

Chirurgiczne aspekty pobierania nerek u świń dla celów ksenotransplantacji

JERZY SKUCIŃSKI, WOJCIECH NOWAK, JAROSŁAW WIECZOREK*, RAFAŁ SOLECKI

I Katedra Chirurgii Ogólnej Collegium Medicum UJ, ul. Kopernika 40, 31-501 Kraków

*Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki w Balicach, ul. Krakowska 1, 32-883 Balice k. Krakowa

Skuciński J., Nowak W., Wieczorek J., Solecki R.

Surgical aspects of pig kidneys collection for xenotransplantation

Summary

The number of patients waiting for transplants has increased despite the constant growth of the number of transplants performed. This is the reason why the possibility of using animal organ donors is taken into consideration. Since 2002, the problems concerning xenotransplantation have been investigated in Poland in the frame of the project: Application of transgenesis in genetic modification of pigs in order to gain organs for transplantation in humans. In the presented paper the possibility of use of transgenic pig kidneys for allogenic and heterogenic transplantation in clinical aspect was evaluated, with the special compliance of surgical methods. The proposed surgical technique of kidney transplantation in pigs derived from the methods used in human medicine and consisted of three stages: the operation of collecting the kidneys en-block, preservation of collected organs and their transplantation. The aim of the first stage was the isolation of the both donor kidneys as fast as possible in a manner not causing the injury of kidney parenchyma, with the maintenance of all anatomical and functional structures and blood vessels. In the study, 3 non-transgenic and 6 transgenic sows with the block of the gene $\alpha 1,3GT$ were evaluated. In the presented studies the modification of the routine technique of kidney collection used in human transplantology was performed with the possibility of application of the method for allo- and xenotransplantation in pigs. The maintenance of the defined conditions of perfusion and storage of the collected organs is the requirement of the preservation of viability of the transplant for the time necessary for preparing the organ and the recipient for the transplantation.

Keywords: xenotransplantation, pig, kidney

Wprowadzone 40 lat temu eksperymentalne metody przeszczepiania narządów są obecnie stosowane z wyboru przy leczeniu zaawansowanej niewydolności nerek, serca, wątroby, płuc i trzustki. Efektywność leczenia tą metodą niewydolności nerek jest bardzo wysoka, roczne przeżycie pacjentów otrzymujących pierwotny przeszczep nerki przekracza 97%, zaś pięcioletnie 93% (9) i jest wyższe w porównaniu do pacjentów leczonych dializoterapią (23). Roczny koszt leczenia chorego ze schyłkową niewydolnością nerek wynosi 33 000-50 000 \$, a w przypadku dializoterapii domowej 55 000-80 000 \$, podczas gdy dla transplantacji nerek koszt rocznego leczenia to ok. 10 000 \$ (12). Wobec sukcesów transplantologii trudności techniczne, wysokie koszty i komplikacje okołoperacyjne nie mają znaczenia, a głównym problemem jest brak dostatecznej ilości narządów do transplantacji. W krajach zrzeszonych w Eurotransplant International Foundation odsetek dawców w 2003 roku wynosił 14,7/mln mieszkańców, pobrano 3345 nerek i wykonano 3046 transplantacji, na 12 382 oczekujących biorców. W Polsce średnia liczba dawców wynosiła 14,5/mln mieszkańców. Zgłoszono 669 dawców, zakwali-

fikowano 556, od których pobrano i przeszczepiono 1040 nerek, na 2384 oczekujących biorców, zarejestrowanych w Krajowej Liście Biorców Poltransplantu (14).

Liczba pacjentów oczekujących na przeszczep zwiększa się pomimo stałego wzrostu ilości wykonywanych transplantacji. Z tego powodu bierze się pod uwagę możliwość wykorzystania zwierząt jako dawców narządów. Transplantacje międzygatunkowe mają być traktowane jako tzw. przeszczepy czasowe lub pomostowe do momentu znalezienia dawcy docelowego. Według niektórych autorów, narządy zwierząt mogą być mniej wrażliwe na nawrót choroby i gwałtowną destrukcję spowodowaną wcześniejszym uczuleniem, mogą pozwolić na rozważenie transplantacji u pacjentów, którym z powodu wieku lub towarzyszących schorzeń nie oferuje się takiej możliwości w oparciu o obowiązujące obecnie standardy. Wykorzystanie zwierząt jako źródła organów pozwoli także na wcześniejszą immunomodulację biorców, a przez to na planowane przeprowadzenie operacji i zwiększenie tolerancji na wprowadzany przeszczep, co nie jest możliwe przy przeszczepach od zmarłych. Dodatkowo wykorzystanie zwierząt jako źródła narządów mogłoby

ograniczyć transmisję czynników infekcyjnych, takich jak wirus Epstein-Barr i cytomegalowirus, które są głównymi czynnikami chorobowymi po allotransplantacji u ludzi (15).

Obecnie w 20 ośrodkach na świecie prowadzone są bardzo intensywne badania dotyczące ksenotransplantacji (3). Za gatunek modelowy przyjęto świnie, a szczególnie rasy świń miniaturowych, które pod względem wielkości i wydolności narządów bardziej odpowiadają organom człowieka (2, 19, 24).

Najistotniejsze w ksenotransplantacji jest obecnie przełamanie bariery międzygatunkowej. Dotychczas poznano 16 węglowodorowych epitopów międzygatunkowych, dla których mogą występować naturalne przeciwciała, najistotniejszy z nich to α Gal (2). Eliminacja swoistego substratu α 1-3galaktozy (α Gal) przez zablokowanie enzymu α -1,3-galaktozylotransferazy (α 1,3GT, GGTA1 EC2.4.1.51), odpowiedzialnego za syntezę epitopu pozwala na przełamanie międzygatunkowej bariery immunologicznej (11). Uzyskanie świń z zablokowanym genem α 1,3GT lub pozbawionych go było największym sukcesem ksenotransplantacji (13)

W Polsce badania dotyczące ksenotransplantacji prowadzone są od 2002 r., w ramach projektu „Wykorzystanie transgenezy w genetycznej modyfikacji świń dla pozyskiwania organów do transplantacji u człowieka”. Wyhodowanie pierwszego transgenicznego knura dla potrzeb ksenotransplantacji potwierdzono w październiku 2003 r. (6). Modyfikacja genetyczna polegała na wprowadzeniu konstrukcji genowej (pFut-GFPBsd, FUT II) α 1,2-fukozylotransferazy człowieka (17). Mechanizm działania α 1,2-fukozylotransferazy opiera się na wiązaniu cząsteczki N-acetylolaktozoaminy (N-lac), która jest substratem dla α -galaktozylotransferazy. Konkurencyjne działanie fukozylotransferazy wobec α GT eliminuje poziom epitopu α Gal i pozwala na ograniczenie nadostrej reakcji odrzucania przeszczepu (16).

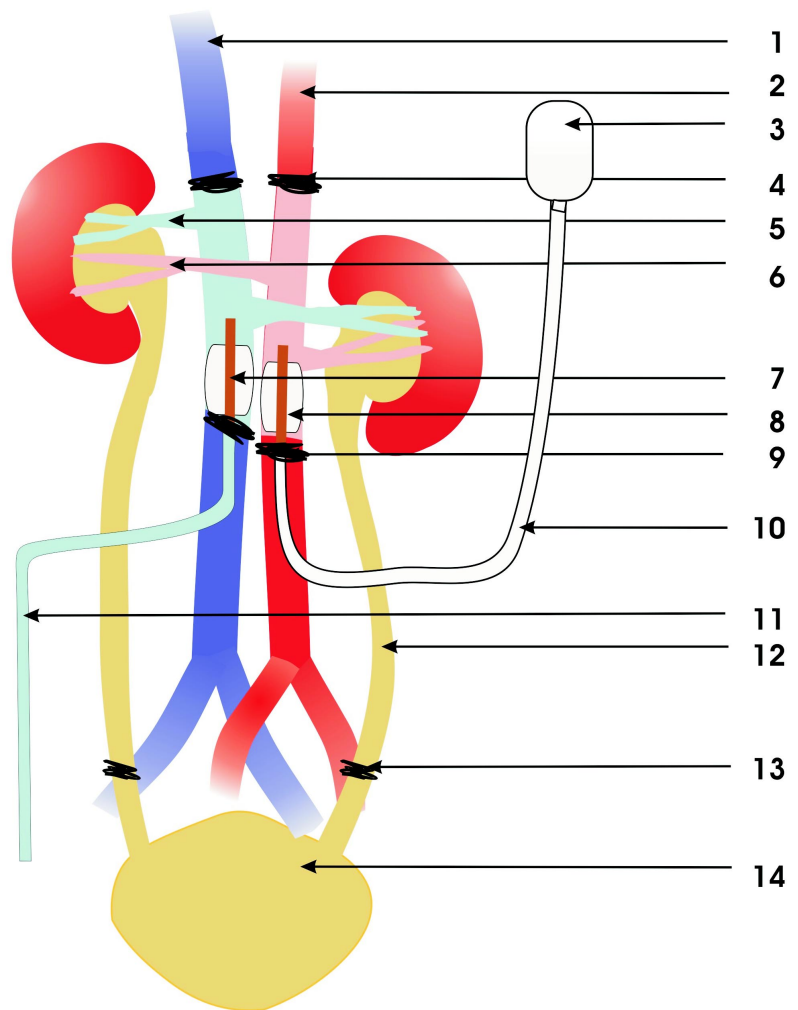
W niniejszych badaniach określano możliwość wykorzystania nerek transgenicznych świń do przeszczepów allogenicznych i heterogenicznych w aspekcie klinicznym, ze szczególnym uwzględnieniem metodyki chirurgicznej.

Zaproponowana technika transplantacji nerek u świń wywodziła się z metodyki stosowanej w medycynie człowieka i obejmowała trzy etapy: operację pobrania nerek en-block, płukanie i przechowywanie pobranych narządów oraz ich przeszczepienie. Celem pierwszego etapu było wyizolowanie obu nerek dawcy w najkrótszym czasie, w sposób nie uszkadzający mięszu z zachowaniem wszystkich struktur anatomicznych, czynnościowych i naczyń krwionośnych.

Materiał i metody

Przygotowanie dawczyń. Dawczyniami nerek były 3 nietransgeniczne i 6 transgenicznych loszek w wieku ok. 6 miesięcy, masie ciała 40-55 kg, bez widocznych objawów chorobowych. Zwierzęta poddano 21-dniowej aklimatyzacji w nowym środowisku. Na 24 godziny przed zabiegiem podano enrofloksacynę (Enroxil 5%, Krka) w dawce 5 mg/kg *i.m.* i wstrzymano podawanie karmy, zapewniając swobodny dostęp do wody. Bezpośrednio przed zabiegiem do pęcherza moczowego założono kateter Folleya 14 FR (Kendall), a do prawej i lewej żyły brzeżnej ucha założono kaniulę 20GA (Venflon BD 1,0).

Prowadzenie znieczulenia. Znieczulenie złożone obejmowało premedykację atropiną (Atropinum Sulfuricum 0,5 mg, Polfa) w dawce 0,06 mg/kg *i.m.* i azaperonem (Stresnil, Janssen Animal Health BVBA) w dawce 3 mg/kg *i.m.* Znieczulenie ogólne indukowano przez podanie thiopentalu sodu (Thiopental, Biochemie GmbH) w dawce 8 mg/kg *i.v.* w bolusie i podtrzymywano, dodając sukcesywnie



Ryc. 1. Schemat płukania nerek *in situ*

Objaśnienia: 1 – żyła główna tylna; 2 – aorta; 3 – płyn płuczący; 4 – podwiązka proksymalna aorty; 5 – żyła nerkowa; 6 – tętnica nerkowa; 7 – cewnik w żyłę główną tylną odprowadzający wypłukaną krew; 8 – cewnik w aorcie z płynem płuczącym; 9 – podwiązka dystalna aorty; 10 – płyn płuczący; 11 – wypłukana krew; 12 – moczowód; 13 – podwiązka na moczowodzie; 14 – pęcherz moczowy

1/5-1/4 dawki początkowej według efektu działania. Prowadzono stałą kontrolę pracy układu oddechowego i sercowo-naczyniowego ze względu na depresyjne działanie thiopentalu na ośrodek oddechowy i układ krążenia.

Pobranie nerek. Cięcie przez powłoki brzuszne wykonano w linii pośrodkowej ciała od wyrostka mieczykowego mostka do spojenia łonowego. Dokładne oględziny narządów jamy brzusznej wykluczyły zmiany patologiczne i anomalie anatomiczne. Po rozległym odpreparowaniu kolejno krezki okrężnicy, krezki jelit cienkich i uwolnieniu więzadła wątrobowo-dwunastniczego narządy jamy brzusznej przesunięto prawostronnie dogłowowo i ustabilizowano. Na tępo wyizolowano aortę z odejściem tętnic nerkowych, żyłę główną tylną z ujęciem żył nerkowych. Wypreparowano moczowody na całej długości do ujścia do pęcherza moczowego. Po dożylnym podaniu 5000 j.m. heparyny (Heparin Biochemie 25.000 j.m., Biochemie Austria) przystąpiono do płukania i ochłodzenia nerek *in situ*. Do aorty i żyły głównej wprowadzono kateter Folleya 10FR (Kendall), kolejno podwiązano główne pnie naczyniowe (aortę i żyłę czczą tylną), dystalnie i proksymalnie od odejścia naczyń nerkowych z zachowaniem 4 cm marginesów, zakładając podwójne przewiązki Vicryl 2 (J&J Inc.). Nerki płukano płynem Ringera (Baxter Terpol) schłodzonym do temperatury 4°C pod ciśnieniem hydrostatycznym ok. 100 cm H₂O, przez ok. 20 min., odprowadzając płyn z żyły głównej podciśnieniem (ryc. 1). Jednocześnie nerki obłożono jałowym lodem. Po zakończeniu perfuzji podwiązano moczowody ok. 2 cm od ujścia do pęcherza szwem Vicryl 2 (J&J Inc.). Obie nerki z pozostawionymi odcinkami pni naczyniowych i moczowodami uwolniono z przestrzeni pozaotrzewnowej i pobrano *en block*.

Rozdzielenie i płukanie nerek. Nerki wyjęto z jamy brzusznej i umieszczono w pojemniku z lodem. Żyłę główną dolną rozcięto wzdłuż przedniej ściany, identyfikując ujścia żył nerkowych, a następnie rozdzielono żyły należące do prawej i lewej nerki z zachowaniem 4 mm łat naczyniowych. W kolejnym etapie wzdłuż tylnej ściany rozcięto aortę, identyfikując tętnice nerkowe, które rozdzielono podobnie jak żyły nerkowe. Rozdzielone nerki zostały ponownie wypłukane. Do tętnicy nerkowej wprowadzono kaniulę i rozpoczęto płukanie płynami konserwującymi Biolasol BM Plus-1 (Biocheffa FZPN, Sosnowiec) lub ViaSpan (Berlzer UV) schłodzonych do temperatury 4°C, ciągłym strumieniem pod ciśnieniem ok. 100 cm H₂O przez ok. 20 minut, do uzyskania wypływu czystego płynu. Wypływ płynu obserwowano przy ujęciu żyły nerkowej. Na tym etapie dokonano klasyfikacji nerek do transplantacji pod względem budowy anatomicznej, zmian patologicznych oraz budowy, przebiegu i szczelności naczyń krwionośnych. Do transplantacji pobierano zawsze większą nerkę, bez zmian patologicznych i anomalii anatomicznych w obrębie naczyń, pozostałe nerki wykorzystano do określenia stopnia apoptozy.

Wyniki i omówienie

Wszystkie z 18 pobranych, rozdzielonych i wypłukanych nerek oceniono jako prawidłowe pod względem wielkości, kształtu i budowy anatomicznej. W jednej nerce stwierdzono wybroczyny podtorebkowe wielkości 1-2 cm pochodzenia mechanicznego. Stwierdzono

6 odmian anatomicznych w przebiegu naczyń krwionośnych. W 4 przypadkach obserwowano niskie odgałęzienie nadnerczowe doogonowe tętnicy nerkowej, w dwóch podwójną tętnicę nerkową. Nie obserwowano anomalii w budowie i przebiegu żył nerkowych. Do transplantacji zakwalifikowano 11 narządów (4 nietransgeniczne i 6 transgenicznych), z których przeszczepiono 9. Pozostałe nerki zakwalifikowano do oceny uszkodzenia organu w trakcie perfuzji i przechowywania. Nie obserwowano różnic w wielkości i budowie anatomicznej nerek i naczyń nerkowych między zwierzętami transgenicznymi i nietransgenicznymi.

W przeprowadzonych badaniach wykonano modyfikację rutynowo stosowanej w transplantologii człowieka techniki pobierania nerek z możliwością zastosowania do przeszczepów allo- i ksenogenicznych u świń. Szczególną uwagę zwrócono na przygotowanie biorców do zabiegu, prowadzenie znieczulenia, możliwie prosty i szybki sposób dojścia do pobieranych narządów, technikę pobrania, płukania i rozdzielania graftu.

Przygotowanie biorców do zabiegu obejmowało: rutynowo stosowaną: 24-godziną głodówkę, profilaktyczne podanie chemioterapeutyku o szerokim spektrum na dobę przed pobraniem narządów, zapewnienie swobodnego dostępu do naczyń krwionośnych oraz opróżnienie pęcherza moczowego bezpośrednio przed zabiegiem. Zrezygnowano natomiast z podania heparyny przed zabiegiem. Opisany sposób przygotowania zwierząt do zabiegu okazał się efektywny i przyniósł pożądane rezultaty.

Narkozę indukowano i prowadzono w oparciu o znieczulenie złożone infuzyjne z wykorzystaniem thiopentalu sodu. Thiopental jest najczęściej stosowanym barbituranem krótko działającym w medycynie ludzi i zwierząt. Jest rutynowo stosowany do indukcji znieczulenia u ludzi. Istnieje możliwość wykorzystania thiopentalu także do znieczuleń podczas długo trwających zabiegów operacyjnych (4), w takich sytuacjach znieczulenie przedłuża się przez podawanie dodatkowych dawek (8). W przeprowadzonych badaniach po podaniu jednorazowej minimalnej dawki thiopentalu sodu wystąpił pełny zanik świadomości, zniesienie czucia bólu i obniżenie napięcia mięśniowego. Narkozę przedłużano, dodając sukcesywnie 1/5-1/4 dawki początkowej według efektu działania. U wszystkich zwierząt poddanych narkozie wystąpiło zmniejszenie liczby i głębokości oddechów oraz przyspieszenie akcji serca. Krótkotrwały bezdech, który ustąpił po wentylacji i tlenoterapii stwierdzono u 1 z 9 poddanych narkozie zwierząt. Czas narkozy wynosił 70-90 minut. W trakcie trwania znieczulenia ilość podawanego preparatu zmniejszała się, a okresy między podaniami ulegały wydłużeniu. Było to prawdopodobnie następstwem kumulacji i powolnego uwalniania thiopentalu z tkanki tłuszczowej i mięśni, a także metabolizowania części thiopentalu do pentobarbitalu przez usuwanie reszt siarkowych (5). Zaproponowa-

ny model znieczulenia pozwala na szybką i pełną indukcję oraz skuteczne i proste prowadzenie narkozy przez cały czas operacji, przy stałej kontroli anestezyjologicznej. Podobne modele znieczulenia infuzyjnego do operacji przeszczepienia nerki proponowano z zastosowaniem ketaminy lub pentobarbitalu (7, 22).

Ważnym etapem operacji było zapewnienie swobodnego dostępu do nerek i głównych pni naczyniowych. Budowa anatomiczna i topograficzna narządów wewnętrznych świni, szczególnie duża objętość jelit, które są 4-6-krotnie dłuższe w porównaniu z człowiekiem oraz ich gatunkowo typowy przebieg, szczególnie okrężnicy wstępującej, uniemożliwiły wykorzystanie techniki stosowanej w transplantologii ludzkiej. Zastosowana modyfikacja polegająca na całkowitym przecięciu obszernej krezki jelita grubego ze zwojami okrężnicy wstępującej pozwoliła na uwidocznienie lewej nerki. W następnej kolejności przecięcie krezki jelita cienkiego i więzadła wątrobowo-dwunastniczego uwidocznilo główne pnie naczyniowe i prawą nerkę.

Ocena i wypreparowanie głównych pni naczyniowych aorty i żyły czczej tylnej z odejściem naczyń nerkowych pozwoliły na przeprowadzenie perfuzji i ochłodzenia nerek *in situ*, przed pobraniem. Po 20-minutowym płukaniu uzyskano wypływ czystego płynu perfuzyjnego. W tym czasie nerki schłodzono do temperatury ok. 10°C. Pierwsze płukanie nerek ogranicza do minimum czas ciepłego niedokrwienia po zamknięciu naczyń, co ma kluczowe znaczenie w przebiegu całej operacji przeszczepienia nerek (10). Czas ciepłego niedokrwienia nie może przekroczyć 10 minut (21). Takie postępowanie wynika z reguły termodynamiki van't Hoffa, według której spadek temperatury o każde 10°C powoduje 2-4-krotne obniżenie kinetyki reakcji chemicznej, co w warunkach głębokiej hipotermii sięgającej 10-15°C powoduje spadek metabolizmu tkanek i zużycia tlenu do 5-10% w porównaniu do warunków fizjologicznych. Obniżenie metabolizmu komórkowego ogranicza degradację tkanek, głównie błon komórkowych, do której dochodzi w okresie niedokrwienia (1). Utrzymanie homeostazy tkanek odbywa się poprzez zapobieganie kwasicy komórkowej, zachowanie zasobów energetycznych komórek, eliminowanie czynników cytotoksycznych, zachowanie równowagi wodno-elektrolitowej, głównie jonów wapnia, sodu i potasu, oraz ograniczenie do minimum przemian katabolicznych przez utrzymanie stałej niskiej temperatury (18, 20). Zachowanie określonych warunków perfuzji i przechowywania pobranych narządów warunkuje zachowanie żywotności przeszczepu na czas przygotowania narządu do przeszczepu i przygotowania biorcy.

Zaproponowany model chirurgiczny pozwala na szybkie pobranie narządów bez uszkodzenia ich struktury, z zachowaniem ciągłości i szczelności naczyń krwionośnych oraz maksymalne skrócenie ciepłego niedokrwienia.

Piśmiennictwo

1. Brodsky S. V., Yamamoto T., Tada T., Kim B., Chen J., Kajiya F., Goligorsky M. S.: Endothelial dysfunction in ischemic acute renal failure: rescue by transplanted endothelial cells. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2002, 282, 1140-1149.
2. Bühler L., Friedman T., Iacomini J., Cooper D. K. C.: Xenotransplantation – state of the hear – update 1999. *Frontiers Biosci.* 1999, 4, 416-432.
3. Deschamps J. Y., Roux J. Y., Sai P., Gouin E.: History of xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2005, 12, 91-109.
4. Dyess D. L., Tacchi E., Powell R. Q., Ardell J. L., Roberts W. S., Ferrara J. J.: Development of a protocol to provide prolonged general anesthesia to pregnant sows. *J. Invest. Surg.* 1994, 7, 235-242.
5. Garbuliński T.: Farmakologia weterynaryjna. PWRiL, Warszawa 1984.
6. Jura J., Słomski R., Smorąg Z., Gajda B., Wieczorek J., Lipiński D., Kalak R., Juzwa W., Zeyland J.: Production of transgenic pigs suitable for xenotransplantation with the use of standard DNA microinjection. *Ann. Anim. Sci.* 2004, 4, 321-327.
7. Kili N., Erhardt W.: Infusion of pentobarbital and fentanyl combination for long-term anaesthesia in pigs. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2004, 28, 603-607.
8. Komar E.: Anestezjologia weterynaryjna. Wyd. AR, Lublin 1984.
9. Kuzniowski M., Ignacak E., Bucki J., Czupryna A., Prokop A., Hajto B., Zawilińska B., Skuciński J., Giza D., Popiela T., Zembala M., Sulowicz W.: Results of kidney transplantation in Kraków in 1992-2000. *Przegl. Lek.* 2000, 57, 619-623.
10. Lou E. S., Tellis V. A., Veith F. J., Gliedman M. L., Freed S. Z.: Emergency cadaveric donor en bloc nephrectomy by in-corpora perfusion technique. *Urology* 1976, 7, 363-365.
11. Mercier D., Charreau B., Wierinckx A., Keijsers R., Adriaensens L., van den Berg Dawid, Joziase D.: Regulation of α 1,3galactosyltransferase expression in pig endothelial cells. *Eur. J. Biochem.* 2002, 269, 1464-1473.
12. Orlecka E., Rowiński W.: Ocena leczenia schyłkowej niewydolności nerek – przegląd literatury. *Farmakoekonomika* 2002, 3.
13. Phelps C. J., Koike C., Vaught T. D., Boone J., Wells K. D., Chen S. H., Ball S., Specht S. M., Polejaeva I. A., Monahan J. A., Jobst P. M., Sharma S. B., Lamborn A. E., Garst A. S., Moore M., Demetris A. J., Rudert W. A., Bottino R., Bertera S., Trucco M., Starzl T. E., Dai Y., Ayare D. L.: Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 2003, 299, 411-414.
14. Poltransplant Biuletyn Informacyjny 2006, 14, 3-29.
15. Samstein B., Platt J. L.: Physiologic and Immunologic Hurdles to Xenotransplantation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2001, 12, 182-193.
16. Sharma A., Okabe J., Birch P., McClellan S. B., Jeffery M. J. M., Platt L., Logan J. S.: Reduction in the level of Gal(α 1,3)Gal in transgenic mice and pigs by the expression of an α (1,2)fucosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996, 3, 7190-7195.
17. Słomski R.: Przygotowanie konstrukcji genowych do modyfikacji świń dla pozyskania organów do transplantacji u człowieka, II Symp. Wykorzystanie transgenezy w genetycznej modyfikacji świń dla pozyskania organów do transplantacji u człowieka, Balice 2005, 8-10.
18. Sola A., Palacios L., Lopez-Marti J., Ivorra A., Noguera N., Gomez R., Villa R., Aguilo J., Hotter G.: Multiparametric monitoring of ischemia-reperfusion in rat kidney: effect of ischemic preconditioning. *Transplantation* 2003, 75, 744-749.
19. Tucker A., Belcher C., Mooloo B., Bell J., Mazzulli T., Humar A., Huges A., McArdle P., Talbot A.: The production of transgenic pigs for potential use in clinical xenotransplantation: baseline clinical pathology and organ size studies. *Xenotransplantation* 2002, 9, 203-208.
20. Vathsala A.: Preventing renal transplant failure. *Ann. Acad. Med. Singapore* 2005, 34, 36-43.
21. Vroemen J. P., van der Vliet J. A., Cohen B., Persijn B., Lansbergen Q., Kootstra G.: The influence of warm and cold ischemic time on the outcome of cadaveric renal transplantation. *Eur. Surg. Res.* 1984, 16, 175-181.
22. Wang K., Li Y., Jiang H., Shen J., Zhang L.: Pig orthotopic renal allotransplantation model. *Transplant. Proc.* 2003, 35, 191.
23. Wolfe R. A., Ashby V. B., Milford E. L., Ojo A. O., Ettenger R. E., Agodoa L. Y. C., Held P. J., Port F. K.: Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N. Engl. J. Med.* 1999, 341, 1725-1730.
24. Zaidi A., Bhatti F., Schmoekel M., Cozzi E., Chavez G., Wallwork J., White D., Friend P.: Kidneys from HDAF transgenic pigs are physiologically compatible with primates. *Transplant Proc.* 1998, 30, 2465-2466.