

# Biomechanikai és koagulációs aspektusok a vascularis graftkutatásban

Doktori értekezés

**Dr. Molnár Gábor Ferenc**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Nemes Attila egyetemi tanár, D.Sc.

Hivatalos bírálók: Dr. Galambos Barnabás főorvos, Ph.D.  
Dr. Kóbori László egyetemi tanár, Ph.D.

A szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szollár Lajos egyetemi tanár D.Sc.

A szigorlati bizottság tagjai: Dr. Jámbor Gyula főorvos, Ph.D.  
Dr. Meskó Éva főorvos, Ph.D.  
Dr. Sándor Tamás főorvos, Ph.D.

Budapest  
2014

# TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK .....	1
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	2
1.BEVEZETÉS.....	4
1.1 Történeti áttekintés .....	4
1.2 Az érgraftok csoportosítása.....	7
1.3 A szövetek prezervációja.....	10
1.3.1 A krioprezerváció.....	11
1.3.2 Hűtve tárolás 4°C-on.....	14
1.3.3 A hűtés alatt végbemenő változások.....	16
1.3.4 Transzport médiumok, prezerváló oldatok, tápfolyadékok.....	19
1.4 A homograftok felhasználási területe.....	21
1.5 A vénák biomechanikája.....	23
1.6 A cellulóz alapú graft.....	24
1.6.1 A bakteriális cellulóz (BC).....	25
1.6.2 Morfológia és felépítés.....	25
1.6.3 A bakteriális cellulóz mechanikai tulajdonságai és biokompatibilitása.....	26
1.6.4 A bakteriális cellulóz mint bioanyag.....	26
2.CÉLKITŰZÉSEK.....	27
3.MÓDSZEREK.....	28
3.1 A vena saphena magna gyűjtése és tárolása.....	28
3.2 Az in vitro biomechanikai tesztelés.....	29
3.3 Biomechanikai számítások.....	32
3.4 Morfológiai módszerek.....	33
3.5 Koagulációs vizsgálataink konvencionális vascularis graftokon és a bakteriális cellulózon, a thrombin és az aktivált XII. faktor keletkezésének mérése.....	35
4.EREDMÉNYEK.....	39
4.1 A vena saphena magna biomechanikai változásai.....	39
4.2 Szöveti feldolgozás.....	43
4.3 A koagulációs vizsgálatok eredménye konvencionális vascularis graftokon és a bakteriális cellulózon.....	49
5.MEGBESZÉLÉS.....	54
5.1 A tárolás során végbemenő biomechanikai változások.....	54
5.2 A tárolás morfológiai következményei.....	56
5.3 Erőfeszítések a krioprezerváció optimalizására.....	57
5.4 A tárolófolyadékok tulajdonságai.....	63
5.5 Koagulációs vizsgálatok.....	69
6.KÖVETKEZTETÉSEK.....	72
7.ÖSSZEFOGLALÁS.....	73
8.SUMMARY.....	74
9.IRODALOMJEGYZÉK.....	75
10.SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	94
11.KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	95

**Rövidítések jegyzéke**

1. ACh	acetylcholine
2. ADP/ATP	adenosine diphosphate / adenosine triphosphate
3. BC	bacterial cellulose
4. Da	Dalton
5. CABG	coronary artery bypass grafting
6. CK	creatine kinase enzyme
7. CPA	cryoprotectant agent
8. DMSO	dimethyl sulfoxide
9. DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
10. EC	Euro-Collins (prezerváló oldat)
11. EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
12. EHB	European Homograft Bank
13. ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
14. ET	endothelin
15. ETP	endogenous thrombin potential
16. FCS	fetal calf serum
17. FGF	fibroblast growth factor
18. HBD/NHBD	heart-beating donor / non-heart-beating donor
19. HBV	hepatitis B virus
20. HCA	hypertonic citrate solution (prezerváló oldat)
21. HCV	hepatitis C virus
22. HE	haematoxylin-eosin
23. HIV	human immunodeficiency virus
24. HTK	histidine tryptophan ketoglutarate (prezerváló oldat)
25. HTLV	human T-lymphotropic virus
26. HUV	human umbilical vein
27. IMA	internal mammarian artery
28. KH	Krebs-Henseleit (prezerváló oldat)
29. LDH	lactate dehydrogenase enzyme
30. MTT	methyl thiazol tetrazolium

31. MOD	multi organ donors
32. MPTP	mitochondrial permeability transition pore
33. mRNS	messenger (hírvivő) ribonukleinsav
34. nKR	normal Krebs-Ringer (prezerváló oldat)
35. NA	noradrenalin
36. NOS	nitric oxide synthase
37. PBS	phosphate buffered saline
38. PDMS	polydimethylsiloxane
39. PE	polyethylene
40. PEG	polyethylene glycol
41. PET	polyethylene terephthalate (Dacron <sup>®</sup> )
42. PFP	platelet-free plasma
43. PTAH	phosphotungstic acid haematoxylin
44. RPMI	Roswell Park Memorial Institute (tápfolyadék)
45. PMMA	polymethylmethacrylate
46. PTFE/ePTFE	polytetrafluoroethylene / expanded polytetrafluoroethylene
47. QCM-D	Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring
48. SD	standard deviation
49. SFA	superficial femoral artery
50. TCM	tissue culture medium
51. UW	University of Wisconsin (prezerváló oldat)
52. VH	vascularis homograft
53. VSM	vena saphena magna

## 1. Bevezetés

### 1.1 Történeti áttekintés

A véna autografttal történt legelső kísérleteket az 1800-as évek legvégén *Gluck* (1894), illetve tőle függetlenül *Exner és Höpfner* (1903) végezték. Bár ezek a vénagraftok mind elzáródtak, *Carrel és Guthrie* (1906) már sikerrel alkalmaztak kísérletes, autológ vénás áthidalást.<sup>1</sup> Az első humán autológ vénával végzett áthidalás *Goyanes* (1906) nevéhez fűződik, aki egy szifiliszos poplitea aneurysma excisiója után, az artériás defektust vena poplitea interpositummal pótolta.<sup>2</sup> Ugyanebben az évben *Lexer* vena saphena magna felhasználásával végzett artériás rekonstrukciót egy posttraumatikus axillaris aneurysma excisio után.<sup>3</sup>

A későbbi Nobel-díjas (1912) francia sebész, *Alexis Carrel* 1907-ben publikálta sikeres ér-heterotranszplantációs kísérletsorozatát kutya-macska modellen, ahol hűtve tárolt explantált véna és artéria szegmenteket helyezett aorta pozícióba.<sup>4</sup> *Carrel* érsebészetben végzett sokrétű, úttörő munkássága még inkább figyelemre méltó annak fényében, hogy akkoriban a manapság esszenciálisnak tartott diagnosztikus (képalkotó) és terápiás eszközök javarészt még hiányoztak. Az ugyancsak Nobel-díjjal (1901) jutalmazott *Röntgen* a gamma-sugárzást, azaz a "röntgensugarat" már 1895-ben felfedezte, de az erek funkcionális vizsgálatát, így például a cerebrális angiográfiát csak 1927-ben írja le *Egas Moniz*.<sup>5</sup> A heparin humán terápiás felhasználhatósága 1936 óta lehetséges.<sup>6</sup>

Az első artériás allografttal sikeresen végrehajtott cardiovascularis rekonstrukciót 1948-ban *Gross* végezte, majd *Kunlin* 1949-ben leírja a modern popliteális bypaszt.<sup>7</sup> *Holden* 1950-ben vena saphenával végzett, occludált artéria femoralis superficialis áthidalásáról számol be.<sup>8</sup> Nem sokkal ezután az első sikeres infrarenális aorta rekonstrukciót ugyancsak artériás homografttal 1951-ben *Dubost* hajtotta végre, ami fontos mérföldkőnek számított az akkor még sebészileg kezelhetetlen aorta aneurysma gyógyításában.<sup>9</sup>

Az első tanulmányok kecsgetető eredményeket mutattak, azt sugallva, hogy az artériás allograftok ugyanolyan jól működnek majd, mint az autograftok, azonban a hosszú távú eredmények szerényebbnek bizonyultak. Az allograftok használata egyre ritkábbá vált, a graftdegeneráció és a komplikációk (elzáródás, meszesedés, tárgulat vagy

ruptura) miatt.<sup>10,11,12</sup> Lényegében a beteg aorta homológ pótlása már a múlt század közepén lehetővé vált, ugyanakkor a technikai kivitelezhetőség legtöbbször csak fél sikert jelentett, és az immunológiai hatások rendszerint graftelégtelenséghez vagy a transzplantátum kilökődéséhez vezettek, nemegyszer a beteg halálát okozva.

Különböző testidegen anyagok (üveg, fém) felhasználására/beültetésére is történtek kísérletek, eredménytelenül. Míg nem 1949-ben *Voorhees* felfedezte, hogy a szívüregben használt selyemvarratot a gazdaszervezet vékony sejtréteggel borítja, mintegy befogadva azt.<sup>13</sup> Ez hatalmas lendületet adott a műerek fejlődésének, fejlesztésének. Megjelentek a szőtt, illetve kötött Dacron<sup>®</sup> (polyethylene terephthalate-PET) műerek, melyek között a jelentős különbséget az áteresztőképesség/pórusnagyság adta. 1952-ben *De Bakey* sikerrel számol be az első Dacron<sup>®</sup> grafftal végzett artériás bypass műtétről, amit saját kezűleg varrt csőformára a felsége varrógépén.<sup>14</sup> A Dacron<sup>®</sup> graftok jól működtek aorta és iliaca pótlás esetén, de infrainguinalis pozícióban hamar elzáródtak.

A polytetrafluoroethylene-t (PTFE) *Plunkett* fejlesztette ki 1938-ban, és először 1945-ben Teflon védjegy alatt került forgalomba. *Gore* további fejlesztőmunkája nyomán létrejött a mikropórusos szerkezetű expandált polytetrafluoroethylene (ePTFE), ami elsősorban mint víztaszító szigetelőanyag került felhasználásra az élet számos területén. Az anyag előnyeit kihasználva elsőként *Soyer*<sup>15</sup> 1972-ben, majd később 1976-ban *Campbell*<sup>16</sup> publikálta az ePTFE műérrel végzett rekonstrukciók eredményeit. Napjainkban az ePTFE a leggyakrabban használt szintetikus graft az alsó végtagi verőérpótlásban.

Ezzel párhuzamosan tovább fejlődött az infrainguinális vénás autografftal végzett rekonstrukció is. Habár *Rob* az, aki 1959-ben elvégzi az első modern sikeres in situ bypass<sup>17</sup> operációt, *Hall* volt, aki a módszert kidolgozta, majd azon további technikai módosításokat végzett, illetve a valvulotomot kifejlesztette.<sup>18</sup> Az alsó végtagi verőérpótlásban az in situ technika csak akkor terjedt el széles körben, mikor *Leather* és *Karmody* beszámolóit megjelentek, kiemelkedő rövid és hosszú távú nyitvamaradási adatokat felmutatva.<sup>19,20</sup> A vita ma is tovább folytatódik az in situ technika és a reverz véna graftok összehasonlításáról, jelenleg úgy tűnik, hogy a nyitvamaradás tekintetében azonosak az eredmények minden pozícióban.

1962-ben a szelektív coronarographia fejlődése nyomán lehetővé vált a coronaria bypass műtét, amit *Sabiston* a jobb koszorúéren végzett,<sup>21</sup> majd ezt *Garret és Favalaro* fejlesztette és tökéletesítette.<sup>22,23</sup>

Az anyagtechnikai újdonságok – ideértve a fémek és fémötvözetek (nitinol) fejlődését – tették lehetővé, hogy a verőerek aneurysmatikus tágulatát, katéteres úton, endoluminális beavatkozással kezeljük. Az aorta aneurysma endoluminális stentgrafttal történő kezelésének technikai kivitelezését *Parodi* 1991-ben írta le.<sup>24</sup>

Ma az intervencionális radiológia széles körben elterjedt diagnosztikus és terápiás határdiszciplína, mely rendkívül gyorsan fejlődik. A *Seldinger*-technika (1952) segítségével mind intraarteriális, mind intravénás megközelítés lehetséges.<sup>25</sup> Ez a kevésbé invazív módszer a perifériás artériás keringés katéteres úton történő helyreállításával több esetben átvette, illetve kiegészítette a műtéti verőérpótlás szerepét (aorto-ilio-femoro-popliteo-cruralis szakaszon). Nagy fontossággal bír az agyi verőerek, az aorta páratlan és páros visceralis ágainak elektív (és egyre inkább akut) intervencióiban, továbbá kiváló lehetőséget nyújt a preoperatív műtéti tervezés esetén is. Az onkológia területén terápiás kísérletek folynak a szuperszelektív kemoterápia vagy az embolizáció felhasználhatóságáról, és a sort tovább folytathatnánk.

Felmerül a kérdés, hogy milyen perspektíva van ma a graftervizáció előtt? Változott-e az elsődleges indikációs területe az egyes graftervizációknak? És főként: Milyen igényeknek kellene megfelelnie az ideális graftervizációnak?

- Az érpótlásban (ezidáig) felhasznált testidegen anyagok sosem integrálódhatnak tökéletesen, mivel a falszerkezetük és biomechanikai profiljuk nem tudja visszaállítani a fiziológiás állapotot.
- Fertőzés szempontjából állandó "locus minoris resistentiae infectionis"-ként viselkednek, ami a bakteriális kolonizáció és a sepsis veszélyét hordozza.
- Az endothel funkció részleges vagy teljes hiánya a thrombosis veszélyét, az antikoaguláns terápia a vérzéses szövődmények esélyét növeli.
- A recipiens szervezet graftra irányuló integrációs/regeneratív/reaktív működése intima hyperplasiahoz, graftervizáció degenerációhoz, steril gyulladáshoz, nem ritkán a graftervizáció elzáródásához vezet.

- Összességében: a Virchow-i triászról kettő, az érfal szerkezetére és a véráramlásra vonatkozó kritériumok is a beültetett graft által determináltak (és közvetve a vér összetételére is hatással van a felszíni tulajdonságai nyomán).

A műerek funkciója – nyitvamaradási ideje – a korszerű komplex terápia nyomán pozitív tendenciát mutat, azonban jócskán elmarad a kívánatostól.

Mindezeknek alapján a vascularis rekonstrukcióban felhasználandó *ideális graftnak*:

- identikus biomechanikai funkciójúnak,
- jó antikoagulációs tulajdonságúnak,
- a fertőzésekkel szemben ellenállóan,
- szövetbarátnak, immunológiailag indifferensnek,
- olcsónak és széles körben elérhetőnek,
- nem rákkeltőnek,
- megfelelő méretűnek,
- sebészileg jól kezelhetőnek,
- tartósnak kell lennie.

## 1.2 Az érgraftok csoportosítása

A vascularis graftokat alapvetően biológiai és szintetikus csoportba sorolhatjuk. (1. ábra) A biológiai graftok esetén a sorban első helyen áll az *autograft*, amikor az adott éret mintegy áthelyezzük ugyanazon páciens más részébe. Artériák esetén érhető módon csak olyan érszakaszok jöhetnek szóba, ahol az ellátási terület kontra vagy ipsilaterális kollaterális keringése önmagában is elegendő a szövetek életben tartásához. Ilyen pl.: a. iliaca interna vagy az a. iliaca interna és a. femoralis (SFA) Dacron<sup>®</sup> pótlással kombinálva. Számos ígéretes próbálkozás történt a coronaria-bypass műtétekhez felhasználható artériás autograft felhasználására, mint az a.radialis,<sup>26</sup> a.epigastrica inferior,<sup>27,28</sup> a.mesenterica inferior<sup>29</sup> vagy az a.gastroepiploica dextra<sup>30</sup>. Előnye, hogy saját élő szövet, ami az intakt endothelium és falszerkezet révén antithrombotikus tulajdonságú, ellenálló a fertőzésekkel szemben, és a kívánt biomechanikai tulajdonságokkal rendelkezik. Hátrányuk, hogy sok esetben nehezen távolíthatók el, növelik a műtéti terhelést. A megfelelő minőségű autológ vénák jó perifériás és centrális rekonstrukciós lehetőséget biztosítanak. Könnyű elérhetőségük miatt elsősorban a v.saphena magna, illetve a v.cephalica jönnek szóba. Előbbi rutinszerűen használják a coronaria-bypass műtétek során, illetve disztális perifériás



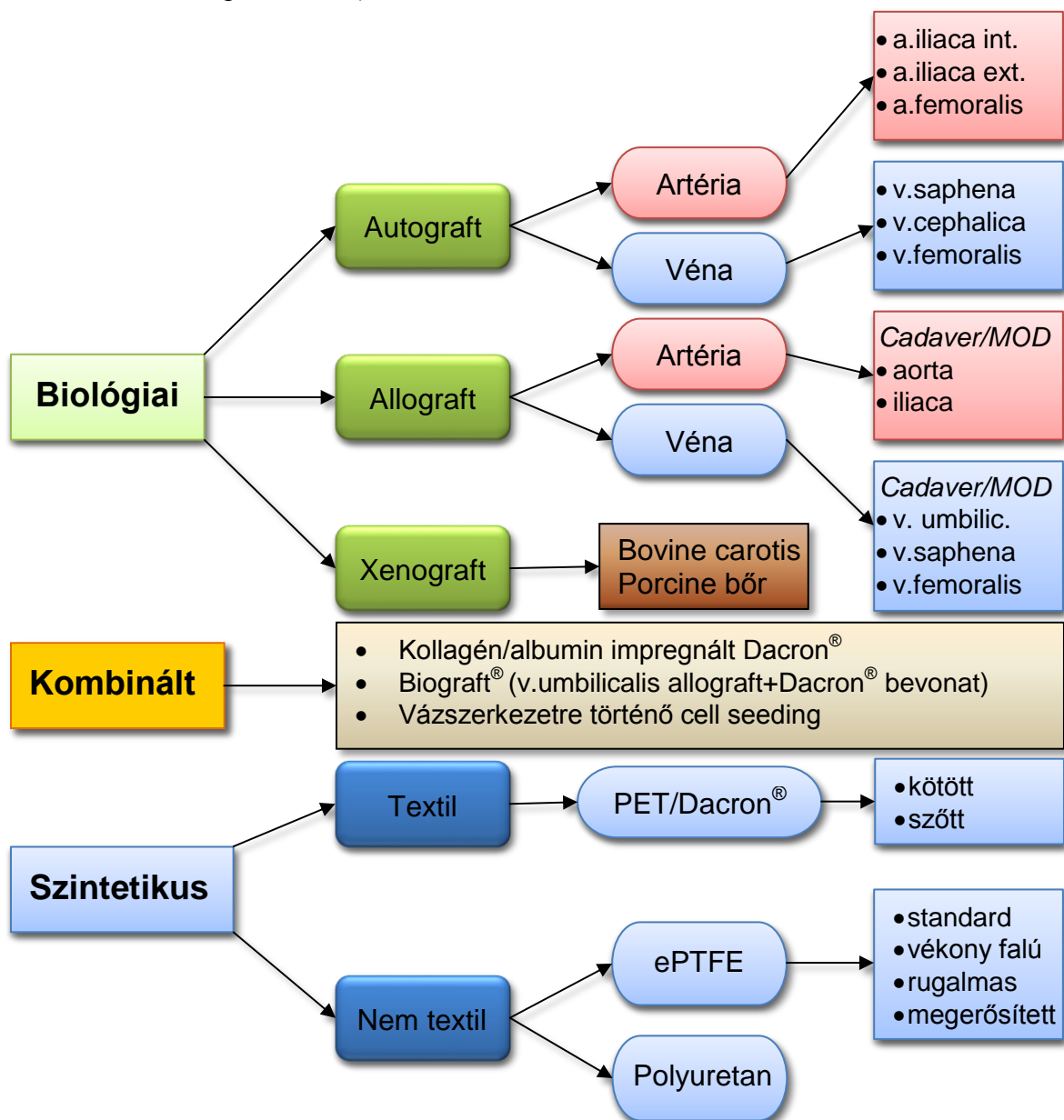
verőér rekonstrukciónál, etc. Azonban ha megfelelő minőségű autológ graft nem áll rendelkezésre a verőér rekonstrukcióhoz, a homograft jelenthet alternatívát.

A *homograft* a recipienssel azonos fajba tartozó donorszervezetből származó graft (artéria, véna, szívbillentyű, egyéb szövet vagy szerv). A homograft és az *allograft* mint fogalom szinonimaként értendő. Az utóbbi időben egyre inkább elterjedt a *cryograft* elnevezés, ami alatt a krioprezervált (artériás) homograftot értjük. A homograftok előnyeként említhető a jó biomechanikai profil, a fertőzésekkel szembeni magas ellenálló képesség, továbbá hogy infrainguinális, disztális rekonstrukciónál is használhatók, és hogy cadaverből megfelelő számú graft gyűjthető. Hátrányuk, hogy immunválaszt váltanak/válthatnak ki, idővel degenerálódnak/degenerálódhatnak és megfelelő tárolási feltételeket igényelnek. Cadaverből mind az artériák (aorto-iliaco-femoro-popliteo-crural szakaszok), mind a vénák (mély és felszínes) megfelelő számban gyűjthetők és széles körben felhasználhatók a későbbiekben.

*Xenograftról*, xenotranszplantációról akkor beszélünk, ha a beültetendő graft valamely, a recipienstől eltérő fajú donorszervezetből származik (pl: porcine, bovine, equine etc.). A témában számos kérdés megválaszolatlan etikai, minőségbiztosítási vonatkozásban és nem utolsósorban az ismert és ismeretlen fertőző ágensek (vírusok) szűrése terén, ami mindmáig megoldatlan. A '80-as évek elején borjú carotis xenografttal (Solcograft-P<sup>®</sup>) történtek ígéretes kísérletes és klinikai tanulmányok, amelyek kiváló kezdeti eredményeket mutattak, továbbá biomechanikai vonatkozásban közel identikusak voltak a humán artériákkal.<sup>31</sup> A gyakori kései aneurysma kialakulás miatt azonban kiszorultak az érsebészet fegyvertárából.<sup>32</sup> A xenograftok napjainkban kevésbé népszerűek a verőér-rekonstrukcióban erős immunogenitásuk miatt, a decellularizált kötőszövet, illetve bőrkészítmények főként a plasztikai sebészetben hódítottak teret.

A *szintetikus* graftok előnye, hogy kívánt méretben egyszerűen beszerezhetők, jól kezelhetők. Hátrányuk, hogy igen költségesek, testidegenek, hajlamosak fertőzésre és elzáródásra, a fiziológiástól eltérő biomechanikai tulajdonságokkal rendelkeznek. A textil alapú Dacron<sup>®</sup> (PET) szőtt, illetve kötött formája porozitás tekintetében különbözik egymástól. A szőtt forma előnyeként említhető a használatakor fellépő kis vérveszteség és hogy mechanikailag ellenálló, erős. Hátránya, hogy rigid, sebészileg nehezebben kezelhető, és nehezen integrálódik a szervezetbe. A kötött forma ezzel

szemben – a magasabb áteresztőképessége miatt – jobb szöveti integrációs tulajdonságokkal rendelkezik, könnyebben kezelhető, ugyanakkor mechanikailag kevésbé ellenálló, tágul, és használatakor előzetes kezelésre (pre-clotting) lehet szükség. Az ePTFE egyesíti a porozitás és az extravazáció hiánya nyújtotta előnyöket, kevésbé thrombogén felszín biztosít, relatíve könnyen kezelhető, méretezhető, különböző változatai is elérhetők (vékony falú, nyújtható, külső spirállal megerősített). Nehézséget okozhatnak azonban az esetleges szűrőcsatorna vérvételek. Napjainkban, a verőér rekonstrukcióban egyik leggyakrabban alkalmazott graft (mind infrainguinális, mind extraanatomikus pótlásoknál).



1. ábra  
A vascularis graftok felosztása.

A *kombinált* graftok célja, hogy az előnyös biológiai és szintetikus tulajdonságokat ötvözzék. Ide sorolhatók a különböző impregnációs eljárásokon (albumin, kollagén, antibiotikum, ezüst) átesett Dacron<sup>®</sup> alapú graftok, amelyek az intraoperatív vérzés csökkentésére, illetve a graftinfectio kivédésére szolgálnak. Továbbá ide sorolható a glutaraldehide fixált v.umbilicalis esetében használt külső Dacron<sup>®</sup> erősítés. Itt kell megemlíteni azokat a biológiai vagy szintetikus eredetű mechanikai stabilitást biztosító vázszerkezeteket (kollagén, cellulóz, hydrogel, stb.), amelyekre simaizom és endothel sejt kultúrák felvitelével mintegy élő, funkcionálisan is közel teljes értékű, működőképes érszakasz kreálható elméletben. Ez utóbbira jó példa a bakteriális cellulóz alapú műér, aminek koagulációs és mechanikai vizsgálatai az utóbbi években történtek Svédországban. Megemlíthető, hogy ígéretes kísérletek folynak kollagén váz vascularis conduitként való alkalmazására is.<sup>33</sup>

Annak ellenére, hogy az ideális graft keresése és maga a graftkutatás világszerte számtalan kutatócsoportot foglalkoztat, az áttörő eredmény még várat magára.

### 1.3 A szövetek prezervációja

A viabilis szövetek a keringés megszűntével hypoxiás, majd anoxiás állapotba kerülnek. A prezerváció célja, hogy a graftbeültetésig megőrizze a szövetek integritását olyan formában, hogy az a fent felsorolt "ideális graft" kritériumoknak minél inkább megfelelhessen. A sejten belüli biokémiai és anyagcsere folyamatok a szövet hőmérsékletével arányosan zajlanak, kézenfekvő hát, hogy első lépésként az explantált szöveteket hűteni kell, ezzel is késleltetve az intracelluláris adenosine triphosphate (ATP) deplécióját és a további sejtkárosító folyamatokat, ugyanakkor a hideg maga is egy sor változást idéz elő a sejt struktúrájában, működésében.

Hypoxiás állapotban a mitochondriális energiatermelő folyamatok – az aerob oxidatív foszforilációval szemben – egyre inkább, majd kizárólag anaerob módon glikolízissel képesek korlátozott ideig energiát termelni. Az egyes sejtek funkciójuk, energiaháztartásuk és az extracelluláris mátrix függvényében érzékenyebbek vagy kevésbé érzékenyek a hypoxiás körülményekre. Az endothel kifejezetten érzékeny a hypoxiára és már néhány órával az explantáció után a diszfunkció/sejtpusztulás jeleit mutatja.<sup>34</sup> A simaizomsejtek és a fibroblasztok kevésbé, az extracelluláris mátrix az

elasztin és kollagén váz közvetlen nem szenved károsodást a hypoxiás körülmények miatt, közvetve azonban a sejtek nekrozisa nyomán a sejtekből kiszabaduló enzimikus hatások károsíthatják azokat.

Az ötvenes évek elején *Dubost* (1952) és *DeBakey* (1954) a rezekált hasi aortát olyan friss allografttal pótolták, amelyeket a beültetésig antibiotikumos oldatban – akár 6 héten keresztül – tároltak. *DeBakey és Hufnagel* (1953) etilén-oxiddal dezinficiálták, majd tartósításként liofilizálták (fagyasztva szárították) az artériás allograftokat. *Gross* (1951) sterilizáció gyanánt a besugárzást választotta, majd a tartósításra fagyasztott szén-dioxidot (száraz jeget) használt. A glutaraldehide fixált v. umbilicalist (HUV) a '70-es évek közepétől használják conduitként, leggyakrabban polyester Dacron® háló erősítéssel. A tárolás 50%-os vizes ethanolban történik, amit a beültetés előtt kiöblítenek.<sup>35</sup>

Logisztikai szempontokat figyelembe véve kívánatos, hogy a graftok tárolása minél hosszabb időn át, költséghatékony és egyszerű módon legyen lehetséges. Ennek több lehetséges variációja kínálkozik, cardiovascularis téren legelterjedtebben erre a szövetek mélyfagyasztott tartósítása és tárolása ad lehetőséget.

### 1.3.1 A krioprezerváció

A tudomány sejtek, szövetek, szervek, sőt az egész emberi test mélyfagyasztásának gondolatával régóta foglalkozik. *Spallanzoni* már 1776-ban (hóban) fagyasztott és felolvasztott spermiumokat,<sup>36</sup> de a folyamat technikai és kivitelezési nehézségei miatt csak az 1900-as évek második felére sikerült kézzel fogható, a gyógyászatban is felhasználható eredményeket felmutatni. Eleinte csak sejt (spermium, oocyta), később szövet (bőr, csont, szalagok, erek), az utóbbi években már preembrió/embrió mélyfagyasztva tárolásáról, beültetéséről is történtek közlések.<sup>37</sup> A sebészeti betegellátás területén a (teljes) rekonstrukcióhoz esetenként szükség van bizonyos szövetek be/átültetésére, (ilyenek az égési sérültnél a félvékony bőr, az ortopédiai/traumatológiai műtétek során a csont, szalag, porc, az ér-, szívsebészeti gyakorlatban pedig a vénák, artériák, szívbillentyű(k)).

A téma fontosságát és aktualitását alátámasztja, hogy a kriológia az utóbbi néhány évtizedben rendkívül gyorsan fejlődő, interdiszciplinális tudományággá nőtte ki

magát. Szó szerinti fordításban: a *cryo* (előtag) nagyon alacsony hőfokot, fagyást; a *preservatio* védelmet, konzerválást jelent. Klinikai szóhasználatban gyakran csak mélyfagyasztásként vagy mélyhűtésként emlegetik. A fent említettek alapján látható, hogy a prezervációs eljárásokat az orvoslás számos területén használják, itt ennek érsebészeti aspektusát, lehetőségeit tárgyaljuk bővebben.

*O'Bryan* 1975-ben mutatta be a mélyfagyasztást dimethyl sulfoxid (DMSO) krioprotektáns használatával, amely alkalmas a cardiovascularis szövetek hosszú távú tárolására. Ezzel a szívsebészek és az érsebészek számára elérhetővé tette a szívbillentyűket és az érgraftokat akut és elektív felhasználási igény esetére. Később a krioprezervált és friss aortabillentyű operációk hosszú távú klinikai eredményeinek összehasonlítását publikálta, amelyben egyértelműen demonstrálja az allograftok életképességét a krioprezervációs technikával.<sup>38</sup> Európában talán a legnagyobb hagyománnyal és graft-számmal rendelkezik a több ország nonprofit közreműködésével létrejött szövetbank, az Európai Homograft Bank (EHB), amely tételes kritériumokat szab a donorral és prezerválandó homografttal szemben.<sup>39</sup>

#### Nem lehet donor:

- ❖ akinél a halál oka ismeretlen
- ❖ akinél valamely fertőzés áll fenn
- ❖ akinél malignus megbetegedés, vérképzőszervi tumorok vagy Hodgkin-kór áll fenn
- ❖ akinél fennállhat a veszélye prion betegségeknek
- ❖ Kockázati magatartás (homoszexualitás, bebörtönzés, drog, ill. alkohol abúzus, stb.)
- ❖ Egyéb általános kizáró tényezők, mint pl.:
  - csökkent immunkompetencia, xenograft recipiensek, mérgező anyagok (cianid, higany, ólom) toxikus koncentrációja a donorban, autoimmun- vagy kollagén-betegség, ami az adott explantálandó szöveteket vagy sejteket támadja.
  - 18 hónapnál fiatalabb kisdéd, akit a HIV, HTLV, HBV vagy HCV fertőzött édesanyja az elmúlt 12 hónapban szoptatott, terhesség és szoptatás élő donor esetén.

#### A donorok lehetnek:

- ❖ Agy-halott páciensek-95% (*heart-beating donors* HBD / *multi-organ donors* MOD)
- ❖ Cadaver-5% (*non heart-beating donors* NHBD)

Cadaver esetén a graftok kivételét legfeljebb 24 órával a keringés leállása után, maximum 6 órás meleg ischemiás idő akceptálásával, minél hamarabb el kell végezni. A graftok feldolgozását szintén a lehető leghamarabb el kell kezdeni, maximum 24 órás késedelemmel. Azaz a teljes ischemiás idő (a keringés leállításától a krioprezervációig) nem haladhatja meg a 72 órát.

A donor korának felső határát férfiak esetén 55 évben, cardiovascularis kockázati tényezővel nem rendelkező nők esetén 60 évben állapították meg.

Egyes morfológiai elváltozások az érintett érszakaszt kizárják a további prezervációs folyamatból:

- atheroma / meszesedés
- ulcerativ laesio
- intramuralis haematoma
- a preparáció miatti sérülések
- lumen stenosis
- dilatatio, aneurysma
- az érfal fertőzése

A szállítás továbbra is steril körülmények között fiziológias sóoldat, Ringer-laktát, Euro-Collins(EC), Krebs-Henseleit (KH), vagy Tissue Culture Medium (TCM) oldatban történik külső jégűtés mellett. Mivel ezidáig nincs egységes protokoll a transzportmédiúra vonatkozóan, így az egyes szövetbankok más-más transzportmédiót használnak.

A Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinika keretein belül működő érbankba a graftok Ringer-laktát antibiotikus és antimycotikus oldatban érkeznek, kívülről jeges hűtéssel, steril csomagolásban, megfelelő dokumentációval. Ezt követi a graftok vizsgálata, preparálása, méret szerinti osztályozása, illetve adatbázisba rögzítése, majd a decontaminatio és krioprezerváció, amit szabály szerint az explantációtól számított 24 órán belül meg kell kezdeni.

Az EHB protokollja szerint a morfológiailag megfelelő szöveteket egy három különböző antibiotikumot (Vancomycin, Lincomycin, Polymixin B) tartalmazó oldatban 20-48 órán keresztül inkubálják 4 °C-on.<sup>40</sup> Az EHB elmúlt 20 éves tevékenységét vizsgálva kiderült, hogy az alkalmatlannak nyilvánított vascularis szövetek 30%-a az antibiotikus decontaminatio sikertelensége miatt következett be. Régebben a decontaminációs idő 20 óra volt a HBD és 48 óra a NHBD –től származó graftok esetén. Az inkubációs idő meghosszabbításával (2009) javultak az arányok, és a hármas antibiotikum kombináció átlagosan 75%-ban mutatott sikeres decontaminációt.

Megemlíthető azonban, hogy a fent leírt kombináció nem nyújt kellő védelmet *Propionibacterium acnes* ellen, ami egy aerotoleráns anaerob Gram-pozitív baktérium, ami része az emberi bőr normál flórájának, ugyanakkor súlyos endocarditist és további szövődeményeket okozhat.<sup>41</sup>

A szövetek, graftok hűtése előtt a vivőoldatként használt tápfolyadékhoz (a mi gyakorlatunkban Ringer-laktát oldathoz) DMSO-t adnak a 10%-os koncentráció eléréséig. A DMSO a szövetekbe diffundál, ami a sejten belül és az extracellulás térben kialakuló fagyási sérüléseket hivatott minimalizálni. A DMSO vélhetőleg egy citotoxikus vegyület, a koncentráció 1,8 M fölé nem emelhető. Az equilibrium elérése után (40-60 perc) számítógépvezérelt mélyfagyasztás történik két lépcsőben: ahol a hőmérséklet +4°C és -40°C között 1°C/perc, majd -40°C és -100°C között 5°C/perc sebességgel csökken. A raktározás -130 °C alatti folyékony nitrogén gőzben történik.<sup>42</sup>

A graft felhasználásakor a felolvasztás a felolvadásig szobahőmérsékleten, majd 37 °C-os fürdőben történik. Minőségbiztosítási szempontból is fontos a donorok szerológiai szűrése és a minták bakteriológiai utánkövetése: aerob, anaerob és gomba mikrobiológiai tenyésztése, a transzport folyadékból, a decontaminációs folyadékból szövetmintával együtt, és a prezerváló folyadékból.<sup>40</sup>

A krioprezerváció révén tehát a szövetek hosszútávú tárolása akár több évre is lehetővé vált. Mélyfagyasztott állapotban a szerkezetileg ép szövet korlátlan ideig tárolható, és a felolvasztás pillanatában a beültetéshez megfelelő minőségű szövet állhat rendelkezésre. A módszernek alapvetően a költséges műszaki igény szab határt.

### 1.3.2 A hűtve tárolás 4°C-on

Tekintve, hogy a szövet/szervtranszplantáció folyamatában az explantáció és az implantáció térben és időben elkülönül, a legtöbb szervet/szövetet a szállítás ideje alatt hűtve kell tárolni. *Meleg ischémias időnek* nevezzük a keringés megszűnése és szerv/szövet tényleges explantációja (és transzportmédiumba helyezése) között eltelt időt, míg *hideg ischémias idő* alatt a hűtött prezerváló oldatban eltöltött időt értjük (azaz egészen a beültetésig, a declamp pillanatáig). Így hideg ischémias időnek tekinthető a hosszabb időn keresztüli hideg anoxiás tárolás is. Krioprezerváció esetén a szövetben a

meleg és hideg ischemiás idő alatt végbemenő károsodásokhoz hozzáadódnak a mélyfagyasztás és felolvasztás ciklus során végbemenő fiziko-kémiai változások.

Visszatérve *Carrel*, korábban említett, 1907-ben publikált kísérletsorozatához,<sup>4</sup> *Carrel* eredeti célkitűzése is az volt, hogy találjon egy módszert, ami megfelelő ideig képes az egyébként gyorsan dezintegrálódó érszövetet megóvni, hogy az transzplantációs célból később felhasználható legyen. Abból az egyszerű megállapításból indult ki, hogy a hullai elváltozások hűtött körülmények között lassabban alakulnak ki. Ennek nyomán a kutyából explantált artéria, illetve véna graftokat a beültetésig különböző ideig (3-20 nap) többek között fiziológiás sóoldatban hűtve (0-4 C°) tárolta.

A hideg anoxiában történő tárolás egy egyszerű, kevéssé műszerigényes, ennek következtében olcsóbb eljárás. Ugyanakkor a fagyási sérülések az intracelluláris kristályosodás káros hatásai csakúgy, mint a DMSO feltételezett citotoxikus hatásai elkerülhetők. A 4 C°-ra hűtés általánosan elfogadottnak mondható a transzplantálandó szövetek/szervek metabolikus igényeinek csökkentése érdekében.<sup>43</sup> Roppant fontos azonban, hogy milyen transzport/tároló médiumot használunk. Efféle gondolatai már *Carrel*nek is lehettek lévén, hogy a leírt kísérleteiben más-más tároló médiumot használt: a kutyából származó carotis, illetve jugularis interna szegmentumot izotóniás sóoldatban, fibrinmentes szérumban, illetve Locke's oldatban tárolta, ami egy összetettebb oldat. (Alapja a Ringer oldat, de ezen kívül glukózt és némileg több NaCl-ot tartalmaz). Több mint 100 év elteltével ma is ugyanazt a kérdést tesszük fel: Mi a megfelelő transzport/tároló médium?

Intenzív kutatás tárgya, hogy milyen összetételű folyadék képes a szövetek integritását a leginkább és a legtovább megőrizni. Ennek számszerűsítése, összehasonlítása még ennél is nagyobb feladat elé állítja a kutatókat és a tudományt. A tárolt graft tulajdonságai közül a leginkább vizsgáltak a biomechanikai, viabilitási, hisztológiai és koagulációs tulajdonságok, amelyek valamilyen standardizált mérési módszer alapján összehasonlíthatók a különböző módon tárolt sejtek, szövetek, graftok esetén, végeredményben azonban mindig a klinikai felhasználhatóság a döntő.

A hideg anoxiában tárolt graftok felhasználása jelenleg az infrainguinális revascularizációknál, májtranszplantációnál a hepatica korai postoperatív thrombosisa esetén<sup>44,45</sup> készített artériás conduitként mondható általánosan elfogadottnak.



### 1.3.3 A hűtve tárolás alatt végbemenő változások

Ez egy komplex kérdéskör, ahol legkevesebb 4 kérdést kell megfogalmaznunk:

- Milyen változásokért felelős az alacsony hőmérséklet?
- Milyen változásokért felelős a hypoxia?
- Mennyiben befolyásolja a tároló médium a végbemenő változásokat?
- A fentiek tükrében milyen időfaktorról beszélhetünk az egyes morfológiai és/vagy funkcionális károsodások kialakulásának tekintetében?

Egy szövet sorsát a transzplantációs folyamatban végigkövetve láthatjuk, hogy első lépésben a keringés megszűntével oxigénhiány, azaz hypoxia lép fel. A hypoxia által kiváltott sejt-sérülés csökkentése érdekében, a szövetet kivétel után hűtve tároljuk, ami késlelteti az intracelluláris ATP kimerülését, és lassítja a sejt-károsító folyamatokat,<sup>46,47,48</sup> ugyanakkor önmagában is előidézhet, illetve hozzájárulhat a sejt-károsodáshoz.<sup>49,50,51</sup> Habár a graftsérülés kiváltója a hypoperfúzió és a hypothermia, a keringés helyreállítása, azaz a meleg reperfúzió nem állítja le a sejt-károsító folyamatokat, hanem épp ellenkezőleg, tovább súlyosbítja azokat. Egyrészt bizonyos időtartamú hypoxiás periódus után az oxigénellátás helyreállítása ún. reoxygenizációs sérüléshez vezet, másrészt bizonyos idejű hypothermiából történő felmelegítés, felmelegedési károsodáshoz, vagy más néven hideg-indukált apoptózishoz vezet. A sérült szövetben/szervben áramló vér akut gyulladásos reakciót vált ki, ami súlyos esetben különböző szintű graftdiszfunkciót eredményezhet. S az utóbbi évek kutatásai alapján egyre nyilvánvalóbb, hogy a hideg anoxiás tárolás és az azt követő meleg reperfúzió során elszenvedett kezdeti sejt/szövet sérülések az akut gyulladásos reakció kiváltásán túl, fontos szerepet játszanak az immunrendszer modulálásában, hozzájárulva ezzel a krónikus gyulladásos reakcióhoz, a krónikus graftdiszfunkcióhoz és a krónikus rejekcióhoz.<sup>52,53,54,55</sup>

A hypothermia (0-4°C) alkalmazása széles körben elterjedt, védő hatását a hypoxia indukálta ATP csökkenés késleltetésével éri el. Régóta ismert tény azonban, hogy hypothermia során az emlős sejtekben károsodások is bekövetkeznek. A klasszikus nézet szerint a hideg gátolja a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATP-áz működését, és ez vezet az intracelluláris nátrium szint emelkedéséhez, majd a következményes klorid beáramlásához és a sejt duzzadásához.<sup>46-48,56</sup> Ugyanakkor ez a klasszikus elképzelés

kisebb jelentőséggel bír máj endothel sejtek, hepatocyták vagy a vesetubulus sejttei esetén.<sup>57</sup> A fiziológiás ionösszetételű és szöveti/szervi prezerváló oldatokban is végbemenő hypothermiás sérülések bizonyítottan a reaktív oxigén gyökökön keresztül, pontosabban a vas-dependens úton keletkező reaktív oxigén gyökökön keresztül jönnek létre.<sup>48,50,58,59,60,61</sup>

A hűtött állapotból fiziológiás hőmérsékletre történő felmelegítés tovább fokozza a sejtkárosodást.<sup>49,62,63</sup> Hasonló módon, ahogy a reoxygenizációs károsodást a hypoxia alatt végbemenő celluláris változások okozzák/teszik lehetővé, úgy a felmelegítés esetében is a hypothermia alatt bekövetkező celluláris változások tehetők felelőssé.<sup>49,64</sup> A melegítés során a sejt apoptotikus elváltozásokat mutat, mint a celluláris és sejtmagzsugorodás, a kromatin kondenzálódása, a zeiózis (blebbing) és az apoptotikus testek megjelenése, vagy egyes esetekben a DNS fragmentálódása.<sup>49,63,65,66</sup> Emiatt a hypothermia kiváltotta és a felmelegítés alatt megmutatkozó apoptotikus típusú sejt-sérülést, *hideg indukálta apoptózisnak* nevezik.<sup>49</sup> A felmelegítés kulcsfontosságú az apoptotikus elváltozások kialakulásához, a hypothermiában elpusztuló sejtek nem mutatnak a programozott sejthalálra jellemző morfológiai képet.

Az hogy a sejt apoptózis vagy nekrozis révén pusztul el, a sejt (maradék) aktuális celluláris ATP szintjétől függ. Ugyanakkor egyre nyilvánvalóbb az is, hogy kevert formák is léteznek és az apoptózis és a nekrozis csak a két véglet.<sup>67,68</sup> A mitochondriális átvezető pórus a közös központi szereplő a sejtpusztulás különböző módozataiban, amit alapvetően a celluláris ATP szint határoz meg.<sup>68,69,70</sup> Így érthető, hogy a tiszta hypoxiás károsodás egyöntetűen nekrozishoz vezet, míg a reoxygenizációs károsodások gyakran mutatnak nekrotikus vagy kevert morfológiájú képet, habár apoptózis is előfordul.<sup>71,72</sup> A különböző prekondicionálási protokollok a hatásukat a MPTP megnyílásának csökkent érzékenységén keresztül fejtik ki.<sup>73,74,75,76</sup>

Eltérően sok más típusú sejt-sérüléstől – amelyek a reaktív oxigéngyökök hatásán keresztül jönnek létre – a hideg indukálta sejt-sérülés (akár a hypothermia, akár a felmelegítés ideje alatt) a sejt redox-aktív (azaz kelátképzésre alkalmas) vastartalmának emelkedése révén fejt ki hatását: az alacsony reaktivitású  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  és molekuláris oxigént magas reaktivitású gyökökké alakítja, mint pl. a hydroxil gyökök vagy a vas-oxid gyökök.<sup>50,64,65,77</sup> A sejt redox-aktív vastartalmának emelkedése jelentős lipid peroxidációhoz vezet, azonban a fő célpontja a mitochondrium. A hideg által okozott

celluláris vasháztartás megváltozása következményeként alakulhat ki a hideg indukálta mitochondriális áteresztő pórus. Ez valószínűleg összekötő láncszeme az apoptotikus jelátvivő folyamatoknak, mint pl: a Cyt-c kiáramlásának vagy a caspase 3 aktiválódásának. Egyes sejttípusokban további vasfüggő folyamatok, pl. a proteázok (proteosoma) aktiválása is szerepet játszik. Az intracelluláris vasforgalom összetett és tárgyalása messzire vezetne, jelenlegi tudásunk szerint azonban a mitochondrium karmesteri szerepet játszik benne.<sup>78</sup> Mindezek alapján a transzportműködésekkel való dúsítása javasolható.<sup>58-60,65,79,80</sup>

A hypoxia/reoxygenizáció és hypothermia/felmelegítés során fellépő változások intracelluláris szinten jelennek meg, ezek endothel sejt aktivációhoz és akut gyulladásos reakcióhoz vezetnek, ideértve a granulocyták szöveti invázióját és a reaktív oxigéngyökök termelődését, amelyek – ezúttal – az extracelluláris térbe áramlanak ki. Egyes szabad gyökök, mint pl.  $H_2O_2$ , elérhet intracelluláris kompartmenteket is az endothel vagy parenchymás sejtekben, és tovább serkenti a mitochondriális áteresztő pórus kialakulását. Önmagát erősítő folyamatként a gyulladásos reakció nagyban felerősítheti a szöveti károsodást,<sup>81</sup> nem szabad elfeledkeznünk azonban arról, hogy a gyulladásos reakciót a korai hypoxia és a hideg indukálta sérülés idézi elő. Így a korai intracelluláris változásokat mérséklő folyamatok nagymértékben csökkenthetik a későbbi gyulladásos reakció létrejöttét.<sup>82</sup>

*Yard* és kollegái a katekolaminok védő hatását tapasztalták endothel sejt kultúra hideg anoxiás tárolása kapcsán. A védő hatást a katekolaminok antioxidatív, szabadgyökfogó képességének tulajdonították.<sup>83</sup>

A vörösvértettek hűtve tárolására vonatkozóan *Nagy* és munkatársai tettek megállapításokat. Adataik alátámasztják, hogy az ATP-vesztés, vagyis az energiahány a vörösvértettek teljes makromolekuláris szerkezetére hat, nemcsak egyes részekre (mint például a Na-K-ATP-áz). Ez azt jelentheti, hogy az energizált citoplazmaszerkezet, mint egész, felelős az egyenlőtlen ionmegoszlás fenntartásáért és az élő sejtek (beleértve a kísérleteikben használt vörösvértettek is) integritásának fenntartásáért.<sup>84</sup>

Egy holland munkacsoport artéria és vena iliaca belfelszínének endothel fedettségét és a sejtek morfológiai elváltozását vizsgálta scanning elektronmikroszkópos módszerrel különböző időpontokban: a kivételkor, tíz óra hideg anoxiás tárolás után University of Wisconsin (UW) oldatban, és hét nap hideg anoxiás tárolás (UW) után.

Az endothel borítás (mennyisége és minősége) nagymértékben csökkent az artériák esetén, azonban a vénáknál legnagyobb mértékben megmaradt. Érdekes megállapításra jutottak a tároló edény tekintetében, ahol az üveg tárolóedények szignifikánsan jobb eredményt mutattak a műanyag tasakokkal való összehasonításban, valamint a vér minél előbbi kimosása, és az elegendő mennyiségű tároló folyadék (hogy a graft szabadon lebeghessen) javíthatja az endothelréteg megőrzését.<sup>85</sup>

Érdemes néhány szót szólni arról is, hogy a hideg, mint fizikai tényező azon felül, hogy egy sor változást okoz a sejt homeosztázisában, már 2 óra elteltével 24 génnek az átírását befolyásolja jelentősen. Tehát már a tárolás legelején (2 óra után), jóval azelőtt, mielőtt még bármiféle morfológiai elváltozás mutatkozna a sejteken, már jelen vannak a citoplazmában azok a hírvivő ribonukleinsavak (mRNS-ek), amelyek közvetítik a sejt hidegre adott válaszát.<sup>86</sup>

Visszatérve a kérdésselvetésekre látható, hogy a hypothermia és a hypoxia és ugyanígy a felmelegítés és a reoxygenizáció egyidőben zajló fiziko-kémiai folyamatok, így a didaktikailag külön tagolt intracelluláris változások parallel módon, több esetben egymást erősítve mennek végbe. A hypoxia/reoxygenizáció miatt létrejövő sejtkárosodások a celluláris ionháztartás zavarában és az aktív oxigén-gyökök keletkezésében, illetve a mitochondrium membrán permeabilitásának növekedésében nyilvánulnak meg és vezet(het)nek a sejt maradék energiaszintjétől függően apoptózishoz vagy nekrozishoz. A folyamatot nagymértékben befolyásolja az adott szövet metabolikus igénye és a tároló oldat összetétele, amelyek együttesen határozzák meg a szövetkárosodás időbeni lefutását.

#### **1.3.4 Transzport médiumok, prezerváló oldatok, tápfolyadékok**

A tanszplasztáció sikere szempontjából a tároló oldat összetétele meghatározó jelentőségű.<sup>87,88</sup> A jelenleg használt oldatoknak egyik fő célja, hogy megelőzze a sejtek duzzanatát, ami részben a sejtmembrán ionpumpáinak hypoxiás hideg tárolás okozta gátlása miatt következik be, illetve megelőzze az energiaháztartás következményes leromlását, ami végül az intracelluláris ionhomeosztázis elvesztéséhez vezet.<sup>89</sup> Alapvető fontosságú, hogy a felhasznált oldat steril legyen, erre azért kell fokozottan ügyelni, mert ha valamilyen fertőző ágens bekerül az oldatba, az a tárolt szövet integritását

veszélyezteteti. Fertőzött médiumban tárolt szerv/szövet a továbbiakban nem alkalmas beültetésre. A Brüsszelben működő Európai Homograft Bankba a beérkező szövetek 10%-át valamilyen fertőző ágenssel történt kontamináció miatt kell beültetésre alkalmatlannak nyilvánítani. Több tároló folyadékot emiatt az oldathoz adott antibiotikus és/vagy antimycotikus adalékokkal egészítenek ki. A különböző szervek/szövetek más-más igényt támasztanak a transzportmédiummal szemben, azaz más-más oldatban tárolhatók legelőnyösebben.

Általánosságban az erek prezervációja azért bír kiemelt jelentőséggel, mert minden szervtranszplantáció esetén a tároló médium – a szervek perfúziójakor – annak érrendszerével a hideg ischemiás idő alatt közvetlenül érintkezik. Ilyenformán az endothel sejtek és simaizomsejtek azok, amelyek a prezerváló oldattal közvetlen kapcsolatba kerülnek, és a szállítás során állandó kapcsolatban maradnak. A késői graft-diszfunkció meghatározó okaként, a beültetéskor (már) fennálló endothel sejtsejt sérülés tehető felelőssé.<sup>90</sup> Az aktivált endothel sejtekben jelentős mennyiségű citokin, továbbá adhesiós molekulák termelése zajlik, ami nagyban elősegíti a graft gyulladást (humorális és celluláris) sejtekkel történő invázióját. Ezek a mediátorok súlyosbítják az ischemiás-reperfúziós károsodásokat, elősegítik az akut,<sup>91</sup> illetve a krónikus rejekciót,<sup>92</sup> és a vasculopáthiát.<sup>93</sup> A tüdő transzplantáció során a hűtve tárolás és a reperfúzió után (szabályszerűen) jelentkező oedema az endothel sejtek tárolás utáni diszfunkciójára utal.<sup>94,95,96</sup> Számos szerző szerint az endothel sejtek érzékenyebbek a hideg ischemiára a parenchymalis sejteknél. Ismerve az endothel sejtek kritikus fontosságú (anti)koagulációs és permeabilitási tulajdonságait, nem meglepő, hogy számtalan tanulmány vette górcső alá ezt a kérdéskört.

A különböző oldatokat ionösszetételük alapján intracelluláris/depolarizáló (magas  $K^+$ , alacsony  $Na^+$  tartalmú) vagy extracelluláris/nem depolarizáló (alacsony  $K^+$ , magas  $Na^+$  tartalmú) médiumokra oszthatjuk, amelyek nevékhöz híven az intra-, illetve az extracelluláris ionegyensúlyt reprezentálják. Nagyszámú egyszerűbb összetételű prezerváló oldat van forgalomban, amit gyakorta használnak szervkivételnél transzportmédiumként pl.: Ringer-laktát oldat, UW-oldat, hisztidin-tryptofán-ketoglutarát (HTK) oldat, Euro-Collins (EC) oldat. A TiProtec a piacon megjelent új tároló médium, a HTK oldat módosításával hoztak létre: hisztidin tartalmát teljes egészében N-acetylhisztidinre cserélték, relative magas kálium és klorid

koncentrációval rendelkezik. Ezen kívül sucrose-t, alanint, glycint, és kelátképzőt is tartalmaz a maximális protekció elérésére. Az irodalom nem egységes az új oldat prezervációs képességének tekintetében.<sup>86,97</sup>

Szövet kultúra médium, a továbbiakban TCM (tissue culture medium), izolált sejtek szaporítására kifejlesztett oldat, ami összetételében megteremti azt a kényes egyensúlyt, ami a sejtek túléléséhez, osztódásához szükséges. A különbség a szövet kultúra médium és az egyéb mikrobiológiai tápoldatok között, hogy azoknak a sejteknek, amelyek egy komplex szervezetből származnak a növekedéshez gyakran szükségük van hormonokra, növekedési faktorokra, amelyek *in vivo* jelen vannak. Ennek megoldására vérszérumot vagy szintetikus úton előállított „szérum helyettesítőt” kevernek a médiumba. Lényeges különbség a tápkultúra oldatok tárgyalásánál elkülöníteni az ún. definiált vagy összetevői tekintetében nem definiált médiumot. A definiált, vagyis szintetikus oldatban minden összetevő koncentrációja pontosan meghatározott, továbbá nem tartalmaz gomba, állati, vagy növényi szövetet.

*Galambos* és munkatársai a vena saphena magna homograftok életképességének változását vizsgálták X-VIVO™ 10 TCM-ben történő 6 hetes tárolás alatt. Methyl thiazol tetrazolium (MTT) redukciós teszt felhasználásával azonos viabilitási értékeket mértek a krioprezervált és felolvasztott vénák esetén és a 6 hetes hideg anoxiában X-VIVO™ 10 TCM-ben történő tárolás után.<sup>98,99</sup> Ez egyedülálló az irodalomban, és klinikai felhasználása is ígéretes perspektívát rejthet magában. Az X-VIVO™ 10 médium tartalmaz L-glutamint, gentamicint és fenolvöröst, továbbá rekombináns humán szérumfehérjéket (albumin, inzulin) és pasztörizált humán szérum transferrint.

#### **1.4 A homograftok felhasználási területe**

A homograftoknak intézményenként változó lehet a felhasználási profilja, a tradíció vagy a sebészi kompetencia függvényében. Irányelvként elfogadhatjuk, hogy a homograft abban az esetben jelent választandó/választható alternatívát, amikor elfogadható minőségű/mennyiségű saját anyag (autograft) valamilyen okból nem áll rendelkezésre.

*Jelenlegi indikációs területek lehetnek:*

1. Infrainguinalis szakaszon végzett verőér rekonstrukciók – alsó végtagi obliteratív verőérbetegségben (főként infragenicularis/cruralis anastomosis esetén).<sup>100</sup>
2. A hasi aorta fertőzések kórképei (rupturált/nem rupturált mycotikus aneurysma, szintetikus aortagraft infectioja, aortodigestiv fistula).<sup>101,102,103</sup>
3. Végtagi szintetikus graftok fertőzések komplikációi esetén.<sup>101,104</sup>
4. Krónikus haemodialysis egyes eseteiben: arteriovenosus graft beültetések,<sup>105</sup> vagy meglévő arteriovenosus graft fertőzések komplikációi esetén.<sup>106</sup>
5. Gyereksebészetben:
  - v.porta thrombosis miatti meso-Rex bypass változatainál.<sup>107,108</sup>
  - Norwood műtét – első fázisában (módosított Blalock-Taussig shunt).<sup>109</sup>
  - Hypoplasztikus aortaív rekonstrukciójakor.<sup>110</sup>
  - hasi aorta rekonstrukciójakor.<sup>111,112</sup>
6. Traumás végtagsérülések érsebészeti rekonstrukciójakor.<sup>113</sup>
7. Májtranszplantáción átesett páciensek korai vagy későbbi vasculáris komplikációi esetén (a. hepatica/v. portae thrombosisa).<sup>44,45</sup>
8. Egyes fertőzésekre hajlamos páciensek esetén (immunszupresszió vagy egyéb fertőzésre hajlamosító tényező miatt).
9. Trachea/bronchus pótlása esetén.<sup>114,115</sup>
10. Vena cava superior thrombosis esetén végzett rekonstrukciónál.<sup>116,117</sup>
11. Egyéb vascularis rekonstrukciók, főként tumor miatti rezekció esetén.<sup>118</sup>

Számos sebészi területen történtek kísérletek a homograftok alkalmazására, melyeknek mára már csak történelmi jelentőségük van. Ilyen például a hydrocephalus kezelésére használt vena saphena magna billentyűs graft, amely műtétet kifejezetten azokban a gazdaságilag szegényebb országokban kívántak használni, ahol a drága shunt-öket nem tudták megfizetni.<sup>119</sup> Egyes fül-orr-gégészeti beavatkozásoknál, mint pl. tympanoplasztikánál, mint felszint borító anyag használtak fel v.saphena magnát.<sup>120</sup> Meg kell említenünk, hogy a coronaria bypass műtétek esetén is történtek (és történnek) próbálkozások saphena homograftok felhasználására, ahol a homograftok nyitvamaradási ideje az utograftokhoz képest ugyan gyengébb eredményt hozott,<sup>121</sup> de mivel esetenként ez az egyetlen elérhető (javarészt életmentő) megoldás, akutan jó

haemodinamikai eredmény érhető el vele. Ugyancsak megemlíthető az a roppant érdekes megközelítés, amiben a homograft konduit funkcióját nem a vér, hanem a belégzett levegő továbbítására használják. Centrális elhelyezkedésű tüdő neopláziák operációjakor, ha a pulmonectomia így elkerülhető: a hiányzó bronchusszakasz artériás homografttal pótolható.<sup>114,122,123</sup>

A fentiekből világosan látszik, hogy az indikációs területek plasztikusak és mindmáig változnak, s nem okozna meglepetést, ha néhány éven belül számos további területen is megjelenének a terápiás felhasználhatóság fegyvertárában.

## 1.5 A vénák biomechanikája

A vénák fiziológiás funkcióinak jelentős része biomechanikai jellegű és/vagy mechanikai erők függvénye. A szervezet vérkészletének 60-70%-a, e nagy disztenzibilitású, alacsony nyomású rendszerben helyezkedik el, a venulák száma duplája az arterioláknak. A szegmentális biomechanikai tulajdonságokat a geometriai, elasztikus és kontraktilis jellemzők meghatározásával jellemezhetjük:

- ❖ Geometriai tényezők
  - külső, belső átmérő
  - falvastagság
- ❖ Elasztikus paraméterek
  - disztenzibilitás –  $D_{inc}$
  - elasztikus modulus –  $E_{inc}$
- ❖ Kontraktilitás
  - maximális aktív kontrakció

A vérerek a szervezetben folyamatosan ki vannak téve különböző frekvenciájú, főleg körfogatmenti rugalmas deformációknak a vérnyomásváltozás függvényében. Az érfal rugalmas ellenállását a vérnyomás e tágító hatásával szemben az elasztikus modulussal ( $E$ ) lehet jellemezni, amelyet a tangenciális irányú rugalmas feszültség ( $S$ ) és a vele megegyező irányú relatív megnyúlás ( $\epsilon$ ) hányadosaként határozhatunk meg.

Az elasztikus modulus fenti, általános elméleti definíciója azt sugallja, mintha a tangenciális feszültség és a tangenciális nyúlás között az összefüggés lineáris lenne egy adott ér esetében, a valóságban azonban nem ez a helyzet. A vérnyomás növekedésével



párhuzamosan az erek egyre merevebb csövekként viselkednek, azaz az elasztikus modulus értéke növekszik, mivel a tangenciális feszültség mind nagyobb, a tangenciális nyúlás pedig mind kisebb mértékben nő a nyomással. Ez esetben azonban, ha a modulus értékeit kellően kis nyomásnövekményre számítjuk ki, jó közelítéssel lehet jellemezni az érfal valós elaszticitását.

Az erek véráramlással szembeni ellenállását (rezisztenciáját) alapvetően 3 tényező befolyásolja: az ér keresztmetszete, az ér hossza és az áramló vér viszkozitása. Ezek közül is kiemelt fontosságú az ér átmérője, ami az érfalban található simaizmok kontrakciójának, vagy relaxációjának függvénye. Az erek hossza nem változik szignifikánsan, és a vér viszkozitása fiziológiásan szűk tartományban mozog (leszámítva a haematokrit vagy a hőmérséklet esetleges változását). Az érátmérőt érintő legkisebb változás is a rezisztencia nagymértékű változását vonja maga után. A rezisztencia egyenesen arányos az ér hosszával és a vér viszkozitásával, és fordítottan arányos az ér sugarának negyedik hatványával. Tehát azonos átmérőjű erek esetén igaz, ha egy ér kétszer hosszabb, az dupla rezisztenciát jelent. Ha a viszkozitás kétszeresére nő, a vascularis rezisztencia is duplázódik. Az ér sugarának növekedése csökkenti a rezisztenciát, vagyis a sugár megduplázásával a rezisztencia a 16-od részére csökken. Érthető hát, miért annyira fontos az erek kaliberének mérete és annak szabályozása.

## 1.6 A cellulóz alapú graft

A nem thrombogén bioanyagok fejlesztése, valamint a thrombogenesis csökkentésére irányuló felszíni módosítások jelentik az egyik legnagyobb kihívást a vascularis graftok esetében. Annak ellenére, hogy az elmúlt több mint 30 évben intenzív kutatás folyt ezirányban, továbbra sincs megbízható polymer alapú szintetikus graft, ami az 5mm-nél kisebb átmérőjű graftokat illeti.<sup>124</sup>

A bakteriális cellulózt mint lehetséges érpótló anyagot az utóbbi években kezdték vizsgálni. Magam a göteborgi Wallenberg laboratórium vendégkutatójaként a bakteriális cellulóz koagulációs viszonyait vizsgáltam. Célunk egy olyan módszer kifejlesztése volt, amivel megbízható és reprodukálható módon vizsgálhatók a különböző felszínek koagulációs tulajdonságai. Együttműködésünk nyomán egy társszerzős cikk született.

### 1.6.1. A bakteriális cellulóz

A cellulóz a Földön a legnagyobb számban előforduló biopolymer, vízben oldhatatlan és microbialis enzimek által bomlik le. Több különböző organizmus képes előállítani: növények, algák, baktériumok. Az *Acetobacter* genus egyes tagjai, különösképp az *Acetobacter Xylinum* szintetizálja és extracellulárisan szekretálja a cellulózt.<sup>125</sup> Maga a cellulóz lineáris nanoméretű D-glukóz fibrillumokból épül fel.<sup>126</sup> A cellulóz fibrillumok hálózatos struktúrája nagymértékben hasonlít a kötőszövetek extracelluláris mátrixban található kollagén felépítésére.<sup>127</sup>

A bakteriális cellulóz (BC) nem hydrogel a szó valódi értelmében, bár gyakran utalnak erre a magas (99%) víztartalma és a vízben oldhatatlan, de rendkívül hydrophil természete miatt. Mivel a BC a fibrillumok többségében rendezetlen kapcsolódásából épül fel, ez erős mechanikai tulajdonságokkal ruházza fel az anyagot, ami kulcsfontosságú a korábban említett biomechanikai erők elviselésében és a ruptura megelőzésében a jövőbeni érgraftok fejlesztésekor. A BC tetszés szerint alakítható, 3 dimenziós formák, csövek, lapok formálhatók belőle.<sup>127</sup> A BC fő előnye, szemben a más organizmusok által szintetizált cellulózzal, hogy biogenikus összetevőktől mentes (a növényi cellulózban fellelhető liginin, pekin vagy arabinan).

### 1.6.2 Morfológia és felépítés

A cellulóz szintézise a vízdékony monoszaharid D-glukózzal kezdődik, ami extracellulárisan termelődik a folyadék/levegő felszínén. A BC glukan láncait számos enzim komplex mintegy kisajtolja magából, amelyek ezután a Van der Waals erők hatására aggregálódnak kb. 1,5 nm széles sub-fibrillumokká. Ezek továbbalakulnak mikrofibrillumokká, majd kötegekké (bundles). A köteg-forma egy sűrű retikuláris szerkezet, amit hidrogén kötések stabilizálnak. A tápkultúra médiumban a kötegek szalagokká egyesülnek, és ezek alkotják a cellulóz hálózatos szerkezetét. A nanofibrillumok biztosítják a BC mechanikai erejét és a magas, közel 99%-os vízmegtartó kapacitását.<sup>128</sup> A BC morfológiája a gyártás körülményeitől függően változik: statikus viszonyok között a BC a tápanyagban gazdag médium felszínén keletkezik az oxigénben gazdag levegő-folyadék felszínén. A gyártási technológiának megfelelően a BC két jól elkülönülő rétegből áll: az egyik (belső) felszín egy kompakt fibrillum hálózat, ami nagyon kevés pórust tartalmaz, a másik (külső) felszín egy

porózus hálózatos szerkezet, a két réteg a denzitásában különbözik. A gyártási eljárás során több tulajdonság befolyásolható, ideértve a pórus nagyságát, a felszín vagy a különböző rétegek sajátosságait is.<sup>129</sup>

### **1.6.3. A BC mechanikai tulajdonságai és a biokompatibilitás**

Az optimális pótlóanyag, mint ahogy azt a korábbiakban említettük, biokompatibilis és megfelelő mechanikai és fizikai tulajdonságokat biztosít a sejtek megtapadásához és a szöveti integrációhoz. A BC graftok az állatkísérletek előtt aprólékos mechanikai tesztelésen estek át (burst strength, compliance, tensile strength). Mechanika tulajdonságai hasonlóak a sertés carotis artériájához.<sup>127</sup> A compliance görbéje a piacon fellelhető szintetikus anyagok közül leginkább követi az artériákét.

A graft integrációja a gazdaszervezetbe kritikus fontosságú a műérutatásban. Williams a biocompatibilitást így definiálja: egy anyag azon képessége, ami a gazdaszervezet helyénvaló válaszreakciója mellett képes ellátni a speciális feladatát.<sup>130</sup> Vagyis ebben az esetben a gazdaszervezet helyénvaló válaszreakciója alatt a graft által kiváltott alacsony gyulladási és idegentest reakciót érthetjük. A BC kiváló integrációs tulajdonságairól, a gyulladási és idegentest reakció hiányáról számolnak be, állatkísérletes modellben subcutan<sup>131</sup> és carotis pozícióban<sup>132</sup> is. Ebből fakadóan a BC ígéretes érpótlóanyagnak tekinthető.

### **1.6.4. A bakteriális cellulóz mint bioanyag**

A bakteriális cellulóz különféle felhasználási formában fellelhető az élet számos területén, legyen szó akár étkezési adalékanyagokról, a diétás rostokról, szűrő membránokról vagy ultraerős papírról. Bioanyagként komoly lehetőségeket rejt magában a különböző szövetek (testen kívüli) létrehozásában (tissue engineering), így támasztó-, pótlóanyagként szolgál a porcépítésben, az érzékszítésben (BASYS<sup>®</sup>), illetve másod- és harmadfokú égések és gyomorfekély kezelésben, továbbá olyan esetekben, ahol átmeneti bőrpótló anyag szükséges (Biofill<sup>®</sup>, Gengiflex<sup>®</sup>, XCell<sup>®</sup>), vagy a periodontális szövetek helyreállításakor használható (Gengiflex<sup>®</sup>).<sup>133,134,135</sup>

## 2. Célkitűzések:

- I. A coronaria bypass műtétek során felhasználandó (friss) humán vena saphena magna morfológiai és biomechanikai vizsgálata.
- II. Az explantált vena saphena magna 1, illetve 2 héten át normal Krebs-Ringer (nKR) oldatban, 4°C fokon történő steril tárolásának morfológiai hatásai, továbbá aktív és passzív biomechanikai tulajdonságainak vizsgálata.
- III. Az X-VIVO™ 10 médiumban 1, 2, 3, 4 hétig, 4°C fokon sterilen tárolt vena saphena magna szegmentumok biomechanikai sajátosságainak értékelése, és ennek összevetése a nKR-ben tárolt mintákkal.
- IV. A vena saphena magna krioprezervációja és felolvasztása során végbemenő biomechanikai változások összehasonlítása a 4°C fokon tárolt graftok tulajdonságaival.
- V. Az különböző tárolási feltételek esetén fellépő hisztológiai változások szisztematikus értékelése, továbbá az érfal makromolekuláris permeabilitásának vizsgálata a kolloidális vas (Ferrlecit®) transmuralis diffúziójának értékelésével.
- VI. A bakteriális cellulóz mint lehetséges érpótló anyag és a leggyakrabban használt vascularis graftok (pro)koagulációs tulajdonságainak vizsgálata és összehasonlítása új módszer kifejlesztése révén.

### 3. Módszerek

#### 3.1 A vena saphena magna gyűjtése és tárolása

A mérésekhez felhasznált vénákat a coronaria bypass műtetre kerülő páciensektől gyűjtöttük, a műtét befejeztével a kimaradó véna szakaszt – amennyiben az legalább 40mm hosszú volt – használtuk fel további vizsgálatainkhoz. Az anyagyűjtést, tárolást és további biomechanikai, szövettani feldolgozást TUKÉB engedéllyel (123/2006) végeztük.

Összesen 72 véna szegmentumot vizsgáltunk, amit 32 koszorúér műtéten átesett páciénstől gyűjtöttünk. 8 különböző csoportot határoztunk meg.

- Friss szegmentumok – a kivétel után közvetlenül mérésre kerültek.  
*/friss, n=14/*
- Hűtött (0-4°C) normál Krebs-Ringer oldatban 1 hétig tárolt minták.  
*/nKR-1hét, n=10/*
- Hűtött (0-4°C) normál Krebs-Ringer oldatban 2 hétig tárolt minták.  
*/nKR-2hét, n=8/*
- Hűtött (0-4°C) X-VIVO™ 10 oldatban 1 hétig tárolt minták.  
*/Xvivo-1hét, n=8/*
- Hűtött (0-4°C) X-VIVO™ 10 oldatban 2 hétig tárolt minták.  
*/Xvivo-2hét, n=8/*
- Hűtött (0-4°C) X-VIVO™ 10 oldatban 3 hétig tárolt minták.  
*/Xvivo-3hét, n=8/*
- Hűtött (0-4°C) X-VIVO™ 10 oldatban 4 hétig tárolt minták.  
*/Xvivo-4hét n =8/*
- Négy hétig krioprezervált és felolvasztott minták esetében.  
*/cryo, n=8/*

A normál Krebs-Ringer oldatot a legtöbb esetben szállító és két csoportban tároló médiumként használtuk, továbbá a mechanikai tesztelés során a szervfürdő alapösszetevője volt. Ennek összetétele mmol/L-ben kifejezve: 119 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 24 NaHCO<sub>3</sub>, 5.5 glukóz és 0.02 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

Szövetkultúra médiumként az X-VIVO™ 10 folyadékot (BioWhittaker, Walkersville, MD, US, BW04380Q) használtuk, ami egy szérummentes, kémiailag meghatározott összetételű készítmény. Rekombináns, illetve pasztörizált humán fehérjéket (albumint, transferrint és inzulint) továbbá fenolvöröst és antibiotikumként gentamicint tartalmaz. A médiumot többek között csontvelői őssejtek tárolására, szaporítására alkalmazzák.

A mintákat steril üvegedényekben tároltuk gumidugóval légmentesen lezárva. Ezután külső jeges hűtéssel szállításhoz előkészítettük, vagy 1-4 hétig hűtve tároltuk. Az nKR és X-VIVO™ 10 csoportokban a tárolás 4°C fokon történt.

Az explantált véna szegmentumok krioprezervációját a Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinika protokolljának megfelelően végeztük. A mintákat először antibiotikum tartalmú Ringer-laktát oldatba helyeztük, és krioprotektánsként fokozatosan DMSO-t adtunk hozzá, míg el nem értük a végső 10%-os koncentrációt. Körülbelül 20 perc szobahőmérsékleten történt *equilibratio* után a mintákat a programozott mélyfagyasztó készülékbe helyeztük, és -40°C eléréséig 1°C/perc hűtési sebességgel, majd ezt követően a -150°C hőmérséklet eléréséig 5°C/perc hűtési sebességgel fagyasztottuk. Ezután a mintákat folyékony nitrogéngőzben tároltuk (-140 / -150°C) négy hétig.

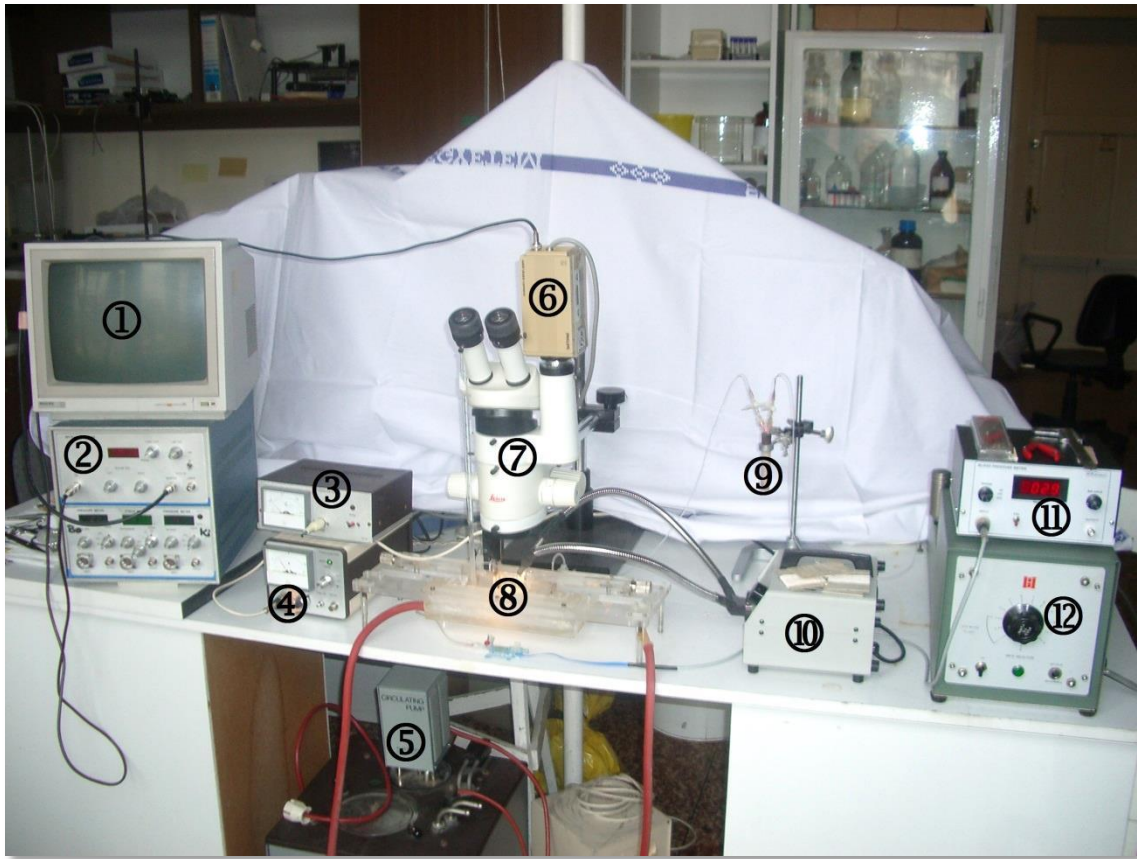
A felolvasztásnál a gyors protokollt használtuk, azaz a mintákat felolvadásig szobahőmérsékleten tartottuk, majd azt követően 37 °C fokos fürdőbe merítettük.

### 3.2. Az *in vitro* biomechanikai tesztelés

A graftok biomechanikai vizsgálatokhoz a jól ismert Cox-metódust<sup>136</sup> alkalmaztuk, a méréseket a Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézet haemodinamikai laboratóriumában végeztem.

A vénákat sztereomikroszkóp alatti óvatos preparálással készítettük elő a mérésre, eltávolítva a kötő- és zsírszövetet. Ezután 37 °C-os nKR szervfürdőbe helyeztük, amiben 95% O<sub>2</sub> és 5% CO<sub>2</sub> gázkeveréket buborékolattunk. Az *angiométer* szervfürdőjében a szegment mindkét végét kanuláltuk, majd az eredeti (relaxált) hossz 10%-ával nyújtottuk, hogy a fiziológias *in vivo* axiális hosszt szimuláljuk. Az intraluminális nyomást egy infúziós pumpa (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)

és egy rezervoár segítségével állítottuk be az adott értékekre. A szegmentum középső részét egy videomikroszkóppal hoztuk látótérbe, ami egy Leica mikroszkópból, egy Philips analóg videokamerából és Cole-Palmer száloptikából épült fel. A szegmentum képe megjelent a képernyőn, majd az egyes mérési pontok kézi beállításával az érszakasz külső és belső átmérője mérhetővé vált egy analóg minikomputer segítségével. A kalibrációkat Wild mikrométer segítségével végeztük. A 2. ábra a mérési berendezést mutatja, a 3. ábra a szervfűrdőről készült közeli felvétel, ahol a bal oldali kanül egy mikroerőmérőhöz rögzített, amit az axiális kezdő feszülés beállítására használtunk.



2. ábra

*A mérési berendezés fényképe.*

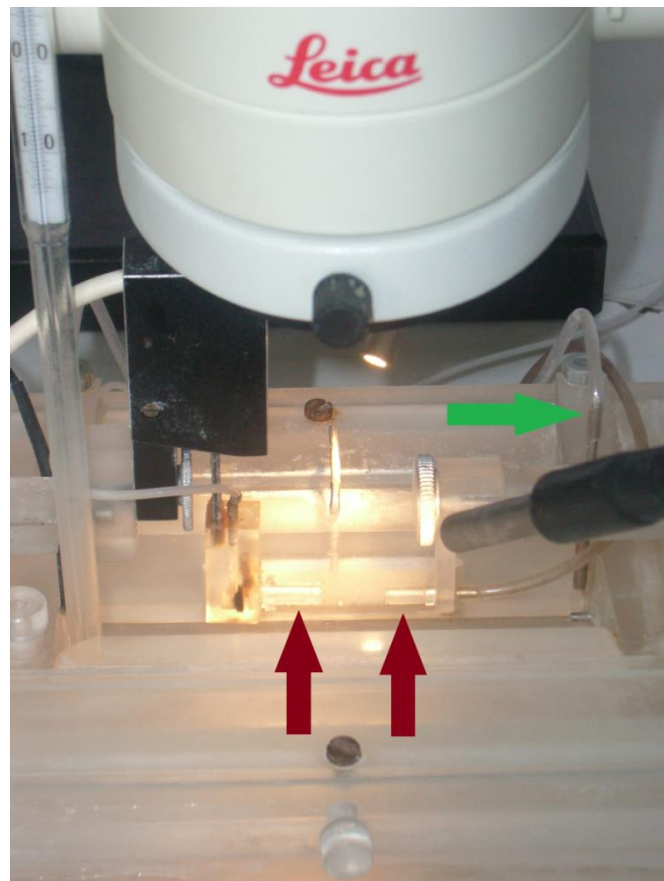
*1-monitor; 2-analóg minicomputer; 3-thermometer; 4-micro erőmérő;  
5-a szervfűrdő thermostatja; 6-analóg videokamera; 7-mikroszkóp;  
8-az angiometer szervfűrdője; 9-reservoár; 10-száloptika;  
11-digitalis nyomásmérő; 12-infúziós pumpa*

Az érszakaszok első lépésben preinkubáción estek át 30 percen keresztül 10 Hgmm-es intraluminális nyomáson. Ezt követően a nyomást lépésről lépésre 7,5

Hgmm-ként emeltük 0-85 Hgmm között, minden egyes nyomáslépcsőn 2 percnyi egyensúlyozás után olvastuk le a külső átmérőt jelölő mérési pontok távolságát.

A maximális aktív kontrakció elérése érdekében a mérési folyamatot megismételtük  $10\mu\text{M}$  norepinephrin jelenlétében, valamint  $\text{Ca}^{2+}$  mentes Krebs-Ringer oldatban a teljes relaxációt kiváltva 150 Hgmm eléréséig. A második és a harmadik mérési folyamatot megelőzte 10 perc 15 Hgmm-es nyomáson történő előinkubáció, ahol a szervfürdő összetételét az előbb leírtak szerint változtattuk. Így a mérési pontok regisztrációját az első, ill. második mérési folyamatban: 0-3-10-18-26-33-41-49-56-64-72-79-87 Hgmm intraluminális nyomásértéken, míg a harmadikban ezen kívül: 94-102-110-117-125-133-140-148 Hgmm nyomásértékeken is elvégeztük.

Végezetül nyomáspróbát hajtottunk végre 300 Hgmm-es nyomáson, és regisztráltuk az esetleges érfali szivárgást.



3. ábra

*Közele felvétel az angiométer szervfürdőjéről.  
a piros nyilak a graftot rögzítő kanülöket mutatják, a zöld  
nyíl a szervfürdő oxigenizálását szolgáló csőre mutat*



### 3.3 Biomechanikai számítások

A belső átmérő méréséhez egy speciális szálóptikát használtunk, de ezt nem regisztráltuk minden egyes mérési pontnál. Emiatt a belső átmérő értékére a külső átmérő változásaiból következtettünk, az érfal isovolumetriás tulajdonságából kiindulva.

A tangenciális feszülést a Frank-Starling egyenlőség alapján számítottuk ki:

- $\sigma = p * r_i / h$

$p$  az intramuralis nyomás, az  $r_i$  a belső sugár, a  $h$  pedig az érfal vastagsága.

Kiszámoltuk az inkrementális disztenzibilitást:

- $D_{inc} = \Delta V / (V * \Delta p)$

$D_{inc}$  az inkrementális disztenzibilitás,  $\Delta V$  a lumen térfogatának változása a  $\Delta p$  mértékű nyomásváltozása a  $V$  kiindulási térfogathoz viszonyítva.

Az inkrementális elasztikus modulust a következő egyenlet felhasználásával számoltuk:

- $E_{inc} = 2r_i^2 * r_o / (r_o^2 - r_i^2) * (\Delta p / \Delta r_o)$

$r_i$  és az  $r_o$  az érfal belső és a külső sugara,  $\Delta r_o$  pedig a külső sugár változása a  $\Delta p$  nyomásváltozás hatására.

A norepinephrinnel végzett mérések során a létrejövő kontrakciót minden egyes nyomásértéken a belső átmérő teljesen relaxált állapothoz viszonyított százalékos változásként értékeltük.

A statisztikai értékelést egy és kétváltozós ANOVA-val végeztük, illetve egyes esetekben a korrelációs koefficiens is meghatároztunk. A  $p < 0,05$  értéket fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak.

### 3.4 Morfológiai módszerek

A biomechanikai feldolgozás kiegészítéseként a Semmelweis Egyetem Igazságügyi és Biztosítás-orvostani Intézetének segítségével a különböző módszer szerint tárolt minták rutin szövettani feldolgozására és értékelésére is sor került. A szövettani mintákat 10%-os pufferolt formalinban rögzítettük, ezt követően rutin feldolgozás szerint paraffin beágyazás után 4µm vastagságú metszetek készültek.

A metszetek morfológiai értékeléséhez az alábbi festési eljárásokat használtuk:

- *Hematoxilin–eosin (HE) festés*: általános, áttekintő jellegű festés, a szövet minden részét megfesti, nem maradnak festetlen területek. A hematoxilin a sejtmagokat, bazofil struktúrákat kékes, lilás színűre festi, míg az eosin általános citoplazma kontrasztfestést ad, ami halványpiros, rózsaszín.
- *PTAH (phosphotungstic acid haematoxylin)*: foszforvolfrámsavas-hematoxilin festés hasonló szíkontrasztot képez, mint a hematoxilin-eosin, mivel a foszforvolfrámsav a szövetek fehérjéihez kötődik. Különböző laesiokban fellelhető fibrin, izomtumorok, idegrendszeri gliózis kimutatására használják. Az izomszövetet kékesfeketére, a kötőszövetet halvány narancssárgás-rózsaszínre, a fibrint sötétkékre, az elasztikus rostokat lilára festi.
- *Trikróm festés*: három különböző festék alkalmazásával történik, ahol az azokármín a magot piros színűre, az alaninkék a kötőszöveti állományt és a kollagént kékre, az orange-G a sejtmagot vörösre vagy narancssárgára festi, és halvány narancssárga háttérfestést ad.
- *Orcein*: A rugalmas vagy elasztikus rostok a kollagén rostoknál jóval vékonyabb, közel egyenletes vastagságú rostok, amelyek rutin festési eljárásokkal nem festhetők, speciális, resorcin-fuchsin vagy orcein festéssel tehetők láthatóvá. Rugalmas rostok a kötőszövetekben mindenhol előfordulnak, különösen ott, ahol a szervek működés közben erős alakváltozáson mennek keresztül.

A morfológiai értékelésen túl célul tűztük ki a különböző körülmények között tárolt érgraftok szöveti intaktságának vizsgálatát. Ennek fontos funkcionális jellemzője a vascularis permeabilitás, ami a vas-kolloid (Ferrlecit<sup>®</sup>) érfalba történő diffúziójával vizsgálható.<sup>137</sup> A Ferrlecit<sup>®</sup> nátrium-vas (III)-glükonát komplex formájában forgalmazott vaspótló készítmény, stabil makromolekuláris komplex, aminek gél kromatográfiával mért molekuláris tömege 289,000-440,000 Dalton közé esik. A komplex negatív töltésű, szabad Na<sup>+</sup> ionokat tartalmazó alkalikus oldatban, az oldat a mélyvörös színe a vas-oxid kötésekből adódik.



A lúgos kémhatású, magas (20%) sucrose tartalmú vizes oldat 12,5 mg/ml elemi vasat tartalmaz nátriumsó-szénhidrát komplex formában. Tartalmaz továbbá 9 mg/ml benzil-alkoholt, mint inaktív alkotórészt.

A különböző csoportokból való festeni kívánt specimeneket szobahőmérsékletű 25%-os Ferrlecites fiziológiás sóoldatba merítettük, és 60 percen keresztül inkubáltuk, majd fiziológiás sóoldattal történő öblítés után – a korábban leírtak szerint – 10%-os pufferolt formalin oldatban rögzítettük.

- *Perls-féle berlini-kék reakció:* Fe<sup>+++</sup> (ferri)-ionok kimutatása használatos érzékeny reakció. Perls 1867 óta használt eljárásával a sejtekben kötött formában organikus molekulákba épülve előforduló ferri ionok sárga vérlúgsóval (kálium-hexacianoferrát-II) sötétkék csapadékot, azaz berlini-kéket (vas-II-hexaciano-ferrát) képezve reagálnak. A ferri ionok kimutathatóságának előfeltétele, hogy azokat a reakcióba vitel előtt fel kell szabadítani a szerves kötéseikből, ezért a metszeteket 10%-os HCl-ben előkezeltük.

### 3.5 Koagulációs vizsgálatok konvencionális vascularis graftokon és a bakteriális cellulózon: a thrombin és az aktivált XII. faktor keletkezésének mérése

A munkánk során olyan új módszert fejlesztettünk ki, amely alkalmas a vascularis graftok (pro)koaguláns tulajdonságainak vizsgálatára, valamint a bakteriális cellulóz és a leggyakrabban használt graftok PET (Dacron®) és ePTFE (GORE-TEX®) felszíni tulajdonságainak összevetésére. Ehhez a thrombin termelődési módszert (thrombin generation assay)<sup>138</sup> modifikáltuk, adaptáltuk, hogy a felszín-indukált koagulációt mérhessük. Továbbá egy vizualizációs módszerrel, a vizsgált felszínen meginduló koagulációs folyamatok láthatóvá tételére és kiértékelésére egy egyszerűsített színkódolt módszert alkalmaztunk.

A választott graftokból 7 mm átmérőjű körlapokat vágunk ki, amelyeket 96 lyukú lapos aljú enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tálcákba helyeztük a lumen felülettel felfelé. A vizsgálni kívánt felszíneket egy előkezelt gyűrűvel a fenékhez rögzítettük. A mérések során gumi és szilikon gyűrűket teszteltünk, melyeket vagy a Corline módszer<sup>139</sup> szerint előkezeltünk, vagy vékony vaseline réteggel vontunk be. A thrombin képződési kísérlet a Hemker által korábban leírt módszer szerint történt,<sup>138</sup> azzal a különbséggel, hogy itt nem alkalmaztunk hozzáadott szöveti faktort vagy foszfolipid aktivátort, hanem a jelen levő érplátó anyag egységnyi felszíne aktiválta a koagulációt. A vizsgálatra előkészített ELISA tálcát a 4. ábra szemlélteti.

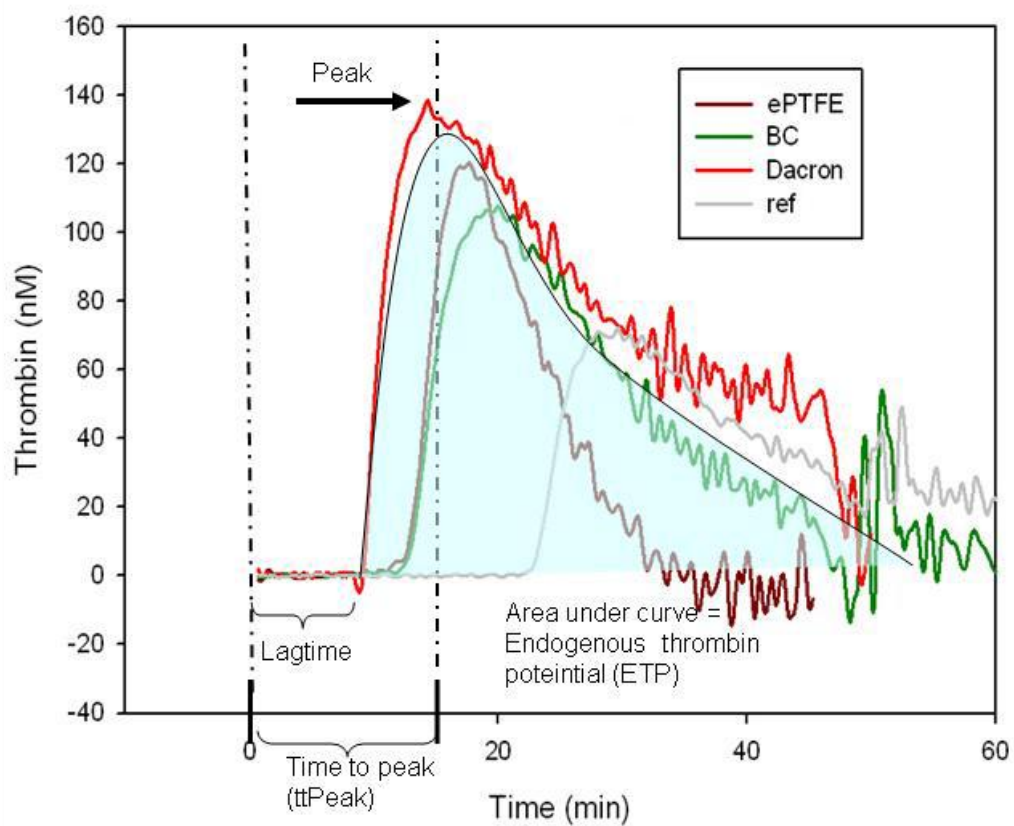
Dac	Dac	Dac	Dac	Dac	Dac	Dac	Dac	Dac	Dac	Dac	Dac
ePTFE	ePTFE	ePTFE	ePTFE	ePTFE	ePTFE	ePTFE	ePTFE	ePTFE	ePTFE	ePTFE	ePTFE
BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC
Dac	Dac	Dac	Dac	Dac	Dac	Dac	Dac	Dac	Dac	Dac	Dac
ePTFE	ePTFE	ePTFE	ePTFE	ePTFE	ePTFE	ePTFE	ePTFE	ePTFE	ePTFE	ePTFE	ePTFE
BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC
Oring	Oring	Oring	Oring	Oring	Oring	Oring	Oring	Oring	Oring	Oring	Oring
Empty	Empty	Empty	Empty	Empty	Empty	Empty	Empty	Empty	Empty	Empty	Empty

4. ábra

*Az ELISA tálcák előkészítésének vázlatja.*

*A vizsgálni kívánt graft felszínek: Dac-(Dacron®), ePTFE, BC, Oring-graft felszín nélküli kezelt rögzítő gyűrű, Empty-üresen hagyott fehér-vazelin, sárga-heparin előkezelt gyűrűvel történt rögzítés, a négy szín a 4 egészséges önkéntes plazmamintáját jelzi*

Minden mintához 80  $\mu$ l centrifugált vérplazmát (platelet-free plasma – PFP) és 20  $\mu$ l foszát pufferolt sóoldatot (phosphate buffered saline PBS) mértünk. Minden mintához tartozott egy kalibráció is, ami 80  $\mu$ l PFP és 20  $\mu$ l Thrombin Calibrator (Throbinoscope BV, Hollandia) együtteséből tevődött össze. Ezeket és a kontrollként használt, grafffelszín nélküli, kezelt gumigyűrűt tartalmazó mintákat is együtt futtattuk. A thrombin termelés megindításához Fluo-puffert (Throbinoscope BV) fluoreszcens szubsztráttal Z-Gly-Gly-Arg-AMC (Bachem, Bubendorf, Switzerland) kevertünk össze DMSO-ban, majd ebből a keverékből 20  $\mu$ l adtunk minden egyes mintához. Minden mérésnél 3-szoros mintaszámmal dolgoztunk. A keletkező thrombin mennyiségével arányosan változott a mérhető, hasított szubsztrát mennyisége. A fluoreszcenciát spektrofotométerrel (excitáció:390nm és emisszió:460nm hullámhosszértéken) mértük 20 másodpercenként, 37 °C-on. Meghatároztuk a thrombin keletkezés megindulásáig eltelt időt (lag time), az endogén thrombin potenciált (ETP), azaz összes keletkezett thrombint, amit a kapott görbe alatti terület számolásával kaptunk. Meghatároztuk továbbá a thrombin keletkezésének maximális sebességét (peak) és az addig eltelt időt (time to peak). A mért illetve számolt paramétereket az 5. ábra szemlélteti.



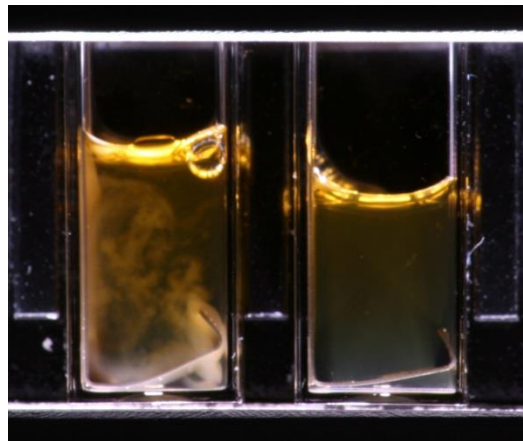
5. ábra

*A thrombogram a thrombin keletkezésének időbeni lefutását mutatja egységnyi felületű vizsgált graffok jelenléte mellett az idő függvényében lila-ePTFE, zöld-BC, piros-Dacron<sup>®</sup>, szürke-referencia*

Az előbbieken leírt módszerrel mértük a grafftelszínen keletkező aktivált XII faktor mennyiségét is, azzal a különbséggel, hogy itt a fluorescens szubsztrát Boc-Gln-Gly-Arg-AMC (Bachem, Bubendorf, Switzerland) volt, amit hasonló módon DMSO-ban keverve adtunk a citrátos PFP-hez. Ennél a mérési sorozatnál 4-szeres mintaszámmal végeztük a fluorometriás mérést.

A különböző grafftelszíneken indukált koaguláció mérésére és összehasonlítására a korábban leírt módszer szerinti véralvadás láthatóvá tételével nyílt lehetőségünk.<sup>140</sup> Így a koaguláció iniciatív, illetve propagációs fázisának összehasonlítása is megvalósult.

Annak érdekében, hogy a 4,5 ml-es spektrofotometriás (polymethylmethacrylate -PMMA) küvettába (Kartell, Italy) töltött vérplazma (PFP) kizárólag a grafft luminális felszínével érintkezessen, a szerző által tervezett acélrögzőtőket készítettünk. A rögzőtőket 0,1% (w/v) poly-L-lysine vizes oldattal (Sigma-Aldrich) kezeltünk a gyártó leírása szerint, ezzel elkerülve a koaguláció acélrögzőtő általi aktiválását.<sup>141</sup> (6. ábra)



6. ábra  
Kezeletlen(bal) és poly-L-lysine kezelt(jobb)  
acélrögzőtők vérplazmában.

Első lépésként a PFP kalciumtartalmának visszaállítása történt  $\text{CaCl}_2$  hozzáadásával a 17,4 mM végső koncentrációig, ezt követően 2 ml plazmát mértünk minden küvettába. A küvettákat fehér fényt kibocsátó LED lápasorral világítottuk meg alulról.

Digitális fényképezőgéppel frontális ún. time-lapse felvételeket készítettünk párhuzamosan az összes vizsgált mintáról 15 másodpercenként összesen 200 percen keresztül. A regisztrációt 37 °C-on végeztük. A képeket ezután számítógépre átvittük és szekvenciát (gyorsított felvételt) készítettünk belőle. A koaguláció detektálását a vérplazmában jelentkező fényintenzitás erősödés alapján végeztük, ami az oldhatatlan fibrin hálózat mennyiségével volt arányos. A fényintenzitás alapján egy egyszerűsített szinkódolás történt, így láthatóvá téve a koaguláció térbeli és időbeli eloszlását. Az egyes fényképek analizálásával számoltuk a felszíni koagulációs időt (iniciatív), majd ezt követően a vérplazma (felszíntől távolabb eső) koagulációját (propagáció).

A legtöbb koagulációs folyamatot vizsgáló módszer a véralvadást mértékét egy térfogatra vonatkoztatva vizsgálja, figyelmen kívül hagyva, hogy hol kezdődött az aktiváció, illetve hogy abból a pontból milyen kinetikával történt a véralvadás propagációja. A fent leírt módszerrel ezek jól meghatározhatók, és fontos információval szolgálhatnak a továbbiakban a vér és az idegen felszínnek interakciójának vizsgálataiban. A 7. ábra a time-lapse fényképezésre előkészített küvettákat ábrázolja, a három vizsgált érpótlóanyag beillesztése és rögzítése után.



7. ábra

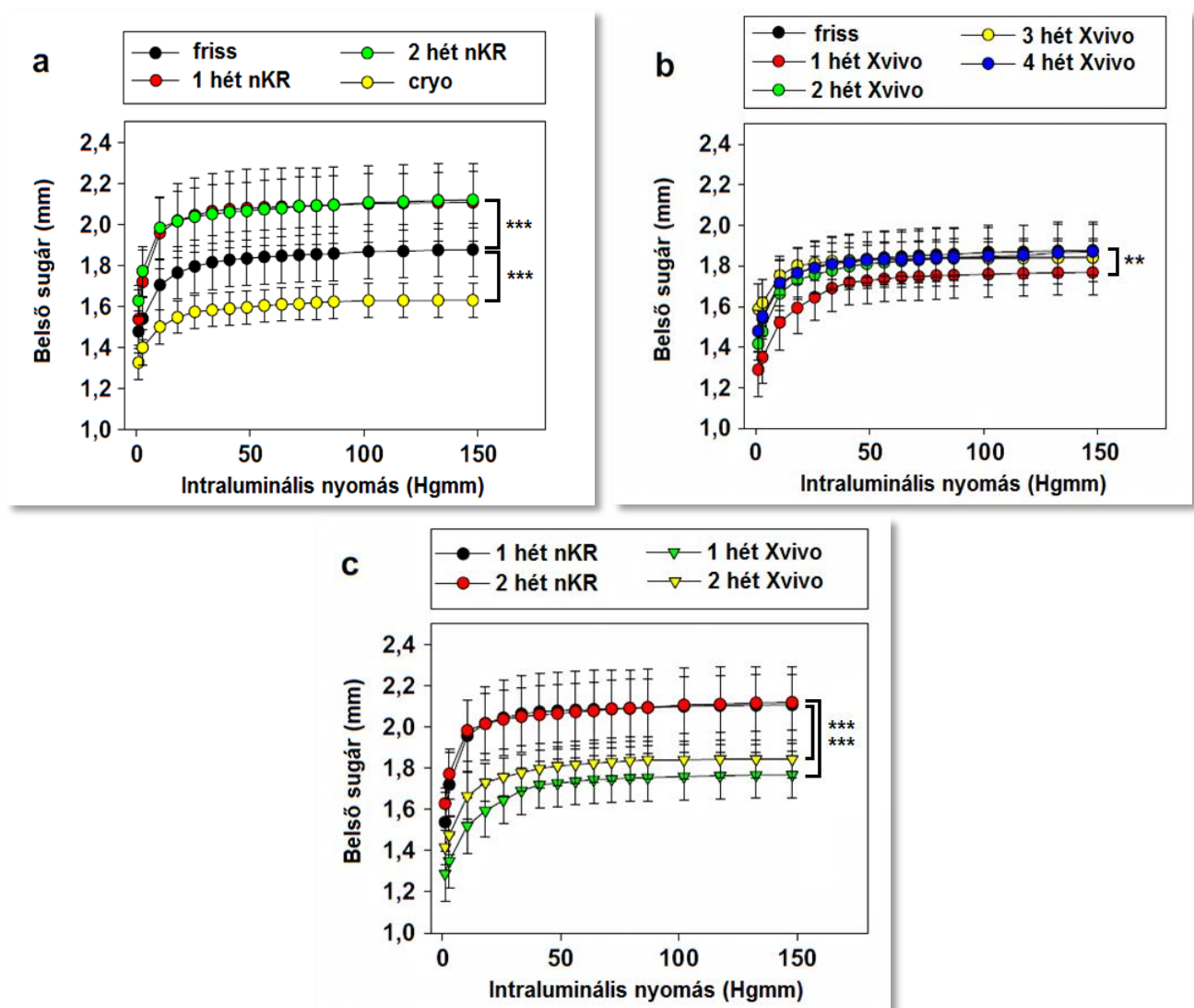
*PMMA küvetták mérésre előkészítve balról jobbra:  
PET (Dacron<sup>®</sup>), BC, ePTFE(GORE-TEX<sup>®</sup>)*

## 4. Eredmények

### 4.1 A vena saphena magna biomechanikai változásai

A tárolás során bekövetkező eltéréseket az aktív és passzív biomechanikai tényezők változásán keresztül követtük nyomon, illetve értékeltük.

A nKR-ben 4°C-on történt tárolás tágulást idézett elő az ellazult (relaxált) állapotban lévő érszegmentekben, ugyanakkor a falvastagság nem változott. A 8. ábra a különböző ideig más-más médiumban tárolt friss, illetve krioprezervált minták nyomás-átmérő görbéit mutatja.



8. ábra

Eltérő módon tárolt VSM szegmentumok geometriai tulajdonságainak változásai különböző összehasonlításokban, a szegmentumok belső sugár – intraluminális nyomás jelleggörbéi alapján.

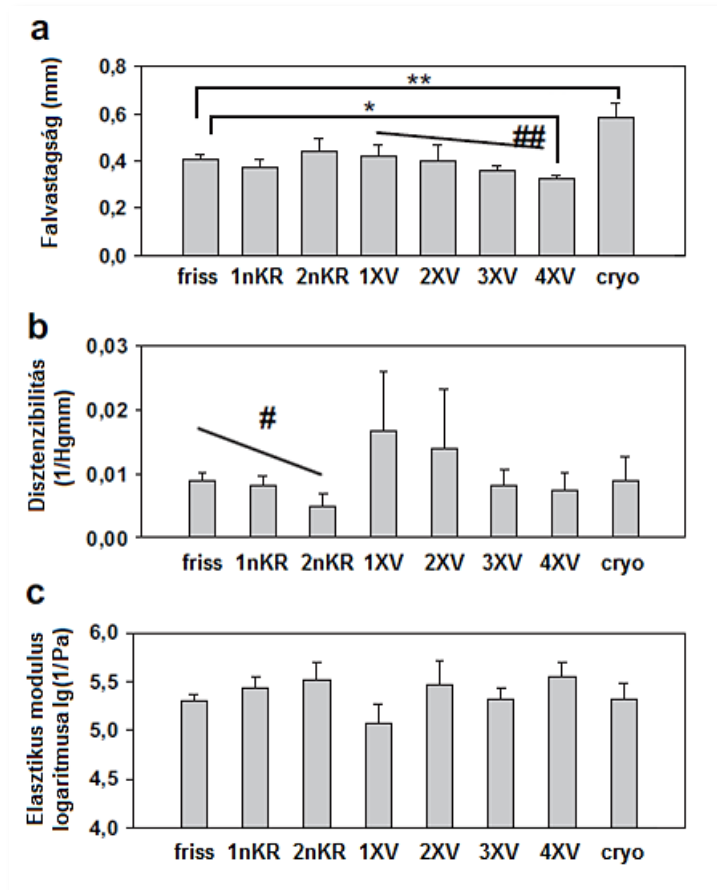
a, friss, 1,2 hét nKR tárolt és krioprezervált minták jelleggörbéi.

b, friss és különböző ideig X-VIVO™10 oldatban tárolt minták jelleggörbéi

c, különböző oldatokban 1,2 hétig tárolt graftok jelleggörbéinek összehasonlítása (kétváltozós ANOVA \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001)



Mind az nKR-ben tárolt átmérő-növekedés, mind a krioprezervált mintáknál mért kisebb szegmentátmérő a friss (kontroll) csoporthoz képest szignifikáns ( $p < 0,001$ ) eltérést mutatott: A kontroll csoport belső átmérője  $1,70 \pm 0,12$  mm volt 10 Hgmm nyomásértéken, míg a tárolási időszak végére nKR oldatban  $1,98 \pm 0,15$  mm-re emelkedett. (8/a. ábra) Ugyanakkor a falvastagságuk nem változott számottevően. (9/a. ábra) Mérsékelt, de statisztikailag szignifikáns csökkenés mutatkozott az izobárikus disztenzibilitás ( $8,9 \pm 1,3 \times 10^{-3}$  szemben  $4,9 \pm 1,9 \times 10^{-3}$  1/Hgmm) tekintetében kéthetes tárolás után. (9/b. ábra) Ugyanakkor az elasztikus modulus változatlan maradt. (9/c. ábra) A maximális koncentrációjú norepinephrinnel kiváltott kontrakciós képesség közel teljes mértékben megszűnt 1 hetes nKR oldatban végzett tárolás után a friss szegmentumokhoz viszonyítva,  $1,6 \pm 0,8\%$ -ra csökkent a kiindulási  $10,1 \pm 1,5\%$  értékről,  $p < 0,01$ .



9. ábra

*A falvastagság és a véna graftok elasztikus tulajdonságainak változásai különböző tárolási feltételek esetén.*

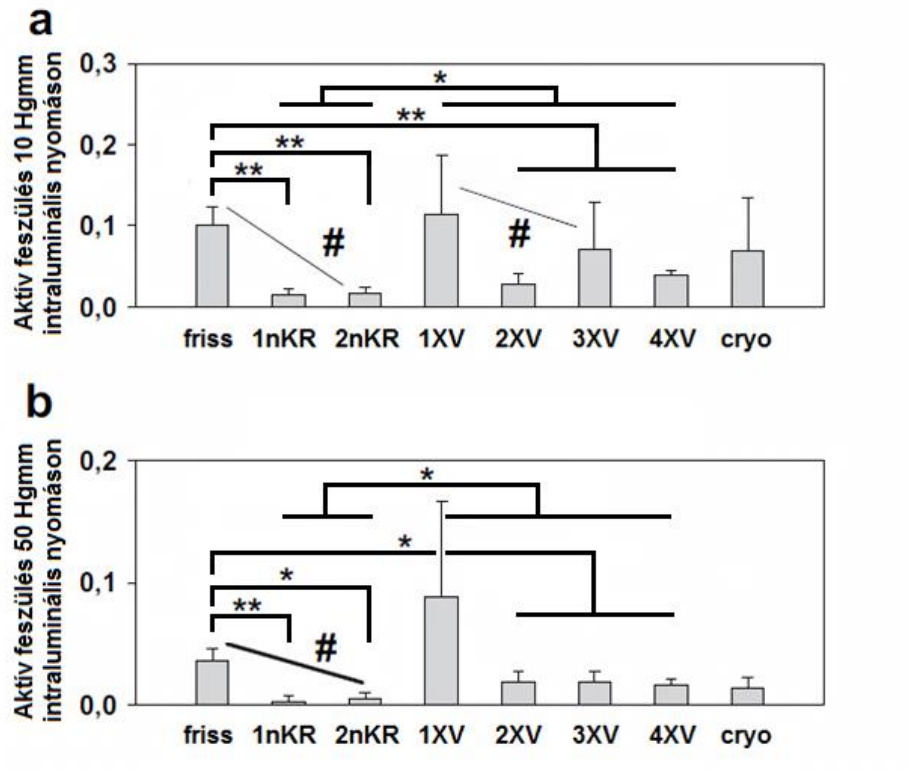
a, A falvastagság értékei 10 Hgmm intraluminális nyomáson

b, Inkrementális disztenzibilitás 15 Hgmm intraluminális nyomáson

c, Inkrementális elasztikus modulus logaritmusa 15 Hgmm intraluminális nyomáson

Friss, 1 és 2 hétig 4 °C nKR-ben (1nKR, 2nKR), 1,2,3 és 4 hétig 4 °C X-VIVO™ 10-ben tárolt (1XV, 2XV, 3XV, 4XV), ill. krioprezervált (cryo) minták esetén. (egy változós ANOVA \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; statisztikai differencia a korrelációs koefficiens szignifikancia szintjében # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ )

Felolvasztás és inkubáció után a *krioprezervált minták* csökkent lumen átmérőt és megnövekedett falvastagságot mutattak ( $586 \pm 56 \mu\text{m}$ ), szemben a kontroll csoportban mérttel ( $408 \pm 17 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.01$ ) relaxált szegmentumok esetén, 10 Hgmm intraluminális nyomáson. Ezek a minták elasztikus tulajdonságaikat jórészt megőrizték és a kontrakciós képességüket sem veszítették teljesen el. (9/a. és 10/c. ábra)



10. ábra

*Különböző módon tárolt VSM szegmentumok kontrakciós tulajdonságainak változása két nyomásszinten*

a, 10 Hgmm intraluminális nyomáson; b, 50 Hgmm intraluminális nyomáson

Friss, 1 és 2 hétig 4 °C nKR-ben (1nKR, 2nKR), 1, 2, 3 és 4 hétig 4 °C X-VIVO™ 10-ben tárolt (1XV, 2XV, 3XV, 4XV), ill. krioprezervált (cryo) minták esetén. (egy változós ANOVA \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; statisztikai differencia a korrelációs koefficiens szignifikancia szintjében # $p < 0,05$ )

A szövetkultúra médiumban tárolt vénaszakaszok biomechanikai tulajdonságai szignifikánsan különböztek az nKR oldatban tárolt szegmentektől. A tárolás kezdetén átmérő csökkenést tapasztaltunk, szemben az nKR oldatban tárolt szegmentumok dilatatiojával. Az X-VIVO™ 10 tápfolyadékban történő tárolás a lumen méretét a 2-4 hét között nem befolyásolta (8/b. és 8/c. ábra). Figyelemre méltó, hogy a passzív nyomásgörbe 2 hét tárolás után is majdnem tökéletesen egyezett a friss szegmenteknél nyert görbékkel. (8/b. ábra) Ezeknél a mintáknál, ellentétben a mélyfagyasztott szegmentumokkal, a falvastagság fokozatosan csökkent a tárolási idő előrehaladtával (a

korrelációs koefficiens szignifikancia szintje  $p < 0.01$ ). Szemben az nKR oldatban tárolt graftokkal, a TCM-ben tárolt minták elasztikus tulajdonságainak változása nem ért el statisztikailag szignifikáns szintet.

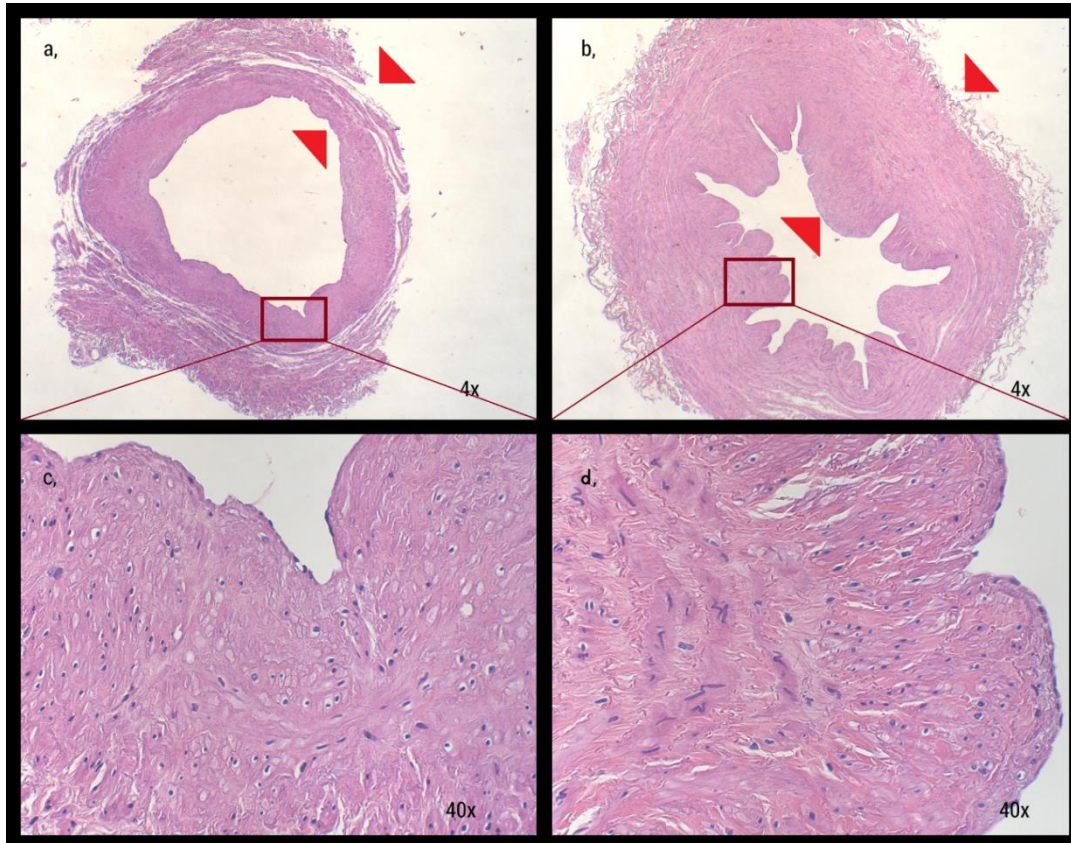
Megállapítottuk azt is, hogy az X-VIVO™ 10-ben tárolt szegmentumok relatíve jól megőrizték a kontrakciós képességüket: ugyan a tárolás során ez folyamatosan csökkent, de a megfelelő nKR szegmentekhez viszonyítva szignifikánsan jobb kontrakciós képességet őriztek meg ( $p < 0,05$ ), mind 10 Hgmm, mind 50 Hgmm intraluminális nyomásértéken. (10/a. és 10/b. ábra)

A tárolási vizsgálatokkal kapcsolatos tapasztalataink alapján elmondható, hogy az első néhány (5-10) tájékozódó biomechanikai tesztelés során nyilvánvalóvá vált, hogy nehéz lesz összehasonlítható adatokat gyűjteni. Ennek magyarázata, hogy az egyes páciensektől származó graftok nagyban eltérő eredményeket mutattak geometriai és biomechanikai tulajdonságaikat tekintve. Az egyéni különbségeket kiküszöbölendő, a kontroll (friss) csoportot úgy határoztuk meg, hogy nagyobb esetszám legyen, míg azoknál a csoportoknál, ahol a kontinuitás feltétele volt a mérési eredmények összehasonlíthatóságának az 1nKR ill. 2nKR továbbá a 1XV – 2XV – 3XV – 4XV csoportokban azonos donortól származó mintákkal dolgoztunk, de ugyanez igaz volt a szövettani mintákra is. Ez értelemszerűen megnehezítette a munkát, mert ritkán került ki a műtőből ilyen hosszúságú kimaradó graft, ugyanakkor a biomechanikai, illetve szövettani összehasonlíthatóság érdekében esszenciális volt.

További nehézséget, ill. problémát jelenthet, ha a graft inficiálódik, ami történhet a kivétel alatt, vagy a műtét végeztével, amikor a műtősnő kiadja a maradék graftot, esetleg a tároló edények nem megfelelő kezeléséből adódóan. A mi tárolási gyakorlatunkban egyszer fordult elő (gombás) fertőzés, igaz a tárolás kezdetétől számított 2 hónap elteltével. A kérdéses specimen jól elkülönült a többi mintától, lévén az X-VIVO™ 10-ben található fenolvörös színe is elhalványult, jelezve a pH változást.

## 4.2 A szövettani feldolgozás

Morfológiai analízis történt friss anyagon 1, illetve 2 héten át 4 °C-os nKR-ben tárolt minták esetén, és protokoll szerint krioprezelvált (négy hétig folyékony nitrogén gőzben tárolt) és felolvasztott minták esetén, továbbá X-VIVO™ 10 tápfolyadékban 1, 2, 3 és 4 hétig tárolt vena saphena magna szegmentumok esetében.



11. ábra

Két betegből A (a,c) B (b,d) származó friss vena saphena magna HE festéssel.

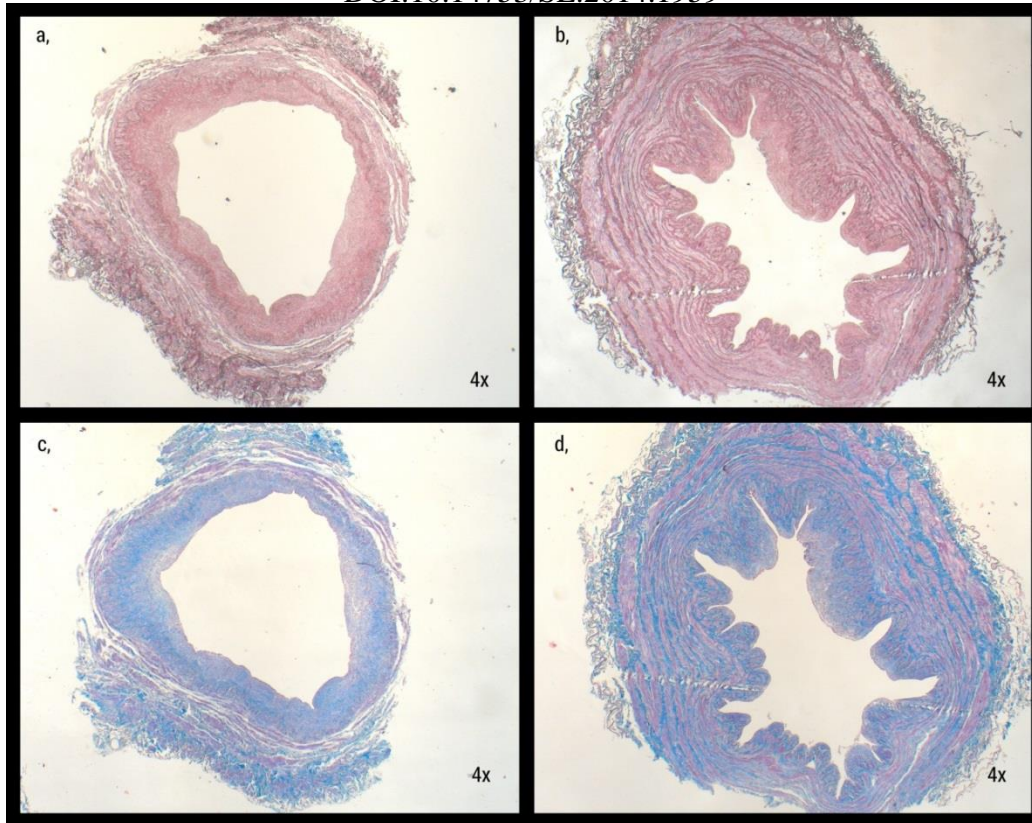
A nyíllal jelölt helyen jól látható a vénafal jelentősen eltérő falvastagsága.

4x-es (a,b), és 40x-es (c,d) nagyítás

A vizsgált vénák nagy egyéni különbségeket mutattak, döntő többségükben az intima kiszélesedése volt megfigyelhető már a friss mintáknál is. A vénafalakban kezdettől fogva megfigyelhető volt a fibrotikus-kötőszövetes átalakulás is.

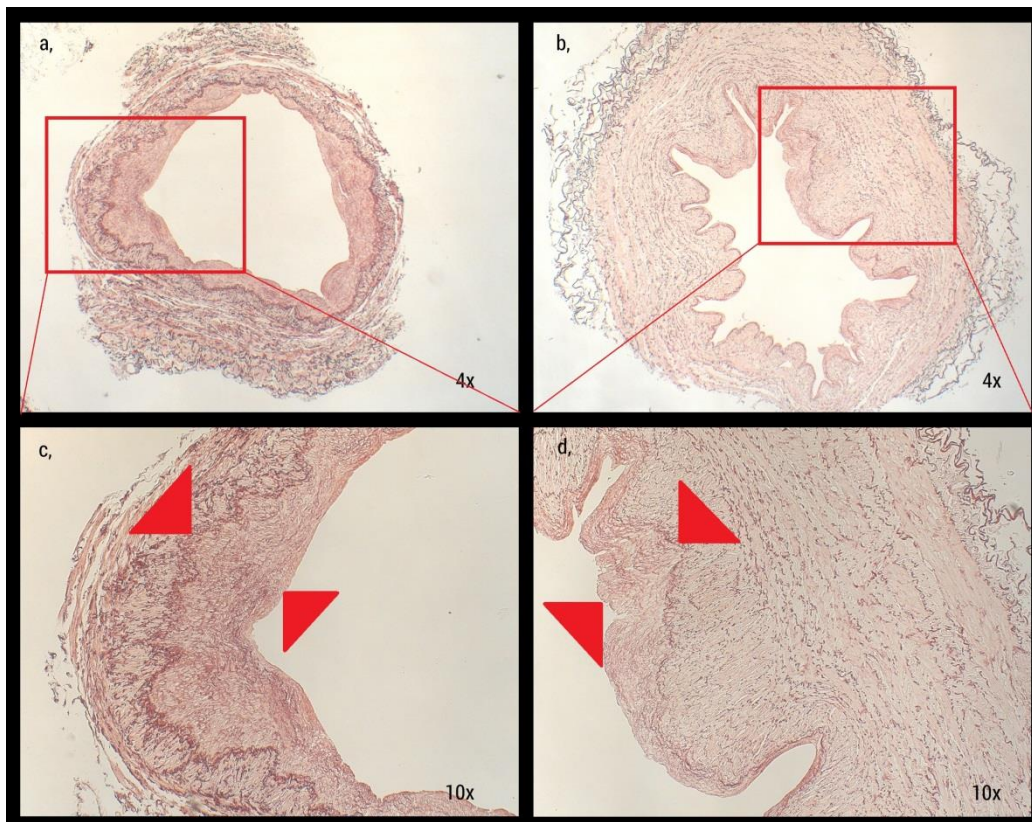
Az erek morfológiai analízise kétféle oldatban kivitelezett tárolás és a fent leírt festés(ek) után történt, ahol az idő függvényében jellegzetes szöveti jelek, elváltozások alakultak ki az érfal károsodását mutatva. Továbbá az idő függvényében a rugalmas rostok károsodása, töredezése is jól követhető volt. Az értékeléshez használt festési eljárásokat a 11-14. ábra mutatja be friss minták esetében.





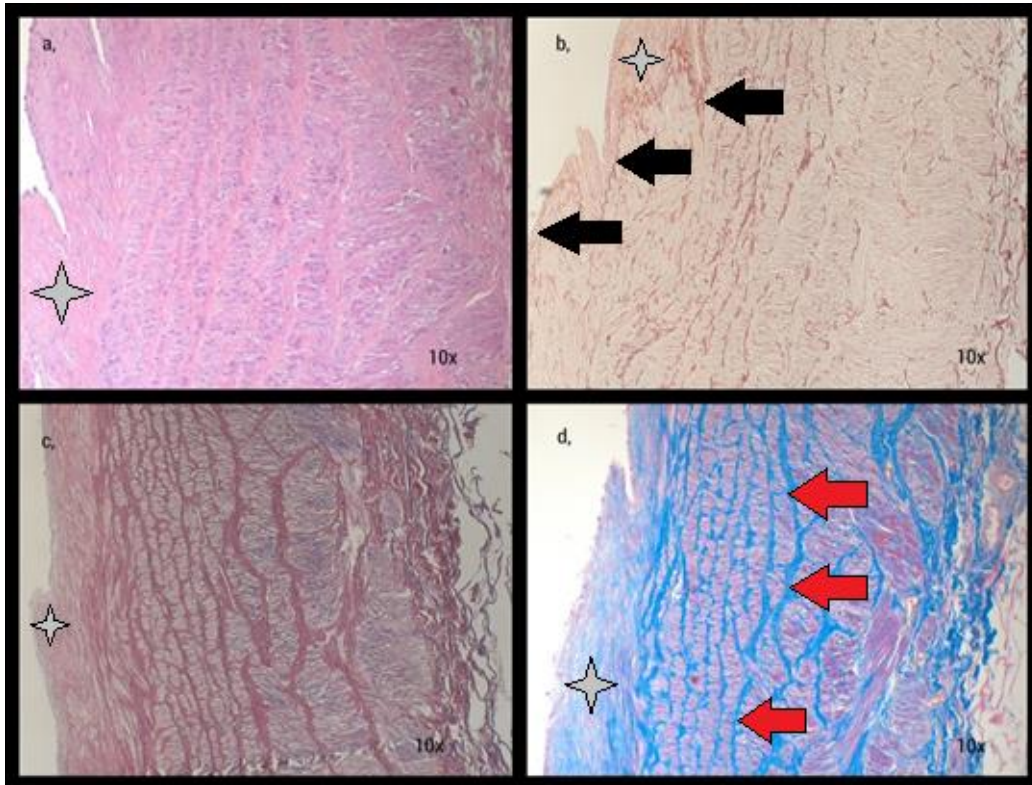
12. ábra

Két betegből A (a,c) B (b,d) származó friss vena saphena magna  
PTAH festéssel (a,b), illetve trikróm festéssel (c,d)  
4x-es nagyításban



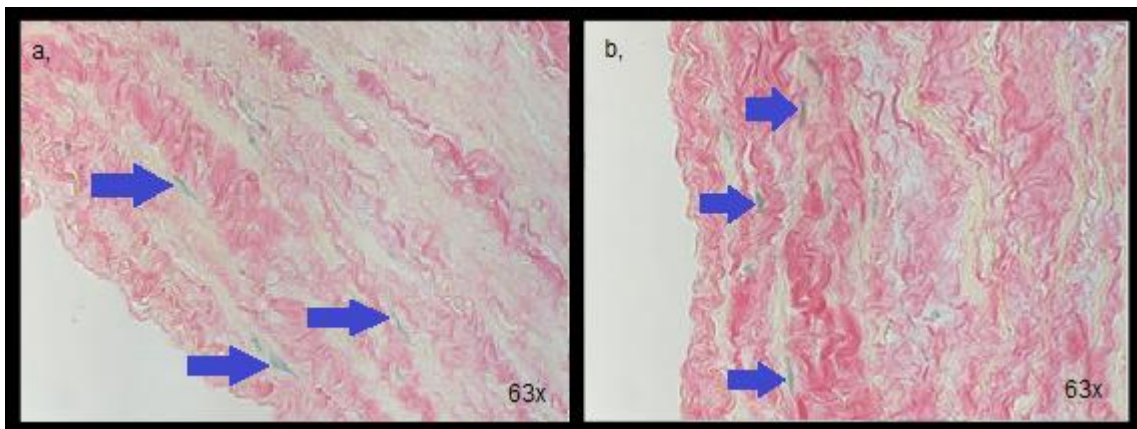
13. ábra

Két betegből A (a,c) B (b,d) friss vena saphena magna orcein festéssel  
Szembetűnő az intima (nyílhegyek közt) gócos kiszélesedése  
4x-es (a,b), illetve 10x-es nagyításban (c,d)



14. ábra

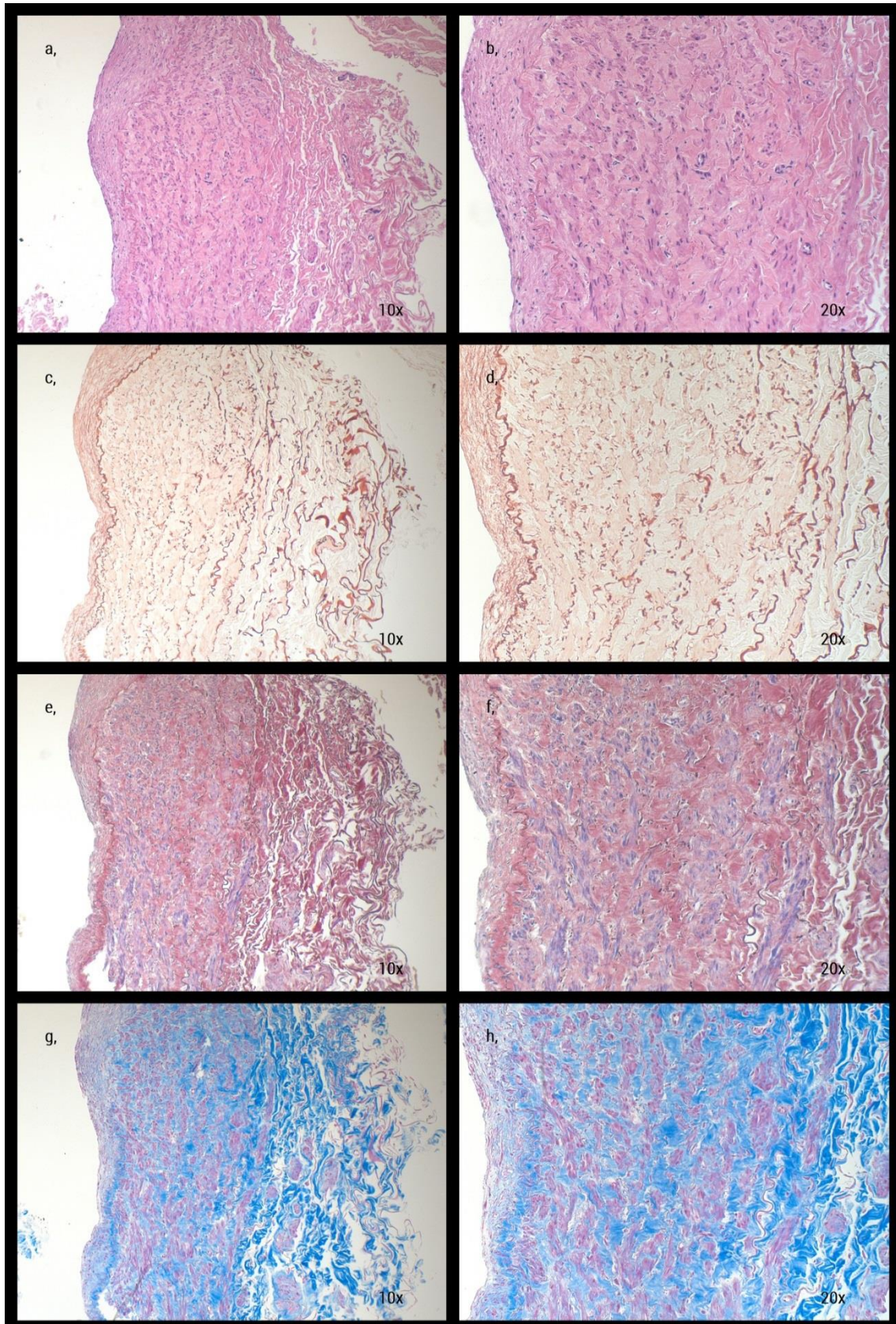
Ugyanazon betegből származó friss vena saphena magna (hosszmetszet) HE (a), orcein (b), PTAH (c) és trikróm festéssel (d), 10x-es nagyításban. Az intima kiszélesedett (csillag), a lamina elastica interna egyenetlen (fekete nyilak). A tunica mediában a simaizomsejtek között kötőszövet szaporulat látható (piros nyilak).



15. ábra

Berlinikék pozitívítás az intimában és a media felső középső rétegében, 63x-os nagyításban.

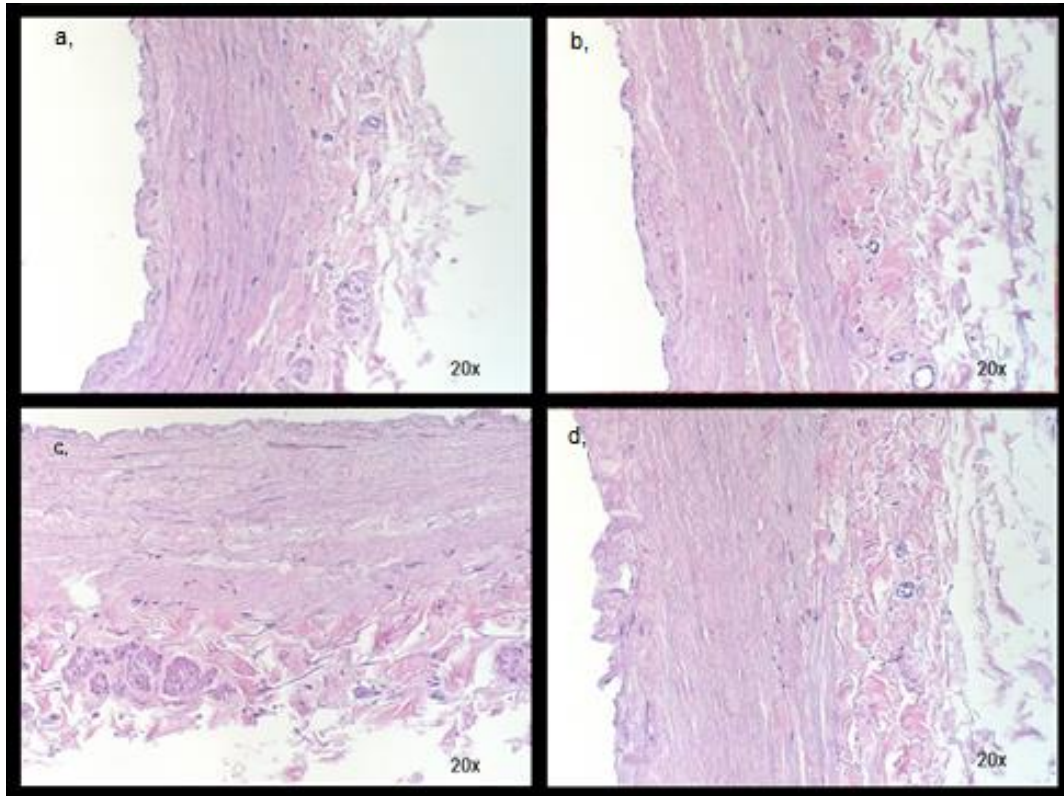




16. ábra

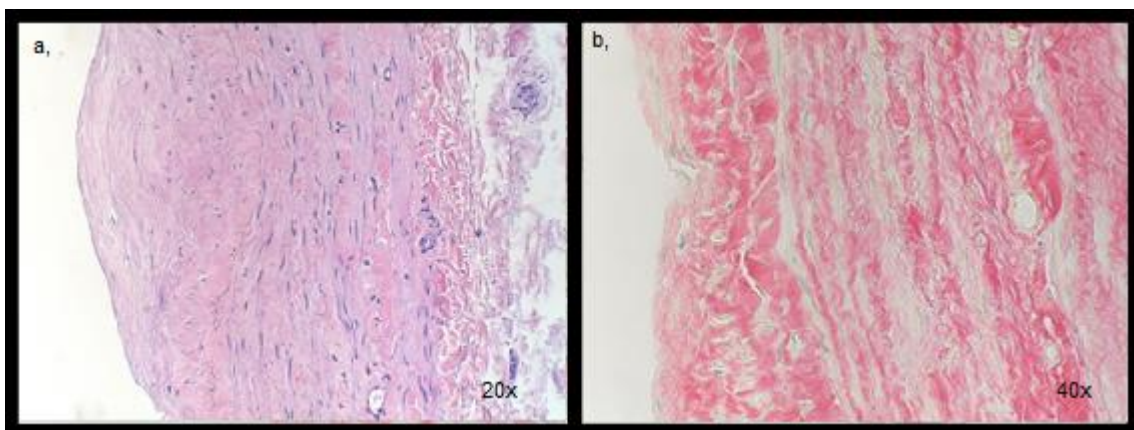
Mélyfagyasztott és felolvasztott VSM minták keresztmetszeti képe  
HE (a,b); orcein (c,d); PTAH (e,f); trikróm festéssel (g,h) 10x és 20x-os nagyításban.  
Az intima körkörösén kiszélesedett, benne fibrotikus plakk, az izomréteg vízenyősen  
fellazult, az izomsejtek között enyhe fibrosis látható.





17. ábra

Ugyanazon betegtől származó X-VIVO™ 10-ben 1 hétig (a), 2 hétig (b), 3 hétig (c), 4 hétig (d) tárolt graftok keresztmetszeti képe HE festéssel 20x-os nagyításban. A tárolás előrehaladtával a media egyneműsödik, a sejtmagok száma csökken, az oedema mértéke a teljes tárolás során alacsony maradt.



18. ábra

nKR oldatban 1 hétig tárolt vena saphena szegmentumok keresztmetszete HE festéssel (a), és berlini-kék reakcióval (b) 20x-os (a) ill. 40x-es (b) nagyításban. Fibrotikus plakk az intimában, enyhe vizenyő a mediában, berlini-kék pozitív szemcsék az intimában és a tunica media felső rétegében.



A morfológiai vizsgálatkor értékeltük az endothel belfelszint (tunica intima), a lamina elastica internat, a simaizom réteget (tunica media), illetve az intramuralis oedema fokát.

A *friss* mintáknál általánosságban elmondható, hogy az intima gócosan enyhén kiszélesedett, egy esetben rekanalizálódó plakkot is megfigyeltünk. A lamina elastica interna egyrétegű, hullámos morfológiájú, az izomréteg megtartott. Helyenként az elasztikus rostok száma megnövekedett, az oedema mértéke enyhe volt. Berlini-kék reakciót csak egyes esetekben tapasztaltunk. (11-14. ábra)

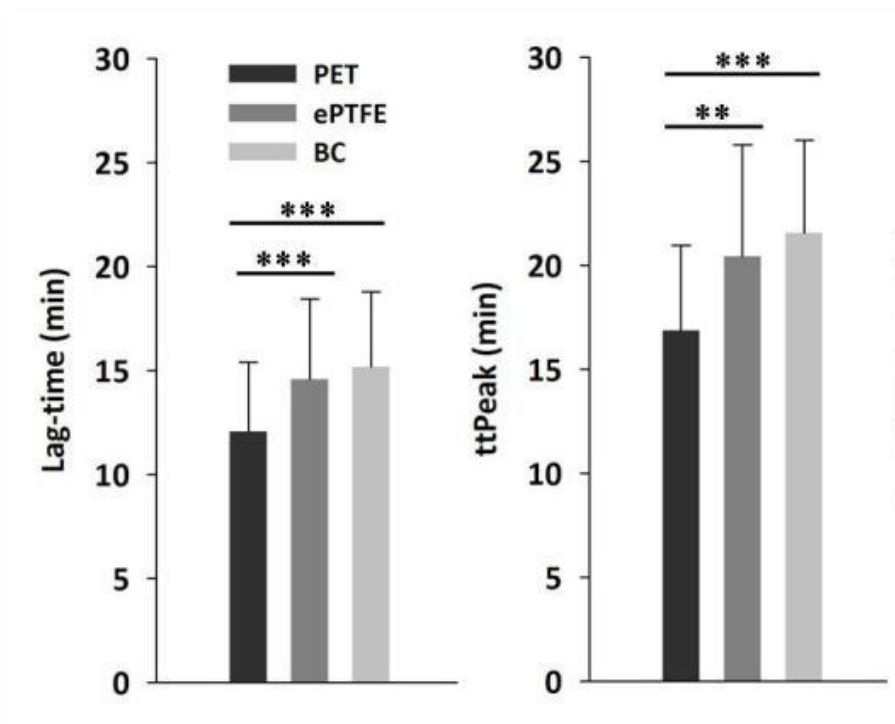
A *nKR* oldatban 1 és 2 hétig hűtve tárolt minták esetén az intima gócosan enyhén vagy mérsékelten kiszélesedett. A rugalmas lemez 1 hét után egyrétegű hullámos morfológiát, míg 2 hét tárolás idő után, több helyen töredezettséget mutatott. A tunica media szerkezete fellazult és benne a simaizomsejtek megnyúltak, az oedema mértéke enyhe vagy mérsékelt volt. A minták többségében értékelhető enyhe illetve mérsékelt berlini-kék reakciót tudtunk kimutatni 1 hetes *nKR* tárolás után a tunica intimában, ami a 2 hétig tárolt mintáknál már a mélyebb simaizomrétegben is kimutathatóvá vált. (15. és 18. ábra)

A *mélyfagyasztott* és *felolvasztott* vena specimenek esetében az intima körkörösén, egyenetlenül kiszélesedett, benne helyenként fibrotikus plakkokkal. A rugalmas lemez helyenként töredezett. A tunica mediában vizenyősen fellazult szerkezetet és az izomsejtek között enyhe fibrosist találtunk. (16. ábra)

Az *X-VIVO™ 10* tápkultúrában hűtve tárolt szegmentumok esetén az intima gócos enyhe kiszélesedést mutatott 1, 2, 3 és 4 hét elteltével is. A lamina elastica interna már 1, illetve 2 hetes tárolás után hullámos, helyenként töredezett morfológiát mutatott, ami 3, illetve 4 hét után egyre halványabban festődött és nehezen volt elkülöníthető. A tunica media egyneműsödő szerkezetet és halvány festődést mutatott az 1, 2, 3 és 4 hetes tárolás után is, a tunica mediában az oedema mértéke mérsékelt volt. Pozitív berlini-kék reakciót tapasztaltunk több vizsgált mintában is. (17. ábra)

### 4.3 Koagulációs vizsgálataink konvencionális vascularis graftokon és a bakteriális cellulózon

A thrombin keletkezés tekintetében azt tapasztaltuk, hogy a BC és az ePTFE esetében szignifikánsan ( $p < 0,001$   $n=13$ ) hosszabb volt a thrombin keletkezéséig eltelt idő szemben a PET mintákkal. A csúcskoncentráció eléréséig eltelt idő vizsgálatokor ugyanez mutatkozott. Továbbá a BC minták esetén tapasztaltuk a legalacsonyabb thrombin csúcskoncentrációt (Peak). Kismértékű, de szignifikáns ( $p < 0,05$ ) különbséget találtunk a PET és az ePTFE között, ahol az ePTFE mutatta a magasabb csúcskoncentrációt a thrombin keletkezés tekintetében (Peak). Az összes keletkezett thrombin mennyiség (ETP) tekintetében szignifikáns ( $p < 0,05$ ) különbséget csak a BC és a PET minták között találtunk. Megjegyzendő azonban, hogy a különböző önkéntesektől származó vérplazma miatt variációk előfordultak a Peak és az ETP tekintetében. A 19. és a 20. ábra a szignifikáns összefüggéseket mutatja.

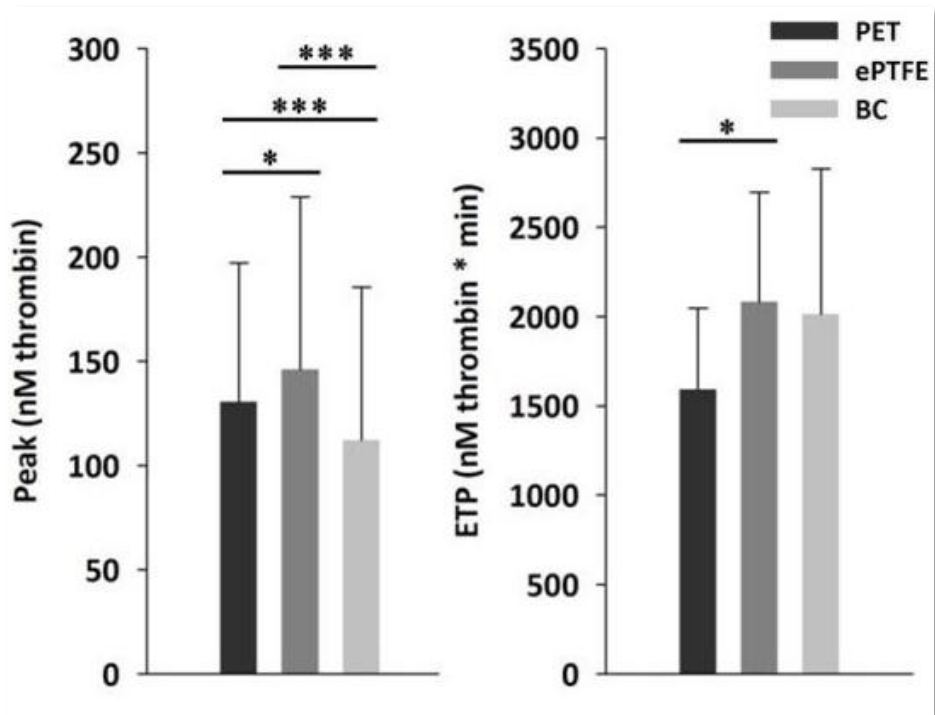


19.ábra

*A thrombin keletkezési kísérlet során a centrifugált vérplazma egységnyi felszínű graftfelszínre reagált (PET, ePTFE és BC). A paraméterek közül a lag time és a time-to-peak (ttpeak) szignifikánsan hosszabbnak bizonyult az ePTFE és a BC felszín esetén összehasonlítva a PET felszínrel.*

*A mérési eredményeket az átlag + egy SD formában ábrázoltuk.*

*\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ,  $n = 13$ .*



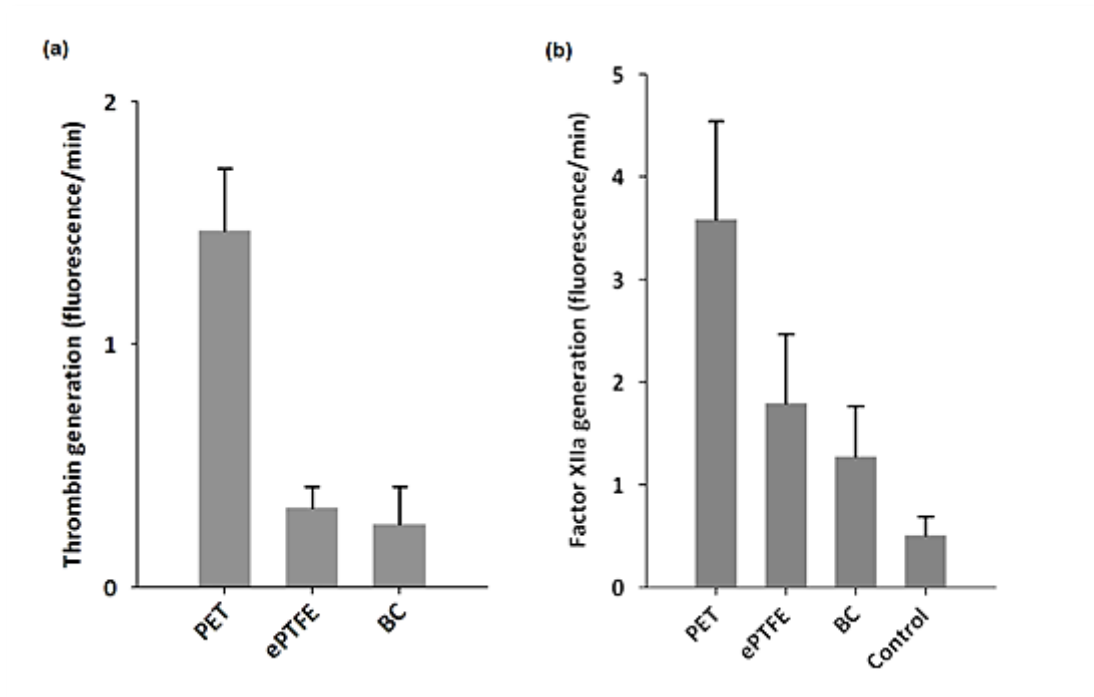
20.ábra

*A keletkezett thrombin csúcskoncentrációja a PET és az ePTFE felszínek esetén szignifikánsan magasabb volt, mint a BC esetén. Az endogén thrombin potenciál (ETP) csak a PET és a BC felszín között mutatott szignifikáns különbséget.*

*A mérési eredményeket az átlag + egy SD formában ábrázoltuk*

*\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ,  $n = 13$ .*

Azoknál a mintáknál, amelyeket heparinnal kezelt gumigyűrűvel rögzítettünk, az immobilizált heparin nagyon erős gátló hatást fejtett ki. Így a thrombin-keletkezés alacsony szintje miatt a Thrombinoscope szoftver nem tudta értékelni, ezért a fluoreszcencia átlagos emelkedési ütemét számoltuk 60 perces időszak alatt. E szerint a PET anyag jelenlétében nagyjából 5x gyorsabban megy végbe a thrombin keletkezése összevetve az ePTFE ( $p < 0,001$ ) vagy BC ( $p < 0,001$ ) graftokkal, amelyek között nincs szignifikáns különbség.

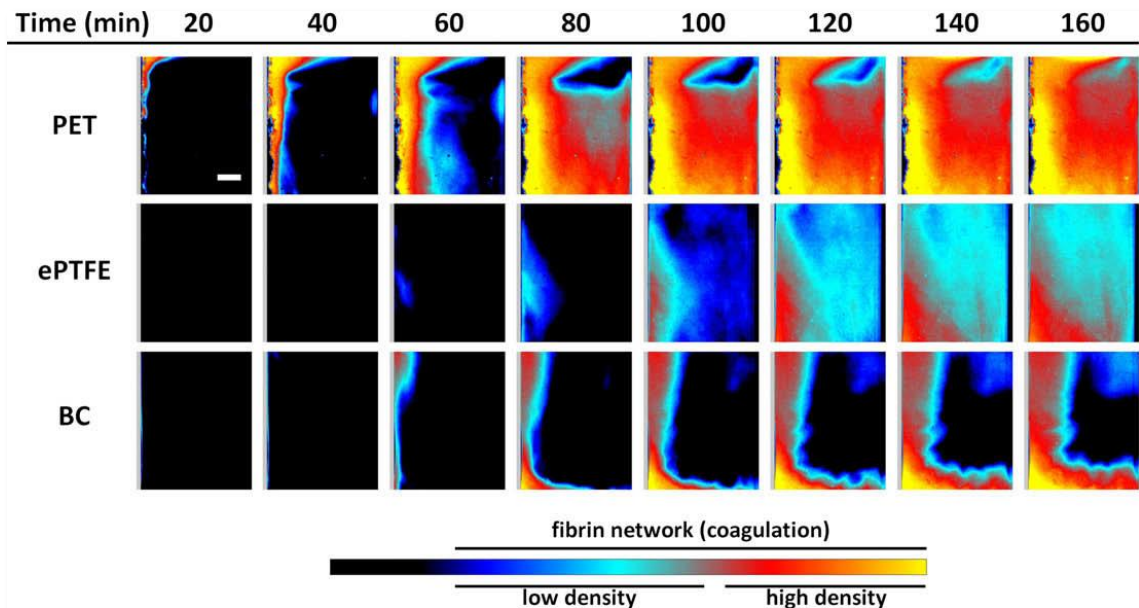


21. ábra

*A thrombin (a) és az aktivált XII faktor (b) keletkezésének üteme 60 perces mérési időszak, heparin kezelt gumigyűrűs rögzítés*

Az aktivált XIIa faktort, az intrinsic véralvadási út kezdő enzimének keletkezését is mértük különböző graftminták felszínén az előzőekkel megegyező módon. A három tesztelt anyag közül a PET felszín aktiválta legnagyobb mértékben a XII faktort, míg az ePTFE ( $p=0,011$ ) sokkal alacsonyabb aktivációs ütemet mutatott és BC ( $p=0,001$ ) a legalacsonyabbat.

A vérplazmában az "idegen" graftfelszín hatására beinduló véralvadási folyamatok vizsgálatát és összehasonlítását, technikailag egyszerű, optikai képrögzítéssel és számítógépes kiértékeléssel végeztük.



22. ábra

*A véralvadás láthatóvá tétele:*

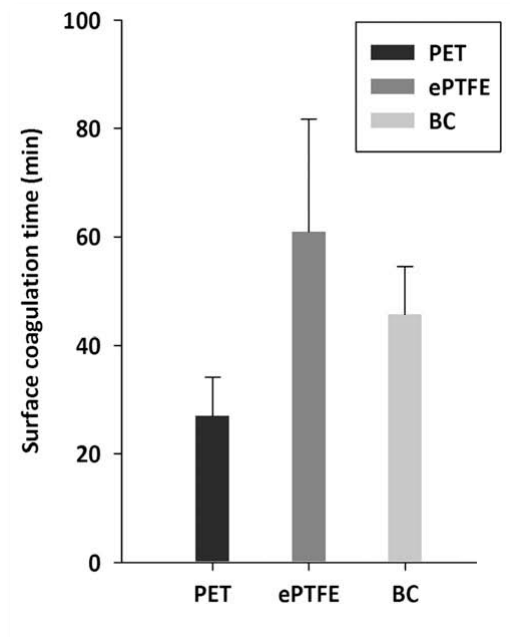
*Reprezentatív szinkódolt time-lapse képek a véralvadás időbeni lefutásáról PFP-ben, a küvetta bal oldalán helyezkedik el a vizsgált felszín (PET, ePTFE, BC)*

*A szinkódolás a fibrinhálózat denzitásán alapszik.*

A 22. ábráról egyértelműen leolvasható, hogy a három vizsgált felszín közül a PET esetben indult meg leghamarabb a véralvadás. Míg az ePTFE esetén a koaguláció aktivációja lassabbnak bizonyult a BC-hez képest, addig a propagációs fázis tekintetében ennek ellenkezője figyelhető meg, ami nagyon gyorsan ment végbe a plazmatérfogat egészében. Az is látható, hogy a BC esetben – szemben a másik két vizsgált felszínnel – a 160 perces vizsgálati idő alatt is maradt a küvettaiban egy rész(térfogat), amelyben a véralvadás nem mutatkozott.

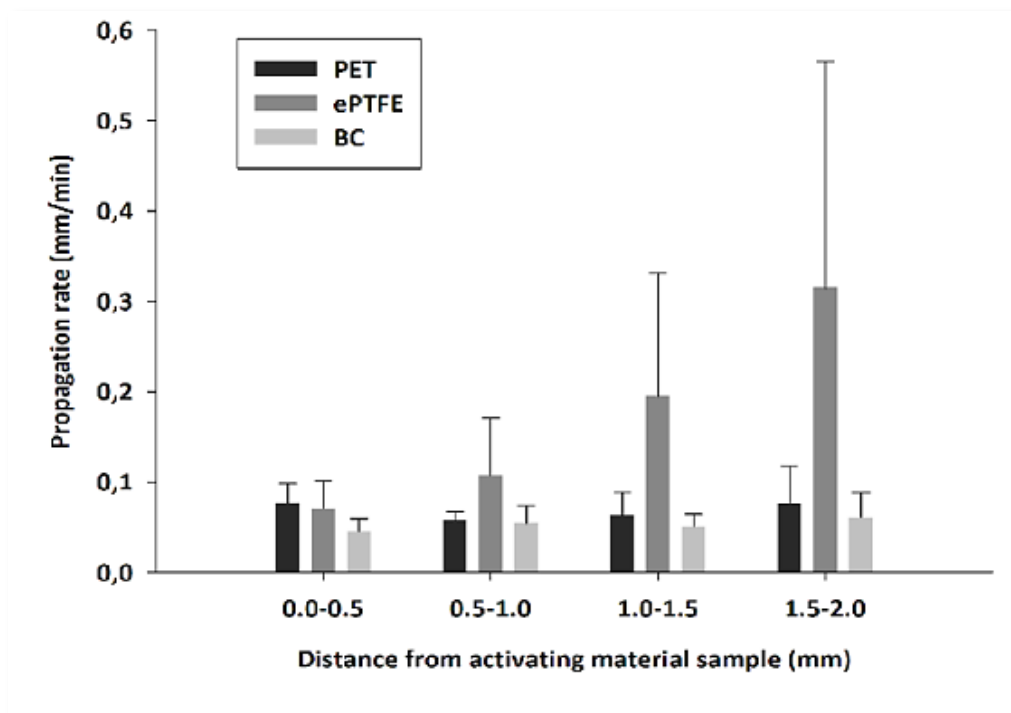
A grafft felszínen meginduló véralvadás (*iniciatív fázis*) mérési eredményei, illetve a kalkulált felszíni koagulációs idő eredményeit a 23. ábra mutatja (n=6). Az egyes pótlóanyagokra vonatkozó értékek növekvő sorrendben (átlag  $\pm$  SD) a következők: PET ( $27 \pm 8$  perc) < BC ( $46 \pm 9$  perc) < ePTFE ( $61 \pm 21$  perc).

A véralvadás előrehaladását (*propagációs fázis*) hasonlóképpen értékeltük, ahol a fibrin megjelenésének sebességét összesen négy, a behelyezett grafftól számított 0,5 mm-es szakaszon át mértük az összes vizsgált felszín esetén (n=6). Az eredmények a propagációs fázis drámai gyorsaságát mutatták ePTFE esetén, szemben a PET és a BC felszínekkel. Ezen eredményeket szemlélteti a 24. ábra.



23. ábra

Felszíni alvadási idő PET, ePTFE és BC esetén.  
6 különböző egészséges önkéntes donor vérplazmájából.  
Az értékek ábrázolása átlag + SD szerint látható.



24. ábra

Véralvadás előremenetelének mértéke (propagációs ráta)  
0,5 mm-es intervallumokban PET, ePTFE és BC graft esetén.  
6 különböző egészséges önkéntes donor vérplazmájából.  
Az értékek ábrázolása átlag + SD szerint látható.

A koagulációs vizsgálatokban mind a thrombin, mind az aktivált XII faktor keletkezése, valamint a koaguláció vizualizációja során kapott eredmények tekintetében is reprodukálható adatokat kaptunk, amelyek a módszer hatékonyságát bizonyítják. A BC mint bioanyag koaguláció szempontjából az ePTFE-hez hasonló profilt mutatott, ami ígéretessé teszi a BC – mint leendő érprotlóanyag – további vizsgálatait.

## 5. Megbeszélés

### 5.1 A tárolás során végbemenő biomechanikai változások

A frissen explantált autológ vena saphena magna szegmentum az „elsőként választandó” graft a legtöbb centrális és perifériás verőérprotlás esetén. Tárolt allogén homograftok választható alternatívát kínálnak, amikor nincs saját elfogadható minőségű vagy méretű explantálható vena saphena magna. Ez a helyzet előállhat reoperációk, fertőzött alsó végtag, fertőzött aorta műtéteknél, egyes gyermekszívsebészeti beavatkozások esetén, és trauma vagy tumor miatt végzett artériás rekonstrukció esetén, etc.

A mélyfagyasztás és a (rövid ideig) fiziológiás sóoldatban történő hűtve tárolás elfogadott a VSM prezerválására, ugyanakkor korántsem problémamentes.<sup>142</sup> Bár a mélyfagyasztott artériák (javarészt) megőrzik a viszkoelasztikus tulajdonságaikat,<sup>143,144,145,146</sup> az eljárás során jelentős sejtkárosodást szenvednek el. A foszfát pufferolt sóoldatban 4°C fokon hűtve tárolt érgraftok esetén elfogadható a nyitvamaradási arány<sup>147</sup> (patency rates), de az endothel sejtek NO termelő képessége már 60 perc múltán megszűnik<sup>148</sup> és az érszakasz kontraktilitása is lecsökken 4 óra múltán<sup>149</sup>. Az endothel réteg 3 nap alatt teljesen leválik<sup>150</sup>. Négy hét hűtve tárolás teljesen acelluláris graftot eredményez.<sup>151</sup>

Számos, a hűtve tárolás javítására irányuló törekvés került napvilágra.<sup>142,148</sup> Galambos és mtsai.<sup>152,153</sup> metil thiazol tetrazolium (MTT) redukciós teszttel bizonyították a véna allograftok magasfokú életképességét, akár 6 heti szövetkultúra médiumban történő hűtött tárolás után is. Saját munkánk ezen gondolatmenet egyenes folytatásaként a szövetkultúra médiumban tárolt véna graftok biomechanikai tulajdonságaira irányult, lévén az aktív és passzív biomechanikai tulajdonságok fontos meghatározói a graft beültetés utáni funkciójának és további sorsának. Kísérleteinkben a

vena saphena magna tárolására vonatkozóan, célul tűztük ki a passzív geometriai és rugalmassági tényezők, illetve az aktív kontrakciós képesség összehasonítását különböző ideig történő 4 °C fokon végzett tárolás esetén fiziológiás sóoldatban és komplex szövetkultúra médiumban. Ezen felül a méréseket mélyfagyasztott és felolvasztott mintákon is elvégeztük.

Tételes biomechanikai vizsgálatainkban azt találtuk, hogy a humán vena saphena érszegmentumok enyhe morfológiai dilatációt, csökkent disztenzibilitást, és a simaizom funkció teljes hiányát (elvesztését) mutatják 1-2 hetes 4°C-os sóoldatban (nKR) történő tárolás után. Azoknál az érszakaszoknál, amelyeket 4°C-os tápoldatban (TCM) tároltunk, változatlan lument és enyhén csökkent falvastagságot tapasztaltunk, míg kontraktilitásuk részben megmaradt. A krioprezervált vénák fala megvastagodott és lumenük szűkült, elasztikus tulajdonságaik megmaradtak, míg kontraktilitásuk magasabb nyomáson elveszett. Az érfal az összes szegmens esetében megfelelő szakítószilárdsággal rendelkezett és kiállta a nyomáspróbát, amelyet 300 Hgmm-es intraluminális tesztnyomáson végeztünk, azért hogy az artériás rendszerbe ültetéskor az implantált vénára háruló nyomást biztosan kiállja.<sup>154</sup>

Érdekes megfigyelés, hogy míg a hideg sóoldatban tárolt mintáknak az átmérője szignifikánsan nőtt, addig falvastagságuk nem változott számottevően a friss graftokéhoz képest. Ennek vélhető magyarázata, hogy két folyamat, az erek tónusának csökkenése következtében kialakuló cikumferenciális (és feltehetőleg longitudinális) megnyúlás, és az érfal tunica mediájában létrejövő ödémás elfajulás párhuzamosan zajlik. A mérési folyamat során így a cirkumferenciális megnyúlás miatt várható érfal vastagság csökkenését a növekvő intramuralis oedema kompenzálja.

Megállapíthatjuk, hogy az eltérő tárolási feltételek nagymértékben befolyásolják a vénák biomechanikai tulajdonságait: a hűtött fiziológiás sóoldatban való tárolás kizárólag rövid ideig, maximum néhány óráig elfogadható, ezt követően a sejtek funkciói nagymértékben romlanak, és morfológiai elváltozások jelentkeznek. Ezzel szemben a TCM-ben hűtve tárolt minták esetén változatlan lument, enyhén csökkent falvastagságot regisztráltunk, ugyanakkor a kontraktilitásuk egy része megmaradt, ami arra utal, hogy a tápoldat olyan környezetet biztosít a (véna)graftoknak, amely képes hosszabb időn át (napok-hetek) késleltetni a funkcionális és morfológiai eltérések kialakulását. A TCM-ben való tárolás megőrzi a kontraktilitást (és így a



simaizomfunkciót) ezen felül a falvastagság enyhe csökkenését és az elasztikus tulajdonságok változatlanóságát eredményezi 4 heti hűtve tárolás után. A megőrzött kontraktilitás és a szegmentumok megmaradó elasztikus tulajdonságai a szövetkultúra médiumban történő tárolás esetén várhatóan javítani fogják a vénás transzplantátumok nyitvamaradását in vivo.

A mélyfagyasztott graftoknál megnövekedett érfalvastagságot és csökkent átmérőt tapasztaltunk, a rugalmas tulajdonságaik változatlanok maradtak, de a kontrakciós képességük magasabb nyomáson teljesen elveszett. Ez egyben azt is jelenti, hogy biomechanikai összehasonlításban a kriopezervált graftok és az általunk 4 héten keresztül tápkultúra médiumban 4°C-on hűtve tárolt graftok között szignifikáns különbséget kimutatni nem tudtunk.

## 5.2 A tárolás morfológiai következményei

A szövettani feldolgozásnál a 8 vizsgált csoportban elvégzett szövettani értékelés alapján elmondható, hogy – a biomechanika tulajdonságokhoz hasonlóan – a minták szerkezetüket tekintve nagy egyéni különbségeket mutatnak. Idült visszérbetegségre jellemző pathológiás elváltozások gyakorta voltak megfigyelhetők mind a tunica intimában, mind a tunica mediában, néhány kivételtől eltekintve, valamilyen mértékben minden vénánál előfordultak. Ennek okai lehetnek korábbi gyulladás, trauma, vénás keringészavar, továbbá a vizsgált betegcsoport átlagos életkora és jellemző egyéb komorbiditásai. Tapasztalataink egybecsengenek az irodalomban is több helyen említett autológ saphena graftok széles skálán mozgó szövettani intaktségával és biomechanikai tulajdonságaival.

Biomechanikai mérésen átesett graftokat szövettani feldolgozásra nem küldtünk, tekintve a mérési folyamat során jelentősen igénybevett véna szegmentumok (így többek között a 300 Hgmm-en végzett nyomáspróba) vélhetőleg további strukturális károsodásokat mutattak volna. Emiatt ilyen biomechanikai és szövettani korrelációról nincsenek adataink. Azonban a friss graftok esetén tapasztalt biomechanikai tulajdonságok nagymértékű variabilitásában, feltehetőleg a graft kivétel alatt elszenvedett károsodása mellett (vongálás, felfújás, papaverines sóoldatban tárolás, etc.), az esetenként már meglévő idült elváltozások is szerepet játszottak.

Az nKR-ben történő tárolás, hasonlóan a tápfolyadékban végzett tároláshoz, a lamina elastica interna károsodását, töredezését eredményezte, a tunica media szerkezete fellazult, oedemássá vált.

Nehézséget jelentett, hogy az alkalmazott vas kolloiddal történt festés az érszegmentumok luminális és adventitiális felszínével is érintkezett, azaz hipotetikusan a vas kolloid tunica mediába történő diffúziója két oldalról is történhetett, bár tapasztalataink szerint az adventitián keresztül ennek mértéke alacsony volt.

A vas kolloid diffúziós vizsgálat egyes friss mintákban is adott pozitív reakciót. Ez azt jelzi, hogy a vascularis, makromolekuláris permeabilitás tekintetében egyes graftok már a tárolás megkezdésekor elvesztették barrier-funkciójukat, míg egyesek megtartották. Az nKR oldatban végzett 1, illetve 2 hetes tárolási idő múltán az érfal simaizomzatának mélyebb és mélyebb rétegei is pozitív berlini-kék reakciót adtak. Amit a vascularis permeabilitás növekedéseként értékeltünk. Ez tendenciaként megállapítható, ugyanakkor a minták különbözősége és a vizsgált esetszám nem tette lehetővé a kvantitatív analízis végzését.

A többi vizsgált csoportban (reprodukálható) konkluzív pozitív berlini-kék reakciót, illetve annak időbeli előrehaladtát nem tudtuk kimutatni. Ennek egyik oka lehetett az erek nagyfokú különbözősége (kaliber, falvastagság, elszenvedett vongálás, hideg ischemiás idő), az alacsony vizsgált esetszám, valamely a festési eljárás során bekövetkezett technikai hiba, vagy a metódus érzékenységének ezen időablakra vonatkoztatott alacsony volta.

### **5.3 Erőfeszítések a krioprezerváció optimalizására**

Több mélyfagyasztási protokoll látott napvilágot és különösen az utóbbi években történtek erőfeszítések a mélyfagyasztási eljárások optimalizálására. Elsősorban a mélyfagyasztás során használt krioprotektáns koncentrációja, egyéb a kristályképződést, vagy az ozmotikus stressz hatását mérséklendő adalékok és eljárások meghatározása, illetve felderítése áll a középpontban.

Ismert, hogy a fagyasztás és felolvasztás súlyos károsodást idéz elő a sejtekben és a szövetekben. Az érszövetek mélyfagyasztása bizonyos fokú simaizom és endothelfunkció csökkenéshez vezet, ami kulcsfontosságú a vascularis homeosztázis

szabályozásában. Az endothel sejtek közvetlenül érintkeznek a vér alkotóelemeivel és az alattuk fekvő simaizom réteggel, részben vagy egészben ők felelnek a megfelelő értónusért és a felszín antithrombotikus tulajdonságaiért. Így az endothel sejtek adekvát tartósítása döntő fontosságú lehet az artériás graftok közép- és hosszú távú életképességét, funkcióját tekintve.

A hűtés/fagyasztás, illetve a melegítés/felolvasztás sebessége, a tárolás hőfoka, a prezerváló folyadék (vivőoldat), a felhasznált krioprotektáns (CPA), annak hozzáadása/elvétele, stb. olyan tényezők, amelyek befolyásolják a szövet krioprezerváció során elszenvedett károsodását.<sup>155</sup> A szövetek krioprezervációjában talán a legnagyobb kihívást az jelenti, hogy egy komplex multicelluláris rendszerben a különböző sejtek más-más igényt támasztanak az optimális prezervációra.

A mélyfagyasztási eljárás(oka)t, izolált sejtek, sejtszuspenziók tárolására, célzottan fejlesztették ki. A szövetek krioprezervációjakor a szövet összes sejtje típusa hasonló fiziko-kémiai változásoknak van kitéve. Azoknál a sejteknél, amelyek a szövet belsejében helyezkednek el, további tényezők is szerepet játszanak: sejt-sejt kapcsolatok, sejt-mátrix kapcsolatok, a hőmérséklet és az oldat hatóanyagainak szöveten belüli eltérő koncentrációja és a membránokon keresztüli vízcserre korlátozott volta, amelyek felerősíthetik a fagyási sérülést. Az extracelluláris jégképződés, ami egy sejtszuspenzióra nézve ártalmatlan, a szöveten belül komoly szerkezeti károkat okozhat. Emiatt az artériákban sűrűn elhelyezkedő sejtek sokkal inkább kiszolgáltatottak a krioprezerváció okozta mechanikai stressznek, szemben a vénákban megtalálható lazábban elhelyezkedő sejtekkel. Az erek felolvasztás után megmaradó funkcionális aktivitása függ az érfal vastagságától és a sejtek azon belüli elhelyezkedésétől, más szóval a krioprezerváció annál jobb hatásfokú, minél kevesebb sejt minél lazább viszonyban van jelen. Erre jó példa, hogy a kisebb intramyocardialis rezisztenciaerekben (arteriolákban) majdnem tökéletes tartósítás érhető el a simaizom és az endothelfunkció tekintetében, míg a nagyobb epicardialis coronaria erekben, e tekintetben csak részleges prezerváció volt megfigyelhető.<sup>156</sup> Vastag falú humán<sup>157,158</sup> és sertés<sup>159,160</sup> aorta mélyfagyasztása után a simaizom és endothel funkció egyáltalán nem, vagy elhanyagolhatóan alacsony szinten jelent meg.

Az emlőssejtek krioprotektív adalék nélkül történő fagyasztása súlyos sejtkárosodást okoz, amit alig néhány sejt él túl. A hőmérséklet nulla fok alá

süllyedésével párhuzamosan víz távozik a sejtekből és extracellulárisan megfagy, így a sejt zsugorodik. Ha a hűtés túl gyorsan történik, a jégkristályok intracellulárisan alakulnak ki következményes sejtkárosodással, ha azonban túl lassú a hűtés a víz extracellulárisan fagy meg és a sejtkárosodáshoz az ún. oldat-effektus (solution-effect) vezet.<sup>161,162</sup>

A fagyási sérülések elkerülése végett krioprotektáns oldatokat használnak, ami vivőoldatból és a krioprotektáns anyagból, anyagokból tevődik össze. A leggyakoribb vivőoldatok a RPMI tápkultúra médium, Krebs-Heinseleit (KH) oldat és a Dulbecco modifikált Eagle médium (DMEM). A számos vizsgálatban használt foetalis borjú szérum (fetal calf serum – FCS) nem bizonyult védő hatásúnak a felolvasztás utáni simaizom vagy endothel funkció tekintetében sem nyúl carotis,<sup>163</sup> sem humán v.saphena magna,<sup>164,165</sup> sem a. coronaria, illetve a.mesenterica<sup>166</sup> esetén sem.

A legjobb védelem a membránpermeábilis és nem-membrán permeábilis krioprotektánsok kombinációjával érhető el. A membrán permeábilisak közül a dimethyl sulfoxide (DMSO), a polyethylene glycol (PEG) és a glycerol említhető. Ma legelfogadottabb és a legszélesebb körben használt CPA a DMSO. A nem-membrán permeábilis védő anyagok a sucrose, trehalose, chondroitin szulfát, a víz visszatartásával a sejt térfogatát stabilizálják alacsony hőmérséklet tartományban. Állatkísérletekben a sucrose hozzáadása a DMSO-t tartalmazó kriomédiumhoz nemcsak a felolvasztás utáni kontraktilis funkciót javította, hanem a substans P-vel kiváltott endothel függő relaxációt is a sertés coronaria ereiben.<sup>167</sup> Mindkét típusú CPA közvetlenül a sejtmembrán szintjén fejti ki védőhatását, szinergista módon. Fontos kritérium, hogy a krioprotektáns anyagok hatásos, de nem toxikus koncentrációban legyenek jelen, ez a DMSO esetében kb. 1,5-1,8M-ra tehető nyúl a. carotis<sup>156</sup> és kutya v. saphena magna<sup>168,169</sup> esetén. Ugyanez a koncentráció (fagyasztás nélkül) nem változtatta sem a kontraktilis, sem az endothel funkciót humán artéria mammaria interna(IMA),<sup>170,171</sup> illetve humán vena saphena magna(VSM) esetén.<sup>165</sup> Megjegyzendő azonban, hogy a felolvasztás utáni kontrakciós képesség (NA és ET<sub>1</sub> és KCl esetén is) szignifikánsan romlik 2 órás és még inkább 4 órás equilibratio után, összehasonlítva a fagyasztás nélküli mintákkal,<sup>165</sup> ugyanakkor magasabb DMSO koncentráció (2,4M) szignifikáns gyengülést mutatott a kontrakciós és a relaxációs képességekben is.<sup>163,168,169</sup> A funkcionális eltérések összhangban állnak a fény és elektronmikroszkópos

vizsgálatokkal, amelyek az alacsony koncentrációjú DMSO-ban történt (fagyasztás nélküli) tárolás után csak minimális elváltozásokat mutattak humán IMA,<sup>171</sup> sertés aorta és a. iliaca esetén.<sup>172,173,174</sup>

Nyúl carotist vizsgálva 1M DMSO koncentrációjú oldatban a 95%-os equilibrium eléréséhez szobahőmérsékleten 13 perc, 2 °C-on 18 perc kellett.<sup>175</sup> További vizsgálatok nyúl femorális artérián (KH oldat 2M DMSO, 0,1M sucrose, 50% FCS) az optimális fagyasztás előtti equilibriumot 10 percre teszik, ennél hosszabb idő már a noradrenalinra adott kontrakciós válasz progresszív csökkenését vonta maga után. Ezzel szemben humán IMA és VSM esetén a felolvasztás utáni kontrakció akár 2 óras equilibrium után is megmaradt.<sup>165,170</sup> Az RPMI-sucrose (RPMI 1640, 1.8M DMSO, 0.1M sucrose) 50%-al jobb felolvasztás utáni kontrakciós képességet mutatott (NA,ET<sub>1</sub>) szemben a KH-sucrose médiummal.<sup>165</sup>

A hűtés optimális sebessége sejttípusonként változik, függ a sejtmembrán víz permeabilitásától és a sejtfelszín és sejttérfogat arányától.<sup>161</sup> Sertés aortában a simaizomsejtek számára a 0,3 °C/perc, míg az endothel sejtek számára a 10 °C/perc a kedvező. Jelenleg általánosan 1°C/perc hűtési sebesség használatos a vascularis szövetek krioprezervációjakor. Ilyen körülmények mellett a biokémiaileg kimutatható sejtleletkéesség hasonlít a nem fagyasztott (friss) kontrollokéra,<sup>176</sup> de morfológiai elváltozásokban jelentős variáció mutatkozik.<sup>177</sup> Ugyanakkor az érfunkció vizsgálata csökkent kontraktilitást és az endothelium-dependens relaxáció hiányát, vagy közel elhanyagolható mértékét igazolta.<sup>178,179</sup> Nyúl carotis krioprezervációja 1°C/perc hűtési sebességgel KH vivőoldatban 1,2M vagy 1,8M koncentrációjú DMSO jelenlétében a felolvasztás után a kontrakció 40%-a és az endothelium-dependens relaxáció 60%-a megmaradt.

Humán VSM esetén az optimális, felolvasztás utáni funkció a 0,6°C/perc hűtési sebességgel érhető el. Tehát a vascularis szövetek megfelelő hűtési rátája 0,6-3 °C/perc közé esik, amikor a minta -70 °C-ra lehűlt, egyenesen áthelyezhető folyékony nitrogénbe (-196°C), vagy annak gőzébe, ahol gyakorlatilag korlátlan ideig tárolható. Egyes protokollok kihangsúlyozzák, hogy a mintákat sohasem merítik bele a folyékony nitrogénbe, hanem annak gőzét használják a tárolásra.<sup>39</sup> Tárolás -70 és -85 °C közötti hőfokon rövid távon működőképes (3-4hét),<sup>156,180</sup> de ez a hőmérséklet tartomány nem biztosít valódi hosszú távú túlélést az emlős sejtek számára.<sup>180</sup> Példaként említhető

többek között a francia Henry Mondor Kórház szövetbankja, ahol a francia szabályozás által jóváhagyott egyszerűsített protokollt használnak  $-80\text{ °C}$  fokra hűtve 10%(12%) DMSO krioprotektáns mellett. A minták lefagyasztása és felolvasztása nem kontrollált módon, hanem egy lépésben történik.<sup>181,182</sup> Nem találtak különbséget a friss és a különböző módon mélyfagyasztott ( $-80\text{°C}/150\text{°C}$ ) nyúl carotis strukturális (diaméter, intima-media arány), vagy mechanikai paramétereit (disztenzibilitás, cirkumferenciális stressz, elasztikus modulus) között.<sup>181</sup> Amennyiben az addig nitrogén tartályban tárolt szövet hőmérséklete a felmelegítés során a  $-123\text{ °C}$  meghaladta, úgy már nem helyezhető vissza folyékony nitrogén gőzbe, ez ugyanis az ún. kritikus újrakristályosodási hőmérséklet. A nitrogénben tárolt minták már 10 perc száraz jégen ( $-78\text{°C}$ ) történő tárolás után visszahelyezve nitrogén tartályba súlyos sérüléseket szenvednek el.<sup>183</sup>

Az EHB a  $-80\text{°C}$ -on tárolt graftokat maximum 1 hónapig tartja felhasználhatónak, megjegyzi azonban, hogy a beültetésre kiküldött graftok fel nem használása esetén maximum 1-3 hónapig tárolhatók a felhasználó intézetben, ebben az esetben az EHB azonban nem vállal felelősséget a szövet minőségért.<sup>39</sup>

A mélyfagyasztás folyamatában a maximális thermális stressz a felolvasztás során jelentkezik.<sup>184</sup> Az izolált sejtek felolvasztása általában gyorsan történik, hogy megelőzzék a jégkristályok képződését a lefagyasztott mintában, a szövetek gyors melegítése azonban törésekhez vezethet a mechanikai stressz következtében.<sup>161</sup> Hunt és munkatársai kimutatták, hogy az érfalban létrejövő mikrofraktúrák a krioprezerváció során ( $-80$  és  $-196\text{ °C}$  között) fellépő mechanikai stressznek tulajdoníthatók.<sup>185</sup> Egy másik lehetséges hipotézis szerint a gyors felmelegítés felelős a törések kialakulásáért, amikor a szöveti hőmérséklet  $-150\text{°C}$  és  $-100\text{°C}$  között van, és így megakadályozható ha  $-100\text{ °C}$  fokig lassú melegítést alkalmazunk.<sup>186</sup> Hasonló károsodásokat figyeltek meg törpesértés a. iliaca gyors felolvasztása esetén, ahol folyadék halmozódott fel a lamina elastica interna alatt (subelastica rétegben), és az érfal bontásában résztvevő enzimek megemelkedett expresszióját tapasztalták.<sup>187</sup>

Lassú felmelegítéssel  $15\text{°C}/\text{perc}$  javulást értek el humán VSM<sup>165</sup> és IMA esetén a noradrenalinra adott kontrakciós válasz tekintetében, szemben a gyors felmelegítéssel ( $100\text{°C}/\text{perc}$ ), azonban ez nem érte el a szignifikáns szintet.<sup>170</sup>  $1\text{°C}/\text{perc}$  felmelegítés esetén több tanulmány is kedvező változásokat tapasztalt: az endothel morfológiai

elváltozásai jelentősen csökkentek, és ezzel párhuzamosan a károsodott területek hányada is jelentős csökkent.<sup>173,174,187,188</sup>

Mivel a sejtek sokkal érzékenyebbek a duzzadásra mint a zsugorodásra, így felolvasztás után a CPA eltávolítása és fiziológias oldatra cserélése az ozmotikus sokk elkerülés érdekében fokozatos hígítási sorral, lépésről lépésre történik<sup>161</sup>(ennek fontosságát azonban többen vitatják).

Összefoglalva: a nitrogén gőzben, krioprezerváló zacskóban tárolt graftok jobb felolvasztás utáni funkcionális aktivitást mutatnak, szemben a folyékony nitrogénbe merített ampullákban tárolt graftokkal. A kriomédiumnak lehetőség szerint tartalmaznia kell permeábilis és non-permeábilis CPA-t nem toxikus dózisban, pl: RPMI tápkultúra médium 1,8M DMSO és 0,1M sucrose. Ha KH oldtat a vivőfolyadék, annak kalcium koncentrációját célszerű 1,25M –ra csökkenteni. A CPA equilibratio ideje a szövet vastagságától függ, minimum 10-20 perc, a humán artériák és vénák relative jól tolerálják a kriomédiumban töltött időt. A hűtés legoptimálisabban számítógép vezérléssel kivitelezhető az artériák esetén 1°C/perc, míg a vénáknál 0,6°C/perc sebességgel. A graft, miután elérte a -70 °C-ot direkt áthelyezhető a folyékony nitrogén tárolóba, ahol korlátlan ideig tárolható. A felmelegítés a felolvasztás utáni legjobb funkcionális aktivitás érdekében, továbbá a krioprezerváció indukálta szövetkárosodások csökkentése végett, a lassú metódus alapján kivitelezendő.<sup>155,165</sup>

A mélyfagyasztás tökéletesítése és az új fiziko-kémiai tényezők tesztelése folyamatos. Ezt bizonyítja egy újkeletű cikk, ami a sejtek közötti kommunikációs csatornák (gap junction, hemichannel) meghatározó szerepét írja le. Ezen csatornák blokkolásával (Gap27) az egyes sejtek ionháztartásának zavara, vagy intracelluláris apoptózist indukáló molekulái nem hatnak/jutnak át a szomszédos sejtekbe, megelőzve ezzel a dominóeffektusként jelentkező sejthalált a szomszédos sejtekben. Ezen felül az úgynevezett hemichannel blokkolásával az extracelluláris tér felé történő kontrollálatlan ioncsere is gátolt. A vizsgálat 73% ill. 71%-kal csökkent simaizom pusztulásról számol be az artériák, illetve vénák esetén. Sőt az endothel sejtek esetén is csökkent sejthalálózást közöl: 32% az artériák és 51% a vénák esetén.<sup>189</sup> Vélhető, hogy a téma igen hamar az érdeklődés középpontjába fog kerülni, tekintve hogy az elv nemcsak a mélyfagyasztás, hanem az összes szövettárolási módszer esetén alkalmazható.

## 5.4 A tárolófolyadékok tulajdonságai

Hidalgo és munkatársai humán v.umbilicalis endothel sejtkultúrát felhasználva vizsgálták a sejtsor felszíni folytonosságát, a sejtek életképességét, és az endothel sejtmembrán integritását 3, illetve 16 órán keresztül hideg ischemiának kitett mintákban 4 különböző tároló médium esetén. Tároló oldatként két *laktobionát-raffinóz* alapú (módosított UW oldat, módosított UW oldat alacsony  $K^+$  tartalommal) és két *hypertóniás citrát* oldatot (HCA oldat, HCA oldat alacsony  $K^+$  tartalommal) választottak. A hűtve tárolás eredményeként súlyos elváltozásokat mutattak ki az endothel sejtek morfológiájában: sejtek közötti kapcsolatok felszakadásával már 3 óra hűtve tárolás után megszűnt az endothel folytonossága mind a négy médium esetén. A súlyosan károsodott sejteknél gyakorta mutatkozott zeiózis (cellular blebbing). 16 órás hypoxiás hypothermia után azok a sejtkultúrák, amelyeket laktobionát alapú médiumban tároltak, szignifikánsan jobb eredményt mutattak az sejtek életképességére és a sejtréteg folytonosságára vonatkozóan, mint a hipertóniás citrát oldatban tároltak. Bár az intracelluláris típusú (módosított UW) oldat jobbnak bizonyult az extracelluláris típusú (módosított UW oldat alacsony  $K^+$  tartalommal) oldathoz képest, de ez nem érte el a szignifikáns szintet.<sup>190</sup>

Az endothel (és a simaizom) sejtek funkcionális (endothel dependens kontrakció/relaxáció) és morfológiai vizsgálata EC oldatban tárolt patkány artériaszegmentek esetén releváns javulást mutatott 0,4-1,5 mmol/L kalcium jelenlétében. Ezzel párhuzamosan a hozzáadott kalcium a sejtmorfológiai elváltozásokat (a mitochondriumok, sejtmag duzzanata/dezintegrálódása, a sejtorganellumok elvesztése) is hatékonyan mérsékelte. Több tanulmány is kimutatta, hogy az extracelluláris kalcium koncentráció kiemelt fontossággal bír az endothel sejt permeabilitásának szabályozásában: az extracelluláris kalcium depléció növeli a permeabilitást.<sup>191,192</sup> Az 1,5mmol/L kalcium koncentrációval rendelkező Krebs oldatban a patkány aorta vascularis kontrakciója 36 órás hideg (4°C) tárolás után is megmaradt. Ugyanakkor a kifejezetten szervtranszplantációs transzportmédiumnak fejlesztett EC, UW, Perfadex egyike sem tartalmaz kalciumot és nem is képesek megőrizni a kontrakciós képességet 36 órás hideg tárolás után. Megemlíthető azonban, hogy az endothelfüggő relaxációt az UW oldat, szemben a Krebs oldattal 36 órás tárolást



követően is megőrzi,<sup>193</sup> ugyanakkor EC oldatban tárolt érszegmentek kontrakciós képessége már 24 óra tárolás során elvész, így ennek vizsgálata kissé nehézkes.<sup>194</sup>

A hypothermiás tárolás és a kalciummentes oldat együttesen okozzák a megnövekedett folyadékbeáramlást és a következetes sejtmorfológiai változásokat az endothel és a simaizomsejtekben.<sup>195</sup> A hideg kiváltotta endothel sejtréteg felszakadozását, v. saphena magna coronaria bypasshoz kivett szegmentumait vizsgálva Solberg és munkatársai már a 80-as évek közepén arra a megállapításra jutottak, hogy azokban a mintákban, amelyeket 20 C° fokon tároltak, az endothel sejtréteg károsodása szignifikánsan kisebb volt, szemben a ma is általánosan használatos 4 C°-os tárolással. Így a 45 perces 4 C° fokos tárolás után az elektronmikroszkópos morfológiai értékelésnél a felszín 18 %-án hiányzott az endothel borítás, ez az érték 20 C°-os tárolás esetén 4%-ra csökkent. A sejtek formaváltozását figyelembe véve feltételezhető, hogy a hideg hatására bekövetező citosceletalis (ezen belül is microtubularis) változások állnak a tapasztaltak hátterében.<sup>196</sup> A sejtek elvesztik mechanikai ellenállóképességüket és a citoplazma folyékonyabbá válik. Ugyanakkor ez a strukturális elváltozás visszafordítható folyamat, mivel a hőmérséklet emelésével a microtubulusok újrendeződnek, újraépülnek.<sup>196,197</sup>

Ezek a megfigyelések egybecsengenek Gerlach és munkatársai máj endothel sejteken végzett vizsgálataival, ahol a tárolás utáni endothelialis repairt vizsgálták. Endothel sejtkultúrát 6 órán keresztül tároltak anoxiában különböző oldatban (UW, HTK, EC, TCM) 4 °C fokon. Ezt követően vizsgálták a sejtleválást, sejtosztódást, az életképességet, a mitózis gyorsaságát, a sejtek vándorlási sebességét és irányváltoztatását. Ezek alapján a sejtleválás, EC>HTK>UW>TCM. A mitózis sebessége a hypoxiás tárolás előtt TCM-ben 10% ± 4%/h, majd az anoxia ideje alatt 0% és a TCM-be való visszahelyezés után csak 8 óra (UW,HTK), illetve 12 óra (EC) múlva indult újra a sejtosztódás (a tárolás előtti szinthez viszonyítva jelentősen lassabban). A migratio a tárolás előtt 55±4µm/h volt, ami 0 –ra csökkent a tárolás alatt. A sejtmozgás visszatérte 1 órával a tárolás után mutatkozott és 6 óra elteltével (UW, HTK) megközelítette a kiindulási értéket, azonban az EC csoport jócskán lemaradt. A sejtek irányváltoztatása ugyancsak hasonló eredményt adott UW, illetve HTK tárolást preferálva.<sup>198</sup> Egyes sejtlelettani funkciók, mint a felszínhez tapadás, migratio, irányváltoztatás, osztódás, amelyekben a microtubulus és a mikrofilamentum rendszer

alapvető fontossággal bír, a hideg anoxiában való tárolás során oldattól függően kisebb nagyobb mértékben károsodnak. Az endothel sejtréteg intaktsága nagymértékben függ a citosceletalis elemek épségétől, amelyek meghatározzák az endothel sejtek alakját és biztosítják a sejt-sejt illetve sejt-membrana basalis közötti kapcsolatokat.<sup>199</sup>

Wilson és munkacsoportja nyolc prezerváló oldatot hasonlított össze a vascularis endothelium struktúrájára és funkciójára vonatkozóan patkány aorta modellen: 1 óra meleg ischemia, 1 óra in situ prezererváció után az explantált aortát 24 órán keresztül különböző médiumokban hűtve (4°C) tárolták. Kontrollként fiziológias sóoldatot használtak. A phenylephrinnel prekontrahált szegmentumokat növekvő koncentrációjú acetylcholinnal kezelték. Az endothel függő relaxáció mértékéből következtettek az endothel sejtek funkcionális állapotára: a HTK, az UW oldatok, illetve a Celsior oldat előnyei mutatkoztak a többi tároló oldattal és a kontrollnak választott fiziológias sóoldattal szemben. Ezt a HTK oldatban tárolt szegmentumok scanning elektron mikroszkópos vizsgálata is megerősítette. A Marshall's oldatban tároltakon, ahol a sejtek citosceletalis váza degenerálódott és elvesztették az ér belfelületére jellemző hullámmintázatot is, a lumen felületén a már korábban említett zeizis/cellular blebbing és membrántöredések jelentkeztek. A transzmissziós elektronmikroszkópos képek láthatóvá tették a meleg és a hideg ischemia utáni súlyos sejt-károsodásokat, ugyanakkor az oldatok között különbséget nem tudtak megállapítani.<sup>142</sup>

Érdekes megfigyelés, hogy a rágcsálók aortájának endothel sejtei (sokkal) ellenállóbbak az ischemiával szemben, mint a humán endothel sejtek, pl. Corner összehasonlító vizsgálatában az UW oldat mutatkozott a legjobbnak a hűtve tárolt érszövet funkcionális integritásának megőrzésében akár 72h múltán.<sup>200</sup>

Találni a szakirodalomban természetesen a fentiekől eltérő eredményeket is: *humán* a. hepatica szegmentumok UW oldatban történő hideg anoxiás tárolását követően már 1 óra elteltével jelentősen romlik az endothel függő relaxációs válasz az acetilkolinra (ACh) és az adozin-difoszfátra (ADP), ugyanakkor a tárolás nem befolyásolja a norepinephrinnel kiváltott endothelium independens kontrakciót, illetve Na-nitroprussziddal kiváltott endothelium independens relaxációt. Nem befolyásolja továbbá a hypoxiára adott endothel függő kontrakciós választ sem. A deendothelizált szegmentumokban a hypoxiás kontrakció elmaradt.<sup>201</sup>

Jelenleg a hisztidin-tryptofán-ketoglutarát (HTK) oldat a legelfogadottabb a cardioplegiara, továbbá széles körben használt transzportmédium, azonban szívtranszplantáció esetén a hideg ischemiás időt 4-6 órára korlátozza.<sup>202,203</sup> A hisztidin ugyanis elősegíti a hidrogén peroxid által okozott DNS károsodást, és (önmagában is) toxikus hatása a sejtre egyes modellekben,<sup>204,205</sup> továbbá a hisztidin felerősíti a vas-indukálta lipid peroxidációt, ugyanakkor a hisztidin-indukálta sejt-sérülések vasfüggőek.<sup>204</sup> Sertés aorta szegmentumokat vizsgálva, az endothel sejtek túlélése javult a hideg tárolást követően klórban gazdag tároló médiumokban.<sup>206</sup> Ezzel szemben izolált patkány hepatocyták tovább maradtak életképesek klorid szegény oldatban, gátolva a hideg kiváltotta vas-független sejt-sérülést.<sup>207</sup> Ennek a kissé mechanikus megközelítésnek az alapján egy új HTK alapú prezerváló oldatot fejlesztettek ki, amiben többek között a hisztidin toxikus hatásának csökkentését annak részleges N-acetil-L-hisztidin szubsztitúciójával,<sup>204-207,208,209,210</sup> a nátrium influx gátlását glicin és alanin<sup>210</sup> hozzáadásával kívánták elérni. A hozzáadott arginin a nitrogén oxid szintetáz (NOS) szubsztrátjaként, az aszpartát energia szubsztrátként szolgál. Membrán permeabilis és impermeabilis vas kelátor hozzáadása a vas-független reaktív oxigénradikálok okozta károsodások gátlására hivatott. A sejtoedema kialakulását megelőzendő a mannitol sucrose-ra cserélték, ami impermeabilis, míg a mannitol a májsejtekbe bejut.<sup>211</sup> Wu K. és munkatársai patkány szív transzplantációs modellen vizsgálta a fent leírt formában módosított HTK oldatokat (magas illetve alacsony kloridtartalommal). A magas kloridtartalmú oldat szignifikánsan jobb prezerválóképességet mutatott vas kelátor jelenlétében, összehasonlítva a genuin HTK oldattal, ami összhangban áll – a korábban már említett – Fingas és munkatársai által közölt magasabb klórtartalom előnyös prezervációs hatásaival.<sup>208</sup> Hasonlóképp szignifikáns javulást tapasztaltak az LDH és CK szintek tekintetében, illetve az apoptózis vizsgálatokor. Markáns hisztológiai különbségeket tapasztaltak, és a beültetéskor mért rebeating time is szignifikánsan rövidebb lett. Összességében az új oldat jelentősen csökkenti a hideg indukálta myocardialis károsodást, és javítja a graft tárolhatóságát (graft survival) a HTK-oldattal összevetve. A klorid ionok jelenléte kritikus fontosságú a szív prezervációjában.<sup>212</sup>

A vasfüggő és a nem vasfüggő hideg indukálta sejt-károsodások szisztematikus vizsgálata során patkány májsejtkultúrát vizsgálva a kelátképző anyagok fontosságát

mutatták ki, ami blokkolva a vasfüggő utat közel teljesen gátolta a sejtsérülést (LDH kiáramlást). A nem vasfüggő károsodás (ami a vasfüggőnek töredékét képezi) klorid függőnek bizonyult, és a klorid szegény oldatok előnyét mutatta, szemben a magas klorid tartalmúakkal.<sup>207</sup> A deferoxamin, mint vas kelátor, prezerváló oldatokban való használata védő hatásúnak bizonyult a hűtve tárolt vese,<sup>213</sup> és hideg perfúziós szív esetén,<sup>214</sup> továbbá ferritin nehézlánc fokozott expressziója szintén védő hatást nyújt a hideg ischemia/meleg reperfúzió ellen patkányokban.<sup>215</sup> A vas kelátorok védő hatását mutatták ki a coronaria endothel sejtek hideg ischemiás vizsgálataiban is.<sup>216</sup>

Visszakanyarodva az erek prezervációs lehetőségeihez a HTK oldat, fiziológias sóoldat és TiProtec névre keresztelt módosított HTK oldat összehasonlítását vizsgálták artéria szegmentek hideg anoxiában való tárolásakor. A TiProtec a piacon egy új tároló médium, ami összetételében nagyban hasonlít a fent leírtakra annyi különbséggel, hogy a HTK oldat hisztidin tartalmát teljes egészében N-acetylhisztidinre cserélték és relative magas kálium és klorid koncentrációval rendelkezik. Ezen kívül sucrose-t, alanint, glycint és kelátképzőt is tartalmaz a maximális protekció elérésére. Vizsgálataik eredményeképp a humán a.mammaria interna szegmentek 10 órás fiziológias sóoldatban való hideg tárolása után tónusukat veszítették. Míg a HTK 4 órás hideg tárolás alatt jól megőrizte az érfunkciót, azaz értónus kialakulását, illetve az endothel és simaizom dilatatív funkcióját, addig 4 nap hideg tárolás után a kontrakciós és relaxációs képesség elveszett. Ezzel szemben TiProtec oldatban tárolt szegmentumok 4 nap után is megőrizték az értónust csakúgy, mint az endothel és a simaizomsejtfunkciót. 10 nap eltelte után az endothelfüggő relaxáció kb. 50%-a a kiindulási értéknek, ugyanakkor a simaizom funkció továbbra is teljes értékű maradt.<sup>97</sup> Ebner és munkatársai *ezzel szöges ellentétben* egér aortán végzett vizsgálatok alapján 2 napi hideg tárolás (TiProtec) után az érfunkció szignifikáns csökkenését tapasztalta, 7 nap eltelte után phenylephrinnel semmilyen kontrakció nem volt kiváltható.<sup>86</sup>

A szövet kultúra médium, a továbbiakban TCM (tissue culture medium), izolált sejtek szaporítására kifejlesztett oldat, ami összetételében megteremti azt a kényes egyensúlyt, ami a sejtek túléléséhez, osztódásához szükséges. A különbség a szövet kultúra médium és az egyéb mikrobiológiai tápoldatok között, hogy azoknak a sejteknek, amelyek egy komplex szervezetből származnak a növekedéshez gyakran

szükségük van hormonokra, növekedési faktorokra, amelyek *in vivo* jelen vannak.<sup>217</sup> Ennek megoldására vér szérumot vagy szintetikus úton előállított „szérum helyettesítőt” kevernek a médiumba. Lényeges különbség a tápkultúra oldatok tárgyalásánál elkülöníteni az ún. definiált, vagy összetevői tekintetében nem definiált médiumot.<sup>218</sup> A definiált, vagyis szintetikus oldatban minden összetevő koncentrációja pontosan meghatározott, továbbá nem tartalmaz gomba, állati, vagy növényi szövetet.

Egy, a sejt- és szövetkultúrák között közkedvelt tápoldat a RPMI (Roswell Park Memorial Institute) médium, amit hagyományosan a lymphoid sejtek szérummentes expanziójára használnak. Ez egy magas foszfát tartalmú oldat, amit úgy alakították ki, hogy 5% CO<sub>2</sub> tartalmú légkörben lehessen használni. Az RPMI 1640, egy bikarbonát pufferrel rendelkező oldat, ami abban különbözik a többi emlős sejt kultúra médiumtól, hogy pH értéke 8. Megfelelő hozzáadott szérummal vagy szérum helyettesítővel az RPMI 1640 sokféle sejt kultivációját teszi lehetővé, kifejezetten a T/B-lymphocytákét vagy akár a csontvelői sejtekét. Több tartósítási protokollban is helyet kapott, többek között a korábban tárgyalt megújult krioprezervációs eljárásokban is.<sup>155,219,220</sup> Azonban a tápoldat összetétele (alacsony kalcium, magas anorganikus foszfát és glukóz) drasztikusan felerősíti a hideg indukált, vasfüggő sejtsérülést és apoptózist az MPTP indukciójával Vero-B4 sejtek esetén, és ugyanezen pathomechanizmus alapján más sejt típusoknál is. Párhuzam vonható az UW oldattal, (amiből hiányzik a kalcium és magas a foszfát tartalma), ami ugyancsak felerősíti a hideg kiváltotta sejtsérülést. Hozzáadott kelátképzővel vagy a MPTP célzott gátlásával (trifluoperazin + fructose) teljes védelem érhető el.<sup>221</sup>

Martínez és munkatársai a gyerekeknél végzett májátültetés esetén használt *vascularis homograftok* (VH) prezervációs lehetőségeit vizsgálták. Ugyanazon donortól származó friss (tárolási idő < 24h; median 8h) VH-ok és egy másik donortól származó Terasaki tápoldatban tárolt (1-26 nap; medián 8 nap) VH-ok retrospektív összehasonlítását végezték. A Terasaki oldat összetevői McCoy's lymphocytá kultúra médium, foetalis borjú szérum, HEPES puffer és gentamicin. Eredményeik szerint statisztikailag nem volt szignifikáns különbség az 1 éves graft túlélés tekintetében, és a 3 éves graft túlélés hasonlóan bizonyult a friss és tárolt artériák és vénák tekintetében. A hisztológiai feldolgozásban kimutatták továbbá, hogy 24-48 óra hideg tárolás után az endothel és az intimális rétegek kivétel nélkül megsemmisülnek függetlenül a használt

tároló oldattól (fiziológias sóoldat, UW oldat, Terasaki tápoldat). Ugyanakkor a kontamináció tekintetében is eltérő értékeket kaptak a tároló oldatok tekintetében: 56% fiziológias sóoldat, 20% UW oldat és 5% Terasaki oldat esetén. Ez szignifikáns eltérésnek bizonyult, sugallva ezzel a gentamicin tartalmú oldatok előnyét a penicillin (UW) tartalmú, vagy antibiotikum mentes oldattal (fiziológias sóoldat) szemben.<sup>45</sup>

*Galambos* és munkatársai a véna saphena magna homograftok életképességének változását vizsgálták X-VIVO™ 10 TCM-ben történő 6 hetes tárolás alatt. Methyl thiazol tetrazolium (MTT) redukciós módszer alapján azonos viabilitási értékeket mértek a krioprezervált és felolvasztott vénák esetén és a 6 hetes hideg anoxiás X-VIVO™ 10 TCM-ben történő tárolás után.<sup>98,99</sup> Ehhez az eredményhez hasonlót a szakirodalomban ezidáig sehol nem közöltek, egyetlen tároló oldattal, vagy újfent kikísérletezett tároló médium esetén sem! Ezt támogatja a saját vizsgálatainkból kiolvasható előnyös biomechanikai profil is. Az X-VIVO™ 10 Médium tartalmaz L-glutamint, gentamicint és fenolvöröst, továbbá rekombináns humán szérumfehérjét (albumin, inzulin) és pasztörizált humán szérum transzferrint, ugyanakkor mentes bármiféle hozzáadott növekedési faktortól, protein-kináz C stimulátortól, így megfelelő a másodlagos hírvivő rendszerek tanulmányozására rágsáló, illetve humán lymphociták esetén is. Összetételét tekintve kiválóan alkalmas a Limfokin Aktiválta Killer (LAK) sejtek szérum-mentes környezetben történő tenyésztésére, továbbá monocyták, makrofágok és őssejtek tárolására, növesztésére is és megfelel az európai, illetve amerikai követelményrendszereknek.

Elképzelhető, hogy a transzferrinnek, a vas anyagcsere háztartásban betöltött szerepe előnyösen befolyásolja a tárolás során végbemenő hideg indukálta vasfüggő szabadgyökök termelődést, lévén a transzferrin a legdinamikusabb hordozó (carrier), a teljes vaskötő kapacitást is alapvetően ennek a szintje határozza meg.<sup>222</sup>

## 5.5 Koagulációs vizsgálatok

A thrombin és az aktivált XII faktor termelődésének vizsgálatával, továbbá egy új vizualizációs módszerrel megkönnyítve a koaguláció leképezését összehasonlíttuk a különböző vascularis grafft felszínnek plazma koagulációs tulajdonságait. Három grafft felszín, ideértve két jól ismert, a kereskedelmi forgalomban is elérhető érpótló anyagot a PET (Dacron<sup>®</sup>) és ePTFE (GORE-TEX<sup>®</sup>) továbbá a bakteriális cellulózból előállított új érpótló anyagot vizsgáltuk ex vivo. Hasonló munkáról irodalmat áttekintve nem találtunk tanulmányt.

A thrombin termelődés vizsgálatokor drámai különbségek igazolódtak a három vizsgált felszín között. Mind az ePTFE mind a BC grafftok szignifikánsan hosszabb lag time és time to peak értékeket mutattak szemben a PET felszínrel, ami arra utal, hogy a koaguláció kezdeti aktivációja lényegesen lassabb az ePTFE és a BC esetén, mint a PET felszínen. Ezzel teljességgel egybeesnek a XII faktor keletkezésének vizsgálata és a vizualizációs módszer során kapott eredmények. A PET felszínen jelentősen több aktivált XII faktor keletkezett és ezen a grafft felszínen volt a legkorábban kimutatható a fibrin hálózat kialakulása. A felszín aktiválta koaguláció nagyon hasonlóan bizonyult a Teflon és a BC tekintetében, a vizualizációs vizsgálatoknál alig rövidebb felszíni koagulációs időt mértünk a BC esetén. Egy korábbi vizsgálatban a felszín indukálta véralvadás összehasonlítását végezték polyethylene (PE), polyethyleneterephthalate (PET), polymethylmethacrylate (PMMA) és polydimethylsiloxane (PDMS) felszínnek esetében oszcillációs (QCM-D) technikával: a vizsgált anyagok közül a PET felszín a többi anyaghoz képest lényegesen nagyobb mértékben indukálta a fibrin kialakulását.<sup>223</sup> Egy másik tanulmány szintén a PET felszín jóval nagyobb thrombogenitását találta az ePTFE felszínrel összevetve.<sup>224</sup> Ezek az eredmények megerősítik a saját méréseink eredményeit mind a thrombin keletkezés, mind a videóanalízis tekintetében, miszerint a PET valóban egy erősen prokoaguláns felszín. A Dacron<sup>®</sup> felszín meglehetősen hidrofób, és korábbi vizsgálatok szerint a hidrofób felszínnek alacsony kontaktaktivációs potenciállal rendelkeznek.<sup>225</sup> Más vizsgálatok szerint önmagában a XII faktor aktivációja végbemehet hidrofíl vagy hidrofób felszínen is, habár komplex fehérjeoldatok vagy vérplazma esetében a XII faktor kompetitív módon kizáródik a hidrofób felszínekről más nagyobb affinitással rendelkező fehérjék

miatt. Így az aktiváció valójában (in vivo) a hidrofil felszínre korlátozódik.<sup>226,227</sup> Meglehet, hogy a Dacron<sup>®</sup> kötött falszerkezete nagyon nagy felületet generál, ami ellensúlyozza a XII faktor lassú aktivációját. Azonban az is elképzelhető hogy a szövet mikroszkópikus légbuborékokat tartalmaz, aminek következtében a plazma-levegő felszínén a XII faktor aktivációja felgyorsul.<sup>228</sup> Egy érdekes megfigyelés, hogy az ún. Peak, ami alatt a thrombin keletkezési ütemének a maximumát értjük, sokkal alacsonyabb a BC esetén, összehasonlítva akár a Dacron<sup>®</sup>, akár a Teflon felszínnel. Alacsonyabb csúcstérték, alacsonyabb koagulációs aktivitást jelent a BC felszínre nézve. Ez összhangban áll a videóanalízis során a BC esetében tapasztalt lassú propagációs rátával. Feltételezhető, hogy a BC esetében tapasztalt lassú koagulációs folyamat előnyös lehet érgraftok esetében, lehetőséget adva, hogy véráram az aktivált koagulációs faktorokat az adott területről elszállítsa és felhígítsa. Állatkísérletek és klinikai vizsgálatok szükségesek, hogy a BC esetleges előnyös tulajdonságait igazolni lehessen a konvencionális graftokkal szemben.

A különböző (ISO-standard) tesztek közül, amiket a vérrel érintkező anyagok esetében használnak, a thrombin termelődési módszer (thrombin generation assay) a legérzékenyebb és legreprodukálhatóbb teszt, a bioanyagok felszínidukálta koagulációs tulajdonságainak megítélésére.<sup>229</sup> További előnyként említhető a magas mintaszám lehetősége, ami a vizsgált felszínnek közvetlen összehasonlítást teszi lehetővé egyetlen mérési folyamatban.

A thrombin keletkezésének vizsgálatára javasolt módszerünk egyszerű és gyors. Megjegyzendő, hogy ezeket a méréseket vérplazmában hajtottuk végre, de az in vivo körülmények természetesen sokkal bonyolultabb helyzetet teremtenek, amiben szerepet kapnak továbbá a vér alakos elemei és az immun-komplement rendszer is. Az itt leírt vizsgálati eljárások (különösen komplement aktivációs mérésekkel kombinálva) alkalmasak a vérrel érintkező bioanyagok gyors szűrővizsgálatára. Továbbá az új bioanyagok fejlesztésében, módosításában alapvető fontosságú vizsgálati eszköz lehet.



## 6. Következtetések

- I. Az irodalmi adatokkal összhangban jelentős egyéni különbségeket tapasztaltunk a frissen explantált vena saphena magna szakaszok biomechanikai és szövettani vonatkozásában.
- II. A tápkultúra médiumban (X-VIVO™ 10) 4 C°-on tárolt VSM szegmentumok megőrzik geometriai és elasztikus tulajdonságaikat akár 4 hetes tárolás után is, szemben a fiziológiás sóoldatban (normál Krebs-Ringer) tárolt mintákkal, amelyeknél már 2 hetes tárolás után geometriai elváltozások és az aktív rugalmas tulajdonságok teljes hiánya alakult ki.
- III. Biomechanikai profil tekintetében a 4 hétig hűtve tárolt, illetve a krioprezervált és felolvasztott VSM szegmentumok nem mutatnak szignifikáns eltérést. Vagyis egymással adott esetben helyettesíthetők.
- IV. Fénymikroszkópos morfológiai értékelésünk az érszövetek lassú dezintegrációját és az extracelluláris elemek károsodását mutatják, amit elsősorban a tárolás ideje befolyásolt, nem a tároló médium.
- V. A sebészetben felhasznált idegen anyagok (esetünkben vascularis pótlóanyagok) felszíni koagulációs tulajdonságainak vizsgálatára mind az ELISA tálcára adaptált spektrofotometriás eljárás, mind a PMMA küvettákban kivitelezett vizualizációs módszer egy érzékeny, reprodukálható, gyors eljárás, ami távlatokat nyithat a vascularis graftok in vitro koagulációs vizsgálataira.

## 7. Összefoglalás

Munkánkban az ér- és szívsebészet egyik legfontosabb biológiai pótló anyagát a humán ven saphena magnát vettük górcső alá, annak is biomechanikai változásait, eltéréseit vizsgáltuk különböző tárolási feltételek és időtartam után.

A kísérletekhez összesen 32 betegtől származó 72 véna szegmentumot használtunk fel, amit a tárolás alapján 8 csoportra osztottunk: (1) friss, (2) 4°C nKR-1hetes, (3) 4°C nKR-2hetes, (4) 4°C X-VIVO-1hetes, (5) 4°C X-VIVO-2hetes, (6) 4°C X-VIVO-3hetes, (7) 4°C X-VIVO-4hetes, (8) mélyfagyasztott tárolás csoportra. A nKR oldatban tárolt minták egy hét után elveszítették aktív és passzív rugalmasságukat. A tápfolyadékban tárolt minták egy hét elteltével is megőrizték kontrakciós képességüket, és ez a további tárolás (2,3,4 hét) során is csak lassan csökkent. Ezen minták a tárolás alatt megőrizték geometriai tulajdonságaikat, és a friss vénákéhoz hasonló elasztikus tulajdonságokat mutattak. A mélyfagyasztott-felolvasztott minták falvastagsága megnövekedett és rugalmasságuk részben megmaradt. Biomechanikai profil alapján az X-VIVO™ 10 tápfolyadékban hűtve tárolt véna homograftok, potenciális alternatívát jelenthetnek az ér pótlásban, amennyiben nem áll rendelkezésre megfelelő mennyiségű vagy minőségű autológ véna. Hosszú távú klinikai vizsgálatok szükségesek ezen tárolási módszer széles körű felhasználhatóságának további igazolására.

A felszín indukálta koaguláció mérésére a Hemker-féle thrombin keletkezési módszert adaptáltuk, amely így alkalmas a vascularis graftok (pro)koaguláns tulajdonságainak vizsgálatára, a bakteriális cellulóz és a leggyakrabban használt graftok PET (Dacron®) és ePTFE (GORE-TEX®) felszíni tulajdonságainak összevetésére. Továbbá egy vizualizációs módszerrel, a vizsgált felszínen meginduló koagulációs folyamatok láthatóvá tételére egy egyszerűsített színekódolt módszert alkalmaztunk. A thrombin keletkezési üteme drámai különbségeket mutatott a vizsgált felszín tekintetében: Az ePTFE és a BC felszínen lassabban indult be (lag time) és később tetőzött (tpeak), mint a PET felszínen. A BC esetén tapasztaltuk a legalacsonyabb csúcserőértéket (peak), tehát az indukált alvadás sebessége itt a legkisebb. Az aktivált XII faktor és a felszíni koagulációs idő (PMMA-vizualizáció) vizsgálatok is hasonló eredményt kaptunk (átlag ± SD): PET (27 ± 8 min) < BC (46 ± 9 min) < ePTFE (61 ± 21 min). Ezek az eljárások távlatokat nyithatnak a vérrel érintkező bioanyagok, vascularis graftok in vitro koagulációs vizsgálatára.

## 8. Summary

This study investigated one of the most important biologic vascular prosthesis, the human great saphenous vein. We studied the biomechanical alteration after different storage conditions lasting different times.

Altogether, 72 vein segments remaining from CABG of 32 patients were collected and divided into eight groups: (1) fresh, (2) stored in 4°C nKR solution for 1 week, (3) stored in 4°C nKR solution for 2 weeks, (4) stored in 4°C TCM for 1 week, (5) stored in 4°C TCM for 2 weeks, (6) stored in 4°C TCM for 3 weeks, (7) stored in 4°C TCM for 4 weeks, (8) cryopreserved samples. When stored in nKR (normal Kerbs-Ringer solution), we found dilated segmental morphology, decreased distensibility and these segments lost their ability to contract in a week. In contrast, TCM (X-VIVO™ 10)-stored vein segments maintained their contractility for a week, which decreased only slowly afterwards (2,3,4 weeks). Their lumen diameter did not alter in 4 weeks of storage time and elastic parameters of these segments were similar to the fresh segments. Cryopreserved samples exhibited thickened wall, decreased lumen diameter, and contractility. Due to its advantageous biomechanical profile the TCM stored great saphenous vein could be a feasible alternative for different vascular reconstructions in absence of autogenous vein. Long-term studies are necessary to investigate the potential clinical applicability.

For measurements of biomaterial-induced coagulation we have adapted the automated calibrated thrombin generation method to compare BC with clinically used graft materials i.e., expanded poly(tetrafluoroethylene) (ePTFE) and poly(ethyleneterephthalat) (PET). We have also visualized the coagulation propagation at the material surfaces. Thrombin generation experiments revealed dramatic differences between the materials tested. Both ePTFE and BC were found to generate longer lag times and  $t_{peak}$  values than PET. Most importantly, BC was found to generate the lowest “peak”, indicating a slower coagulation process at the surface. These results are also supported by the measurements of factor XIIIa generation and analysis of surface coagulation times, which were detected in the following increasing order (mean  $\pm$  SD): PET (27  $\pm$  8 min) < BC (46  $\pm$  9 min) < ePTFE (61  $\pm$  21 min). Real-time measurement of coagulation seems to have the potential for becoming a powerful tool for evaluation of biomaterials for blood-contacting devices.

## 9. Irodalomjegyzék

---

<sup>1</sup> Carrel A, Guthrie CC. Anastomosis of blood vessels by the patching method and transplantation of the kidney. JAMA, 1906;47:1648-51.

<sup>2</sup> Goyanes DJ. Substitution Plastica de las Arterias por Pas Vena o Arterioplastica Venosa, Aplicado Como Naevo Metodica Tratamiento de los Anemismas. El Siglo Medico, 1906;1:346-62.

<sup>3</sup> Lexer F. Die ideale Operation des Arteriellen und des Arteriennen-venosen aneurysma. Archiv Klin Chir, 1907;83:459-60.

<sup>4</sup> Carrel A. Heterotransplantation of blood vessels preserved in cold storage. J Exp Med, 1907;9(2):226-8.

<sup>5</sup> Antunes JL. Egas Moniz and cerebral angiography. J Neurosurgery, 1974;40:427-32.

<sup>6</sup> Linhardt RJ. Heparin: An important drug enters its seventh decade. Chem Indust, 1991;2:45-50.

<sup>7</sup> Kunlin J. Le traitement de l'arterite obliterante par la greffe veineuse. Arch Mai Coeur, 1949;42:371-2.

<sup>8</sup> Holden WD. Reconstruction of the femoral artery for atherosclerotic thrombosis. Surgery, 1950;27:417.

<sup>9</sup> Dubost C, Allary M, DeConomos N. A propos du traitement des aneurysmes de l'aorte: ablation de l'aneurysme et retablissement de la continuité par greffe d' aorte humaine conservée. Mem Acad Chir, 1951;77:381-3.

- <sup>10</sup> Barner HB, DeWeese JA, Dale WA, Mahoney EB. Aneurysmal degeneration of femoropopliteal arterial homografts. *JAMA*, 1966;196:631-4.
- <sup>11</sup> Knox WG, Miller RE. Long-term appraisal of aortic and arterial homografts implanted in years 1954-1957. *Ann Surg*, 1970;172:1076-8.
- <sup>12</sup> Szilagyi DE, Rodriguez FJ, Smith RF, Elliott JP. Late fate of arterial allografts. Observation 6 to 15 years after implantation. *Arch Surg*, 1970;101:721-33.
- <sup>13</sup> Levin SM. Breakthrough: Arthur Blakemore and Arthur Voorhees, Jr. *J Vasc Surg*, 2012;55(6):1829-31.
- <sup>14</sup> Ivan O. Michael E DeBakey. *The Lancet*, 2008;372:530.
- <sup>15</sup> Soyer T, Lempinen M, Cooper P, Norton L, Eiseman B. A new venous prosthesis. *Surgery*, 1972;72(6):864-72.
- <sup>16</sup> Campbell CD, Brooks DH, Webster MW, Bahnson HT. The use of expanded microporous polytetrafluoroethylene for limb salvage: a preliminary report. *Surgery*, 1976;79(5):485-91.
- <sup>17</sup> Rob CG. Discussion following Szilagyi DE, Smith RF, Elliott JP. Venous autografts in femoropopliteal arterioplasty. Observations in treatment of occlusive disease. *Arch Surg*, 1964;89:113-25.
- <sup>18</sup> Hall K. The great saphenous vein used in situ as an arterial shunt after extirpation of the vein valves. A preliminary report. *Surgery*, 1962;51:492-5.
- <sup>19</sup> Leather RP, Powers SB, Karmody AM. A reappraisal of the in situ saphenous vein arterial bypass: its use in limb salvage. *Surgery*, 1979;86:453-61.

<sup>20</sup> Leather RR, Shah DM, Buchbinder D, Annest SJ, Karmody AM. Further experience with the saphenous vein used in situ for arterial bypass. *Am J Surg*, 1981;142(4):506-10.

<sup>21</sup> Sabiston Jr DC. The William F. Rienhoff, Jr. lecture. The coronary circulation. *John Hopkins Med J*, 1974;134(6):314-29.

<sup>22</sup> Garrett HE, Dennis EW, DeBakey ME. Aortocoronary bypass with saphenous vein graft: seven year follow up. *JAMA*, 1973;223:792-4.

<sup>23</sup> Favaloro RG. Saphenous vein autograft replacement of severe sequential coronary artery occlusion. Operative technique. *Ann Thorac Surg*, 1968;5:334-9.

<sup>24</sup> Parodi JC, Palmaz JC, Barone HD. Transfemoral intraluminal graft implantation for abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg*, 1991;5(6):491-9.

<sup>25</sup> Higgs ZC, Macafee DA, Braithwaite BD, Maxwell-Armstrong CA. The Seldinger technique: 50 years on. *Lancet*. 2005;366(9494):1407-9.

<sup>26</sup> Acar C, Jebara VA, Portoghese M, Beyssen B, Pagny JY, Grare P, et al. Revival of the radial artery for coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg*, 1992;54:652–60.

<sup>27</sup> Lu FL, Xu YQ, Li FD. The anatomy of inferior epigastric artery used as a graft for coronary bypass grafting. *Chin J Clin Anat*, 1993;11:47–9.

<sup>28</sup> Puig LB, Ciongolli W, Cividanés GV, Dontos A, Kopel L, Bittencourt D, et al. Inferior epigastric artery as a free graft for myocardial revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1990;99:251–5.

<sup>29</sup> Shatapathy P, Aggarwal BK, Punnen J. Inferior mesenteric artery as a free arterial conduit for myocardial revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1997;113:210–1.

<sup>30</sup> Mills NL, Everson CT. Right gastroepiploic artery: a third arterial conduit for coronary artery bypass. *Ann Thorac Surg*, 1989;47:706–11.

<sup>31</sup> Nemes A, Acsády G, Fraefel W, Lichti H, Monos E, Oertli R, Somogyi E, Sótonyi P. Application of a vascular graft material (Solcograft-P) in experimental surgery. *Biomaterials*, 1985;6(5):303-11.

<sup>32</sup> Schröder A, Imig H, Peiper U, Neidel J, Petereit A. Results of a bovine collagen vascular graft (Solcograft-P) in infra-inguinal positions. *Eur J Vasc Surg*, 1988;2(5):315-21.

<sup>33</sup> Birchall IE, Lee VW, Ketharanathan V. Retention of endothelium on ovine collagen biomatrix vascular conduits under physiological shear stress. *Biomaterials*, 2001;22(23):3139-44.

<sup>34</sup> Wilbring M, Tugtekin SM, Zatschler B, Ebner A, Reichenspurner H, Matschke K, Deussen A. Even short-time storage in physiological saline solution impairs endothelial vascular function of saphenous vein grafts. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2011;40(4):811-5.

<sup>35</sup> Dodd PD. What tissue bankers should know about the use of allograft blood vessels. *Cell Tissue Bank*. 2010 Feb;11(1):3-11.

<sup>36</sup> Spallanzani L.: *Opuscoli di fisce, animale e vegetabile opuscola. Osservazioni esperienze introtno ai vernicelli spermatici dell'uomo e deglianimali.* 1776.

<sup>37</sup> Stout TA. Cryopreservation of equine embryos: current state-of-the-art. *Reprod Domest Anim*, 2012;47(3):84-9.

<sup>38</sup> O'Brien MF, Stafford EG, Gardner MA, Pohlner PG, McGiffin DC. A comparison of aortic valve replacement with viable cryopreserved and fresh allograft valves, with a note on chromosomal studies. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1987;94:812–23.

<sup>39</sup> 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 Jan 11. [Epub ahead of print]

<sup>40</sup> Tabaku M, Jashari R, Carton HF et al Processing of cardiovascular allografts: effectiveness of European Homograft Bank (EHB) antimicrobial treatment (cool decontamination protocol with low concentration of antibiotics). *Cell Tissue Bank*, 2004;5:261–6.

<sup>41</sup> Fan YD, 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(2):297-304.

<sup>42</sup> Jashari R, Goffin Y, Van Hoeck B et al. Belgian and European experience with the European Homograft Bank (EHB) cryopreserved allograft valves. Assessment of a 20 year activity. *Acta Chir Belg*, 2010;110:280–290

<sup>43</sup> Belzer FD. Preservation of the kidney. In: Sabiston DC jr, ed *Davis-Christopher Textbook of surgery. The biological basis of modern surgical practice* 11<sup>th</sup> edition. Philadelphia, Saunders, 1977:523-5.

<sup>44</sup> Molnár GF. A máj artériás keringésének vizsgálata transzplantáció előtt és után. (rektori pályamunka) 2005.



- <sup>45</sup> Martínez JA, Rigamonti W, Rahier J, Gigi J, Lerut J, De Ville de Goyet J, Otte JB, Reding R. Preserved vascular homograft for revascularization of pediatric liver transplant: a clinical, histological, and bacteriological study. *Transplantation*, 1999;68(5):672-7.
- <sup>46</sup> Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*, 1988;45(4):673-6.
- <sup>47</sup> Blankensteijn JD, Terpstra OT. Liver preservation: the past and the future. *Hepatology*, 1991;13(6):1235-50.
- <sup>48</sup> Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation*, 1992;53(5):957-78.
- <sup>49</sup> Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG, de Groot H. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J*, 1999;13(1):155-68.
- <sup>50</sup> Rauen U, de Groot H. Mammalian cell injury induced by hypothermia - the emerging role for reactive oxygen species. *Biol Chem*, 2002;383(3-4):477-88.
- <sup>51</sup> Salahudeen AK. Cold ischemic injury of transplanted kidneys: new insights from experimental studies. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004;287(2):181-7.
- <sup>52</sup> Tilney NL, Guttman RD. Effects of initial ischemia/reperfusion injury on the transplanted kidney. *Transplantation*, 1997;64(7):945-7.
- <sup>53</sup> Lu CY, Penfield JG, Kielar ML, Vazquez MA, Jeyarajah DR. Hypothesis: is renal allograft rejection initiated by the response to injury sustained during the transplant process? *Kidney Int*, 1999;55(6):2157-68.

<sup>54</sup> Land W. Postischemic reperfusion injury and allograft dysfunction: is allograft rejection the result of a fateful confusion by the immune system of danger and benefit? *Transplant Proc*, 1999;31(1-2):332-6.

<sup>55</sup> Land W. Postischemic reperfusion injury to allografts - a case for 'innate immunity'? *Eur Surg Res*, 2002;34(1-2):160-9.

<sup>56</sup> Hochachka PW. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science*, 1986;231:234-41.

<sup>57</sup> Fuckert O, Rauen U, De Groot H. A role for sodium in hypoxic but not in hypothermic injury to hepatocytes and LLC-PK1 cells. *Transplantation*, 2000;70(5):723-30.

<sup>58</sup> Rauen U, Elling B, Gizewski ER, Korth HG, Sustmann R, de Groot H. Involvement of reactive oxygen species in the preservation injury to cultured liver endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, 1997;22(1-2):17-24.

<sup>59</sup> Salahudeen AK, Huang H, Patel P, Jenkins JK. Mechanism and prevention of cold storage-induced human renal tubular cell injury. *Transplantation*, 2000;70(10):1424-31.

<sup>60</sup> Peters SM, Rauen U, Tijssen MJ, Bindels RJ, van Os CH, de Groot H, Wetzels JF. Cold preservation of isolated rabbit proximal tubules induces radical-mediated cell injury. *Transplantation*, 1998;65(5):625-32.

<sup>61</sup> Rauen U, de Groot H. Cold-induced release of reactive oxygen species as a decisive mediator of hypothermia injury to cultured liver cells. *Free Radic Biol Med*, 1998;24(7-8):1316-23.

<sup>62</sup> Rauen U, Reuters I, Fuchs A, de Groot H. Oxygen-free radical-mediated injury to cultured rat hepatocytes during cold incubation in preservation solutions. *Hepatology*, 1997;26(2):351-7.

<sup>63</sup> Salahudeen AK, Joshi M, Jenkins JK. Apoptosis versus necrosis during cold storage and rewarming of human renal proximal tubular cells. *Transplantation*, 2001;72(5):798-804.

<sup>64</sup> Rauen U, Petrat F, Li T, De Groot H. Hypothermia injury/cold-induced apoptosis--evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O<sub>2</sub>-/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation. *FASEB J*, 2000;14(13):1953-64.

<sup>65</sup> Kerkweg U, Li T, de Groot H, Rauen U. Cold-induced apoptosis of rat liver cells in University of Wisconsin solution: the central role of chelatable iron. *Hepatology*, 2002;35(3):560-7.

<sup>66</sup> Vairetti M, Griffini P, Pietrocola G, Richelmi P, Freitas I. Cold-induced apoptosis in isolated rat hepatocytes: protective role of glutathione. *Free Radic Biol Med*, 2001;31(8):954-61.

<sup>67</sup> Rauen U, de Groot H. New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage injury. *J Investig Med*, 2004;52(5):299-309.

<sup>68</sup> Lemasters JJ. V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol*, 1999;276:1-6.

<sup>69</sup> Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998;281(5381):1309-12.

<sup>70</sup> Kim JS, He L, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;304(3):463-70.

- <sup>71</sup> Elsässer A, Suzuki K, Lorenz-Meyer S, Bode C, Schaper J. The role of apoptosis in myocardial ischemia: a critical appraisal. *Basic Res Cardiol*, 2001;96(3):219-26.
- <sup>72</sup> Saikumar P, Dong Z, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. *Oncogene*, 1998;17(25):3341-9.
- <sup>73</sup> Suleiman MS, Halestrap AP, Griffiths EJ. Mitochondria: a target for myocardial protection. *Pharmacol Ther*, 2001;89(1):29-46.
- <sup>74</sup> Javadov SA, Clarke S, Das M, Griffiths EJ, Lim KH, Halestrap AP. Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart. *J Physiol*, 2003;549:513-24.
- <sup>75</sup> Argaud L, Gateau-Roesch O, Chalabreysse L, Gomez L, Loufouat J, Thivolet-Béjui F, Robert D, Ovize M. Preconditioning delays Ca<sup>2+</sup>-induced mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res*, 2004;61(1):115-22.
- <sup>76</sup> Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res*, 2004;61(3):372-85.
- <sup>77</sup> Huang H, Salahudeen AK. Cold induces catalytic iron release of cytochrome P-450 origin: a critical step in cold storage-induced renal injury. *Am J Transplant*, 2002;2(7):631-9.
- <sup>78</sup> Des R. Richardson, Darius J. R. Lane, Erika M. Becker, Michael L.-H. Huang, Megan Whitnall, Yohan Suryo Rahmanto, Alex D. Sheftel, Prem Ponka Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010;107(24):10775–82.

<sup>79</sup> Rauen U, Schulze Frenking GE, deGroot H, Kälteschädigung/kälteinduzierte Apoptose: klein Schutz durch Konservierungslösungen, aber Protektion durch Eisenchelatoren. *Transplantationsmedizin*, 2002;14:102-9.

<sup>80</sup> Arthur PG, Niu XW, Huang WH, Deboer B, Lai CT, Rossi E, Joseph J, Jeffrey GP. Desferrioxamine in warm reperfusion media decreases liver injury aggravated by cold storage. *World J Gastroenterol*, 2013;19(5):673-81.

<sup>81</sup> Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003;284(1):15-26.

<sup>82</sup> Rauen U, de Groot H. New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage injury. *J Investig Med*, 2004;52(5):299-309.

<sup>83</sup> Yard B, Beck G, Schnuelle P, Braun C, Schaub M, Bechtler M, Göttmann U, Xiao Y, Breedijk A, Wandschneider S, Lösel R, Sponer G, Wehling M, van der Woude FJ. Prevention of cold-preservation injury of cultured endothelial cells by catecholamines and related compounds. *Am J Transplant*, 2004;4(1):22-30.

<sup>84</sup> Nagy S, Paál M, Kószegi T, Ludány A, Kellermayer M. ATP and integrity of human red blood cells. *Physiol Chem Phys Med NMR*, 1998;30(2):141-8.

<sup>85</sup> van Leeuwen EB, Molema G, van Luyn MJ, de Jong KP, Dijk F, Slooff MJ, Ruiters MH, van der Meer J. Scanning electron microscopic analysis of endothelial cell coverage and quality in large vessels from multi-organ donors: effects of preservation on endothelial cell integrity. *Clin Transplant*, 2000;14(3):246-51.

<sup>86</sup> Ebner A, Poitz DM, Augstein A, Strasser RH, Deussen A. Functional, morphologic, and molecular characterization of cold storage injury. *J Vasc Surg*, 2012;56(1):189-98.

- <sup>87</sup> Hooper TL, Jones MT, Thomson DS, Cook L, Owen S, Wilkes S, Woodcock A, Webster AH, Hasleton P, McGregor CG. Hypertonic citrate solution as an alternative to modified Euro-Collins' solution for lung preservation. *Transplantation*, 1991;51(5):1043-8.
- <sup>88</sup> Collins GM, Wicomb WN. New organ preservation solutions. *Kidney Int Suppl*, 1992;38:S197-202.
- <sup>89</sup> Fuller BJ. The effects of cooling on mammalian cells. In: Fuller BJ, Grout BW, eds. *Clinical applications of cryobiology*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1991:1-21
- <sup>90</sup> Häyry P. Chronic rejection: an update on the mechanism. *Transplant Proc*, 1998;30(8):3993-5.
- <sup>91</sup> Land W, Schneeberger H, Schleibner S, Illner WD, Abendroth D, Rutili G, Arfors KE, Messmer K. The beneficial effect of human recombinant superoxide dismutase on acute and chronic rejection events in recipients of cadaveric renal transplants. *Transplantation*, 1994;57(2):211-7.
- <sup>92</sup> Gourishankar S, Halloran PF. Late deterioration of organ transplants: a problem in injury and homeostasis. *Curr Opin Immunol*, 2002;14(5):576-83.
- <sup>93</sup> Valantine HA. Cardiac allograft vasculopathy: central role of endothelial injury leading to transplant "atheroma". *Transplantation*, 2003;76(6):891-9.
- <sup>94</sup> Hidalgo MA, Shah KA, Fuller BJ, Green CJ. Cold ischemia-induced damage to vascular endothelium results in permeability alterations in transplanted lungs. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1996;112(4):1027-35.
- <sup>95</sup> Oka T, Puskas JD, Mayer E, Cardoso PF, Shi SQ, Wisser W, Slutsky AS, Patterson GA. Low-potassium UW solution for lung preservation. Comparison with regular UW, LPD, and Euro-Collins solutions. *Transplantation*, 1991;52(6):984-8.

- <sup>96</sup> Pickford MA, Gower JD, Simpkin S, Sampson M, Green CJ. Function of single rat lung isografts after 48-hour cold storage. The effect of treatment with free radical antagonists and prostacyclin PGI<sub>2</sub>. *Transplantation*, 1991;51(4):743-9.
- <sup>97</sup> Garbe S, Zatschler B, Müller B, Dieterich P, Ebner A, Rauen U, Matschke K, Deussen A. Preservation of human artery function following prolonged cold storage with a new solution. *J Vasc Surg*. 2011 Apr;53(4):1063-70.
- <sup>98</sup> Galambos B, Csöngé L, Olah A, von Versen R, Tamas L, Zsoldos P. Quantitative reduction of methyl tetrazolium by fresh vein homograft biopsies in vitro is an index of viability. *Eur Surg Res*. 2004 Nov-Dec;36(6):371-5.
- <sup>99</sup> Galambos B, Csöngé L, von Versen R, Olah A, Tamas L, Zsoldos P. Preservation of vein allograft viability during long-term storage. *Eur Surg Res*. 2005 Jan-Feb;37(1):60-7.
- <sup>100</sup> Brown KE, Heyer K, Rodriguez H, Eskandari MK, Pearce WH, Morasch MD. Arterial reconstruction with cryopreserved human allografts in the setting of infection: A single-center experience with midterm follow-up. *J Vasc Surg*, 2009;49(3):660-6.
- <sup>101</sup> Bíró G, Szeberin Z, Nemes A, Acsády G. Cryopreserved homograft and autologous deep vein replacement for infrarenal aorto and iliaco-femoral graft infection: early and late results. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 2011;52(2):169-76.
- <sup>102</sup> Bisdas T, Bredt M, Pichlmaier M, Aper T, Wilhelmi M, Bisdas S, Haverich A, Teebken OE. Eight-year experience with cryopreserved arterial homografts for the in situ reconstruction of abdominal aortic infections. *J Vasc Surg*, 2010;52(2):323-30.
- <sup>103</sup> Long-term results of cryopreserved arterial allograft reconstruction in infected prosthetic grafts and mycotic aneurysms of the abdominal aorta.

Lesèche G, Castier Y, Petit MD, Bertrand P, Kitzis M, Mussot S, Besnard M, Cerceau O. *J Vasc Surg.* 2001 Oct;34(4):616-22.

<sup>104</sup> Castier Y, Paraskevas N, Maury JM, Karsenti A, Cerceau O, Legendre AF, Duprey A, Cerceau P, Francis F, Leseche G. Cryopreserved arterial allograft reconstruction for infected peripheral bypass. *Ann Vasc Surg,* 2010;24(8):994-9.

<sup>105</sup> Takamoto S, Nakajima S, Okita Y, Motomura N, Yuasa M, Sada M, Imakita M, Tsuji T. Cryopreserved femoral arterial allografts for vascular access in hemodialysis. *Transplant Proc,* 1998;30(7):3917-9.

<sup>106</sup> Lin PH, Brinkman WT, Terramani TT, Lumsden AB. Management of infected hemodialysis access grafts using cryopreserved human vein allografts. *Am J Surg,* 2002;184(1):31-6.

<sup>107</sup> Olausson M, Patil PB, Kuna VK, Chougule P, Hernandez N, Methe K, Kullberg-Lindh C, Borg H, Ejnell H, Sumitran-Holgersson S. Transplantation of an allogeneic vein bioengineered with autologous stem cells: a proof-of-concept study. *Lancet,* 2012;380(9838):230-7.

<sup>108</sup> Facciuto ME, Rodriguez-Davalos MI, Singh MK, Rocca JP, Rochon C, Chen W, Katta US, Sheiner PA. Recanalized umbilical vein conduit for meso-Rex bypass in extrahepatic portal vein obstruction. *Surgery,* 2009;145(4):406-10.

<sup>109</sup> Bogáts G, Kertész E, Katona M, Tószegi A, Kovács GS. Modified Blalock-Taussig shunt using allograft saphenous vein: six years' experience. *Ann Thorac Surg,* 1996;61(1):58-62.

<sup>110</sup> Caspi J, Pettitt TW, Mulder T, Stopa A. Development of the pulmonary arteries after the Norwood procedure: comparison between Blalock-Taussig shunt and right ventricular-pulmonary artery conduit. *Ann Thorac Surg,* 2008;86(4):1299-304.



<sup>111</sup> Kaye AJ, Slemp AE, Chang B, Mattei P, Fairman R, Velazquez OC. Complex vascular reconstruction of abdominal aorta and its branches in the pediatric population. *J Pediatr Surg*, 2008;43(6):1082-8.

<sup>112</sup> Meyers RL, Lowichik A, Kraiss LW, Hawkins JA. Aortoiliac reconstruction in infants and toddlers: replacement with decellularized branched pulmonary artery allograft. *J Pediatr Surg*, 2006;41(1):226-9.

<sup>113</sup> La Barbera G, Pumilia G, La Marca G, Martino A. Denatured venous homograft as an arterial substitute in civilian vascular injuries. Thirty months' experience. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 1998;15(6):467-71.

<sup>114</sup> Wurtz A. Tracheal replacement with banked cryopreserved aortic allograft. *Ann Thorac Surg*, 2010;89(6):2072.

<sup>115</sup> Davidson MB, Mustafa K, Girdwood RW. Tracheal replacement with an aortic homograft. *Ann Thorac Surg*, 2009;88(3):1006-8.

<sup>116</sup> Mestres CA, Mulet J, Pomar JL. Large-caliber cryopreserved arterial allografts in vascular reconstructive operations: early experience. *Ann Thorac Surg*, 1995;60(2):105-7.

<sup>117</sup> Billing JS, Sudarshan CD, Schofield PM, Murgatroyd F, Wells FC. Aortic arch homograft as a bypass conduit for superior vena cava obstruction. *Ann Thorac Surg*, 2003;76(4):1296-7.

<sup>118</sup> Meniconi RL, Ettore GM, Vennarecci G, Lepiane P, Colasanti M, Laurenzi A, Colace L, Santoro R. Use of cold-stored vein allografts for venous reconstruction during pancreaticoduodenectomy. *J Gastrointest Surg*, 2013;17(7):1233-9.

<sup>119</sup> Udwardia TE. Treatment of hydrocephalus using saphenous vein homograft. *Arch Dis Child*, 1969;44(235):422-7.

<sup>120</sup> Willems A. Remarks about tympanoplastic (personel methods) (author's transl) *Laryngol Rhinol Otol*, 1976;55(5):382-6.

<sup>121</sup> Saunders CR, Tedesco DJ, Yee ES. Reverse Saphenous Vein Homografts as Bypass Conduits: A Preliminary Report. *J Vasc Endovasc Surg*, 1992;26(7):562.

<sup>122</sup> Wurtz A, Hysi I, Zawadzki C, Soenen V, Hubert T, Banfi C, Jashari R, Copin MC. Construction of a tube-shaped tracheal substitute using fascial flap-wrapped revascularized allogenic aorta. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2012;41(3):663-8.

<sup>123</sup> Radu DM, Seguin A, Bruneval P, Fialaire Legendre A, Carpentier A, Martinod E. Bronchial replacement with arterial allografts. *Ann Thorac Surg*, 2010;90(1):252-8.

<sup>124</sup> Phillips MR, Yamaguchi H, Miller VM, Williams S, Morris JJ, Schaff HV. Endothelial sodding of the Permaflow prosthetic coronary artery bypass conduit. *Ann Thorac Surg* 1998;66(4):1191-7.

<sup>125</sup> Brown, R.M., Jr., J.H. Willison, and C.L. Richardson, Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976;73(12):4565-9.

<sup>126</sup> Ross, P., R. Mayer, and M. Benziman, Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol Rev*, 1991;55(1): 35-58.

<sup>127</sup> Backdahl, H., et al., Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. *Biomaterials*, 2006;27(9):2141-9.

<sup>128</sup> Iguchi, M., S. Yamanaka, and A. Budhiono, Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts. *Journal of Materials Science*, 2000;35(2):261-270.

- <sup>129</sup> Backdahl, H., et al., Engineering microporosity in bacterial cellulose scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med*, 2008;2(6):320-30.
- <sup>130</sup> Williams, D.F. *The Williams dictionary of biomaterials*. Liverpool Univ. Press., Liverpool, 1999:40
- <sup>131</sup> Helenius, G., et al., In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *J Biomed Mater Res A*, 2006;76(2):431-8.
- <sup>132</sup> Wippermann, J., et al., Preliminary results of small arterial substitute performed with a new cylindrical biomaterial composed of bacterial cellulose. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2009;37(5):592-6.
- <sup>133</sup> Czaja W, Krystynowicz A, Bielecki S, Brown RM Jr. Microbial cellulose--the natural power to heal wounds. *Biomaterials*, 2006;27(2):145-151.
- <sup>134</sup> Svensson A, Nicklasson E, Harrah T, Panilaitis B, Kaplan DL, Brittberg M, Gatenholm P. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials*. 2005;26(4):419-31.
- <sup>135</sup> Fontana JD, de Souza AM, Fontana CK, Torriani IL, Moreschi JC, Gallotti BJ, de Souza SJ, Narcisco GP, Bichara JA, Farah LF. Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. *Appl Biochem Biotechnol*. 1990;24-25:253-64.
- <sup>136</sup> Cox RH. Three-dimensional mechanics of arterial segments in vitro: Methods. *J Appl Physiol*, 1974;36:381-4.
- <sup>137</sup> Jellinek H, Nagy Z, Hüttner I, Bálint A, Kóczé A, Kerényi T. Investigations of the permeability changes of the vascular wall in experimental malignant hypertension by means of a colloidal iron preparation. *Br J Exp Pathol*. 1969;50(1):13-6.

<sup>138</sup> Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoort R, Lecompte T, Béguin S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2003;33(1):4-15.

<sup>139</sup> Andersson, J., et al., Optimal heparin surface concentration and antithrombin binding capacity as evaluated with human non-anticoagulated blood in vitro. *J Biomed Mater Res A*, 2003;67(2):458-66.

<sup>140</sup> Faxalv L, Tengvall P, Lindahl TL. Imaging of blood plasma coagulation and its propagation at surfaces. *J Biomed Mater Res A* 2008;85(4):1129–34.

<sup>141</sup> Kenausis GL, Voros J, Elbert DL, Huang NP, Hofer R, Ruiz-Taylor L, Textor M, Hubbell JA, Spencer ND. Poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) layers on metal oxide surfaces: Attachment mechanism and effects of polymer architecture on resistance to protein adsorption. *J Phys Chem*. 2000;104:3298-3309.

<sup>142</sup> Wilson CH, Stansby G, Haswell M, Cunningham AC, Talbot D. Evaluation of eight preservation solutions for endothelial in situ preservation. *Transplantation*. 2004;78(7):1008-13.

<sup>143</sup> Armentano RL, Santana DB, Cabrera-Fischer AI, Graf S, Campos HP, Germa YZ, et al. An in vitro study of cryopreserved and fresh human arteries: a comparison of ePTFE prostheses and human arteries studied non-invasively in vivo. *Cryobiology* 2006;52:17

<sup>144</sup> Bia D, Pessana F, Armentano R, Perez H, Graf S, Zocalo Y, et al. Cryopreservation procedure does not modify human carotid homografts mechanical properties: and isobaric and dynamic analysis. *Cell Tissue Bank* 2006;7:183.

<sup>145</sup> Bia D, Barra JG, Armentano RL, Zocalo Y, Perez H, Saldias M, et al. Cryografts implantation in human circulation would ensure a physiological transition in the arterial wall energetics, damping and wave reflection. *Physiol Res* 2008;57:351.

<sup>146</sup> Santana DB, Armentano RL, Zocalo Y, Perez Campos H, Cabrera FE, Graf S, et al. Functional properties of cryopreserved carotid and femoral arteries, and of venous and synthetic grafts: comparison with arteries from normotensive and hypertensive patients. *Cell Tissue Bank* 2007;8:43

<sup>147</sup> Olivier TV, Mitchell D, Crowe D, Romeo R, Gray K, Morrison W. Effects of cold storage on the subsequent structure and function of microvenous autografts. *Br J Plastic Surg* 1994;47:548.

<sup>148</sup> Thatte HS, Biswas KS, Najjar SF, Birjiniuk V, Crittenden MD, Michel T, et al. Multi-photon microscopy evaluation of saphenous vein endothelium and its preservation with a new solution, GALA. *Ann Thorac Surg* 2004;77:1145.

<sup>149</sup> Cavallari N, Abebe W, Mingoli A, Hunter III WJ, Agrawal DK, Sapienza P, et al. Functional and morphological evaluation of canine veins following preservation in different storage media. *J Surg Res* 1997;68:106.

<sup>150</sup> Vischjager M, VanGulik TM, Pfaffendorf M, VanZwieten PA, VanMarle J, Kromhout JG, et al. Morphology and function of dog arterial grafts preserved in UW-solution. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1996;12:508.

<sup>151</sup> Crowe DM, Hurley JV, Mitchell GM, Niazi Z, Morrison WA. Longterm studies of cold-stored rabbit femoral artery and vein autografts. *Br J Plast Surg* 1998;51:291.

<sup>152</sup> Galambos B, Csonge L, von Versen R, Olah A, Tamas L, Zsoldos P. Preservation of vein allograft viability during long-term storage. *Eur Surg Res*. 2005;37(1):60-7.

<sup>153</sup> Galambos B, Csonge L, Olah A, von Versen R, Tamas L, Zsoldos P. Quantitative reduction of methyl tetrazolium by fresh vein homograft biopsies in vitro is an index of viability. *Eur Surg Res* 2004;36:371.

- <sup>154</sup> Molnár GF, Nemes A, Kékesi V, Monos E, Nádasy GL. Maintained geometry, elasticity and contractility of human saphenous vein segments stored in a complex tissue culture medium. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2010;40(1):88-93.
- <sup>155</sup> Müller-Schweinitzer E. Cryopreservation of vascular tissues. *Organogenesis.* 2009;5(3):97-104.
- <sup>156</sup> Ku DD, Liu Q, Norton P, Caulfield JB. Cryopreservation of coronary endothelium and endothelial-mediated responses. *Cryobiology* 1994;31:82-9.
- <sup>157</sup> Langerak SE, Groenink M, van der Wall EE, Wassenaar C, Vanbavel E, van Baal MC, et al. Impact of current cryopreservation procedures on mechanical and functional properties of human aortic homografts. *Transpl Int* 2001;14:248-55.
- <sup>158</sup> Rendal Vazquez ME, Rodriguez Cabarcos M, Martinez Santos MV, Fernandez Mallo RO, Sanchez Ibanez J, Segura Iglesias R, et al. Functional assessment of cryopreserved human aortas for pharmaceutical research. *Cell Tissue Bank* 2004;5:119-23.
- <sup>159</sup> Rendal Vazquez ME, Rodriguez Cabarcos M, Martinez Santos MV, Fernandez Mallo RO, Sanchez Ibanez J, Segura Iglesias R, et al. Functional assessment of cryopreserved pig aortas for pharmaceutical research. *Cell Tissue Bank* 2004;5:111-8.
- <sup>160</sup> Rendal E, Rodriguez M, Martinez MV, Fernandez RO, Sanchez J, Segura R, et al. Function of cryopreserved pig aortas. *J Surg Res* 2004;120:304-11.
- <sup>161</sup> Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol* 2007;368:39-57.
- <sup>162</sup> Mazur P. Slow-freezing injury in mammalian cells. *Ciba Found Symp* 1977;19-48.

- <sup>163</sup> Bateson EAJ, Pegg DE. Cryopreservation of arteries. *Cryo Letters* 1994;15:15-26.
- <sup>164</sup> Schilling A, Glusa E, Muller-Schweinitzer E. Nature of the vehicle solution for cryopreservation of human peripheral veins: preservation of reactivity to pharmacological stimuli. *Cryobiology* 1995;32:109-13.
- <sup>165</sup> Muller-Schweinitzer E, Striffeler H, Grussenmeyer T, Reineke DC, Glusa E, Grapow MT. Impact of freezing/thawing procedures on the post-thaw viability of cryopreserved human saphenous vein conduits. *Cryobiology* 2007;54:99-105.
- <sup>166</sup> Muller-Schweinitzer E, Mihatsch MJ, Schilling M, Haefeli WE. Functional recovery of human mesenteric and coronary arteries after cryopreservation at -196°C in a serum-free medium. *J Vasc Surg* 1997;25:743-50.
- <sup>167</sup> Muller-Schweinitzer E, Ellis P. Sucrose promotes the functional activity of blood vessels after cryopreservation in DMSO-containing fetal calf serum. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1992;345:594-7.
- <sup>168</sup> Muller-Schweinitzer E. Cryopreservation: a useful technique for storing tissues for pharmacological investigations. *Trends Pharmacol Sci* 1988;9:221-3.
- <sup>169</sup> Muller-Schweinitzer E. Cryopreservation of isolated blood vessels. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch* 1988;115:405-9.
- <sup>170</sup> Muller-Schweinitzer E, Stulz P, Striffeler H, Haefeli WE. Functional activity and transmembrane signaling mechanisms after cryopreservation of human internal mammary arteries. *J Vasc Surg* 1998;27:528-37.
- <sup>171</sup> Muller-Schweinitzer E, Grapow M, Konerding MA, Zerkowski HR. Freezing without surrounding cryomedium preserves the endothelium and its function in human internal mammary arteries. *Cryobiology* 2005;51:54-65.

<sup>172</sup> Arnaud F. Endothelial and smooth muscle changes of the thoracic and abdominal aorta with various types of cryopreservation. *J Surg Res* 2000;89:147-54.

<sup>173</sup> Pascual G, Rodriguez M, Corrales C, Turegano F, Garcia-Honduvilla N, Bellon JM, et al. New approach to improving endothelial preservation in cryopreserved arterial substitutes. *Cryobiology* 2004;48:62-71.

<sup>174</sup> Pascual G, Garcia-Honduvilla N, Rodriguez M, Turegano F, Bujan J, Bellon JM. Effect of the thawing process on cryopreserved arteries. *Ann Vasc Surg* 2001;15:619-27.

<sup>175</sup> Bateson EA, Busza AL, Pegg DE, Taylor MJ. Permeation of rabbit common carotid arteries with dimethyl sulfoxide. *Cryobiology* 1994;31:393-7.

<sup>176</sup> Arnaud F. Endothelial and smooth muscle changes of the thoracic and abdominal aorta with various types of cryopreservation. *J Surg Res* 2000;89:147-54.

<sup>177</sup> Rendal E, Santos MV, Rodriguez M, Sanchez J, Segura R, Matheu G, et al. Effects of cryopreservation and thawing on the structure of vascular segment. *Transplant Proc* 2004;36:3283-7.

<sup>178</sup> Rendal Vazquez ME, Rodriguez Cabarcos M, Martinez Santos MV, Fernandez Mallo RO, Sanchez Ibanez J, Segura Iglesias R, et al. Functional assessment of cryopreserved human aortas for pharmaceutical research. *Cell Tissue Bank* 2004;5:119-23.

<sup>179</sup> Rendal E, Rodriguez M, Martinez MV, Fernandez RO, Sanchez J, Segura R, et al. Function of cryopreserved pig aortas. *J Surg Res* 2004;120:304-11.



<sup>180</sup> Muller-Schweinitzer E, Tapparelli C. Pharmacological studies on frozen stored canine saphenous veins and basilar arteries. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1986;332:74-8.

<sup>181</sup> Ingrid Masson, Anne Fialaire-Legendre, Caroline Godin, Pierre Boutouyrie, Philippe Bierling, Mustapha Zidi Mechanical properties of arteries cryopreserved at  $-80^{\circ}\text{C}$  and  $-150^{\circ}\text{C}$  *Medical Engineering & Physics* 2009;31:825-32

<sup>182</sup> Long-term results of cryopreserved arterial allograft reconstruction in infected prosthetic grafts and mycotic aneurysms of the abdominal aorta. Lesèche G, Castier Y, Petit MD, Bertrand P, Kitzis M, Mussot S, Besnard M, Cerceau O. *J Vasc Surg*. 2001;34(4):616-22.

<sup>183</sup> Goffin YA, Van Hoeck 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(2):207-14.

<sup>184</sup> Zhang A, Cheng S, Gao D, Xu LX. Thermal stress study of two different artery cryopreservation methods. *Cryo Letters* 2005;26:113-20.

<sup>185</sup> Hunt CJ, Song YC, Bateson EA, Pegg DE. Fractures in cryopreserved arteries. *Cryobiology*. 1994;31(5):506-15.

<sup>186</sup> Pegg DE, Wusteman MC, Boylan S. Fractures in cryopreserved elastic arteries. *Cryobiology*. 1997;34(2):183-92.

<sup>187</sup> Bujan J, Pascual G, Garcia-Honduvilla N, Gimeno MJ, Jurado F, Carrera-San Martin A, et al. Rapid thawing increases the fragility of the cryopreserved arterial wall. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;20:13-20.

<sup>188</sup> Pasquinelli G, Foroni L, Buzzi M, Tazzari PL, Vaselli C, Mirelli M, et al. Smooth muscle cell injury after cryopreservation of human thoracic aortas. *Cryobiology* 2006;52:309-16.

<sup>189</sup> Bol M, Van Geyt C, Baert S, Decrock E, Wang N, De Bock M, Gadicherla AK, Randon C, Evans WH, Beele H, Cornelissen R, Leybaert L. Inhibiting connexin channels protects against cryopreservation-induced cell death in human blood vessels. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2013;45(4):382-90.

<sup>190</sup> Hidalgo MA, Mann DJ, Fuller BJ, Green CJ. Effects of depolarizing or non-depolarizing preservation solutions on human endothelial cells during cold hypoxia. *Clin Sci (Lond).* 1996;90(2):135-41.

<sup>191</sup> Pitelka DR, Taggart BN, Hamamoto ST. Effects of extracellular calcium depletion on membrane topography and occluding junctions of mammary epithelial cells in culture. *J Cell Biol.* 1983;96(3):613-24.

<sup>192</sup> Shasby DM, Shasby SS. Effects of calcium on transendothelial albumin transfer and electrical resistance. *J Appl Physiol.* 1986;60(1):71-9.

<sup>193</sup> Ingemansson R, Budrikis A, Bolys R, Sjöberg T, Steen S. Effect of temperature in long-term preservation of vascular endothelial and smooth muscle function. *Ann Thorac Surg.* 1996;61(5):1413-7.

<sup>194</sup> Ingemansson R, Sjöberg T, Steen S. Importance of calcium in long-term preservation of the vasculature. *Ann Thorac Surg.* 1996;61(4):1158-62.

<sup>195</sup> Ingemansson R., Bolys R., Budrikis A., Lindgren A., Sjöberg T., Steen S. Addition of calcium to Euro-Collins solution is essential for 24-hour preservation of the vasculature *Annals of Thoracic Surgery* 1997;63(2):408-13.

- <sup>196</sup> Detrich HW, Jordan MA, Wilson L, Williams RC. Mechanisms of microtubule assembly. *J Biol Chem* 1985;260:16:9479-90
- <sup>197</sup> Bhenke O. Microtubules and microfilaments. *Triangle* 1974;13:7-16.
- <sup>198</sup> Gerlach J, Grehn S, Neuhaus P. Endothelial cell kinetics after anoxia and hypothermia in preservation solutions as indicators of endothelial repair. *Transplant Proc.* 1993;25:1593-4.
- <sup>199</sup> Gotlieb AI. The endothelial cytoskeleton: organization in normal and regenerating endothelium. *Toxicol Pathol* 1990;110:129-41.
- <sup>200</sup> Corner JA, Berwanger CS, Stansby G. Preservation of vascular tissue under hypothermic conditions. *J Surg Res.* 2003;113(1):21-5.
- <sup>201</sup> Jeng LB, Lin PJ, Yao PC, Chen MF, Tsai KT, Chang CH. Impaired endothelium-dependent relaxation of human hepatic arteries after preservation with the University of Wisconsin solution. *Arch Surg.* 1997;132(1):7-12.
- <sup>202</sup> Garlicki M, Kołcz J, Rudziński P, Kapelak B, Sadowski J, Wójcik S, Pietrzyk E, Frasik W, Drukała J, Dziatkowiak A. Myocardial protection for transplantation. *Transplant Proc.* 1999;31(5):2079-83.
- <sup>203</sup> Jahania MS, Sanchez JA, Narayan P, Lasley RD, Mentzer RM Jr. Heart preservation for transplantation: principles and strategies. *Ann Thorac Surg.* 1999;68(5):1983-7.
- <sup>204</sup> Rauen U, Klempt S, de Groot H. Histidine-induced injury to cultured liver cells, effects of histidine derivatives and of iron chelators. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(2):192-205.

<sup>205</sup> Cantoni O, Giacomoni P. The role of DNA damage in the cytotoxic response to hydrogen peroxide/histidine. *Gen Pharmacol.* 1997;29(4):513-6.

<sup>206</sup> Wille T, de Groot H, Rauen U. Improvement of the cold storage of blood vessels with a vascular preservation solution. Study in porcine aortic segments. *J Vasc Surg.* 2008;47(2):422-31.

<sup>207</sup> Rauen U, Kerkweg U, de Groot H. Iron-dependent vs. iron-independent cold-induced injury to cultured rat hepatocytes: a comparative study in physiological media and organ preservation solutions. *Cryobiology.* 2007;54(1):77-86.

<sup>208</sup> Fingas CD, Wu S, Gu Y, Wohlschlaeger J, Scherag A, Dahmen U, Paul A, de Groot H, Rauen U. Assessment of a chloride-poor versus a chloride-containing version of a modified histidine-tryptophan-ketoglutarate solution in a rat liver transplantation model. *Liver Transpl.* 2011;17(6):650-60.

<sup>209</sup> Rauen U, de Groot H. Inherent toxicity of organ preservation solutions to cultured hepatocytes. *Cryobiology.* 2008;56(1):88-92.

<sup>210</sup> Frank A, Rauen U, de Groot H. Protection by glycine against hypoxic injury of rat hepatocytes: inhibition of ion fluxes through nonspecific leaks. *J Hepatol.* 2000;32(1):58-66.

<sup>211</sup> Wu S, Wohlschlaeger J, de Groot H, Rauen U. Evaluation of a modified HTK solution containing the new iron chelator LK 614 in an isolated rat liver perfusion model. *J Invest Surg.* 2009;22(5):340-7.

<sup>212</sup> Wu K, Türk TR, Rauen U, Su S, Feldkamp T, de Groot H, Wiswedel I, Baba HA, Kribben A, Witzke O. Prolonged cold storage using a new histidine-tryptophan-ketoglutarate-based preservation solution in isogeneic cardiac mouse grafts. *Eur Heart J.* 2011;32(4):509-16.

<sup>213</sup> Huang H, He Z, Roberts LJ 2nd, Salahudeen AK. Deferoxamine reduces cold-ischemic renal injury in a syngeneic kidney transplant model. *Am J Transplant.* 2003;3(12):1531-7.

<sup>214</sup> Magni F, Panduri G, Paolucci N. Hypothermia triggers iron-dependent lipoperoxidative damage in the isolated rat heart. *Free Radic Biol Med.* 1994;16(4):465-76

<sup>215</sup> Berberat PO, Katori M, Kaczmarek E, Anselmo D, Lassman C, Ke B, Shen X, Busuttill RW, Yamashita K, Csizmadia E, Tyagi S, Otterbein LE, Brouard S, Tobiasch E, Bach FH, Kupiec-Weglinski JW, Soares MP. Heavy chain ferritin acts as an antiapoptotic gene that protects livers from ischemia reperfusion injury. *FASEB J.* 2003;17(12):1724-6.

<sup>216</sup> Schröder C, Heintz A, Pexa A, Rauen U, Deussen A. Preclinical evaluation of coronary vascular function after cardioplegia with HTK and different antioxidant additives. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2007;31(5):821-6.

<sup>217</sup> Cooper GM (2000). "Tools of Cell Biology". *The cell: a molecular approach.* Washington, D.C: ASM Press.

<sup>218</sup> Madigan M, Martinko J (editors). (2005). *Brock Biology of Microorganisms* (11th ed.). Prentice Hall.

<sup>219</sup> Pukacki F, Jankowski T, Gabriel M, Oszkinis G, Krasinski Z, Zapalski S. The mechanical properties of fresh and cryopreserved arterial homografts. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000;20(1):21-4.

<sup>220</sup> Bia D, Atienza JM, Salvucci F, Zócalo Y, Rojo FJ, García-Herrera C, Claes E, Pérez H, Craiem D, Lluberas S, Fernández D, Laza S, Guinea GV, Armentano RL. Preservation of muscular and elastic artery distensibility after an intercontinental

cryoconserved exchange: theoretical advances in arterial homograft generation and utilization. *Artif Organs*. 2009;33(8):662-9

<sup>221</sup> Pless-Petig G, Metzenmacher M, Türk TR, Rauen U. Aggravation of cold-induced injury in Vero-B4 cells by RPMI 1640 medium - Identification of the responsible medium components. *BMC Biotechnol*. 2012;12:73

<sup>222</sup> Yamanishi H, Iyama S, Yamaguchi Y, Kanakura Y, Iwatani Y. Total iron-binding capacity calculated from serum transferrin concentration or serum iron concentration and unsaturated iron-binding capacity. *Clin Chem*. 2003;49(1):175-8.

<sup>223</sup> Andersson M, Andersson J, Sellborn A, Berglin M, Nilsson B, Elwing H. Quartz crystal microbalance-with dissipation monitoring (QCM-D) for real time measurements of blood coagulation density and immune complement activation on artificial surfaces. *Biosens Bioelectron* 2005;21(1):79–86.

<sup>224</sup> Hamlin GW, Rajah SM, Crow MJ, Kester RC. Evaluation of the thrombogenic potential of three types of arterial graft studied in an artificial circulation. *Br J Surg* 1978;65(4):272–6.

<sup>225</sup> Chatterjee K, Guo Z, Vogler EA, Siedlecki CA. Contributions of contact activation pathways of coagulation factor XII in plasma. *J Biomed Mater Res A*. 2009;90(1):27-34.

<sup>226</sup> Zhuo R, Siedlecki CA, Vogler EA. Autoactivation of blood factor XII at hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Biomaterials* 2006;27(24):4325–32.

<sup>227</sup> Zhuo R, Siedlecki CA, Vogler EA. Competitive-protein adsorption in contact activation of blood factor XII. *Biomaterials* 2007;28(30):4355–69.

<sup>228</sup> Ritter EF, Vann RD, Wyble C, Barwick WJ, Klitzman B. Hydrostatic pressure reduces thrombogenicity of polytetrafluoroethylene vascular grafts. *Am J Physiol* 1989;257:H1076–81.

<sup>229</sup> van Oeveren W, Haan J, Lagerman P, Schoen P. Comparison of coagulation activity tests in vitro for selected biomaterials. *Artif Organs* 2002;26(6):506–11.

## 10. Saját publikációk jegyzéke

**Molnár GF**, Kékesi V, Nádasy GL, Nemes A, Monos E. Vena saphena magna biomechanikai változása különböző tárolási feltételek mellett. *Érbetegségek* 2013;20(3):55-59.

**Molnár GF**, Nemes A, Kékesi V, Monos E, Nádasy GL. Maintained geometry, elasticity and contractility of human saphenous vein segments stored in a complex tissue culture medium. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2010;40(1):88-93.

Fink H, Faxälv L, **Molnár GF**, Drotz K, Risberg B, Lindahl TL, Sellborn A. Real-time measurements of coagulation on bacterial cellulose and conventional vascular graft materials. *Acta Biomater.* 2010;6(3):1125-30.



## 11. Köszönetnyilvánítás

Legelőször szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, pártfogómnak, dr. Nemes Attila professzor úrnak, aki állandó inspirációval vezetett a kutatásban. Nemcsak szakmailag, hanem emberileg is sokat kaptam tőle az elmúlt évek során. Köszönet illeti dr. Nádasy György docens urat, aki a biomechanikai vizsgálatokban és azok kiértékelésben nélkülözhetetlen segítséget nyújtott. Külön köszönöm dr. Kékesi Violetta docensnőnek a támogató iránymutatását és nevelő szeretetét. Szeretném megköszönni dr. Monos Emil professzor úrnak az előremutató konzultációkat. Köszönetet mondok dr. Hubay Márta adjunktusnőnek a szövettani vizsgálatokban nyújtott nagylelkű munkájáért. Köszönetet szeretnék mondani a Városmajori kutatólaboratórium dolgozóinak, a Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinikán dolgozó szív- és érsebész kollegáknak, doktorandusz társaimnak, továbbá a Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézet munkatársainak, különösképpen a hemodinamikai laboratórium dolgozóinak.

Köszönet illeti professzor Bo Risberg-et, aki lehetővé tette a svédországi kutatómunkám megvalósulását, továbbá Anders Sellborn-t, aki tutoromként, konzulensemként volt számomra nélkülözhetetlen segítség.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak, különösképpen szeretett feleségemnek és kislányaimnak azt a türelmes áldozatvállalást, amivel lehetővé tették számomra a kutatómunka végzését.