

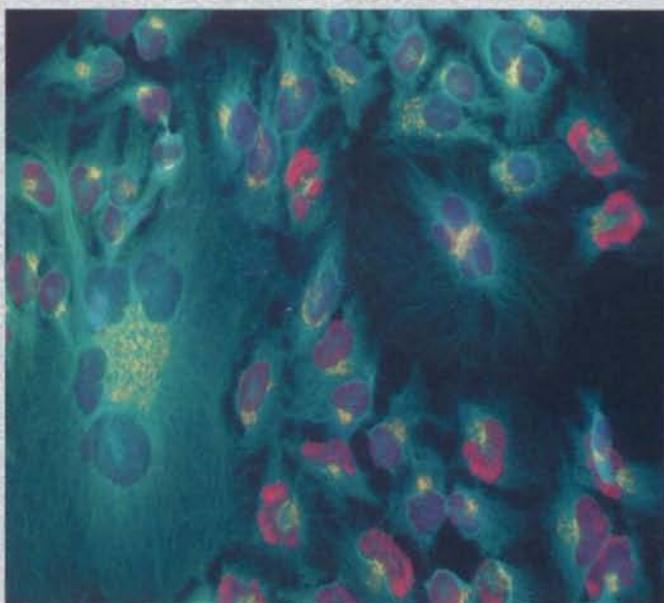
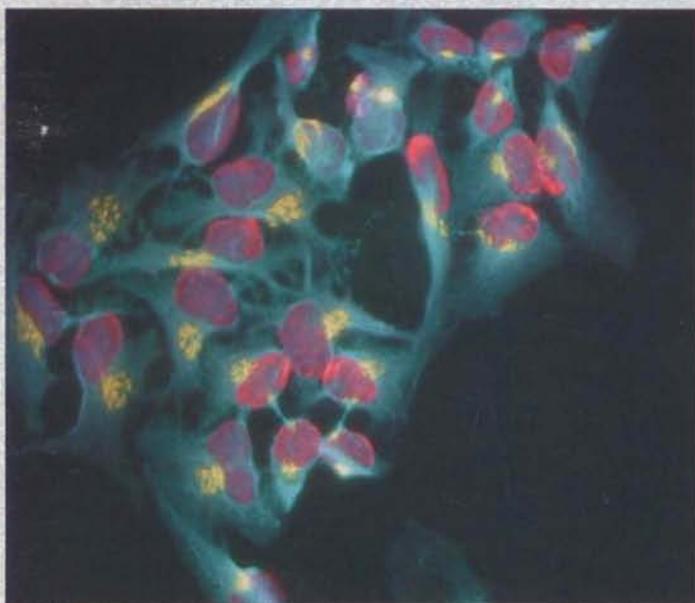
LETTERE GIC

Periodico della Società Italiana di Citometria

EFFETTO DI ALCUNE ANTOCIANINE, ESTRATTE DA RIBES NIGRUM, NEI CONFRONTI DEL DANNO AL DNA E DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE

ALTERAZIONI DELL'APOPTOSI E DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE NELLE BRANCIE DEL TELOESTEO LIZA AURATA ESPOSTO A METALLI PESANTI

ANALISI DEL RUOLO DEL PROTOONCOGENE MET NEI PROCESSI BIOLOGICI CHE CAUSANO L'INSORGENZA DEL TUMORE COLORETTALE
VALUTAZIONE DELL'EMOCOMPATIBILITÀ IN VITRO DI PROTESI VASCOLARI ELASTOMERICHE IN RELAZIONE AL LORO CONTENUTO IN SILICONE



Valutazione dell'emocompatibilità *in vitro* di protesi vascolari elastomeriche in relazione al loro contenuto in silicone

Dario Spiller¹, Paola Losi¹, Enrica Briganti¹, Silverio Sbrana², Silvia Kull¹,
Ilaria Martinelli¹ & Giorgio Soldani¹

Istituto di Fisiologia Clinica CNR di Massa, Ospedale "G.Pasquinucci",

¹Laboratory for Biomaterials & Grafts Technology

²Laboratorio di Ematologia e Citometria a Flusso

dariospiller@libero.it

INTRODUZIONE

Il trattamento chirurgico dei pazienti soggetti a malattia vascolare aterosclerotica periferica o a patologie cardiache, come l'ischemia coronarica, necessita di condotti vascolari sostitutivi per ristabilire la continuità vascolare.

Attualmente nella procedura chirurgica del *by-pass* aorto-coronarico vengono utilizzati vasi sanguigni autologhi come ad esempio la vena safena espantata dallo stesso paziente¹; tuttavia il 15% delle protesi venose si occlude entro il primo mese dall'impianto in seguito alla formazione di trombi ed un ulteriore 15% entro il primo anno dall'impianto per un restringimento del lume del vaso dovuto ad iperplasia intimale².

Per i motivi sopra elencati sono in fase di studio protesi vascolari artificiali in grado di sostituire i vasi sanguigni danneggiati. Attualmente le protesi di diametro superiore a 10 mm sono nella quasi totalità in Dacron[®] tessuto con velluto all'interno e/o all'esterno, mentre le protesi di diametro inferiore a 10 mm sono realizzate nel 75% dei casi in politetrafluoroetilene espanso (ePTFE) e nel 25% in Dacron[®]. Le protesi con diametro inferiore a 6 mm, sia in Dacron[®] che in ePTFE, sono quelle che presentano i maggiori problemi a causa dei processi trombotici che si generano all'interfaccia tra il sangue e la superficie interna delle stesse³.

Recentemente nel "Laboratory for Biomaterials & Grafts Technology" dell'Istituto di Fisiologia Clinica del C.N.R. di Massa sono state realizzate protesi vascolari di piccolo diametro con buone caratteristiche di emocompatibilità con un nuovo materiale elastomerico; il materiale combina, in un unico composto, le ottime proprietà chimico-fisiche del polietereuretano (PEtU) con quelle di biostabilità ed emocompatibilità del silicone [polidimetilsilossano (PDMS)].

Recentemente in letteratura è stato dimostrato che diversi materiali con questo tipo di composizione chimica hanno potenzialmente le caratteristiche ideali per essere impiegati nella realizzazione di dispositivi per uso biomedico⁴.

In questo lavoro si è voluto approfondire le suddette osservazioni sperimentali; in particolare lo scopo è stato quello di valutare l'influenza del contenuto in silicone sull'emocompatibilità delle protesi realizzate in PEtU-PDMS. Quest'ultima è stata valutata quantitativamente *in vitro* in un sistema per la circolazione passiva del

sangue utile a predire il comportamento delle protesi sintetiche *in vivo*; nel circuito sono state valutate protesi con tre diverse percentuali di silicone (10, 25, 40 %).

Le protesi sono state realizzate tramite un'apparecchiatura denominata *spray-machine* che consente di ottenere protesi con struttura interna microporosa e sono state sterilizzate con la stessa procedura che sarà utilizzata per i futuri esperimenti di impianto nei modelli animali. Al termine degli esperimenti sono stati valutati diversi parametri riguardanti l'adesione e l'attivazione piastrinica: il conteggio delle piastrine circolanti con un contaglobuli elettronico; il dosaggio della β -tromboglobulina (β -TG) e della P-selectina tramite saggi ELISA; l'espressione sulla superficie delle piastrine dell'antigene CD62P e la formazione di aggregati monocito-piastrine tramite l'analisi citofluorimetrica.

MATERIALI E METODI

Protesi oggetto dello studio

Le protesi in PEtU-PDMS sono state realizzate tramite la *spray-machine*, apparecchiatura che si basa sul principio fisico dell'inversione di fase applicabile alle soluzioni polimeriche.

Le protesi impiegate in questo studio sono state realizzate con microgeometria porosa della superficie interna utilizzando una soluzione del materiale alla concentrazione di 0,2% in THF/DX e con diverso contenuto di PDMS (10, 25 e 40%) dello strato interno in modo da poter valutare l'effetto del PDMS sull'emocompatibilità.

Protesi interamente realizzate con lo stesso PEtU commerciale del materiale oggetto dello studio e aventi le stesse caratteristiche di quelle in esame, sono state impiegate per valutare l'influenza della presenza del PDMS sull'emocompatibilità. Un tubo in silicone medical grade (sil, Masterflex[®] 96419-25) è stato utilizzato per la messa a punto del circuito e come materiale di riferimento in quanto sono note la biocompatibilità ed emocompatibilità di questo tipo di silicone⁷.

Il circuito *in vitro*

Durante il lavoro di tesi è stato costruito un dispositivo per la circolazione *in vitro* di sangue umano, allo scopo di portarlo a contatto con la superficie interna delle protesi. Il circuito è stato costruito sul modello descritto

da Tepe nel 2002⁵ e si basa sull'utilizzo di una pompa peristaltica modificata in modo da ottenere un flusso passivo del sangue all'interno delle protesi e tale da indurre una bassa emolisi durante l'esperimento.

Il circuito, schematizzato in Fig. 1, è costituito da 40 cm di protesi in PEtU-PDMS chiuse a *loop*, grazie a raccordi di Teflon® ed alloggiato su un supporto di plexiglass a croce messo in rotazione grazie all'azione di una pompa peristaltica, in modo da ottenere una velocità di flusso indicativa del sangue pari a 24 cm/s. In questo modo si ottiene un flusso passivo in cui la colonna di sangue fluisce scorrendo lungo le pareti interne delle protesi in direzione opposta alla rotazione delle protesi stesse.



Figura 1.
Schema del circuito *in vitro*:
1. Protesi in PEtU-PDMS
2. Supporto in plexiglass
3. Pompa peristaltica.

Tutto il circuito, compresa la pompa peristaltica, è stato inserito in una camera termostata alla temperatura fisiologica di 37°C per l'intera durata dell'esperimento (2 ore).

Donatori e preparazione del sangue

Per ogni esperimento sono stati utilizzati 15 ml di sangue umano anticoagulato con sodio-citrato 3,8% (1:10). I donatori sono stati selezionati in base ai seguenti criteri: età compresa fra i 20 e i 35 anni, non fumatori, con i valori dell'emocromo nel range di normalità e che non avessero assunto farmaci anticoagulanti e antiaggreganti nelle due settimane precedenti l'esperimento. Il prelievo è stato effettuato, immediatamente prima dell'esperimento, con ago da 19G dalla vena anticubitale per limitare l'attivazione piastrinica basale⁶.

Valutazione dell'adesione piastrinica

L'adesione delle piastrine sulla superficie interna delle protesi è stata valutata in maniera indiretta determinando il numero di piastrine in campioni di sangue all'inizio e alla fine dell'esperimento.

La conta delle piastrine è stata effettuata su sangue intero mediante un contaglobuli elettronico (Sysmex SF3000).

Dosaggio della β -tromboglobulina

Prima dell'esperimento e al suo termine campioni di sangue sono stati prelevati dal circuito, mescolati 1:30 con anticoagulante di Edimburgo (una miscela di Prostaglandina E1 e Teofillina) freddo e mantenuti per 30' a 4°C per bloccare il rilascio di β -TG durante la successiva preparazione del plasma povero di piastrine (PPP) mediante centrifugazione a 2500g per 30' a 4°C⁸. Il sovrantante è stato prelevato nella zona mediana per

evitare la linea di sedimentazione dei globuli rossi ed il metabolita è stato dosato tramite un dosaggio ELISA a cattura (Roche Diagnostic).

Dosaggio della P-selectina

Prima dell'esperimento, e al suo termine, è stato prelevato dal circuito 1ml di sangue intero e mantenuto per 30' a 4°C prima di essere centrifugato a 2500g per 30' a 4°C⁹. La concentrazione di P-selectina è stata determinata tramite un dosaggio ELISA a cattura (Bender MedSystems).

Analisi citofluorimetriche:

1 - Valutazione dell'attivazione piastrinica

In questo studio sono stati utilizzati due anticorpi monoclonali (Valter Occhiena srl, Torino, Italia) diretti contro antigeni piastrinici: il CD41a-FITC per la distinzione delle piastrine dagli altri elementi corpuscolari del sangue ed il CD62P-PE per identificare le piastrine attivate.

I campioni di sangue sono stati analizzati con citofluorimetro FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). I parametri strumentali sono stati impostati nel seguente modo: *forward scatter* (FSC) scala log, *side scatter* (SSC) scala log, FL1 scala log (fluorescenza verde) e FL2 scala log (fluorescenza rossa). La soglia è stata posta sul segnale di FSC per consentire una miglior discriminazione delle piastrine dai detriti cellulari. La popolazione piastrinica è stata identificata tramite un doppio *gate*: il primo posto sul *dot plot* dei due segnali di *scatter* ed il secondo sul segnale di FL1. Per ogni campione sono stati memorizzati almeno 20.000 eventi CD41 positivi.

Tramite l'analisi citofluorimetrica è stato possibile distinguere le piastrine dagli altri elementi del sangue (leucociti, eritrociti e detriti) in base ai parametri fisici correlati FSC e SSC e all'espressione di CD41. Inoltre una volta identificata la popolazione piastrinica in base all'analisi morfologica, marcando le piastrine con anti-CD62P-PE (FL2) è stato possibile individuare le piastrine attivate.

2 - Quantificazione della formazione di aggregati monocito-piastrine

I campioni di sangue sono stati marcati simultaneamente con un appropriato volume dei seguenti anticorpi monoclonali (Valter Occhiena) diretti contro l'antigene comune leucocitario CD45, l'antigene di differenzamento monocitario CD14 e l'antigene piastrinico costitutivo CD41a (gpIIb). I campioni di sangue sono stati analizzati mediante il suddetto citofluorimetro.

Il canale di fluorescenza FL2 (positività per CD45) è utilizzato come parametro di soglia (*threshold*) per l'acquisizione dei dati. Per ogni campione vengono acquisiti almeno 10.000 eventi in un *dot plot* di SSC vs FL2. Utilizzando questo tipo di marcatura è possibile, non soltanto quantificare la percentuale di aggregati eterotipici monocito-piastrine all'interno dell'intera popolazione leucocitaria (eventi con tripla positività CD45/CD14/CD41a), ma è anche possibile valutare

l'intensità netta di fluorescenza (NFI). Quest'ultima rappresenta un indice indiretto del numero di piastrine coniugate con ogni singolo monocita.

ANALISI DEI DATI

Per valutare l'emocompatibilità delle protesi in PETU-PDMS in relazione alla percentuale di PDMS presente nel loro strato interno, sono stati eseguiti cinque esperimenti indipendenti per ogni tipo di protesi. Lo stesso numero di esperimenti è stato effettuato utilizzando le protesi in PETU ed il tubo in silicone *medical grade*.

I dati ottenuti dagli esperimenti sono stati espressi in percentuale quelli relativi all'adesione piastrinica e all'espressione del CD62P, in ng/ml quelli dei metaboliti dosati mediante ELISA, come percentuale di positività e come NFI quelli citometrici. Tutti i valori dei suddetti parametri, calcolati al termine della circolazione, sono stati riportati ai rispettivi valori basali.

L'analisi statistica è stata eseguita raccogliendo i dati di tutti gli esperimenti indipendenti, rappresentati in termini di medie \pm le relative deviazioni standards, utilizzando il programma per analisi statistica Statview 5.0 (SAS Institute). I dati per gruppi indipendenti sono stati analizzati mediante ANOVA e differenze significative fra gruppi di medie sono state valutate mediante i test di Student e di Fisher con un livello di significatività dell'5%.

RISULTATI

Adesione piastrinica

Dopo 2 ore di circolazione *in vitro* è stato osservato un decremento significativo della percentuale di piastrine circolanti nelle protesi in PETU, non solo rispetto al tubo in silicone *medical grade* ma anche rispetto alle protesi in PETU-PDMS ad alta % di PDMS (25 e 40). Inoltre, la percentuale di piastrine circolanti nelle protesi in PETU-PDMS al 10% di PDMS è significativamente inferiore rispetto a quelle al 40%.

I risultati relativi alla conta delle piastrine indicano che maggiore è la percentuale di silicone nello strato interno delle protesi in PETU-PDMS, maggiore è il numero di piastrine circolanti e quindi l'adesione alla superficie

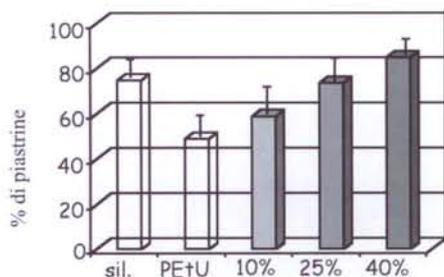


Figura 2. Conta delle piastrine nel campione di sangue circolante al termine dell'esperimento.

interna delle stesse è minore (Fig. 2).

Dosaggio della β -tromboglobulina

L'analisi statistica ha evidenziato che le protesi in PETU-PDMS a più alto contenuto in PDMS (25 e 40%) inducono un rilascio di β -TG significativamente minore sia rispetto alle protesi in PETU-PDMS al 10% di

PDMS sia rispetto ai materiali di riferimento (Fig. 3). I risultati confermano quanto emerso dalla conta piastrinica; la presenza di PDMS alle concentrazioni più alte influisce positivamente sull'emocompatibilità delle pro-

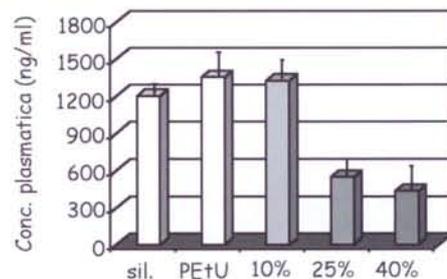


Figura 3. Rilascio di β -TG (ng/ml) dopo 2 ore di circolazione.

tesi.

Dosaggio della P-selectina

Non sono state rilevate differenze significative nel rilascio di questo metabolita né tra protesi in PETU-PDMS a diverso contenuto in PDMS, né tra queste e le protesi di riferimento.

I dati dimostrano che tutte le protesi in PETU-PDMS, indipendentemente dalla percentuale di PDMS di cui sono costituite, determinano un'attivazione piastrinica paragonabile a quella dei materiali di riferimento.

Analisi citofluorimetriche:

1-Valutazione dell'attivazione piastrinica

L'espressione della molecola CD62P sulle piastrine attivate è indipendente dalla percentuale di silicone presente nelle protesi in PETU-PDMS ed è paragonabile a quella dei materiali di riferimento.

2-Quantificazione della formazione di aggregati monocito-piastrine

Dall'analisi statistica effettuata sui dati di ogni esperimento per entrambi i parametri presi in esame si può notare che: le protesi in PETU-PDMS al 25 e 40% di PDMS hanno una percentuale di aggregati e una NFI significativamente più basse non solo rispetto a quelle contenenti il 10% di PDMS ma anche rispetto ai mate-

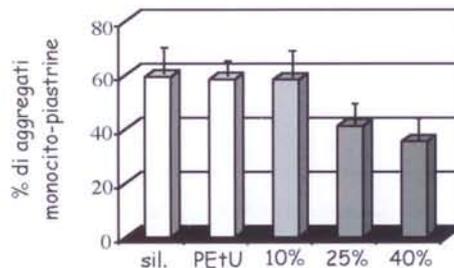


Figura 4. % di aggregati monocito-piastrine dopo 2 ore di circolazione.

riali di riferimento (Fig. 4).

I risultati ottenuti analizzando i dati citometrici come percentuale di positività sono in accordo con quelli dell'NFI; questi dati concordano con quelli dell'adesione piastrinica e del dosaggio della β -TG.

DISCUSSIONE

L'approccio più corretto per valutare l'emocompatibilità di protesi vascolari e di altri dispositivi biomedici, sottoposti a diretto contatto con il sangue, al fine di poter stimare il comportamento del dispositivo dopo l'impianto. La maggior parte dei metodi per valutare l'emocompatibilità delle protesi vascolari *in vitro* sono focalizzati sullo studio dell'adesione e attivazione piastrinica e della formazione di trombi¹⁰. Misurare *in vitro* l'attivazione indotta dai biomateriali rappresenta un problema di non facile soluzione. Il problema principale è rappresentato dal livello di attivazione delle piastrine dovuto alla venipuntura, alla manipolazione del sangue, ai cambiamenti di temperatura ed al contatto con le superfici, che dovrebbero essere il più possibile inerti, del sistema sperimentale⁶. Perciò, per misurare l'attivazione piastrinica *in vitro*, occorre ridurre il più possibile questa attivazione di fondo per essere in grado di rilevare il grado di attivazione indotta dai biomateriali.

Nel 2002 Tepe et al. hanno costruito un dispositivo per la circolazione *in vitro* in cui si ottiene un flusso passivo del sangue mediante una pompa peristaltica. Il circuito è costituito da 50 cm di tubo in PVC, chiuso a *loop*, e messo in rotazione grazie all'impiego di un cilindro rotante collegato con la pompa. Tale dispositivo è stato utilizzato per valutare la trombogenicità di diversi tipi di *stents* intravascolari inseriti all'interno di un tubo in PVC.

In questo studio, per valutare l'emocompatibilità di protesi vascolari in PEtU-PDMS in relazione alla percentuale di silicone in esse contenuto, è stato costruito un circuito simile a quello di Tepe. Il circuito è stato adattato al nostro scopo sostituendo il tubo in PVC con protesi in PEtU-PDMS lunghe 40 cm per amplificare l'effetto del biomateriale sul sangue.

Con questo circuito sono stati valutati tre tipi di protesi realizzate in PEtU-PDMS che differivano per la percentuale di PDMS presente nel loro strato interno (10, 25 e 40%); come riferimento sono state realizzate protesi con lo stesso PEtU commerciale presente nelle protesi oggetto dello studio ed un tubo in silicone *medical grade*.

Prima, e al termine della circolazione *in vitro*, sono stati prelevati dei campioni di sangue su cui sono state eseguite diverse indagini per stabilire il grado di emocompatibilità delle diverse protesi. I parametri sono stati scelti in accordo con quanto stabilito dalle norme ISO 10993-4 riguardanti la valutazione *in vitro* dell'emocompatibilità dei biomateriali. Per ogni tipo di protesi presa in esame sono stati eseguiti cinque esperimenti indipendenti per la significatività statistica dei risultati. Uno dei parametri che meglio permette di valutare l'emocompatibilità di una protesi vascolare artificiale è l'adesione piastrinica sulla superficie luminale. In condizioni fisiologiche di circolazione sanguigna le piastrine non aderiscono alle cellule endoteliali che rivestono il lume dei vasi, ma l'esposizione del sangue a superfici estranee, come quelle dei materiali che costituiscono i dispositivi artificiali (protesi vascolari e foglietti valvo-

lari), determina l'adsorbimento di uno strato di proteine e cellule, accompagnato dall'attivazione della coagulazione del sangue¹¹. Nel corso di questa sperimentazione si è osservato che l'adesione piastrinica alla superficie luminale delle protesi in PEtU-PDMS varia in funzione del contenuto di PDMS delle stesse. Le protesi ad alto contenuto in PDMS catturano una quantità minore di piastrine rispetto a quelle a più basso contenuto in PDMS, mentre le protesi costituite da PEtU commerciale inducono una considerevole adesione piastrinica. Pertanto si può affermare che il silicone influisce sulla capacità delle protesi in esame di simulare le condizioni della circolazione fisiologica.

Tali risultati sono in accordo con una serie di studi recenti che hanno dimostrato che diversi poliuretani commerciali, se chimicamente combinati con il PDMS, determinano un'adesione piastrinica inferiore e un minore adsorbimento di fibrinogeno rispetto agli stessi poliuretani commerciali di riferimento¹². Gli autori spiegano come questo fenomeno sia dovuto all'elevata emocompatibilità del PDMS, suggerendo che domini sufficientemente grandi di PDMS all'interno dei materiali sfavoriscano l'adesione piastrinica.

Per quanto riguarda l'attivazione piastrinica, essa è stata monitorata mediante quantificazione del rilascio di due proteine, β -TG e P-selectina, da parte delle piastrine attivate in seguito alla reazione di degranulazione.

I risultati ottenuti per quanto riguarda il rilascio di β -TG hanno confermato quelli dell'adesione: protesi in PEtU-PDMS a più alto contenuto in PDMS (25 e 40 %) inducono un rilascio di β -TG minore rispetto a quelle al 10% e ai materiali di riferimento. Anche da questo parametro esaminato appare evidente che il PDMS favorisce l'emocompatibilità delle protesi, riducendo l'attivazione piastrinica.

Il saggio ELISA per il dosaggio della P-selectina solubile nel PPP si è rivelato molto meno sensibile rispetto a quello per valutare il rilascio della β -TG e non ha permesso la discriminazione dell'attivazione indotta dalle diverse quantità di PDMS contenuto nelle protesi. L'unico dato che è emerso è che tutte le protesi in PEtU-PDMS, indipendentemente dalla percentuale di PDMS inducono un'attivazione simile ai materiali di riferimento.

Infine è stata valutata l'attivazione piastrinica mediante citometria a flusso, metodica d'elezione per questo tipo di studi. Infatti l'impiego di anticorpi monoclonali per specifici antigeni piastrinici direttamente coniugati con fluorocromi, ha reso possibile la valutazione di marcatori fenotipici e funzionali direttamente su campioni di sangue intero; ciò ha evitato l'introduzione di artefatti sperimentali derivati da procedure di separazione e arricchimento e ha consentito di raccogliere informazioni anche sui leucociti.

La prima analisi citofluorimetrica che è stata condotta in questo studio riguarda il monitoraggio dell'attivazione piastrinica mediante l'espressione del CD62P, selectina che interagendo con il corrispondente ligando CD162 (PGSL-1), presente sulla superficie leucocitaria, è responsabile della formazione di aggregati eterotipici

fra piastrine e leucociti.

Non si sono rilevate differenze significative nell'attivazione in relazione ai diversi tipi di protesi ma si è solamente potuto apprezzare che tutti i tipi di protesi indipendentemente dal loro contenuto in silicone inducono un'attivazione piastrinica simile a quella indotta dai materiali di riferimento. Questo parametro contrasta solo apparentemente con l'adesione piastrinica e il rilascio di β -TG, infatti numerose esperienze di laboratorio hanno dimostrato che la P-selectina, una volta espressa sulla superficie delle piastrine, viene rapidamente rilasciata nel plasma¹³. Si può quindi ipotizzare che una così ampia superficie di attivazione, rappresentata dai 40 cm di protesi in PEtU-PDMS, possa aver determinato una rapida espressione del CD62P sulla membrana delle piastrine attivate e che la stessa sia tornata a livello *resting* al termine delle 2 ore di circolazione.

L'analisi citofluorimetrica dell'attivazione piastrinica ha compreso inoltre la valutazione del numero di aggregati monocito-piastrine, infatti la formazione di questi aggregati favorisce l'aumento di espressione di molecole integriche sulla superficie dei globuli bianchi e, di conseguenza, svolge un ruolo importante nel mantenimento della reazione cellulare infiammatoria di fase acuta, nei processi trombotici e nell'ischemia cardiaca^{14,15}.

I dati citometrici rappresentati come percentuale di positività e come NFI sono in accordo fra loro e dimostrano che protesi in PEtU-PDMS con il 25 e al 40 % di PDMS sono quelle che inducono la percentuale inferiore di coniugati eterotipici e la minor NFI; anche l'analisi citofluorimetrica dei coniugati eterotipici conferma che la presenza del PDMS influenza positivamente l'emocompatibilità delle protesi in PEtU-PDMS.

Tali risultati concordano con la sperimentazione eseguita *in vivo* da Michelson et al. nel 2002¹⁶: la valutazione del numero di aggregati monocito-piastrine si è dimostrata, anche in tale studio, un *marker* più sensibile di attivazione piastrinica rispetto all'espressione del CD62P sulla membrana delle piastrine attivate.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti nel presente studio sono così riassumibili: il silicone (PDMS) influenza positivamente l'emocompatibilità del PEtU commerciale presente nelle protesi in PEtU-PDMS, infatti le protesi con il contenuto maggiore di silicone (25 e 40 %) hanno determinato una ridotta adesione piastrinica, un ridotto rilascio di β -tromboglobulina ed una quantità minore di aggregati monocito-piastrine.

In conseguenza dei risultati ottenuti nel corso di questa sperimentazione *in vitro* le protesi con percentuali maggiori di PDMS saranno scelte per esperimenti di impianto in animali per valutarne ulteriormente l'emocompatibilità.

BIBLIOGRAFIA

1. BRYAN A. J., ANGELINI G.D. (1994). The biology of saphenous vein graft occlusion: etiology and strategies for prevention. *Curr Opin Cardiol* 9:6, pp. 641-9.

2. LITTLE B.W., LOPP F.D., COSGROVE D.M., RATLIFF N.B., EASLY K., TAYLOR P.C. (1985) Long Term (5 to 12 years) serial studies of internal mammary artery and saphenous vein coronary bypass grafts. *Thorac Cardiovasc Surg*, Vol 89, pp. 248-58.

3. BOS G. W., POOT A. A., BEUGELING T., VAN AKEN W. G., FEIJEN J. (1998). Small-diameter vascular graft prosthesis: current status. *Arch Physiol Biochem* 106-2, pp. 100-115.

4. PARK J.H., PARK K.D., BAE Y.H. (1999) PDMS-based polyurethanes with MPEG grafts: synthesis, characterization and platelet adhesion study. *Biomaterials*, Vol 20, pp. 943-53.

5. TEPE G., WENDEL H.P., KHORCHIDI S., SCHMEHL J., WISKIRCHENS, PUSICH B., CLAUSSEN C.D., DUDA S.H. (2002). Thrombogenicity of Various Endovascular Stent Types: An *In Vitro* Evaluation. *J Vasc Interv*, Vol 13, pp. 1029-1035.

6. BAR J., SCHOENFELD A., HOD M., RABINERSON D., MARMUR A. et al. (1996) The effect of time interval after venipuncture and anticoagulation on platelet adhesion and aggregation. *Clin Lab Haem* 18, pp. 281-284.

7. GAUTAM S.K., KAMAT M.V., BASU S. (1995) Is there a case for haemorrhological screening in the haemocompatibility testing of materials? *Biomed Mater Eng*, Vol 5(3), pp. 141-146.

8. LUDLAM C.A., CASH J.D. (1976) Studies on the liberation of β -thromboglobulin from human platelets *in vitro*. *Br J Haemat* 33, pp. 239-247.

9. CONWAY D.S.G., PEARCE L.A., CHIN B.S.P., HART R.G., LIP G.Y.H. (2002) Plasma Von Willebrand Factor and soluble P-Selectin as indices of endothelial damage and platelet activation in 1321 patients with nonvalvular atrial fibrillation. *Circulation*, Vol 106, pp. 1962.

10. BASMADJIAN D., SEFTON M. V., BALDWIN S. A. (1997) Coagulation on biomaterials in flowing blood: some theoretical consideration. *Biomaterials* 18, pp. 1511-1522.

11. SEYFERT U.T., BIEHL V., SCHENK J. (2002). *In vitro* haemocompatibility testing of biomaterials according to the ISO 10993-4. *Biomolecular Engineering*, Vol 19, pp. 91-6.

12. LIM F., YANG C.Z., COOPER S.L. (1994) Synthesis, characterization and *ex vivo* evaluation of polydimethylsiloxane polyurea-urethanes. *Biomaterials*, Vol 15, pp. 408-16.

13. FERRONI P., PULCINELLI F. M., LENTI L., GAZZANIGA P. P. (1999) Is soluble P-selectin determination a more reliable marker of *in vivo* platelet activation than CD62P flow cytometric analysis? *Thromb Haemost* 81, pp. 472-3.

14. NAILIN L., GOODALL A.H., HJEMDAHL (1999) Efficient flow cytometric assay for platelet-leucocyte aggregates in whole blood using fluorescence signal triggering. *Cytometry*; Vol 35:154-61.

15. HARTZ S., MEBART B., TSCHOEPE D. (2003). Leucocyte apoptosis in whole blood involves platelet dependent coaggregation. *Cytometry*, Vol 52A, pp. 117-121.

16. MICHELSON A.D., BARNARD M.R., KRUEGER L.A., VALERI C.R., FURMAN M.I. (2002). Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of *in vivo* platelet activation than platelet P-Selectin. *Circulation*, Vol 104, pp. 1533-37.