

**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**

## 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 powlekane 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.

**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 Gomorigo na obecność włókien retikuliny oraz znakowałam przeciwciałami. Do identyfikacji komórek śródbłonna 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 neointimy. 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 tętnicznych w bezwodnym NaCl jest oryginalną i pełnowartościową metodą o znaczeniu klinicznym, szczególnie do operacji rewaskularyzacyjnych w zakażonych tkankach.

## Summary

**Background.** Although autologous venous grafting is a method of choice in reconstructive arterial surgery in patients with obstructive atherosclerosis, artificial teflon grafts are used quite commonly because of wide lumen, sufficient length and availability in various sizes. Unfortunately, they are susceptible to infection difficult to combat with antibiotics. Infection of this type of grafts is seen in about 10% of cases. Infected artificial arterial grafts have to be removed and cannot be replaced by the same type of material due to easy bacterial adherence. Other types of grafts are tried with various results. The so far used cryopreserved human arteries have limited longevity and are mechanically fragile. Moreover, using cryopreserved allografts we face the problem of thrombosis and stenosis, especially in case of small diameters. Similar defects present allografts preserved in glutaraldehyde. The transplanted allogeneic arteries evoke immune reaction what limits time of their patency. Moreover, both fresh and frozen may require administration of immunosuppressive drugs. As another alternative prostheses coated with silver ions and antibiotics are used, however, long-term results are not satisfactory.

For this reasons, a method for successful long-term preservation of arterial allografts displaying strong mechanical properties, low antigenicity, resistance to colonization by micro-organisms, and suitable for replacement of infected synthetic grafts is needed.

We were searching, In the Department of Surgical Research and Transplantology, for a method of preservation of arteries that would meet these conditions. In our previous research we found that preservation of tissues in anhydric sodium chloride may facilitate maintaining their cellular and molecular structure. Skin preserved in sodium chloride powder retained its molecular structure and evoked only minor reaction at the site of implantation [Olszewski et al. 2006]. This prompted us to investigate whether arteries can also be preserved in this fashion and display:

- a) unchanged morphology,
- b) strong mechanical endurance and
- c) low antigenicity after transplantation.

**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. After harvesting, 5 µm thick slides were stained with hematoxyline/eosine and trichrome azan for collagen fibers. In order to identify the presence of endothelial cells immunostaining using antibodies against CD31, RECA-1 (HIS 52) and CD54 was used. To monitor host immune reaction against the graft antibodies against ED1 (CD68), OX6 (MHC II) and W3/13 (CD43) antigens were applied. The ultrastructure of aortae specimens was 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. No thrombosis was observed with only slight thickening of the neointima. Hematoxyline/eosine and trichrome azan stainings, as well as electron microscopic studies showed preserved anatomical structure of the transplants and revealed normal structure of elastin fibers. The number of muscle cells was significantly lower in preserved and transplanted than non-preserved aortae. No significant differences between preserved transplanted and non-preserved aortae stained for CD31, CD54, RECA-1 were observed. There was only slight infiltration of ED1 (CD 68), OX6 (MHC class II) and W3/13 (CD43) positive cells around the allografts. The maximum tensile strength was lower in the preserved and transplanted aortae than in freshly harvested and transplanted, but it did not influence function of the graft. The intraluminal pressures reached in both groups values of above 300 mmHg without wall rupture.

**Conclusions.** Aortae preserved in anhydric sodium chloride remained patent and functioned properly even 15 months after transplantation. Their tensile strength was slightly lower, however, there was no difference in the intravascular pressure strength between groups. These observations indicate that preservation of arteries in anhydrous sodium chloride may serve as a novel method for obtaining arterial allografts of normal mechanical properties and low immunogenicity qualifying them for replacement of infected artificial arterial grafts.