

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

**PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE**

(10) FI 910113 A7

**(12) JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **910113**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
**C12N 5/08
A61L 27/00**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **23.06.1989**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **09.01.1991**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **09.01.1991**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **23.06.1989 PCT/US1989/002776**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

11.07.1988 US 217299

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Purdue Research Foundation, 328 ENAD Building West Lafayette, IN 47907, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Badylak, Stephen F., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Lantz, Gary, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Geddes, Leslie A., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

4 •Coffey, Arthur C., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Kudossiirrekoostumus ja menetelmä

Sammansättning av vävnadstransplantat samt förfarande

Kudossiirrekoostumus ja menetelmä

Tämä keksintö koskee uutta kudossiirrekoostumusta, jolla on monia synteettisiä siirremateriaaleja parempi
 5 lujuus, aukipysyvyys, kyky vastustaa infektoita, epäimmu-
 nogeenisuus, epätrombogeenisuus ja kyky vastustaa pullis-
 tumien muodostumista. Tarkemmin määriteltynä tämä keksintö
 koskee kudossiirrekoostumuksia, jotka käsittävät limakal-
 von alaisia ja limakalvon tyvialueen osia ohutsuoletta, ja
 10 menetelmiä mainittujenlaisten koostumusten valmistamiseksi ja
 käyttämiseksi.

Keksinnön tausta

Kudossiirremateriaalit ovat nykyisin saavuttaneet huomattavan kliinisen ja taloudellisen merkityksen. Arvi-
 15 oidaan, että vuonna 1986 käytettiin 130 miljoonaa dollaria
 yksistään verisuonisiirteisiin sepelvaltimo-ohitussiirteet
 pois luettuina. Verisuonisiirretoimenpiteiden onnistumis-
 tiheydet ovat kuitenkin heikompia kuin useimpien muiden
 20 kirurgisten toimenpiteiden. Kumulatiivista avoimuusastet-
 ta 50 % 5 vuoden aikana pidetään esimerkiksi erinomaisena
 läpimitaltaan pienten verisuonisiirteiden kohdalla. Täl-
 laiset alhaiset onnistumistiheydet johtuvat suurelta osin
 tällä hetkellä kliinisessä käytössä olevien siirremate-
 riaalien yhdestä tai useammasta fysikaalisesta tai toimin-
 25 nallisesta heikkoudesta.

Kudossiirteisiin soveltuvien materiaalien identifi-
 ointi on erityisen vaikeaa, koska tällaisilla materiaa-
 leilla täytyy olla joukko eriluonteisia ominaisuuksia.
 Verisuonisiirremateriaaleilta ei esimerkiksi vaadita pel-
 30 kästään mekaanista stabiiliutta jatkuvan rasituksen alai-
 sina, vaan niillä täytyy myös olla riittävä huokoisuusaste
 hiussuonien muodostumisen kannalta, samanlainen mukautu-
 vuus kuin isäntäkudoksella ja korkea negatiivinen Zeta-
 potentiaali (jotta ne olisivat epätrombogeenisia). Lisäksi

niiden tulisi olla allergisoimattomia, ei-karsinogeenisia ja edullisesti halpoja valmistaa.

Harvoilla, jos millään, kudossiirremateriaalilla on kaikki nämä toivottavat ominaisuudet. Kirjallisuudessa
5 olevat raportit verisuonisiirrealalla tehdystä tutkimuksesta ja kehityksestä heijastavat meneillään olevaa merkittävää työtä nykyisin tunnettujen siirremateriaalien heikkouksien voittamiseksi.

Verisuonisiirteisiin on käytetty sekä synteettisiä
10 että autogeenisiä materiaaleja. Synteettisten materiaalien joukkossa paisutettu polytetrafluorieteeni (PTFE) on eräs yleisesti käytetty verisuonisiirremateriaali, erityisesti pienten suonien ohitusleikkausten yhteydessä. Paisutetusta PTFE:stä valmistetut siirteet ovat kuitenkin alttiita uuden sisäkalvon liikakasvulle ja myöhemmille siirretrombooseille (avoimuusaste on esimerkiksi noin 50 % 6 vuoden kuluttua reisi-polvitaiveohitusten kohdalla). PTFE-siirteiden onnistumustiheyden ilmoitetaan olevan vielä pienempi käytettäessä niitä laskimoverenkierrossa.

20 Erästä toista synteettistä materiaalia - Dacronia^R - käytetään usein läpimitaltaan suuriin verisuonisiirteisiin liittyvissä toimenpiteissä (esimerkiksi munuaisentakaisissa aortasiirteissä). Neulotun Dacronin huokoisuusaste on kuitenkin suhteellisen korkea, ja se täytyy esihyydyttää
25 ennen istutusta, jotta vältetään runsas verenvuoto. Tämä esihyydytysmenettely ei aina ole käytännöllinen eikä menestyksellinen. Kudotun Dacronin^R, vaikka se onkin vähemmän huokoista, mukautuvuus on vain 20 % normaalin aortan yhteydessä havaittavasta. Lopuksi mainittakoon, että Dacron^R-
30 siirteet toimivat heikosti läpimitaltaan pienissä valtimoissa tai laskimoissa, joissa veren virtaus on suhteellisen hidasta.

Eräs merkittävimmistä ongelmista, joita liittyy synteettisten materiaalien käyttöön kudossiirremateriaaleina, on se, että synteettisten materiaalien kyky vastus-
35

taa infektoitumista on heikko. Synteettisten siirteiden istutusta seuraavissa infektioissa kuolevuus on 66 %. Synteettisillä materiaaleilla on taipumus kerätä mikro-organismeja koloihinsa ja ne ovat kontaminoituneina äärimmäisen epäherkkiä antibakteeriselle hoidolle. Infektoituneiden synteettisten siirteiden poistaminen on käytännöllisesti katsoen väistämätöntä.

Myöhemmin tutkijat ovat kuvanneet synteettisten iho- ja verissuonivastineiden valmistusta käyttämällä eläviä ihmissoluja. Katso US-patenttijulkaisut 4 604 346, 4 546 500, 4 539 716, 4 485 097 ja 4 485 096.

Autogeenisistä materiaaleista on jalkavarren iholaskimoa, ihmisen napalaskimoa, nurinkäännettyä ohutsuolta ja väärttinävaltimoa kaikkia käytetty, mutta kussakin näistä materiaaleista on esiintynyt myös huomattavia heikkouksia. Jalkavarren iholaskimo saattaa olla sopimattoman kokoinen tiettyihin toimenpiteisiin tai sitä ei ehkä ole saatavana sairauden aiheuttaman vaurioitumisen vuoksi. Lisäksi jalkavarren iholaskimossa saattaa olla hyväksyttävää enemmän suonikohjuja, ja se kärsii kiihtyneestä valtimohaurastumien syntymisestä "valtimoksimuuttamisen" jälkeen. Sekä napalaskimosiireitä että nurinkäännetystä ohutsuolesta valmistettuja siirteitä vaivaavat varhaisvaiheen tromboosi ja myöhempi pullistumien muodostuminen. Myös väärttimävaltimon käyttökelpoisuus on rajoitettu, koska se on vaikea ottaa talteen ja saattaa vahingoittaa siirteen istutuksen jälkeen.

Tämän keksinnön yhtenä päämääränä on tarjota käyttöön kudossiirremateriaali, jolla ei ole monia tällä hetkellä kliinisesti käytettäviin siirremateriaaleihin liittyvistä haittapuolia.

Tämän keksinnön yhtenä toisena päämääränä on tarjota käyttöön menetelmä uuden kudossiirremateriaalin valmistamiseksi osasta ohutsuolta.

Tämän keksinnön yhtenä päämääränä on vielä tarjota käyttöön menetelmä uuden monikäyttöisen kudossiirremateriaalin käyttämiseksi omakudos-, omalaji- ja vieraslajisiirresovelluksissa.

5 Tämän keksinnön yhtenä lisäpäämääränä on vielä tarjota käyttöön menetelmä uuden kudossiirrekoostumuksen käyttämiseksi verisuonien korvaamiseen.

Piirustuksen lyhyt kuvaus

Kuvio 1 on poikkileikkauskuva osasta ohutsuolta.

10 Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Tämä keksintö koskee kudossiirrekoostumusta, joka käsittää pääasiassa vaihtolämpöisen selkärankaisten ohutsuolipalan limakalvonalaiskudoskalvoa. Limakalvonalaiskudoskalvo erotetaan kerroksena lihaskalvosta ja ainakin ohutsuolipalan limakalvon ontelonpuoleisesta osasta. Samalla kun keksinnön mukaisella kudossiirrekoostumuksella on osoitettu olevan erinomaiset toiminnalliset ominaisuudet sellaisissa sovelluksissa kuin omakudos- ja omalajiverisuonisiirteissä, tämän keksinnön mukaisille kudossiirrekoostumuksille odotetaan löytyvän laajaa käyttöä jopa vieraslajisiirteinä sekä verisuoni- että muissa kudossiirresovelluksissa. Tämän hakemuksen tekijät ovat havainneet, että kyseisellä kudossiirrekoostumuksella on useita fyysikaalisia ja biologisia ominaisuuksia, jotka tekevät siitä erityisen sopivan kudossiirrekäyttötarkoituksiin.

Tämän keksinnön eräässä edullisessa suoritusmuodossa kudossiirremateriaali käsittää limakalvonalaiskudosta ja limakalvon tyvikudosta, jotka on irrotettu kerroksena osasta ohutsuolta, edullisemmin tyhjäsuoletta, pohjukais-
 30 suolen ja sykkyräsuolen välisestä ohutsuolen osasta. Ohutsuoli koostuu ennen käsittelemistä (delaminointia) tämän keksinnön mukaisen siirremateriaalin saamiseksi joukosta erillisiä kudosterroksia. Kuvio 1 on poikkileikkauskuva ohutsuoletta, jossa näkyvät sen erilliset kudosterrokset
 35 merkittyinä kirjaimilla A - G (uloimmasta kerroksesta si-

simpään), jotka kerrokset yhdessä muodostavat suolen seinämän. Uloin kudokset A edustaa suolilievekudoksia. Suolilievekudokset esitetään erillisenä kerroksena pelkästään asian valaisemiseksi. Tällaiset kudokset eivät tavallisesti esiinny erillisenä kerroksena vaan ennemminkin epäjatkuvin kudosegmentteinä. Kerrokset B ja C edustavat herakalvoa (tunica serosa) ja vastaavasti lihaskalvoa (tunica muscularis). Kerros D, limakalvonalaiskudoskalvo (tunica submucosa), on tiivistä, epäsäännöllistä kollageenisidekudosta, jossa on usein lukuisia syöttösoluja. Näistä syöttösoluista peräisin oleva hepariini on todennäköisesti ainakin osaksi syynä siirremateriaalien varhaisen trombogeenisuuden puuttumiseen.

Kerrokset E, F ja G edustavat yhdessä niin kutsuttua limakalvoa (tunica mucosa). Kerros E on sileän lihaksen soluista koostuva kerros, joka tunnetaan limakalvon lihaskerroksena (lamina muscularis mucosa). Kerros F, tiivis kerros (stratum compactum), koostuu soluttomasta kollageenista ja elastiinikuiduista. Kerros G koostuu limakalvon epiteelikerroksesta (lamina epitheliasis mucosa) ja sen tukikerroksesta (lamina propria), jotka ovat yhdessä järjestyneet nukkaarakkeiksi, sarjaksi limakalvon sormimaisia ulkonemia.

Jäljempänä yksityiskohtaisesti selostettavaa suolikudospalan käsittelyä tämän keksinnön mukaiseksi siirremateriaaliksi seuraava histologinen tutkimus osoittaa, että limakalvon epiteelikerros ja sen tukikerros on poistettu samoin kuin lihaskalvo ja herakalvo. Tämän keksinnön mukainen edullinen siirremateriaali käsittää siten limakalvonalaiskudoskalvon D yhdessä limakalvon tyviosien, erityisesti limakalvon lihaskerroksen E ja tiiviin kerroksen F, kanssa. Näitä kerroksia kutsutaan yhdessä jäljempänä ohutsuolen limakalvonalaiskerroksiksi ("SIS", Small Intestine Submucosa).

Tämän keksinnön mukainen SIS-omakudossiirre voidaan valmistaa esimerkiksi leikkaamalla ensin irti osa autogeenisestä proksimaalisesta tyhjäsuolesta, kun vatsa on avattu keskiviivan kohdalta. Poistettu tyhjäsuolen osa kääritään sitten kirurgisiin sieniin, joita on liotettu fysiologisessa suolaliuoksessa. Kun suoliyhdysaukko on saatu valmiiksi, poistettu suolen osa käsitellään jäljempänä kuvattavalla keksinnön mukaisella menetelmällä käytettäväksi kudossiirremateriaalina. Omalajisiirteitä valmistetaan vastaavasti samaan lajiin kuuluvista elinten-/kudoksenluovuttajista poistetusta suolikudoksesta. Vieraslajisiirteitä voidaan valmistaa esimerkiksi kissan, sian tai naudan suolikudoksesta, joka on otettu lopetetuista eläimistä teurastustoimenpiteiden yhteydessä. Tähän mennessä on havaittu vain hyvin pieniä morfologisia eroja eri lajien suolikudoksissa. Tämän keksinnön mukaisen ihmisestä peräisin olevan siirrekudoksen histologisen ulkonäön havaittiin itse asiassa olevan lähes identtinen koiran vastaavan kudoksen kanssa. Ainoa havaittavissa oleva morfologinen ero oli ihmiskudoksen hieman vähemmän tiivis stratum compactum.

Tämän keksinnön mukainen kudossiirremateriaali valmistetaan hankaamalla suolikudoksesta pois ulommat kerrokset, mukaan luettuina sekä herakalvo että lihaskalvo (kerrokset B ja C kuviossa 1), ja sisemmät kerrokset, mukaan luettuina ainakin limakalvon (kerrokset E - G kuviossa 1) ontelonpuoleinen osa (kerros G). Lievissä hankausolosuhteissa limakalvo delaminoituu stratum compactumin (kerros F) ja kerroksen G tukikerroksen välistä. Tarkemmin ilmaistuna sen jälkeen kun suolenpalasta on poistettu mahdolliset suolilievekudokset käyttämällä esimerkiksi Adson-Brown-pinsettejä ja Metzenbaum-saksia, herakalvo ja lihaskalvo (ulommat kudokset) irrotetaan suolenpalasta hankaamalla pituussuuntaisin pyyhkimisliikkein leikkausveitsen varrella ja kostutetulla sideharsolla. Kun suolen-

pala on käännetty nurin, irrotetaan limakalvon ontelo-osa sen alla olevasta kudoksesta käyttämällä samanlaista pyyhkimisliikettä. Huolehditaan limakalvonalaiskudoksen puhkeamisen estämisestä. Samoin siirteen pinnalle irrotetuista kerroksista mahdollisesti jääneet "kudoslaput" poistetaan. Suolenpala voidaan mahdollisesti kääntää ensin nurin, poistaa sitten ontelonpuoleiset kerrokset ja kääntää se sitten takaisin alkuperäiseen asentoonsa herakalvon ja lihaskalvon poistamista varten. Siirremateriaali on valkeahko, läpikuultava kudosputki, jonka paksuus on noin 0,1 mm ja joka koostuu tyypillisesti limakalvonalaiskudoskalvosta ja siihen kiinnittyneistä lihaskalvosta ja stratun compactumista. Verisuonisiirteen valmistamiseksi käännetään valmistettu siirre alkuperäiseen asentoonsa, niin että stratun compactum toimii siirteen ontelonpuoleisena pintana.

Valmistettu siirremateriaali huuhdotaan tyypillisesti fysiologisella suolaliuoksella ja laitetaan 10 % neomysiinisulfaattia sisältävään liuokseen noin 20 min:n ajaksi, minkä jälkeen siirremateriaali on valmis käytettäväksi. Siirteitä käytetään tavanomaisin kirurgisin meneteltyin, joita yleisesti käytetään kudossiirresovelluksissa. Muissa kuin verisuonikudossiirresovelluksissa käytettäväksi putkimainen siirremateriaali voidaan leikata pituussuuntaisesti ja avata "kudoslapuksi". Koko edellä kuvattu kudosten delaminointimenettely voidaan itse asiassa tehdä "suolikudoslapuille", jotka on valmistettu leikkaamalla suolenpala putuussuunnassa ja "avaamalla" se siirrelappuesituotteeksi. Valmistettuja siirrekudoslappuja voidaan käyttää esimerkiksi ihosiirremateriaalina tai muiden elimistön kudosaivurioiden korjaamiseen, joiden yhteydessä voidaan kirurgisesti käyttää kudossiirrelappua, jolla on tämän keksinnön mukaisen siirrekoostumuksen fysikaaliset ja toiminnalliset ominaisuudet.

Verisuonisiirrekäytössä siirteen läpimitan tulisi olla suunnilleen sama kuin siirteen vastaanottavan verisuonen. Tämä toteutetaan käsittelemällä kudossiirre sylinteriksi, jonka läpimitta on suunnilleen sama kuin vastaanottavan verisuonen, ja ompelemalla tai muulla tavalla kiinnittämällä kudossiirre pituussuunnassa mainitun verisuonisiirteen muodostamiseksi. Niinpä verisuonisiirre voidaan valmistaa esimerkiksi valitsemalla steriili lasisauva, jonka ulkoläpimitta on yhtä suuri kuin vastaanottavan verisuonen, ja työntämällä lasisauva siirteen sisään. Sit-
 10 ten ylimääräinen kudokse kerätään kokoon ja ontelon haluttu läpimitta saavutetaan ompelemalla siirteen pituussuunnassa (käyttämällä esimerkiksi kahta jatkuvaa ommelriviä tai yksinkertaista epäjatkuvaa ommelriviä) tai käyttämällä
 15 muita alalla tunnettuja kudoksenkiinnitysmenetelmiä.

Tämän keksinnön päämäärät toteuttavalla SIS-koostumuksella on kudossiirremateriaalien yhteydessä hyvin toivottavat mekaaniset ominaisuudet, mukaan luettuina alhainen huokoisuusaste, hyvä mukautuvuus ja korkea puhkaisupainearvo. Mitä huokoisuuteen tulee, ammattimies tietää, että kudossiirremateriaalin huokoisuusasteen tulee olla riittävän alhainen, jotta estetään verenvuoto leikkauksen aikana, mutta kuitenkin riittävän korkea, jotta mahdollistetaan uudelleen kehittyneiden suonenseinämäsuonten ulottuminen siirremateriaalin läpi ravinnon tuomiseksi uuteen sisäkalvoon ja ontelopintaan. Siirremateriaalin huokoisuutta mitataan tyypillisesti vesimäärällä (ml), joka kulkee siirteen läpi neliösenttimetriä kohden minuutissa paine-eron ollessa 120 mmHg. SIS-siirremateriaalin huokoisuusaste on 10, paljon alhaisempi kuin alalla nykyisin tunnettujen muiden siirremateriaalien. (Kudotun Dacronin[®] huokoisuusaste on esimerkiksi 50.) Tästä alhaisesta huokoisuusasteesta huolimatta SIS on silti riittävän huokoista uusien hiussuonien muodostumisen mahdollistamiseksi
 35 SIS-siirteen sisään. Verisuonisiirrekäytössä SIS-koostu-

mukset mahdollistavat veren täyttämien, ontelopintaan asti ulottuvien hiussuonien muodostumisen siirteen seinämään jopa neljän vuorokauden kuluessa leikkauksen jälkeen.

- Mitä siirteen mukautuvuuteen tulee, alalla on kuvattu mukautuvuuden ja avoinnapysymisen välisen suoran riippuvuuden olemassaoloa. Siirremateriaalin tulisi ihan-
 5 netapauksessa olla vähintään yhtä mukautuvaa kuin kudος, jonka se korvaa. SIS-siirremateriaalin pituussuuntainen mukautuvuus mitattiin käyttämällä yksinkertaista vetokoet-
 10 ta. Mittauksen alkupituus muodostettiin tekemällä musteella kaksi merkkiä 5,0 cm:n etäisyydelle toisistaan. Venymä ja käytetty voima mitattiin kuormitettaessa näytteitä ve-
 tonopeudella 32 cm/cm/min, jolloin saatiin seuraavat tu-
 lokset:
- 15 SIS-siirteen mukautuvuus: 0,045 cm/N pituussenttimetriä kohden
- Normaalin koiranaortan mukautuvuus: 0,017 cm/N pituussenttimetriä kohden.
- Niinpä SIS-materiaaleilla on itse asiassa suurempi mukau-
 20 tuvuus kuin normaalilla aortalla. Tämä on merkittävä edis-
 tysaskel verisuonisiirrealan tekniikan tasoon nähden. Kaikki tällä hetkellä saatavissa olevat synteettiset siir-
 teet ovat 3 - 10 kertaa vähemmän mukautuvia kuin luonnol-
 linen valtimo ja vastaavassa suhteessa luonnollista valti-
 25 moa alttiimpia tromboosille. Tekniikan tasoa vastaava me-
 netelmä tämän mukautuvuusepäsuhteen kompensoimiseksi on
 käyttää siirremateriaalia, jonka läpimitta on suurempi
 kuin viereisen luonnollisen valtimon. Tämä menetelmä on
 kuitenkin johtanut lisäongelmiin. Läpimitaltaan suuremman
 30 siirresegmentin läpi virtaavan veren nopeus on pienempi.
 Tällaisissa olosuhteissa verihiutaleiden ja fibriinin ke-
 rääntyminen ja sitä seuraava tromboosi ovat todennäköisem-
 piä. Koska SIS-materiaalilla on mainitunlainen hyvä mu-
 kautuvuus, voidaan käyttää läpimitaltaan yhtä suuria
 35 SIS-siirteitä ilman tällaisten ongelmien ilmaantumista.

Keksinnön mukaisella SIS-siirremateriaalilla on havaittu olevan selvästi korkeampi puhkaisupainearvo, kuin mitä esiintyisi fysiologisesti. Puhkaisupainetestistä tehtiin kiinnittämällä putkimainen SIS-siirrepala kahteen sylinteriin, joiden läpimitta oli 25 mm, ja paineistamalla siirre-
 5 tyypikaasulla käyttämällä vakiovirtausnopeutta. Käytettiin kahta virtausnopeutta. Pienemmällä virtausnopeudella paine kohosi aluksi, putosi sitten ja asettui sitten stationaariselle kaasun ulosvirtauksen siirteen seinämän läpi
 10 asettuessa tasapainoon kaasun sisäänvirtauksen kanssa. Suuremmalla virtausnopeudella paine kohosi välittömästi puhkaisuosuhteita vastaavaksi, suunnilleen arvon 400 mmHg, mikä osoittaa, että siirremateriaali pystyy helposti kestämään jatkuvia pulssipaineita, joita tavataan
 15 normaalissa fysiologisessa verisuonisiirrekäytössä.

Esimerkit

Esimerkki 1

Ohutsuolen limakalvonalaiskudos läpimitaltaan suurena valtimosiirteenä

20 On tehty sarja kokeita, joissa on testattu kolmen erilaisen ohutsuolikonfiguraation kykyä toimia verisuonisiirteenä koiran munuaisentakaisessa aortassa. Ensimmäisessä kokeessa käytettiin täyspaksuista, nurinkääntämätöntä tyhjäsuoлипalaa joko koskemattomine suoliliepeen verisuonihermolähteineen tai käyttämällä siirremateriaalina
 25 vapaata, eristettyä palaa. Veren ja siirteen välisenä rajapintana oli suolen limakalvo. Kaikki 4 koira kuolivat tässä kokeessa 18 tunnin kuluessa leikkauksesta siirresegmentin tromboosin ja ompeleista tapahtuneen verenvuodon
 30 seurauksena.

Toisessa kokeessa käytettiin eristettyä ja nurinkäännettyä tyhjäsuoлипalaa siirteenä, jolloin herakalvo toimii veren ja siirteen välisenä rajapintana. Tässä kokeessa käytettiin kahta koira. Ensimmäisen koiran siirteeseen kehittyi tromboosi 4 tunnin kuluessa leikkaukses-

ta, ja toinen koira kuoli lähemmässä liitoskohdassa esiintyneeseen akuuttiin verenvuotoon 4 päivän kuluttua leikkauksesta.

Kolmannessa kokeessa testattiin vain osan suolen seinämästä käyttöä siirremateriaalina. Kustakin koirasta otettiin talteen vapaa pala autogeenista ylempää tyhjäsuolta ja poistettiin sitten pääosa limakalvosta raaputtamalla ontelopintaa leikkausveitsen tylpällä kädensijalla. Samalla menettelyllä poistettiin sitten herakalvo ja lihaskalvo. Tässä suolenpalan näennäisesti karkeassa käsittelyssä jäljelle jäänyt kudος oli limakalvoalaiskudoksesta ja tyvikudoksesta koostuva osa, jonka paksuus oli 100 µm. Tämä siirre sijoitettiin sitten 15 koiran munuaisentakaiseen aortaan, ja se on ollut huomattavan menestyksellinen. Tämän kolmannen kokeen tuloksista esitetään seuraavassa yhteenveto.

13 koiralla 15:sta siirre säilyi avoimena lopetushetkeen asti. 11 koiraa lopetettiin eri aikoina, 4 päivää - 1 vuosi, leikkauksen jälkeen. Eläimissä ei esiintynyt merkkejä siirteeninfektoitumisesta, pullistumien muodostumisesta eikä tromboosista. Kahdessa koirassa havaittu siirteen epäonnistuminen johtui teknisistä virheistä, mm. metallisten liittimien väärästä sijoituksesta ja huonosta liittämistekniikasta. Kaksi eläimistä on edelleen elossa tätä kirjoitettaessa, ja niitä seurataan siirteen pitempikäisen avoinnapysymisen suhteen.

Siirteiden avoinnaolo varmistettiin positiivisella kontrastikuvauksella 4 - 7 päivän kuluttua leikkauksesta ja 6 - 8 viikon välein sen jälkeen. Lisäksi siirteen avoinnapysymistä seurattiin kliinisesti tarkkailemalla voimakkaan reisivaltimopulssin läsnäoloa ja takaraajojen turvotuksen puuttumista.

11 koirista, joilla siirre pysyi avoinna, lopetettiin eri aikoina leikkauksen jälkeen (4, 7, 10 ja 14 päivää ja 9, 11, 13, 17, 26, 44 ja 52 viikkoa). Juuri ennen

lopettamista eläille tehtiin lisäksi angiografia siirten aukiolon varmistamiseksi ja vertailukuvan saamiseksi siirteen laajentumisen, ahtautumisen ja pullistumien muodostumisen arvioimiseksi. Kaikilla 11 eläimellä siirre oli täysin avoin eikä siinä esiintynyt merkkejä tuhoisista ontelomuutoksista.

Näiden siirrepalojen karkeassa patologisessa tutkimuksessa näkyi kiiltävä ontelopinta, jossa oli sattumanvaraisesti järjestyneitä punaisia ja valkoisia alueita ja jossa ei näkynyt merkkejä etenevästä tukoksen muodostumisesta. Siirteessä havaittiin ympäröivän lujan, siirteen seinämän kanssa yhteenkasvaneen sidekudoksen kerääntymistä. Yhdessäkään aiemmin kuin 6 kuukautta leikkauksen jälkeen tutkitussa näytteessä ei näkynyt merkkejä endoteelisolujen kasvusta siirteen pinnalla. Näiden siirteiden pintaa peitti tasainen, suhteellisen tiivis ja organisoitunut kollageenikerros.

26, 44 ja 52 viikon kuluttua otettujen näytteiden histopatologisessa tutkimuksessa näkyi litistyneitä, "endoteelin kaltaisia" soluja, jotka osittain peittivät ohuen (noin 500 μ m) tiiviisti järjestyneen fibriinikerroksen. Veren täyttämiä hiussuonia oli koko kudoksen alueella, eikä alkuperäisen siirremateriaalin ulkorajaa voitu erottaa ympäröivästä sidekudoksesta. Ontelopinnan tutkiminen pyyhkäisyelektronimikroskoopilla osoitti kerroksen litistyneitä soluja, joita ei voitu erottaa endoteelisoluista ja joissa oli pientyneitä "valejalkoja". Näiden siirteiden tutkiminen läpäisyelektromikrokoopilla viittasi myös ontelopintaa peittävien endoteelisolujen läsnäoloon. Immuunifluoresenssivärjäyksellä havaittu tekijään VIII liittyvän antigeenin läsnäolo viittasi lisäksi näiden siirteen ontelopinnan solujen endoteelialkuperään. Siirremateriaalista tutkittiin endoteelisolujen läsnäolo myös testaamalla endoteelistä peräisin olevan relaksaatiotekijän läsnäolo. Siirrenäytteiden pinnalle levitettiin asetyylikoliinia ja

otettiin talteen effluentti. Effluentin osoitettiin sisältävän endoteelistä peräisin olevaa relaksaatiotekijää havaitsemalla sileän lihaksen relaksaatio rotanaortapreparaatissa. Verenpaine pään puolella ja toisella puolella
 5 SIS-siirteeseen nähden ja SIS-siirteessä määritettiin kustakin 10 lopetetusta koirasta. Verenpaineet olivat yhtä suuret kaikissa 3 kohdassa kullakin koiralla, mikä heijastaa SIS-siirremateriaalin käytön aiheuttamien haitallisten hemodynaamisten ilmiöiden puuttumista.

10 Seuraavat laboratorioparametrit mitattiin ennen leikkausta, päivän kuluttua leikkauksesta ja sitten muina aikoinen seuraavien kuukausien aikana kaikista koirista: hematokriitti, protrombiiniaika, aktivoitu osittaistromboplastiiniaika, verihiutalemäärä, verisolujen kokonaismäärä
 15 ja pieni seeruminkuva. Tulokset osoittivat kaikkien eläinten olevan normaaleja näiden laboratoriomittausten mukaan kaikkina aikoina. Näille eläimille annettiin hepariinihoitoa pienellä annoksella (600 yksikköä IV) leikkauksen aikana mutta ei antikoagulantteja leikkauksen jälkeisen jakson
 20 aikana. Kaikkien muutosten puuttuminen koagulaatiotesteissä ja verihiutalemäärissä oli erityisen rohkaisevaa, kun otetaan huomioon koiran suhteellisesti hyperaktiivinen koagulaatiojärjestelmä ihmiseen verrattuna.

Esimerkki 2

25 Ohutsuolen limakalvonalaiskudos läpimitaltaan pienenä valtimosiirteenä

Tässä kokeessa istutettiin 18 koiraan kaikkiaan 36 siirrettä sekä reisivaltimeen että yhteiseen päänavtimeen. 33 siirrettä 36:sta pysyi avoimena. Näiden eläinten
 30 kohdalla tehtiin samanlaiset laboratoriomittaukset kuin ensimmäisessä tutkimuksessa eikä havaittu mitään epänormaaliuksia. Lisäksi käytettiin tavanomaista kaksikulotteista ultraäänikuvausta avoimuuden ja suonien poikkileikkausläpimitan mittaamiseen.

Neljän päivän kuluttua leikkauksesta lopetetusta koirasta otetun siirrekudoksen patologisessa tutkimuksessa näkyi ei-tromboottinen ontelopinta ja lievästi ahtautunut lähempi liitoskohta. Histologinen tutkimus osoitti veren täyttämien hiussuonien varhaisen läsnäolon siirteen seinä-
 5 mässä, joka on mahdollisesti elimistön luonnollinen puolustautumiskeino infektiota vastaan. Viisi näistä koirista on edelleen elossa lisätutkimuksia varten tätä kirjoitettaessa. Tässä kokeessa pisimpään elossa säilynyt koira on
 10 nyt elänyt 7 kuukautta leikkauksen jälkeen.

Esimerkki 3

Ohutsuolen limakalvonalaiskudos laskimosiirteenä

Tässä kokeessa SIS-siirre sijoitettiin kahden koiran taampaan onttolaskimoon (vastaa ihmisen alaonttolaskimoa) ja viiden koiran etupuoliseen onttolaskimoon (vastaa ihmisen yläonttolaskimoa). Vaikka taemman onttolaskimon siirteet pysyivät avoinna vain 11 ja vastaavasti 14 päivää, patologinen tutkimus osoitti siirteiden epäonnistumisen johtuvan teknisistä virheistä, joiden yhteydessä viallinen liitoskohta oli ahtautunut (läpimitta 8 mm luonnollisen onttolaskimon ja läheisen siirteen läpimitan ollessa 16 mm). Lisäksi kummankin siirteen ontelopintoja peitti ei-tromboottinen "vale-epiteeli", joka koostui tiiviisti pakkautuneesta fibriinistä ja epäkypsästä kollageeniside-
 20 kudoksesta.

Etupuolisen onttolaskimon siirteet pysyivät avoinna siihen asti, kun kolme koirista lopetettiin 7, 14 ja vastaavasti 21 päivän kuluttua leikkauksesta. Kaksi koirista ovat edelleen hengissä tätä kirjoitettaessa, ja siirteet
 30 ovat avoinna 7 viikon kuluttua leikkauksesta. Lähemmässä ommellinjassa näkyi kaikissa kolmessa koirassa merkkejä varhaisesta tromboosista kohdassa, jossa siirteen reuna oli käännetty ja aiheutti veren pyörteistä virtaamista, mutta muu osa loppuosa siirteestä oli ei-tromboottinen.
 35 Lisäksi karkeat patologiset ja histologiset tutkimukset

osoittivat, että siirrettä vuorasi kiiltävä, sileä punainen pinta, jonka ulkonäkö oli samanlainen kuin aiemmissa kokeissa tutkittujen varhaisvaiheen siirteiden pinnan.

Esimerkki 4

5 Ohutsuolen limakalvonalaiskudos omalajivaltimosiirteenä

SIS:ää on käytetty läpimitaltaan suurena omalajisiirteenä koiran aortassa. Omalajisiirteet valmistettiin samalla tavalla kuin edellä omakudosaortasiirretutkimuksemme yhteydessä kuvatut. Tätä kirjoitettaessa koe-eläinten leikkauksesta on kulunut vasta 8 viikkoa, mutta niissä ei näy mitään merkkejä siirteen tromboosista, infektoitumisesta tai pullistumien muodostumisesta (angiogrammein osoitettuna).

15 Esimerkki 5

Ohutsuolen limakalvonalaiskudos vieraslajivaltimosiirteenä

20 SIS:ää on käytetty vieraslajisiirteenä koirassa. Kissasta peräisin oleva SIS-siirre valmistettiin edellä kuvattujen menettelyjen mukaisesti ja sijoitettiin koiraan. Tätä kirjoitettaessa koe-eläimen leikkauksesta on kulunut kaksi viikkoa eikä siinä näy mitään negatiivisia merkkejä.

Patenttivaatimukset

1. Kudossiirrekoostumus, joka käsittää lämminverisen selkärankaisen ohutsuolipalan limakalvon alaiskudoskalvoa (tunica submucosa) ja limakalvon lihaskerrosta (muscularis mucosa) ja tiivistä kerrosta (stratum compactum), jotka mainitut limakalvonalaiskudoskalvo, lihaskerros ja tiivis kerros on irrotettu kerroksena mainitun ohutsuolipalan lihaskalvosta (tunica muscularis) ja limakalvon (tunica mucosa) ontelonpuoleisesta osasta.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen kudossiirrekoostumus, t u n n e t t u siitä, että suolikudospala otetaan tyhjäsuolesta (jejunum).

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen kudossiirrekoostumus, t u n n e t t u siitä, että se on muotoiltu sylinteriksi, jolla on ennalta määrätty ontelon läpimitta ja joka on ommeltu sylinterin pituussuunnassa.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen kudossiirrekoostumus, t u n n e t t u siitä, että tiivis kerros muodostaa sylinterin ontelopinnan.

5. Patenttivaatimuksen 2 mukainen kudossiirrekoostumus, t u n n e t t u siitä, että se on muotoiltu sylinteriksi, jolla on ennalta määrätty ontelon läpimitta ja joka on ommeltu sylinterin pituussuunnassa.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen kudossiirrekoostumus, t u n n e t t u siitä, että tiivis kerros muodostaa sylinterin ontelopinnan.

7. Menetelmä kudossiirrekoostumuksen valmistamiseksi ohutsuolipalasta, t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää vaiheen, jossa mainittu osa kaavitaan herakalvon (tunica serosa), lihaskalvon (tunica muscularis) ja vähintään ontelopuoleisen osan limakalvosta (tunica mucosa) poistamiseksi koostumuksen tuottamiseksi, joka käsittää lämminverisen selkärankaisen ohutsuolipalan limakalvon alaiskudoskalvoa (tunica submucosa) ja limakalvon lihas-

kerrosta (muscularis mucosa) ja tiivistä kerrosta (stratum compactum).

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että koostumus muotoillaan sylin-
5 teriksi, jolla on ennalta määrätty ontelon läpimitta ja
joka on ommeltu sylinterin pituussuunnassa.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että valmistetaan koostumus, jossa
tiivis kerros muodostaa sylinterin ontelopinnan.

