

Aortik Homogreft Canlılığının Biyokimyasal Yöntemlerle Değerlendirilmesi

Dr. Mustafa Özbaran*, Dr. Işıl Mutaf**, Dr. Yüksel Atay*, Dr. Zühre Badak***, Dr. Gülsüm Tokbaş***, Dr. Oya Bayındır**, Dr. Isa Durmaz*

* Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, Bornova-İZMİR

** Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

*** Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Aort kapak hastalıklarının cerrahi tedavisinde protez kapakların dezavantajları aortik homogreft kapak kullanımını son yıllarda daha yaygın bir alternatif haline getirmiştir. Homogreft kapakların canlılık ve dayanıklılığını en üst düzeyde tutabilmek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu çalışmada tavşan aortalarının alınma ve saklanma yöntemleri ile çeşitli solüsyonlar içindeki canlılığının korunması, biyokimyasal tetkikler baz alınarak incelenmiştir. Bu amaçla 7'şerli 3 grup tavşan aortası kullanılmış, gruplar aortların alınış saatine (iskemik peryot) göre (0, 12, 24 saat) ayrılmıştır. Ayrıca her grup iki değişik antibiyotikli, besleyici sıvı ortamda bekletilmiş, 0-8-24-48-168. saatlerde pH, glikoz, laktat ölçümleri yapılmıştır. Ayrıca aort dokularında 0. ve 168. saatlerde doku glikojen tayini gerçekleştirilmiştir. Tüm solüsyonların mikrobiyolojik tetkikleri yapılmıştır. Sonuçta dokunun saklandığı solüsyondaki glikoz tüketimi laktat düzeyinin önemli birer canlılık kriteri olduğuna, dokunun alınma saati ile canlılığı arasında önemli ölçüde ters orantı olduğu sonucuna varılmıştır.

GKD Cer. Derg. 1992;1: 146-151

The Assessment of The Viability of Aortic Homograft Valves by Using The Biochemical Methods

The disadvantages of prosthetic valves widened the use of aortic homograft valves in the surgical management of aortic valvular disease. Many methods are used for homograft valves to maintain the viability and durability at optimal levels. In this study rabbit aortas were examined by biochemical methods for their viability in different solutions. 3 group with 7 rabbits in each were studied and the groups were determined by the harvesting time of their aortas (0 - 12 - 24 hours). Each group were placed in two different antibiotic nutritional media and the measurements of pH, glucose, and lactate levels were made in 0 - 8 - 24 - 48 and 168. hours. The determination of glucogene level in the aortic tissue was made in 0 and 168. hours. All solutions were studied microbiologically. Finally we concluded that the lactate level and the amount of the glucose consumption of the nutritional media are important viability criterions and tissue viability is decreasing as the preservation time increases.

GKD Cer. Derg. 1992;1: 146-151

Kalp hastalıklarının önemli bölümünü oluşturan kalp kapağı patolojilerinde cerrahi yaklaşım iki ana gruba ayrılmaktadır. Bunlar:

- 1) Kapak rekonstrüksiyonu,
- 2) Kapak replasmanıdır.

Rekonstrüksiyon özellikle aort vakalarında ve ilerlemiş kalsifik kapak hastalıklarında başarılı olamamaktadır. Bu amaçla, bozuk kapağın değiştirilmesi fikri doğmuştur. Yapılan çalışmalar sonucunda; ilk protez kapak 21 Eylül 1960 tarihinde mitral pozisyonunda Albert STARR tarafından takılmıştır. Bu operasyon kapak cerrahisinde yeni bir dönem açmış, ancak protez kapaklarla ilgili tromboembolizm, hemoliz ve enfeksiyon gibi bazı komplikasyonlar tam olarak çözümlenememiştir^(2,3,4). Öte yandan 1948 yılında insan kadavra dokusunu damar hastalıklarında kullanma fikri Gross tarafından ortaya atılmış, bunu takiben 1951 yılında DuBost ilk aortik homogrefti abdominal aort anevrizmasında kullanmıştır⁽⁴⁾. İlk girişimlerin ümit kırıcı olmasına karşın, bu konudaki atılımlar durmamış ve 1956 yılında aort yetmezliği olan bir hastanın, inen aortasına ilk aortik homogreft kapak Gordon Murray tarafından implante edilmiştir⁽⁵⁾. Klinik olarak başarıyla uygulanan ve aortik homogreft kapak sürecinin kesintisiz olarak başlamasını sağlayan; İngiltere'den Donald Ross ve Yeni Zelanda'dan Sir Brian Barrat-Boyes'un 1962 yılındaki bildirimleri olmuştur^(6,7).

Cerrahi teknik dışında, homogreft kapakların başarısını engelleyen ve kullanımı açısından tek dezavantaj kabul edilen faktör kapağın dayanıklılığıdır^(2,3,4). Kapağın dayanıklılığını etkileyen en önemli faktörler ise donör ve donörden alınıp takılmasına kadar geçen süredir. U nedenle donöre ait faktörlerle, alınıp-takılma aşamasına kadar izlenen protokoller üzerine birçok araştırma gerçekleştirilmiştir ve çeşitli yöntemlerle korunan kapakların uzun dönem performansları incelenmiştir^(8,9,10,11,12,13).

1960-1970 dönemini kapsayan agresif sterilizasyon teknikleri (irradiasyon ve gluteraldehid) dayanıklılığı azalttığı için terk edilmiştir.

1970 yılından sonra **Fresh Wet-Stored Homogreft** kavramı geliştirilmiştir ki, halen bu yöntem geçerliliğini korumaktadır. Bu yöntemde kapaklar antibiyotikli, besleyici ortam içerisinde +4°C'de korunmaktadırlar. Bu tür kapakların uzun dönem performansları daha iyidir, ancak canlı olmadıkları kabul edilmektedir^(13,14,15).

1975 yılında O'Brien homogreftleri derin dondurma (Cryopreservation) ile saklama yöntemini gerçekleştirmiştir ki, bu kapakların canlılıkları yüksek olup, uzun dönem dayanıklılığının daha iyi olduğuna dair yazılar mevcuttur^(16,17,18).

Doku canlılığı, dayanıklılığı etkileyen, önemli faktördür. Doku canlılığının kesin kriteri doku kültürü yapılmasıdır^(16,18,19). Ancak homogreft olarak alınan dokunun, saklanması amacıyla bulunduğu solüsyonda açığa çıkan metabolitler de dokunun canlılığı hakkında bilgi vermektedir^(16,21). Glikoz kullanımı, canlılık göstergesi olarak kabul edilen bir kriterdir^(16,20). Biz bu çalışmada glikozun Embden-Meyerhof yolu ile anaerobik parçalanmaya gittiği durumda, laktik asid oluşacağı, bunun da ortam pH'ını düşüreceğini düşürerek, homogreftin içinde bulunduğu solüsyonun laktat ve pH değişimlerinin de, canlılık göstergesi olarak değerini araştırmayı amaçladık⁽²⁰⁾. Ayrıca dokunun canlılığını sürdürebilmek amacıyla kendi enerji kaynağı olan glikojeni kullanıp kullanmadığını da araştırmamızda inceledik.

Materyal ve Metod

Bu çalışmada fresh-wet homogreft prezervasyon yönteminde anoksik periyodun, sterilizasyon amacı ile kullanılan antibiyotik kombinasyonunun ve antibiyotikli besi yerinde bekleme süresinin doku canlılığı üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada materyal olarak tavşan aortası kullanılmıştır.

Yedi'şerlik 3 grup halindeki 21 tavşanda, karotis arterden kanatılarak hipovolemik kardiak arrest sağlanmış, ilk 7'inde öldükten hemen sonra, 2. grupta 12 saat sonra, 3. grupta 24 saat sonra, toraks ve karın açılarak steril şartlarda kalpten iliak bifürkasyona kadar aorta disseke edilip çıkartılmıştır. 2 ve 3. gruptaki tavşanlar disseksiyon yapılarına kadar geçen sürede morg şartlarına uygun +4°C'lik bir ortamda bekletilmişlerdir.

Cerrahi yöntemle alınan materyalin bir kısmında direkt olarak doku glikojenine bakılmış, kalan doku 2 parçaya ayrılarak değişik kombinasyonlardan oluşan 2 farklı grup antibiyotik solüsyonu içerisine konup takibe alınmıştır (Tablo 1). Antibiyotik solüsyonlarına konan materyaller 24 saat ışısız ve +22°C'lik oda sıcaklığı ortamında, sonraki 6 gün yine ışısız +4°C'lik ortamda bekletilmişlerdir. Kullanılan solüsyonlar; mikroorganizmaların

Tablo 1. Kullanılan antibiyotik solüsyonu içerikleri

A Solüsyonu	B Solüsyonu
Piperasilin 2 gr.	Cephradine 500 mg.
Cefuroxime 800 mgr.	Gentamycine 80 mg.
Kanamycine 250 mgr.	Mezlocilin 2 gr.
24 cc. distile suda	24 cc. Distile suda
+	+
MEDIUM 199 20 cc.	MEDIUM 199 20 cc.
NaHCO3 12 cc.	NaHCO3 12 cc.
Flucanazole 10 mg.	Flucanazole 10 mg.
100 cc.'ye distile suya	100 cc.'ye distile suya
toplam 124 c.	toplam 124 cc.

üremesi halinde yapılacak biyokimyasal incelemeleri saptıracağından ve ayrıca antibiyotikli solüsyonların yeterli sterilizasyon sağlayıp sağlayamayacağını tesbit etmek amacıyla mikrobiyolojik takibe alınmışlardır.

Yukarıda sözü edilen şekilde hazırlanan ve bekletilen materyallerde, doku canlılığını incelemek için aşağıdaki kimyasal araştırmaları gerçekleştirdik. Ayrıca gerek biyokimyasal, gerekse mikrobiyolojik incelemeler, içerisinde doku bulunmayan kontrol solüsyonlarında da yapılmıştır.

Materyallerin bulunduğu solüsyonların 0, 8, 48 ve 168. saatlerde glikoz için alınan sıvılardan, Boehringer Mannheim enzimatik U-metot kiti ile LKB ultraspec II spektrofotometrede Xmg - cinsinden laktat ölçümü yapılmıştır.

Aorta çıkartıldıktan hemen sonra, dokuda glikojen düzeyi saptanmış, 168. saatte tüm işlemler bittikten sonra solüsyondaki aort dokusu çıkartılarak yeniden doku glikojeni ölçülmüştür.

Doku glikojen tayini için GOOD yöntemi kullanılmıştır. U yöntemle glikojen miktarının ölçülmesi glikojeni etil alkol ile çöktürüp 6 N HCl ile hidroliz ettikten sonra, glikoz oksidaz ile glikoz tayini esasına dayanmaktadır^(19,20).

Doku materyallerinin bulunduğu iki farklı antibiyotik solüsyonunun içerikleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Birinci grup solüsyondaki antibiyotikler halen kliniğimiz homograft sterilizasyon protokolüne uygundur. İkinci grup solüsyon için ise; kapak, aort dokusu ve

miyokarda en yüksek konsantrasyona ulaşan antibiyotikler seçilmiştir.

Doku materyallerinin bulunduğu solüsyonlardan ve kontrol gruplarından, 24. saatte steril şartlarda 0.5 cc'lik örnek alınıp 2 cc. hacmindeki beyin – kalp infüzyon sıvı besiyerine konmuştur. 24 saatlik enkübasyondan sonra bakteriyolojik inceleme için kanlı agara ve mikolojik inceleme için Saburovd dekstroz agara (SDA) ekim yapılmıştır. SDA'da 26°C – 37°C'de 4 gece, kanlı agar 37°C'de 24-48 saat enkübe edilmiştir. Yapılan kültürler incelenmiştir.

Elde edilen tüm veriler Ege Üniversitesi Bilgisayar Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde, Genstat 5 istatistik programında variance analiz kullanılarak değerlendirilmiştir. Çıkan sonuçların korelasyonları t testi kullanılarak yapılmış, anlamlılık değeri bulunmuştur.

Bulgular

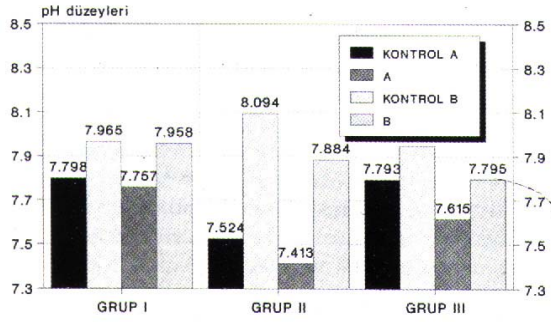
Çalışmada, A ve B antibiyotik solüsyonlarındaki pH, glikoz, laktat düzeylerindeki farklılıklar, glikoz tüketimindeki ve doku glikojen seviyesindeki değişimler aşağıdaki başlıklar altında toplanmıştır.

pH düzeyleri

pH değişimleri kontrol gruplarına göre karşılaştırıldığında; I. grupta A solüsyonunu ortalama pH değeri 7.756 iken kontrol solüsyonunda 7.798, B solüsyonunda 7.957, kontrol solüsyonunda ise 7.965 bulunmuştu ki ortalama pH değeri açısından I. grupta, kontrol gruplarına göre anlamlı değişiklik yoktur. II. grupta pH değerleri A solüsyonunda 7.413, kontrol solüsyonunda 7.524, B solüsyonunda 7.884, kontrol solüsyonunda 8.094 bulunmuştur. II. grupta A ve B solüsyonlarını pH değerleri kontrollerine göre anlamlı olarak düşük (p<0.01) bulunmuştur. III. grupta da aynı sıra ile pH değerleri 7.614, 7.793 ve 7.795, 7.047 bulunmuştur. Bu grupta da pH değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşüktür (p<0.001) (Grafik 1).

Glikoz Tüketimi

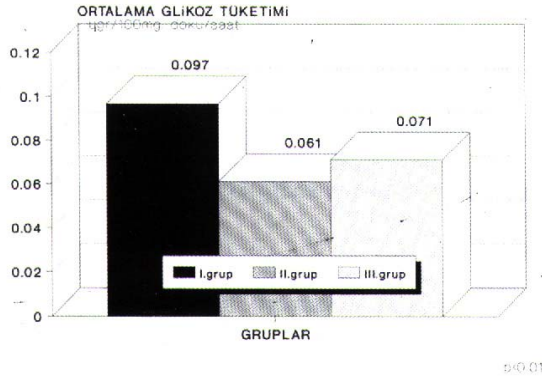
Glikoz tüketimini saptayabilmek için her denekte; ölçümlerin yapıldığı saat, her ölçümden sonra solüsyonda ortaya çıkan azalma ve dokunun ağırlığı göz önüne alınmış, ayrıca saklama sürecinde ölçüm yapılan her saat dilimine değerler bölünerek, o saat dilimindeki saatlik glikoz tüketimi hesaplanmıştır. Sonuçlar 100 mg. dokuya göre standardize edilmişlerdir.



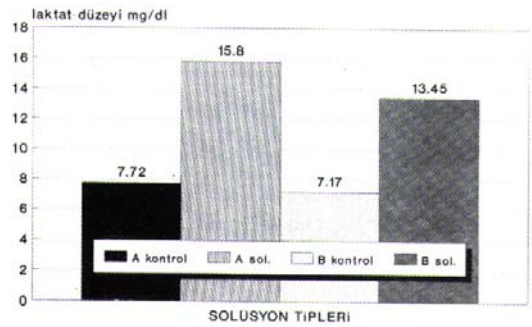
Grafik 1. Gruplarda A ve B solüsyonlarının, kontrollerine göre pH değişim grafiği



Grafik 2. Dokuların saklanma sürecindeki saatlik glikoz tüketimlerini gösteren değişim eğrisi



Grafik 3. Ortalama saatlik glikoz tüketimi



Grafik 4. A ve B solüsyonlarının laktat düzeyleri

Sonuçta $x = \mu\text{gr}/100 \text{ mg doku/saat}$ şeklinde saatlik tüketim bulunmuştur.

A ve B solüsyonları karşılaştırıldığında glikoz tüketimi A solüsyonunda ortalama $0.0765 \mu\text{gr}/100 \text{ mg doku/saat}$, B solüsyonunda ortalama $0.0758 \mu\text{gr}/100 \text{ mg doku/saat}$ olarak anlamlı farklılık yoktur.

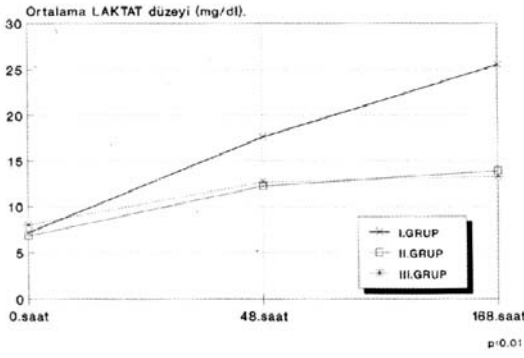
I. grupta 0-8, 8-27, 24-48, 48-168. saatler arasında glikoz tüketimi ($\mu\text{gr}/100 \text{ mg. doku/saat}$) sıra ile 0.2186, 0.1048, 0.0506, 0.0121 olarak bulunmuştur ki tüketimde azalma söz konusudur ($p < 0.01$ 'dir) II. grupta aynı sıra ile glikoz tüketim değerleri 0.1348, 0.0651, 0.0374, 0.0079 olarak bulunmuştur (0-8 ile 8-24 saat arası için $p < 0.05$ olarak bulunmuştur). III. grupta yine aynı sıra ile 0.1476, 0.0852, 0.0431, 0.0068 bulunan glikoz tüketimindeki düşme tüm saatler için

anlamlıdır ($p < 0.01$ 'dir) (Grafik 2).

Sonuçlara bakıldığında I. grupta ortalama glikoz tüketimi $0.065 \mu\text{gr}/100 \text{ mg doku/saat}$, II. grupta $0.0613 \mu\text{gr}/100 \text{ mg. doku/saat}$, III. grupta $0.0707 \mu\text{gr}/100 \text{ mg. doku/saat}$ olarak bulunmuştur. Buna göre I. gruptaki tüketim II. ve III. gruba göre anlamlı olarak farklıdır ($p < 0.01$) II. ve III. gruplar arasında fark yoktur (Grafik 3).

Laktat Düzeyleri

Laktat düzeyleri ortalama değeri A solüsyonu için 15.80 mg/dl , (kontrol 7.72 mg/dl) B solüsyonu için 13.45 mg/dl. , (kontrol 7.17 mg/dl) olarak bulunmuştur. A ve B solüsyonlarındaki ortalama laktat düzeyleri kontrollerine oranla anlamlı olarak yükselmiştir. ($p < 0.01$) (Grafik 4). I. grupta 7.16 mg/dl. olan 0. saat değeri 48. saatte



Grafik 5. Zamana göre laktat değişimi

Tablo 2. Ortalama doku glikojen değerleri

	A sol.		B sol.	
	0. saat	168. saat	0. saat	168. saat
I. Grup	390.3±61.4	369.7±49.1	507.7±38.8	
II. Grup	185.0±26.8	294.3±31.6	469.9±45.0	
III. Grup	259.4±26.8	307.0±50.6	458.9±56.5	

Değerler μ g. glikoz/gr doku yaş ağırlık

17.62 mg/dl'ye 168. saatte 25.52 mg/dl'ye yükselmiştir. II. grup için bu değerler; 6.79 mg/dl, 12.25 mg/dl, 13.91 mg/dl, III. grup için ise; 8.02 mg/dl., 12.7 mg-dl, 13.25 mg/dl olmuştur. Bu sonuçlara göre I. gruptaki tüm yükselmeler anlamlıdır ($p < 0.01$). II. ve III. gruplarda 0 ile 48. saat arası yükselme anlamlıdır ($p < 0.01$). 48 ile 168. saatler arasında anlamlı farklılık yoktur. I. gruptaki tüm yükselmeler II. ve III. gruba göre anlamlı iken, ($p < 0.01$), II. ve III. grup arası değişimler anlamsızdır (Grafik 5).

Doku Glikojen Düzeyleri

İlk alınan glikojen değerleri ile 168. saatte A ve B solüsyonlarında bekleyen dokulardaki glikojen değerleri arasında anlamlı bir farklılık yoktur. Ortalama değerler Tablo 2'de gösterilmiştir.

Mikrobiyolojik İnceleme

Materyal metod bölümünde belirtilen şekilde elde edilen kültürlerin hiçbirisinde üreme olmamıştır.

Tartışma

Son zamanlarda dünyada yaygın olarak kullanılan homogreftlerin uzun dönem sonuçları ile homogreft dokusunun canlılığı arasında çok yakın bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle doku canlılığı üzerindeki çalışmalarında büyük bir artış olduğu gözlenmektedir^(16,18,19). Doku canlılığı tayininde genel olarak glikoz tüketimi ve doku kültürü yöntemleri kullanılmaktadır^(4,16,19,21,22). Bu çalışmada; kimyasal reaksiyonların bu konudaki değeri araştırılmak istenmiştir.

Çalışmamızda pH verileri incelendiği zaman, I. grupta pH'ın zaman süreci içerisinde 0. saatte göre düştüğünü, ortamın asidoza kaydığını görmekteyiz. Bu bize dokunun glikoz kullanımı sonucunda ortamda laktik asidin arttığını göstermektedir, bu da dokunun canlılığını devam ettirmesinin bir belirtisidir. Halbuki II. ve III. grupta kontrol solüsyonuna göre ilk ölçümlerde pH düşmekte, takip eden ölçümlerde düzeyin sabit kaldığı gözlenmektedir. Bu durum ilk başta iskemik dokunun ortama karışmasıyla asit nitelikli metabolitlerin sıvıya geçtiğini ve pH'yı düşürdüğünü, daha sonraki ölçümlerde sabit kalması ise dokuda metabolik olayların azaldığını veya durduğunu düşündürmektedir.

Glikoz tüketimi doku canlılığı tayininde etkili bir biyokimyasal yöntemdir^(16,20,23). Eğer dokuda canlılık mevcutsa ortamdaki glikozu kullanacaktır. Nitekim bizim çalışmamızda da her 3 grupta glikoz tüketimi bütün deney süresince devam etmiş, ancak sonra doğru tüketim miktarında azalma izlenmiştir. Bu ise deney sonuna doğru canlılığın azaldığını düşündürmektedir. Yine II. ve III. gruplarda Grafik 2'de görüldüğü şekilde glikoz tüketimi I. gruba oranla daha düşük seviyede seyretmektedir ki, bu da; II. ve III. gruptaki dokuların canlılığının I. grup kadar iyi olmadığını kanıttır. Buradan da doku canlılığı açısından anoksik periyodun (dokunun, donörün ölümünden besiyerine konana kadar geçen süre) son derece önemli olduğu anlaşılmaktadır. I. grupta glikoz tüketimi 48. saatten sonra belirgin olarak azalmaktadır. Homogreftlerin bu süreçten önce kriyoprezervasyon işlemine tabi tutulmaları halinde canlılığın daha fazla korunmuş olabileceği ileri sürülmektedir⁽¹⁷⁾. II. ve III. grubun glikoz tüketim eğrilerinde istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Bu da bize morg koşullarında bekletilen donörlerden 12 veya 24 saat sonra alınan aort dokularının canlılığında çok önemli bir fark olmadığını gösterir.

Laktat, glikozun Emdben-Myerhof yolu ile parçalanmaya gittiği zaman ortaya çıkan bir metabolittir⁽²⁾. Eğer doku canlılığını sürdürüyor ve ortamdaki glikozu kullanıyorsa laktat açığa çıkacaktır. Çalışmamızda kontrol solüsyonuna göre laktat düzeyi tüm gruplarda artış göstermiştir. Ancak I. grupta, II. ve III. gruba göre bu artış daha belirgindir ki; bu da canlılığın I. grupta daha iyi olduğunu göstermektedir. 48. saatten sonra II. ve III. gruptaki laktat seviyesinin sabit kalışı doku canlılığını kaybolduğunu düşündürmektedir. I. grupta 168. saatte bile laktat artışı devam etmektedir. Bu durum anoksik periyodun çok kısa olduğu homogreftlerin besiyerinde canlılığını daha uzun süre devam ettirebildiğini göstermektedir. Glikoz tüketiminde olduğu gibi laktat artışında II. ve III. gruplar arasında önemli fark gözlenmemiştir (Grafik 4, 5).

Doku canlılığını devam ettirdiği sürece öncelikle ortamdaki glikozu, daha sonra yapısındaki enerji kaynağı olan glikojeni tüketmeye başlayacaktır. Bu düşünceden hareket ederek doku glikojenindeki değişiklikleri araştırdık. Ölçümlerde anlamlı bir değişim saptayamadık. Bu durum; besiyerinin glikozdan zengin olması, dolayısıyla deney süresince dokunun, ortamdaki glikozu kullandığı şeklinde yorumladık.

Mikrobiyolojik incelemelerde; deneyde kullandığımız antibiyotik konsantrasyonlarının sterilizasyon için yeterli ve doku canlılığı açısından sakıncasız olduğunu gözledik. Bu nedenle bu tip antibiyotiklerin homogreft sterilizasyonunda güvenle kullanılabilceği kanısındayız.

Sonuçlar

- I.** Glikoz tüketim tayini, laktat düzeyindeki değişiklikler daha çarpıcı olmakla beraber besiyeri ortamının pH değişimi canlılık hakkında bilgi veren kıymetli biyokimyasal analizlerdir.
- II.** Çalışmada antibiyotikler bu konsantrasyonda homogreft sterilizasyonu için yeterlidir ve canlılığa olumsuz yönde etkileri yoktur.
- III.** Anoksik periyodun uzunluğu doku canlılığını olumsuz yönde etkileyen en önemli faktördür.
- IV.** Besiyeri ne kadar ideal olursa olsun saklama süresi uzadıkça doku canlılığını kaybetmektedir.

Kaynaklar:

1. Starr A, Edwards ML: Mitral replacement: Clinical experience with a ball-valve prothesis. *Ann Surg* 1961;54:726.
2. Baue AA, Geha A: Glenn's Thoracic and Cardiovascular Surgery. V. Edition, Appleton & Lange, 1991; 1692-1729.
3. Kirklin JW, Boyes BB: Cardiac Surgery. John Wiley & Sons. 1986;441-44.
4. Hopkins R: Cardiac reconstructions with allograft valves. Springer & Verlag. New York, 1989;3-88.
5. Murray G: Homologous aortic valve segment transplants as surgical treatment for aortic and mitral insufficiency. *Angiology* 1956;7:466.
6. Ross DN: Homograft replacement of the aortic valve. *Lancet* 1962;2:487.
7. Barrat-Boyes BG: Homograft aortic valve replacement and aortic incompetence and stenosis. *Thorax* 1964;19:121.
8. Heimbecker RO, Aldridge HE, Hlemire G: The durability and fate of aortic valve grafts. *J Cardiovasc Surg* 1968;9:611.
9. Heimbecker RO: Durability of fresh homograft. *Ann Thorac Surg* 1986;42:602.
10. Malm JR, Bowman FO Jr., Harris PD, Kovalick ATW: An evaluation of aortic valve homografts sterilized by electron beam energy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1967;54:471.
11. Bech PM, Bowman D Jr, Kaiser GA, Malm JR: Frozen irradiated aortic valve homografts sterilized by electron beam energy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1967;54:471.
12. Barrat-Boyes BF, Roch ABG, Whitlock RML: Six year review of results of freehand our using on antibiotic sterilized homograft valve. *Circulation* 1977;55:353.
13. Miller DC: Fresh aortic homografts: Long term results with freehand aortic valve replacement. *J Cardiac Surg* 1987;2:185.
14. Penta A, Quareshi S, Radley-Smith R, Yacoub MH: Patient status 10 or more years after fresh homograft replacement of the aortic valve. *Circulation* 70 (suppl): 1984:I:182.
15. Thompson R-Yocoub M, Ahmed M, et al: The use of fresh unstented homograft valves for replacement of the aortic valve. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1980;79:896.
16. O'Brien BF, Stafford G, Gardner MMAH, et al: A comparison of aortic valve replacement with viable cryopreserved and fresh allograft valves with a note on chromosomal studies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987;94:812.
17. O'Brien MF, Stafford G, Gardner M, et al: The viable cryopreserved allograft aortic valve. *J Cardiac Surg* (Suppl I): 12987;2:153.
18. AngellWW, Angel JD, Dury JH, et al: Long term follow up of viable frozen aortic homografts: a viable homograft valve bank. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987;93:815.
19. Jeffry P, Lupinetti M, Mardan A: Endothelial cell viability in the rat aortic wall. *Ann Thorac Surg* 1991;51:204.
20. Martin J: Harper's Review of Biochemistry. Lange M.P. 19th Ed. 183;164-166.
21. O'Brien M, Johnston N, Stafford G: A study of the cells in the explanted viable cryopreserved allograft valve. *J Cardiac Surg* 3 (suppl 3) 1988;279.
22. Jonas R, Ziemer G, Britton L: Cryoreserved and fresh antibiotic-sterilized valved aortic homograft conduits in a long term sheep model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1988;96:746.
23. Bodnar M, Matsuki O, parker R, Ross DN: Viable and nonviable aortic homografts in the subcoronary position. A comparative study. *Ann Thorac Surg*. 1980;47:800.