

MAGDALENA GEWARTOWSKA

**NOWA METODA PRZECHOWYWANIA
W BEZWODNYM CHLORKU SODU
NACZYŃ TĘTNICZYCH DO PRZESZCZEPIENIA**

**ZESPÓŁ KLINICZNO-BADAWCZY CHIRURGII TRANSPLANTACYJNEJ ORAZ
ZESPÓŁ KLINICZNO-BADAWCZY EPIGENETYKI CZŁOWIEKA
INSTYTUT MEDYCyny DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ
IM. M. MOSSAKOWSKIEGO PAN**

**ROZPRAWA DOKTORSKA PRZYGOTOWANA POD KIERUNKIEM
PROF. DR HAB. N. MED. WALDEMARA L. OLSZEWSKIEGO**

WARSZAWA 2014

*Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi,
Profesorowi Waldemarowi Olszewskiemu za opiekę merytoryczną,
przekazaną mi wiedzę i poświęcony czas*

*Dr hab. Małgorzacie Frontczak - Baniewicz za pokazanie mi
świata mikroskopii elektronowej i cenne wskazówki*

*Dr hab. Hannie Gałkowskiej za pomoc
przy pracy nad manuskrytem*

*Współpracownikom
z Zespołu Kliniczno-Badawczego Epigenetyki Człowieka,
Zespołu Kliniczno-Badawczego Chirurgii Transplantacyjnej oraz
Środowiskowego Laboratorium Mikroskopii Elektronowej
za pomoc w badaniach, wsparcie i miłą atmosferę pracy*

Praca finansowana była ze środków projektu badawczego MNiSW NN 404 197037 pt. „Przechowywanie allogenicznych tętnic do przeszczepów i przetok dializacyjnych - metoda, ocena struktury i funkcji”, realizowanego w latach 2009-2013.

Spis treści

Spis treści.....	5
Wykaz skrótów używanych w pracy	7
Wykaz tabel	9
Wykaz rycin.....	10
Założenia pracy.....	14
1 Wstęp.....	16
1.1 Miażdżyca zarostowa tętnic.....	16
1.1.1 Metody postępowania w przypadku miażdżycy tętnic.....	18
1.2 Rodzaje przeszczepów naczyniowych.....	19
1.2.1 Sztuczne protezy naczyniowe.....	19
1.2.2 Przeszczepy biologiczne autologiczne	21
1.2.3 Przechowywane przeszczepy biologiczne.....	23
1.2.4 Próby rozwiązania problemu przechowywania i immunogenności tętnic	27
2 Cel pracy.....	29
3 Materiały.....	30
3.1 Model badawczy	30
3.1.1 Przeszczep ortotopowy	30
3.1.2 Przeszczep podskórny.....	30
3.2 Grupy doświadczalne.....	31
3.2.1 Przeszczep ortotopowy	31
3.2.2 Przeszczep podskórny.....	33
4 Metodyka badań	34
4.1 Technika pobierania aorty piersiowej od dawcy.	34
4.2 Metoda przechowywania aorty do przeszczepienia.....	34
4.3 Procedura uwadniania.....	34
4.4 Technika przeszczepiania ortotopowego aorty brzusznej.....	35
4.5 Technika przeszczepiania podskórnego aorty brzusznej	36
4.6 Ocena wytrzymałości mechanicznej aort.....	36
4.7 Ocena immunogenności aort.....	37
4.7.1 Ocena immunogenności aort po przeszczepieniu ortotopowym	37
4.7.2 Ocena immunogenności aort po przeszczepieniu podskórnym.....	37
4.8 Barwienia histologiczne aort.....	37
4.9 Znakowania immunohistochemiczne aort do analizy w mikroskopie świetlnym	37
4.10 Ocena parametrów morfologicznych przeszczepionej ortotopowo aorty i nacieków komórkowych.	40
4.11 Przygotowanie materiału do analizy w mikroskopie elektronowym	42
4.12 Analiza statystyczna otrzymanych wyników	42
5 Wyniki	44
5.1 Ocena makroskopowa przeszczepionych ortotopowo aort.....	44

5.2	Budowa morfologiczna aort kontrolnych przed przeszczepieniem.....	46
5.3	Budowa morfologiczna aort po przechowywaniu w NaCl przed przeszczepieniem.....	46
5.3.1	Ocena obwodu warstwy wewnętrznej pokrytej śródbłonkiem naczyniowym aort przed przeszczepieniem.....	47
5.3.2	Ocena grubości warstwy wewnętrznej, środkowej i zewnętrznej w aortach przechowywanych w bezwodnym chlorku sodu przed przeszczepieniem....	48
5.3.3	Liczba komórek mięśniowych w warstwie środkowej.....	49
5.4	Budowa morfologiczna aort przeszczepionych ortotopowo.....	50
5.4.1	Ocena obwodu warstwy wewnętrznej aort pokrytej śródbłonkiem naczyniowym po przeszczepieniu	50
5.4.2	Grubość poszczególnych warstw aorty w zależności od czasu przechowywania, okresu po przeszczepieniu i układu doświadczalnego	54
5.4.3	Liczba komórek w warstwie środkowej	59
5.5	Budowa ultrastrukturalna aort przechowywanych w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepionych ortotopowo.....	63
5.6	Wytrzymałość mechaniczna aort	68
5.7	Ocena immunogenności aort przechowywanych w bezwodnym NaCl.....	70
5.7.1	Immunogenność aort zbadana po przeszczepieniu ortotopowym.	70
5.7.2	Immunogenność aort przechowywanych w NaCl zbadana po przeszczepieniu podskórnym	80
6	Dyskusja	85
7	Podsumowanie.....	100
7.1	Aorty przechowywane, przed przeszczepieniem.....	100
7.2	Aorty przechowywane, po przeszczepieniu.....	100
8	Wnioski.....	102
9	Piśmiennictwo	103
	Streszczenie	111
	Summary.....	114

Wykaz skrótów używanych w pracy

AAA (ang. abdominal aortic aneurysm) - tętniak aorty brzusznej

CABG (ang. coronary artery by-pass graft) - pomost aortalno-wieńcowy

E2F - białka tworzące rodzinę czynników transkrypcyjnych regulujących przejście z fazy G1 do fazy S w cyklu komórkowym

EDHF (ang. endothelium derived hiperpolarizing factor) - śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący

EDRF (ang. endothelium-derived relaxing factor) - śródbłonkowy czynnik rozszerzający naczynia

EGF (ang. epidermal growth factor) - naskórkowy czynnik wzrostu

ET-1 (ang. endothelin-1) - endotelina-1

EVAR (ang. endovascular aneurysm repair) - wewnątrznaczyniowy zabieg naprawy tętniaka aorty

FGF (ang. fibroblast growth factor) - czynnik wzrostu fibroblastów

HBGF (ang. heparin-binding growth factor) - czynnik wzrostu wiążący heparynę

IGF-1 (ang. insulin-like growth factor-1) - insulinopodobny czynnik wzrostu-1

IL (ang. interleukin) - interleukina

INF-gamma (ang. interferon-gamma) - interferon gamma

LDL (ang. low density lipoprotein) - lipoproteiny o małej gęstości

M-CSF (ang. macrofage colony stimulating factor) - czynnik stymulujący kolonie makrofagów

MMP-2 (ang. matrix metalloproteinase-2) - metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej-2

MMP-9 (ang. matrix metalloproteinase-9) - metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej-9

NFkappaB (ang. nuclear factor-kappaB) - czynnik jądrowy-kappaB

NO (ang. nitric oxide) - tlenek azotu

oxLDL (ang. oxidised low density lipoprotein) - zmodyfikowane oksydacyjnie lipoproteiny o małej gęstości

PDGF (ang. platelet-derived growth factor) - płytkopochodny czynnik wzrostu

PGI₂ (ang. prostacyclin) - prostacyklina

PTCA (ang. percutaneous transluminal coronary angioplasty) - przezskórna plastyka naczyń wieńcowych

TAA (ang. thoracic aortic aneurysm) - tętniak aorty piersiowej

TGF (ang. transforming growth factor) - transformujący czynnik wzrostu

TNF (ang. tumor necrosis factor) - czynnik martwicy nowotworu

tx syn - przeszczep wykonany w układzie syngenicznym (LEW do LEW)

tx allo - przeszczep wykonany w układzie allogenicznym (BN do LEW)

VASP (ang. vasodilator-stimulated phosphoprotein) - fosfoproteina stymulująca wazodylatację

Wykaz tabel

Tabela 1. Grupy doświadczalne.

Tabela 2. Grupy kontrolne.

Tabela 3. Czas przechowywania i uwadniania aort.

Tabela 4. Charakterystyka użytych przeciwciał.

Tabela 5. Ocena makroskopowa aort po przeszczepieniu ortotopowym.

Tabela 6. Ocena makroskopowa aort po przeszczepieniu ortotopowym -uśrednione wyniki.

Tabela 7. Wytrzymałość mechaniczna aort szczurzych.

Wykaz rycin

- Rycina 1. Zmiana miażdżycowa.
- Rycina 2. Schemat obliczeń dla każdej grupy doświadczalnej.
- Rycina 3. Technika przeszczepu ortotopowego aorty brzusznej - schemat.
- Rycina 4. Schemat budowy aorty z uwzględnieniem sposobu dokonywania pomiarów.
- Rycina 5. Przykładowe zdjęcie aorty z wykonanymi w programie Cell pomiarami parametrów morfologicznych i nacieków komórkowych przeszczepionej ortotopowo aorty.
- Rycina 6. Aorta zaraz po pobraniu (A) oraz przechowywana w bezwodnym NaCl przez 3 miesiące (B); 6 miesięcy (C); i 10 miesięcy (D). Znakowanie anty HIS52, pow. x100.
- Rycina 7. Wielkość obwodu warstwy wewnętrznej aort pokrytej śródbłonkiem przed i po przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu (wyrażona w procentach).
- Rycina 8. Grubość poszczególnych warstw aort przed i po przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu.
- Rycina 9. Liczba komórek mięśniowych w warstwie środkowej aort przed i po przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu.
- Rycina 10. Aorta przechowywana przez 12 miesięcy i przeszczepiona na 15 miesięcy w układzie syngenicznym (A) lub allogenicznym (B) oraz nieprzechowywana, przeszczepiona na 12 miesięcy w układzie allogenicznym (C). Znakowanie anty HIS52, pow. x100.
- Rycina 11. Aorta przechowywana przez 10 miesięcy i przeszczepiona na 3 miesiące (A) oraz przechowywana przez 12 miesięcy, przeszczepiona na 15 miesięcy (B) w układzie syngenicznym. Znakowanie anty CD31, pow. x200.
- Rycina 12. Aorta przechowywana przez 12 miesięcy i przeszczepiona na 3 miesiące (A) oraz przechowywana przez 12 miesięcy przeszczepiona na 15 miesięcy (B) w układzie allogenicznym. Znakowanie anty CD31, pow. x100.
- Rycina 13. Wielkość obwodu warstwy wewnętrznej aort pokrytej śródbłonkiem po przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepieniu (wyrażona w procentach).
- Rycina 14. Wielkość obwodu warstwy wewnętrznej aort pokrytej śródbłonkiem po długoterminowym przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepieniu (wyrażona w procentach).
- Rycina 15. Grubość poszczególnych warstw ściany aort po krótkoterminowym przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepieniu.

- Rycina 16. Aorta przechowywana przez 12 miesięcy i przeszczepiona na 3 miesiące w układzie syngenicznym, H/E, pow. x100, miejsce zespolenia (A), fragment przeszczepionego naczynia z pogrubiłą warstwą wewnętrzną, H/E pow. x200 (B)
- Rycina 17. Grubość warstwy wewnętrznej ściany aort po długoterminowym przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepieniu.
- Rycina 18. Grubość warstwy środkowej aort po długoterminowym przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepieniu.
- Rycina 19. Grubość warstwy zewnętrznej aort po długoterminowym przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepieniu.
- Rycina 20. Aorta nieprzechowywana, nieprzeszczepiona (A), nieprzechowywana, przeszczepiona na 6 miesięcy w układzie syngenicznym (B), nieprzechowywana, przeszczepiona na 6 miesięcy w układzie allogenicznym (C), przechowywana przez 6 miesięcy, przeszczepiona na 6 miesięcy w układzie allogenicznym (D). Znakowanie anty ED1 pow. x100
- Rycina 21. Liczba komórek mięśniowych w warstwie środkowej aort po przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepieniu.
- Rycina 22. Aorta przechowywana przez 10 miesięcy, 3 miesiące po syngenicznym przeszczepieniu (A) oraz aorta przechowywana przez 12 miesięcy, 3 miesiące po allogenicznym przeszczepieniu (B). Trichrome Azan pow. x200.
- Rycina 23. Liczba komórek mięśniowych w warstwie środkowej aort po długoterminowym przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepieniu.
- Rycina 24. Aorta kontrolna, nieprzechowywana, nieprzeszczepiona (obraz ultrastrukturalny).
- Rycina 25. Aorta przechowywana przez 6 miesięcy, nieprzeszczepiona (obraz ultrastrukturalny).
- Rycina 26. Aorta przechowywana przez 1 miesiąc, przeszczepiona na 12 miesięcy w układzie syngenicznym, uwidoczniła na zdjęciu warstwę wewnętrzną naczynia (obraz ultrastrukturalny).
- Rycina 27. Aorta przechowywana przez 1 miesiąc, przeszczepiona na 12 miesięcy w układzie syngenicznym, uwidoczniła na zdjęciu warstwę środkową naczynia (obraz ultrastrukturalny).
- Rycina 28. Aorta przechowywana przez 1 miesiąc, przeszczepiona na 12 miesięcy w układzie allogenicznym, uwidoczniła na zdjęciu warstwę wewnętrzną naczynia (obraz ultrastrukturalny).

- Rycina 29. Aorta przechowywana przez 1 miesiąc, przeszczepiona na 12 miesięcy w układzie allogenicznym, uwidoczniona na zdjęciu warstwa wewnętrzna naczyń (obraz ultrastrukturalny).
- Rycina 30. Aorta przechowywana 12 miesięcy, 3 miesiące po przeszczepieniu allogenicznym; wyznakowana anty: ED1 (A) W3/13 (B) i OX6 (C) oraz po przeszczepieniu syngenicznym, wyznakowana anty OX6 (D), pow. x100.
- Rycina 31. Liczba komórek OX6+ (MHCII+) naciekających warstwę wewnętrzną aort po przechowywaniu w bezwodnym NaCl i przeszczepieniu ortotopowym.
- Rycina 32. Liczba komórek ED1+ (monocyty/makrofagi) naciekających warstwę wewnętrzną aort po przechowywaniu w bezwodnym NaCl i przeszczepieniu ortotopowym.
- Rycina 33. Liczba komórek W3/13+ (leukocyty) naciekających warstwę wewnętrzną aort po przechowywaniu w bezwodnym NaCl i przeszczepieniu ortotopowym.
- Rycina 34. Liczba komórek OX6+ (MHCII+) naciekających warstwę środkową aort po przechowywaniu w bezwodnym NaCl i przeszczepieniu ortotopowym.
- Rycina 35. Liczba komórek ED1+ (monocyty/makrofagi) naciekających warstwę środkową aort po przechowywaniu w bezwodnym NaCl i przeszczepieniu ortotopowym.
- Rycina 36. Liczba komórek W3/13 (leukocyty) naciekających warstwę środkową aort po przechowywaniu w bezwodnym NaCl i przeszczepieniu ortotopowym.
- Rycina 37. Liczba komórek OX6+ (MHCII+) naciekających warstwę zewnętrzną aort po przechowywaniu w bezwodnym NaCl i przeszczepieniu ortotopowym.
- Rycina 38. Liczba komórek ED1+ (monocyty/makrofagi) naciekających warstwę zewnętrzną aort po przechowywaniu w bezwodnym NaCl i przeszczepieniu ortotopowym.
- Rycina 39. Liczba komórek W3/13+ (leukocyty) naciekających warstwę zewnętrzną aort po przechowywaniu w bezwodnym NaCl i przeszczepieniu ortotopowym.
- Rycina 40. Aorta nieprzechowywana (kolumna lewa) oraz przechowywana 7 dni w bezwodnym NaCl (kolumna prawa); 7 dni po allogenicznym podskórnym wszczepieniu w łapę.
- Rycina 41. Liczba komórek OX6+ (MHCII+) naciekających aorty po przechowywaniu w bezwodnym NaCl i wszczepieniu podskórnym.
- Rycina 42. Liczba komórek ED1+ (monocyty/makrofagi) naciekających aorty po przechowywaniu w bezwodnym NaCl i wszczepieniu podskórnym.

- Rycina 43. Liczba komórek W3/13+ (leukocyty) naciekających aorty po przechowywaniu w bezwodnym NaCl i wszczepieniu podskórnym.
- Rycina 44. Masa regionalnych węzłów chłonnych po podskórnym wszczepieniu aort.

Założenia pracy

Przeszczepy tętnicze są rutynową metodą przywracania ukrwienia w zarostowej miażdżycy powodującej obwodowe niedokrwienie kończyn dolnych. Najlepsze wyniki osiąga się przez użycie autologicznych przeszczepów żylnych, jako pomostów omijających miejsce niedrożności. W przypadku braku odpowiedniej żyły alternatywą jest użycie sztucznej protezy. Jednak w takim wypadku nierzadkim powikłaniem są zakażenia w łożysku przeszczepu, wymagające zastąpienia protezy przeszczepem opornym na zakażenie. Zakażenie sztucznego przeszczepu jedynie w nielicznych przypadkach może być z powodzeniem leczone antybiotykami. W większości przypadków należy zastąpić zakażony przeszczep nowym, najlepiej biologicznym, nie zasiedlanym przez bakterie i nie naciekanym przez komórki odpornościowe biorcy. Jeśli zastosowano by świeżo pobrany od dawcy allogeniczny przeszczep tętniczy, wówczas należałoby badać zgodność antygenów w układzie AB0, a także HLA, a być może także stosować immunosupresję. Stosowanie świeżych alloprzeszczepów pomimo słabo dodatniej próby krzyżowej, jest dopuszczalne jedynie w sytuacjach niedokrwienia znacznych obszarów kończyny lub sepsy zagrażających życiu chorego. Zwykle do zastąpienia zakażonej protezy używane są mrożone tętnice z banków naczyń. Mają one jednak szereg niedoskonałości, takich jak np. mała wytrzymałość mechaniczna oraz zachowana immunogenność. Ponadto przy przeszczepach naczyń mrożonych o małej średnicy wysoce problematyczne jest zachowanie drożności przeszczepu. Podobne wady mają przeszczepy przechowywane w glutaraldehydzie. Jako alternatywa dla przeszczepów allogenicznych stosowane są także protezy sztuczne powlekanie jonami srebra o działaniu bakteriobójczym lub nasączone antybiotykami. Użycie takich protez nie zapewnia jednak równie dobrych wyników leczenia jak przeszczep biologiczny, jest bowiem obciążone ryzykiem ponownego rozwoju zakażenia i zapalenia w dawnym łożysku.

Istnieje więc niewątpliwe zapotrzebowanie na inaczej niż dotychczas przechowywane tętnice ludzkie, tak by były one odporne na zasiedlanie przez mikroorganizmy, wytrzymałe mechanicznie i nadawały się do zastąpienia zakażonych sztucznych przeszczepów, a nawet do zastosowania jako przetoki hemodializacyjne.

W Zespole Kliniczno-Badawczym Chirurgii Transplantacyjnej IMDiK PAN poszukiwaliśmy metody przechowywania tętnic spełniającej te warunki. Jako środek do przechowywania zaproponowany został bezwodny sproszkowany chlorek sodu. Idea ta powstała w czasie prowadzenia przez nas badań nad zakażeniami kończyn dolnych w krajach tropikalnych, głównie Indiach, gdzie niedostępne były urządzenia do zamrażania i przechowywania tkanek pobranych do oceny histopatologicznej. Postanowiliśmy zastosować odwodnienie osmotyczne pobranych tkanek za pomocą soli kuchennej. W początkowym okresie sprawdzaliśmy wpływ tego sposobu przechowywania na różne typy komórek i tkanek. Okazało się, iż preparaty tkankowe przechowywane w sproszkowanym chlorku sodu w warunkach o wilgotności zero, zachowywały przez miesiące prawidłową strukturę mikroskopową i molekularną badaną przeciwciałami monoklonalnymi [Olszewski i wsp. 2004]. Wykazaliśmy, iż skóra ludzka przechowywana w bezwodnym chlorku sodu przeżywa trwale po przeszczepieniu i zachowuje swoją strukturę molekularną oraz wywołuje jedynie niewielką reakcję w miejscu wszczepienia myszy SCID [Olszewski i wsp. 2006]. Ta obserwacja skłoniła mnie do zbadania, czy taka metoda mogłaby być zastosowana do przechowywania tętnic, i tak jak wykazano na innych tkankach, pozwoli ona na:

- a) zachowanie niezmięionej struktury,
- b) zachowanie właściwości mechanicznych,
- c) obniżenie antygenowości umożliwiające allogeniczne przeszczepianie bez immunosupresji.

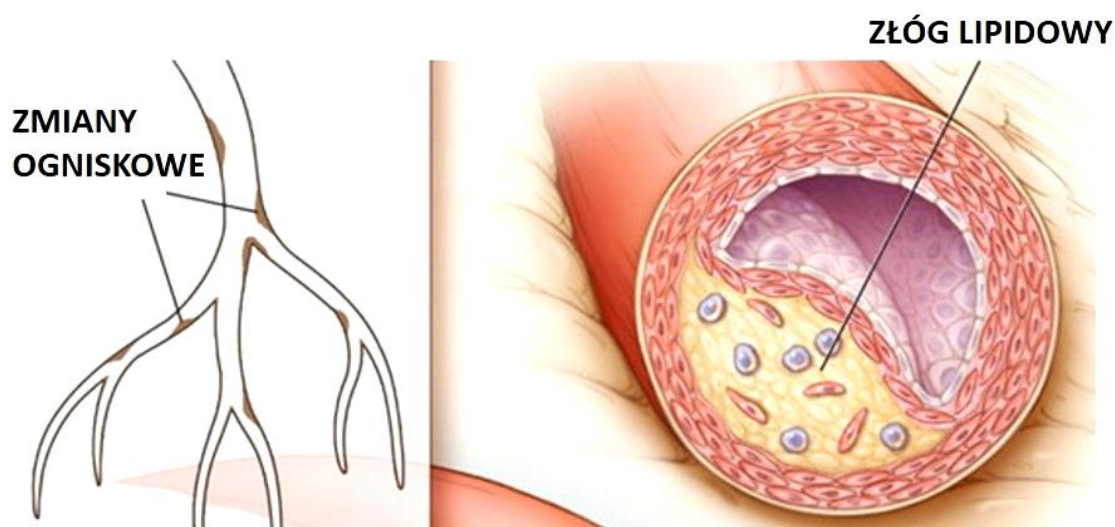
Postanowiłam przeprowadzić badania nad przeszczepianiem aort przechowywanych w odwodnionym sproszkowanym chlorku sodu szczurom w układzie allogenicznym, wszczepiając je ortotopowo lub jako pomost, zapewniając pełny przepływ krwi do tylnej części ciała zwierzęcia. Zaplanowałam przechowywanie aort do 12 miesięcy oraz obserwacje po przeszczepieniu trwające podobny okres czasu.

1 Wstęp

1.1 Miażdżycza zarostowa tętnic.

Choroby układu sercowo-naczyniowego należą do największych problemów społecznych w krajach rozwiniętych. W Polsce, podobnie jak w Europie, stanowią najczęstszą przyczynę zgonów. Zmiany chorobowe toczone się w układzie tętniczym zwykle przebiegają zgodnie z jednym z dwóch scenariuszy: w pierwszym prowadzą do stopniowego zwężenia światła naczyń, a ostatecznie do ich całkowitego zamknięcia i niedokrwienia tkanek położonych dystalnie, w drugim upośledzają podatność i sprężystość ściany naczyń prowadząc do ich trwałego poszerzenia i powstania tętniaka.

Miażdżycza tętnic (łac. *atheromatosis*, *atherosclerosis*) jest to choroba przewlekła, charakteryzująca się zmianami patologicznymi w błonie wewnętrznej i środkowej tętnic z odkładaniem się złogów lipidowych.



Rycina 1. Zmiana miażdżycowa wg. Avery RK. i wsp. 2003.

Naczyniami najczęściej objętymi miażdżycą są aorta, tętnice wieńcowe i mózgowo, oraz tętnice kończyn. Miażdżycza jest główną przyczyną zmian zwyrodnieniowo-wytwórczych w błonie wewnętrznej i środkowej tętnic. Pomimo ogromnego postępu w diagnostyce i leczeniu miażdżycy, jaki dokonał się w ubiegłym wieku, nadal pozostaje ona ogromnym problemem klinicznym [Kannel i wsp. 2004].

Etiologia miażdżycy tętnic nie jest w pełni poznana. Obecnie większość badaczy skłania się do tego, że powstanie i rozwój miażdżycy jest procesem uwarunkowanym wieloczynnikowo. Uważa się, że najważniejszym czynnikiem prowadzącym do zmian miażdżycowych są zaburzenia metabolizmu ściany naczyniowej i gospodarki lipidowej. Istnieją doniesienia, że czynnikiem ryzyka również mającym duże znaczenie w wystąpieniu i progresji chorób tętnic, jest palenie papierosów. Rozwój choroby występuje 1,7-5,6 razy częściej u palaczy w porównaniu do osób niepalących [Fowkes i wsp. 1992]. Ponadto, do jej wystąpienia predystynuje m.in. hipercholesterolemia, wysoki poziom trójglicerydów, wysoki wskaźnik BMI, cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, zaburzenia krzepnięcia krwi oraz stres.

W przeciągu ostatnich lat uzyskano wiele dowodów na to, że przewlekłe infekcje bakteryjne i wirusowe także mogą indukować lub przyspieszać rozwój miażdżycy [Każmierski 2009]. Uważa się, że rolę w patogenezie miażdżycy odgrywa przede wszystkim zakażenie *Cytomegalovirus* [Nieto i wsp. 2004]. Podobną rolę w postępie miażdżycy próbowano przypisać także infekcji *Chlamydia pneumoniae* [Luque i wsp. 2012, Sander i wsp. 2001], *Helicobacter pylori* [Gasbarrini i wsp. 1998], oraz innym przewlekłym zakażeniom [Kiechl i wsp. 2001]. Aktualnie zainteresowanie badaczy skupia się na genetycznym podłożu miażdżycy. Wiadomo, że zwapnienie tętnic, będące jednym z czynników ryzyka w chorobach sercowo-naczyniowych jest w znacznym stopniu dziedziczne - nawet 40 do 50% przypadków może mieć podłoże genetyczne [Marion i wsp. 2012].

Miażdżycza tętnic jest częstsza u mężczyzn i nasila się z wiekiem [D'Agostino i wsp. 2008, Kannel i wsp. 2004]. Powstawanie zmian miażdżycowych w ścianie naczyń zapoczątkowuje akumulacja utlenionych cząstek LDL-cholesterolu przez komórki śródbłonka i przemieszczanie ich pod błonę wewnętrzną tętnic, do macierzy podśródbłonkowej, gdzie tworzą tzw. pasma tłuszczowo-lipidowe. Stopień nasilenia tego zjawiska jest wprost proporcjonalny do poziomu krążących we krwi cząstek LDL (Lusis 2000). Akumulacja utlenionych cząstek LDL (ox LDL) tuż pod powierzchnią śródbłonka naczyniowego prowadzi do jego aktywacji i produkcji przez komórki śródbłonkowe szeregu cząstek prozapalnych, między innymi czynnika stymulującego powstawanie kolonii makrofagów (M-CSF). Z napływających monocytów/makrofagów powstają z kolei komórki piankowe gromadzące drogą tzw. „szlaku zmiataczowego” jeszcze więcej lipidów, pochodzących z lipoprotein osocza krwi, które uprzednio zostały uszkodzone przez reaktywne formy tlenu. Dlatego komórkom zapalnym

przypisuje się dużą rolę w procesie tworzenia blaszki miażdżycowej [Stary i wsp. 1995]. Ponadto cząstki ox LDL hamują produkcję przez komórki śródbłoka naczyniowego tlenku azotu, który jest mediatorem wielu zjawisk chroniących przed miażdżycą, między innymi rozkurczu mięśni gładkich ściany naczynia. Utrata biologicznej aktywności komórek śródbłoka wiąże się ze wzrostem gotowości zakrzepowo-zatorowej [Lusis 2000; Obońska i wsp. 2010]. Następstwa miażdżycy mogą być bardzo poważne. Na skutek zwapnienia, odkładania złogów lipidowych w obrębie błony wewnętrznej oraz namnażania komórek mięśni gładkich, dochodzi do zwężenia światła i upośledzenia przepływu krwi przez naczynie. Prowadzi to do niedokrwienia tkanek i narządów położonych dystalnie w stosunku do zmiany w naczyniu. Zwapnienie tętnic mózgu powoduje niedokrwienie mózgu oraz zwiększa prawdopodobieństwo pęknięcia naczyń i udarów, zwłaszcza przy współistniejącym nadciśnieniu tętniczym. Miażdżycą tętnic wieńcowych jest jedną z przyczyn choroby wieńcowej, miażdżycą aorty może prowadzić do powstania tętniaka, zaś zakrzepica w tętnicach obwodowych do utraty kończyny. Pęknięcie blaszki miażdżycowej natomiast bezpośrednio zagraża życiu chorego [Rykowski 1990].

1.1.1 Metody postępowania w przypadku miażdżycy tętnic.

Leczenie miażdżycy może być zachowawcze (zapobieganie postępowi choroby, leczenie chorób współistniejących, poprawa ukrwienia kończyn, zapobieganie zmianom martwiczym oraz leczenie już istniejących) oraz operacyjne. Metodą leczenia inwazyjnego stosowaną u chorych z ostrą zakrzepicą występującą w przebiegu miażdżycy jest zabieg usunięcia skrzepliny, a gdy okaże się on niewystarczający udrażnia się tętnicę usuwając ze światła naczynia zmiany miażdżycowe wraz ze zmienioną błoną wewnętrzną, a czasami nawet błoną mięśniową. Często stosowane jest także rozszerzanie zwężonych naczyń specjalnym balonem rozprężanym w miejscu zwężenia (metoda przezskórnej plastyki naczyń wieńcowych, PTCA). W przypadku gdy powyższe metody są niewystarczające wykonuje się wszycie odcinków naczyń własnych pacjenta, omijających zwężenie (tzw. by-passy żyłne lub tętnicze), albo zabieg wycięcia zmienionego odcinka i wszczepienia innego naczynia lub protezy naczyniowej dla przywrócenia ciągłości przepływu, bądź też wprowadzenia stent-graftu naczyniowego [Rykowski 1990].

1.2 Rodzaje przeszczepów naczyniowych

1.2.1 Sztuczne protezy naczyniowe

1.2.1.1 Rodzaje sztucznych protez naczyniowych.

Obecnie najczęściej wykorzystuje się protezy naczyniowe zbudowane z poliestrów: politetrafluoroetylenowe (PTFE) i dakronowe. Protezy politetrafluoroetylenowe są szczelne i sztywne. Używane są przede wszystkim do protezowania małych i średnich tętnic oraz żył [Noszczyk i wsp. 1998]. Protezy dakronowe mogą być tkane lub dziane. Protezy tkane charakteryzują się dużą odpornością na pęknięcie i niską rozciągliwością, co ułatwia dobór protezy o odpowiedniej długości. Są one mało przepuszczalne, dzięki czemu ryzyko krwawienia jest mniejsze, a obecnie, dla zwiększenia szczelności, są zazwyczaj dodatkowo uszczelniane kolagenem. Stosuje się je przede wszystkim w operacjach tętniaków aorty brzusznej i piersiowej. Wadą tego typu protez jest ryzyko strzępienia.

Protezy dziane charakteryzują się większą przepuszczalnością, są porowate. Sprzyja to przerastaniu protezy przez tkanki, ale zwiększa ryzyko krwawienia, co kiedyś wiązało się z koniecznością uszczelniania protezy krwią chorego (tzw. preclotting). Jednak stosowane aktualnie protezy posiadają włókna dziane bardzo gęsto, aby uzyskać mniejszą przepuszczalność i wysoką odporność mechaniczną. Ponadto dzięki powlekaniu protez dzianych kolagenem lub żelatyną nie występuje już konieczność dodatkowego uszczelniania protezy krwią. Zaletą protez dzianych jest to, że ich układ włókien zapewnia niewielkie ryzyko strzępienia się niezależnie od kąta docinania, co pozwala uzyskać trwałość zespolenia [Lew i wsp. 2011].

Sztuczne protezy naczyniowe stosuje się w operacjach metodą klasyczną, wykonywaną przez tradycyjny dostęp chirurgiczny - z otwarciem klatki piersiowej lub brzucha. Tak zwane stent-grafty są odmianą protez sztucznych używanych w zabiegach wewnątrznaczyniowego wszczepienia protezy (EVAR). Stanowią one połączenie sztucznej protezy naczyniowej i stentu (metalowej siatki lub sprężyny, wykonanej z biologicznie neutralnego metalu np. stali czy nitinolu). Endoproteza wprowadzana jest przez tętnicę udową w postaci ściśniętej, a następnie, po umieszczeniu jej we właściwym miejscu, rozprężana i mocowana na zasadzie docisku. Obecnie najczęstsze są samorozprężające się protezy, których rozprężanie wspomaga się ewentualnie za pomocą balonu [Nataraj i wsp. 2004, Pupka i wsp. 2009].

1.2.1.2 Powikłania po przeszczepieniu sztucznych protez naczyniowych

Zastosowanie sztucznej protezy jest dobrą alternatywą w przypadku braku możliwości uzyskania od chorego odpowiedniej żyły do przeszczepu. Wszczepienie sztucznego naczynia, obarczone jest ryzykiem powikłań: niedrożności w skutek wykrzepienia, zwężenia na skutek przerostu warstwy wewnętrznej, zakażenia. Na powyższe powikłania narażone są w szczególności protezy wykorzystywane do przetok dializacyjnych i protezowania naczyń obwodowych o małej średnicy. Do niedrożności dochodzi tu w 30% przypadków w okresie 5 lat [Fahner i wsp. 2006, Ishi i wsp. 2008].

W celu poprawienia wyników uzyskiwanych przy zastosowaniu sztucznych przeszczepów wykorzystuje się obecnie różnego typu modyfikacje takich protez. Badania mające na celu zmniejszenie trombogenności rozpoczęto pod koniec lat 90. Najpierw wprowadzono do użytku klinicznego protezy dakronowe ze związanymi w ścianie protezy cząsteczkami heparyny, a kilka lat później impregnowane heparyną protezy politetrafluoroetylenowe [Pupka i wsp. 2010].

Badania eksperymentalne na modelu zwierzęcym, jak również niezbyt liczne do tej pory badania kliniczne wykazały, że odporność tych protez na powstawanie zakrzepów jest podobna jak autogennej żyły wszywanej na tym samym poziomie. W długoterminowych obserwacjach rozbieżność wyników jest niestety większa na niekorzyść sztucznych protez opłaszczonych heparyną, ale są one i tak znacznie lepsze od tradycyjnych protez PTFE. Poza zmniejszeniem trombogenności związanie heparyny w ścianach protezy hamuje także w pewnym stopniu przerost warstwy wewnętrznej prowadzący do zwężenia światła naczynia [Dorigo i wsp. 2011, Pedersen i wsp. 2010, Pupka i wsp. 2010].

Kolejnym rodzajem protez, które mają zapewniać większą drożność i niską zakrzepowość, są protezy impregnowane heparyną i środkiem immunosupresyjnym, którym zazwyczaj jest sirolimus. Przeprowadzone na modelu zwierzęcym badania wykazują, że zastosowanie miejscowo dodatkowo leku immunosupresyjnego jeszcze bardziej redukuje przerost błony wewnętrznej oraz powoduje zmniejszenie nacieków komórkowych wokół przeszczepu [Ishii i wsp.2007, Ishii i wsp.2008].

Poza wysoką trombogennością sztucznych protez, poważny problem stanowią także zakażenia, występujące niezależnie od zastosowanej taktyki postępowania chirurgicznego i profilaktyki antybiotykowej. Według jednych autorów stanowią one

0,5-2% przypadków [FitzGerald i wsp. 2005], podczas gdy inne doniesienia mówią o 0,5-6% przypadków [Ricco i wsp. 2011]. Zazwyczaj drobnoustrojami odpowiedzialnymi za tego typu zakażenia są bakterie z rodzaju *Staphylococcus*. Zakażenie protezy, ze względu na niską penetrację leków do wnętrza ściany protezy, jedynie w nielicznych przypadkach może być z powodzeniem leczone antybiotykami [FitzGerald i wsp. 2005]. Nie jest to powikłanie bardzo częste, jednak związane z wysoką śmiertelnością.

Ryzyko zakażenia usiłuje się zmniejszyć poprzez stosowanie protez impregnowanych solami srebra lub nasączanych antybiotykami [Pupka i wsp. 2010]. Wśród protez opłaszczonych srebrem, najczęściej używane w klinice są protezy dakronowe dodatkowo uszczelniane kolagenem. Jednak badania doświadczalne wykazują sprzeczne rezultaty odnośnie ich właściwości antybakteryjnych, a w największym do tej pory randomizowanym badaniu na modelu zwierzęcym wykazano brak wpływu impregnacji srebrem na częstość występowania zakażenia protezy [Gao i wsp. 2010]. Jeśli rozważamy działanie antybakteryjne antybiotyku związanego w ścianie naczynia, to z przeprowadzonych dotychczas badań wynika, że wśród sztucznych naczyń impregnowanych antybiotykami najbardziej odporna na zakażenia jest proteza dakronowa opłaszczona rifampiną [Lew i wsp. 2011]. Jednak pomimo wszystko, zastąpienie zakażonej protezy zwykłym przeszczepem naczyniowym pozostaje nadal najlepszym rozwiązaniem.

1.2.2 Przeszczepy biologiczne autologiczne.

Zastosowanie przeszczepów biologicznych ciągle daje najlepsze rezultaty, ale ich dostępność jest ograniczona. Najlepsze wyniki osiąga się z użyciem autologicznych przeszczepów żylnych. Zastosowanie żyły własnej pacjenta jako pomostu naczyniowego jest najkorzystniejszym rozwiązaniem ze względu na brak reakcji immunologicznej na przeszczep, niskie ryzyko infekcji i udowodnioną w obserwacjach długoterminowych niższą trombogenność. Ze względu na długość, szerokość światła i grubość ściany, najczęściej używana jest żyła odpiszczelowa. Jednak nie zawsze istnieje możliwość pobrania od chorego naczynia, które nadawałoby się do przeszczepienia. Wówczas stosuje się sztuczne protezy naczyniowe: dakronowe, służące głównie do rekonstrukcji naczyń u chorych z tętniakami aorty brzusznej i piersiowej, lub też zbudowane z politetrafluoroetyleny (PTFE, Gore-Tex).

1.2.2.1 Przeszczepy allogeniczne i ksenogeniczne.

W latach 50-tych, przed wprowadzeniem protez tętniczych, w przypadku braku odpowiedniego naczynia własnego, alternatywą dla przeszczepu autologicznego pozostawały, powszechnie stosowane wówczas, przeszczepy tętnicze allogeniczne i ksenogeniczne. Pochodzenie tętnicy od niezgodnego tkankowo dawcy, lub tym bardziej od dawcy innego gatunku, wiązało się z intensywną reakcją biorcy na przeszczep.

Badania doświadczalne dowodzą, że w przypadku przeszczepu ksenogenicznego naczynia posiadającego komórki śródbłonkowe i mięśniowe dochodzi do odrzucenia ostrego lub nadostrego (zależnie od gatunku). Jednak w następującym później procesie przewlekłego odrzucenia, do reakcji ze strony biorcy dochodzi nawet po przeszczepieniu naczynia pozbawionego komórek (poddanego tzw. procesowi decelularyzacji). Tak więc z całą pewnością w przewlekłym odrzuceniu przeszczepu międzygatunkowego odgrywają rolę również składniki macierzy zewnątrzkomórkowej. Reakcja immunologiczna biorcy na przeszczepy ksenogeniczne, zarówno pozbawione, jak nie pozbawione elementów komórkowych, prowadzi do rozpadu elastyny i osłabienia ściany naczynia, a co za tym idzie do powstawania tętniaków [Allaire i wsp. 1994].

Jak wynika z obserwacji, w przypadku przeszczepów allogenicznych immunogenne są przede wszystkim jego elementy komórkowe. Jeśli z naczynia przeszczepianego w układzie allogenicznym zostaną uprzednio usunięte elementy komórkowe (komórki śródbłonka oraz mięśni gładkich), nacieki w obrębie warstwy zewnętrznej są znacznie mniejsze niż w przypadku decelularyzowanych przeszczepów ksenogenicznych. W warstwie środkowej zostaje zachowana elastyna i nie obserwuje się poszerzenia naczynia. Natomiast jeśli przeszczepione zostaje naczynie allogeniczne wraz z elementami komórkowymi, dochodzi do zjawisk mających miejsce w przeszczepach ksenogenicznych pozbawionych śródbłonka i komórek mięśniowych – rozpadu elastyny oraz nacieków komórek układu odpornościowego biorcy [Allaire i wsp. 1996, Allaire i wsp. 1997].

Wykonanie przeszczepów allogenicznych świeżych naczyń bywa konieczne w przypadku zakażenia łożyska przeszczepu sztucznego, ale pojawiają się problemy związane ze stosowaniem immunosupresji bądź doбором dawców i biorców pod względem zgodności głównych antygenów w zakresie układu ABO oraz HLA.

Uniknięcie odpowiedzi immunologicznej na przeszczep, czy to poprzez wprowadzenie leków immunosupresyjnych, czy przez odpowiedni dobór dawców, pozwala na zahamowanie procesu degradacji ściany przeszczepionego naczynia, zachowanie śródbłonna naczyniowego i aktywności komórek ściany przeszczepu [Pupka i wsp. 2004]. Jednak stosowanie leków immunosupresyjnych pozostaje dyskusyjne, gdyż ma wiele skutków ubocznych.

1.2.3 Przechowywane przeszczepy biologiczne.

Ze względu na zapotrzebowanie i ograniczony dostęp do świeżych naczyń odpowiednich do przeszczepienia, tworzone są banki naczyń od dawców. Tętnice przechowywane są przede wszystkim przy użyciu metody zamrożenia w bardzo niskich temperaturach w zakresie -70 do -196°C (krioprezerwacja) lub jedynie w obniżonej temperaturze (zwykle $+4^{\circ}\text{C}$). W latach 80-tych ubiegłego wieku próbowano także przechowywania naczyń w glutaraldehydzie [Dardik i wsp. 1976, Dardik i wsp. 1979]. Co do skuteczności tej metody badacze nie są zgodni, część uważa, że daje dobre rezultaty, [Dardik i wsp. 2002], ale na przykład Roberts i wsp. (1989) wykazali, że metoda ta nie może konkurować z wyżej wymienionymi ze względu na gorszą drożność przechowywanego naczynia.

1.2.3.1 Powikłania po przeszczepieniu tętnic przechowywanych.

Każda z metod przechowywania wywiera w pewnym stopniu negatywny wpływ na strukturę naczynia, zachowanie kolagenu i elastyny w niezmienionej formie, zawartość komórek mięśniowych w warstwie środkowej naczynia oraz obecność komórek śródbłonkowych, których utrata prowadzi do zwiększonej trombogenności przeszczepu.

Zwłaszcza w przypadku naczyń o małej średnicy (poniżej 6 mm), długotrwałe utrzymanie drożności przeszczepu lub protezy stanowi poważny problem kliniczny. Komorowska-Timek i współpracownicy (2002) przeprowadzili na grupie ponad 100 szczurów doświadczalne przeszczepy naczyń o małej średnicy (tętnica udowa), mrożonych w ciekłym azocie. Przed przeszczepieniem badacze stosowali skomplikowany protokół zamrażania naczyń, poprzedzony półgodzinną perfuzją mającą na celu ochłodzenie dawcy, a uzyskany materiał był przechowywany w ciekłym azocie przez 2 do 3 tygodni. Przeszczepy wykonywano w 3 układach doświadczalnych:

świeże alloprzeszczepy, mrożone alloprzeszczepy i mrożone przeszczepy syngeniczne. Po pierwszym miesiącu drożność przeszczepionych naczyń we wszystkich grupach wynosiła 100%, jednak po 8 miesiącach wszystkie mrożone alloprzeszczepy były niedrożne, podczas gdy w pozostałych dwóch grupach drożność pozostawała bez zmian. Badania kliniczne przeprowadzone przez Farber i współpracowników (2003), polegające na przeprowadzeniu rewaskularyzacji poniżej więzadła pachwinowego z użyciem mrożonej odpiszczelowej żyły allogenicznej u prawie 200 chorych wykazały, że pomimo doboru pod kątem zgodności w zakresie układu ABO i Rh oraz terapii wspomagającej środkami przeciwzakrzepowymi (warfryną sodu i/lub aspiryną) drożność przeszczepionych naczyń pogarszała się bardzo szybko. Po 1 miesiącu od zabiegu 83% naczyń pozostawało drożnych, po pół roku - 50%, po 12 miesiącach - 30%, a po 24 miesiącach jedynie 18%.

Mrożenie ma więc niekorzystny wpływ na drożność przeszczepionego naczynia. Utrzymanie drożności przeszczepu przez jak najdłuższy czas ma zaś kluczowe znaczenie dla zapewnienia wystarczającej perfuzji tkanek w okresie tworzenia krążenia obocznego w przypadku leczenia krytycznego niedokrwienia kończyn dolnych.

Pupka i współpracownicy (2003) przeprowadzili u 39 chorych wymianę zainfekowanej protezy naczyniowej w odcinku aortalno-biodrowo-udowym na alloprzeszczep tętniczy. Przeszczepy przechowywane były metodą zimnego niedokrwienia (+4°C w płynie konserwującym University of Wisconsin) lub mrożone (-196°C). Alloprzeszczep przechowywany w +4°C wszczepiono u 35 chorych, przy czym 16 z nich otrzymywało leczenie immunosupresyjne (grupa 1), grupa 2 pozostawała bez leków immunosupresyjnych; naczynie przechowywane przez zamrożenie wszczepiono czterem osobom (grupa 3). W grupie 1 (z immunosupresją) nie obserwowano powikłań w postaci pęknięcia przeszczepu z powodu degradacji jego ściany. W grupie 2 występowały powikłania związane z uszkodzeniem ściany przeszczepu - u 3 chorych pęknięcie, u 3 zakrzepica i u 2 tętniaki. Tętniaki stwierdzono także we wszystkich czterech przeszczepach naczyń mrożonych (100% w porównaniu do 10% w grupie naczyń nie poddanych mrożeniu). Wyniki tych badań sugerują, że zamrażanie znacząco obniża wytrzymałość ściany naczynia i zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia tętniaka. Istnieją doniesienia, że zamrażanie tkanek w fazie gazowej azotu o temperaturze -150°C oraz fazie ciekłej o temperaturze -196°C niszczy włókna elastynowe. Naczynia poddane zamrożeniu zawierają ich mniej niż nieprzechowywane [Wollmann i wsp. 2011]. Ponadto w trakcie odmrażania powstają

mikropęknięcia naczyń, szczególnie w obrębie warstwy wewnętrznej i środkowej [Bujân i wsp. 2000, Pegg i wsp. 1997, Rendal i wsp. 2004]. Podatność na pęknięcie obserwuje się zwłaszcza przy przechowywaniu w bardzo niskich temperaturach i szybkim odmrażaniu [Pascual i wsp. 2005, Yi Xu i wsp. 2008]. Zamrażanie naczyń w temperaturze -80°C pozwala lepiej zachować strukturę i właściwości mechaniczne naczyń [Hunt i wsp. 1994, Masson i wsp. 2009]. Jednak zastosowanie mikroskopii wielofotonowej umożliwiło uwidocznienie uszkodzeń macierzy zewnątrzkomórkowej, których nie obserwowano w mikroskopie świetlnym [Schenke-Layland i wsp. 2006].

Mrożenie uszkadza także komórki śródbłonna. Praca doświadczalna Rendal i współpracowników z 2004 roku, przeprowadzona na naczyniach świńskich wykazała, że podczas przechowywania naczyń, zarówno w fazie ciekłej jak i gazowej azotu, dochodzi do zniszczenia komórek śródbłonkowych. Inni autorzy donoszą z kolei o zachowaniu struktury śródbłonna przy jednoczesnym upośledzeniu jego funkcji wskutek zamrażania naczyń [Langerak i wsp. 2001]. Dodatkowe zastosowanie substancji chroniących tkankę przed wpływem niskiej temperatury (krioprotekcyjnych) oraz określonych procedur zamrażania i rozmrażania ma wpływ na poprawę wyników [Arnaud 2000, Pukacki i wsp. 2000], jednak większość badaczy pozostaje zgodna co do negatywnego wpływu mrożenia na komórki śródbłonna, który staje się jeszcze bardziej wyraźny w przypadku naczyń poddanych przeszczepieniu, a więc narażonych na stres związany z przepływem krwi (ang. shear stress) [Pascual i wsp. 2001]. Także przy przechowywaniu w warunkach hipotermii stosowanie płynów takich jak University of Wisconsin (UW), Modified University of Wisconsin (mUW), EuroCollins (EC), czy Bretschneider histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) poprawia parametry przechowywanej tkanki. Na przykład kurczliwość komórek mięśni gładkich zostaje najlepiej zachowana w płynie UW, ale są to dane dla krótkich okresów przechowywania (24-72 godzin) [Corner i wsp. 2003].

Mrożone naczynia zachowują komórki mięśni gładkich w warstwie środkowej. Langerak i współpracownicy (2001) wykazali obecność komórek mięśni gładkich w ścianie naczyń przechowywanych przez 6 tygodni w temperaturze -197°C , jednak komórki te wykazywały mniejszą kurczliwość względem kurczliwości przed zamrożeniem. Obecność komórek mięśniowych naczynia z jednej strony pozytywnie wpływa na wytrzymałość ściany naczynia, z drugiej strony ich właściwości immunogenne mogą mieć negatywny wpływ na czas „przeżycia” przeszczepu. Pomimo, że komórki mięśniowe uzyskane z mrożonej aorty wykazują nieznaczną

ekspresję antygenów zgodności tkankowej, to po stymulacji INF-gamma ekspresja cząsteczek MHC klasy II na powierzchni tych komórek znacząco wzrasta [Salomon i wsp. 1993].

Jako alternatywę dla krioprezerwacji wymienia się także proces witrifikacji, czyli błyskawicznego chłodzenia przy zastosowaniu wysokiego stężenia substancji krioprotekcyjnych, co pozwala na uniknięcie tworzenia kryształów lodu uszkadzających tkankę [Brockbank i wsp. 2000, Thakrar i wsp. 2006].

Jeśli chodzi o przechowywanie w glutaraldehydzie, istnieją duże rozbieżności w poglądach badaczy. Część uważa tę metodę za wysoce skuteczną i pozwalającą na zachowanie drożności naczynia [Dardik i wsp. 2002], podczas gdy inni donoszą o znacznym pogorszeniu drożności takich naczyń już po 4 tygodniach po przeszczepieniu (75% w porównaniu do 95% w grupie kontrolnej) [Roberts i wsp. 1989]. Istnieją również doniesienia, że utrwalanie w glutaraldehydzie pozwala jedynie na stabilizację kolagenu a nie pozostałych składników macierzy zewnątrzkomórkowej, w szczególności elastyny [Jayakrishnan i wsp. 1996], co skutkuje tym, że tętnice tak utrwalane charakteryzują się małą wytrzymałością mechaniczną po przeszczepieniu [Lee i wsp. 2001].

Ponadto naczynia allogeniczne zachowują immunogenność w różnym stopniu, zależnie od zastosowanej metody przechowywania. Tak więc, aby drożność i struktura przechowywanego allograftu pozostały zachowane długoterminowo, niejednokrotnie zachodzi konieczność zastosowania leków immunosupresyjnych, podobnie jak w wypadku przeszczepiania świeżo pobranych naczyń [Vischjager i wsp. 1996].

Stosowane w klinice przechowywanie naczyń metodą zimnego niedokrwienia (w temperaturze +4°C) umożliwia zachowanie włókien elastycznych i kolagenowych oraz utrzymanie niezmięionej wytrzymałości mechanicznej ściany naczynia. Ta metoda pozwala jednak przechowywać naczynia przez krótki okres czasu - maksymalnie do 30 dni [Gacko i wsp. 2004], czy według innych autorów do 42 dni [Galambos i wsp. 2005]. Po tym czasie dochodzi do fragmentacji włókien elastycznych i kolagenowych. W przeciwieństwie do zamrożenia w temperaturach poniżej -80°C, już 7-dniowe przechowywanie naczyń metodą zimnego niedokrwienia prowadzi do rozpadu wszystkich typów komórek w naczyniu, a więc uzyskania całkowicie pozbawionego komórek przeszczepu [Gacko i wsp. 2004]. Uzyskanie naczynia bezkomórkowego, a więc pozbawionego swoich najbardziej immunogennych elementów jest w przypadku przeszczepów allogenicznych korzystne. Teoria

ta znajduje potwierdzenie podczas prób stosowania przeszczepów ksenogenicznych, w przypadku których problem odrzucenia jest jeszcze większy. W takiej sytuacji przygotowanie naczynia do przeszczepu wymaga procesu decelularyzacji, czyli pozbawienia naczynia elementów komórkowych, za pomocą enzymów bądź detergentów. Tak przygotowane przeszczepy pokrywa się heparyną, aby zmniejszyć ryzyko powstawania zakrzepów na pozbawionej śródbłonka powierzchni naczynia [Conklin i wsp. 2002].

Istnieje szereg badań potwierdzających korzystny wpływ decelularyzacji na zmniejszenie immunogenności alloprzeszczepów a co za tym idzie zniszczeń dokonywanych przez komórki odpornościowe biorcy. Jednakże badacze wskazują jednocześnie na fakt, że repopulacja przeszczepianego naczynia komórkami zgodnymi pod względem antygenów zgodności tkankowej, a najlepiej komórkami własnymi, pozwoliłaby uzyskać optymalne wyniki [Grauss i wsp. 2003, Meyer i wsp. 2005].

1.2.4 Próby rozwiązania problemu przechowywania i immunogenności tętnic.

Jedną z potencjalnych metod przechowywania naczyń jaką można rozważać, jest utrwalenie materiału biologicznego przez odwodnienie osmotyczne. W warunkach fizjologicznych komórki ssaków ulegają ekspozycji na wysokie ciśnienie osmotyczne. Są to np. komórki rdzenia nerki, narażone na działanie wysokich stężeń soli i mocznika [Burg 1995]. Istnieje także wiele przykładów komórek, czy nawet całych organizmów, które przystosowały się do bardzo wysokich stężeń soli w środowisku zewnętrznym. Należy tu wymienić bakterie, które przeżywają nie tylko w oceanach o ciśnieniu osmotycznym sięgającym nawet 1000mOsmol/kg, ale również w słonych jeziorach, których woda stanowi nasycony roztwór soli. Istnieją również bezkręgowce, u których stężenie soli w płynie zewnątrzkomórkowym jest takie samo jak w wodzie morskiej, w której żyją [Dmitrieva i wsp. 2005]. Niestety, w przypadku większości komórek narażenie na stres osmotyczny ma poważne konsekwencje. Należą do nich m.in. pęknięcia nici DNA i zahamowanie procesów jego reperacji na skutek obniżonej aktywacji czynników biorących udział w odpowiedzi na uszkodzenia DNA, takich jak Mre 11, H2AX czy Chk 1 [Dmitrieva i wsp. 2004; Dmitrieva i wsp. 2005]. Być może jednak gwałtowny proces dehydratacji, który ma miejsce podczas umieszczenia komórek bądź tkanek w sproszkowanym, bezwodnym chlorku sodu jest na tyle szybki, że pozwala na uniknięcie stresu osmotycznego.

Wcześniejsze prace prowadzone w naszym zespole wykazały, że osmotyczne odwodnienie tkanki może stanowić alternatywną metodę przechowywania i pozwala na zachowanie struktury tkanki w przypadku skóry i węzłów chłonnych [Olszewski i wsp. 2004]. Ponadto skóra przechowywana w bezwodnym chlorku sodu wywołuje jedynie niewielką reakcję odpornościową w miejscu implantacji [Olszewski i wsp. 2006]. Prowadziliśmy również badania nad przechowywaniem w ten sposób hepatocytów, które wykazały, że po przechowywaniu, a następnie uwodnieniu, możliwe jest uzyskanie komórek o niemal niezmienionej morfologii. Oznaczanie poziomu apoptozy metodą TUNEL i anty-ssDNA wykazało, że poziom apoptozy w hepatocytach przechowywanych przez okres kilku dni w bezwodnym chlorku sodu z 20% BSA wynosi jedynie około 5%, w porównaniu do 90% w przypadku hepatocytów przechowywanych bez utrwalenia [Gewartowska i wsp. 2005].

Bazując na wynikach dotychczasowych doświadczeń, postanowiłam zbadać, czy metoda przechowywania w odwodnionym chlorku sodu okaże się skuteczna także w przypadku tętnic i pozwoli na ich długoterminowe przechowywanie, zachowanie nienaruszonej struktury ściany naczynia oraz obniżenie jego antygenowości.

2 Cel pracy

Zbadanie, czy metoda przechowywania tętnic w bezwodnym chlorku sodu pozwala na:

- a) zachowanie niezmięionej struktury,
- b) zachowanie właściwości mechanicznych,
- c) obniżenie antygenowości tętnic umożliwiające ich allogeniczne przeszczepianie bez immunosupresji.

3 Materiały

Wszystkie eksperymenty były wykonywane za zgodą IV Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (uchwała nr 23/2009). Badania prowadzono na samcach szczurów szczepów wsobnych Lewis (LEW) i Brown Norway (BN) o ciężarze ciała 250-300g, pochodzących ze zwierzętarni IMDiK PAN. Szczury szczepów LEW (RT1A^l) i BN (RT1Aⁿ) zostały wybrane ze względu na wysoką immunogenność BN względem LEW. Hodowla zwierząt prowadzona była w warunkach jałowych (za służą) w temperaturze 22°C±2°C, przy wilgotności 50-60% oraz z zachowaniem rytmu dobowego dzień/noc - 12h/12h. Zwierzęta otrzymywały paszę SSniff sterylizowaną promieniowaniem jonizującym w dawce 25 kGy oraz wodę sterylizowaną za pomocą filtra RO i promieniowania UV.

3.1 Model badawczy

Badania prowadziłam na dwóch modelach doświadczalnych:

3.1.1 Przeszczep ortotopowy

Doświadczenie polegało na ortotopowym przeszczepieniu aorty długości 2-3 centymetrów, metodą koniec do boku. We wszystkich eksperymentach biorcami przeszczepu były szczury szczepu LEW. Aorty do przeszczepienia uzyskano od szczurów szczepów LEW i BN, wykonano przeszczepy w układzie syngenicznym i allogenicznym. Naczynia przed przeszczepieniem były przechowywane w bezwodnym chlorku sodu przez okres 1 do 12 miesięcy albo przeszczepiane bez przechowywania, natychmiast po pobraniu.

3.1.2 Przeszczep podskórny

Doświadczenie polegało na podskórnym wszczepieniu w łapę fragmentów aort o długości 1 centymetra szczurom szczepu LEW. Aorty do przeszczepienia uzyskano od szczurów szczepów LEW i BN, wykonano przeszczepy w układzie syngenicznym i allogenicznym. Naczynia były przechowywane w bezwodnym chlorku sodu przez 7 dni albo przeszczepiane bez przechowywania, natychmiast po pobraniu. Po 7 dniach pobrano wycinki skóry z obu łap, w celu zbadania nacieków komórkowych w miejscu przeszczepu. Pobierano również węzły chłonne podkolanowe i biodrowe dla określenia reakcji immunologicznej w węzłach. Jest to rutynowy test do badania immunogenności *in vivo*.

3.2 Grupy doświadczalne

3.2.1 Przeszczep ortotopowy

Tętnice były przechowywane w bezwodnym chlorku sodu od 0 do 15 miesięcy i przeszczepiane na okres od 3 do 15 miesięcy. Wykonano syngeniczne i allogeniczne przeszczepy tętnic pobranych od szczurów szczepów wsobnych LEW (RT1A^l) i BN (RT1Aⁿ). Liczebność zwierząt w grupach badanych i kontrolnych (aorty nieprzeszczepione) wynosiła od 3 do 8.

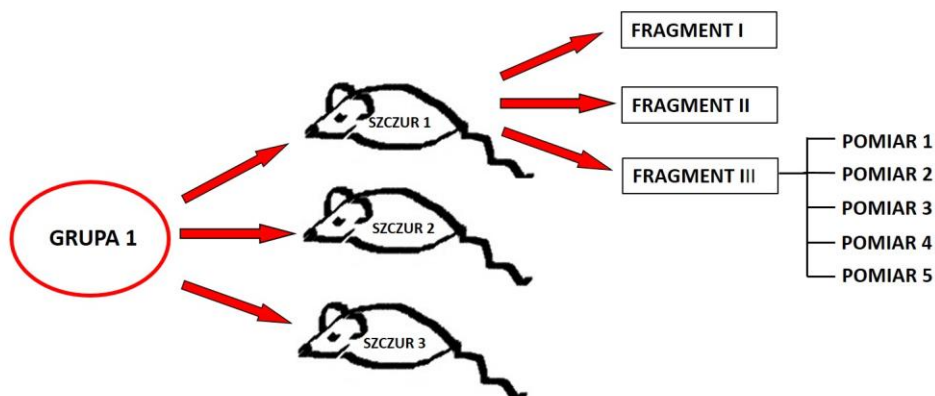
Tabela. 1. Grupy doświadczalne w modelu przeszczepów ortotopowych.

Nr grupy	Rodzaj przeszczepu (liczba zwierząt N=)	Czas przechowywania w NaCl	Czas obserwacji	Wykonane oznaczenia
1	Syngeniczny (N=5)	Nieprzechowywany	6 miesięcy	MŚ (n=3) WM (n=3)
2	Allogeniczny (N=7)	Nieprzechowywany	6 miesięcy	MŚ (n=3) WM (n=4)
3	Syngeniczny (N=3)	6 miesięcy	6 miesięcy	WM (n=3)
4	Allogeniczny (N=4)	6 miesięcy	6 miesięcy	MŚ (n=3) WM (n=3)
5	Syngeniczny (N=4)	1 miesiąc	12 miesięcy	ME (n=4)
6	Allogeniczny (N=5)	1 miesiąc	12 miesięcy	ME (n=4)
7	Syngeniczny (N=3)	10 miesięcy	3 miesiące	MŚ (n=3)
8	Allogeniczny (N=3)	12 miesięcy	3 miesiące	MŚ (n=3)
9	Syngeniczny (N=4)	12 miesięcy	15 miesięcy	MŚ (n=3) WM (n=3)
10	Allogeniczny (N=8)	12 miesięcy	15 miesięcy	MŚ (n=3) WM (n=5)

MŚ- Mikroskopia świetlna, ME- Mikroskopia elektronowa, WM- Wytrzymałość mechaniczna

Analizę mikroskopową przeszczepów wykonałam w każdej grupie na 3 szczurach. Obliczenia wykonywałam z 3 fragmentów każdego preparatu, w każdym oceniałam badane parametry na 5 polach o wielkości 100x100µm, co daje 45 pomiarów dla danego parametru w każdej grupie.

SCHEMAT OBLICZEŃ DLA KAŻDEJ GRUPY DOŚWIADCZALNEJ



Rycina 2. Schemat obliczeń dla każdej grupy doświadczalnej.

Tabela. 2. Grupy kontrolne.

Nr grupy (liczba zwierząt N=)	Czas przechowywania w NaCl	Czas po przeszczepieniu	Wykonane oznaczenia
I (N=7)	0	0	MŚ (n=3) ME (n=4) WM (n=4)
II (N=3)	3 miesiące	0	MŚ (n=3)
III (N=7)	6 miesięcy	0	MŚ (n=3) ME (n=4) WM (n=3)
IV (N=3)	10 miesięcy	0	MŚ (n=3)

MŚ- Mikroskopia świetlna, ME- Mikroskopia elektronowa, WM- Wytrzymałość mechaniczna

3.2.2 Przeszczep podskórny

Grupy doświadczalne w modelu przeszczepów podskórnych:

Grupa badana: Trzem szczurom szczepu LEW wszczepiono podskórnie aorty przechowywane przez 7 dni. W łapę lewą wszczepiono aorty BN (podskórny przeszczep allogeniczny – sc tx allogeniczny), a w łapę prawą aorty LEW (podskórny przeszczep syngeniczny – sc tx syngeniczny).

Grupa kontrolna: Trzem szczurom szczepu LEW wszczepiono podskórnie nieprzechowywane aorty (bezpośrednio po pobraniu). W łapę lewą wszczepiałam aorty BN, a w łapę prawą aorty LEW.

4 Metodyka badań

4.1 Technika pobierania aorty piersiowej od dawcy.

Po uśpieniu 3,6% wodzianem chloralu, podanym dootrzewnowo w dawce 10ml/kg mc. i skrwawieniu dawcy wykonywano kolejno:

- przecięcie przepony i otwarcie klatki piersiowej dwoma bocznymi cięciami przez żebra,
- przecięcie łuku aorty, pnia płucnego, żył głównych i wyjęcie serca i płuc,
- wypreparowanie aorty piersiowej, podwiązanie tętnic bocznych i ich odcięcie,
- wycięcie aorty piersiowej.

4.2 Metoda przechowywania aorty do przeszczepienia.

Chlorek sodu przeznaczony do przechowywania tkanek poddawano sproszkowaniu z użyciem młynka elektrycznego, a następnie odwodnieniu poprzez wyprażenie przez 2 godziny w 220°C. Fragmenty aort umieszczano w bezwodnym chlorku sodu i przechowywano szczelnie zawinięte w folii aluminiowej w temperaturze 4°C przez okres od tygodnia do 15 miesięcy. Aorty były poddane działaniu chlorku sodu jedynie z zewnątrz, nie było styczności soli ze światłem naczynia. Końce naczyń narażone na działanie NaCl od strony wewnętrznej naczynia były odcinane przed przeszczepieniem na odcinku po 2-3 mm z każdej strony.

4.3 Procedura uwadniania

Aorty były uwadniane poprzez trzykrotne umieszczenie w 20 ml 0,9% NaCl z 5% albuminą bydlęcą (Sigma-Aldrich, USA nr kat. A9647). Procedurę przeprowadzano w temperaturze 4°C na kołyszce. Przed przeszczepieniem naczynie było odpłukiwane w 0,9 % NaCl bez dodatku albuminy. Czas uwadniania był dostosowany do czasu przechowywania w chlorku sodu i wynosił od 1,5 h do 96 h.

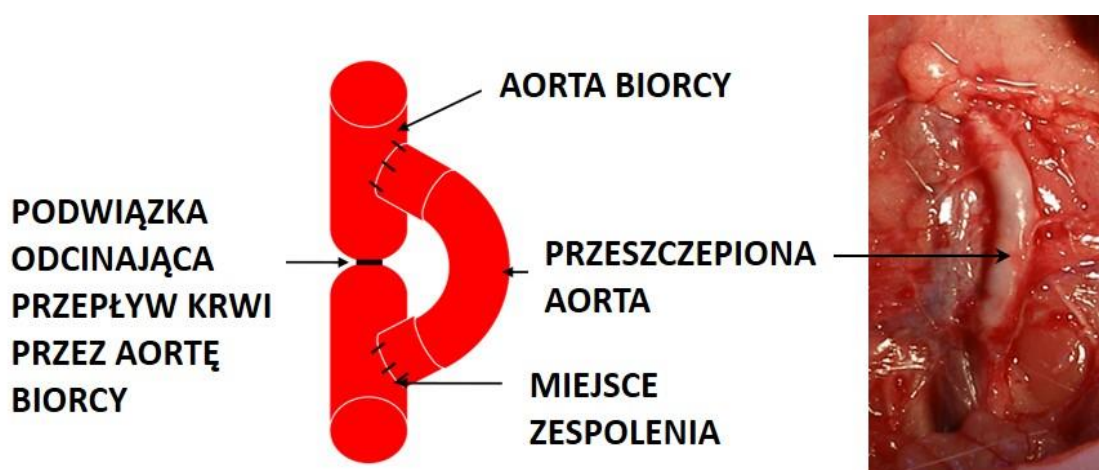
Tabela 3. Czas przechowywania i uwadniania aort.

Czas przechowywania	Czas uwadniania
7 dni	1,5 godziny
6 miesięcy	48 godzin
10-15 miesięcy	96 godzin

4.4 Technika przeszczepiania ortotopowego aorty brzusznej

Zwierzę w znieczuleniu ogólnym 3,6% wodzianem chloralu podanym dootrzewnowo w dawce 10ml/kg mc. było otwierane cięciem wzdłuż linii białej, a następnie:

- odpreparowywano naczynia główne brzuszne szczura i oddzielano aortę od żyły głównej dolnej,
- na aortę zakładano zaciski naczyniowe, między zaciskami wykonywano podłużne nacięcie o długości 4 mm,
- mikrochirurgicznym szwem ciągłym wykonywano zespolenie górne, koniec do boku, między aortą dawcy a biorcy,
- w identyczny sposób zespalano drugi koniec aorty dawcy z aortą biorcy uzyskując „pętlę naczyniową”,
- podwiązywano aortę biorcy pomiędzy zespoleniami, by wymusić przepływ krwi jedynie przez przeszczepione naczynie,
- zdejmowano zaciski naczyniowe i po kontroli szczelności zespolenia zamykano powłoki.



Rycina 3. Technika przeszczepu ortotopowego aorty brzusznej – schemat.

Po zakończeniu czasu obserwacji (od 6 do 15 miesięcy) zwierzę w znieczuleniu ogólnym 3,6% wodzianem chloralu otwierano wzdłuż linii białej, preparowano miejsca zespolenia, zakładano podwiązki powyżej i poniżej zespolenia, a następnie pobierano przeszczepiony fragment aorty. Po pobraniu zwierzę było poddawane eutanazji przez wykrwawienie.

Fragmenty aort do barwień histologicznych i znakowania przeciwciałami utrwalano w acetonie z suchym lodem i przechowywano w temperaturze -80°C . Liczebność szczurów w każdej z grup, w których wykonano znakowania wynosiła $n=3$.

Materiał do badań mikroskopowo-elektronowych pobierano po wykonaniu perfuzji zwierząt przez lewą komorę serca utrwalaczem: 2% roztworem paraformaldehydu i 2,5% aldehydu glutarowego w 0,1M buforze kokodylanowym. Liczebność szczurów w każdej z grup wynosiła $n=4$.

4.5 Technika przeszczepiania podskórnego aorty brzusznej

Wykonano podskórne wszczepienie w łapę uśpionego szczura 1-centymetrowych odcinków aort przechowywanych w NaCl i świeżych. Naczynia uzyskano od szczurów szczepu BN (sc tx allogeniczny) lub LEW (sc tx syngeniczny). W miejscu wszczepienia nie zakładano szwów, aby uniknąć nacieków zapalnych wokół szwu. Po 7 dniach szczury usypiano i pobierano wycinki skóry z tkanką podskórną z obu łap. Wypreparowano i zważono węzły chłonne podkolanowe i biodrowe w celu określenia reakcji immunologicznej w węzłach. Po pobraniu zwierzę było poddawane eutanazji przez wykrwawienie. Fragmenty skóry utrwalano w acetonie z suchym lodem i przechowywano w temperaturze -80°C .

4.6 Ocena wytrzymałości mechanicznej aort

Wytrzymałość mechaniczną naczyń badano poprzez określenie dwóch parametrów: wytrzymałości na rozciąganie (badanie wytrzymałościowe w próbie rozciągania) oraz oznaczanie maksymalnego ciśnienia wewnątrznaczyniowego (badanie wytrzymałościowe w próbie ciśnieniowej). Wytrzymałość na rozciąganie badano urządzeniem Wagner Force Dial™, model FDK / FDN (Wagner instruments, P.O.B 1217 Greenwich, USA) na 1-centymetrowych odcinkach naczyń pochodzących ze środkowej części pętli, przykładając siłę rozciągającą wzdłuż długiej osi naczynia.

Badanie wytrzymałościowe w próbie ciśnieniowej wykonywano przez stopniowe zwiększanie ciśnienia wewnątrz naczynia o świetle zamkniętym podwiązkami. Odczytu dokonywano manometrem w momencie pęknięcia naczynia.

4.7 Ocena immunogenności aort

4.7.1 Ocena immunogenności aort po przeszczepieniu ortotopowym

Immunogenność aort po przeszczepieniu ortotopowym była badana na podstawie oceny intensywności nacieków komórkowych w miejscu przeszczepu. Oceniano wielkość nacieków w każdej z warstw przeszczepionego naczynia. Komórki naciekające przeszczep identyfikowano z użyciem przeciwciał ED1, OX6 i W3/13. Oceny dokonano za pomocą programu Cell Imaging Software for Life Science Microscopy firmy Olympus.

4.7.2 Ocena immunogenności aort po przeszczepieniu podskórnym

Immunogenność aort po przeszczepie podskórnym była badana na podstawie oceny intensywności nacieków komórkowych w miejscu przeszczepu. Komórki naciekające przeszczep identyfikowano z użyciem przeciwciał ED1, OX6 i W3/13. Oceny dokonano za pomocą programu Cell Imaging Software for Life Science Microscopy firmy Olympus. Reakcję immunologiczną regionalnych (podkolanowych i biodrowych) węzłów chłonnych na przeszczep określano na podstawie zmian w ich masie. Węzły ważono przy użyciu wagi Mettler Toledo XS 205. Odczytu dokonywano z dokładnością do czwartego miejsca po przecinku.

4.8 Barwienia histologiczne aort

Wszystkie barwienia i znakowania przeprowadzano na tkankach mrożonych, utrwalonych w acetonie z suchym lodem. Po pobraniu aorty cięto na skrawki o grubości 5µm przy użyciu kriostatu firmy Leica model CM 1850 UV i barwiono hematoksyliną/eozyną oraz metodą trichrome Azan na obecność włókien kolagenowych.

4.9 Znakowania immunohistochemiczne aort do analizy w mikroskopie świetlnym

Do identyfikacji antygenów powierzchniowych komórek zastosowano przeciwciała monoklonalne mysie skierowane przeciwko antygenom szczurzym. Przeciwciał CD31, RECA-1 (HIS 52) oraz CD54 używano do identyfikacji komórek śródbłonna naczyniowego. Znakowanie leukocytów przeciwciałami ED1 (CD68), OX6 (MHC II) i W3/13 (CD43) miało na celu monitorowanie reakcji immunologicznej biorcy na przeszczep. Stosowano metodę pośredniego znakowania przy użyciu

kompleksu biotyna-streptawidyna-fosfataza alkaliczna (LSAB-2 Kit AP, DAKO A/S, Dania, nr kat. K0674). Preparaty tkankowe utrwalano 10 minut w acetonie, a następnie suszono. W celu zablokowania niespecyficznego barwienia, tkanki inkubowano z surowicą kozią, rozcieńczoną 1:1 buforem Tris pH=7,6 przez 20 minut w temperaturze pokojowej, po czym nakładano na 45 minut pierwszorzędowe przeciwciała monoklonalne znakujące komórki:

a) Śródbłónka naczyniowego:

CD 31 (1:30, mysie anty szczurze, Serotec, Oxford, UK, nr kat. MCA 1334G),

RECA-1 (HIS 52) (1:30, mysie anty szczurze, Serotec, Oxford, UK, nr kat. MCA970R),

CD 54 (1:30, mysie anty szczurze, Serotec, Oxford, UK, nr kat. MCA773).

b) Układu odpornościowego:

ED 1 (1:100, mysie anty szczurze CD68, Serotec, Oxford, UK, nr kat. MCA341R),

OX 6 (1:100, mysie anty szczurze RT1B, Serotec, Oxford, UK, nr kat. MCA46G),

W 3/13 (1:100, mysie anty szczurze CD43, Serotec, Oxford, UK, nr kat. MCA54G).

Po odpłukaniu w buforze Tris pH=7.6 preparaty inkubowano 15 minut z II-rzędowym biotynylowanym przeciwciałem kozim skierowanym przeciwko immunoglobulinie myszy, następnie nakładano streptawidynę skoniugowaną z alkaliczną fosfatazą. Odpłukiwano w buforze Tris pH=7,6 i przeprowadzono reakcję z chromogennym substratem dla alkalicznej fosfatazy (Vector Laboratories, USA, nr kat. SK-5100) przez 15 min. Preparaty płukano w wodzie destylowanej, dobarwiano hematoksyliną przez 55 sekund i zatapiano w żelu glicerynowym.

Tabela 4. Charakterystyka użytych przeciwciał.

Przeciwciało	Ekspresja antygeny	Funkcja
CD31	Komórki ciągłego śródbłonka naczyniowego.	Pełni rolę w interakcjach adhezyjnych pomiędzy sąsiadującymi komórkami śródbłonka oraz między leukocytami a komórkami śródbłonka. Homofilne CD31 uczestniczy w diapedezie leukocytów przez śródbłonek, heterofilne CD31 pełni rolę w migracji monocytów przez błonę podstawną podśródbłonkową.
RECA-1 (HIS 52)	Antygen ekspresjonowany przez szczurze komórki śródbłonkowe.	Jest jedynym specyficznym markerem wszystkich typów szczurzych komórek śródbłonka naczyniowego. Charakter tego antygeny powierzchniowego jest nadal nieznan.
ICAM-1 (CD 54)	Komórki śródbłonka, mięśni gładkich, fibroblastów. Indukcja tego białka, wiąże się z obecnością mediatorów procesu zapalnego np. TNF- α , INF- γ , IL-1.	Bierze udział w procesie adhezji i migracji leukocytów przez barierę komórek śródbłonka.
ED1 (CD68)	Silna ekspresja przez monocyty i makrofagi, słaba przez granulocyty krwi obwodowej.	Może odgrywać rolę w procesie fagocytozy przez makrofagi, oraz w interakcjach z innymi komórkami i patogenami. Wiąże się z tkankowo-specyficznymi lektynami i selektynami, co umożliwia zasiedlanie określonych obszarów.
OX 6 (MHCII, RT1B)	Limfocyty B, komórki dendrytyczne, makrofagi, komórki nabłonkowe.	Prezentacja antygeny, mediowanie odpowiedzi immunologicznej lub tolerancji na antygen.
W3/13 (CD43)	Silna ekspresja na leukocytach, z wyjątkiem limfocytów B w fazie spoczynkowej.	Pełni rolę antyadhezyjną, sygnałową oraz w oddziaływaniach cytoszkieletowych.

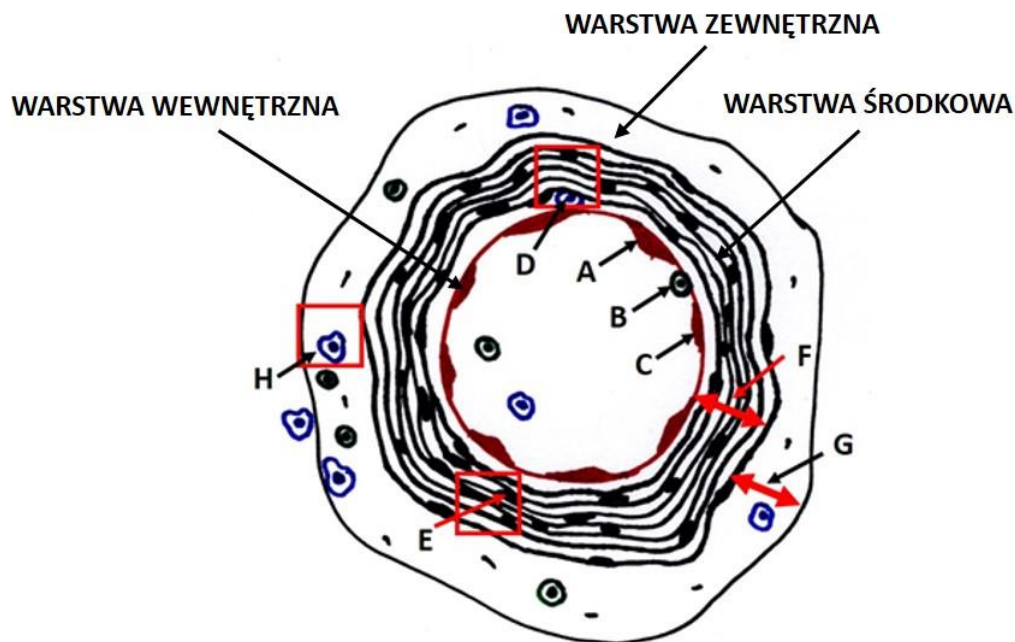
4.10 Ocena parametrów morfologicznych przeszczepionej ortotopowo aorty i nacieków komórkowych.

Do oceny preparatów wykorzystano mikroskop świetlny (IX71, Olympus, Japan) wyposażony w kamerę (SPT-M324CE, Sony, Japan) z oprogramowaniem Cell Imaging Software for Life Science Microscopy firmy Olympus (Olympus, Germany).

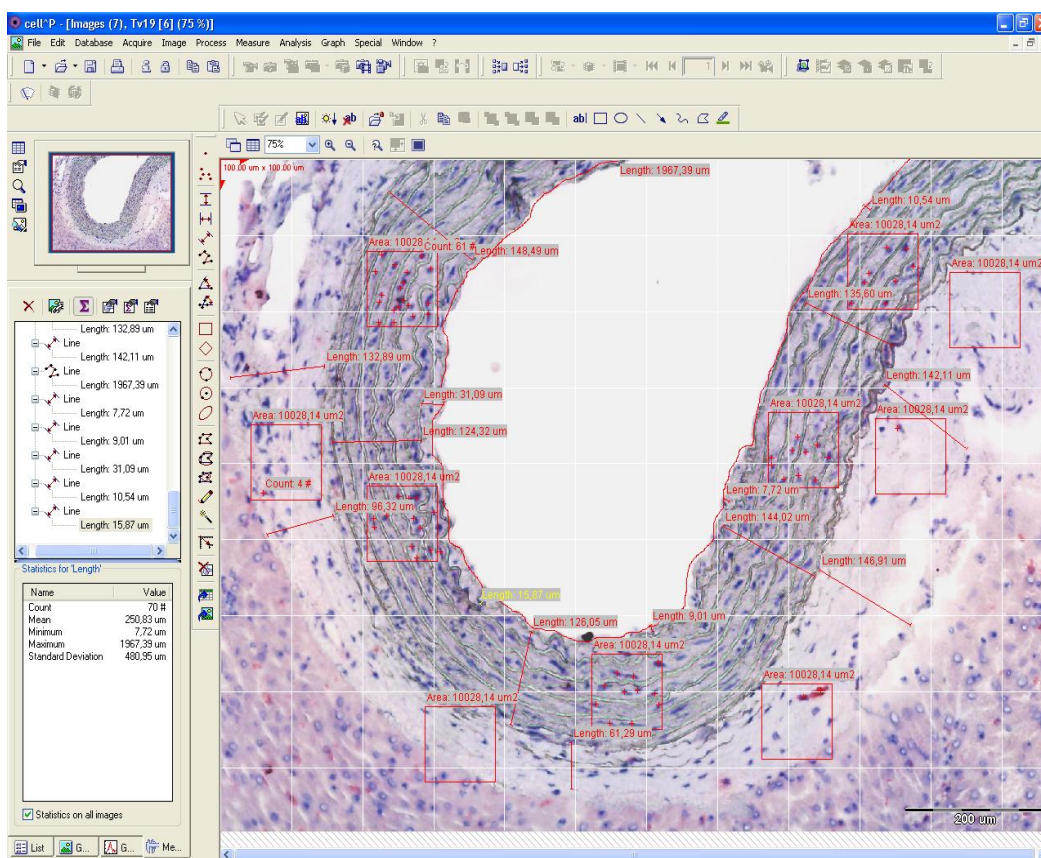
Badano następujące parametry:

- A. Wielkość obwodu warstwy wewnętrznej pokrytej śródbłonkiem naczyniowym (oceniana w przekroju poprzecznym, wyrażona jako wartość procentowa, poprzez stosunek długości fragmentu warstwy wewnętrznej pokrytej śródbłonkiem do całej długości warstwy wewnętrznej),
- B. Liczbę komórek pozytywnych w obrębie warstwy wewnętrznej (średnia z 5 pól o wymiarach 100x100 μm),
- C. Szerokość warstwy wewnętrznej w μm (średnia z 5 pomiarów),
- D. Liczbę komórek pozytywnych w obrębie warstwy środkowej (średnia z 5 pól o wymiarach 100x100 μm),
- E. Liczbę komórek w obrębie warstwy środkowej (średnia z 5 pól o wymiarach 100x100 μm),
- F. Szerokość warstwy środkowej w μm (średnia z 5 pomiarów),
- G. Szerokość warstwy zewnętrznej w μm (średnia z 5 pomiarów),
- H. Liczbę komórek pozytywnych w obrębie warstwy zewnętrznej (średnia z 5 pól o wymiarach 100x100 μm).

W przypadku przeszczepów podskórnych badano jedynie intensywność reakcji immunologicznej poprzez ocenę nacieków komórek ED1, OX6 i W3/13 pozytywnych.



Rycina 4. Schemat budowy aorty z uwzględnieniem sposobu dokonywania pomiarów. Wyjaśnienia oznaczeń w tekście na stronie 39.



Rycina 5. Przykładowe zdjęcie aorty z wykonanymi w programie Cell pomiarami parametrów morfologicznych i nacieków komórkowych przeszczepionej ortotopowo aorty.

4.11 Przygotowanie materiału do analizy w mikroskopie elektronowym

W celu uzyskania materiału do badań ultrastruktury aort w mikroskopie elektronowym każde zwierzę zostało poddane perfuzji przez lewą komorę serca utrwalaczem: 2% roztworem paraformaldehydu i 2,5% glutaraldehydu w 0,1M buforze kokodylanowym, pH 7,4, przez 20 minut w temperaturze 20°C. Po perfuzji aorty pobierano i utrwalano w tym samym roztworze przez 3 godziny w temperaturze pokojowej, następnie przez 48 godzin w temperaturze 4°C. Po utrwaleniu aorty płukano w 0,1M buforze kokodylanowym przez 24 godziny. Tkanę osmowano używając mieszaniny 1% tlenku osmu (OsO_4) i 0.8% żelazicyjanku potasu $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Materiał odwadniano przeprowadzając przez szereg alkoholi oraz tlenek propylenu ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$), początkowo czysty, a następnie ze wzrastającym stężeniem żywicy (w proporcji 3:1, 1:1, 1:3). Ostatnim etapem procedury było zatopienie aorty w czystej żywicy. Materiał cięto na skrawki ultracienkie i analizowano w elektronowym mikroskopie transmisyjnym JEM-1200EX.

4.12 Analiza statystyczna otrzymanych wyników

Stosownie do charakteru poszczególnych parametrów, część z nich poddano przed analizą transformacji: kątowej (procent obwodu warstwy wewnętrznej pokrytej śródbłonkiem naczyniowym), pierwiastkowej (zliczenia komórek odpornościowych biorcy naciekających przeszczep) lub logarytmicznej (szerokość poszczególnych warstw aort, reakcja regionalnych węzłów chłonnych).

Porównania wielokrotne przeprowadzono metodą Tukey'a, poprzedzoną analizą wariancji w klasyfikacji pojedynczej (SAS/ANOVA, SAS Institute 2010) na trzech poziomach istotności: 0,05; 0,01 i 0,001. Równolegle wykonano (w przypadku wyników doświadczeń z przeszczepów ortotopowych i podskórnych) porównania parami metodą Satterthwaite'a, co dało możliwość uniezależnienia się od założenia o jednorodności zmienności. W poszczególnych kombinacjach czynników znaleziono 95% przedziały ufności dla wartości średnich poszczególnych cech. W przypadku stosowania transformacji danych wyliczono przedziały dla cech transformowanych, po czym przeniesiono je do skali oryginalnej przez zastosowanie transformacji odwrotnych.

Wyniki doświadczeń dotyczących wytrzymałości mechanicznej aort były danymi lewostronnie uciętymi, co wykluczało proste zastosowanie metod parametrycznych. Grupy porównano za pomocą testu rangowego Kruskala-Wallisa z wykorzystaniem permutacyjnego rozkładu statystyki testu do oceny istotności statystycznej. Otrzymane wartości liczbowe przedstawiono w formie średniej \pm SEM.

5 Wyniki

5.1 Ocena makroskopowa przeszczepionych ortotopowo aort

Wszystkie aorty nieprzechowywane, przeszczepione na 6 miesięcy w układzie syngenicznym (grupa 1) zachowywały drożność i tętniły. Nie zaobserwowałam powstania tętniaków. Natomiast w grupie naczyń nieprzechowywanych, przeszczepionych również na 6 miesięcy, ale w układzie allogenicznym (grupa 2) drożnych było 71,4%, tętniło 57,1%, a poszerzonych było 14,3%. Aorty przechowywane przez 6 miesięcy i przeszczepione na 6 miesięcy w układzie syngenicznym (grupa 3) były drożne i tętniły, nie obserwowałam również występowania tętniaków. Natomiast naczynia allogeniczne przechowywane przez 6 miesięcy i przeszczepione na 6 miesięcy (grupa 4) zachowywały drożność i tętniły w 75% przypadków, a 25% z nich było poszerzonych. Po krótkoterminowym przechowywaniu (30 dni) i przeszczepieniu na 12 miesięcy, zarówno w układzie syngenicznym (grupa 5), jak i allogenicznym (grupa 6), aorty zachowywały takie same parametry jak w grupie 1. Długoterminowe przechowywanie (10-12 miesięcy) i krótkoterminowe (3 miesiące) przeszczepienie powodowało nieznaczne pogorszenie parametrów w naczyniach allogenicznych (grupa 8), ale nie syngenicznych (grupa 7). Po długoterminowym przechowywaniu (12 miesięcy) i długoterminowym przeszczepieniu (na 15 miesięcy) (grupy 9 i 10) odsetek naczyń drożnych i tętniących zmniejszył się, a poszerzonych zwiększył zarówno w przeszczepach syngenicznych, jak i allogenicznych (tabela 5).

Tabela 5. Ocena makroskopowa aort po przeszczepieniu ortotopowym.

	Czas w NaCl	Czas po przeszczepieniu	Drożność	Tętnienie	Poszerzenie	N=
Grupa 1 Syngeniczne	Nieprzechowywane	6 miesięcy	5/5 (100%)	5/5 (100%)	0/5 (0%)	N=5
Grupa 2 Allogeniczne	Nieprzechowywane	6 miesięcy	5/7 (71,4%)	4/7 (57,1%)	1/7 (14,3%)	N=7
Grupa 3 Syngeniczne	6 miesięcy	6 miesięcy	3/3 (100%)	3/3 (100%)	0/3 (0%)	N=3
Grupa 4 Allogeniczne	6 miesięcy	6 miesięcy	3/4 (75%)	3/4 (75%)	1/4 (25%)	N=4
Grupa 5 Syngeniczne	30 dni	ok 12 miesięcy	4/4 (100%)	4/4 (100%)	0/4 (0%)	N=4
Grupa 6 Allogeniczne	30 dni	ok 12 miesięcy	5/5 (100%)	5/5 (100%)	0/5 (0%)	N=5
Grupa 7 Syngeniczne	10 miesięcy	3 miesiące	3/3 (100%)	3/3 (100%)	0/3 (0%)	N=3
Grupa 8 Allogeniczne	12 miesięcy	3 miesiące	3/3 (100%)	2/3 (66,6%)	1/3 (33,3%)	N=3
Grupa 9 Syngeniczne	12 miesięcy	15 miesięcy	4/4 (100%)	3/4 (75%)	1/4 (25%)	N=4
Grupa 10 Allogeniczne	12 miesięcy	15 miesięcy	7/8 (87,5%)	7/8 (87,5%)	4/8 (50%)	N=8

Jeśli porównywać średnią wyników w grupach naczyń nieprzechowywanych i przechowywanych (bez względu na długość czasu przechowywania i przeszczepienia), to naczynia przechowywane w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepione w układzie syngenicznym mają niemalże te same parametry co świeże: drożność (tak jak w przypadku świeżych) 100%, tętnienie 92,9% (w przypadku świeżych 100%), poszerzenie 8,3% (w przypadku świeżych 0%). Grupa tętnic

przechowywanych w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepionych w układzie allogenicznym różni się natomiast w sposób dość istotny od grupy kontrolnej aort nieprzechowywanych, przeszczepionych w układzie allogenicznym. Wśród tętnic przechowywanych drożnych pozostawało 90,6% (w porównaniu do 71,4%), tętniło 82,3% (w porównaniu do 57,1%), a poszerzenie obserwowałam w 27,1% w porównaniu do 14,3% w grupie kontrolnej aort nieprzechowywanych przeszczepionych w układzie allogenicznym (tabela 6).

Tabela 6. Ocena makroskopowa aort po przeszczepieniu ortotopowym - uśrednione wyniki.

	Drożność	Tętnienie	Poszerzenie
Nieprzechowywane syngeniczne	100%	100%	0%
Przechowywane syngeniczne	100%	92,9%	8,3%
Nieprzechowywane allogeniczne	71,4%	57,1%	14,3%
Przechowywane allogeniczne	90,6%	82,3%	27,1%

5.2 Budowa morfologiczna aort kontrolnych przed przeszczepieniem.

Ściana aort kontrolnych zdrowego szczura (N=3), nie poddanych procesowi przechowywania, składała się z trzech warstw. Warstwa wewnętrzna wysłana była ciągłym, płaskim śródbłonkiem naczyniowym, znakującym się przeciwciałami anty HIS52 i anty CD31, jak również mniej specyficznym w stosunku do komórek śródbłonka przeciwciałem anty CD54. Komórki tej warstwy spoczywały na cienkiej błonie podstawnej, pod którą występowała warstwa środkowa. Jej grubość w aortach nieprzechowywanych przed przeszczepieniem wynosiła średnio $117 \pm 4,5 \mu\text{m}$. Warstwę tę tworzyły włókna elastyczne (8-10 warstw) o układzie okrężnym. Pomiędzy włóknami obserwowałam licznie występujące komórki mięśniowe (średnio $67 \pm 1,2$ komórek). Grubość warstwy zewnętrznej, zawierającej liczne włókna kolagenowe i elastynowe wynosiła średnio $16,9 \pm 2,6 \mu\text{m}$.

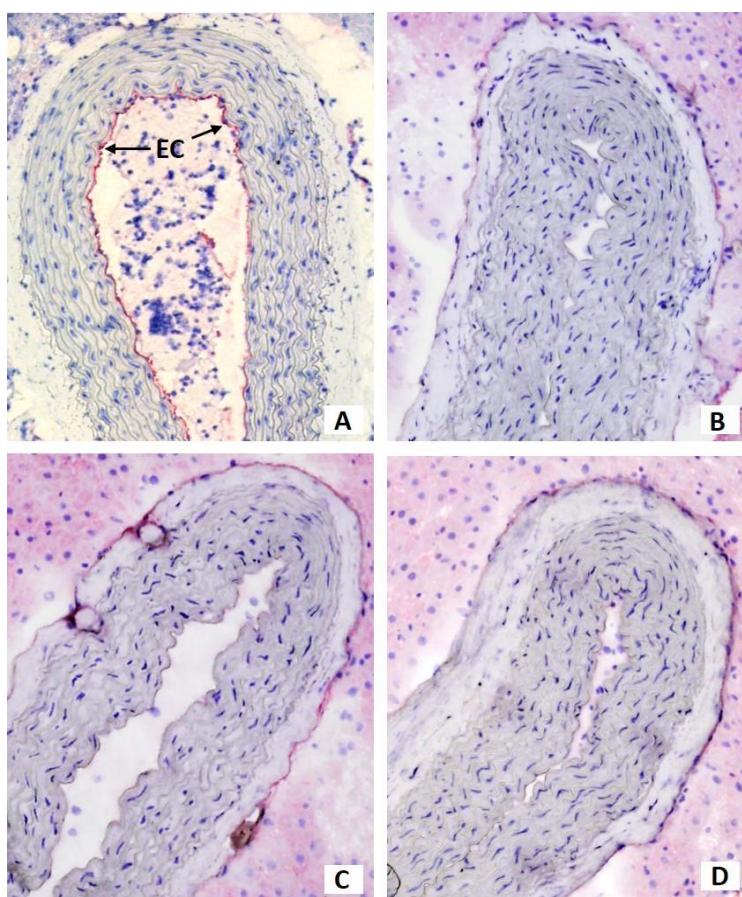
5.3 Budowa morfologiczna aort po przechowywaniu w NaCl przed przeszczepieniem.

W celu zbadania, czy metoda przechowywania w bezwodnym chlorku sodu pozwoli na uzyskanie naczyń charakteryzujących się parametrami umożliwiającymi ich zastosowanie do przeszczepów, po procesie przechowywania w NaCl dokonałam oceny morfologicznej aort. Badałam obwód warstwy wewnętrznej pokrytej śródbłonkiem

naczyniowym aort przed przeszczepieniem, oceniałam grubość poszczególnych warstw aorty oraz liczebność komórek mięśniowych w warstwie środkowej.

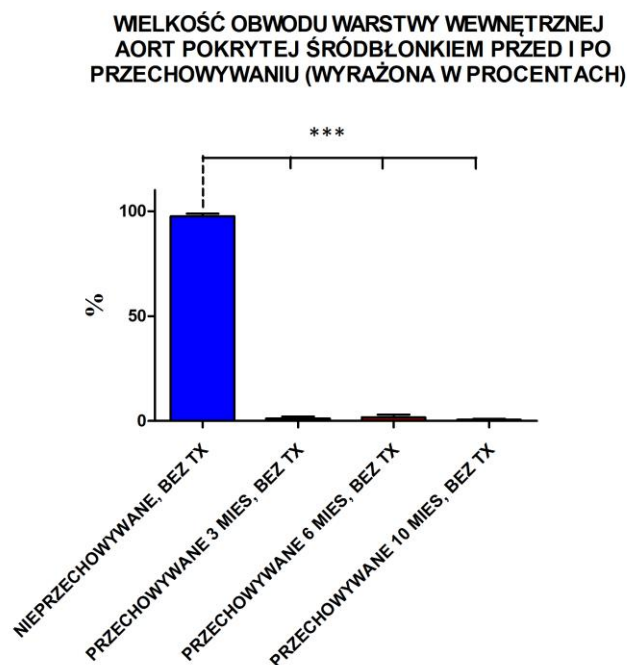
5.3.1 Ocena obwodu warstwy wewnętrznej aort pokrytej śródbłonkiem naczyniowym przed przeszczepieniem.

W przypadku aort przechowywanych w bezwodnym chlorku sodu przed przeszczepieniem nie zidentyfikowałam komórek śródbłonka naczyniowego znakujących się przeciwciałami anty HIS52, anty CD31 i anty CD54. Obserwowałam natomiast zachowaną strukturę włókien elastycznych i obecne między nimi lekko obkurczone miofibroblasty. Komórki śródbłonka naczyniowego (zabarwione na czerwono) obecne były jedynie w nieprzechowywanej aorticie. Poza tym obraz aort przechowywanych w bezwodnym chlorku sodu nie odbiegał od obrazu aorty kontrolnej (rycina 6).



Rycina 6. Aorta świeża po pobraniu (A) oraz przechowywana w bezwodnym NaCl przez 3 miesiące (B); 6 miesięcy (C); i 10 miesięcy (D). Znakowanie anty HIS 52, pow. x100. EC-komórki śródbłonka naczyniowego.

Na poniższym wykresie przedstawiłam wyniki obliczeń procentu obwodu warstwy wewnętrznej aort pokrytej śródbłonkiem w grupach aort przed i po przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu.

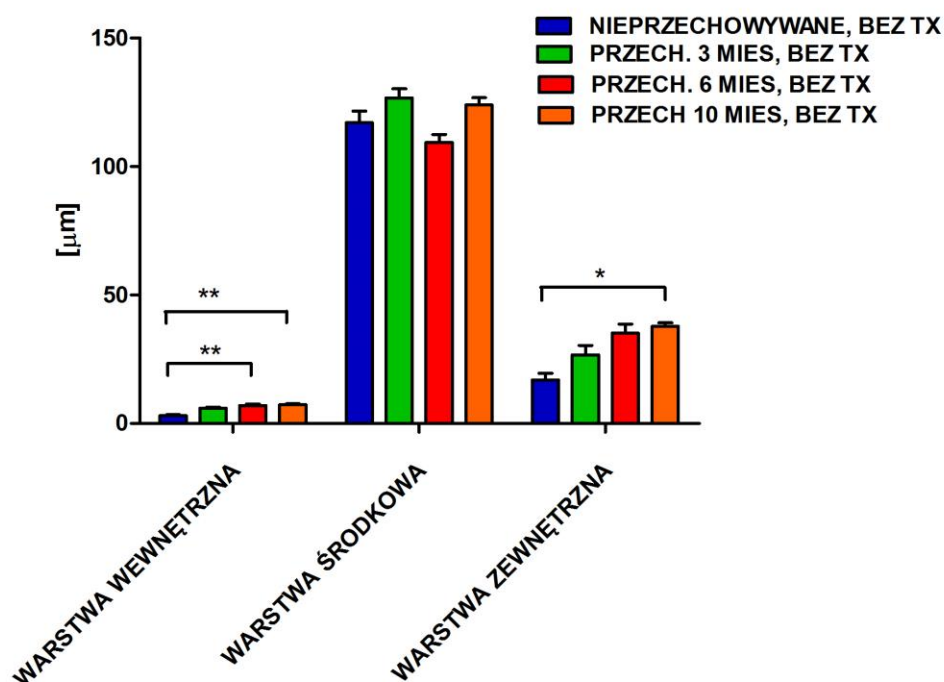


Rycina 7. Wielkość obwodu warstwy wewnętrznej aort pokrytej śródbłonkiem przed i po przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu (wyrażona w procentach). Analizę statystyczną wykonałam metodą porównań wielokrotnych Tukey’*a* ANOVA, *** $p < 0,001$. Wyniki badań przedstawione są jako średnie arytmetyczne \pm SEM. Linia przerywaną oznaczono dane stanowiące punkt odniesienia w analizie statystycznej. Skrót „bez tx” oznacza aorty nieprzeszczepione.

5.3.2 Ocena grubości warstwy wewnętrznej, środkowej i zewnętrznej w aortach przechowywanych w bezwodnym chlorku sodu przed przeszczepieniem.

Grubość warstwy wewnętrznej aort nieprzechowywanych wynosiła średnio $3,05 \pm 0,3 \mu\text{m}$. Była ona porównywalna do wartości obserwowanych w aortach przechowywanych 3 miesiące, ale istotnie statystycznie niższa ($p < 0,01$), niż w przypadku aort przechowywanych 6 miesięcy ($7 \pm 0,6 \mu\text{m}$) i 10 miesięcy ($7,33 \pm 0,3 \mu\text{m}$). Może to wynikać z nadmiernej rehydratacji tkanki po przechowywaniu. Grubość warstwy środkowej była porównywalna we wszystkich badanych grupach i wynosiła $109,2 \pm 3,2 \mu\text{m}$ do $126 \pm 3,6 \mu\text{m}$, natomiast w przypadku warstwy zewnętrznej różnicę istotną statystycznie ($p < 0,05$) zaobserwowano jedynie pomiędzy aortami nieprzechowywanymi, a przechowywanymi przez 10 miesięcy ($16,9 \pm 2,6 \mu\text{m}$ w porównaniu do $37,8 \pm 1,4 \mu\text{m}$). Dane te przedstawia rycina 8.

GRUBOŚĆ POSZCZEGÓLNYCH WARSTW AORT PRZED I PO PRZECHOWYWANIU

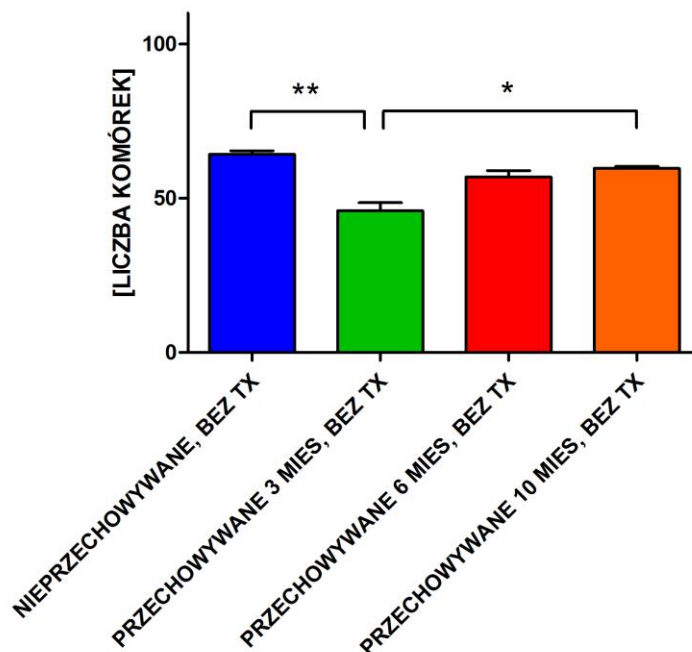


Rycina 8. Grubość poszczególnych warstw aort przed i po przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu. Analizę statystyczną wykonałam metodą porównań wielokrotnych Tukey'a ANOVA; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Wyniki badań przedstawione są jako średnie arytmetyczne \pm SEM. Skrót „bez tx” oznacza aorty nieprzeszczepione.

5.3.3 Liczba komórek mięśniowych w warstwie środkowej.

W aortach nieprzechowywanych oraz przechowywanych w bezwodnym chlorku sodu przez 6 i 10 miesięcy liczba komórek mięśniowych w warstwie środkowej była porównywalna i wynosiła odpowiednio: 64, 57 i 60 (rycina 11). Liczbę komórek w obrębie warstwy środkowej podaję jako średnią z 5 pól o wymiarach $100 \times 100 \mu\text{m}$. W przypadku aort przechowywanych przez 3 miesiące liczba komórek mięśniowych w warstwie środkowej była nieco niższa niż w pozostałych grupach i wynosiła 46. Dane te przedstawia rycina 9.

LICZBA KOMÓREK MIĘŚNIOWYCH W WARSTWIE ŚRODKOWEJ AORT PRZED I PO PRZECHOWYWANIU

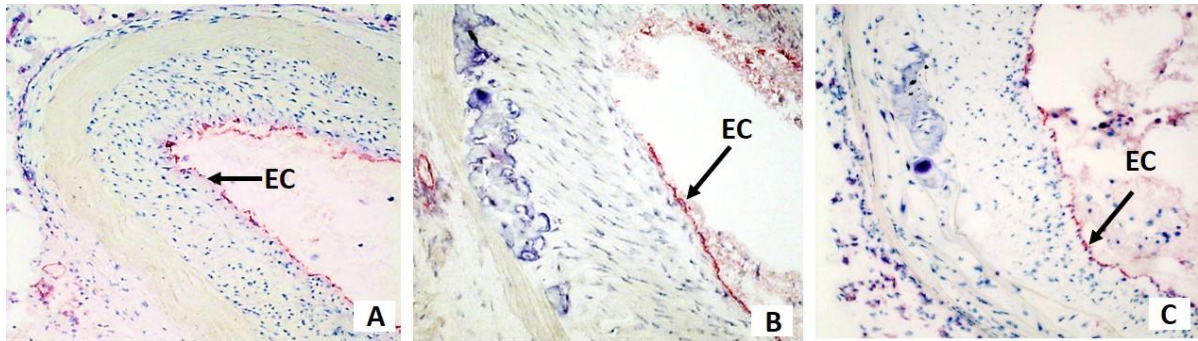


Rycina 9. Liczba komórek mięśniowych w warstwie środkowej aort przed i po przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu. Analizę statystyczną wykonałam metodą porównań wielokrotnych Tukey'a ANOVA * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Wyniki badań przedstawione są jako średnie arytmetyczne \pm SEM. Skrót „bez tx” oznacza aorty nieprzeszczepione.

5.4 Budowa morfologiczna aort przeszczepionych ortotopowo.

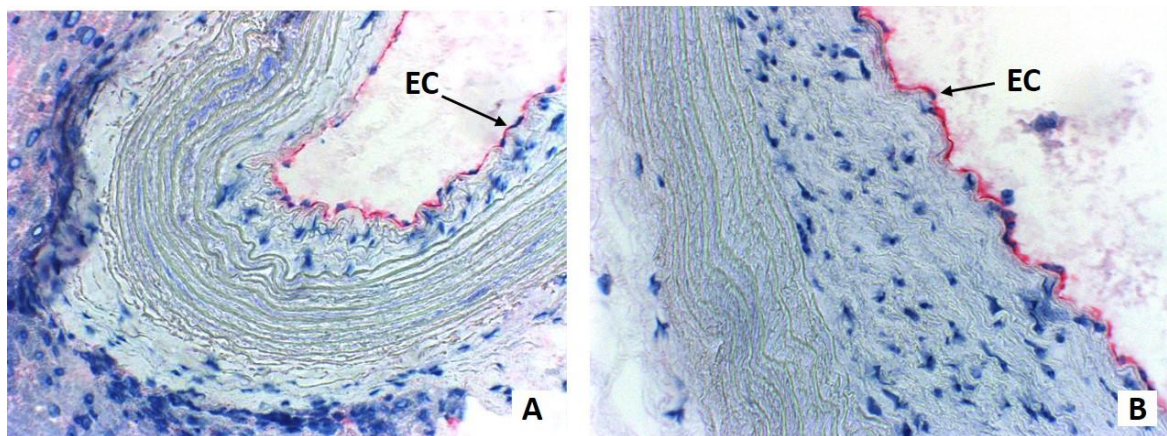
5.4.1 Ocena obwodu warstwy wewnętrznej aort pokrytej śródbłonkiem naczyniowym po przeszczepieniu.

Naczynia przechowywane przez 12 miesięcy w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepione na 15 miesięcy, zarówno w układzie syngenicznym, jak i allogenicznym charakteryzowały się obecnością komórek śródbłonka naczyniowego wyrażających antygen HIS52 (rycina 10). Podobnej obserwacji dokonałam w przypadku naczyń nieprzechowywanych i długoterminowo przeszczepionych.

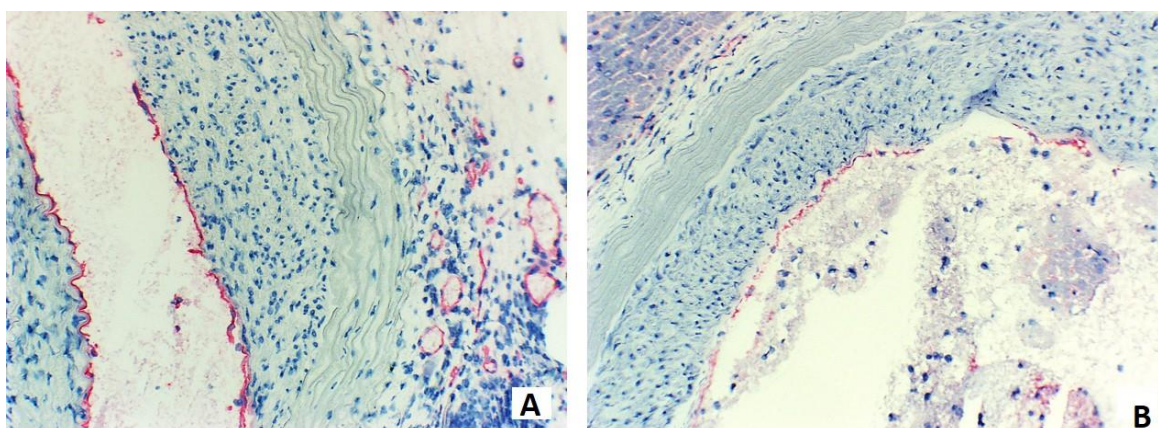


Rycina 10. Aorta przechowywana przez 12 miesięcy i przeszczepiona na 15 miesięcy w układzie syngenicznym (A) lub allogenicznym (B) oraz nieprzechowywana, przeszczepiona na 12 miesięcy w układzie allogenicznym (C). Znakowanie anty HIS52; na czerwono wyznakowane komórki śródbłonna wyściełające naczynie (EC); pow. x100.

W przeszczepionych aortach obserwowałam także obecność antygenów CD31 na komórkach śródbłonna naczyniowego (rycina 11 i 12). Analogiczna sytuacja miała miejsce w przypadku antygeny CD54.



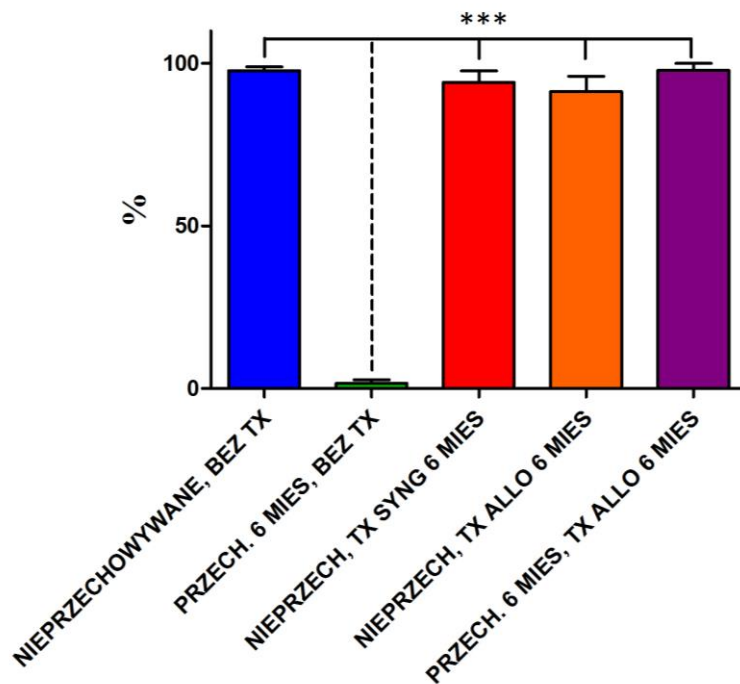
Rycina 11. Aorta przechowywana przez 10 miesięcy i przeszczepiona na 3 miesiące (A) oraz przechowywana przez 12 miesięcy, przeszczepiona na 15 miesięcy (B) w układzie syngenicznym. Znakowanie anty CD31; na czerwono wyznakowane komórki śródbłonna wyściełające naczynie (EC); pow. x200.



Rycina 12. Aorta przechowywana przez 12 miesięcy i przeszczepiona na 3 miesiące (A) oraz przechowywana przez 12 miesięcy przeszczepiona na 15 miesięcy (B) w układzie allogenicznym. Znakowanie anty CD31; na czerwono wyznakowane komórki śródbłonna wyściełające naczynie; pow. x100.

Na rycinie 13 przedstawiłam wielkość obwodu warstwy wewnętrznej aort pokrytej śródbłonkiem. W aortach nieprzechowywanych, zarówno nieprzeszczepionych, jak przeszczepionych w układzie syn- i allogenicznym część warstwy wewnętrznej naczynia pokrytej śródbłonkiem wynosiła 91 - 98%. Natomiast w przypadku aort poddanych procesowi przechowywania w bezwodnym NaCl, ale nieprzeszczepionych stanowiła ona jedynie ok. 1% powierzchni (słupek zielony). Po przeszczepieniu pozbawionych śródbłonna aort przechowywanych przez 6 miesięcy na 6 miesięcy obserwowałam zwiększenie procentu obwodu warstwy wewnętrznej pokrytej śródbłonkiem naczyniowym do ponad 90% (słupek fioletowy).

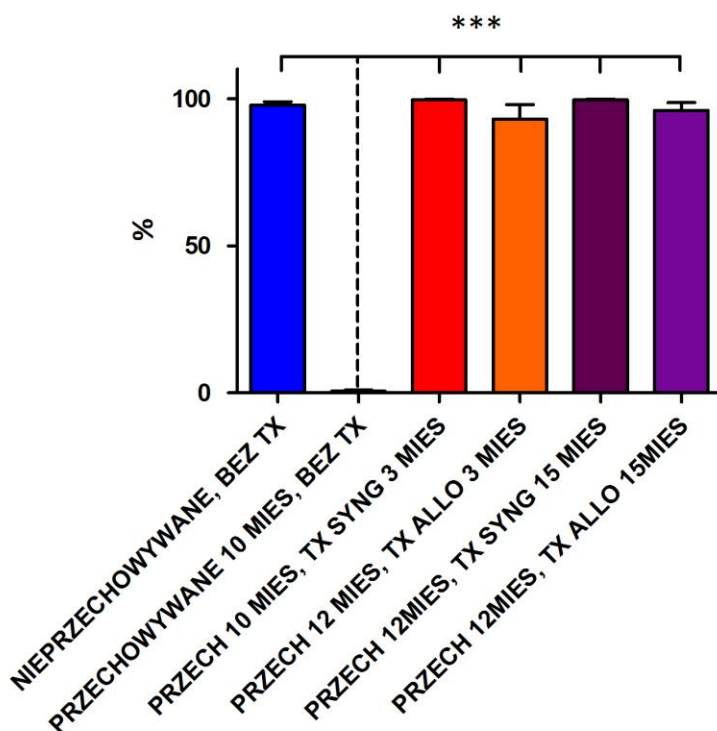
**WIELKOŚĆ OBWODU WARSTWY WEWNĘTRZNEJ
AORT PO PRZESZCZEPIENIU POKRYTEJ
ŚRÓDBŁONKIEM (WYRAŻONA W PROCENTACH)**



Rycina 13. Wielkość obwodu warstwy wewnętrznej aort pokrytej śródbłonkiem po przeszczepieniu (wyrażona w procentach). Analizę statystyczną wykonałam metodą porównań wielokrotnych Tukey'a ANOVA *** $p < 0,001$. Wyniki badań przedstawione są jako średnie arytmetyczne \pm SEM. Linią przerywaną oznaczono dane stanowiące punkt odniesienia w analizie statystycznej. Skrót „bez tx” oznacza aorty nieprzeszczepione.

We wszystkich ocenianych grupach doświadczalnych procent obwodu warstwy wewnętrznej aort pokrytej śródbłonkiem, po długoterminowym przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepieniu, był porównywalny i wynosił od 93 do 99,5%. Dane te przedstawia rycina 14.

**WIELKOŚĆ OBWODU WARSTWY WEWNĘTRZNEJ
AORT POKRYTEJ ŚRÓDBŁONKIEM PO
DŁUGOTERMINOWYM PRZECHOWYWANIU
I PRZESZCZEPIENIU (WYRAŻONA W PROCENTACH)**

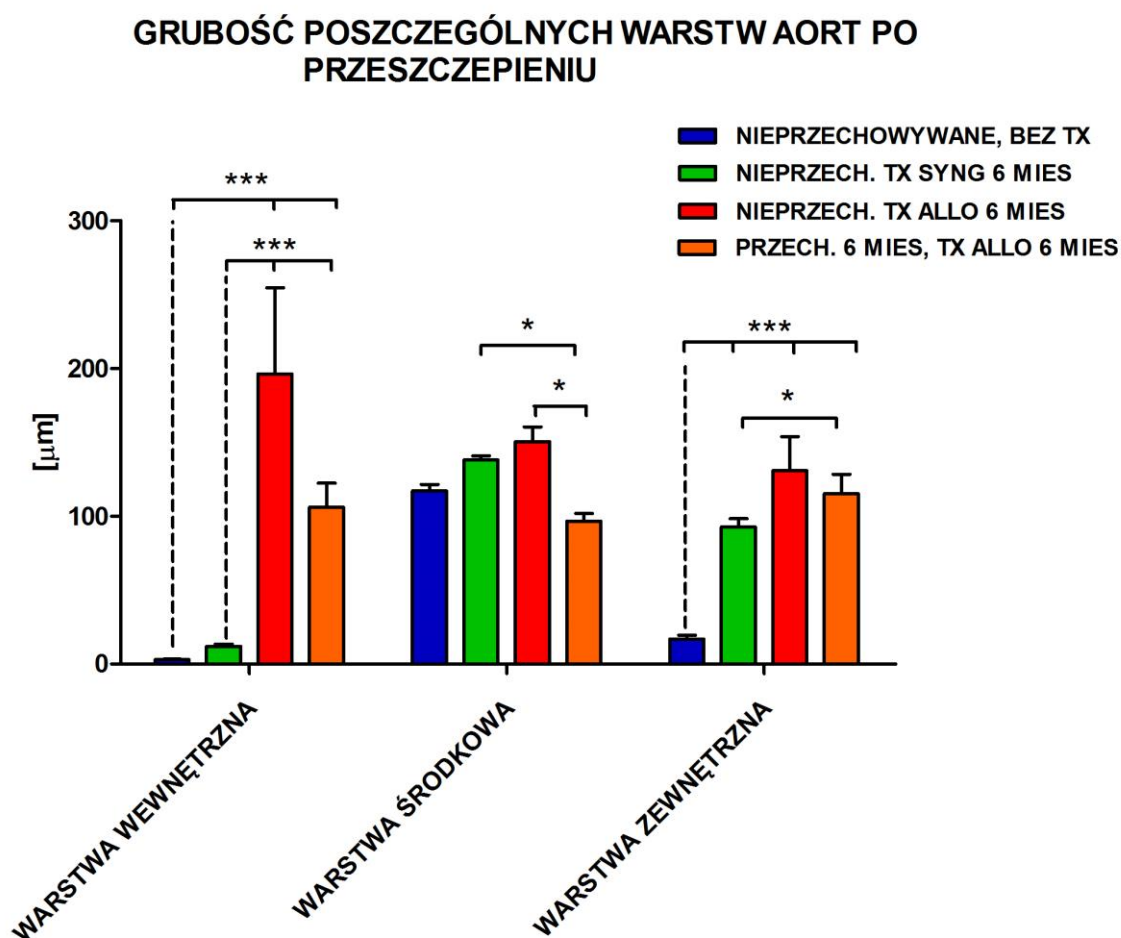


Rycina 14. Wielkość obwodu warstwy wewnętrznej aort pokrytej śródbłonkiem po długoterminowym przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepieniu (wyrażona w procentach). Analizę statystyczną wykonałam metodą porównań wielokrotnych Tukey'a ANOVA. Wyniki badań przedstawione są jako średnie arytmetyczne \pm SEM. *** $p < 0,001$. Linia przerywaną oznaczono dane stanowiące punkt odniesienia w analizie statystycznej. Skrót „bez tx” oznacza aorty nieprzeszczepione.

5.4.2 Grubość poszczególnych warstw aorty w zależności od czasu przechowywania, okresu po przeszczepieniu i układu doświadczalnego.

W grupie aort przechowywanych przez 6 miesięcy w NaCl i przeszczepionych na 6 miesięcy w układzie allogenicznym obserwowałam znaczny przerost warstwy wewnętrznej, której grubość wynosiła $106 \pm 16,3 \mu\text{m}$ w porównaniu do nieprzechowywanych, nieprzeszczepionych - $3 \pm 0,3 \mu\text{m}$ i nieprzechowywanych, przeszczepionych na 6 miesięcy w układzie syngenicznym - $12 \pm 1,6 \mu\text{m}$. W grupie aort nieprzechowywanych, przeszczepionych allogenicznie na 6 miesięcy grubość warstwy wewnętrznej była niemal dwukrotnie większa ($196 \pm 58,3 \mu\text{m}$) niż w przypadku aort

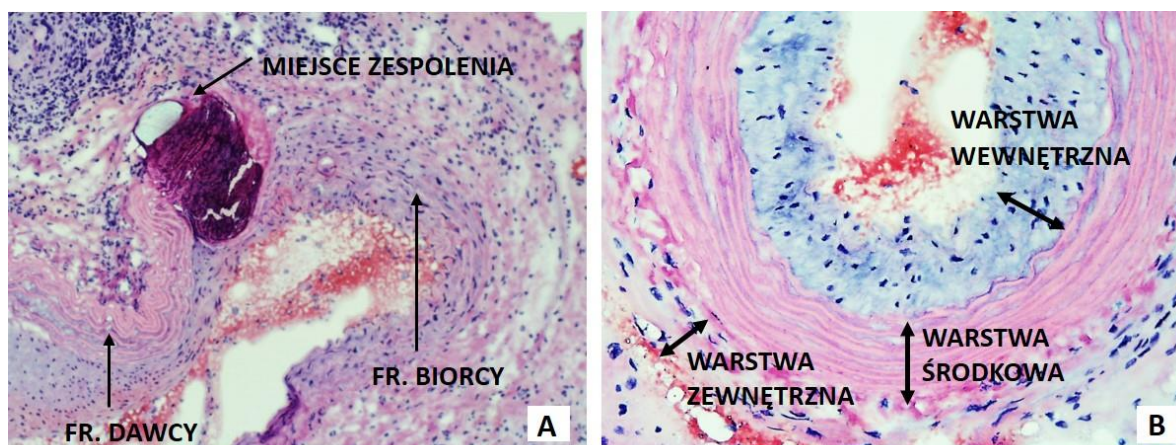
przechowywanych. Różnice w grubości warstwy środkowej pomiędzy tymi grupami były nieznaczne. Warstwa zewnętrzna aort po przeszczepieniu była we wszystkich grupach doświadczalnych istotnie statystycznie ($p < 0,001$) grubsza niż w nieprzechowywanych, nieprzeszczepionych aortach kontrolnych ($92,6 \pm 5,7 \mu\text{m}$; $130,8 \pm 23,1 \mu\text{m}$ i $115,2 \pm 13,1 \mu\text{m}$ w porównaniu do $16,9 \pm 2,6 \mu\text{m}$). Dane te przedstawia rycina 15.



Rycina 15. Grubość poszczególnych warstw ściany aort po krótkoterminowym przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepieniu. Analizę statystyczną wykonałam metodą porównań wielokrotnych Tukey'a ANOVA * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Wyniki badań przedstawione są jako średnie arytmetyczne \pm SEM. Linia przerywaną oznaczono dane stanowiące punkt odniesienia w analizie statystycznej. Skrót „bez tx” oznacza aorty nieprzeszczepione.

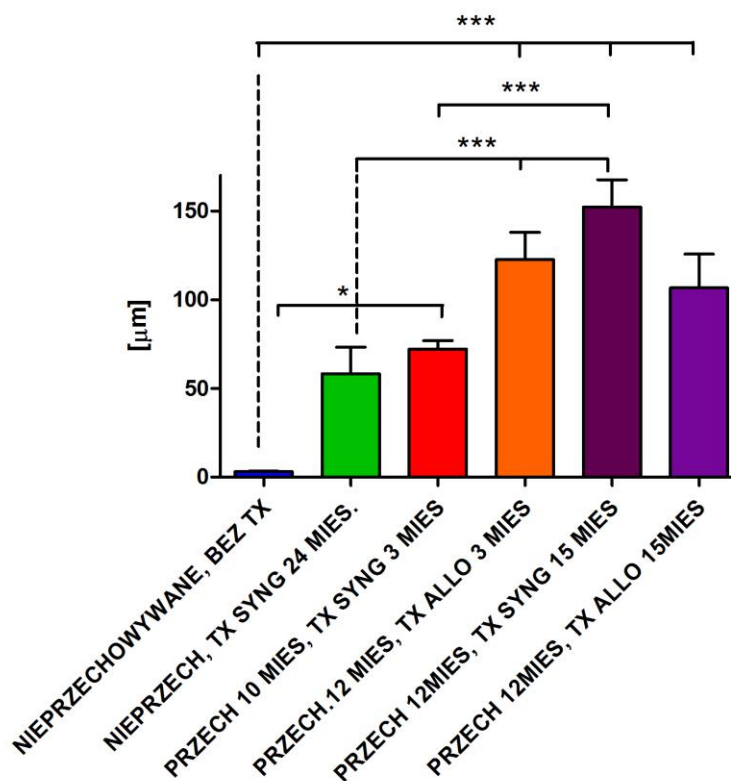
Grubość warstwy wewnętrznej ściany aort po długoterminowym przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepieniu była w analizowanych

grupach doświadczalnych większa w porównaniu do nieprzechowywanych i nieprzeszczepionych aort kontrolnych. Przy przeszczepach aort długoterminowo przechowywanych (syngenicznych przeszczepach długoterminowych, zaś allogenicznych zarówno krótko- jak i długoterminowych) grubość warstwy wewnętrznej była znacząco wyższa i wynosiła odpowiednio $152,3 \pm 15,2 \mu\text{m}$ (dla syngenicznych) oraz $122,6 \pm 15,3 \mu\text{m}$ i $106,6 \pm 18,9 \mu\text{m}$ (dla allogenicznych) w porównaniu do $3 \pm 0,3 \mu\text{m}$ w aortach kontrolnych. Zwiększenie grubości warstwy wewnętrznej obserwowałam także w przypadku aort nieprzechowywanych, przeszczepionych długoterminowo w układzie syngenicznym ($58 \pm 15 \mu\text{m}$ w porównaniu do $3 \pm 0,3 \mu\text{m}$). Podobny wynik otrzymałam w krótkoterminowych przeszczepach syngenicznych aort przechowywanych 10 miesięcy ($72 \pm 4,7 \mu\text{m}$). Dane te przedstawiają ryciny 16 i 17.



Rycina 16. Aorta przechowywana przez 12 miesięcy i przeszczepiona na 3 miesiące w układzie syngenicznym, H/E, pow. x100, miejsce zespolenia (A), fragment przeszczepionego naczynia z pogrubiałą warstwą wewnętrzną, H/E x200 (B).

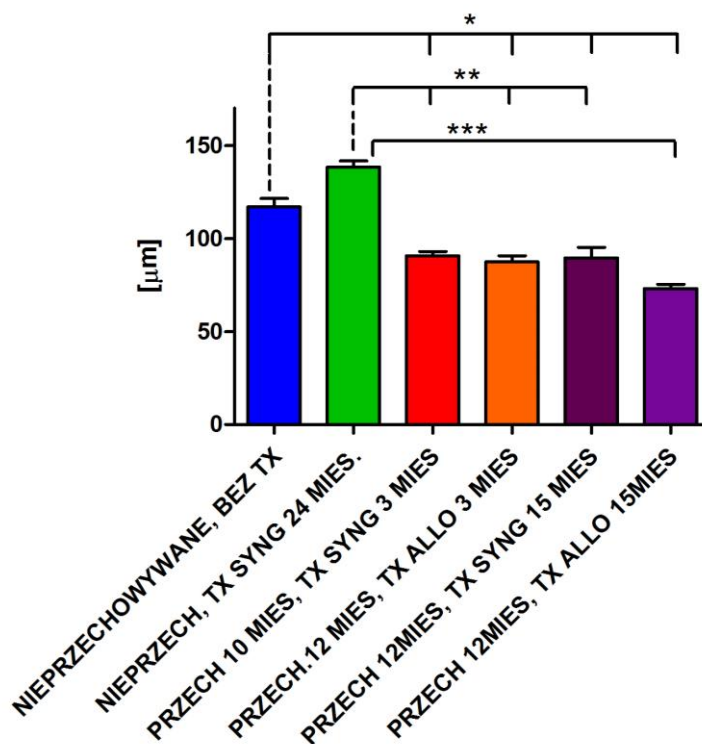
**GRUBOŚĆ WARSTWY WEWNĘTRZNEJ
AORT PO DŁUGOTERMINOWYM
PRZECHOWYWANIU I PRZESZCZEPIENIU**



Rycina 17. Grubość warstwy wewnętrznej ściany aort po długoterminowym przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepieniu. Analizę statystyczną wykonałam metodą porównań wielokrotnych Tukey'a ANOVA * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Wyniki badań przedstawione są jako średnie arytmetyczne \pm SEM. Linia przerywaną oznaczono dane stanowiące punkt odniesienia w analizie statystycznej. Skrót „bez tx” oznacza aorty nieprzeszczepione.

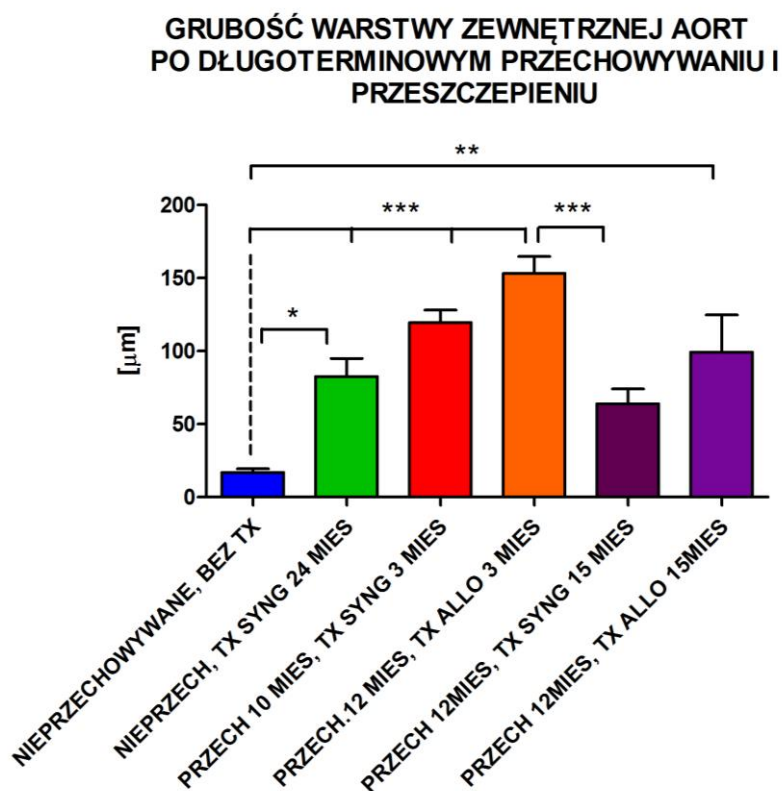
We wszystkich analizowanych grupach doświadczalnych aort przechowywanych w NaCl i przeszczepionych grubość warstwy środkowej ściany aort była zbliżona i wynosiła od $73 \pm 2,3 \mu\text{m}$ do $90,7 \pm 2,3 \mu\text{m}$. Istotnie statystycznie większa była szerokość warstwy środkowej w grupach aort nieprzechowywanych, zarówno nieprzeszczepionych ($117 \pm 4,5 \mu\text{m}$), jak przeszczepionych syngenicznie ($138,3 \pm 3,4 \mu\text{m}$), co przedstawia rycina 18.

GRUBOŚĆ WARSTWY ŚRODKOWEJ AORT PO DŁUGOTERMINOWYM PRZECHOWYWANIU I PRZESZCZEPIENIU



Rycina 18. Grubość warstwy środkowej aort po długoterminowym przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepieniu. Analizę statystyczną wykonałam metodą porównań wielokrotnych Tukey'a ANOVA * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Wyniki badań przedstawione są jako średnie arytmetyczne \pm SEM. Linia przerywaną oznaczono dane stanowiące punkt odniesienia w analizie statystycznej. Skrót „bez tx” oznacza aorty nieprzeszczepione.

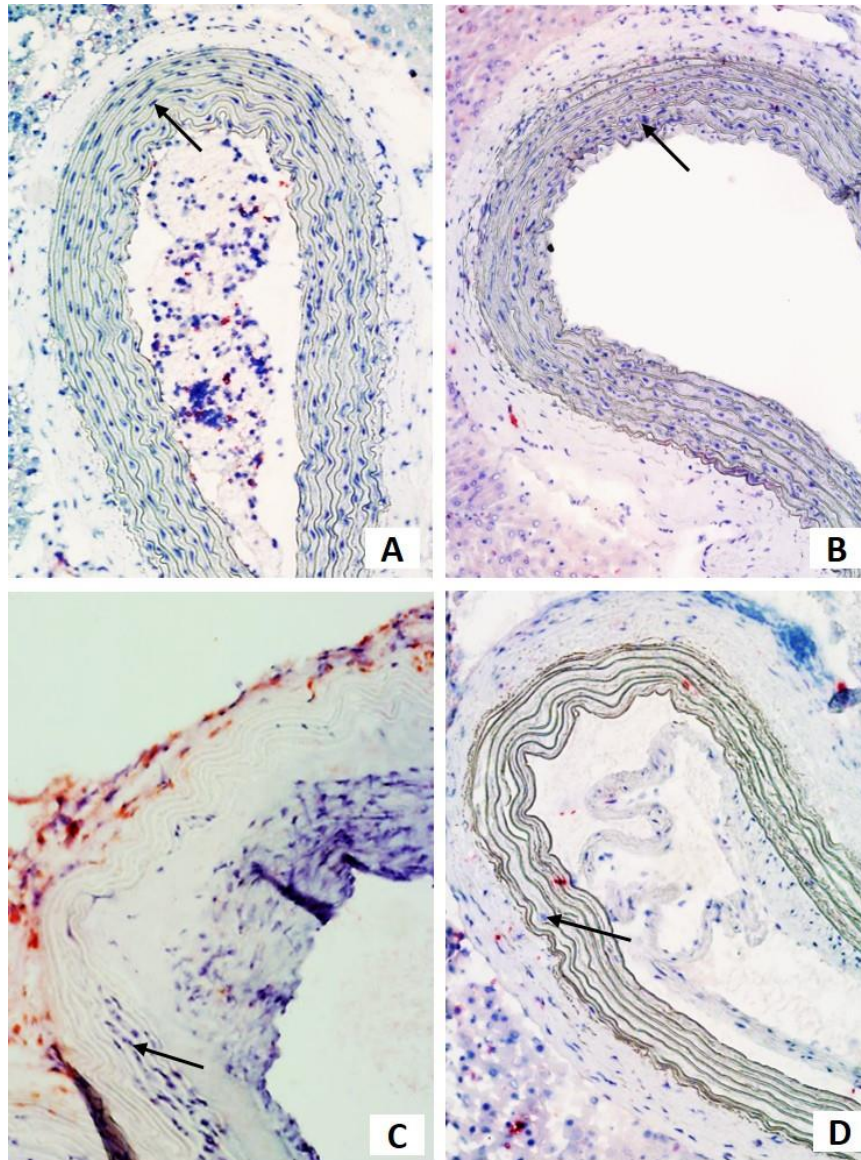
Grubość warstwy zewnętrznej ściany aort była większa we wszystkich analizowanych grupach doświadczalnych aort długoterminowo przechowywanych i przeszczepionych w porównaniu do aort kontrolnych – nieprzechowywanych, nieprzeszczepionych. Takiej zależności nie stwierdziłam w porównaniu do grupy aort nieprzechowywanych i przeszczepionych, co przedstawia rycina 19.



Rycina 19. Grubość warstwy zewnętrznej aort po długoterminowym przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepieniu. Analizę statystyczną wykonałam metodą porównań wielokrotnych Tukey'a ANOVA *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Wyniki badań przedstawione są jako średnie arytmetyczne \pm SEM. Linia przerywaną oznaczono dane stanowiące punkt odniesienia w analizie statystycznej. Skrót „bez tx” oznacza aorty nieprzeszczepione.

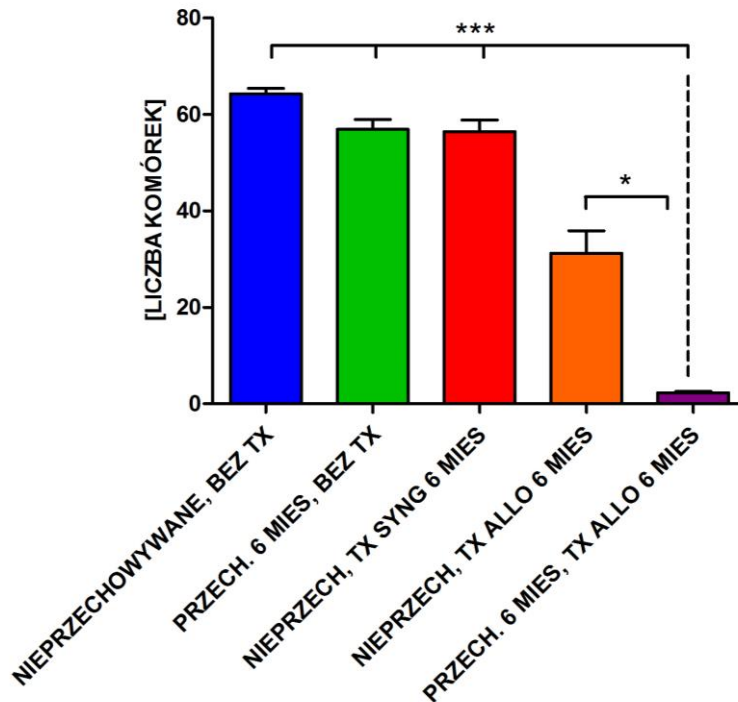
5.4.3 Liczba komórek w warstwie środkowej.

W przypadku aort przechowywanych przez 6 miesięcy, ale nieprzeszczepionych, liczba komórek mięśniowych była wysoka i porównywalna do nieprzechowywanej i nieprzeszczepionej aorty kontrolnej ($57 \pm 2,1$ versus $64 \pm 1,2$ komórek). Podobnie było w grupie aort nieprzechowywanych i przeszczepionych w układzie syngenicznym. Po przeszczepieniu allogenicznym nieprzechowywanej aorty obserwowałam zmniejszenie się liczby komórek mięśniowych w warstwie środkowej aorty prawie o połowę (do $31 \pm 4,7$ komórek). Przechowywanie przez 6 miesięcy w NaCl i przeszczepienie w układzie allogenicznym prowadziło natomiast do niemal całkowitej utraty miofibroblastów. Dane te przedstawiają ryciny 20 i 21.



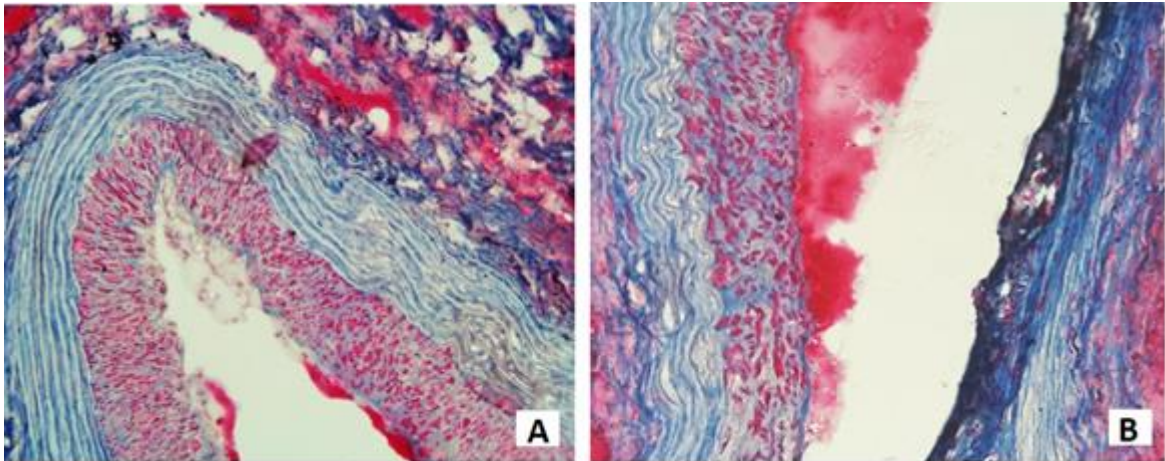
Rycina 20. Aorta nieprzechowywana, nieprzeszczepiona (A), nieprzechowywana, przeszczepiona na 6 miesięcy w układzie syngenicznym (B), nieprzechowywana, przeszczepiona na 6 miesięcy w układzie allogenicznym (C), przechowywana przez 6 miesięcy, przeszczepiona na 6 miesięcy w układzie allogenicznym (D). Strzałką oznaczono komórki mięśniowe pomiędzy włóknami elastycznymi w warstwie środkowej: liczne (A,B), nieliczne (C) i obserwowane sporadycznie (D). (C) Widoczny naciek komórek ED1⁺ (wyznakowanych na czerwono). (A, B, D) Brak nacieku. Znakowanie anty ED1 (monocyty/makrofagi) pow. x100.

LICZBA KOMÓREK MIĘŚNIOWYCH W WARSTWIE ŚRODKOWEJ AORT PO PRZESZCZEPIENIU

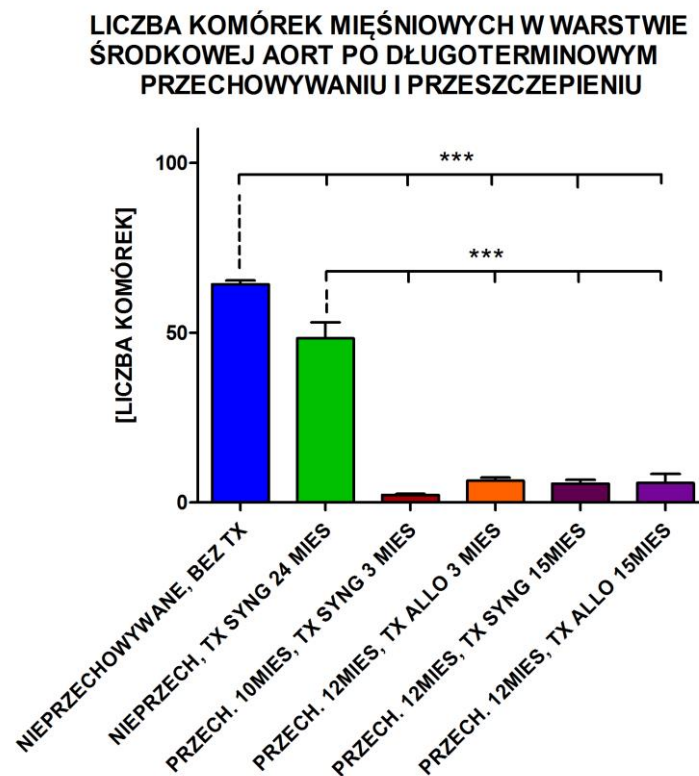


Rycina 21. Liczba komórek mięśniowych w warstwie środkowej aort po przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepieniu. Analizę statystyczną wykonałam metodą porównań wielokrotnych Tukey'a ANOVA *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$. Wyniki badań przedstawione są jako średnie arytmetyczne \pm SEM. Skrót „bez tx” oznacza aorty nieprzeszczepione.

Aorty przechowywane długoterminowo (przez 10-12 miesięcy), przeszczepione zarówno w układzie syngenicznym jak allogenicznym, charakteryzowały się obecnością jedynie pojedynczych komórek mięśniowych w warstwie środkowej. Na liczbę komórek nie miał wpływu czas przeszczepienia – podobna sytuacja miała miejsce zarówno po krótkoterminowym (na 3 miesiące) jak długoterminowym (na 15 miesięcy) przeszczepieniu. Włókna elastynowe i kolagenowe były dobrze zachowane, jedynie miejscami charakteryzowały się nieco poluźnioną i lekko zaburzoną strukturą (rycina 22 i 23).



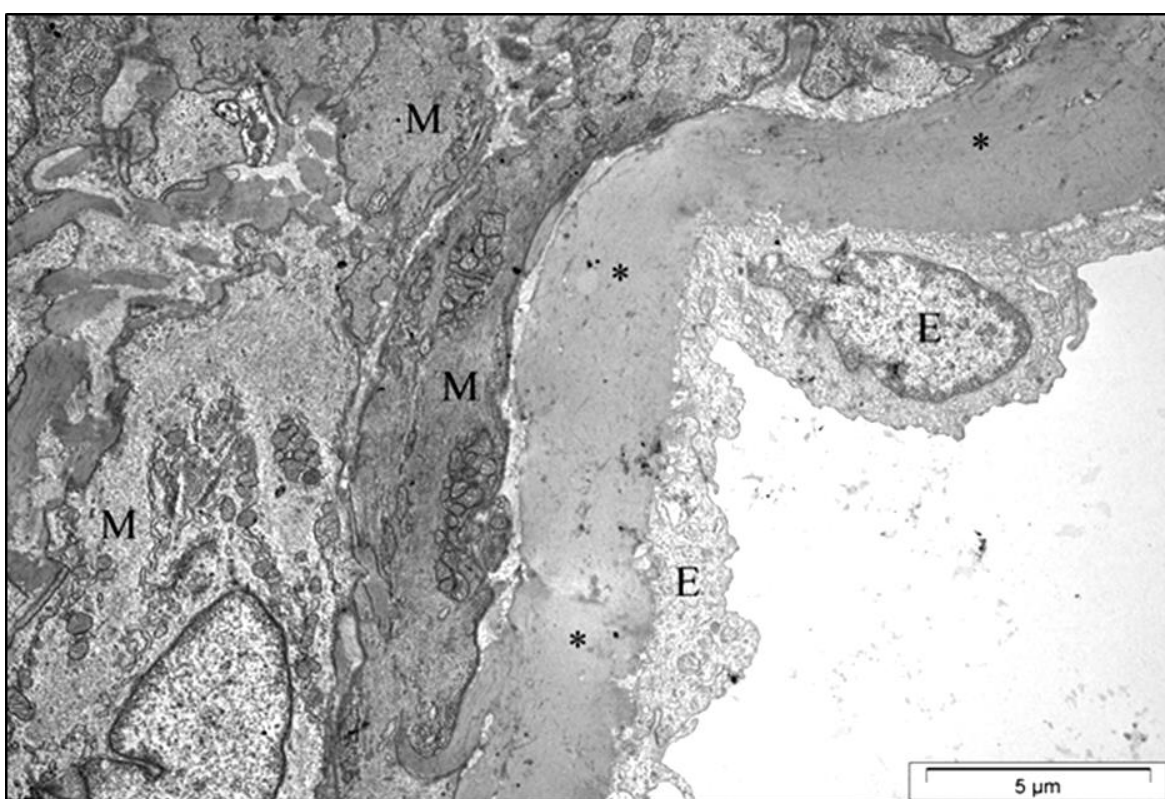
Rycina 22. Aorta przechowywana przez 10 miesięcy, 3 miesiące po syngenicznym przeszczepieniu (A) oraz aorta przechowywana przez 12 miesięcy, 3 miesiące po allogenicznym przeszczepieniu (B). Trichrome Azan; pow. x 200.



Rycina 23. Liczba komórek mięśniowych w warstwie środkowej aort po długoterminowym przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepieniu. Analizę statystyczną wykonałam metodą porównań wielokrotnych Tukey'a ANOVA *** $p < 0,001$. Wyniki badań przedstawione są jako średnie arytmetyczne \pm SEM. Linia przerywaną oznaczono dane stanowiące punkt odniesienia w analizie statystycznej.

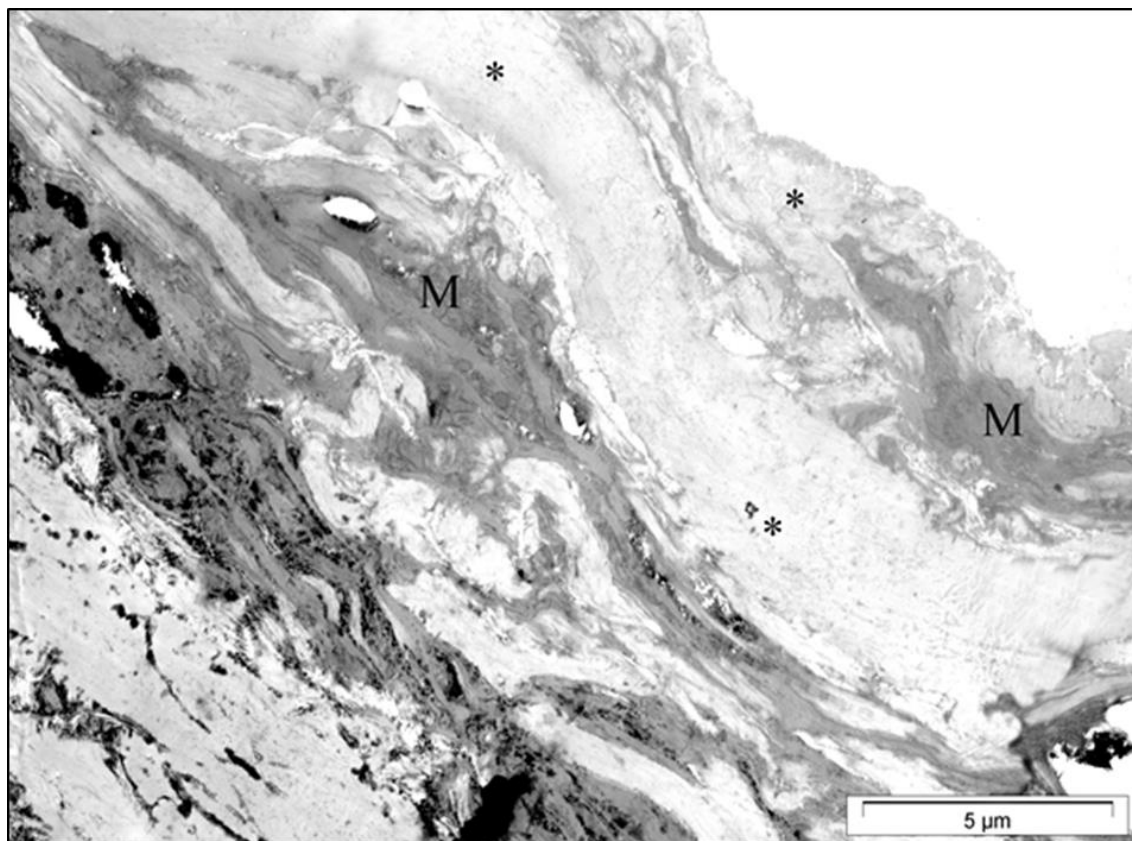
5.5 Budowa ultrastrukturalna aort przechowywanych w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepionych ortotopowo.

W aortach kontrolnych, pobranych od zdrowych szczurów, nieprzechowywanych i nieprzeszczepionych analiza mikroskopowo-elektronowa wykazała obecność ciągłej warstwy komórek śródbłonkowych, leżących na cienkiej błonie podstawnej oraz obecnych pod nią warstwy włókien elastynowych i komórek mięśniowych (rycina 24).



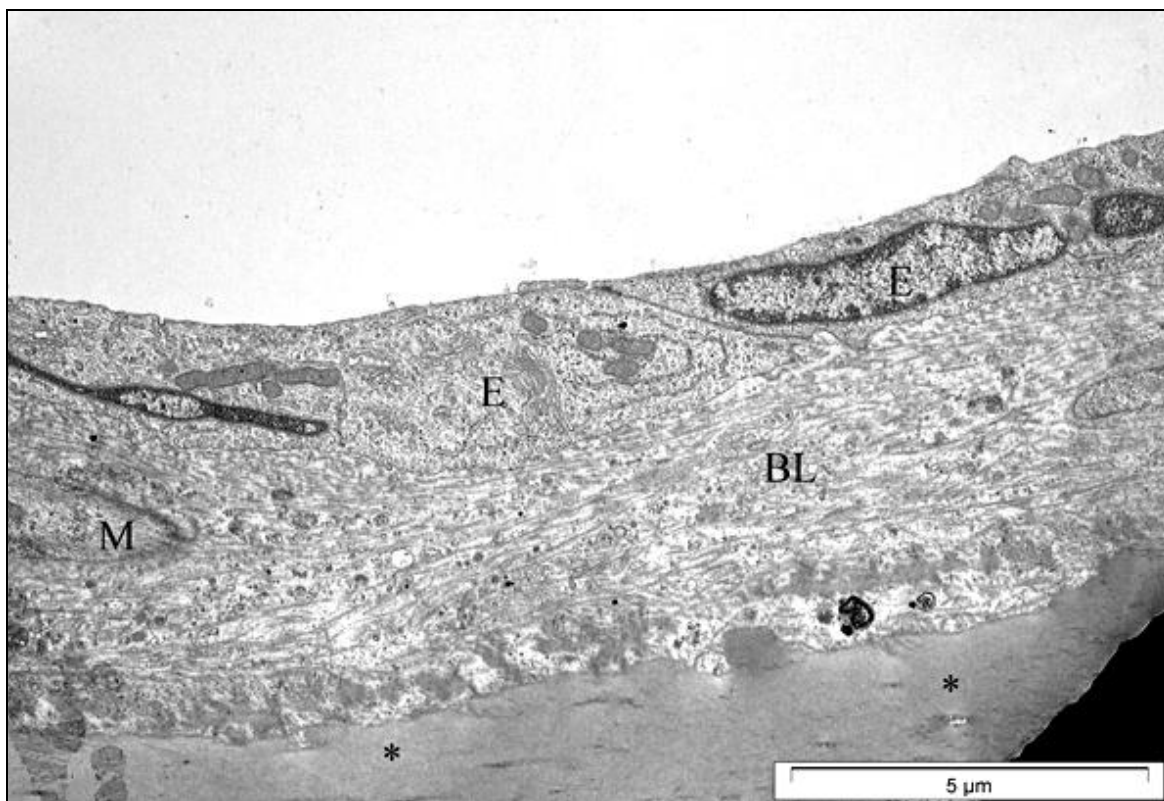
Rycina 24. Aorta kontrolna, nieprzechowywana, nieprzeszczepiona. E - komórka śródbłonka, M – komórka mięśniowa, * - warstwa elastyny.

W grupie aort przechowywanych, ale nieprzeszczepionych, nie obserwowano obecności komórek o morfologii komórek śródbłonkowych. Warstwa elastyny oraz mięśniówka pozostawały zachowane (rycina 25).



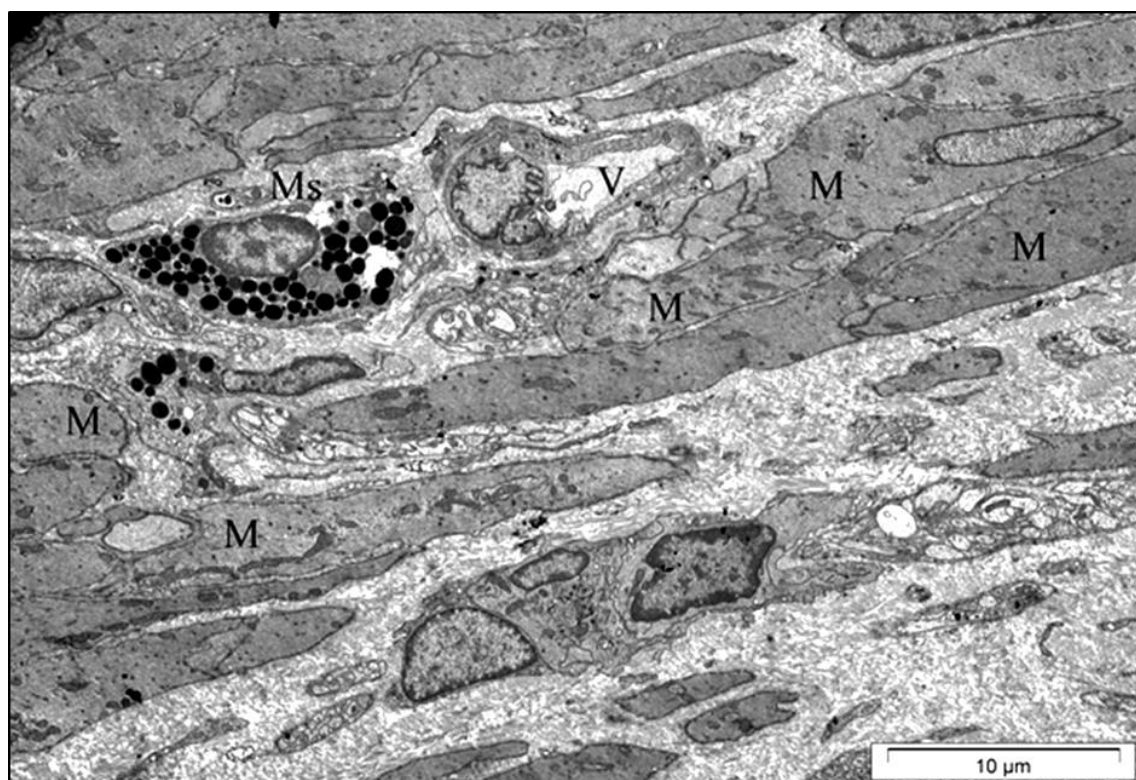
Rycina 25. Aorta przechowywana przez 6 miesięcy, nieprzeszczepiona. M – komórka mięśniowa, * - warstwa elastyny.

W aortach przechowywanych 1 miesiąc, a następnie przeszczepionych na 12 miesięcy obserwowano wyraźnie wyodrębnioną warstwę komórek śródbłonkowych i zachowaną warstwę włókien elastynowych. Obecna pod śródbłonkiem błona podstawna była wyraźnie poszerzona (rycina 26). W poszerzonej błonie podstawnej obserwowano wypustki fibroblastów i komórek mięśniowych oraz pasma kolagenu.



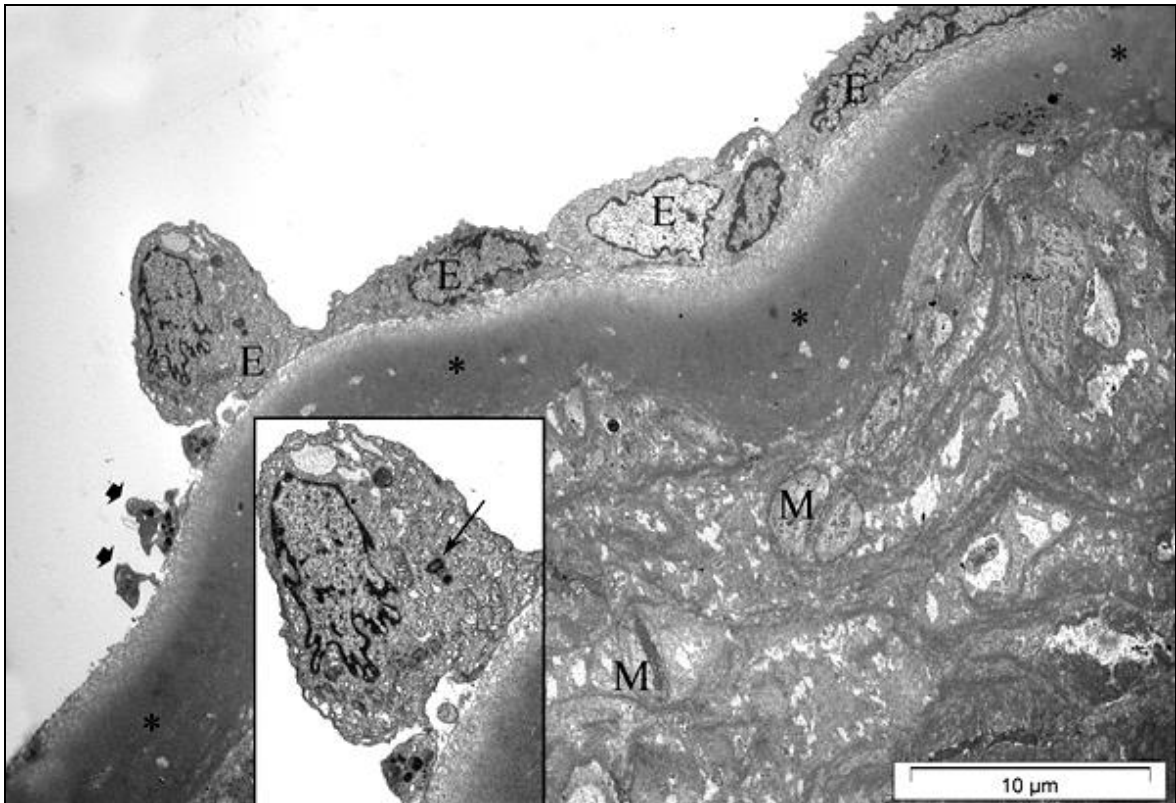
Rycina 26. Aorta przechowywana przez 1 miesiąc, przeszczepiona na 12 miesięcy w układzie syngenicznym, uwidoczniona na zdjęciu warstwa wewnętrzna naczynia. E - komórka śródbłonka, M - komórka mięśniowa, BL - błona podstawna, * - warstwa elastyny.

Warstwa środkowa aort przechowywanych przez 1 miesiąc, przeszczepionych na 12 miesięcy w układzie syngenicznym była dobrze zachowana (rycina 27). Występowały tam komórki mięśniowe, wypustki fibroblastów, pojedyncze komórki tuczne, oraz własne naczynia zaopatrujące (*vasa vasorum*).



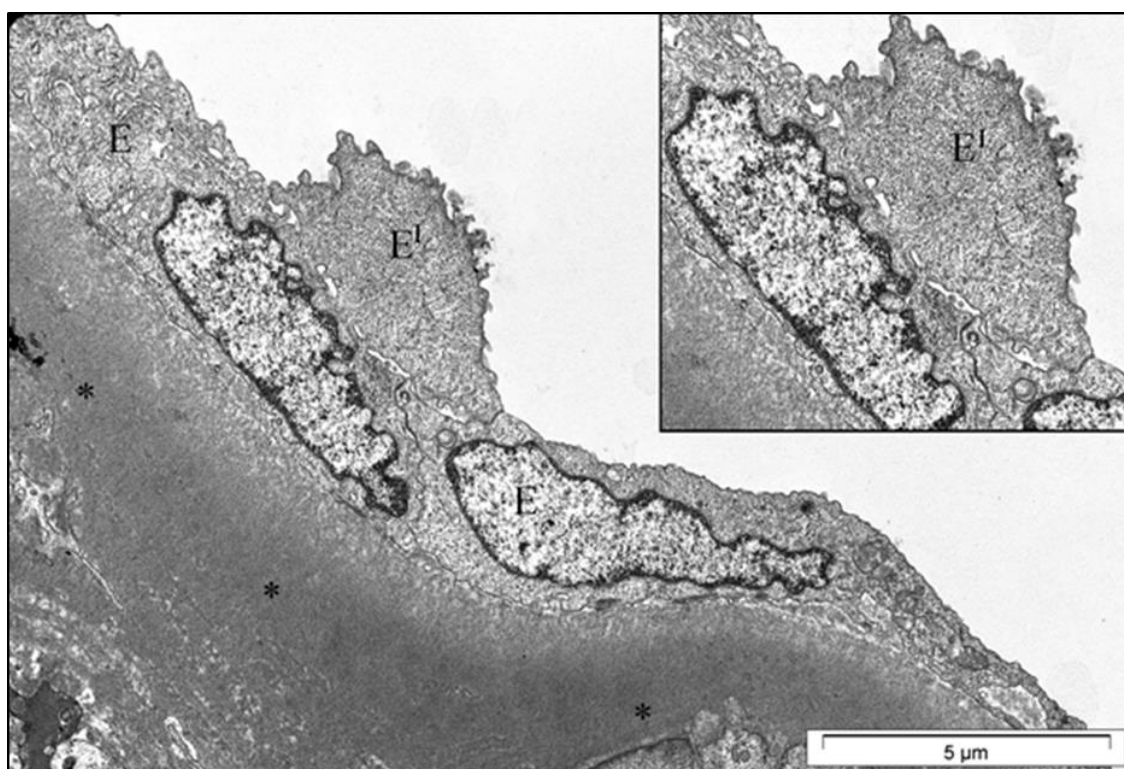
Rycina 27. Aorta przechowywana przez 1 miesiąc, przeszczepiona na 12 miesięcy w układzie syngenicznym, uwidocziona na zdjęciu warstwa środkowa naczynia. M – komórka mięśniowa, Ms – mastocyt, V – *vasa vasorum*.

Analiza mikroskopowo-elektronowa aort przechowywanych przez 1 miesiąc, a następnie przeszczepionych na 12 miesięcy w układzie allogenicznym wykazała obecność komórek śródbłonna wyściełających ścianę aorty od strony luminalnej. Komórki wykazywały cechy hipertrofii, a w ich cytoplazmie obecne były centriole. Niekiedy warstwa elastyny była odsłonięta, obecne były jedynie pojedyncze komórki o morfologii podobnej do komórek śródbłonkowych. Pod warstwą elastyny występowały komórki mięśniowe oraz ich wypustki (rycina 28).



Rycina 28. Aorta przechowywana przez 1 miesiąc, przeszczepiona na 12 miesięcy w układzie allogenicznym, uwidoczniła na zdjęciu warstwa wewnętrzna naczynia. E - komórka śródbłonkowa, M - komórka mięśniowa, * - warstwa elastyny, → centriola, ► prawdopodobnie migrujące komórki śródbłonka.

W tej grupie doświadczalnej obserwowano również naczynia z ogniskowo występującą drugą warstwą komórek śródbłonkowych. Komórki śródbłonkowe leżące bezpośrednio na błonie podstawnej przylegały do siebie tworząc jednolitą warstwę. Komórki górnej warstwy posiadały liczne wypustki, i jak jest to widoczne na rycinie 29, pozostawały punktowo połączone z leżącymi poniżej komórkami warstwy ciągłej.



Rycina 29. Aorta przechowywana przez 1 miesiąc, przeszczepiona na 12 miesięcy w układzie allogenicznym, uwidoczniła na zdjęciu warstwa wewnętrzna naczynia. E - komórka śródbłonkowa, E¹ – komórka śródbłonka leżąca na warstwie śródbłonka, * - warstwa elastyny.

5.6 Wytrzymałość mechaniczna aort.

Wytrzymałość mechaniczną naczyń badano poprzez określenie dwóch parametrów: wytrzymałości na rozciąganie (ang. tensile strenght) oraz maksymalnego ciśnienia wewnątrznaczyniowego (badanie wytrzymałościowe w próbie ciśnieniowej). Średnia wytrzymałość na rozciąganie aort kontrolnych (nieprzechowywanych, nieprzeszczepionych) wynosiła 437 ± 82 g i była porównywalna do wytrzymałości aort nieprzechowywanych, przeszczepionych na 6 miesięcy w układzie syngenicznym (416 ± 75 g). Aorty nieprzechowywane, przeszczepione na 6 miesięcy, ale w układzie allogenicznym, cechowały się znacznie niższą wytrzymałością (283 ± 93 g), podobnie jak aorty przechowywane przez 6 miesięcy, przeszczepione na 6 miesięcy w układzie syngenicznym (272 ± 67 g). We wszystkich pozostałych grupach, zarówno w przypadku aort przechowywanych w NaCl, jak nieprzechowywanych, wytrzymałość na zerwanie

wynosiła poniżej 200 g. Wartość ta nie została określona precyzyjniej ze względu na ograniczenia techniczne urządzenia pomiarowego.

Wytrzymałość na ciśnienie wywierane na ściany naczyń we wszystkich badanych grupach wynosiła powyżej 300 mm Hg (wartość maksymalna w pomiarze manometrem). Dane przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Wytrzymałość mechaniczna aort szczurzych.

Czas przechowywania	Czas przeszczepienia [miesiące]	Układ doświadczalny (liczba zwierząt N=)	Średnia wytrzymałość na zerwanie (tensile strenght) [g]	Wytrzymałość na ciśnienie wywierane na ściany naczyń [mm Hg]
0	0	- N=4	437	>300
0	6	Syngeniczny N=3	416	>300
6	6	Syngeniczny N=3	272	>300
0	6	Allogeniczny N=4	283	>300
6	6	Allogeniczny N=3	<200	>300
0	>12	Syngeniczny N=3	<200	>300
0	>12	Allogeniczny N=3	<200	>300
12	15	Syngeniczny N=3	<200	>300
12	15	Allogeniczny N=5	<200	>300

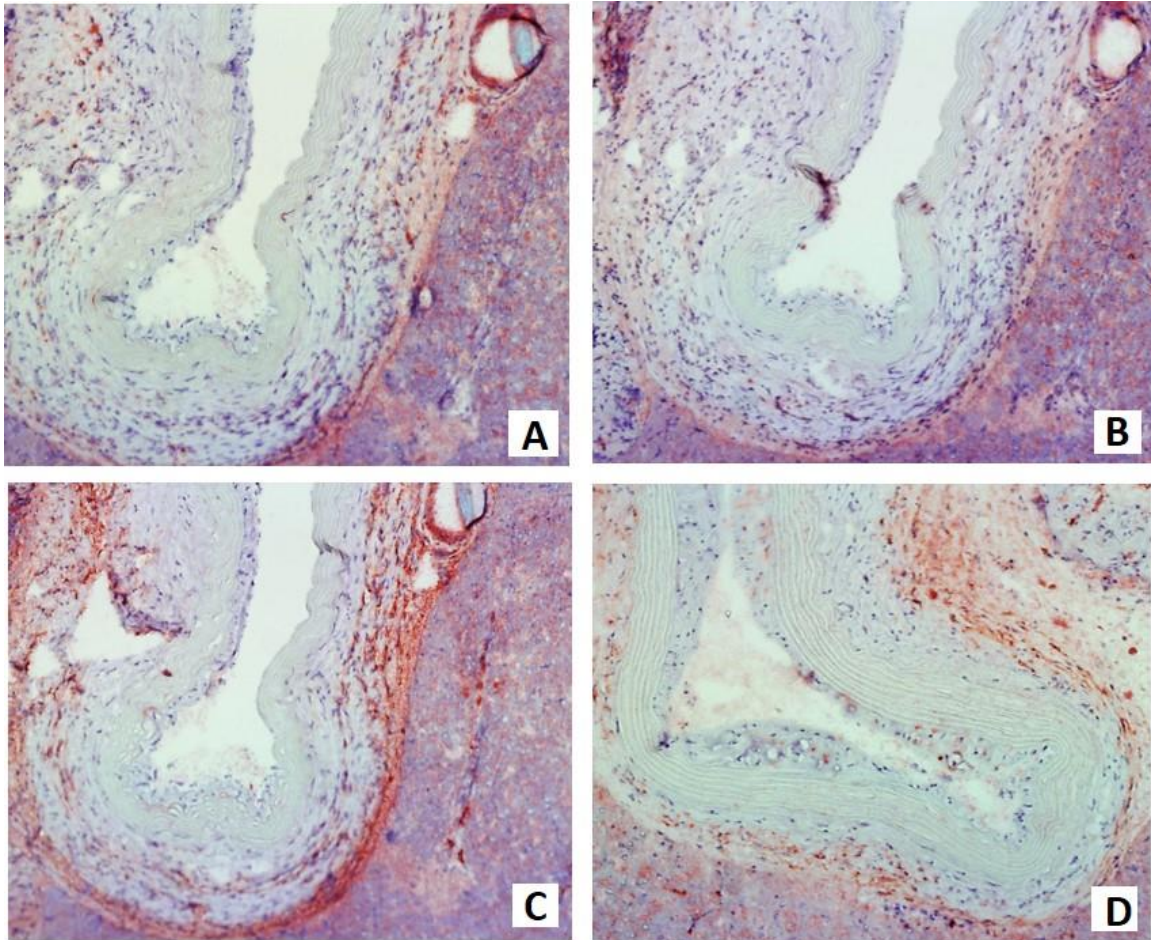
Wyniki badań wytrzymałości aort były danymi lewostronnie uciętymi (granica odczytu urządzenia pomiarowego), co wykluczało proste zastosowanie metod parametrycznych. Grupy porównano za pomocą testu rangowego Kruskala-Wallisa z wykorzystaniem permutacyjnego rozkładu statystyki testu (Manly 1997; SAS/NPAR1WAY, SAS Institute 2010) do oceny istotności statystycznej.

Istotność statystyczną wykazano przy porównaniu grup przeszczepów o wytrzymałości poniżej 200 g z grupami aort nieprzechowywanych i nieprzeszczepionych oraz nieprzechowywanych i przeszczepionych na 6 miesięcy w układzie syngenicznym. Poziom istotności statystycznej wynosił $p < 0,05$.

5.7 Ocena immunogenności aort przechowywanych w bezwodnym NaCl.

5.7.1 Immunogenność aort zbadana po przeszczepieniu ortotopowym.

W aortach przechowywanych 12 miesięcy w NaCl, 3 miesiące po przeszczepieniu allogenicznym (rycina 30) obserwowałam nacieki komórek odpornościowych – monocytów/makrofagów (A), leukocytów (B) i komórek MHC II⁺ (C). Komórki jednojądrzaste były widoczne jedynie od strony warstwy zewnętrznej naczynia i nie infiltrowały ściany aorty. Obecność komórek MHC II⁺ zaobserwowałam także w warstwie zewnętrznej aort przechowywanych 12 miesięcy w NaCl, 3 miesiące po przeszczepieniu syngenicznym (D).

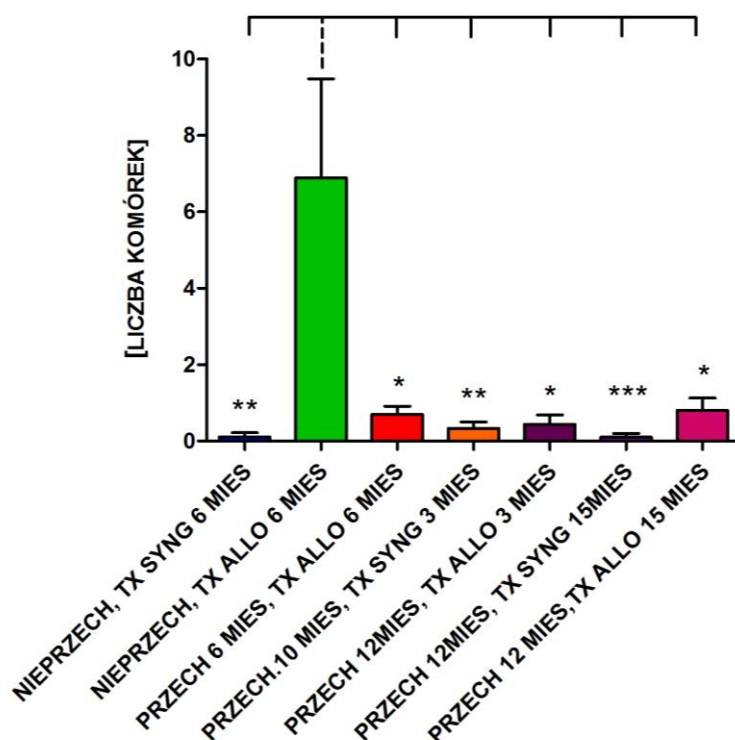


Rycina 30. Aorta przechowywana 12 miesięcy, 3 miesiące po przeszczepieniu allogenicznym; wyznakowana anty ED1 (A) W3/13 (B) i OX6 (C) oraz po przeszczepieniu syngenicznym, wyznakowana anty OX6 (D). Komórki pozytywne zabarwione na kolor czerwony, pow. x 100.

5.7.1.1 Liczba komórek immunologicznie czynnych biorcy naciekających warstwę wewnętrzną przeszczepionej aorty.

Liczba komórek OX6⁺ naciekających warstwę wewnętrzną aort nieprzechowywanych, przeszczepionych w układzie syngenicznym oraz aort przechowywanych (we wszystkich schematach doświadczalnych) wynosiła średnio 0-1 komórki (w 5 polach obliczeniowych o wymiarach 100x100 μ m). Jedynie w grupie aort nieprzechowywanych, przeszczepionych w układzie allogenicznym obserwowaliśmy większe nagromadzenie komórek OX6⁺ (średnio $7\pm 2,6$ komórek). Dane te przedstawia rycina 31.

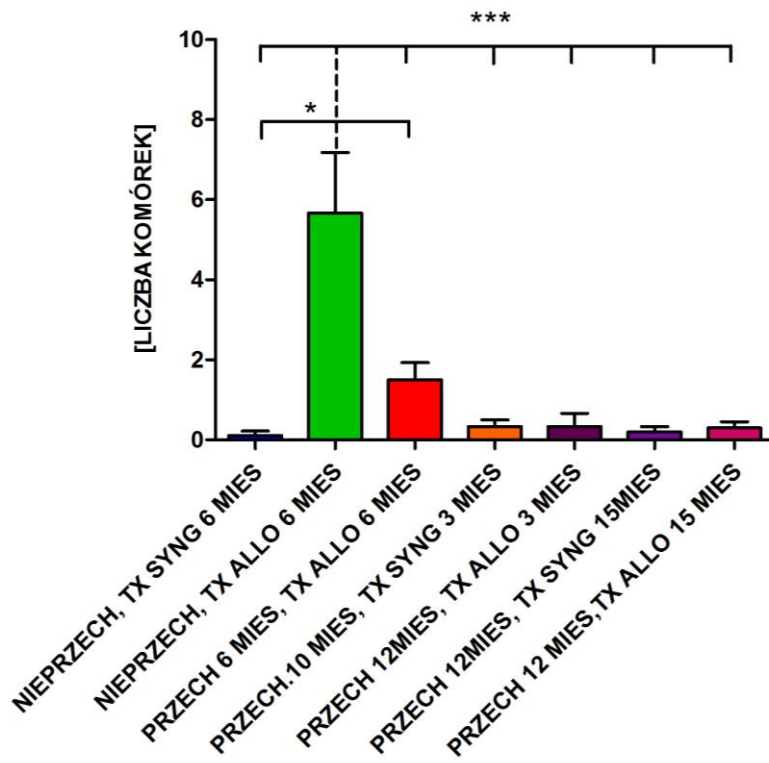
LICZBA KOMÓREK OX6+ NACIEKAJĄCYCH
WARSTWĘ WEWNĘTRZNĄ AORT PO
PRZESZCZEPIENIU ORTOTOPOWYM



Rycina 31. Liczba komórek OX6+ (MHCII+) naciekających warstwę wewnętrzną aort po przechowywaniu w bezwodnym NaCl i przeszczepieniu ortotopowym. Analizę statystyczną wykonałam metodą porównań wielokrotnych Tukey'a ANOVA * $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Wyniki badań przedstawione są jako średnie arytmetyczne \pm SEM. Linia przerywaną oznaczono dane stanowiące punkt odniesienia w analizie statystycznej.

Podobnie jak w przypadku komórek OX6+, duży naciek komórek ED1+ w obrębie warstwy wewnętrznej obserwowałam jedynie w grupie aort nieprzechowywanych, przeszczepionych w układzie allogenicznym. Niewielki, ale istotnie statystycznie większy ($p < 0,05$) w porównaniu do kontroli (nieprzechowywanych aort przeszczepionych w układzie syngenicznym) był naciek w warstwie wewnętrznej aort przechowywanych 6 miesięcy w NaCl, przeszczepionych na 6 miesięcy w układzie allogenicznym (średnia wynosiła $1,5 \pm 0,4$ w porównaniu do $0,1 \pm 0,1$ komórek) co przedstawia rycina 32.

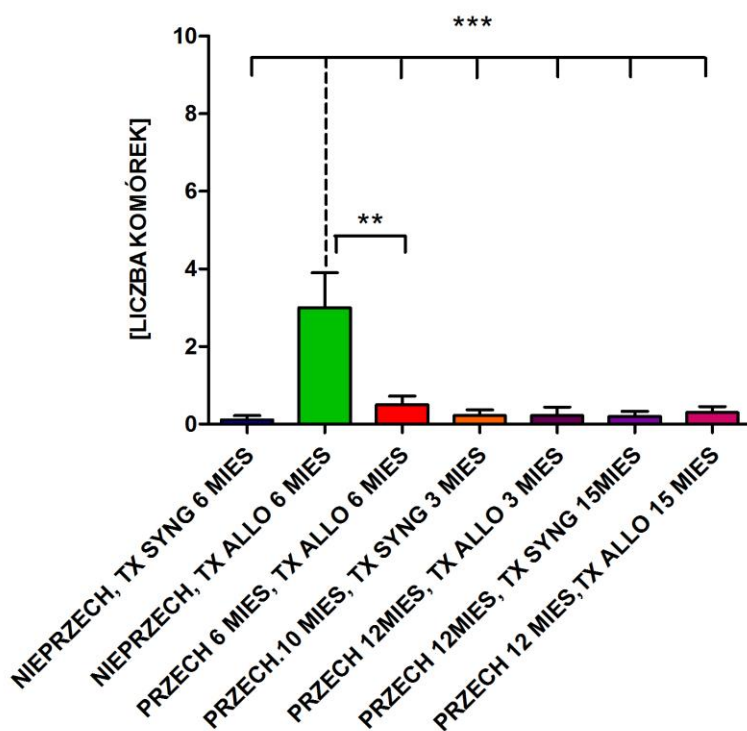
LICZBA KOMÓREK ED1+ NACIEKAJĄCYCH
WARSTWĘ WEWNĘTRZNĄ AORT PO
PRZESZCZEPIENIU ORTOTOPOWYM



Rycina 32. Liczba komórek ED1+ (monocyty/makrofagi) naciekających warstwę wewnętrzną aort po przechowywaniu w bezwodnym NaCl i przeszczepieniu ortotopowym. Analizę statystyczną wykonałam metodą porównań wielokrotnych Tukey'a ANOVA * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Wyniki badań przedstawione są jako średnie arytmetyczne \pm SEM. Linia przerywaną oznaczono dane stanowiące punkt odniesienia w analizie statystycznej.

Nacieki komórek W3/13+ były niewielkie we wszystkich grupach doświadczalnych. Maksymalną ich liczbę zidentyfikowałam w grupie nieprzechowywanych aort przeszczepionych w układzie allogenicznym na 6 miesięcy (średnio $3 \pm 0,9$ komórki) (rycina 33).

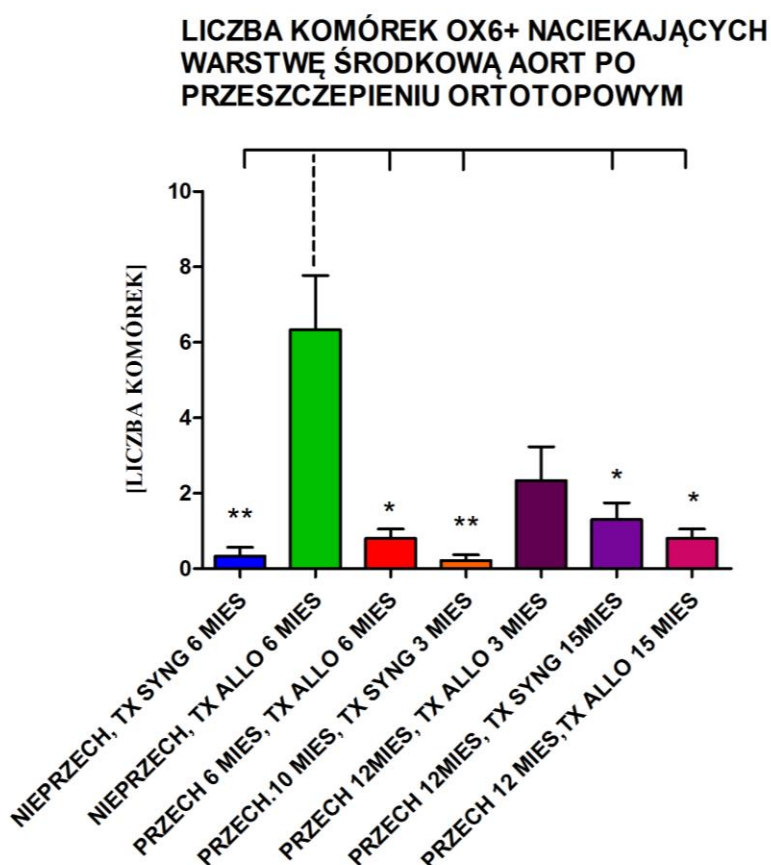
LICZBA KOMÓREK W3/13+ NACIEKAJĄCYCH WARSTWĘ WEWNĘTRZNĄ AORT PO PRZESZCZEPIENIU ORTOTOPOWYM



Rycina 33. Liczba komórek W3/13+ (leukocyty) naciekających warstwę wewnętrzną aort po przechowywaniu w bezwodnym NaCl i przeszczepieniu ortotopowym. Analizę statystyczną wykonałam metodą porównań wielokrotnych Tukey'a ANOVA ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Wyniki badań przedstawione są jako średnie arytmetyczne \pm SEM. Linia przerywana oznaczono dane stanowiące punkt odniesienia w analizie statystycznej.

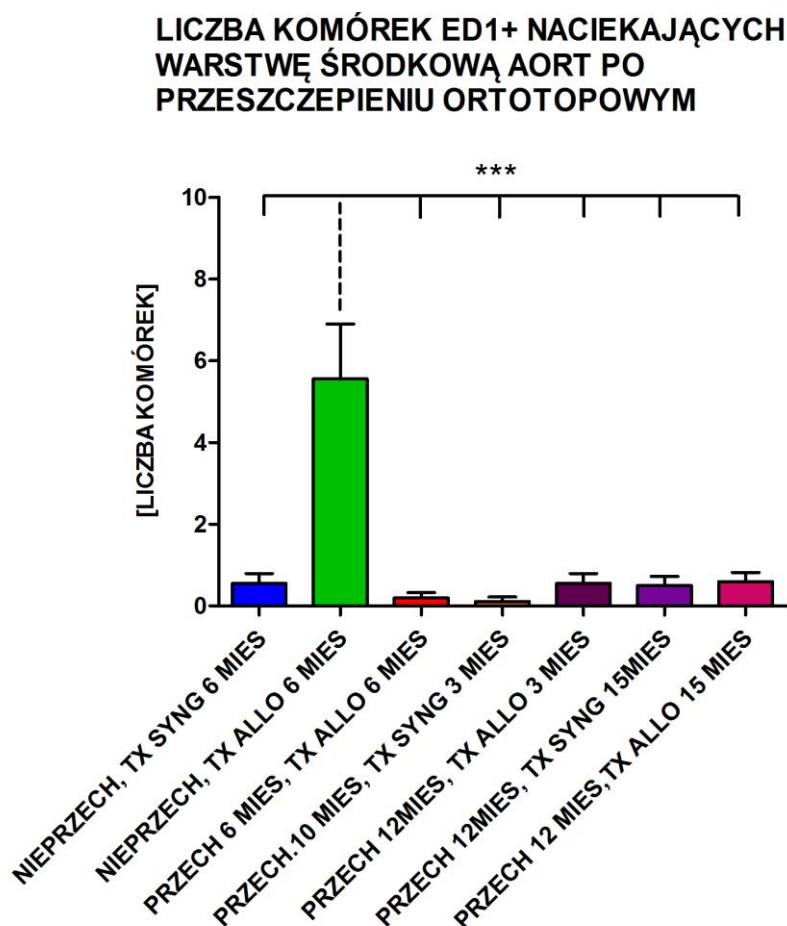
5.7.1.2 Liczba komórek immunologicznie czynnych biorecy naciekających warstwę środkową przeszczepionej aorty.

W grupie aort nieprzechowywanych, przeszczepionych w układzie allogenicznym na 6 miesięcy komórek OX6+ było średnio $6,3 \pm 1,4$. W pozostałych grupach natomiast były one obserwowane sporadycznie (0-2). Dane te przedstawia rycina 34.



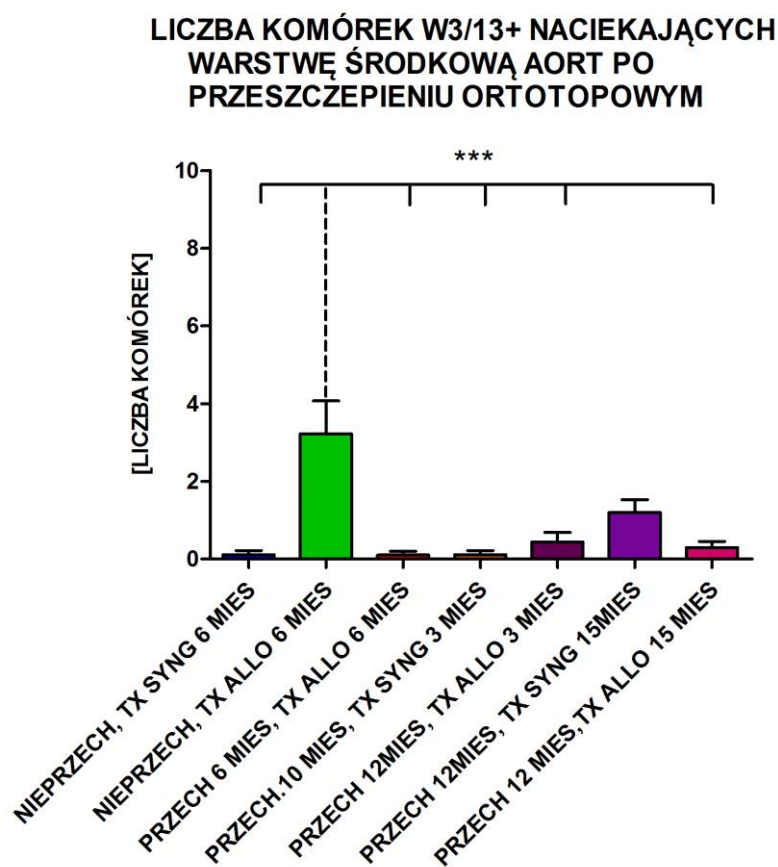
Rycina 34. Liczba komórek OX6+ (MHCII+) naciekających warstwę środkową aort po przechowywaniu w bezwodnym NaCl i przeszczepieniu ortotopowym. Analizę statystyczną wykonałam metodą porównań wielokrotnych Tukey'a ANOVA * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Wyniki badań przedstawione są jako średnie arytmetyczne \pm SEM. Linia przerywaną oznaczono dane stanowiące punkt odniesienia w analizie statystycznej.

Podobnie jak w przypadku komórek OX6+, naciek komórek ED1+ jest zauważalny jedynie w grypie aort nieprzechowywanych, przeszczepionych w układzie allogenicznym (średnio $5,5 \pm 1,3$ komórek), co przedstawia rycina 35.



Rycina 35. Liczba komórek ED1+ (monocyty/makrofagi) naciekających warstwę środkową aort po przechowywaniu w bezwodnym NaCl i przeszczepieniu ortotopowym. Analizę statystyczną wykonałam metodą porównań wielokrotnych Tukey'a ANOVA *** $p < 0,001$. Wyniki badań przedstawione są jako średnie arytmetyczne \pm SEM. Linia przerywaną oznaczono dane stanowiące punkt odniesienia w analizie statystycznej.

W warstwie środkowej nacieki komórek W3/13+ były niewielkie we wszystkich grupach doświadczalnych (rycina 36).

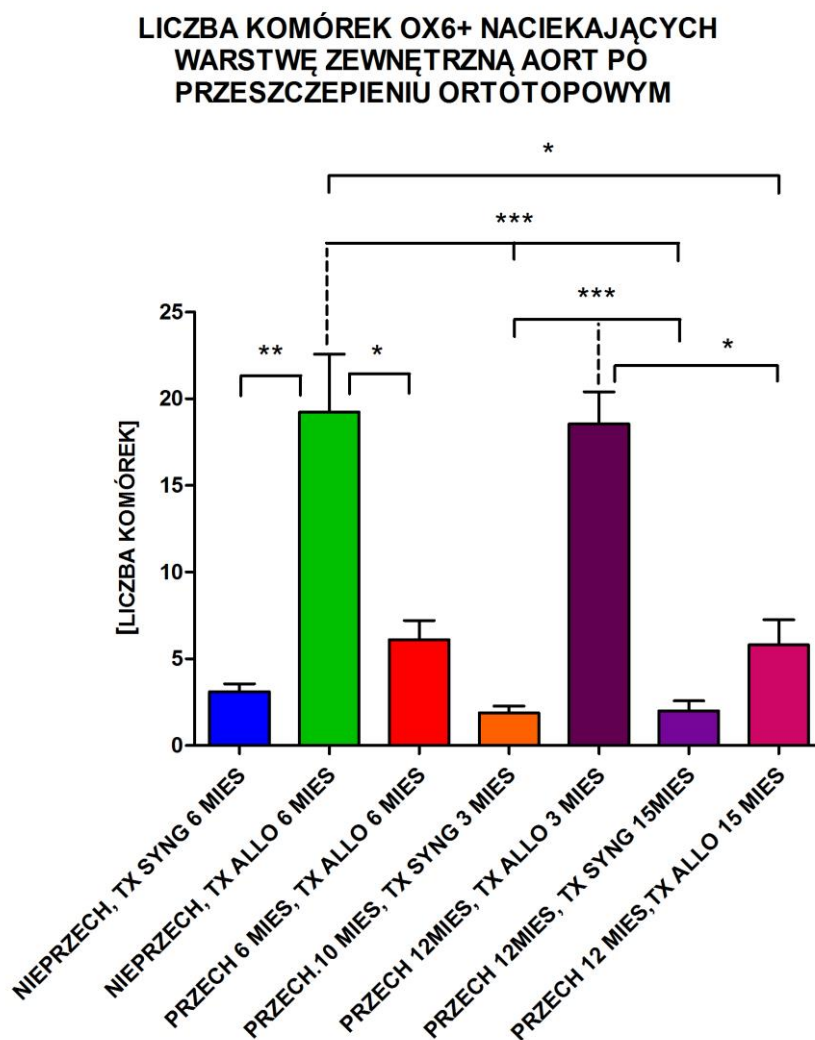


Rycina 36. Liczba komórek W3/13 (leukocyty) naciekających warstwę środkową aort po przechowywaniu w bezwodnym NaCl i przeszczepieniu ortotopowym. Analizę statystyczną wykonałam metodą porównań wielokrotnych Tukey'a ANOVA, *** $p < 0,001$. Wyniki badań przedstawione są jako średnie arytmetyczne \pm SEM. Linia przerywaną oznaczono dane stanowiące punkt odniesienia w analizie statystycznej.

5.7.1.3 Liczba komórek immunologicznie czynnych biorcy naciekających warstwę zewnętrzną przeszczepionej aorty.

Obserwowałam znaczny naciek komórek OX6+ w warstwie zewnętrznej aort nieprzechowywanych, przeszczepionych w układzie allogenicznym na 6 miesięcy (średnio $19,2 \pm 3,3$ komórek w 5 polach o wymiarach $100 \times 100 \mu\text{m}$) oraz aort przechowywanych w NaCl przez 12 miesięcy, przeszczepionych w układzie allogenicznym na 3 miesiące (średnio $18,5 \pm 1,9$ komórek). W pozostałych grupach doświadczalnych liczba komórek OX6+ wynosiła $1,9 \pm 0,4$ do $6,1 \pm 1,1$ i nie odbiegała

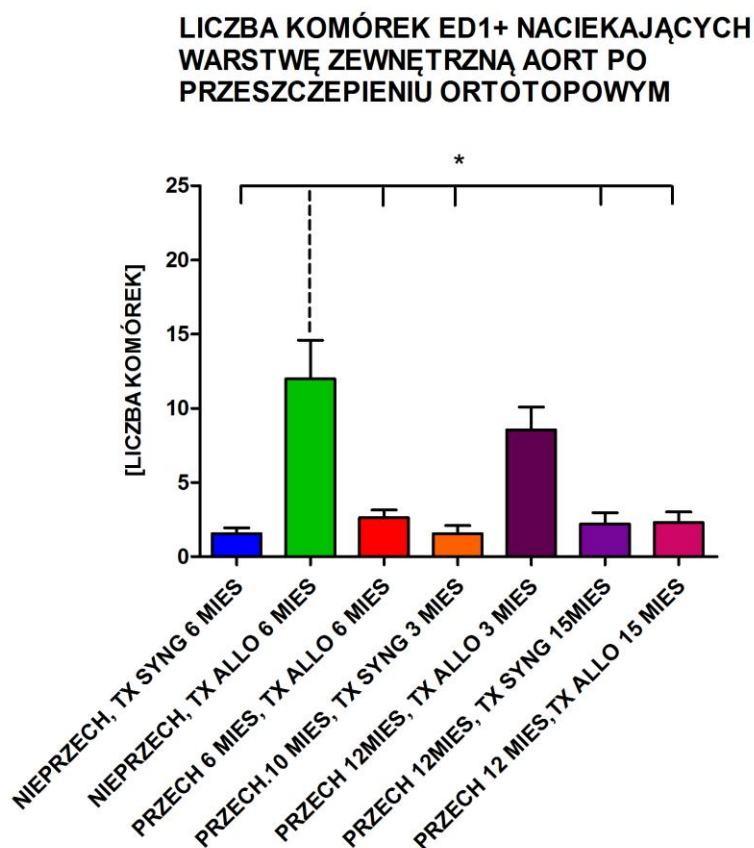
w sposób istotny statystycznie od grupy kontrolnej aort nieprzechowywanych, przeszczepionych w układzie syngenicznym na 6 miesięcy (średnio $3,1 \pm 0,4$ komórek). Dane te przedstawiono na rycinie 37.



Rycina 37. Liczba komórek OX6+ (MHCII+) naciekających warstwę zewnętrzną aort po przechowywaniu w bezwodnym NaCl i przeszczepieniu ortotopowym. Analizę statystyczną wykonałam metodą porównań wielokrotnych Tukey'a ANOVA * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Wyniki badań przedstawione są jako średnie arytmetyczne \pm SEM. Linia przerywaną oznaczono dane stanowiące punkt odniesienia w analizie statystycznej.

Naciek komórek ED1+ w warstwie zewnętrznej aort był nieco mniej intensywny niż w przypadku komórek OX6+. W grupach aort przechowywanych liczba komórek ED1+ w warstwie zewnętrznej była porównywalna do grupy kontrolnej aort nieprzechowywanych, przeszczepionych w układzie syngenicznym na 6 miesięcy

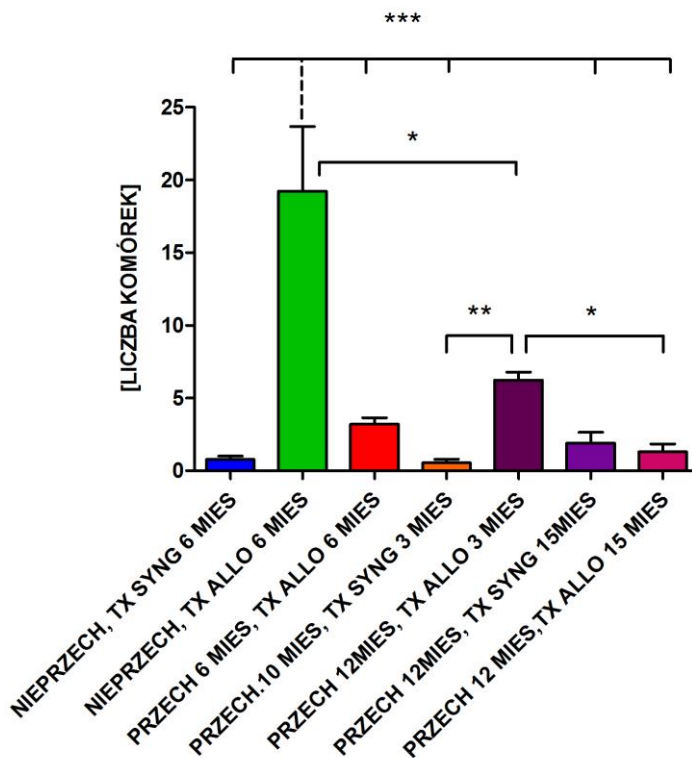
($3,1 \pm 0,3$ komórek). W przypadku allogenicznego przeszczepienia aort nieprzechowywanych na 6 miesięcy oraz aort przechowywanych w NaCl przez 12 miesięcy na 3 miesiące, wynosił średnio $12 \pm 2,5$ i $8,5 \pm 1,6$ komórek, co przedstawia rycina 38.



Rycina 38. Liczba komórek ED1+ (monocyty/makrofagi) naciekających warstwę zewnętrzną aort po przechowywaniu w bezwodnym NaCl i przeszczepieniu ortotopowym. Analizę statystyczną wykonałam metodą porównań wielokrotnych Tukey'a ANOVA *** $p < 0,001$. Wyniki badań przedstawione są jako średnie arytmetyczne \pm SEM. Linia przerywaną oznaczono dane stanowiące punkt odniesienia w analizie statystycznej.

Liczba komórek W3/13+ naciekających warstwę zewnętrzną aort nieprzechowywanych, przeszczepionych w układzie allogenicznym na 6 miesięcy, wynosi średnio $19,2 \pm 4,4$ komórek i jest istotnie statystycznie wyższa, niż we wszystkich pozostałych grupach, włącznie z grupą aort przechowywanych w NaCl przez 12 miesięcy, przeszczepionych w układzie allogenicznym na 3 miesiące ($6,2 \pm 0,5$ komórek) (rycina 39).

LICZBA KOMÓREK W3/13+ NACIEKAJĄCYCH
WARSTWĘ ZEWNĘTRZNĄ AORT PO
PRZESZCZEPIENIU ORTOTOPOWYM



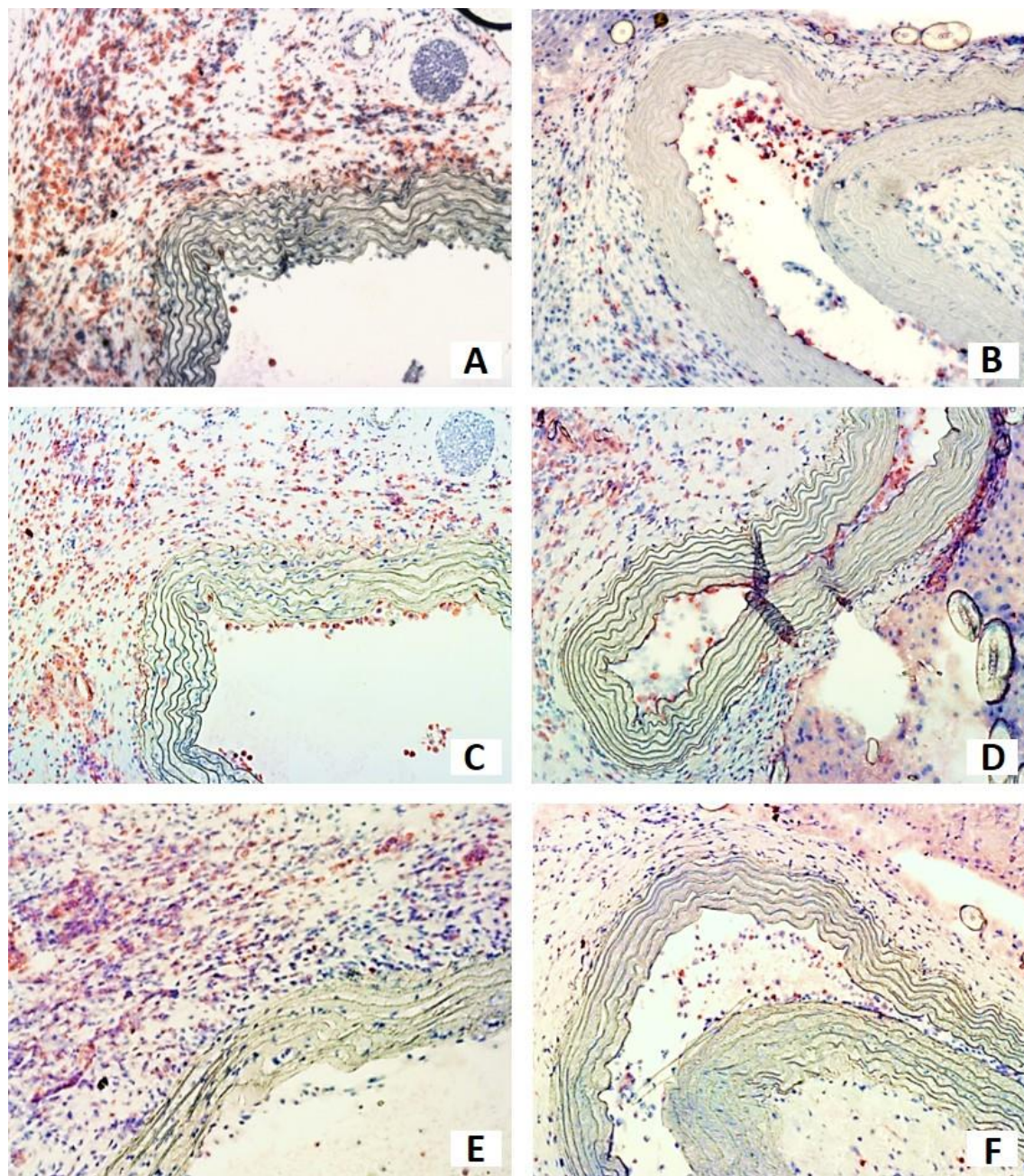
Rycina 39. Liczba komórek W3/13+ (leukocyty) naciekających warstwę zewnętrzną aort po przechowywaniu w bezwodnym NaCl i przeszczepieniu ortotopowym. Analizę statystyczną wykonałam metodą porównań wielokrotnych Tukey'a ANOVA * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Wyniki badań przedstawione są jako średnie arytmetyczne \pm SEM. Linia przerywaną oznaczono dane stanowiące punkt odniesienia w analizie statystycznej.

5.7.2 Immunogenność aort przechowywanych w NaCl zbadana po przeszczepieniu podskórnym.

5.7.2.1 Liczba komórek immunologicznie czynnych biocy naciekających aortę wszczepioną podskórnym.

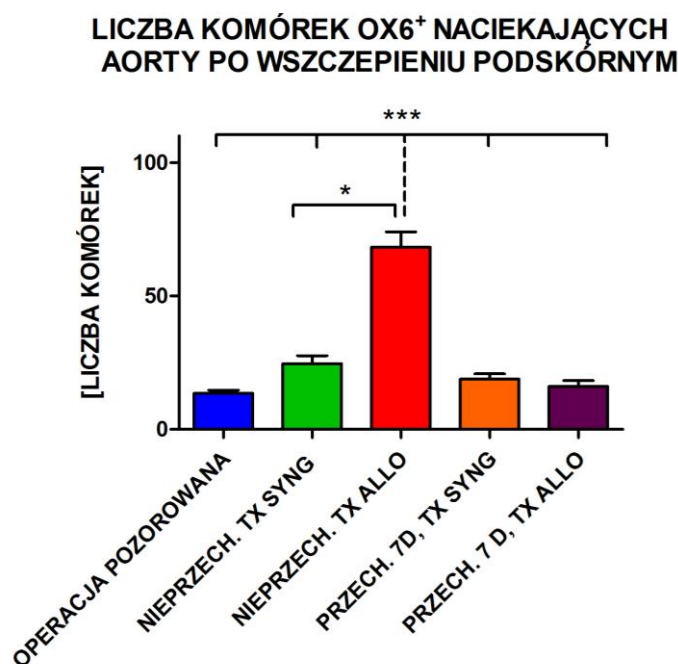
W przypadku aort nieprzechowywanych, przeszczepionych w układzie allogenicznym (rycina 40, kolumna lewa - zdj. A,C,E) obserwowałam większe nacieki komórek odpornościowych biocy (wyznakowane na czerwono), niż w przypadku aort przeszczepionych w układzie allogenicznym, które były poddane wcześniej procesowi przechowywania w bezwodnym chlorku sodu (kolumna prawa - zdj. B,D,F).

Obserwacja ta powtarzała się w przypadku wszystkich badanych fenotypów komórek (OX6+, ED1+ i W3/13+).



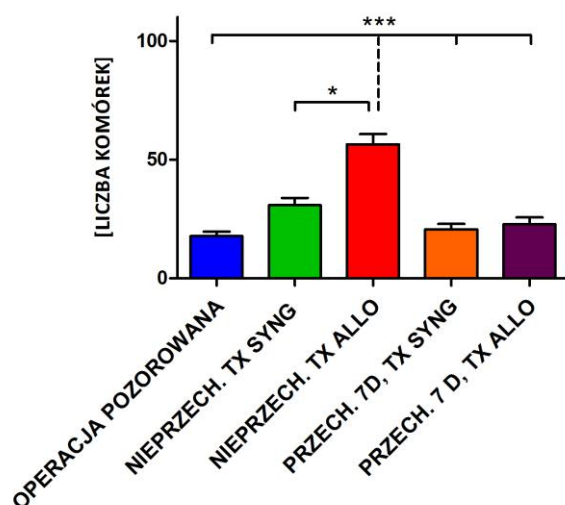
Rycina 40. Aorta nieprzechowywana (kolumna lewa) oraz przechowywana 7 dni w bezwodnym NaCl (kolumna prawa); 7 dni po allogenicznym podskórnym wszczepieniu w łapę. A,B - na czerwono wyznakowane komórki MHC klasy II pozytywne (OX6+), C,D- monocyty/makrofagi (ED1+), E,F- leukocyty (W3/13+) pow. x100.

Nacieki komórek OX6+ we wszystkich preparatach aort przechowywanych, bez względu na układ doświadczalny, były porównywalne jak w nieprzechowywanych, syngenicznie przeszczepionych aortach kontrolnych oraz w przypadku operacji pozorowanej. Liczba komórek OX6+ naciekających nieprzechowywane, wszczepione w układzie allogenicznym aorty była istotnie statystycznie wyższa niż we wszystkich pozostałych grupach (rycina 41). Analogiczna sytuacja miała miejsce w przypadku komórek ED1+ i W3/13+ (dane przedstawione na rycinach 42 i 43).



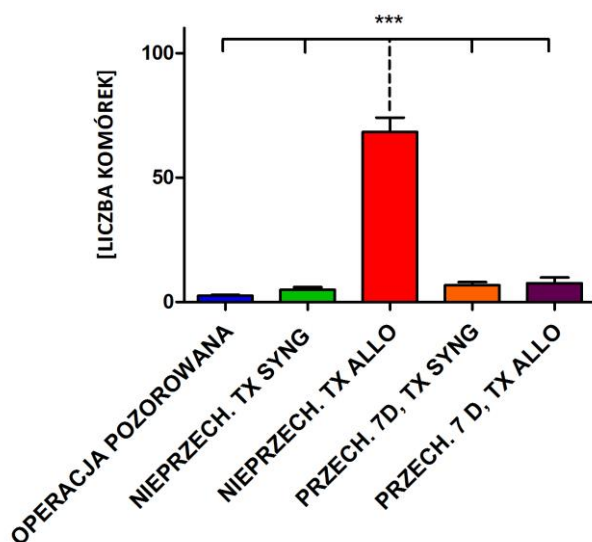
Rycina 41. Liczba komórek OX6+ (MHCII+) naciekających aorty po przechowywaniu w bezwodnym NaCl i wszczepieniu podskórnym. Analizę statystyczną wykonałam metodą porównań wielokrotnych Tukey'a ANOVA * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Wyniki badań przedstawione są jako średnie arytmetyczne \pm SEM. Linia przerywaną oznaczono dane stanowiące punkt odniesienia w analizie statystycznej.

LICZBA KOMÓREK ED1⁺ NACIEKAJĄCYCH
PODSKÓRNICIE WSZCZEPIONĄ AORTĘ



Rycina 42. Liczba komórek ED1⁺ (monocyty/makrofagi) naciekających aorty po przechowywaniu w bezwodnym NaCl i wszczepieniu podskórnym. Analizę statystyczną wykonałam metodą porównań wielokrotnych Tukey'a ANOVA * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Wyniki badań przedstawione są jako średnie arytmetyczne \pm SEM. Linia przerywaną oznaczono dane stanowiące punkt odniesienia w analizie statystycznej.

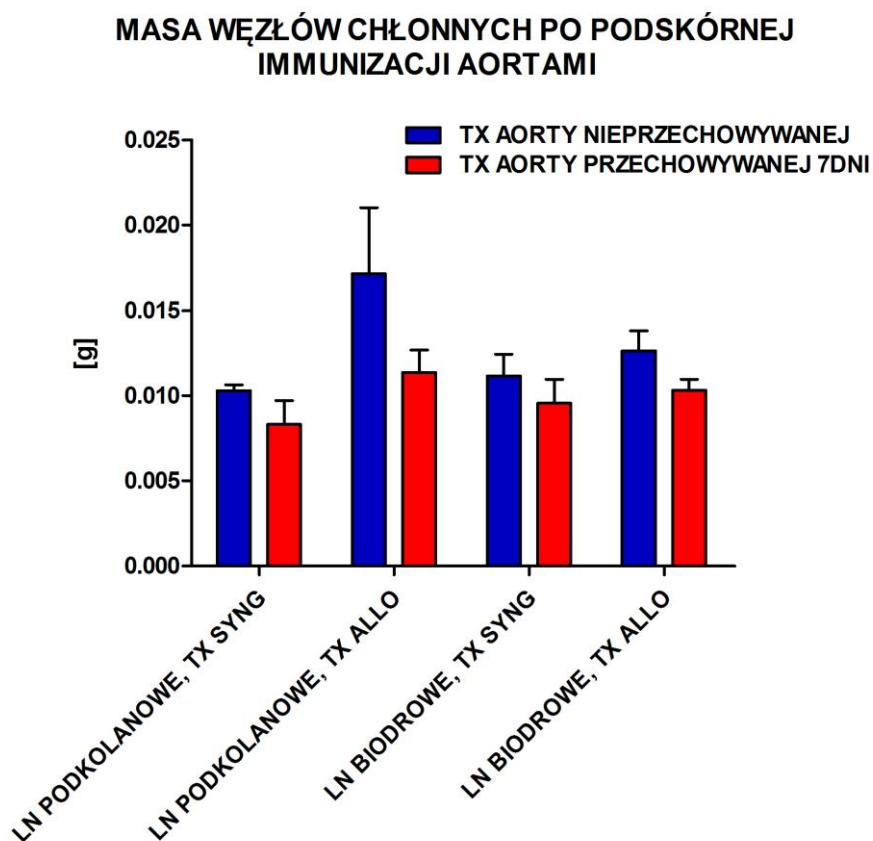
LICZBA KOMÓREK W3/13⁺ NACIEKAJĄCYCH
PODSKÓRNICIE WSZCZEPIONĄ AORTĘ



Rycina 43. Liczba komórek W3/13⁺ (leukocyty) naciekających aorty po przechowywaniu w bezwodnym NaCl i wszczepieniu podskórnym. Analizę statystyczną wykonałam metodą porównań wielokrotnych Tukey'a ANOVA *** $p < 0,001$. Wyniki badań przedstawione są jako średnie arytmetyczne \pm SEM. Linia przerywaną oznaczono dane stanowiące punkt odniesienia w analizie statystycznej.

5.7.2.2 Reakcja regionalnych węzłów chłonnych po podskórnym wszczepieniu aorty.

Masa regionalnych (podkolanowych i biodrowych) węzłów chłonnych po podskórnym wszczepieniu aort w łapę była niższa w grupie aort przechowywanych w bezwodnym chlorku sodu niż nieprzechowywanych (rycina 44), jednak nie były to różnice istotne statystycznie.



Rycina 44. Masa regionalnych węzłów chłonnych po podskórnym wszczepieniu aort. Analizę statystyczną wykonałam metodą porównań wielokrotnych Tukey'a ANOVA. Wyniki badań przedstawione są jako średnie arytmetyczne \pm SEM.

6 Dyskusja

Przedstawiona przeze mnie w niniejszej pracy metoda umożliwia długoterminowe przechowywanie w bezwodnym chlorku sodu naczyń tętnicznych do przeszczepienia. Zastosowanie tej metody przechowywania pozwalało na zachowanie w warunkach doświadczalnych funkcji przeszczepionego naczynia nawet przez 15 miesięcy. Drożność naczynia oraz zmiany w ścianie przeszczepu były w pewnym stopniu zależne od syn- i allogeniczności oraz czasu przechowywania przeszczepu.

Aorty przechowywane w bezwodnym chlorku sodu przez 30 dni i przeszczepione na 12 miesięcy, zarówno w układzie syngenicznym jak i allogenicznym zachowały we wszystkich przypadkach drożność i niezmienną światłość. Wyniki te były identyczne z rezultatem uzyskanym w grupie kontrolnej aort syngenicznych przeszczepionych zaraz po pobraniu.

Aorty syngeniczne przechowywane przez 6 miesięcy i przeszczepione na 6 miesięcy były drożne i tętniły, a także nie obserwowałam występowania tętniaków. Aorty allogeniczne przechowywane przez 6 miesięcy i przeszczepione na okres 6 miesięcy zachowywały drożność i tętniły w 75% przypadków, a 25% z nich miało poszerzone światło.

Po długoterminowym przechowywaniu (12 miesięcy) i długoterminowym przeszczepieniu (15 miesięcy) odsetek naczyń drożnych w grupie przeszczepów syngenicznych był taki jak w aortach nieprzechowywanych (100%), a w grupie przeszczepów allogenicznych wynosił on 87,5%. Poszerzenie światła naczyń obserwowałam w 25% przypadków w grupie naczyń przeszczepionych w układzie syngenicznym i w 50% przypadków w układzie allogenicznym.

Wszystkie aorty nieprzechowywane, przeszczepione w układzie syngenicznym zachowały po 6 miesiącach od przeszczepienia drożność, tętniły, a ich przekrój nie zmienił się. W układzie allogenicznym częściową drożność zachowało 71% przeszczepów, tętniło 57,1%, a 14% uległo tętniakowatemu poszerzeniu.

Powyższe obserwacje wskazują, że naczynia przechowywane w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepione w układzie allogenicznym utrzymują drożność i zachowują niezmienny kształt w większym procencie przypadków niż naczynia allogeniczne przeszczepiane natychmiast po pobraniu.

Utrata drożności części aort przeszczepionych w układzie allogenicznym mogła wynikać z reakcji układu odpornościowego biorcy na przeszczep. To również mogło

być przyczyną poszerzenia światła niektórych badanych naczyń allogenicznych. Proces zapalny związany z reakcją odrzucania obcej tkanki prowadzi do uszkodzenia ściany przeszczepu. Do utraty drożności dochodzi w mechanizmie agregacji czynników morfotycznych krwi, wydzielania czynników wzrostu, a następnie hiperprolifracji oraz migracji komórek mięśniowych z warstwy środkowej do wewnętrznej [Mennander i wsp. 1991].

Reakcja zapalna na allogeniczny przeszczep prowadzi także do uszkodzenia ściany naczynia, uruchomienia kaskady krzepnięcia i degradacji proteolitycznej włókien elastycznych ściany przeszczepu, których uszkodzenie skutkuje obniżeniem wytrzymałości naczynia i powstawaniem tętniaków [Gacko i wsp. 2004]. Zatem biologiczny mechanizm rzadszego powstawania tętniaków w naczyniach przechowywanych tłumaczyć można utratą właściwości immunogennych przeszczepu pod wpływem działania stężonego chlorku sodu.

W sytuacji, gdy wymagana średnica naczynia jest niewielka (np. przy wykonywaniu pomostu omijającego udowo-podkolanowego), problem powstawania zakrzepów i utraty drożności sztucznych protez jest tak samo istotny jak w przypadku krioprzechowywanych przeszczepów allogenicznych, o czym wspominałam we wstępie. Uzyskane przeze mnie wyniki w grupie przeszczepów allogenicznych aort przechowywanych w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepionych na rok są znamienne lepsze, niż w przypadku protez naczyniowych czy tętnic mrożonych. Drożność pomostów sztucznych i żylnych przez rok od momentu przeszczepienia jest zbliżona (76,9% PTFE względem 77,1% w przypadku przeszczepu żyły własnej). Jednak w dłuższym, 3-letnim, okresie obserwacji znacznie wyższy odsetek przeszczepów z żyły własnej zachowuje przepływ (48,7%, PTFE w porównaniu do 77,1% żyły własnej) [Conklin i wsp. 2002]. W badaniach przeprowadzonych przez Pupkę i współpracowników (2010) spośród protez impregnowanych heparyną po roku drożność zachowało 71% protez dakronowych i 62% protez z PTFE. Podczas 5-letniego okresu obserwacji po protezowaniu z użyciem protez dakronowych z heparyną bądź protez z PTFE uzyskano jeszcze niższy odsetek drożnych naczyń - odpowiednio 46% i 35% w obu grupach [Devine i wsp. 2004]. Metaanaliza 7 badań przeprowadzona przez Takagi i współpracowników (2010) dała podobne rezultaty: 49,2% drożnych protez dakronowych względem 38,4% drożnych protez PTFE w 5-letnim okresie obserwacji. Natomiast drożność tętnic przechowywanych w bezwodnym chlorku sodu, w zależności od czasu przechowywania i układu

doświadczalnego wahała się od 87,5% do 100%, średnio dla wszystkich badanych aort 93,55%.

Po przechowywaniu aort w bezwodnym chlorku sodu ale przed ich przeszczepieniem wykonałam szereg oznaczeń, mających na celu określenie wpływu zastosowanej metody przechowywania na tętnice. Okazało się, że aorty przechowywane w bezwodnym chlorku sodu zachowują niezmienną budowę ściany. Grubość warstwy wewnętrznej aort 3, 6 i 10 miesięcy po przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu była nieznacznie większa niż w aortach kontrolnych natychmiast po pobraniu, prawdopodobnie na skutek zbyt intensywnego uwodnienia, zaś grubość warstwy środkowej i zewnętrznej aort po przechowywaniu w NaCl i aort nieprzechowywanych była porównywalna.

W moich badaniach wykazałam, że naczynia poddane działaniu bezwodnego chlorku sodu przez 3, 6 i 10 miesięcy zachowały prawidłową strukturę włókien elastynowych i kolagenowych, czego nie udaje się osiągnąć innymi metodami. Także liczba komórek mięśniowych w warstwie środkowej była porównywalna w aortach przechowywanych w bezwodnym chlorku sodu i w aortach nieprzechowywanych. Jednak w przeprowadzonych przeze mnie badaniach immunohistochemicznych z zastosowaniem przeciwciał przeciwko antygenom komórek śródbłonka (CD31, HIS52, CD54), nie stwierdziłam obecności komórek śródbłonka w naczyniach przechowywanych w bezwodnym chlorku sodu. Wyniki te potwierdziłam w badaniu z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej. Oznacza to, że śródbłonek ulega zniszczeniu podczas procesu przechowywania lub uwadniania.

Tak więc metoda przechowywania naczyń w bezwodnym chlorku sodu pozwala na zachowanie włókien elastycznych, komórek mięśniowych, ale prowadzi do utraty komórek śródbłonka naczyniowego.

Nasuwa to pytania: czy takie naczynie zachowuje swoją wartość jako materiał do przeszczepu, czy utrata śródbłonka ma jakiegokolwiek znaczenie dla jego funkcjonowania i „żywności”?

Za najważniejszy uważam fakt, że naczynie funkcjonuje jako przewód, wykazuje wystarczającą elastyczność i wytrzymałość mechaniczną aby oprzeć się ciśnieniu krwi i funkcja ta utrzymuje się nawet wiele miesięcy po przeszczepieniu.

Śródbłonek pełni funkcję ochronną i wydzielniczą. Wydzielany przez śródbłonek tlenek azotu działa rozkurczająco na naczynie oraz hamująco na proliferację komórek mięśni gładkich w ścianie naczynia. Dodatkowo śródbłonek

uwalnia prostacykliny, naczyniorozkurczające oraz hamujące adhezję leukocytów i adhezję oraz agregację płytek krwi [Obońska i wsp. 2010, Tousoulis i wsp. 2012].

Mając na uwadze jedynie powyższe funkcje, utrata komórek śródbłonka w trakcie przechowywania w NaCl stanowiłaby wadę tej metody. Tak więc z jednej strony utrata komórek śródbłonkowych może mieć negatywne skutki, takie jak zwiększenie częstotliwości powstawania zakrzepów czy przerost warstwy wewnętrznej przeszczepionego naczynia, ale z drugiej strony elementy komórkowe allogenicznych naczyń krwionośnych są ich najbardziej immunogenną częścią [Allaire i wsp. 1996; Allaire i wsp. 1997]. Patrząc na to zagadnienie z tej perspektywy, lepiej jest przeszczepić naczynie o niższej immunogenności, chociaż pozbawione śródbłonka spełniającego funkcję ochronną, niż ryzykować powstanie nasilonej reakcji immunologicznej biorcy na przeszczep allogeniczny.

Niezależnie od metody przygotowania i przechowywania wszystkie naczynia po przeszczepieniu ulegają przebudowie tkankowej. Dokładnie tak samo dzieje się w przypadku naczynia przechowywanego w bezwodnym chlorku sodu. Zakres i natężenie procesu przebudowy jest jednak różne i zależy nie tylko od zastosowanej metody przygotowania i przechowywania przeszczepu, ale również cech wyjściowych użytego materiału tkankowego. Ponadto przeszczepiane naczynie narażone jest na uszkodzenia mechaniczne podczas operacji, uszkodzenia związane z niedokrwieniem, a w przypadku przeszczepu allogenicznego także na uszkodzenia związane z reakcją immunologiczną biorcy na obcą tkankę.

W czasie procesu przechowywania w bezwodnym chlorku sodu dochodzi do prawie całkowitego zniszczenia śródbłonka. Komórki śródbłonka zostają zachowane jedynie na 1% obwodu naczynia. Po przeszczepieniu natomiast, we wszystkich badanych przeze mnie układach doświadczalnych, zidentyfikowałam obecność śródbłonka naczyniowego wyściełającego pogrubiałą warstwę wewnętrzną naczyń i pokrywającego nawet 90% obwodu naczynia. Ponieważ nie stwierdzałam obecności komórek śródbłonkowych w aortach przechowywanych w bezwodnym chlorku sodu przed przeszczepieniem, uważam, że uległ on regeneracji po przeszczepieniu w organizmie biorcy.

Powstaje pytanie o pochodzenie komórek śródbłonkowych, którymi pokrył się przeszczep. W preparatach histologicznych analizowanych w mikroskopie świetlnym obserwowałam „napękanie” komórek od strony zespołen z naczyniem biorcy, co sugeruje, że pochodzą one od gospodarza. Podobne spostrzeżenie poczynili Bigaud

i współpracownicy (1999), jak również Andriambeloso i współpracownicy (2001). Ich badania wykazały tworzenie neointymy - po miesiącu od przeszczepienia w okolicach zespoлей, a po 2 miesiącach w całym naczyniu.

Natomiast wykonana przeze mnie analiza z użyciem mikroskopii elektronowej ujawniła, że miejscowo widoczne są dwie warstwy komórek o cechach ultrastrukturalnych komórek śródbłonkowych. Komórki górnej warstwy posiadają liczne wypustki, pozostając w ogniskowym kontakcie z komórkami tworzącymi warstwę ciągłą. Pozwala to przypuszczać, że są to komórki migrujące, zasiedlające ścianę naczynia od strony światła. Te obserwacje także pozostają w zgodzie z doniesieniami literaturowymi [Hu i wsp. 2003], potwierdzającymi, że komórki śródbłonkowe pokrywające przeszczep pochodzą od biorcy, a biorą początek z krążących komórek progenitorowych. Użyty przez autorów układ doświadczalny (przeszczep allogeniczny u myszy, komórki śródbłonkowe dawcy lub biorcy konstytutywnie wyrażały β -galaktozydazę) umożliwił bardzo dokładne prześledzenie pochodzenia komórek śródbłonka. Badacze ci wykazali, że w przeszczepie allogenicznym do 3 dnia po przeszczepieniu dochodzi do zmniejszenia o połowę, a do tygodnia do niemal całkowitej utraty śródbłonka dawcy, z jednoczesną repopulacją (pełną po 4 tygodniach) komórkami biorcy.

Na podstawie moich doświadczeń uważam, że regeneracja śródbłonka w przeszczepionym naczyniu prawdopodobnie zachodzi jednocześnie od strony zespoлей z naczyniem biorcy i od światła naczynia, na całej jego długości, przez zasiedlanie przez komórki krążące i w obu przypadkach nowo powstały śródbłonek pochodzi od biorcy.

Z literatury wynika, że po przeszczepieniu naczynia pokrytego śródbłonkiem, zarówno syngenicznego, jak allogenicznego, dochodzi do uszkodzenia i utraty śródbłonka przeszczepu. Przez 3 dni przebieg procesu regeneracji w obu typach przeszczepów jest podobny. W pierwszym dniu po przeszczepieniu zarówno naczynia syngeniczne, jak allogeniczne wykazują podobny stopień uszkodzenia śródbłonka, głównie w okolicach zespoлей. Prawdopodobnie jest to wynik urazu związanego z operacją i niedokrwieniem. W przypadku przeszczepu syngenicznego regeneracja śródbłonka przebiega stale aż do 14 dnia, kiedy to zostaje ukończona. W przeszczepie allogenicznym natomiast około 7-10 dnia dochodzi do ponownego uszkodzenia śródbłonka, tym razem na podłożu reakcji immunologicznej. W 2 i 3 tygodniu po przeszczepie obserwuje się przyleganie monocytów/makrofagów i limfocytów T,

a po 3 tygodniach naczynie jest ponownie całkowicie pozbawione śródbłonka. Dopiero po 2 miesiącach następuje jego całkowita regeneracja [Andriambelason i wsp. 2001, Hu i wsp. 2003].

Ponieważ po 7 dniach od operacji w przeszczepach allogenicznych rozpoczyna się intensywny proces przylegania leukocytów i utraty śródbłonka [Andriambelason i wsp. 2001], wykorzystanie alloprzeszczepów pozbawionych śródbłonka wydawałoby się korzystne. Pozwalałoby uniknąć odpowiedzi immunologicznej biorcy na komórki śródbłonka przeszczepu. W ten sposób skrócony zostałby czas regeneracji warstwy wewnętrznej naczynia przez komórki biorcy.

Autorzy badań doświadczalnych nad przechowywaniem naczyń do przeszczepienia w glicerolu także skłaniają się do twierdzenia, że brak allogenicznych komórek śródbłonka w naczyniu stanowi zaletę testowanej przez nich metody przechowywania [Fahner i wsp. 2008]. Z przeprowadzonych przez tę grupę doświadczeń wynika, że przechowywany w glicerolu, bezkomórkowy przeszczep ulega szybszemu pokryciu śródbłonkiem biorcy, reakcja immunologiczna biorcy jest słabsza, a co za tym idzie mniej wyraźny jest przerost warstwy wewnętrznej. Podobna sytuacja ma miejsce przy przechowywaniu naczyń w bezwodnym chlorku sodu, kiedy uzyskuje się naczynia o zachowanej strukturze włókien elastycznych, ale pozbawione komórek śródbłonka naczyniowego.

Śródbłonek odgrywa także rolę antytrombogenną. Jednak na korzyść przeszczepiania naczyń nie zawierających komórek śródbłonka dawcy świadczą wyniki doświadczeń Komorowskiej-Timek i współpracowników z 2002 roku, polegające na przeszczepianiu mrożonych tętnic udowych u szczurów. Autorzy wykazali, że początkowy brak śródbłonka w przeszczepianych naczyniach nie ma wpływu na uzyskaną później drożność przeszczepów. Wyniki te są tym bardziej istotne, że schemat doświadczalny dotyczył naczyń o bardzo małej średnicy, a więc szczególnie narażonych na powstawanie zakrzepów i niedrożności.

Badania dowodzą, że komórki śródbłonka w przeszczepach allogenicznych nie są niezbędne, gdyż około 11 dnia po przeszczepieniu komórki śródbłonka ulegają destrukcji w procesie ostrego odrzucenia. Dochodzi do uwolnienia czynnika aktywującego płytki (PAF) i wzrostu stężenia tromboksanu, co inicjuje kaskadę krzepnięcia [Gacko i wsp. 2004]. Przeszczepienie naczynia allogenicznego z zachowanymi komórkami śródbłonka prowadzi do silnej reakcji immunologicznej biorcy, w przebiegu której dochodzi do całkowitej utraty śródbłonka [Redwood i wsp.

2001]. Intensywny proces odrzucenia, poza utratą śródbłonka i opóźnieniem procesu jego regeneracji prowadzi do zniszczenia włókien elastycznych naczyń, a co za tym idzie osłabienia jego właściwości mechanicznych i powstawania tętniaków. W przeszczepianych przeze mnie naczyniach przechowywanych w bezwodnym chlorku sodu nie obserwowałam tak intensywnej reakcji biorcy na przeszczep. We wszystkich grupach doświadczalnych dochodziło do regeneracji śródbłonka komórkami biorcy. Dlatego uważam, że zjawisko utraty komórek śródbłonka w przechowywanych badana przeze mnie metodą naczyniach jest korzystne, jako że szukamy nie metody pozwalającej na jak najlepsze utrwalenie całej struktury tkanki, ale takiej która pozwoli na osiągnięcie jak najdłuższego czasu przeżycia przeszczepu.

Kolejnym badanym przeze mnie parametrem była obecność komórek mięśniowych (SMC) w warstwie środkowej naczyń. Bezpośrednio po przechowywaniu naczyń liczba SMC była porównywalna jak w kontrolnych, nieprzechowywanych aortach. Jednak we wszystkich grupach aort przechowywanych w bezwodnym chlorku sodu po przeszczepieniu obserwowałam niemal całkowitą utratę miofibroblastów warstwy środkowej naczyń. Liczba komórek spadła średnio z 64 (średnia obliczeń z 5 pól o wymiarach 100x100µm) w świeżej aorcie do 46-60 w aortach przechowywanych, ale nieprzeszczepionych i do 2-6 (w zależności od układu doświadczalnego) w aortach przechowywanych i przeszczepionych.

Z literatury wiadomo, że po przeszczepieniu świeżej aorty w układzie allogenicznym już po 14 dniach dochodzi do zmniejszenia liczby komórek mięśniowych w warstwie środkowej [Andriambeloson i wsp. 2001, Bigaud i wsp. 1999]. Bigaud i współpracownicy (1999) wykonywali alloprzeszczepy aorty na modelu szczurzym. Wykazali oni, że w 14 dniu następuje spadek liczby komórek w warstwie środkowej, zaś po 56 dniach warstwa środkowa jest już ich całkowicie pozbawiona i obserwuje się pęknięcia włókien elastycznych. Nie stwierdzili natomiast takich zmian, jeśli zwierzęta doświadczalne otrzymywały cyklosporynę w dawce 7,5mg/kg/dzień, co sugeruje, że w procesie odgrywała rolę odpowiedź immunologiczna biorcy.

Wyniki te potwierdza praca Rossmanna i współpracowników (1999) przeprowadzona również na modelu szczurzym. W przypadku przeszczepów syngenicznych autorzy po 3 miesiącach obserwowali, że struktura zarówno warstwy wewnętrznej, jak i środkowej naczyń nie odbiega od kontroli. W przeszczepach allogenicznych natomiast stwierdzili znaczne pogrubienie warstwy wewnętrznej

i obecność w jej obrębie komórek mięśniowych, podczas gdy większość komórek mięśniowych warstwy środkowej uległa nekrozie.

W przeprowadzonych przeze mnie doświadczeniach liczba komórek w naczyniach po przeszczepieniu allogenicznym była o połowę niższa niż w wyjściowej aorcie (31 względem 64), i niższa niż w aorcie przeszczepionej syngenicznie (31 względem 56). Potwierdza to rolę odpowiedzi immunologicznej biorcy w procesie utraty komórek mięśniowych w przeszczepie allogenicznym. W przypadku aort, które były przechowywane w bezwodnym chlorku sodu obserwowałam jednak niemal całkowitą utratę komórek warstwy środkowej, zarówno w przeszczepach syngenicznych, jak allogenicznych (2-6 komórek, w zależności od układu doświadczalnego). Zjawisko to można wyjaśnić dwojako: 1) komórki w przeszczepianym naczyniu są nadal żywe, ale podczas procesu przeszczepienia, związanego z nim stresem, urazu mechanicznego, niedokrwiennego i reakcji immunologicznej dochodzi do ich obumarcia, 2) komórki w naczyniu poddanym przechowywaniu już nie są żywe, lub żywe, ale poważnie uszkodzone, czego nie udało się zaobserwować, gdyż w barwieniach histologicznych widać zachowane jądra komórkowe. Ponieważ utrata komórek jest dużo wyraźniejsza w aortach po przechowywaniu w NaCl, niż w przypadku świeżego przeszczepu allogenicznego uważam, że to bezwodny chlorek sodu powoduje w trakcie procesu przechowywania uszkodzenia w komórkach mięśniowych. Po przeszczepieniu dochodzi do ich rozpadu. Zachowane zostają jednak włókna elastynowe i kolagenowe, w przeciwieństwie do przeszczepów allogenicznych aort świeżych, gdzie obserwuje się pęknięcia i rozluźnienie struktury włókien.

Fahner i współpracownicy (2009) w swoich badaniach nad przechowywaniem aort szczurzych w glicerolu wykazali, że w alloprzeszczepach przechowywanych tą metodą liczba komórek mięśniowych w warstwie środkowej spada szybko w przeciągu pierwszego tygodnia, ale później utrzymuje się na stałym poziomie do 90 dni po przeszczepie. W grupie kontrolnej, którą stanowiły nieprzechowywane przeszczepy syngeniczne, ilość SMC początkowo była wyższa, niż w przechowywanych, ale w długoterminowych obserwacjach (powyżej 2 tygodni) w obu grupach była porównywalna. Minus tej pracy stanowi fakt, że badania nie obejmowały grupy alloprzeszczepów aort nieprzechowywanych, więc trudno definitywnie stwierdzić, czy obserwowane rozbieżności były wynikiem przechowywania aorty przed przeszczepieniem czy też prowadzenia obserwacji na innym układzie doświadczalnym.

W przypadku przeszczepów naczyń mrożonych również dochodzi do spadku ilości komórek mięśniowych w warstwie środkowej. Yamada i współpracownicy (2012) wykonali na modelu króliczym allogeniczne przeszczepy aort przechowywanych w temperaturze -80°C przez 2 miesiące. Autorzy zaobserwowali, że już po 2 dniach od przeszczepienia liczba SMC jest o połowę niższa niż wyjściowo, jednak później do 11 dnia szybko rośnie, aż do osiągnięcia liczebności takiej jak w aorcie kontrolnej, po czym ponownie spada. Początkowa intensywne proliferacja SMC jest prawdopodobnie reakcją na czynniki wzrostu wydzielane po uszkodzeniu śródbłonna, urazie związanym z przeszczepieniem, czy też w przypadku alloprzeszczepów jako reakcja na obcą tkankę. Mechanizm ten opisano w literaturze [Behrendt i wsp. 2000]. Limfocyty T biorcy ulegają aktywacji i wydzielają liczne cytokiny (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, INF-gamma, TNF-alpha i TNF-beta), co stymuluje produkcję kolejnych cytokin i ekspresję cząsteczek adhezyjnych. Prowadzi to do infiltracji i akumulacji makrofagów w obrębie ściany naczynia. Dochodzi do miejscowego procesu zapalnego, aktywowane makrofagi i limfocyty produkują cytokiny i czynniki wzrostu (PDGF, IGF-1, FGF, HBGF, EGF, TGF-beta). Ma miejsce stymulacja proliferacji komórek mięśniowych oraz syntezy i wydzielania przez nie składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Po aktywacji komórki mięśniowe ulegają zmianie fenotypowej i stają się komórkami wydzielniczymi posiadającymi zdolność do migracji. Przemieszczają się do neointimy, co prowadzi do jej przerostu [Faxon i wsp. 2004].

Przerost warstwy wewnętrznej jest obecnie uważany za główną przyczynę utraty drożności przeszczepu w okresie od 2 do 24 miesięcy po wszczepieniu [Lemson i wsp. 2000]. Ponieważ proliferacja komórek mięśniowych jest podstawowym czynnikiem powodującym przerost warstwy wewnętrznej i utratę drożności przeszczepu, możliwość zahamowania nadmiernej proliferacji SMC mogłaby stanowić rozwiązanie tego problemu.

Ehsan i współpracownicy w 2001 roku przeprowadzili badania doświadczalne polegające na przeszczepianiu żyły szyjnej do tętnicy szyjnej u królików z hipercholesterolemią. Doświadczenia wykazały, że śródoperacyjne podanie „wabikowej” (ang. decoy) sekwencji oligonukleotydowej (ODN), odpowiadającej miejscom wiązania E2F (kluczowy czynnik transkrypcyjny cyklu komórkowego) prowadzi do zahamowania proliferacji SMC i zapobiega przerostowi warstwy wewnętrznej w przeszczepionych naczyniach. W efekcie nawet u królików

pozostających przez pół roku na diecie wysokocholesterolowej nie dochodziło do przerostu warstwy wewnętrznej i powstania niedrożności w przeszczepionym naczyniu.

Podobne badania, również na modelu króliczym, ale z użyciem chimerycznej „wabikowej” sekwencji oligonukleotydu (ODN) wchodzącej w interakcję równocześnie z E2F i NFκB wykonali Miyake i współpracownicy (2008). W grupie doświadczalnej, która miała podawane ODN badacze zaobserwowali spadek proliferacji, jak również zahamowanie migracji SMC (w testach *in vitro*). Testy *in vivo* wykazały mniejszy przerost warstwy wewnętrznej i oprócz tego mniejszą infiltrację makrofagów do przeszczepu.

W moich doświadczeniach wykazałam, że po przeszczepieniu świeżych aort w układzie allogenicznym na 6 miesięcy dochodzi do znacznego przerostu warstwy wewnętrznej aort. Obserwacja ta jest zgodna z literaturą [Rossmann i wsp. 1999]. W grupie aort przechowywanych w NaCl przez 6 miesięcy i przeszczepionych allogenicznie na 6 miesięcy, grubość warstwy wewnętrznej wynosiła średnio 106 μm, a w grupie aort nieprzechowywanych, przeszczepionych allogenicznie około 196 μm. Grubość warstwy wewnętrznej aort kontrolnych zdrowego szczura wynosiła 3 μm. Tak więc w przypadku przeszczepienia allogenicznego na 6 miesięcy zarówno w grupie aort przechowywanych w bezwodnym chlorku sodu, jak nieprzechowywanych obserwowałam pogrubienie warstwy wewnętrznej, jednak w przypadku aort przechowywanych była ona prawie dwukrotnie cieńsza. Fakt, że komórki mięśniowe warstwy środkowej aort przechowywanych w bezwodnym chlorku sodu są uszkodzone i jest ich bardzo mało, stanowi swojego rodzaju zabezpieczenie przed ich hiperproliferacją i niekontrolowanym przerostem warstwy wewnętrznej. We wszystkich grupach naczyń przechowywanych w bezwodnym NaCl, a następnie przeszczepionych, obserwowałam przerost warstwy wewnętrznej, jednak nie w stopniu mającym jakikolwiek niekorzystny wpływ na drożność, a co za tym idzie na prawidłowe funkcjonowanie naczynia.

Nieznaczny przerost warstwy wewnętrznej naczynia, pod warunkiem że nie powoduje istotnego zwężenia światła naczynia, może mieć też pozytywny aspekt. Neointima zbudowana jest z komórek mięśniowych i macierzy zewnątrzkomórkowej, więc strukturalnie odpowiada warstwie środkowej naczynia biorcy - umożliwia przejście przez warstwę wewnętrzną niektórych funkcji pozbawionej SMC warstwy

środkowej i utrzymanie długoterminowej homeostazy [Bellon i wsp. 1996, Redwood i wsp. 2001].

Badania wykazują, że przerost warstwy wewnętrznej nie ma wpływu na architekturę warstwy środkowej. Salomon i współpracownicy w 1991 roku badali tętnicę wieńcową od chorych po przeszczepieniu serca (średni czas po przeszczepieniu wynosił 13,2 miesiąca). Nawet w preparatach charakteryzujących się znacznym pogrubieniem warstwy wewnętrznej nie zaobserwowali zaburzeń w budowie błony sprężystej wewnętrznej i włókien elastycznych warstwy środkowej. Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku naczyń przechowywanych w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepionych - przerost intymy nie ma wpływu na budowę włókien elastycznych warstwy środkowej.

Z danych literaturowych wynika, że w przypadku przeszczepów allogenicznych dochodzi do zmniejszenia grubości warstwy środkowej. Zjawisko to obserwowane jest relatywnie późno - między 30 a 40 dniem po przeszczepieniu. Początkowo wiązano je z migracją komórek mięśniowych do warstwy wewnętrznej, jednak obecnie wydaje się, że decydujący wpływ ma raczej ich obumieranie, gdyż utrata SMC zaczyna się jeszcze przed rozpoczęciem formowania intymy [Bigaud i wsp. 1999, Rossmann i wsp. 1999].

W swoich badaniach zaobserwowałam, że we wszystkich grupach doświadczalnych aort przechowywanych i przeszczepionych grubość warstwy środkowej ściany naczyń była porównywalna, i istotnie statystycznie niższa w stosunku do aort kontrolnych – nieprzechowywanych, nieprzeszczepionych oraz nieprzechowywanych i przeszczepionych. To potwierdza hipotezę, że komórki mięśniowe warstwy środkowej podczas przechowywania w chlorku sodu ulegają uszkodzeniu i obumierają, co skutkuje znacznym zmniejszeniem grubości tej warstwy.

Podobne obserwacje poczynili autorzy pracy dotyczącej działania glutaraldehydu [Dumont i wsp. 1993]. Przeszczepiali oni aorty szczurze w układzie syngenicznym i allogenicznym. Po 3 tygodniach od zabiegu zaobserwowali, że naczynia przechowywane w glutaraldehydzie mają cieńszą warstwę środkową, bez względu na zastosowany układ doświadczalny. Badacze ci podkreślają w swojej pracy, że skutkiem przechowywania w glutaraldehydzie była też mniejsza odpowiedź proliferacyjna komórek mięśniowych. Tak więc utrata komórek mięśniowych warstwy środkowej naczyń może mieć także swój pozytywny aspekt.

Grubość warstwy zewnętrznej ściany aort była wyższa we wszystkich grupach doświadczalnych aort przechowywanych i przeszczepionych niż w aortach kontrolnych

- nieprzechowywanych, nieprzeszczepionych. Nie stwierdziłam natomiast takiej zależności w porównaniu do grupy aort nieprzechowywanych i przeszczepionych. Zatem zmiana grubości warstwy zewnętrznej prawdopodobnie nie ma żadnego związku z procesem przechowywania w bezwodnym chlorku sodu.

Kluczowy dla funkcjonowania przeszczepionego naczynia parametr, jakim jest wytrzymałość mechaniczna naczyń, badałam poprzez określenie dwóch parametrów: wytrzymałości na siłę działającą wzdłuż osi długiej naczynia (rozciąganie) i wytrzymałości na siłę działającą prostopadle do ściany naczynia (ciśnienie wewnętrzne).

Średnia wytrzymałość na rozciąganie aort kontrolnych (nieprzechowywanych, nieprzeszczepionych) wynosiła 437 ± 82 g. Wytrzymałość tych aort po przeszczepieniu na 6 miesięcy w układzie syngenicznym była porównywalna i wynosiła średnio 416 ± 75 g. Aorty nieprzechowywane i przeszczepione także na 6 miesięcy, ale w układzie allogenicznym, cechowały się znacznie niższą wytrzymałością, wynoszącą średnio 283g. To wskazuje, że w wyniku reakcji biocy na przeszczep allogeniczny dochodzi do osłabienia wytrzymałości przeszczepu na zerwanie. Wytrzymałość na rozciąganie aort przechowywanych przez 6 miesięcy w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepionych w układzie syngenicznym wynosiła średnio 272g. Wartość ta jest bliska wytrzymałości aort nieprzechowywanych i przeszczepionych w układzie allogenicznym (272 ± 67 g względem 283 ± 93 g), ale znacznie niższa niż przeszczepionych w układzie syngenicznym (272 ± 67 g względem 416 ± 75 g).

Wytrzymałość aort przechowywanych przez 6 miesięcy w chlorku sodu i przeszczepionych na 6 miesięcy w układzie allogenicznym wynosiła poniżej 200g. Wartość ta nie została określona precyzyjniej ze względu na ograniczenia techniczne urządzenia pomiarowego. Otrzymane wyniki wskazują, że przechowywanie w bezwodnym chlorku sodu powoduje zmniejszenie wytrzymałości naczynia na rozciąganie.

Po czasie dłuższym niż jeden rok od przeszczepienia, zarówno aorty nieprzechowywane, jak i przechowywane w bezwodnym chlorku sodu, przeszczepione zarówno w układzie syngenicznym jak i allogenicznym, wykazywały wytrzymałość na rozciąganie poniżej 200g. Świadczy to o tym, że do osłabienia wytrzymałości przeszczepionego naczynia na zerwanie w długoterminowych obserwacjach dochodzi niezależnie od tego, czy naczynie było przechowywane w bezwodnym chlorku sodu.

Drugim badanym parametrem była wytrzymałość na ciśnienie wywierane na ściany naczyń wyrażone w mm słupa Hg.

W warunkach fizjologicznych ciśnienie wywierane na ściany naczyń nie przekracza 200 mm Hg. Do pomiaru wybrano manometr o maksymalnej wartości odczytu 300 mm Hg, aby znacznie przekroczone zostały wartości fizjologiczne. Żadne badane przez mnie przeszczepy, w żadnej grupie doświadczalnej, nie uległy rozerwaniu przy próbie ciśnieniowej o nacisku przekraczającym 300 mm słupa Hg.

Różnice w wytrzymałości na ciśnienie wywierane na ściany naczyń pomiędzy aortami przechowywanymi i nieprzechowywanymi, nawet przy znacznie przekroczonym ciśnieniu fizjologicznym były nierejestrowalne.

Spadek wytrzymałości na zerwanie świadczy o tym, że parametry mechaniczne ulegają pogorszeniu podczas przechowywania w bezwodnym chlorku sodu. Jednak w warunkach *in vivo* kluczową rolę dla „przeżycia” przeszczepu pełni wytrzymałość na siły skierowane prostopadle do jego długiej osi, wywierane przez przepływ krwi w jego wnętrzu. Siły działające *in vivo* wzdłuż długiej osi naczyń są znacznie mniejsze. Dlatego wytrzymałość na rozciąganie ma znaczenie drugorzędne. Ponadto ich wartości zmierzone w trakcie doświadczeń *in vitro* znacznie przekraczały wartości występujące w warunkach *in vivo*.

We wszystkich układach doświadczalnych, bez względu na czas przechowywania i czas od przeszczepienia, aorty przechowywane w bezwodnym chlorku sodu wytrzymują ciśnienie wewnętrzne znacznie przewyższające ciśnienie fizjologiczne, a to uzasadnia ich zastosowania w klinice.

Ponadto ogromną zaletą aort przechowywanych w bezwodnym chlorku sodu była ich niska immunogenność. Immunogenność jest oceniana gęstością nacieków komórek jednojądrzastych biorcy. W przeszczepach ortotopowych nacieki z komórek zapalnych w obrębie warstwy środkowej i wewnętrznej obserwowalam jedynie w grupie aort nieprzechowywanych, przeszczepionych w układzie allogenicznym. Ilość komórek o fenotypie ED1⁺ i OX6⁺ (monocytów/makrofagów i komórek MHC II⁺), naciekających ścianę naczyń w grupie przeszczepów allogenicznych, wynosiła 6 komórek (średnia obliczeń z 5 pól o wymiarach 100x100μm). Komórek o fenotypie W3/13⁺ (leukocytów) było średnio o połowę mniej.

Dla aort przechowywanych w bezwodnym chlorku sodu bez względu na czas przechowywania i układ doświadczalny ilość komórek ED1⁺, OX6⁺ i W3/13⁺ w obrębie warstwy wewnętrznej i środkowej wynosiła od 0 do 2,5 komórek. Aorty

przechowywane w bezwodnym chlorku sodu odznaczały się statystycznie istotnie niższą immunogennością niż allogeniczne przeszczepy aort nieprzechowywanych. W przypadku przeszczepów syngenicznych aorty przechowywane w NaCl nie wywoływały żadnej, a grupie przeszczepów allogenicznych wywoływały znikomą reakcję odpornościową biorcy wokół przeszczepu.

Doświadczenia przeprowadzone przez Yamadę i współpracowników (2012) dotyczące przeszczepów mrożonych aort na modelu króliczym także wykazały, że w warstwie środkowej nacieki komórek jednojądrzastych biorcy zdarzają się sporadycznie. W tych doświadczeniach, podobnie jak ja w swoich, autorzy obserwowali, że warstwa środkowa naczyń mrożonych i przeszczepionych jest prawie całkowicie pozbawiona komórek mięśniowych - począwszy od 60 do 720 dnia po przeszczepieniu.

W całkowitej opozycji do tej pracy pozostają wyniki badań Moriyamy i współpracowników (2001), które miały na celu ustalenie, czy istnieją różnice w immunogenności naczyń świeżych, mrożonych i przechowywanych w glutaraldehydzie. Autorzy wykonali allogeniczne, podskórne wszczepienie szczurom szczepu LEW fragmentów aorty piersiowej świeżej (grupa 1), mrożonej (grupa 2) i przechowywanej w glutaraldehydzie (grupa 3). Zbadanie wielkości nacieków komórek jednojądrzastych biorcy w 7, 14, 28 i 56 dniu po wszczepieniu wykazało, że nie ma różnicy pomiędzy grupami 1 i 2, a jedynie w grupie aort przechowywanych w glutaraldehydzie nacieki były mniejsze.

Zbadano także immunogenność tętnic szyjnych mrożonych w temperaturze -150°C do -170°C i przeszczepianych na modelu owczym. Po 3 miesiącach od przeszczepienia okazało się, że w obrębie warstwy zewnętrznej zarówno tętnic mrożonych, jak świeżych, ma miejsce intensywny proces zapalny, dochodzi do utraty komórek mięśniowych i przerostu warstwy wewnętrznej [Nataf i wsp. 1995].

Wyniki tych doświadczeń sugerują, że najczęściej stosowana w klinice metoda przechowywania naczyń, jaką jest mrożenie, prowadzi do zachowania immunogenności przechowywanego naczynia, podczas gdy przechowywanie w NaCl tą immunogenność obniża.

W warstwie zewnętrznej we wszystkich grupach doświadczalnych liczebność wszystkich badanych przez mnie populacji komórek odpornościowych biorcy była większa niż w pozostałych warstwach. Wynika to z faktu, że w obrębie warstwy zewnętrznej występują, nawet w warunkach fizjologicznych tzw. „komórki rezydentne”

[Bigaud i wsp. 1999, Rossmann i wsp. 1999]. Nacieki wszystkich trzech badanych subpopulacji komórek również były istotnie statystycznie mniejsze w aortach przechowywanych w chlorku sodu w porównaniu do aort kontrolnych. Wyjątek stanowiła grupa aort przechowywanych przez 12 miesięcy, przeszczepionych na 3 miesiące w układzie allogenicznym, w której nacieki komórek OX6+ i ED1+ były porównywalne jak w nieprzechowywanych aortach allogenicznych, przeszczepionych na 6 miesięcy. Trudno jednak wyciągnąć wniosek, że immunogenność w tej grupie nie zmieniła się względem aort nieprzechowywanych, gdyż brak w moim modelu doświadczalnym grupy aort nieprzechowywanych przeszczepionych allogenicznie na ten sam okres czasu. Tak więc porównywane grupy nie korespondują ze sobą idealnie pod względem czasu obserwacji, co ma kluczowe znaczenie w badaniu nasilenia reakcji zapalnej.

Takie wyjaśnienie potwierdza również moja obserwacja, że aorty przechowywane przez 6 miesięcy i przeszczepione na 6 miesięcy wykazują istotnie statystycznie mniejszą immunogenność niż aorty nieprzechowywane, przeszczepione allogenicznie na dokładnie ten sam okres czasu. W grupie aort przechowywanych nacieki wszystkich 3 badanych subpopulacji komórek są znacznie mniejsze.

Obserwację, że aorty allogeniczne przechowywane w bezwodnym chlorku sodu, we wszystkich grupach doświadczalnych, po przeszczepieniu ortotopowym wykazują niższą immunogenność niż aorty przeszczepione natychmiast po pobraniu potwierdziłam w doświadczeniach polegających na podskórnym wszczepieniu aort w łapę szczura. Nacieki wokół przeszczepów aort przechowywanych w bezwodnym NaCl, bez względu na układ doświadczalny, pozostawały na poziomie nacieków w grupie nieprzechowywanych przeszczepów syngenicznych. Były również istotnie statystycznie mniejsze niż w aortach nieprzechowywanych, wszczepionych w układzie allogenicznym. Dodatkowo, masa podkolanowych i biodrowych węzłów chłonnych po podskórnym wszczepieniu aort w łapę była nieznacznie niższa w grupie aort przechowywanych w bezwodnym chlorku sodu, ale nie była to różnica istotna statystycznie.

Przechowywanie naczyń tętniczych w bezwodnym NaCl wydaje się oryginalną i pełnowartościową metodą o znaczeniu klinicznym, szczególnie do operacji rewaskularyzacyjnych w zakażonych tkankach. Przeprowadzone przez nas dalsze badania na tętnicach świni, a więc naczyniach o wymiarach podobnych do tętnic ludzkich, potwierdziły wyniki uzyskane w niniejszej pracy.

7 Podsumowanie

7.1 Aorty przechowywane, przed przeszczepieniem.

- 1) Aorty przechowywane w bezwodnym NaCl i przygotowane do przeszczepienia, zachowują prawie niezmienną budowę morfologiczną i ultrastrukturalną. Wyjątek stanowi częściowy brak komórek śródbłonna, co obserwowalam w naczyniach przechowywanych przez 3, 6 i 10 miesięcy.
- 2) Liczba komórek mięśniowych w warstwie środkowej była porównywalna w aortach przechowywanych i w aortach nieprzechowywanych. Struktura włókien elastynowych i kolagenowych w warstwie środkowej była zachowana bez względu na czas przechowywania.
- 3) Grubość warstwy wewnętrznej aort była nieznacznie, ale w sposób istotny statystycznie większa, niż w aortach kontrolnych natychmiast po pobraniu. Grubość warstwy środkowej i zewnętrznej aort przechowywanych i nieprzechowywanych była porównywalna.

7.2 Aorty przechowywane, po przeszczepieniu

- 1) Aorty przechowywane w bezwodnym NaCl po przeszczepieniu tętniły i pozostawały drożne nawet do 15 miesięcy po przeszczepieniu.
 - a) We wszystkich grupach przechowywanych i przeszczepionych aort zidentyfikowałam pojawienie się komórek śródbłonna naczyniowego wyściełającego warstwę wewnętrzną.
 - b) Liczba komórek mięśniowych w warstwie środkowej aort przechowywanych i przeszczepionych była obniżona w porównaniu do aort nieprzechowywanych.
 - c) Struktura włókien elastynowych i kolagenowych w warstwie środkowej aort przechowywanych i przeszczepionych była zachowana.
 - d) Grubość **warstwy wewnętrznej** aort po przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepieniu, zarówno w układzie syngenicznym jak i allogenicznym, była w sposób istotny statystycznie większa, niż w aortach kontrolnych natychmiast po pobraniu oraz większa, niż w przypadku aort nieprzechowywanych, przeszczepionych w układzie syngenicznym. Nie miało to jednak wpływu na drożność.

- e) Grubość **warstwy środkowej** aort po przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepieniu była w sposób istotny statystycznie niższa w stosunku do aort kontrolnych-nieprzechowywanych, nieprzeszczepionych oraz nieprzechowywanych i przeszczepionych.
- f) Grubość **warstwy zewnętrznej** aort po przechowywaniu w bezwodnym chlorku sodu i przeszczepieniu była w sposób istotny statystycznie większa, niż w aortach kontrolnych natychmiast po pobraniu, ale nie odbiegała od aort kontrolnych-nieprzechowywanych, przeszczepionych.
- 2) Wytrzymałość na ciśnienie wywierane na ściany naczyń we wszystkich badanych układach doświadczalnych, zarówno w przypadku aort przechowywanych w bezwodnym NaCl i przeszczepionych, jak i aort kontrolnych wynosiła powyżej 300mm Hg. W teście na rozciąganie (ang. tensile strength) parametry wytrzymałości mechanicznej przeszczepów naczyń przechowywanych w bezwodnym NaCl były niższe.
- 3) Aorty przechowywane w bezwodnym NaCl i przeszczepione odznaczały się niską immunogennością wywoływały jedynie niewielką reakcję immunologiczną wokół przeszczepów allogenicznych. Obserwacja ta znalazła potwierdzenie w przypadku podskórnych implantacji, gdzie zarówno nacieki wokół przeszczepów aort syn- i allogenicznych przechowywanych w bezwodnym NaCl, jak i reakcja regionalnych węzłów były minimalne.

8 Wnioski

Metoda długoterminowego przechowywania aorty szczura w odwodnionym sproszkowanym chlorku sodu pozwala na skuteczne jej przeszczepienie z zachowaniem struktury i hemodynamiki. Aorta allogeniczna tak przechowywana i przeszczepiona wywołuje jedynie śladową odpowiedź ze strony biorcy. Metoda ta, po przeprowadzeniu badań na dużych zwierzętach mogłaby być zastosowana do przechowywania tętnic ludzkich.

9 Piśmiennictwo

1. Allaire E, Bruneval P, Mandet Ch, Becquemin JP, Michel JB. The immunogenicity of the extracellular matrix in arterial xenografts. *Surgery* 1997;122(1):73-81.
2. Allaire E, Mandet Ch, Bruneval P, Bensenane S, Becquemin JP, Michel JB. Cell And Extracellular Matrix Rejection In Arterial Concordant And Discordant Xenografts In The Rat. *Transplantation* 1996;62(6):794-803.
3. Allaire E, Guettier C, Bruneval P, Plissonnier D, Michel JB. Cell-free arterial grafts: Morphologic characteristics of aortic isografts, allografts, and xenografts in rats. *Journal of Vascular Surgery* 1994;19(3):446-56.
4. Andriambelason E, Pally C, Hengerer B, Cannet C, Nikolova Z, Bruns C. i wsp. Transplantation-induced endothelial dysfunction as studied in rat aorta allografts. *Transplantation* 2001;72(12):1881-9.
5. Arnaud F. Endothelial and smooth muscle changes of the thoracic and abdominal aorta with various types of cryopreservation. *J Surg Res* 2000;89(2):147-54.
6. Avery RK. Cardiac-Allograft Vasculopathy *N Engl J Med* 2003;349(9):829-30.
7. Behrendt B, Ganz P, Fang J. Cardiac allograft vasculopathy. *Curr Opin Cardiol* 2000;15(6):422-9.
8. Bellón JM, Jurado F, De Miguel MP, Fraile B, Buján J. Long-term behavior of an arterial autograft: a new role for intimal hyperplasia? *Int J Microcirc Clin Exp* 1996;16(5):240-9.
9. Bigaud M, Schraa EO, Andriambelason E, Lobstein V, Pally C, Kobel T. i wsp. Complete loss of functional smooth muscle cells precedes vascular remodeling in rat aorta allografts. *Transplantation* 1999;68(11):1701-7.
10. Bisdas T, Wilhelmi M, Haverich A, Teebken OE. Cryopreserved arterial homografts vs silver-coated Dacron grafts for abdominal aortic infections with intraoperative evidence of microorganisms. *J Vasc Surg* 2011;53(5):1274-81.
11. 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.

12. Burg MB. Molecular basis of osmotic regulation. *Am J Physiol* 1995;268(6 Pt 2):F983-F996.
13. Clousee WD, Hallett JW Jr, Schaff HV, Gayari MM, Ilstrup DM, Melton LJ 3rd. Improved prognosis of thoracic aortic aneurysms: a population based study. *JAMA*. 1998;280(22):1926-9.
14. Conklin BS, Richter ER, Kreutziger KL, Zhong DS, Chen C. Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft. *Med Eng Phys*. 2002;24(3):173-83.
15. Corner JA, Berwanger CS, Stansby G. Preservation of vascular tissue under hypothermic conditions. *J Surg Res* 2003;113(1):21-5.
16. D'Agostino RB, Vasan SR, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M, Massaro M. i wsp. General Cardiovascular Risk Profile for Use in Primary Care: The Framingham Heart Study. *Circulation* 2008;117(8):743-53.
17. Dardik H, Ibrahim IM, Sprayregen S, Dardik I. Clinical experience with modified human umbilical cord vein for arterial bypass. *Surgery* 1976;79(6):618-24.
18. Dardik H, Ibrahim IM, Dardik I. The role of the peroneal artery for limb salvage. *Ann Surg* 1979;189(2):189-98.
19. Devine C, McCollum C. North West Femoro-Popliteal Trial Participants.: Heparin-bonded Dacron or polytetrafluorethylene for femoropopliteal bypass: five-year results of a prospective randomized multicenter clinical trial. *J Vasc Surg* 2004;40(5):924-31.
20. Dmitrieva NI, Burg MB. Hypertonic stress response. *Mutat Res* 2005;569(1-2):65-74.
21. Dmitrieva NI, Cai Q, Burg MB. Cells adapted to high NaCl have many DNA breaks and impaired DNA repair both in cell culture and in vivo. *PNAS* 2004;101(8):2317-22.
22. Dorigo W, Pulli R, Castelli P, Dorrucchi V, Ferilli F, De Blasis G. i wsp. A multicenter comparison between autologous saphenous vein and heparin-bonded expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) graft in the treatment of critical limb ischemia in diabetics. *J Vasc Surg* 2011;54(5):1332-8.
23. Ehsan A, Mann MJ, Dell'Acqua G, Dzau VJ. Long-term stabilization of vein graft wall architecture and prolonged resistance to experimental atherosclerosis after E2F decoy oligonucleotide gene therapy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;121(4):714-22.

24. Fahner PJ, Idu MM, van Gulik TM, Legemate DA. Systematic review of preservation methods and clinical outcome of infrainguinal vascular allografts. *J Vasc Surg* 2006; 44(3):518-24.
25. Fahner PJ, Legemate DA, van der Wal AC, van Marle J, Peters SL, van Eck CF, van Gulik TM. i wsp. Comparison of preserved vascular allografts using glycerol and University of Wisconsin solution in a goat carotid artery transplantation model. *Eur Surg Res* 2012;48(2):64-72.
26. Farber A, Major K, Wagner WH, Cohen JL, Cossman DV, Lauterbach SR. i wsp. Cryopreserved saphenous vein allografts in infrainguinal revascularization: analysis of 240 grafts. *J Vasc Surg* 2003;38(1):15-21.
27. Faxon DP, Fuster V, Libby P, Beckman JA, Hiatt WR, Thompson RW. i wsp. Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: pathophysiology. *Circulation* 2004;109(21):2617-25.
28. Fikar CR, Koch S. Etiologic Factors of Acute Aortic Dissection in Children and Young Adults. *Clin Pediatr* 2000;39(2):71-80.
29. FitzGerald SF, Kelly C, Humphreys H. Diagnosis and treatment of prosthetic aortic graft infections: confusion and inconsistency in the absence of evidence or consensus. *J. Antimicrob Chemother* 2005;56(6):996–9.
30. Fowkes FG, Housley E, Riemersma RA, Macintyre CC, Cawood EH, Prescott RJ. i wsp. Smoking, lipids, glucose intolerance, and blood pressure as risk factors for peripheral atherosclerosis compared with ischemic heart disease in the Edinburgh Artery Study. *Am J Epidemiol* 1992;135(4):331-40.
31. Gacko M, Płoński A, Ostapowicz R, Andrzejewska A, Guzowski A, Łapiński R. Allogenic arterial grafts in the treatment of patients with infected vascular grafts — the suggestion of a new way of allografts preservation. *Acta Angiol.* 2004;10(1):39–45.
32. 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.
33. Gao H, Sandermann J, Prag J, Lund L, Lindholt JS. Prevention of primary vascular graft infection with silver-coated polyester graft in a porcine model. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2010;39(4):472-7.

34. Gewartowska M, Olszewski WL. The new approaches to preservation of graft cell integrity in preservation for transplantation. *Ann Transplant* 2005;10(4):6-10.
35. Gutstein DE, Fuster V. Pathophysiology and clinical significance of atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovasc Res* 1999;41(2):323-33.
36. Han DW, Park YH, Kim JK, Jung TG, Lee KY, Hyon SH. i wsp. Long-term preservation of human saphenous vein by green tea polyphenol under physiological conditions. *Tissue Eng* 2005;11(7-8):1054-64.
37. Hu Y, Davison F, Zhang Z, Xu Q. Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells. *Circulation*. 2003;108(25):3122-7.
38. Hyon S-H, Kim D-H, Cui W, Matsumura K, Kim J-Y, Tsutsumi S. Preservation of Rat Aortic Tissue Transplant With Green Tea Polyphenols. *Cell Transplant* 2006;15(10):881-3.
39. Ishii Y, Kronengold RT, Virmani R, Rivera EA, Goldman SM, Prechtel EJ. i wsp. A novel bioengineered small caliber vascular graft with excellent one-month patency. *Ann Thorac Surg* 2007;83(2):517-25.
40. Ishii Y, Sakamoto S, Kronengold RT, Virmani R, Rivera EA, Goldman SM. i wsp. A novel bioengineered small-caliber vascular graft incorporating heparin and sirolimus: Excellent 6-month patency. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;135(6):1237-46.
41. Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology. Text and atlas.* 11th ed. McGraw-Hill, New York 2005:206-7.
42. Jayakrishnan A, Jameela SR. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. *Biomaterials* 1996;17(5):471-84.
43. Kannel WB, Agostino RBD, Sullivan L, Wilson PWF. Concept and usefulness of cardiovascular risk profiles. *Am Heart J* 2004;148(1):16-26.
44. Kaźmierski R. Udział czynników zapalnych i zakaźnych w patogenezie miażdżycy tętnic szyjnych *Polski Przegląd Neurologiczny* 2009;5(4): 166-176.
45. Kiechl S, Egger G, Mayr M. i wsp. Chronic infections and the risk of carotid atherosclerosis: prospective results from a large population study. *Circulation* 2001; 103(8):1064-1070.

46. Komorowska-Timek E, Zhang F, Shi DY, Lineaweaver WC, Buncke HJ.: Effect of cryopreservation on patency and histological changes of arterial isogeneic and allogeneic grafts in the rat model. *Ann Plast Surg.* 2002;49(4):404-9.
47. Langerak SE, Groenink M, van der Wall EE, Wassenaar C, Vanbavel E, van Baal MC, Spaan JA. Impact of current cryopreservation procedures on mechanical and functional properties of human aortic homografts. *Transpl Int.* 2001;14(4):248-55.
48. Lee TC, Midura RJ, Hascall VC, Vesely I. The effect of elastin damage on the mechanics of the aortic valve. *J Biomech* 2001;34(2):203–10.
49. Lemson MS, Tordoir JH, Daemen MJ, Kitslaar PJ Intimal hyperplasia in vascular grafts.. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000;19(4):336-50.
50. Lew W, Moore W. Antibiotic-impregnated grafts for aortic reconstruction. *Semin Vasc Surg.* 2011;24(4):211-9.
51. Loh SA, Howell BS, Rockman CB, Cayne NS, Adelman MA, Gulkarov I, Veith FJ, Maldonado TS. Mid- and long-term results of the treatment of infrainguinal arterial occlusive disease with precuffed expanded polytetrafluoroethylene grafts compared with vein grafts. *Ann Vasc Surg.* 2013;27(2):208-217.
52. Lusis A. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407(6801):233-41.
53. Luque A, Turu MM, Rovira N, Juan-Babot JO, Slevin M, Krupinski J. Early atherosclerotic plaques show evidence of infection by *Chlamydia pneumoniae*. *Front Biosci.* 2012;4:2423-32.
54. Marion A, Hofmann B, McNall EM. Genetic Pathways of Vascular Calcification *Trends Cardiovas Med* 2012;22(4):93–8.
55. Masson I, Fialaire-Legendre A, Godin C, Boutouyrie P, Bierling P, Zidi M. Mechanical properties of arteries cryopreserved at -80 degrees C and -150 degrees C. *Med Eng Phys* 2009;31(7):825-32.
56. Mennander A, Tiisala S, Halttunen J, Yilmaz S, Paavonen T, Häyry P. Chronic rejection in rat aortic allografts. An experimental model for transplant arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb* 1991;11(3):671-80.

57. Mitchell IM, Essop AR, Scott PJ, Martin PG, Gupta NK, Saunders NR. i wsp. Bovine internal mammary artery as a conduit for coronary revascularization: long term results. *Ann Thorac Surg* 1993;55(1):120–2.
58. Moriyama S, Utoh J, Sun LB, Tagami H, Okamoto K, Kunitomo R. i wsp. Antigenicity of cryopreserved arterial allografts: comparison with fresh and glutaraldehyde treated grafts. *ASAIO J* 2001;47(3):202-5.
59. Mukherjee D, Eagle KA. Aortic Dissection - An Update. *Curr Probl Cardiol* 2005; 30(6):287–325.
60. Nataraj V, Mortimer AJ. Endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *CEACCP* 2004;4(3):91-4.
61. Nieto FJ, Adam E, Sorlie P, Farzadegan H, Melnick JL, Comstock GW. i wsp. Cohort study of cytomegalovirus infection as a risk factor for carotid intimal–medial thickening, a measure of subclinical atherosclerosis. *Circulation* 1996;94(5):922–7.
62. Noszczyk W. Chirurgia tętnic i żył obwodowych. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1998.
63. Obońska K, Grąbczewska Z, Fisz J. Ocena czynności śródbłonna naczyniowego-gdzie jesteśmy, dokąd zmierzamy? *Folia Cardiologica Excerpta* 2010;5(5):292–7.
64. Olszewski WL, Moscicka M, Zolich D. Human skin long-term preserved in anhydric pulverized sodium chloride retains cell molecular structure and resumes function after transplantation. *Transplantation* 2006;81(11):1583-8.
65. Olszewski WL, Zolich D, Manokaran G, Tripathi MF. Sodium chloride fixation of tissues under field conditions in tropical countries. *J Immunol Methods* 2004;284(1-2):39-44.
66. Pascual G, Martinez S, Rodriguez M, Serrano N, Bellon JM, Bujan J. Patency and structural changes in cryopreserved arterial grafts used as vessel substitutes in the rat. *J Surg Res* 2005;124(2):297-304.
67. Pedersen G, Laxdal E, Ellensen V, Jonung T, Mattsson E. Improved patency and reduced intimal hyperplasia in PTFE grafts with luminal immobilized heparin compared with standard PTFE grafts at six months in a sheep model. *J Cardiovasc Surg* 2010; 51(3):443-8.

68. Pegg DE, Wusteman MC, Boylan S. Fractures in cryopreserved elastic arteries. *Cryobiology* 1997;34(2):183-92.
69. 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.
70. Pupka A, Frydecka I, Polak W, Skóra J, Kosmaczewska A, Szyber P. The Use of Allogenic Vascular Transplants in the Treatment of Prosthetic Infections in Relationship of the Storage of Allograft and Immunosuppression. *Adv Clin Exp Med* 2003;12(6):703-10.
71. Pupka A, Dolińska-Krajewska B, Pawłowski S, Szyber P. Immunosuppression in the Transplantation of the Fresh Arterial Homograft – Case Report. *Adv Clin Exp Med* 2004;13(2):371–4.
72. Pupka A, Blochem D, Chruściel P, Lepiesza A, Rojek A. Syntetyczne protezy wewnątrznaczyniowe stosowane w leczeniu rozwarstwienia aorty. *Polim Med* 2009;39(1):47-56.
73. Pupka A, Janczak D, Szyber PP. Protezy politetrafluoroetylenowe pokryte heparyną w zabiegach rewaskularyzacji kończyn dolnych. *Polim Med* 2010;40(1):9-15.
74. Rauch U, Osende JI, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, Chesebro JH. Thrombus Formation on Atherosclerotic Plaques: Pathogenesis and Clinical Consequences. *Ann Int Med* 2001;134(3):224-38.
75. Redwood AJ, Tennant M. Cellular survival in rat vein-to-artery grafts. *Cell Tissue Res* 2001;306(2):251-6.
76. Rendal E, Santos MV, Rodriguez M, Sánchez J, Segura R, Matheu G. i wsp. Effects of cryopreservation and thawing on the structure of vascular segment. *Transplant Proc* 2004;36(10):3283-7.
77. Ricco JB, Ojan Assadian O. Antimicrobial Silver Grafts for Prevention and Treatment of Vascular Graft Infection. *Semin Vasc Surg* 2011;24(4):234-41.
78. Roberts AH, Wee JT, Nightingale G, MacLeod AM, O'Brien BM. Glutaraldehyde-tanned microvascular grafts. *Br J Plast Surg* 1989;42(4):429-34.

79. Rossmann P, Lácha J. Ultrastructure of rat aortic grafts. *Folia Microbiol (Praha)* 1999;44(5):567-78.
80. Rykowski H. Choroby naczyń. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1990.
81. Salomon RN, Friedman GB, Callow AD, Payne DD, Libby P. Cryopreserved aortic homografts contain viable smooth muscle cells capable of expressing transplantation antigens. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;106(6):1173-80.
82. Sander D, Winbeck K, Klingelhöfer J, Etgen T, Conrad B. Enhanced progression of early carotid atherosclerosis is related to *Chlamydia pneumoniae* (Taiwan Acute Respiratory) seropositivity. *Circulation* 2001;103(10):1390–5.
83. Singh K, Bønaa KH, Jacobsen BK, Bjørk L, Solberg S. Prevalence of and Risk Factors for Abdominal Aortic Aneurysms in a Population-based Study. *Am J Epidemiol* 2001;154(3):236-44.
84. Stary HC, Handler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W. i wsp. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis. *Arterioscl Throm Vas* 1995;15(9):1512-31.
85. Takagi H, Goto SN, Matsui M, Manabe H, Umemoto T. A contemporary meta-analysis of Dacron versus polytetrafluoroethylene grafts for femoropopliteal bypass grafting. *J Vasc Surg* 2010;52(1):232-6.
86. Vischjager M, Van Gulik TM, Van Marle J, Pfaffendorf M, Jacobs MJ. Function of cryopreserved arterial allografts under immunosuppressive protection with cyclosporine A. *J Vasc Surg*. 1996;24(5):876-82.
87. Wollmann LC, Laurindo CA, Costa FD, Moreno AN. Effects of cryopreservation and/or decellularization on extracellular matrix of porcine valves. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2011;26(3):490-6.
88. Xu Y, Hua TC, Sun DW, Zhou GY. Experimental study and analysis of mechanical properties of frozen rabbit aorta by fracture mechanics approach. *J Biomech* 2008;41(3): 649-55.
89. Yamada A, Takahashi R, Toyama R, Okita Y. Acute regeneration and chronic acellular transformation of rabbit cryopreserved aortic allografts. *Acta Histochem Cytochem* 2012;45(3):177-86.

Streszczenie

Wstęp. Przeszczepy tętnicze są rutynową metodą przywracania ukrwienia w zarostowej miażdżycy powodującej obwodowe niedokrwienie kończyn dolnych. Najlepsze wyniki osiąga się przez użycie autologicznych przeszczepów żylnych jako pomost omijający miejsce niedrożności. W przypadku braku odpowiedniej żyły alternatywą jest użycie sztucznej protezy. Jednak w takim wypadku nierzadkim powikłaniem są zakażenia w łożysku przeszczepu wymagające zastąpienia protezy przeszczepem opornym na zakażenie. Zakażenie sztucznego przeszczepu jedynie w nielicznych przypadkach może być z powodzeniem leczone antybiotykami. W większości wypadków, zakażony przeszczep powinien być zastąpiony nowym, najlepiej przeszczepem biologicznym, nie przyciągającym bakterii i komórek odpornościowych biorcy. Zwykle do zastąpienia zakażonej protezy używane są mrożone tętnice z banków naczyń. Wykazują one jednak szereg niedoskonałości takich jak np. mała wytrzymałość mechaniczna oraz zachowana immunogenność. Ponadto przy przeszczepach naczyń krioprzechowywanych o małej średnicy wysoce problematyczne jest zachowanie drożności przeszczepu. Podobne wady mają przeszczepy przechowywane w glutaraldehydzie. Jako alternatywa do przeszczepów allogenicznych stosowane są także protezy sztuczne powlekanie jonami srebra o działaniu bakteriobójczym lub nasączone antybiotykami. Użycie takich protez nie zapewnia jednak równie dobrych wyników leczenia jak przeszczep biologiczny, bowiem ten nowy przeszczep jest obciążony ryzykiem ponownego rozwoju zakażenia i zapalenia w dawnym łożysku. Istnieje więc niewątpliwe zapotrzebowanie na inaczej niż dotychczas przechowywane tętnice ludzkie, tak by były one odporne na zasiedlanie przez mikroorganizmy, wytrzymałe mechanicznie i nadawały się do zastąpienia zakażonych sztucznych przeszczepów, a nawet do zastosowania jako przetoki hemodializacyjne.

W Zespole Kliniczno-Badawczym Chirurgii Transplantacyjnej IMDiK PAN poszukiwaliśmy metody przechowywania tętnic spełniającej te warunki. Jako środek do przechowywania zaproponowany został bezwodny sproszkowany chlorek sodu. Idea ta powstała w czasie prowadzenia przez nas badań nad zakażeniami kończyn dolnych w krajach tropikalnych, głównie Indiach, gdzie niedostępne były urządzenia do zamrażania pobranych do histopatologii tkanek. Postanowiliśmy zastosować odwodnienie osmotyczne pobranych tkanek za pomocą soli kuchennej.

W prowadzonych dotychczas przez nas badaniach sprawdzaliśmy wpływ przechowywania w bezwodnym chlorku sodu na różne typy komórek i tkanek. Prace prowadzone w naszym zespole wykazały, że skóra przechowywana w bezwodnym chlorku sodu zachowuje swoją strukturę molekularną i wywołuje jedynie niewielką reakcję w miejscu wszczepienia [Olszewski WL. i wsp. 2006]. Ta obserwacja skłoniła mnie do zbadania, czy taka metoda mogłaby być zastosowana do przechowywania tętnic, i tak jak wykazano na innych tkankach, pozwoli ona na:

- a) zachowanie niezmienionej struktury,
- b) zachowanie właściwości mechanicznych,
- c) obniżenie antygenowości umożliwiające ich allogeniczne przeszczepianie bez immunosupresji.

Postanowiłam przeprowadzić badania nad przeszczepianiem aorty przechowywanej w odwodnionym sproszkowanym chlorku sodu u szczurów w układzie allogenicznym, wszczepiając ją ortotopowo lub jako pomost, zapewniając pełny przepływ krwi do tylnej części ciała zwierzęcia. Zaplanowałam przechowywanie do 12 miesięcy oraz obserwacje po przeszczepieniu trwające podobny okres czasu.

Metody. Fragmenty szczurzej aorty były przechowywane w odwodnionym chlorku sodu przez okres do 12 miesięcy w temperaturze 4°C. Wykonano syngeniczne i allogeniczne przeszczepy aort na 3 do 15 miesięcy.

Po pobraniu aorty cięłam na skrawki o grubości 5µm i barwiłam hematoksyliną/eozyną, metodą trichrome Azan na obecność włókien kolagenowych i metodą Gomoriego na obecność włókien retikuliny oraz znakowałam przeciwciałami. Do identyfikacji komórek śródbłonka naczyniowego stosowałam przeciwciała anty- CD31, RECA-1 (HIS 52) oraz CD54. Znakowanie przeciwciałami anty- ED1 (CD68), OX6 (MHC II) i W3/13 (CD43) wykonywałam w celu monitorowania reakcji immunologicznej biorcy na przeszczep. Część materiału poddałam analizie ultrastrukturalnej z użyciem mikroskopii elektronowej. Oceniałam także wytrzymałość mechaniczną aort poprzez określenie dwóch parametrów: wytrzymałości na rozciąganie (ang. tensile strenght) oraz maksymalnego ciśnienia wewnątrznaczyniowego (badanie wytrzymałościowe w próbie ciśnieniowej).

Wyniki. Przeszczepy aort przechowywanych w bezwodnym chlorku sodu tętniły i pozostawały drożne do 15 miesięcy po transplantacji. Nie obserwowałam

zakrzepicy wewnątrz przeszczepu, jedynie nieznaczne pogrubienie neointymy. Barwienie metodami H/E i Trichrom Azan wykazały dobrze zachowaną strukturę anatomiczną, jedynie liczba komórek mięśniowych była niższa niż w aortach nieprzechowywanych. Nie było różnic pomiędzy aortami przechowywanymi i przeszczepionymi, a kontrolnymi syngenicznymi przeszczepami w znakowaniu na CD31, CD 54, RECA-1. Analiza w mikroskopie elektronowym wykazała nie zmienioną strukturę elastyny, obecność miofibroblastów między włóknami elastynowymi oraz pojedyncze komórki endotelialne. Nacieki komórek ED1, OX 6 i W3/13 pozytywnych w ścianie przeszczepionych naczyń były nieznaczne. W teście na rozciąganie (ang. tensile strength) parametry wytrzymałości mechanicznej przeszczepów naczyń przechowywanych w bezwodnym NaCl były niższe niż w przypadku aort nieprzechowywanych, jednak nie miało to wpływu na funkcjonowanie naczynia. Wytrzymałość na ciśnienie wywierane na ściany naczynia we wszystkich badanych układach doświadczalnych, zarówno w przypadku aort przechowywanych w bezwodnym NaCl i przeszczepionych jak aort kontrolnych wynosiła powyżej 300mm Hg.

Wnioski. Aorty przechowywane w bezwodnym chlorku sodu przez okres do 12 miesięcy po przeszczepieniu pozostały drożne i zachowały prawidłową budowę kolagenu i elastyny. Naczynia po przechowywaniu w NaCl charakteryzowały się znacznie niższą immunogennością niż nieprzechowywane naczynia allogeniczne. Ich wytrzymałość na zerwanie była niższa, jednak nie było różnic w wytrzymałości na ciśnienie wewnątrznaczyniowe pomiędzy grupami.

Przeprowadzone przeze mnie badania pokazują, że przechowywanie naczyń tętniczych w bezwodnym NaCl jest oryginalną i pełnowartościową metodą o znaczeniu klinicznym, szczególnie do operacji rewaskularyzacyjnych w zakażonych tkankach.

Summary

Background. Autologous venous grafts provide best results for arterial bypass grafting for arterial stenosis. In case of lack of suitable venous graft prosthesis which are easily accessible but susceptible to infection may be an alternative.

Unfortunately only in some cases such infection can be forced with antibiotics. In case of infection at the site of teflon implantation or a-v fistula for hemodialysis allografts become grafts of choice. The so far used cryopreserved human arteries have limited longevity and are mechanically fragile. Moreover, using cryopreserved allografts we have to face the problem of thrombosis and stenosis of the graft, especially in case of small diameter grafts. Similar defects have allografts preserved in glutaraldehyde. Also, the transplanted allogeneic arteries evoke immune reaction. That's why to obtain good long-term results in the case of both fresh and frozen allograft transplantation usage of immunosuppressive drugs is often necessary. As an alternative prosthesis coated with silver ions and antibiotics are used, but still, the results are not satisfactory. For this reasons, a method for successful long-term preservation of arterial allografts with strong mechanical endurance, low antigenicity, resistant to colonization by micro-organisms, and suitable for the replacement of infected synthetic grafts is needed.

In the Department of Surgical Research and Transplantology we have been looking for method of preservation the arteries that would meet these conditions. In our previous research we investigated how the preservation in anhydric sodium chloride would influence various types of tissues and cells. This idea arised while we were performing research on lower limbs infections in tropical countries, especially India, where the devices for freezing tissues collected for histopathology weren't easily accessible. We decided to apply the method of osmotic dehydration of tissues. We reported, that skin preserved in sodium chloride powder retains its molecular structure and evokes only minor reaction at the site of implantation [Olszewski i wsp. 2006]. This prompted me to investigate whether also arteries can be preserved in this fashion with:

- a) unchanged morphology,
- b) strong mechanical endurance and
- c) low antigenicity and successfully transplanted.

The aortae were implanted orthotopically or as a bridge to provide a full flow of blood to the back of the animal's body. The storage time was up to 15 months after transplantation and observations last a similar period of time.

Methods. Fragments of the rat aorta were stored in dehydrated sodium chloride for up to 12 months at 4°C and subsequently transplanted into syngeneic or allogeneic recipients for a period of 3 to 15 months. Then, 5 µm thick slides were prepared and routine hematoxyline/eosine, trichrome azan staining for collagen and Gomori staining for reticulin fibers were performed. In order to identify the presence of endothelial cells I performed immunostaining using antibodies against: CD31, RECA-1 (HIS 52) and CD54. To monitor host immune reaction against the graft I used antibodies anti: ED1 (CD68), OX6 (MHC II) i W3/13 (CD43). Ultrastructure of aortae specimens were evaluated using electronmicroscopy. The tensile strength and maximum intraluminal pressures were measured.

Results. Aortae preserved in anhydric sodium chloride and transplanted remained patent for up to 15 months after transplantation. I did not observe thrombosis, only a slight thickening of the neointima. Hematoxyline/eosine and trichrome Azan stainings, as well as electron microscopic studies displayed the preserved anatomical structure of transplanted aortae and revealed normal structure of elastin fibers, only the number of muscle cells were significantly lower in preserved and transplanted aortae than in non-preserved tissue. No significant differences between preserved transplanted and non-preserved aortae stained for CD31, CD54, RECA-1 were observed. I also observed only slight infiltration of ED1 (CD 68), OX6 (MHC clas II) and W3/13 (CD43) positive cells around the allografts and this immunological reaction was only weakly expressed. The maximum tensile strength was lower in the preserved and transplanted aortae than in freshly harvested and transplanted aortae, but it did not influenced functioning of the graft. The intraluminal pressures reached in both groups values of above 300 mmHg without rupture of the wall.

Conclusions. Aortae preserved in anhydric sodium chloride remain patent and function properly even 15 months after transplantation. Their tensile strength was lower, however, there was no difference in intravascular pressure strength between groups. These observations suggest that preservation in NaCl may serve as a novel method to obtain arterial allografts of low immunogenicity required specifically for revascularization surgery in infected tissues.