное вмешательство хорошо. Общая реакция организма на хирургическую травму была невыраженной. Отдаленные последствия показали положительный результат. Стоит отметить, что данный вид консервации значительно облегчал работу своей доступностью, простотой и экономичностью.

Известен также способ консервации хряща, отраженный в патенте РФ (Разиньков С.П. с соавт. «Способ консервации хряща», патент РФ № 2123259). Предложенный способ консервации хряща заключается в сохранении трансплантата в жидком консервирующем растворе. Хрящевую ткань берут во время операции, обрабатывают физиологическим раствором, помещают в стеклянную стерильную емкость с гречишным медом и хранят при температуре +4–5 °С. Срок хранения при таком способе консервации ограничен 60 сутками [8].

В 2011 году опубликовано описание изобретения к патенту РФ (Лекишвили М.В. с соавт. «Способ изготовления аллоимплантата на основе хрящевой ткани», патент РФ № 2411923). Согласно описанию, реберный хрящ замораживают при температуре –25–30 °С в течение не менее 6 ч., в замороженном состоянии нарезают в продольном направлении на пластины толщиной 0,5–1 мм, лиофилизируют в течение 48 ч., упаковывают в двойной пластиковый пакет, стерилизуют потоком быстрых электронов дозой 20–25 кГр [7].

Описаны также способы сохранения хряща путем криоконсервирования – консервирование при низкой температуре с быстрым замораживанием (от –183 °С до –273 °С) и хранением при температуре от –25 °С до –30 °С; консервирование в специальных растворах, содержащих антибиотики или антисептики.

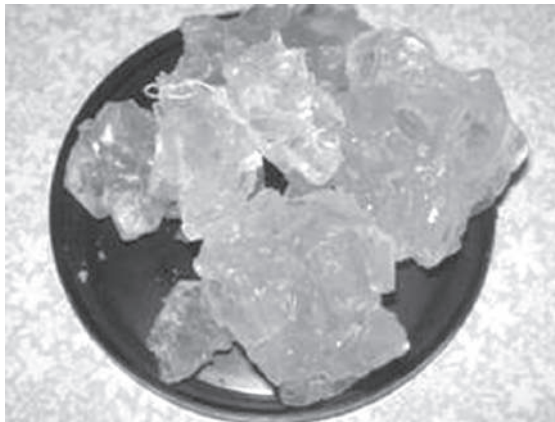


Рис. 3. Кристаллическое вещество гуанидин
Fig. 3. Crystal guanidine

На сегодняшний день способ лиофилизации хряща является одним из основных способов консервации биологического пластического материала. Но, несмотря на то что предложенный способ консервации путем лиофилизации и способ стерилизации путем облучения потоком быстрых электронов продлевают срок хранения аллоимплантатов до 5 лет при комнатной температуре, он является довольно трудоемким и финансово затратным.

Нами были изучены свойства потенциальных веществ для возможной консервации аллотрансплантатов. Среди них были выделены растворы на основе производных гуанидина.

Гуанидин – бесцветное кристаллическое вещество, расплывается на воздухе вследствие поглощения влаги (рис. 3).

Сильное однокислотное основание, $pK_a=12,5$. Гуанидин находится в моче как продукт нормального метаболизма белков [9]. Является структурным фрагментом нуклеиновых кислот, яичного аргинина, стрептомицина, фолиевой кислоты; входит в состав гуано [9].

Гуанидин легко алкилируется. Обладает фунгицидной и бактерицидной активностью. С соляной и азотными кислотами (HCl, HNO₃) гуанидин образует устойчивые соли. Химическая формула гуанидина: CH₅N₃ (рис. 4).

Производные гуанидина не имеют цвета и запаха, пожаробезопасны, взрывобезопасны, полностью растворимы в воде и спиртах, не теряют своих свойств при отрицательных температурах, не разлагаются и сохраняют свои физико-химические и биоцидные свойства до температуры +120 °С. Данные производные относятся к биоцидам широкого спектра антимикробной активности в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, вирусов (в том числе вирусов энтеральных и парентеральных гепатитов, ВИЧ, полиомиелита, гриппа, герпеса и др.), грибов, в том числе плесневых, дрожжевых и дрожжеподобных, грибов рода *Candida*, дерматофитов. Обладают дезодорирующим действием, придают обрабатываемым поверхностям длительный бактерицидный эффект, который может сохраняться в зависимости от поверхности и других внешних факторов от 3 дней до 8 месяцев [10].

Для оценки антимикробной и антисептической активности растворов на основе гуанидина была проведена оценка их активности в отношении типовых тест-культур *E. coli*, *St. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* и *Asp. niger* в соответствии с инструкцией по применению Министерства здравоохранения Республики Беларусь «Методы проверки и оценки антимикробной активности дезинфицирующих и антисептических

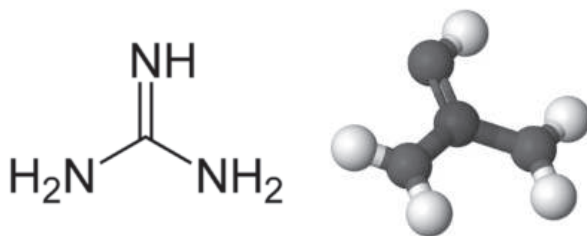


Рис. 4. Химическая формула гуанидина
Fig. 4. Chemical formula of guanidine

средств» (Регистрационный № 11-20-204-200, утв. 22.12.2003 гл. гос. сан. врачом МЗ Республики Беларусь).

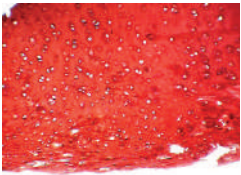
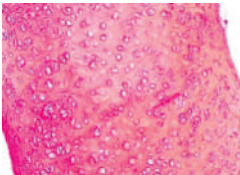
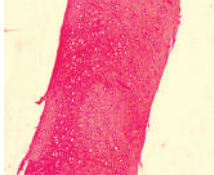
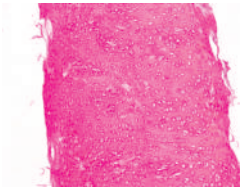
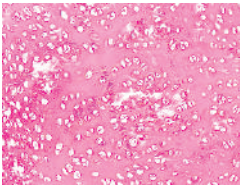
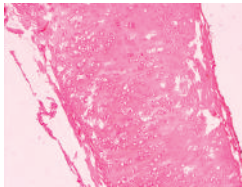
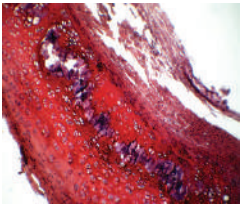
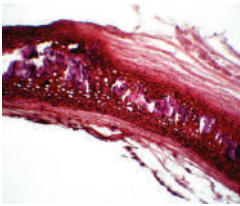
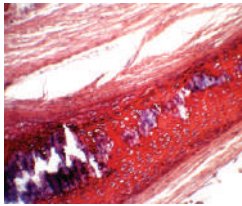
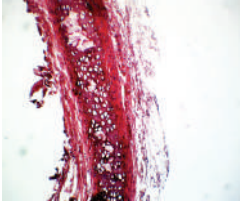
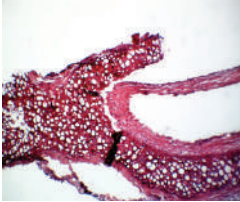
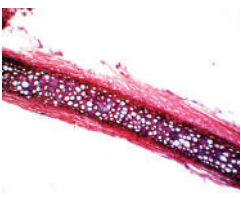
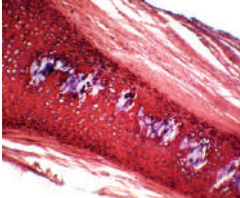
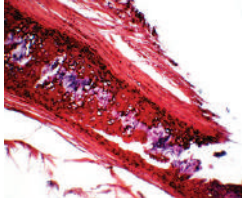
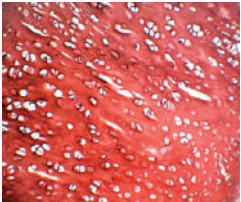
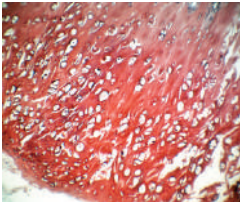
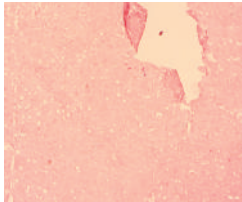
По результатам эксперимента установлено, что средство в концентрации 0,1%, 0,5%, 1,0% по действующему веществу проявило свою эффективность (бактерицидность) относительно исследуемых штаммов культур: *E. coli* $1,0 \times 10^9$ КОЕ/мл – на 15-й минуте в концентрации 0,1–1,0%; *St. aureus* $1,2 \times 10^9$ КОЕ/мл – на 15-й минуте в концентрации 0,1–1,0%; *C. albicans* 9×10^8 КОЕ/мл – на 15-й минуте в концентрации 0,1–1,0%; *Asp. niger* $1,0 \times 10^9$ КОЕ/мл – на 15-й минуте в концентрации 0,1–1,0%, $8,0 \times 10^8$ КОЕ/мл – на 30-й минуте в концентрации 0,1–1,0%, $1,2 \times 10^8$ КОЕ/мл – на 60-й минуте в концентрации 1,0%; *P. aeruginosa* $1,0 \times 10^9$ КОЕ/мл – на 15-й минуте в концентрации 0,1–1,0%. Из общего числа выполненных 96 экспериментальных микробиологических исследований достоверно установлен достаточно высокий уровень антимикробной активности в отношении изученных культур *E. coli*, *St. aureus*, *P. aeruginosa* при режиме 0,1–1,0% – 15 минут и выше, достаточно высокий уровень фунгицидной активности в отношении изученной культуры *Asp. niger* при режиме: 0,1–1,0% – 15 минут и выше. Оценка эффекта роста микроорганизмов (качественная оценка) во времени позволяет сделать вывод, что рост микроорганизмов на обработанной поверхности не наблюдался во временном промежутке 1–4 дня, с 4-го по 7-й день наблюдений рост контрольных культур микроорганизмов обнаружен в 29,16% случаев (28 микробиологических исследований).

Антимикробная активность гуанидина связана с полученной концентрацией действующего вещества в растворе. Антимикробное действие связано с адсорбцией гуанидиновых поликатионов на отрицательно заряженной поверхности бактериальной клетки (блокируется дыхание, питание, транспорт метаболитов через клеточную стенку бактерий) и проникновением внутрь клетки (необратимые структурные повреждения на уровне цитоплазматической мембраны, нуклеотида, цитоплазмы, связывании с кислотными фосфолипидами, белками цитоплазматической мембраны). Результатом этого является блокада ферментов дыхательной системы, потеря патогенных свойств и гибель микробной клетки.

На основании вышеперечисленных результатов нами было принято решение об изготовлении растворов на основе производных гуанидина в концентрации 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1%.

При гистологическом исследовании тканей хряща, консервированных в 0,05%-ной, 0,2%-ной композиции биоцидной субстанции на основе производных гуанидина, наблюдались частичные дистрофические изменения хондроцитов в равной степени через 2, 4 и 6 месяцев. При концентрации 0,5%, 1% наблюдался ярко выраженный некроз клеток и ткани в центральной части среза. При гистологическом исследовании тканей хряща, консервированных в 0,1%-ной композиции биоцидной субстанции на основе производных гуанидина, так же как и тканей хряща, консервированных в 10%-ном нейтральном забуференном медицинском формалине, количество хондроцитов соответствовало норме, наблюдалось равномерное окрашивание тканей, наличие множественных изолированных групп хондроцитов с ядрами.

Гистологическое исследование хрящей, консервированных в разработанной композиции биоцидной субстанции на основе производных гуанидина
Histological examination of cartilages preserved in the developed composition of biocidal substance based on guanidine derivatives

Концентрация раствора	Время консервации		
	2 месяца	4 месяца	6 месяцев
0,05%			
0,1%			
0,2%			
0,5%			
1%			
Формалин			

■ ВЫВОДЫ

1. По результатам микробиологического исследования растворы на основе гуанидина обладают широким спектром антимикробной и противогрибковой активности с длительным дезинфицирующим действием (продолжительным действием) до 6 месяцев в малых концентрациях – 0,1% действующего вещества.
2. Композиция биоцидной субстанции на основе производных гуанидина для консервации хрящей в концентрации 0,1% не вызывает деструктивных изменений в хряще.
3. Совершенствование раствора для консервации аллотрансплантатов и аутоотрансплантатов на основе производных гуанидина может позволить упростить и снизить затраты на процесс консервации тканей и органов, а также позволит создать банк органов и тканей.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Boltrukevich S. *Preparation, preservation and storage of biological tissues in liquid media. Methodological Recommendations. National.* 2000; 3 p. (in Russian)
2. Likhachev A. *Multi-volume guide to otorhinolaryngology.* 4. State Publishing of Medical Literature. Moscow, 1963; 410 p. (in Russian)
3. Melanyin V. *Free transplantation of bone, cartilage and adipose tissue in otorhinolaryngology (experimental clinical study)* (PhD Thesis). Moscow, 1978; 355. (in Russian).
4. Melanyin V., Khorov O., Mukhamedov I. Chronic purulent otitis media: reconstruction of the middle ear – opportunities and perspectives. *Otorhinolaryngology. Eastern Europe.* 2016;1(22). (in Russian)
5. Rauer A.E., Mikhedson N.M. *Plastic surgery on the face. People's Commissariat of Health of the USSR. Gos.izMedgiz, Moscow.* 1943; 10 p. (in Russian)
6. Rychagov G. *General surgery: Study-method. manual.* Mn.: MGMI, 2000; 7 p. (in Russian)
7. Ryabov A., Vasiliev M., Hamidov A., Lekishvili M. *Method for making alloimplantate based on cartilaginous tissue: pat. RF No. 2411923, 20.02.2011.* (in Russian)
8. Razinkov S., Piskunov S., Litovka A., Lykova E. *Cartilage preservation method: pat. RF No. 2123259. Opubl. 20.12.1998.* (in Russian)
9. *Guanidine – properties, group and derivatives of guanidine, history of guanidine discovery* [Electronic resource]. Available at: <http://polyguanidines.ru/sdez/guanidin.htm> (in Russian)
10. *PMG GC polyhexamethylene guanidine hydrochloride, concentrate* [Electronic resource]. Available at: <https://deal.by/p135546953-pgmg-poligeksametilenguanidina-gidrohlorid.htm> (in Russian)