Biomechanikai és koagulációs aspektusok a vascularis graftkutatásban

Doktori tézisek

Dr. Molnár Gábor Ferenc

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

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

Hivatalos bírálók:
Dr. Galambos Barnabás főorvos, Ph.D.
Dr. Kóbori László egyetemi tanár, Ph.D.
A szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Szollár Lajos egyetemi tanár D.Sc.
A szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Jámbor Gyula főorvos, Ph.D.
Dr. Meskó Éva főorvos, Ph.D.
Dr. Sándor Tamás főorvos, Ph.D.

Budapest
2014

1. BEVEZETÉS

A *biológiai* érpótló anyagok közül a megfelelő minőségű autológ vénák felhasználása a perifériás és centrális rekonstrukcióban rutinszerű. Megfelelő autológ graft hiányában a homograft jelent választható alternatívát. A *vascularis homograftok* előnyei a jó biomechanikai profil, a fertőzésekkel szembeni magas ellenálló képesség, továbbá hogy infrainguinalis, distalis rekonstrukciónál is használhatók. Cadaverből vagy többszerv donoroktól megfelelő számú graft gyűjthető, szövetbankban tárolható és széles körben –akár más intézményben is– felhasználható a későbbiekben. Hátrányuk, hogy immunválaszt válthatnak ki, idővel degenerálódhatnak és megfelelő tárolási feltételeket igényelnek.

Fontos cél, hogy a graftok tárolása minél hosszabb időn át, költséghatékony és egyszerű módon legyen lehetséges. Legelterjedtebben erre a szövetek mélyfagyasztott tartósítása és tárolása ad lehetőséget. A folyamat azonban műszerigényes és költéges. Ezért az utóbbi időben újra előtérbe kerültek az egyszerű, hideg anoxiában, 4°C-on történő tárolás lehetőségei.

A hideg anoxiában történő tárolás egy egyszerű, kevéssé műszerigényes, ennek következtében olcsóbb eljárás. Ugyanakkor a fagyási sérülések az intracelluláris kristályosodás káros hatásai csakúgy, mint a DMSO vélhető citotoxikus hatásai elkerülhetők. A 4 C^o-ra hűtés általánosan elfogadottnak mondható a transzplantálandó szövetek/szervek metabolikus igényeink csökkentése érdekében. Az intra- és exracelluláris sérülések megelőzésével a szövet viabilitási és biomechanikai tulajdonságai megőrizhetők, ami nagymértékben segítheti a beültetett graftok hosszútávú működését.

Galambos és mtsai. metil-tetrazolium redukciós teszttel vizsgálták a vena saphena magna (VSM) minták életképességét, 6 heti szövetkultúra médiumban (TCM) történő hűtött tárolást követően, és azt találták, hogy a graft viabilitása kb.60 %-os, ami megfelel a mélyfagyasztás és felolvasztás után tapasztaltakkal.

A tárolt graft tulajdonságai közül a leginkább vizsgáltak a biomechanikai, viabilitási, hisztológiai és koagulációs tulajdonságok. Elfogadott álláspont, hogy érgraftok esetén a beültetéskor fennálló

biomechanikai tulajdonságok kritikus fontosságúak a rövid és hosszú távú nyitva maradás, azaz a későbbi graftfunkció szempontjából.

Ma a verőér rekonstrukcióban leggyakrabban *szintetikus* pótlóanyagok a Dacron® (polyethylene terepthalate-PET) és a Gore-Tex® (expanded polytetrafluoroethylene-ePTFE) használatosak. Előnyük, hogy kívánt méretben egyszerűen beszerezhetők, jól kezelhetők. Hátrányuk, hogy költségesek, testidegenek, fertőzésre és elzáródásra hajlamosak, a fiziológiástól eltérő biomechanikai tulajdonságokkal rendelkeznek, merevek.

A *kombinált* graftoknál az a cél, hogy az előnyös biológiai és szintetikus tulajdonságokat ötvözzék; ide sorolhatók a különböző impregnációs eljárásokon (albumin, kollagén, antibiotikum, ezüst) átesett Dacron alapú graftok. Itt kell azonban megemlíteni azokat a biológiai vagy szintetikus eredetű mechanikai stabilitást biztosító vázszerkezeteket (kollagén, cellulóz, hydrogel, stb.), amelyekre simaizomsejt és endothel sejtkultúrák felvitelével mintegy élő, funkcionálisan is közel teljes értékű, működőképes érszakasz kreálható elméletben. Ez utóbbira jó példa a bakteriális cellulóz alapú műér, amelynek koagulációs és mechanikai vizsgálatai az utóbbi években történtek Svédországban.

A bakteriális cellulóz (BC) hydrophil természetű, magas (99%) víztartalmú, de vízben oldhatatlan anyag, melyet az *Acetobacter Xylinum* szintetizál és extracellulárisan szekretál. A gyártási eljárás során több tulajdonság befolyásolható, mint pl. a pórusnagyság, a felszín vagy a különböző rétegek sajátosságai. Mechanikai tulajdonságai hasonlóak a sertés carotis artériájához. Compliance görbéje a piacon fellelhető szintetikus anyagok közül leginkább követi az artériákét.

A graft integrációja a gazdaszervezetbe kritikus fontosságú a műérkutatásban. A BC kiváló integrációs tulajdonságairól, a gyulladásos és idegentest reakció hiányáról számolnak be, állatkísérletes modellben subcutan és carotis pozícióban is. Ebből fakadóan a BC ígéretes érpótló anyagnak tekinthető.

2. CÉLKITŰZÉSEK

I. A coronaria bypass műtétek során felhasználandó (friss) humán vena saphena magna morfológiai és biomechanikai vizsgálata.

II. Az explantált vena saphena magna 1, illetve 2 héten át normal Krebs-Ringer (nKR) oldatban, 4 °C fokon történő steril tárolásának morfológiai hatásai, továbbá aktív és passzív biomechanikai tulajdonságainak vizsgálata.

III. Az X-VIVO™ 10 médiumban 1, 2, 3, 4 hétig, 4 °C fokon sterilen tárolt szegmentumok biomechanikai sajátosságainak értékelése, és ennek összevetése a nKR-ben tárolt mintákkal.

IV. A vena saphena magna krioprezervációja és felolvasztása során végbemenő biomechanikai változások összehasonlítása a 4 °C fokon tárolt graftok tulajdonságaival.

V. Az különböző tárolási feltételek esetén fellépő hisztológiai változások szisztematikus értékelése, továbbá az érfal makromolekuláris permeabilitásának vizsgálata a kolloidális vas (Ferrlecit®) transmuralis diffúziójának értékelésével.

VI. A bakteriális cellulóz mint lehetséges érpótló anyag és a leggyakrabban használt vascularis graftok (pro)koagulációs tulajdonságainak vizsgálata és összehasonlítása új módszer kifejlesztése révén.

3. MÓDSZEREK

3.1 A vena saphena magna gyűjtése, és tárolása

A mérésekhez felhasznált vénákat a coronaria bypass műtétre kerülő páciensektől gyűjtöttük, a műtét befejeztével a kimaradó véna szakaszt –amennyiben az legalább 40mm hosszú volt– használtuk fel további vizsgálatainkhoz. Az anyagyűjtést, tárolást és további biomechanikai, szövettani feldolgozást TUKEB engedéllyel(123/2006) végeztük. Összesen 32 betegtől származó 72 véna szegmentumot vizsgáltunk. 8 különböző csoportot határoztunk meg.

- Friss szegmentumok a kivétel után közvetlenül mérésre kerültek. **/friss, n=14/**
- Hűtött (0-4°C) nKRoldatban 1 hétig tárolt minták.

  /nKR-1hét, n=10/
- Hűtött (0-4°C) nKRoldatban 2 hétig tárolt minták.

  /nKR-2hét, n=8/
- Hűtött (0-4°C) X-VIVO™ 10 oldatban 1 hétig tárolt minták. **/Xvivo-1hét, n=8/**
- Hűtött (0-4°C) X-VIVO™ 10 oldatban 2 hétig tárolt minták. **/Xvivo-2hét, n=8/**
- Hűtött (0-4°C) X-VIVO™ 10 oldatban 3 hétig tárolt minták. **/Xvivo-3hét, n=8/**
- Hűtött (0-4°C) X-VIVO™ 10 oldatban 4 hétig tárolt minták. **/Xvivo-4hét n=8/**
- Négy hétig krioprezervált és felolvasztott minták esetében. **/Cryo, n=8/**

A normál Krebs-Ringer oldatot a legtöbb esetben szállító és két csoportban tároló médiumként használtunk, illetve ez volt a mechanikai tesztelés során a szervfürdő alapösszetevője is. Ennek összetétele: 119 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 NaH_2PO_4, 2.5 $CaCl_2$, 1.2 $MgSO_4$, 24 $NaHCO_3$, 5.5 glukóz és 0.02 EDTA mmol/L-ben kifejezve.

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

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

Az explantált véna szegmentumok krioprezervációját a Városmajor utcai Szív és Érsebészet Klinika protokolljának megfelelően végeztük. A mintákat először antibiotikum tartalmú Ringer-laktát oldatba helyeztük, krioprtektánsként fokozatosan DMSO-t adtunk hozzá, míg el nem értük a 10%-os koncentrációt. Körülbelül 20 perc szobahőmérsékleten végzett equilibratio után a mintákat a programozott mélyfagyasztó készülékbe helyeztük és -40°C eléréséig 1°C/perc hűtési sebességgel, majd ezt követően a -150°C hőmérséklet eléréséig 5°C/perc hűtési sebességgel fagyasztottuk. Ezután a mintákat folyékony nitrogén gőzében tároltuk (-140/-150°C) négy hétig. A felolvasztásnál a gyors protokollt használtuk, azaz a mintákat 37°C fokos fürdőbe merítettük.

3.2. Az in vitro biomechanikai tesztelés

A vénákat sztereomikroszkóp alatti óvatos preparálással készítettük elő a mérésre, eltávolítva a kötő- és zsírszövetet. Ezután 37 °C-os nKR szervfürdőbe helyeztük, amiben 95% O_2 és 5% CO_2 gázt buborékoltattunk. Az angiométer szervfürdőjében a szegment mindkét végét kanüláltuk, majd a feszítetlen hossz 10%-ával nyújtottuk, hogy a fiziológiás in vivo axiális hosszt szimuláljuk. Az intraluminális nyomást egy infúziós pumpa (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA), és egy rezervoir segítségével állítottuk be az adott értékekre. A szegmentum középső részét látótérbe hoztuk egy videomikroszkóppal, ami egy Leica mikroszkópból, egy Philips analóg videókamerából és Cole-Palmer száloptikából épült fel.

A szegmentum képe megjelent a képernyőn, majd az érszakasz külső és belső átmérője mérhetővé vált egy analog minicomputer segítségével az egyes mérési pontok kézi beállításával. A kalibrációkat Wild mikrométer segítségével végeztük.

Az érszakaszok első lépésben preinkubáción estek át 30 percen keresztül 10 Hgmm-es intraluminális nyomáson. Ezt követően a nyomást lépésről lépésre (7,5 Hgmm-ként) emeltük 0-85 Hgmm között, minden egyes mérési ponton/nyomáson 2 percnyi equilibráció után olvastuk le a mérési pontok távolságát. A mérési folyamatot megismételtük 10 µM norepinephrin jelenlétében, majd ezt követően Ca^{2+}mentes Krebs-Ringer oldatban 150 Hgmm eléréséig. Végezetül nyomáspróbát hajtottunk végre 300 Hgmm-es nyomáson és regisztráltuk az esetleges szivárgást.

3.3 Biomechanikai számítások

A belső átmérő méréséhez egy speciális száloptikát használtunk, de ezt nem regisztráltuk minden egyes mérési pontnál. Emiatt a belső átmérő értékére a külső átmérő változásaiból következtettünk, az érfal isovolumetriás tulajdonságából kiindulva.
A tangenciális feszülést a Frank-Starling egyenlőség alapján számítottuk ki:

- $\sigma = p*r_i / h$ *ahol* p az intramurális nyomás, az r_i a belső sugár, a h pedig az érfal vastagsága.

Számoltuk az inkrementális disztenzibilitást:

- $D_{inc}=\Delta V/(V*\Delta p)$, *ahol* D_{inc} az inkrementális disztenzibilitás, V a kiindulási térfogat, ami Δp mértékű nyomásváltozás hatására, ΔV térfogatáváltozást okoz a lumenben.

Az inkrementális elasztikus modulust a következő egyenlet felhasználásával számoltuk:

- $E_{inc} = 2r_i^2 * r_o/(r_o^2 - r_i^2) * (\Delta p/\Delta r_o)$ *ahol* r_i és az r_o az érfal belső és a külső sugara, Δr_o pedig a külső sugár változása a Δp nyomásváltozás hatására.

A mintákban létrejövő kontrakciót minden egyes nyomás-értéken a belső átmérő teljesen relaxált állapothoz viszonyított százalékos változásaként értékeltük. A statisztikai értékelést egy és kétváltozós ANOVA-val végeztük, illetve egyes esetekben a

korrelációs koefficienst is meghatároztunk. A $p<0,05$ értéket fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak.

3.4 Szövettani feldolgozás

A biomechanikai feldolgozás kiegészítéseként a Semmelweis Egyetem Igazságügyi Orvostani Tanszékének segítségével a különböző módszerek szerint tárolt minták rutin szövettani feldolgozására és értékelésére is sor került.

A szövettani mintákat 10%-os pufferolt formalinban rögzítettük, ezt követően rutin feldolgozás szerint paraffin beágyazás után 4µm vastagságú metszetek készültek. A metszetek részletes morfológiai értékeléséhez az alábbi festési eljárásokat használtuk:

- *Hematoxilin-eosin (HE)*
- *Orcein festés*
- *Foszfor-volfrámsavas hematoxilin*
  *(**p**hosphot**u**ngstic **a**cid **h**aematoxylin - PTAH)*
- *Trikróm (Mallory) festés*

A morfológiai értékelésen túl célul tűztük ki a különböző körülmények között tárolt érgaftok szöveti intaktságának vizsgálatát. Ennek fontos funkcionális jellemzője a vascularis permeabilitás, ami vas-kolloid (Ferrlecit®) érfalba történő diffúziójával vizsgálható. A Ferrlecit® nátrium-vas (III)-glükonát komplex formájában forgalmazott vaspótló készítmény, stabil makromolekuláris komplex, aminek molekuláris tömege 289,000 - 440,000 Dalton közé esik.

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

- *Perls-féle berlini-kék reakció*: amelyet a kolloidális vas kimutatására használtuk.

Hipotézisünk szerint a diffúzió mértéke korrelál a tárolás során végbemenő szöveti dezintegráció mértékével, és a következményes membránkárosodással, és így a berlini-kék reakció eltérő mintázatot mutat a különböző tárolási körülmények függvényében.

3.5 Koagulációs vizsgálataink konvencionális vascularis graftokon és a bakteriális cellulózon, a thrombin és az aktivált XII. faktor keletkezésének mérése

A nem thrombogén bioanyagok fejlesztése, valamint a thrombogenitás csökkentésére irányuló felszíni módosítások jelentik az egyik legnagyobb kihívást a vascularis graftok esetében. Annak ellenére, hogy az elmúlt több mint 30 évben intenzív kutatás folyt ezirányban, továbbra sincs megbízható polymer alapú szintetikus graft, ami az 5 mm-nél kisebb átmérőjű graftokat illeti. Ma műérként leggyakrabban használt anyagok ePTFE és a PET, elzáródásának elsődleges oka az intima hyperplasia, ami a merev műerek és a rugalmas artériák közötti compliance különbségre vezethető vissza. A grafton keresztüli afiziológiás véráramlásért a jelenleg használt merev anyagok és a felszín thrombogén tulajdonságai együtt tehetők felelőssé.

A munkánk célja az volt, hogy olyan új metódust fejlesszünk ki, amely alkalmas a vascularis graftok (pro)koaguláns tulajdonságainak összehasonlítására, illetve az új módszert felhasználva összevessük a bakteriális cellulóz és a jelenleg leggyakrabban használt graftok PET (Dacron®) és ePTFE (GORE-TEX®) felszíni tulajdonságait. Thrombin termelődési módszert (thrombin generation assay) módosítottuk és adaptáltuk, hogy a felszín-indukált koagulációt mérhessük, illetve a koaguláció láthatóvá tételére egy egyszerűsített színkódolt módszert alkalmaztunk.

A választott graftokból 7 mm átmérőjű körlapokat vágtunk ki, amelyeket 96 lyukú lapos aljú ELISA tálcákba helyeztük a luminális felszínükkel felfelé. Ezt követően ezeket egy előkezelt szilikon vagy gumigyűrűvel az fenékhez rögzítettük. A thrombin képződési kísérlet a *Hemker* által korábban leírt metódus szerint történt, azzal a különbséggel, hogy mi nem alkalmaztunk hozzáadott szöveti faktort vagy phospholipid aktivátort, hanem a jelen levő érpótló anyag egységnyi felszíne aktiválta a koagulációt. Minden mintához 80 µl vérplazmát (platelet-free plasma, PFP) és 20 µl foszát pufferolt sóoldatot (phosphate buffered saline, PBS) mértünk. Minden mintához tartozott egy kalibráció is, ami 80 µl PFP és 20 µl Thrombin Calibrator (Throbinoscope BV, Hollandia) együtteséből tevődött össze. Ezeket és a kontrollként használt,

graftfelszín nélküli, kezelt gumigyűrűt tartalmazó mintákat is együtt futattuk. A thrombin termelődés megindításához Fluo-puffert (Throbinoscope BV) fluoreszcens szubsztráttal kevertünk össze DMSO-ban, majd ebből a keverékből 20 µl adtunk minden egyes mintához. Minden mérésnél háromszoros mintaszámmal dolgoztunk. A fluoreszcenciát spektrofotométerrel ex: 390nm és em: 460nm mértük 20 másodpercenként. Meghatároztuk a thrombin keletkezéséig eltelt időt (lag time), az endogén thrombin potenciált (ETP), amit a kapott görbe alatti terület számolásával kaptunk, továbbá a thrombin keletkezésének maximális sebességét (peak) és az addig eltelt időt (time to peak). Az előbbiekben leírt módszerrel mértük a graft felszínen keletkező aktivált XII. faktor mennyiségét is, azzal a különbséggel, hogy itt a fluorescens szubsztrát más volt. Itt négyszeres mintaszámmal végeztük a spektrofotometriás mérést.

A különböző graftfelszíneken indukált koaguláció mérésére és összehasonlítására a véralvadás láthatóvá tételével nyílt lehetőség. Így a koaguláció iniciatív, illetve propagációs fázisának összehasonlítása is megvalósul. Annak érdekében, hogy a 4,5 ml-es spektrofotometriás (polimetilmetakrilát-PMMA) küvettába töltött vérplazma (PFP) kizárólag a graft luminális felszínével érintkezhessen, a szerző által tervezett acélrögzítőket gyártattunk, amiket 0,1% (w/v) poly-L-lysine vizes oldattal (Sigma-Aldrich) kezeltünk, ezzel elkerülve a koaguláció acélrögzítő általi aktiválását. A küvettákat fehér fényt kibocsátó LED lápákkal világítottuk meg.

Time-lapse felvételeket készítettünk párhuzamosan az összes vizsgált mintáról. Majd rövid filmet készítettünk belőle, mint egy gyorsított felvételt. A koaguláció detektálását a videón a vérplazmában jelentkező fényintenzitás erősödés alapján végeztük, amit az oldhatatlan fibrin hálózat kialakulása váltott ki. Az fény intenzitás alapján egy egyszerűsített színkódolás történt, így láthatóvá téve a koaguláció térbeli és időbeli eloszlását.

Az egyes fényképek analízisével számoltuk a felszíni koagulációs időt (iniciatív), majd ezt követően a vérplazma (graftfelszíntől távolabb eső) koagulációját (propagáció).

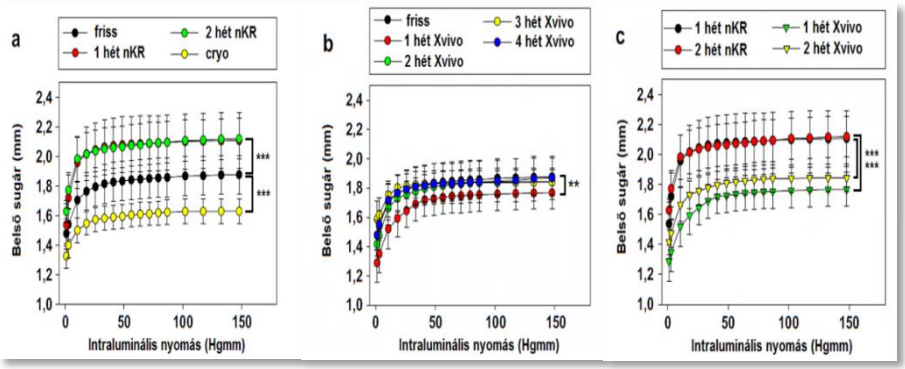
4. EREDMÉNYEK

4.1 A véna saphena magna biomechanikai változásai

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

Az *hideg nKR-ben* történt tárolás tágulást idézett elő az ellazult (relaxált) állapotban lévő érszegmentekben, ugyanakkor a falvastagság nem változott. A *1. ábra* a különböző ideig más-más médiumban tárolt friss, illetve krioprezervált minták nyomás-átmérő görbéit mutatja.

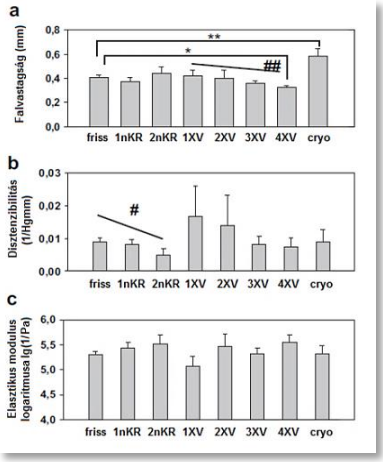
Mind az nKR-ben tárolt átmérő növekedés, mind a krioprezervált mintáknál mért kisebb szegmentátmérő a friss (kontroll) csoporthoz képest szignifikáns (p<0,001) eltérést mutatott. A kontroll csoport belső átmérője 1,70±0,12mm volt 10 Hgmm nyomásértéken és 1,98±0,15mm-re emelkedett a tárolási időszak végére nKR oldatban. (*1/a. ábra)* Ugyanakkor a falvastagság nem változott számottevően. *(2/a. ábra)*



1. ábra

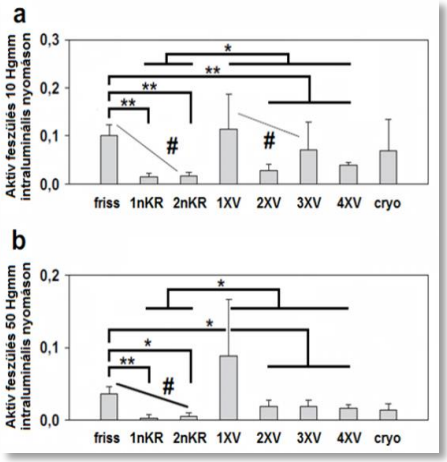
Eltérő módon tárolt VSM szegmentumok geometriai tulajdonságainak változásai a szegmentumok belső sugár – intraluminális nyomás jelleggörbéi alapján.

a, friss, 1,2 hét nKR tárolt és krioprezervált minták; **b,** friss és különböző ideig X-VIVO™10 oldatban tárolt minták; **c,** különböző oldatokban 1,2 hétig tárolt graftok jelleggörbéinek összehasonlítása (kétváltozós ANOVA **p<0,01***p<0,001)



2. ábra

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



3. ábra

Különböző módon tárolt VSM szegmentumok kontrakciós tulajdonságainak változása két nyomásszinten

Mérsékelt, de statisztikailag szignifikáns csökkenés mutatkozott az izobárikus disztenzibilitás ($8.9\pm1.3\times10^{-3}$ szemben $4.9\pm1.9\times10^{-3}$ 1/Hgmm) tekintetében *(2/b. ábra)*. Ugyanakkor az elasztikus modulus változatlan maradt *(2/c. ábra)*. A maximális koncentrációjú norepinephrinnel kiváltott kontrakciós képesség közel teljes mértékben megszűnt 1 hetes nKR oldatban végzett tárolás után a friss szegmentumokhoz viszonyítva (1.6±0.8%-ra csökkent a kiindulási 10.1±1.5% értékről, $p<0.01$). Felolvasztás és inkubáció után a *krioprezervált minták* csökkent lumen méretet és megnövekedett falvastagságot mutattak (586±56 µm), szemben a kontroll csoportban mért értékkel (408±17 µm, $p<0.01$) relaxált szegmentumok esetén, 10 Hgmm intraluminális nyomáson. Elasztikus tulajdonságait jórészt megőrizte és a kontrakciós képességét sem vesztette teljesen el *(1/a.2/c. 3/a,b. ábra)*.

A *szövet kultúra médiumban tárolt véna szakaszok* biomechanikai tulajdonságai szignifikánsan különböztek az nKR oldatban tárolt szegmentekétől. A tárolás kezdetén átmérő csökkenést tapasztaltunk, szemben az nKR oldatban tárolt szegmentumok dilatatiojával. Az X-VIVO™ 10 tápfolyadékban

történő tárolás a lumen méretét a 2-4 hét között nem befolyásolta *(1/b. és 1/c. ábra)*.

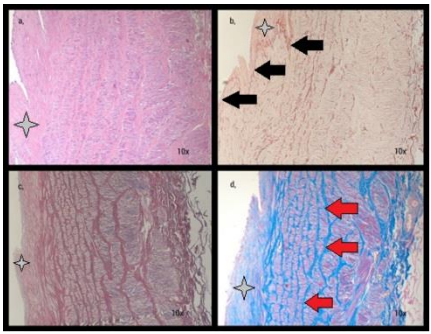
Figyelemre méltó, hogy a passzív nyomásgörbe 2 hét tárolás után is majdnem tökéletes mása volt a friss szegmenteknél mért görbének *(1/b. ábra)*. Ezeknél a mintáknál, ellentétben a mélyfagyasztott szegmentumokkal, a falvastagság fokozatosan csökkent a tárolási idő előrehaladtával (a korrelációs koefficiens szignifikancia szintje $p < 0.01$). Az nKR-ben tárolt szegmentumoktól eltérően, a mélyfagyasztott mintáknál az elaszticitás változása nem ért el szignifikáns szintet.

Megállapíthatjuk, hogy az X-VIVO™ 10-ben tárolt szegmentumok relatíve jól megőrizték a kontrakciós képességüket: ugyan a tárolás során ez folyamatosan csökkent, de a megfelelő nKR szegmentekhez viszonyítva szignifikánsan jobb kontrakciós képességet őriztek meg ($p<0,05$), mind 10 Hgmm, mind 50 Hgmm intraluminális nyomásértéken *(3/a. és 3/b. ábra)*.

4.2 Morfometraiai eredmények

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

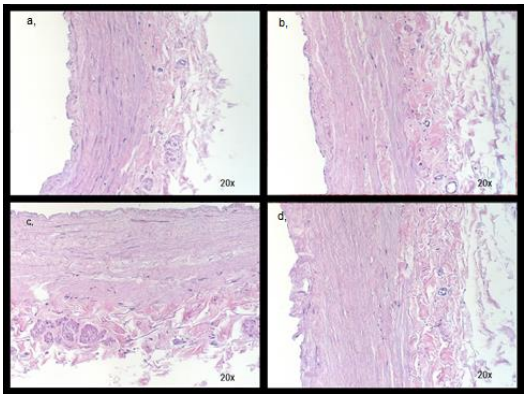
A vizsgált vénák nagy egyéni különbségeket mutattak, döntő többségükben az intima kiszélesedése volt megfigyelhető már a friss



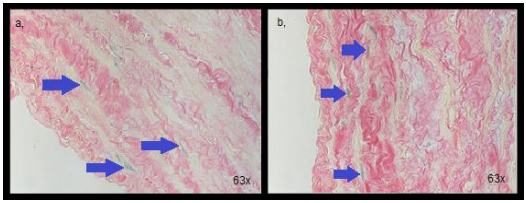
4. ábra
Ugyanazon betegből származó friss vena saphena magna (hosszmetszet) HE (a), orcein (b), PTAH (c) és trikróm festéssel (d), 10x –es nagyításban.
Az intima kiszélesedett(✧), a lamina elastica interna egyenetlen (🡐). A tunica mediában a simaizomsejtek között kötőszövet szaporulat látható(🡐).

mintáknál is. A véna falakban kezdettől fogva megfigyelhető volt a fibrotikus-kötőszövetes átalakulás is.

Az erek morfológiai analízise kétféle oldatban kivitelezett tárolás és a fent leírt festés(ek) után történt, ahol az idő függvényében jellegzetes szöveti jelek, elváltozások alakultak ki az érfal károsodását mutatva. Ezen kívül az idő függvényében a rugalmas rostok töredezése, fragmentálódása is jól követhető volt. Az értékeléshez használt festési eljárásokat a *4. ábra* mutatja be friss minták esetében.



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



6. ábra
Berlini-kék pozitivitás az intimában és a média felső középső rétegében (➔), 63x-os nagyításban.

A morfológiai vizsgálatakor értékeltük az endothel belfelszínt (tunica intima), a lamina elastica internát, a simaizom réteget (tunica media), illteve az intramuralis oedema fokát.

A friss mintáknál általánosságban elmondható, hogy az intima gócosan enyhén kiszélesedett, a lamina elastica interna egyrétegű, hullámos morfológiájú, az izomréteg megtartott. Helyenként az elasztikus rostok száma megnövekedett, az oedema

mértéke enyhe volt. Értékelhető berlini-kék reakciót csak egyes esetekben tapasztaltunk.

A nKR oldatban 1 és 2 hétig hűtve tárolt minták esetén az intima gócosan enyhén vagy mérsékelten kiszélesedett. A rugalmas lemez 1 hét után egy rétegű hullámos morfológiát, míg 2 hét tárolás idő után, több helyen töredezettséget mutatott. A tunica media szerkezete fellazult és megnyúlt, az oedema mértéke enyhe vagy mérsékelt volt. A mélyfagyasztott és felolvasztott vena specimenek esetében az intima körkörösen, egyenetlenül kiszélesedett, benne helyenként fibrotikus plakkokkal. A rugalmas lemez helyenként töredezett. A tunica mediában vizenyősen fellazult szerkezetet és az izomsejtek között enyhe fibrosist találtunk.

Az X-VIVO™ 10 tápkultúrában hűtve tárolt szegmentumok esetén az intima változatlan, gócos enyhe kiszélesedést mutatott 1, 2, 3, 4 hét elteltével is. A lamina elastica interna már 1, illetve 2 hetes tárolás után hullámos, helyenként töredezett morfológiát mutatott, ami 3, illetve 4 hét után egyre halványabban festődik és nehezen elkülöníthető. A tunica média egyeneműsödő szerkezetet és halvány festődést mutatott mind 1, 2, 3 és 4 hetes tárolás után is, az oedema mértéke mérsékelt volt *(5. ábra)*.

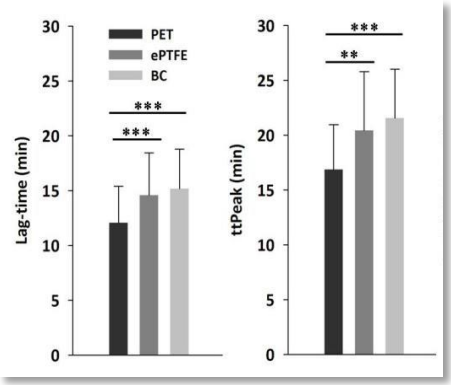
A 8 vizsgált csoportban elvégzett szövettani értékelés alapján elmondható, hogy a minták szerkezetüket tekintve nagy egyéni különbségeket mutatnak, pathológiás elváltozások gyakorta megfigyelhetők mind a tunica intimaban, mind a tunica mediában.
Az nKR-ben és a tápfolyadékban végzett tárolás hasonló szöveti károsodást eredményezett. Azonban az nKR-ben tárolt minták esetén a tunica media, oedemassá vált, míg X-VIVO tárolás esetén, akár 4 hét múltán is az oedema meréke enyhe maradt.

A vas kolloid diffúziós vizsgálat egyes friss mintákban is adott pozitív reakciót. Ez azt jelzi, hogy a vascularis, makromolekuláris permeabilitás tekintetében egyes graftok már a tárolás megkezdésekor elvesztették barrier-funkciójukat, míg egyesek megtartották. Az nKR oldatban végzett 1, illetve 2 hetes tárolási idő múltán az érfal simaizomzatának mélyebb és mélyebb rétegei is pozitív berlini-kék reakciót adtak, amit a vascularis permeabilitás növekedéseként értékeltünk. Ez tendenciaként megállapítható, ugyanakkor a minták különbözősége és a vizsgált esetszám nem tette lehetővé a kvantitatív analízis végzését *(6. ábra)*.

A többi vizsgált csoportban (reprodukálható) konkluzív pozitív berlini-kék reakciót, illetve annak időbeli előrehaladtát nem tudtuk kimutatni.

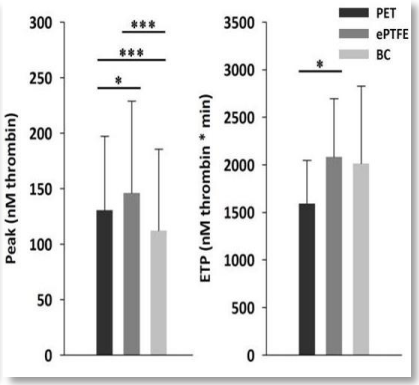
4.4 Koagulációs vizsgálataink konvencionális vascularis graftokon és a bakteriális cellulózon

A thrombin keletkezés tekintetében azt tapasztaltuk, hogy a BC és az ePTFE esetében szignifikánsan ($p<0,001$ $n=13$) hosszabb volt a thrombin keletkezéséig eltelt idő szemben a PET mintákkal. A csúcskoncentráció eléréséig eltelt idő vizsgálatakor ugyanez mutatkozott, továbbá a BC minták esetén tapasztaltuk a legalacsonyabb thrombin csúcskoncentrációt (Peak). Kismértékű, de szignifikáns ($p<0,05$) különbséget találtunk a PET és az ePTFE között, ahol az ePTFE mutatta a magasabb csúcskoncentrációt a thrombin keletkezés tekintetében (Peak). Az összes keletkezett thrombin mennyiség (ETP) tekintetében szignifikáns ($p<0,05$) különbséget csak a BC és a PET minták között találtunk. Megjegyzendő azonban, hogy donorfüggő variációk előfordultak a Peak és az ETP tekintetében *(7.-8. ábra)*.



7. ábra

*A thrombin keletkezési paraméterek az egységnyi PET, ePTFE és BC felszíneken $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, $n=13$.*



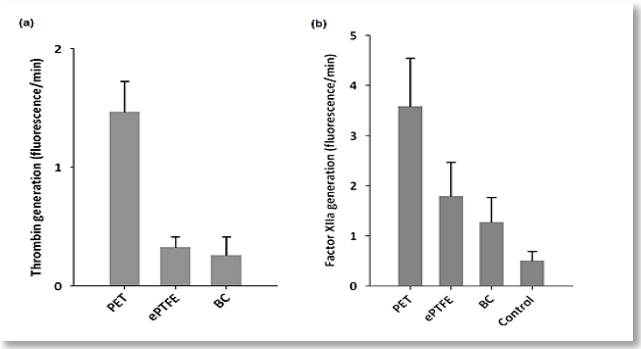
8.ábra

*A keletkezett thrombin csúcskoncentrációja és az endogén thromin potenciál (ETP) * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, $n=13$.*

A heparinnal kezelt gumigyűrűvel rögzített mintáknál a fluoreszcencia átlagos emelkedési ütemét számoltuk 60 perces időszak alatt. A PET anyag jelenlétében nagyjából 5x gyorsabban megy végbe a thrombin keletkezése összevetve az ePTFE ($p<0,001$) vagy BC ($p<0,001$) graftokkal, amelyek között nincs szignifikáns különbség.

Az aktivált XII. faktor az intrinsic véralvadási út kezdő enzimének keletkezését is mértük különböző graftminták felszínén az előzőekkel megegyező módon.

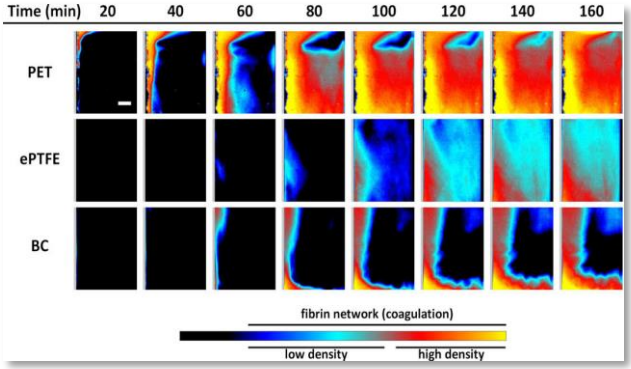
A három tesztelt anyag közül a PET felszín aktiválta legnagyobb mértékben a XII faktort, míg az ePTFE ($p=0,011$) sokkal alacsonyabb aktivációs ütemet mutatott és BC ($p=0,001$) a legalacsonyabbat *(9. ábra)*.



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

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

A *10. ábráról* egyértelműen leolvasható hogy a három vizsgált felszín közül a PET esetében indult meg leghamarabb a véralvadás. Míg az ePTFE esetén a koaguláció aktivációja lassabbnak bizonyult a BC-hez képest, addig a propagációs fázis tekintetében ennek ellenkezője figyelhető meg, ami nagyon gyorsan ment végbe a plazmatérfogat egészében.



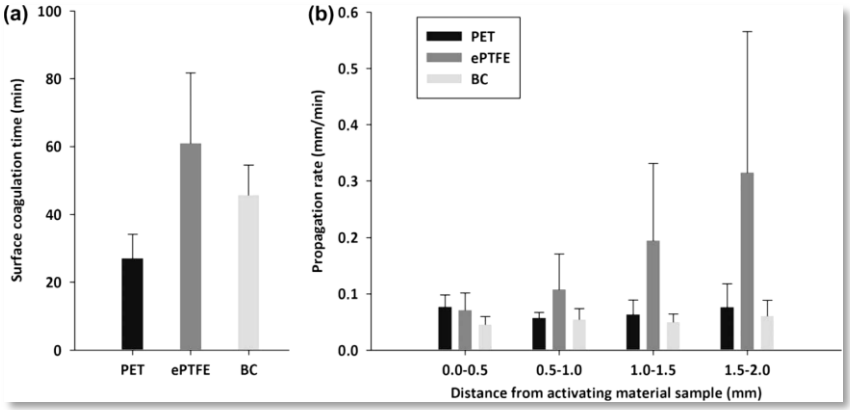
10. ábra
A véralvadás láthatóvá tétele: Reprezentatív színkódolt time-lapse képek a véralvadás időbeni lefutásáról a vizsgált felszíneken: PET,ePTFE,BC
A színkódolás a fibrinhálózat denzitásán alapszik.

Az is látható, hogy a BC esetében szemben a másik két vizsgált felszínnel a 160 perces vizsgálati idő alatt is maradt a küvettában egy rész(térfogat) amelyben a véralvadás nem mutatkozott.

A graftfelszínen meginduló véralvadás (iniciatív fázis) mérési eredményei, illetve a kalkulált felszíni koagulációs idő eredményeit a *11. ábra* mutatja (n=6). Az egyes pótlóanyagokra vonatkozó értékek, növekvő sorrendben (átlag±SD) a következők: PET (27±8 perc) <BC (46±9 perc) <ePTFE (61±21 perc).

A véralvadás előrehaladását (propagációs fázis) hasonlóképpen értékeltük, ahol a fibrin megjelenésének sebességét összesen négy, a behelyezett grafttól számított 0,5 mm-es szakaszon át mértük az összes vizsgált felszín esetén (n=6). Az eredmények a propagációs fázis drámai gyorsaságát mutatták ePTFE esetén, szemben a PET és a BC felszínekkel. *(11/b.ábra)*

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



11. ábra

(a) *Felszini alvadási idő PET, ePTFE és BC esetén.*
(b) *Véralvadás előremenetelének mértéke (propagációs ráta) 0,5 mm-es intervallumokban PET, ePTFE and BC graft esetén.*
Az értékek ábrázolása átlag + SD szerint látható.

A legtöbb koagulációs folyamatot vizsgáló metódus, a véralvadást mértékét térfogatra vonatkoztatva vizsgálja, figyelmen kívül hagyva, hogy hol kezdődött az aktiváció, illetve hogy abból a pontból milyen kinetikával történt a véralvadás propagációja. A fent leírt módszerrel ezek jól meghatározhatók, és fontos információval szolgálhatnak a továbbiakban a vér és az idegen felszínek interakciójának vizsgálataiban.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

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

A kísérletekhez összesen 32 betegtől származó 72 véna szegmentumot használtunk fel, amit a tárolás alapján 8 csoportra osztottunk: (1) friss, (2) 4°C nKR-1hetes, (3) 4°C nKR-2hetes, (4) 4°C X-VIVO-1hetes, (5) 4°C X-VIVO-2hetes, (6) 4°C X-VIVO-

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

A felszín-indukált koaguláció mérésére a Hemker-féle thrombin keletkezési módszert adaptáltuk, amely így alkalmas a vascularis graftok (pro)koaguláns tulajdonságainak vizsgálatára, a bakteriális cellulóz és a leggyakrabban használt graftok PET (Dacron®) és ePTFE (GORE-TEX®) felszíni tulajdonságainak összevetésére. Ezen kívül egy vizualizációs metódussal, a vizsgált felszínen meginduló koagulációs folyamatok láthatóvá tételére egy egyszerűsített színkódolt módszert alkalmaztunk. A thombin keletkezési üteme drámai különbségeket mutatott a vizsgált felszínek tekintetében: Az ePTFE és a BC felszínen lassabban indult be (lag time) és később tetőzött (time to peak), mint a PET felszínen. A BC esetén tapasztaltuk a legalacsonyabb csúcsértéket (peak), tehát az indukált alvadás sebessége itt a legkisebb. Az aktivált XII faktor és a felszíni koagulációs idő (PMMA-vizualizáció) vizsgálatakor is hasonló eredményt kaptunk (átlag ± SD): PET (27 ± 8 min) < BC (46 ± 9 min) < ePTFE (61 ± 21 min). A koagulációs vizsgálatokban mind a thrombin, mind az aktivált XII faktor keletkezése, valamit a koaguláció vizualizációja során kapott eredmények tekintetében is reprodukálható adatokat kaptunk, ami a módszerek hatékonyságát bizonyítja. A BC mint bioanyag koaguláció szempontjából az ePTFE-hez hasonló profilt mutatott, ami ígéretessé teszi a BC-mint leendő érpótlóanyag további vizsgálatait. Ezek az eljárások távlatokat nyithatnak a vérrel érintkező bioanyagok, vascularis graftok in vitro koagulációs vizsgálataira.

6. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSAI

I. Az irodalmi adatokkal összhangban jelentős egyéni különbségeket tapasztaltunk a frissen explantált vena saphena magna szakaszok biomechanikai és szövettani vonatkozásában.

II. A tápkultúra médiumban (X-VIVO™ 10) 4 C°-on tárolt VSM szegmentumok megőrzik geometriai és elasztikus tulajdonságaikat akár 4 hetes tárolás után is, szemben a fiziológiás sóoldatban (normál Krebs-Ringer) tárolt mintákkal, amelyeknél már 2 hetes tárolás után geometriai elváltozások és az aktív rugalmas tulajdonságok teljes hiánya alakult ki.

III. Biomechanikai profil tekintetében a 4 hétig hűtve tárolt, illetve a krioprezervált és felolvasztott VSM szegmentumok nem mutatnak szignifikáns eltérést, vagyis egymással adott esetben helyettesíthetők.

IV. Fénymikroszkópos morfológiai értékelésünk az érszövetek lassú dezintegrációját és az extracelluláris elemek károsodását mutatta, amit elsősorban a tárolás ideje befolyásolt, nem a tároló médium.

V. A sebészetben felhasznált idegen anyagok (esetünkben vascularis pótlóanyagok) felszíni koagulációs tulajdonságainak vizsgálatára mind az ELISA tálcára adaptált spektrofotometriás eljárás, mind a PMMA küvettákban kivitelezett vizualizációs metódus egy érzékeny, reprodukálható, gyors eljárásnak bizonyult, ami új távlatokat nyithat a vascularis graftok in vitro koagulációs vizsgálataira.

Az értekezésben felhasznált közlemények

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

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

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