



Univerzita Karlova v Praze
2. lékařská fakulta



**Změna kvality povrchu alogenního chlopenního štěpu během zpracování
- morfologické změny sledované skenovacím mikroskopem**

Doktorandská disertační práce

MUDr. Jan Burkert

Školitel: MUDr. Jaroslav Špatenka, CSc.
Kardiochirurgická klinika 2.LF UK a Transplantační centrum FN Motol

Školitel konzultant: Doc. MUDr. Jan Vojáček, PhD.
Kardiochirurgická klinika LF UK Hradec Králové

Školitel konzultant: Prim. MUDr. Aleš Mokráček, CSc.
Kardiochirurgické oddělení Nemocnice České Budějovice

Praha 2009

Obsah:

1. Úvod.....	5
1.1. Vymezení pojmů:.....	8
1.2. Biologické chlopně versus mechanické chlopně – obecný přehled.....	9
2. Hypotézy a cíle práce.....	11
2.1. Aortální alograft – historie implantace a indikace.....	13
2.2. Pulmonální alograft - historie implantace a indikace.....	15
2.3. Banka kardiovaskulární tkáně Transplantačního centra FN Motol.....	17
3. Materiál a metodika.....	24
3.1. Protokol Banky kardiovaskulární tkáně ve FN Motol, Praha.....	24
3.1.1. Odběr srdce pro účely získání chlopních alograftů.....	24
3.1.1.1. Sterilní odběr srdce od zemřelých s bijícím srdce během multiorgánových odběrů a od NHBD v době výzkumu.....	25
3.1.1.2. Odběr srdce od dárců s nebijícím srdcem mimo operační sály.....	25
3.1.2. Vlastní příprava aortálního a plicnicového alograftu.....	26
3.1.3. Sterilizace chlopních alograftů.....	27
3.1.4. Kryoprezervace chlopních alograftů.....	28
3.1.5. Rozmrazovací proces a vyjmutí štěpu k vlastní transplantaci.....	29
3.2. Vyšetření vzorků chlopních alograftů elektronovým mikroskopem.....	33
3.2.1. Rozdělení vzorků do skupin.....	33
3.2.2. Příprava vzorků a metoda rastrovací elektronové mikroskopie.....	35
3.3. Hodnocení vzorků chlopních alograftů.....	36
4. Výsledky.....	37
5. Diskuze.....	51
5.1. Podstata a význam viability chlopních alograftů.....	56
5.2. Metody hodnocení viability.....	58
5.3. Faktory ovlivňující viabilitu alograftů.....	60
5.3.1. Teplá a studená ischemie a její vliv na strukturální integritu/viabilitu endotelu a fibroblastů chlopně.....	60
5.3.2. Sterilizace alograftu pomocí antibiotik a jejich vliv na viabilitu zpracovávaných chlopní.....	65
5.3.3. Imunogenicita alograftů.....	69
6. Závěr.....	75
7. Seznam použitých zkratk.....	79
8. Literatura.....	80

1. Úvod

Náhrada nebo „oprava“ chorobou postižených srdečních chlopní patří dnes k rutinním kardiochirurgickým výkonům. Cesta k tomuto stupni poznání byla trnitá a tento vývoj trvá více než půl století. Od samého začátku jsou paralelně vyvíjeny chlopní protézy mechanické (vyrobené z ušlechtilých kovů, grafitu a umělých hmot) a biologické, které byly zpočátku různě upravené chlopně zemřelých (kadaverózních) dárců - alografty. Teprve později byla zkoumána a zavedena náhrada z tkáně jiných živočichů – xenografty, připravené z vepřových aortálních chlopní, případně vepřového, hovězího a výjimečně koňského perikardu. Přes 50 let trvající experimentální i klinický výzkum dosud nemáme ideální chlopní náhradu, tedy bezpečný jednocestný ventil, který by se technicky snadno implantoval, nepoškozoval by krevní elementy, byl netrombogenní, napodoboval by reologii nativní lidské chlopně, fungoval bezhlučně a neomezeně dlouho. Proto se stále pracuje v původních směrech výzkumu, jsou intenzivně zdokonalovány mechanické protézy i xenografty a je dále zdokonalována příprava alograftů. Zvláštní skupinu biologických chlopní tvoří autotransplantáty (pulmonální autograft - autologní plicnice pacienta může být použita k náhradě jeho vlastní aortální či mitrální chlopně). Intenzivně se vyvíjí nový obor – tkáňové inženýrství, které pracuje i na výrobě nového typu biologických chlopních náhrad.

Historie použití chlopních alograftů je fascinující. První kadaverózní lidskou tkáň použil v klinice Robert E. Gross již v roce 1947 (alogenní arteriální štěp v léčbě cerebrovaskulárních onemocnění). V roce 1952 Lam a kolegové poprvé představili koncept implantace lidské alogenní chlopně. Rozvoj chirurgie s použitím alograftů (= homograftů) se ve světě rozvíjel od konce 50tých let a zasadili se o něj takové veličiny kardiologie jakými jsou Donald Ross, Sir Magdi Yacoub, Carlos Duran, Brian Barratt-Boyes, Mark O'Brien a další. Podrobněji uvedu základní historická data dále, při popisu jednotlivých metod implantace.

V bývalém Československu patřil k průkopníkům kardiologie s použitím chlopních alograftů M. Hubka (Bratislava), jehož pionýrské experimentální práce i klinické použití jsou dosud po zásluze citovány. Aplikace této chirurgické metody v Čechách a na Moravě byla pomalejší a o její rozšíření se v 80. letech minulého století zasadili zejména

Bohumil Hučín, Bohuslav Fišer a Jaroslav Špatenka, který v roce 1980 od Donalda Rosse (Londýn) převzal kompletní protokol pro odběr a zpracování aortálních alograftů. V roce 1991 potom založil specializovanou tkáňovou banku, která alogenní srdeční chlopně pro celou Českou republiku nabízí.

Aortální alograft může být teoreticky použit k náhradě aortální, pulmonální, raritně i mitrální či trikuspidální chlopně. Tato specifická biologická protéza je stále diskutována z aspektu zpracování tkáně (Tissue Banking) i z aspektu klinického použití – tedy chirurgické techniky implantace a dlouhodobých výsledků. Základní indikací pro použití aortálního alograftu u dospělých je infekční endokarditida aortální chlopně. Z dalších indikací se aortální alograft používá k náhradě aortální chlopně jako alternativa xenotransplantátu. Plicnicové alografty se používají zejména v dětské kardiologii anebo stále častěji k náhradě výtokového traktu pravé komory jako součást tzv. Rossovy operace. Mitrální alograft může být použit ortotopicky k náhradě mitrální chlopně, či heterotopicky k náhradě chlopně trojcipe – tyto výkony však zatím stále patří do kategorie klinického experimentu. Sami máme experimentální zkušenosti.^{1,2}

Je kvalifikovaně odhadováno, že v současnosti se celosvětově našívá zhruba 49 % mechanických chlopní, 49 % xenograftů a zbylá 2 % tvoří alografty³ Volba typu protézy pro jednotlivá onemocnění a konkrétní pacienty zůstává stále žhavým tématem kardiologických a kardiologických kongresů.

Mezi obecné **výhody chlopního alograftu** (ve srovnání s mechanickou a/nebo biologickou protézou) patří:

1. Maximální možná (téměř fyziologická) EOA (Effective Orifice Area), která je srovnatelná s nativní chlopní event. pulmonálním autografem a současně výrazně větší než všechny používané stentované i bezstentové komerční chlopně.
2. Má potenciál „dilatace anulu“ a zvětšení EOA v případě zvýšených nároků na srdeční výdej – např. při zátěži.
3. Je minimálně trombogenní a není proto nutná žádná antikoagulační či antiagregační medikace.
4. Je naprosto nehlučný.
5. Je relativně odolný proti infekci.

Vedle výhod, má ale použití alograftu i své **závažné nevýhody**:

1. Limitovaná životnost (zejména u velmi mladých nemocných lze s vysokou pravděpodobností očekávat rozvoj degenerativních změn, které mohou vyústit až v potřebu nové náhrady)
2. Vyšší technickou náročnost implantace.

Metoda má limitaci v dostupnosti (danou počtem dárců a dostupností tkáňové banky), což neplatí v naší zemi.

Předkládaná disertační práce chce v úvodu ukázat, že chlopenní alotransplantáty mají své místo v kardiochirurgii a že i v naší zemi s těmito štěpy úspěšně pracuje řada kardiochirurgů a díky nim zde existuje subpopulace nemocných, kteří s tímto typem chlopenní náhrady žijí. Práce chce upozornit, že se pokouší rozšířit naše informace o poznatky, které mohou mít velký praktický dopad. Práce se zabývá způsobem zpracování alogenních chlopenních štěpů (alograftů) v Bance kardiiovaskulární tkáně Transplantačního centra FN Motol. Konkrétně chce ukázat, jak se jednotlivé fáze zpracování včetně kryoprezervace odráží v povrchové morfologii chlopenních alograftů, tedy definovat stupeň poškození endotelu našich, českých štěpů. Poškození povrchů chlopni bylo hodnoceno pomocí skenovací elektronové mikroskopie.

Jednotlivé tkáňové banky totiž kadaverózní tkáň štěpů zpracovávají různým způsobem, takže se produkty – alografty kvalitou tkáně liší. Existuje řada potencionálních faktorů, které mohou negativně ovlivňovat povrchovou morfologii a celkově strukturální integritu chlopenních alograftů, tyto jsou postupně hodnoceny a rozebrány v diskuzi. Obecný přehled chlopenních alograftů včetně historie a současných trendů je stručně uveden v kapitole 2.

1.1. Vymezení pojmů:

Pro lepší orientaci v následujícím textu je nutné definovat některé pojmy. Vzhledem k určitým nepřesnostem v terminologii biologických chlopní, kdy pro určitou chlopní náhradu existuje několik možných výrazů, je nezbytné vymežit pojmy, které se v následujícím textu budou používat.

- **Alogenní (homologní) tkáň** v biologii znamená tkáň stejného živočišného druhu. **Alografterm (homografterm)** tedy rozumíme štěp, odebraný od dárce (človčka), určený k implantaci příjemci (rovněž člověku).
- **Homovitální chlopeň** je chlopeň odebraná za sterilních podmínek během srdeční transplantace (příjemci srdce, tedy žijícímu dárci) nebo kadaveróznímu dárci v rámci multiorgánového odběru po stanovení mozkové smrti. Tato, dále prakticky neošetřená tkáň, bývala zhruba do 48 hodin transplantována příjemci.
- **Antibioticky sterilizovaná chlopeň (tzv. čerstvá – „fresh“ – chlopeň)** je chlopeň odebraná při sekci z kadaverózního dárce do 48 hodin po smrti, nebo častěji v rámci multiorgánového odběru po stanovení smrti mozku podle platné legislativy. Chlopeň je poté sterilizována směsí antibiotik (obvykle 24 hodin při teplotě 37°C) a následně skladována po dobu maximálně 6 týdnů při teplotě 1 - 10°C . Expiruje po 6 – 8 týdnech.
- **Kryoprezervovaná chlopeň** je chlopeň, která je po sterilizaci antibiotiky kontrolovaně mražena (řízeným poklesem teploty ve tkáni rychlostí -1°C/min) v roztoku 10% dimetylsulfidoxidu (DMSO) až na teplotu tekutého dusíku (- 196°C) a následně skladována po dobu až 5 let.

Biologické chlopně (bioprotézy) se dělí na xenografty, alografty a autografty. V textu se bude používat výraz **biologické chlopně**.

- **Xenografty (heterografty, xenotransplantáty, heterotransplantáty):** biologické chlopně pocházející z jiného živočišného druhu (např. vepřové aortální chlopně nebo chlopně vyrobené z hovězího perikardu). V následujícím textu se bude používat výraz **xenograft**. Xenografty se dále dělí na tzv. **stentované**, kdy jsou cípy chlopně ukotveny na rigidní nebo flexibilní kostře - stentu a na **bezstentové (stentless)**, kdy je chlopeň bez stentu.
- **Alografty (homografty, alotransplantáty):** biologická chlopeň pocházející ze stejného druhu (např. aortální, plicnicový nebo mitrální alograft). V následujícím textu se bude používat výraz **alograft, nebo jen štěp**. V klinické praxi je terminologicky aortální alograft a aortální homograft identický a stejně tak tento termín promiskue používají kardiologové i tkáňoví bankéři. Lingvisticky ale tyto termíny shodně nejsou, allo znamená jiný, odlišný – v našem případě míněno odlišný jedinec stejného druhu a homo znamená stejný – zde ve významu stejný druh – člověk. V naší práci proto preferujeme termín „aortální alograft“.
- **Autografty:** chlopně pocházející ze stejného jedince (plicnicové autografty používané k náhradě kořene aorty u Rossovy operace). V textu se bude používat výraz **autograft**.

1.2. Biologické chlopně versus mechanické chlopně – obecný přehled

Doposud není k dispozici randomizovaná studie, která by porovnávala výsledky implantace aortálního alograftu a mechanických chlopní. Většina výhod i nevýhod alograftů, ve srovnání s mechanickými chlopněmi, je obdobná jako u xenograftů.

V odborné literatuře existují pouze dvě velké randomizované studie, které porovnávají dlouhodobé výsledky mechanických chlopní a xenograftů. Jsou to The Veterans Affairs Cooperative Study on Valvular Heart Disease (VA) a Edinburgh heart valve study.^{4, 5, 6} Obě studie porovnávaly obdobné chlopně, tj. diskovou mechanickou chlopeň Björk-Shiley (v době před uvedením poruchového konvexo-konkávniho typu) a biologickou vepřovou chlopeň Hancock (U Edinburgh heart valve studie to byla navíc ještě biologická perikardiální chlopeň Carpentier-Edwards). Chlopně byly použity v aortální i mitrální pozici a doba sledování byla 15 až 20 let. Výsledky byly u obou studií obdobné: přežívání bylo delší u skupiny pacientů s implantovanou mechanickou chlopní. U biologických chlopní byly častější reoperace z důvodu degenerace chlopně. K degeneraci dochází dříve v mitrální pozici (8-10 let) než

v aortální pozici (10-12 let). Riziko tromboembolických komplikací a vzniku endokarditidy je u obou typů chlopní obdobné. Pacienti s implantovanou mechanickou chlopní měli signifikantně vyšší riziko krvácivých komplikací z důvodu antikoagulační léčby.

Z výše uvedených studií a následně i z celé řady dalších observačních studií vyplynulo, že k degeneraci biologických chlopní dochází nejrychleji u mladších pacientů. Nemocní v pokročilém věku mají naopak riziko degenerace chlopně poměrně nízké. Biologické chlopně v mitrální pozici degenerují rychleji ve všech věkových skupinách. U trikuspidální pozice je degenerace pomalejší a nejlepší výsledky vykazují biologické chlopně v aortální pozici u pacientů nad 60 let.^{7, 8}

Na základě výsledků těchto dvou velkých randomizovaných studií, které jsou v souladu s celou řadou dalších observačních studií, se stanovila obecně platná doporučení pro volbu chlopní náhrady.³ Detailnější rozbor a přesná doporučení jsou nad rámec této práce.

2. Hypotézy a cíle práce

Použití biologických chlopenních náhrad, tj. xenograftů, alograftů a později i autograftů, se datuje prakticky od počátků moderní kardiologie. Aortální i plicnicový alograft se úspěšně používá přes 40 let a v dětské i dospělé kardiologii se v určitých indikacích na některých pracovištích považuje za metodu volby.^{9, 10, 11}

Způsob zpracování a implantace alograftů se z pohledu historie několikrát zásadně změnil. V prvopočátcích byly alografty implantovány krátce po sterilním odběru, bez dalšího zpracování. Tyto tzv. homovitální štěpy si nezískaly přílišnou oblibu vzhledem k nemožnosti skladovat chlopeň do doby, než bude zapotřebí, což je základní strategií tkáňového bankéřství.¹² V další fázi byly tedy chlopně odebírány pokud možno za sterilních podmínek a následně sterilizovány pomocí β -propiolaktonu nebo 0,02% chlorhexidenu, o něco později pak ethylen oxidem nebo ozářením.^{27, 13, 14, 15}

Po chemické sterilizaci byly chlopně uloženy v Hankově roztoku o teplotě +4°C po dobu maximálně 4 týdnů.^{27, 16} Takto prezervované chlopně dosahovaly obecně špatných výsledků, byly pozorovány časté degenerace a perforace chlopenních cípů, a proto se od této metodiky opustilo. V roce 1968 zavedl Barratt-Boyes tzv. antibiotickou sterilizaci.¹⁷

Kryoprezervaci poprvé použil v procesu zpracování chlopenních alograftů v roce 1975 O'Brien a znamenala převratný objev, posunující dobu expirace chlopni na léta. Od té doby je jednoznačně nejpoužívanější metodou. Její výhody jsou možnost dlouhodobého uchovávání a šetrná prezervace tkáně, která za dodržení určitých pravidel může zachovat strukturální integritu a dokonce i viabilitu alograftu.¹⁸

První dlouhodobé výsledky kryoprezervovaných alograftů jsou z roku 1986.¹⁸ O'Brien zjistil ve svém souboru, že během 10ti letého sledování bylo 92% nemocných bez reoperace. Podobné výsledky publikoval i Yacoub a spol., který používal tzv. homovitální alograft. Během 10ti let bylo 90% pacientů beze známek degenerace alograftu. Akcelerovanou degeneraci pozoroval u pacientů mladších 30ti let, naopak po 40 roce věku procento degenerace kleslo na výše udávanou hranici.¹⁹ Homovitalní alograft popularizoval

především Yacoub, který sterilně štěp odebíral příjemci srdce během srdečních transplantací a následně štěpy uchovával při teplotě +4°C maximálně 48 hodin do první možné implantace. Vzhledem k nemožnosti skladování, organizační náročnosti těchto operací, menší bezpečnosti z hlediska přenosu infekce štěpem a výsledkům, které odpovídají kryoprezervovaným alograftům, se od jejich používání ustoupilo.

Více jak dvacetileté výsledky kryoprezervovaných alograftů udává opět O'Brien a spol. a jedná se o nejdelší a nejkompletnější follow-up aortálních alograftů v odborné literatuře.¹⁸ Během 30ti letého období byl alograft implantován více jak 1200 pacientům, v počátcích se jednalo o tzv. fresh alograft, od roku 1975 již kryoprezervovaný. Pacientů bez nutnosti reoperace (z jakékoli příčiny) bylo během 20ti letého sledování 50%, a to bez ohledu na způsob prezervace. Frekvence reoperací z důvodu strukturálního poškození u kryoprezervovaných alograftů byla jednoznačně v závislosti na věku příjemce: během 15 let bylo bez nutnosti reoperace z důvodu degenerace 47% (0 – 20 let), 85% (21 – 40 let), 81% (41 – 60) a 94% pacientů (starších 60ti let). Studie tedy prokázala vynikající 15ti letou trvanlivost kryoprezervovaných alograftů u pacientů starších 21 let a zejména pak 60ti let. Naopak výsledky u mladých pacientů jsou suboptimální.

Naše vlastní výsledky operace u 53 nemocných (v letech 1994 – 2008) ukázaly vyšší 30 denní mortalitu (60% tvořili nemocní s infekční endokarditidou). V dalším sledování potom bylo přežití nemocných i interval bez reoperace obdobné, jako u biologických protéz obecně.²⁰

Nevýhodou chlopenních alograftů je obecně, stejně jako u ostatních biologických chlopní, omezená trvanlivost. Střednědobé a dlouhodobé výsledky alograftů se postupně zlepšovaly tak, jak se zdokonaloval způsob jejich zpracování, tj. od chemické a iradiační sterilizace, přes antibiotickou sterilizace („fresh“ alograft) až po dnešní metodu kryoprezervace. S tím, jak se zdokonalovala technika zpracování a prezervace chlopenní tkáně s event zachovalou viabilitou, se snižoval výskyt tzv. strukturálního poškození, tj. degenerace chlopně. Přesto výsledky nelze stále považovat za optimální.

Cílem práce bylo zjistit změny kvality tkáně štěpů při zpracování podle protokolu naší tkáňové banky a navrhnout event. opatření (je-li to možné), která by je zmírnila. Slovo „zmírnila“ zdůrazňuji proto, že k určitým strukturálním změnám tkání

dochází vždy, a to bez ohledu na způsob odběru a zpracování štěpu, tj. změny jsou prokazatelné u čerstvého i kryoprezervovaného alograftu. Je ale podstatné tyto změny minimalizovat, neboť na základě tzv. medicíny založené na faktech mají alografty se zachovalou architektonikou extracelulární matrix a/nebo alespoň částečně zachovalou viabilitou, lepší dlouhodobé výsledky. **Z důvodu dostupnosti metodiky jsme se zaměřili na výzkum změn povrchu chlopní při sledování skenovacím mikroskopem.**

Pro vysvětlení v kterých oblastech kardiochirurgie se chlopenní alotransplantáty užívají a které oblasti kardiochirurgie mohou z výstupu práce těžit si dovoluji v další části vysvětlit v krátkosti použití jednotlivých typů chlopenních štěpů.

2.1. Aortální alograft – historie implantace a indikace

První aortální alograft implantoval v experimentu Gordon Murray v roce 1956.²¹ Po ukončení experimentální práce implantoval v klinické praxi aortální alograft do sestupné aorty z důvodu aortální regurgitace. Dobrá funkce alograftu byla ověřena po 4 letech.²² Hemodynamický benefit heterotopické implantace aortálního alograftu byl v experimentu dále ověřen Bellem, dobrá dlouhodobá funkce v klinice Erwinem, který v Torontu implantoval aortální alograft do sestupné aorty u 9 pacientů. Dobrá funkce se prokázala u 6 z nich, a to až v šestiletém sledování.^{23, 24}

První ortotopickou implantaci aortálního alograftu provedl v klinické praxi Bigelow (pacient zemřel bezprostředně po operaci na koronární trombózu). V roce 1962 následovaly pak již úspěšné transplantace, které nezávisle na sobě realizovali Ross a Barratt-Boyes, publikováno 1962 a 1964.^{25, 26, 27}

Aortální alograft se kromě své obvyklé aortální pozice používal ojedinele v experimentu, ale i v klinické praxi v mitrální nebo trikuspidální pozici.^{28, 29, 30, 31} Jedním z prvních průkopníků byl i československý kardiochirurg Hubka.^{32, 33, 34}

V posledních letech jsou používány dvě chirurgické techniky: tzv. free-hand technika nebo se alograft implantuje jako tzv. aortální kořen – root replacement. V současnosti se více používá náhrada kořene aorty, která i když je zatížena větším rizikem krvácení nebo komplikací spojených s implantací věnčitých tepen, má lepší dlouhodobé výsledky.^{35, 36, 37} Někteří autoři ale subkoronární techniku používají úspěšně i nadále.^{38, 39}

V současnosti je aortální alograft uznávanou alternativou ostatních typů náhrad aortální chlopně. Jeho výhodou jsou výborné hemodynamické vlastnosti, které jsou srovnatelné s nativní aortální chlopní.^{40, 41} Další výhodou je velice nízké riziko tromboembolických komplikací a endokarditidy (89% - 95% pacientů je během 20ti let bez endokarditidy).^{42, 43, 44} V experimentu je dokonce prokazována rezistence proti methicilin rezistentnímu zlatému stafylokoku (MRSA)⁴⁵

Nejčastější a nejvíce akceptovanou indikací aortálního alograftu je bezesporu bakteriální endokarditida nativní nebo protetiké chlopně. Není jednoznačný konsensus, který druh chlopně, tj. mechanická, xenograft nebo alograft, má v případě infekční endokarditidy nejlepší výsledky. Neexistuje rovněž žádná randomizovaná studie, která by výše uvedené chlopenní náhrady v indikaci endokarditidy porovnala a k dispozici jsou pouze retrospektivní studie, mnohdy bohužel s poměrně malým počtem zařazených pacientů. Výsledky těchto studií jsou často v rozporu, a to i z toho důvodu, že se porovnávají nesourodé skupiny (floridní endokarditis a zhojená, proběhlá endokarditis). Přesto se zdá, že alograft má oproti ostatním typům náhrad své výhody a že je více odolný k vzniku reinfekce.^{46, 47} Tato odolnost k infekci se vysvětluje event. viabilitou alograftu a pochopitelně, ve srovnání s mechanickou protézou a xenograftem, absencí cizího materiálu jako je např. našívací dakronový prstenec. Proto je dnes řadou kardiologů považován za metodu volby u infekční endokarditidy aortální chlopně.

Kromě výše uvedené indikace lze aortální alograft použít u pacientů středního věku, tj. 40 – 60 let, u kterých je antikoagulační léčba kontraindikována. Dále lze tuto indikaci rozšířit o pacienty s aktivním životním stylem, kteří si rovněž nepřejí užívat antikoagulační a navíc jim alograft, díky svým výborným hemodynamickým vlastnostem umožňuje opravdu aktivní fyzickou námahu. Riziko reoperace je u této věkové skupiny akceptovatelné a samotná reoperace je rovněž proveditelná s poměrně nízkým rizikem.

2.2. Pulmonální alograft - historie implantace a indikace

Během historie chirurgie vrozených srdečních vad se k obnovení kontinuity mezi pravou komorou a plicnicí použila celá řada materiálů a chlopní. Plicnicový alograft se začal používat v dětské kardiologii o něco později než aortální, ale způsoby jeho zpracování a uskladnění jsou naprosto totožné s aortálním alograftem. V době před „érou“ plicnicového alograftu se používaly do pulmonální pozice aortální alograft, mechanické chlopně a xenografty, případně dakronové konduity s xenografem (např. Hancock).

Jako první použili aortální alograft k náhradě pulmonální chlopně Ross a Somerville v roce 1966.⁴⁸ Záhy se ukázalo, že dochází k časně degeneraci a kalcifikaci s nutností reoperace. Tato časná degenerace byla dána zejména nedokonalým způsobem zpracování alograftů (chemická a radiační prezervace).⁴⁹ Xenografty a konduity s xenografem se používaly poměrně často, některé z nich dodnes. Pro riziko časně degenerace a kalcifikace chlopně i konduity se dnes u dětí používají spíše výjimečně. Nepříznivé výsledky konduity s xenografem a zároveň nové možnosti zpracování alograftů včetně možnosti kryoprezervace, které vedly k lepší trvanlivosti takto zpracovaných chlopní, měly za následek „opětovné vzkříšení“ chlopních alograftů v dětské kardiologii.^{62, 50} I přes zdokonalení techniky prezervace docházelo stále k předčasné degeneraci a kalcifikaci alograftů použitých k heterotopické rekonstrukci výtokového traktu pravé komory (RVOT) a to zejména u malých dětí a nemocných s významnou plicní hypertenzí.^{51, 52} Proto se v polovině 80. let začal stále častěji používat pulmonální alograft, který ve srovnání s aortálním v této pozici, nabízel několik potencionálních výhod: anatomicky i fyziologicky simuluje nativní plicní tepnu, dále lze použít bifurkaci pulmonálního alograftu k perifernějšímu napojení na plicní řečiště a konečně má ve své stěně, ve srovnání s aortou, nižší obsah kalcia, který snižuje riziko časně kalcifikace.⁵³ Tomu odpovídají i výsledky, které jsou obecně v případě rekonstrukce RVOT u vrozených srdečních vad lepší, než u aortálního alograftu. Proto je pulmonální alograft považován v této indikaci většinou dětských kardiologů za metodu volby.^{54, 55}

V současnosti je pulmonální alograft v dětské kardiologii používán nejčastěji k rekonstrukci výtokového traktu pravé komory u pacientů s Fallotovou tetralogií, společným arteriálním trunkem, atrézií plicnice, dvojitým výtokovou pravou komorou nebo transpozicí velkých artérií. Další velmi častou indikací je Rossova operace, kdy je pulmonální alograft

používán k náhradě kořene vlastní plicnice, která je použita k rekonstrukci výtokového traktu levé komory jako tzv. plicnicový autograft.

Výsledky u těchto dvou hlavních skupin, ve smyslu degenerace pulmonálního autograftu a nutnosti reoperace, se významně liší. Obecně jsou lepší u pacientů po Rossově operaci, kdy je během 5ti a 10ti letého sledování bez nutnosti reoperace 93% a 80%.⁵⁶ Důvody, proč jsou dlouhodobé výsledky pulmonálního alograftu u pacientů po Rossově operaci lepší, jsou tyto: je to zejména výhodná anatomická, tzv. ortotopická pozice, kde na rozdíl od heterotopické pozice nehrozí komplikace jako kinking alograftu nebo jeho komprese sternem. Dále to pravděpodobně souvisí s možností použít konduit větších rozměrů.⁵⁷

Pulmonální alograft je tedy nejčastěji používaný extrakardiální konduit při řešení vrozených srdečních vad s nutností rekonstrukce výtokového traktu pravé komory.^{58, 59, 60, 61} Mezi jeho výhody patří poměrně jednoduchá technika implantace a nízké riziko krvácivých komplikací, mezi nevýhody naopak možnost vzniku pseudoaneurysmatu.^{61, 62} Nejdůležitější jsou ale dlouhodobé výsledky ve smyslu degenerace alograftu a jeho selhání s nutností reoperace a tyto výsledky stále nejsou optimální, zejména u pacientů mladších 1 roku. Jedním z vysvětlení těchto nepříznivých výsledků je i somatický růst dítěte. Vezme-li se ovšem v úvahu skutečná velikost implantovaného pulmonálního alograftu a kalkulovaná velikost dle věku pacienta v době explantace, tak nedostatečná velikost alograftu je příčinou reoperace pouze u 10% dětí. Naopak nejčastějšími příčinami jsou stále kalcifikace a degenerace chlopně a konduitu, nejčastěji v anulární oblasti a dále kinking alograftu nebo jeho komprese sternem⁶³

Střednědobé a dlouhodobé výsledky alograftů se u jednotlivých autorů poněkud liší, ale obecně jsou přibližně tyto: bez selhání pulmonálního alograftu je během 1, 5 a 10 let cca 90%, 70% a 50% pacientů, beze známek dysfunkce alograftu pak 80%, 50% a 20% pacientů.^{58, 59, 60, 61, 64} Rizikovými faktory dysfunkce jsou věk, malá velikost použitého alograftu, aortální alograft ale i např. délka teplé ischemie.⁶⁴ Někteří autoři udávají příznivé střednědobé až dlouhodobé výsledky se speciální xenoprotézou Contegra (Medtronic, Minneapolis, MN), což je glutaraldehydem ošetřená hovězí jugulární žíla.⁶⁵

Jak již bylo uvedeno výše, dlouhodobé výsledky pulmonálních alograftů u pacientů po Rossově operaci jsou výrazně lepší.⁵⁶

2.3. Banka kardiovaskulární tkáně Transplantačního centra FN Motol

V roce 1976 vzniklo ve FN Motol Dětské kardiocentrum FN Motol, jehož kardiochirurgická skupina, vedená prof. Hučínem se zabývala myšlenkou zavést použití chlopenních alograftů při řešení některých vrozených srdečních vad. V roce 1980 MUDr. Špatenka navštívil v rámci studijního pobytu National Heart Hospital v Londýně a diskutoval projekt se samotným Donaldem Rossem (osobním přítelem tehdy ještě žijícího legendárního českého kardiochirurga prof. Kafky). Kromě cenných rad přivezl kompletní protokol zpracování chlopenních štěpů. Po diskuzích především s patologi a soudními lékaři (bylo třeba získat přístup k dárčům) byly první aortální alotransplantáty připraveny v roce 1982, později i štěpy pulmonální. Jednalo se o tzv. čerstvé, antibioticky sterilizované chlopně. Průměrně se odebíralo 20 srdcí ročně, převážně od kadaverózních dárců na pitevně a jen výjimečně se dařilo do 6 týdnů najít vhodného příjemce.

V roce 1991 bylo zřízeno Transplantační centrum FN Motol, byla zahájena spolupráce s Ústavem hematologie a krevní transfúze Praha (sterilní zpracování a kryokonzervace štěpů) a především s ostatními transplantačními centry v České republice (ve světě výjimečný systém získávání srdcí multiorgánových dárců, která nejsou z nějakého důvodu transplantována).

V roce 1992 se zahájila kryoprezervace a byla založena Kryobanka srdečních chlopní a cév. Kryobanka srdečních chlopní, díky spolupráci s koordinačním pracovištěm IKEM, nyní s Koordinačním centrem transplantací, participuje na multiorgánových odběrech, což jí umožňuje odběr srdcí, které nejsou vhodné k srdeční transplantaci a která zároveň splňují kritéria odběru srdce na chlopenní alografty. V roce 2004 vznikla zákonným rozhodnutím Ministerstva zdravotnictví České republiky Specializovaná tkáňová banka STB85 - Banka kardiovaskulární tkáně (BKVT). Po celou dobu svého působení, tj. od roku 1992, je Banka kardiovaskulární tkáně jediná v České republice a pokrývá tedy potřeby všech pracovišť, která se zabývají kardiovaskulární problematikou, tj. kryje potřebu kardiovaskulární tkáně v rámci republiky.

Za celou dobu působnosti Banky kardiovaskulární tkáně, tj. od roku 1992 dodnes bylo zpracováno celkem 1164 srdcí. Celkem bylo vyrobeno 1996 aortálních a pulmonálních alograftů, což je 85% z celkového možného množství – viz **tabulka 1**. Přehledně vztah odebraných srdcí na alografty a dále vztah vyrobených a použitých alograft ukazuje **graf 1 a 2**. Z tabulky a grafů vyplývá, že 15% chlopenních alograftů nebylo použito. Důvody pro vyřazení byly: špatný odběr, degenerativní změny, bikuspidální aortální chlopeň, nevhodná anatomie, přetrvávající pozitivní kultivační nález u kontaminovaných chlopní nebo seropozitivita např. na hepatitidu B a C a také arbitrárně stanovená expirace štěpů (po 5 letech od zamražení). Celkem bylo z banky vydáno 1 007 uskladněných štěpů, tj. cca 50%, z nichž 1 996 bylo transplantováno. Dvanáct štěpů nebylo použito - 7 x chybně rozmražené, případně byla zjištěna chybná manipulace a u 5 operací bylo použito více štěpů.

V současné době je tedy odběr dostatečný a pokrývá potřeby všech kardiochirurgických pracovišť v České republice. Cca 350 štěpů je k dispozici v kryoskladech banky STB 85. Určitá část uskladněných kryoprezervovaných alograftů byla rovněž použita pro vědecké účely.

Aktivitu Banky kardiovaskulární tkáně FN Motol a aktivitu českých kardiochirurgických pracovišť lze srovnat s aktivitami velkých evropských i světových tkáňových bank, a aktivitou kardiochirurgů které se zabývají problematikou chlopenních alograftů (samozřejmě při přepočtu na 1 milion obyvatel).

Až 60% uskladněných alograftů je použito v rámci FN Motol, na Oddělení dětské kardiologie, při korekci vrozených srdečních vad. Zbytek je pak použit na ostatních kardiochirurgických pracovištích ČR – viz. dále **tabulka 2 a 3**.

tabulka 1: Aktivita Banky kardiovaskulární tkáň FN Motol v letech 1992 – 2008
(počet odebraných srdcí na alografty a dále počet vyrobených a vydaných štěpů).

Rok	Počet odebraných srdcí (n)	Vyrobené chlopenní alografty (n)	Vydané chlopenní alografty (n)
1992	59	93	23
1993	78	82	25
1994	62	83	58
1995	75	121	56
1996	78	149	76
1997	71	128	61
1998	60	107	67
1999	47	88	64
2000	53	93	63
2001	66	102	49
2002	59	116	62
2003	76	141	69
2004	93	180	67
2005	79	139	54
2006	66	121	50
2007	78	143	69
2008	64	116	88
CELKEM	1164	1 996	1007

tabulka 2: Procentuální zastoupení typů kardiochirurgických operací, u kterých byl použit chlopenní alograft - počet operací neodpovídá počtu z banky vydaných štěpů, protože 12 štěpů nebylo použito (chybně rozmražené, chybná manipulace) a u 5 operací bylo použito více štěpů.

Typ operace	Počet	%
Korekce vrozené srdeční vady	545	55
Náhrada chlopně / kořene aorty	283	29
Rosova operace	162	16
CELKEM	990	100

tabulka 3: Odběr chlopenních alograftů dle jednotlivých pracovišť (1992 – 2008).

(pozn.: IKEM-Institut klinické a experimentální medicíny, CKTCH-Centrum kardiovaskulární a transplantační medicíny, VFN – Všeobecná fakultní nemocnice).

Pracoviště	Počet	%
Dětské kardiocentrum FN Motol	530	52.6
Kardiochirurgická klinika FN Motol	85	8.4
Kardiocentrum České Budějovice	105	10.4
IKEM Praha	37	3.7
Nemocnice Na Homolce, Praha	37	3.6
CKTCH Brno	25	2.5
Kardiochirurgická klinika FN Hradec Králové	11	1.1
Kardiochirurgická klinika Olomouc	8	0.8
Kardiochirurgická klinika VFN Praha	2	0.2
ZAHRANIČÍ	167	16.7
C E L K E M	1 007	100

Odběry od pediatrických dárců po zástavě oběhu (NHBD)

Transplantační centrum FN Motol reagovalo na požadavky dětských kardiochirurgů na štěpy dětských dárců tím, že začlenilo do svého programu i odběry od pediatrických tzv. non heart-beating dárců. V rámci programu odběru orgánů republiky jsou totiž dětské dárce orgánů velmi „vzácní“, dlouhodobě tvoří pouze kolem 5% poolu dárců republiky. Z tohoto programu je tedy ročně k dispozici jen několik málo dětských srdcí pro přípravu chlopenních štěpů, většinou větších zemřelých dětí. Proto jsou jediným možným zdrojem dětí, zemřelé na pediatrických JIP. Tento program je v souladu s českou legislativou.⁶⁶⁶⁷

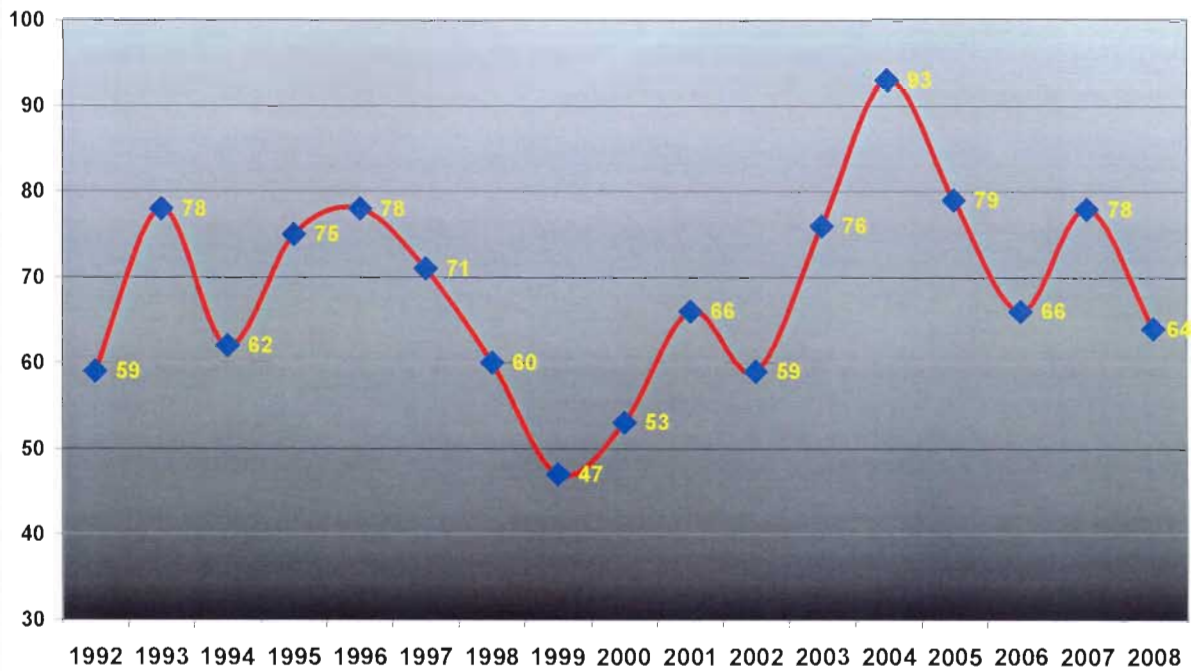
V terminálním stádiu onemocnění potenciálního dárce jsou ošetřujícím personálem informováni rodiče. V případě, že souhlasí s odběrem srdce, je informováno Transplantační centrum FN Motol. Po uplynutí 2 hodin po úmrtí dítěte a po obdržení formálního souhlasu rodičů, provede odběrový team odběr srdce za sterilních podmínek na lůžku JIP – **foto 1 a 2**.

Během období 8 let (2001 – 2008) bylo tímto způsobem a za úzké spolupráce ošetřujícího personálu dětských JIP získáno celkem 25 srdcí (připraveno 50 štěpů), které byly vhodné k odběru na chlopenní alografty. Do dnešních dnů byla většina z nich již použita ke korekci vrozených srdečních vad u pediatrických pacientů na Dětském kardiocentru FN Motol.

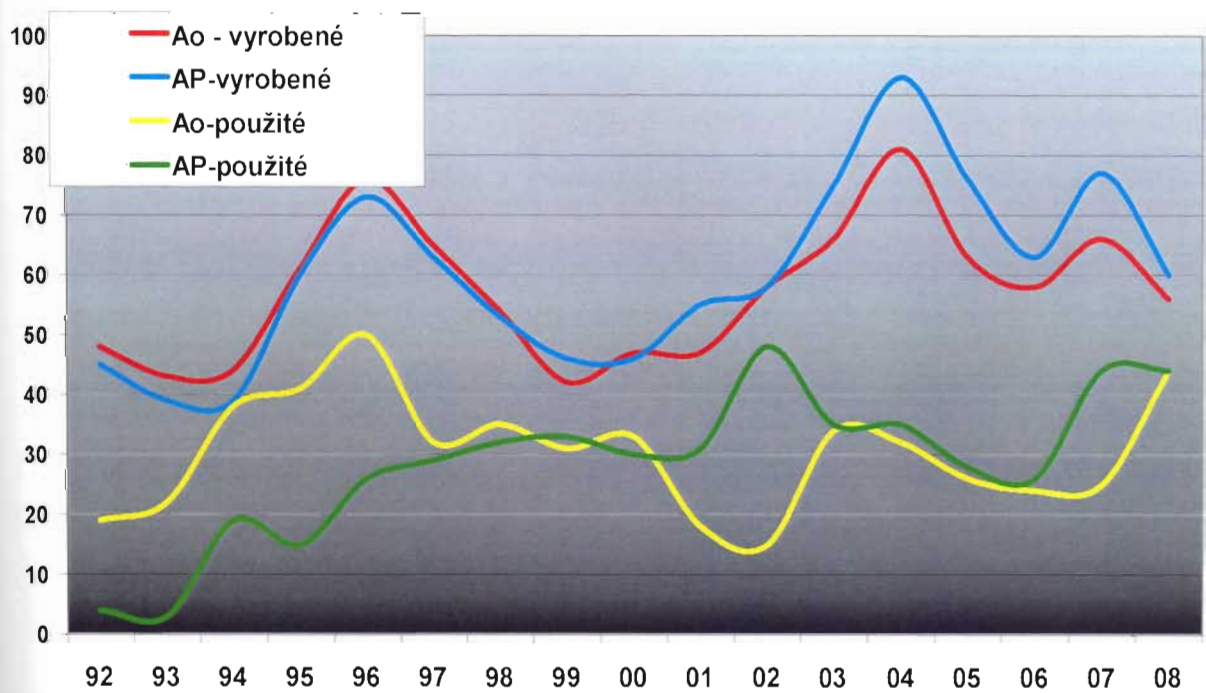
Jak již bylo výše zmíněno, je způsob zpracování nejdůležitější faktor, který určuje dlouhodobou trvanlivost a funkci chlopenních alograftů. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli ověřit současný protokol Transplantačního centra FN Motol a jeho Banky kardiovaskulární tkáně na vznik event. strukturálních a morfologických změn alograftů.^{68, 69} Následující práce proběhla ve spolupráci Transplantačního centra FN Motol v Praze a Anatomického ústavu Lékařské fakulty v Hradci Králové (přednosta: doc. MUDr. Dagmar Slížová, CSc.) a zabývá se morfologickým poškozením endotelu a event. i hlubších subendoteliálních struktur během jednotlivých fází procesu zpracování a kryoprezervace chlopenních alograftů.

Způsob odběru, zpracování a kryoprezervace je detailně rozebrán v kapitole 3.- Protokol Banky kardiovaskulární tkáně STB85 a byl i opakovaně publikován.^{68, 69}

Graf 1: Počet odebraných srdcí na alografty (1992 - 2008)



Graf 2: Počet vyrobených a použitých aortálních a pulmonálních alograftů (1992-2008)



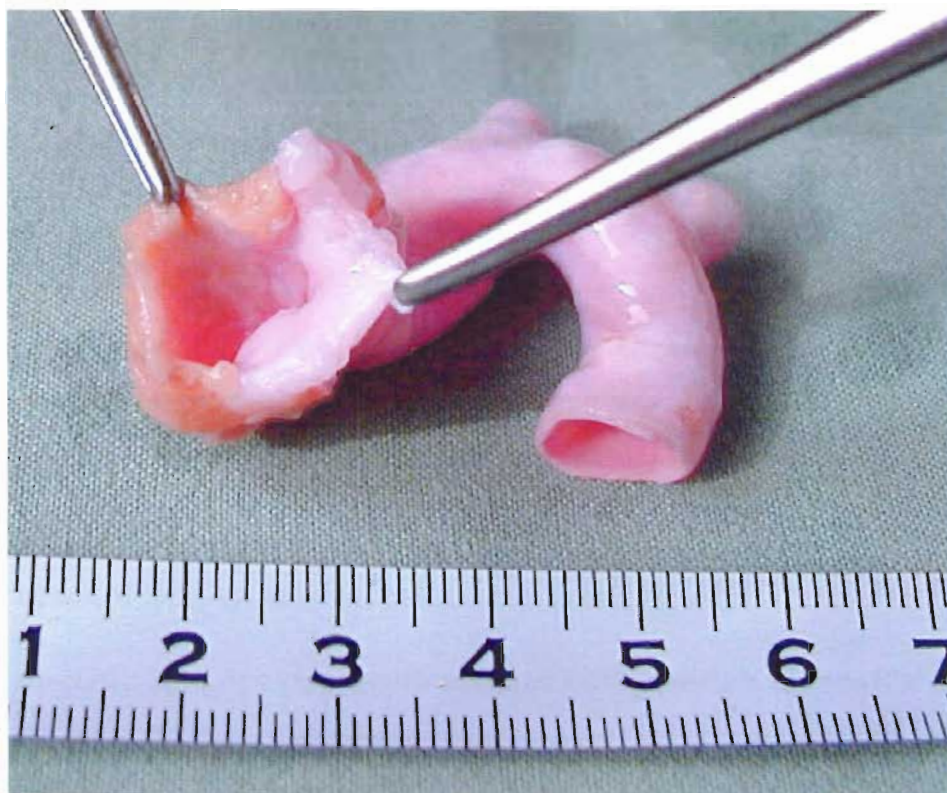


Foto 1: Odebraný aortální alograft od dětského dárce včetně oblouku aorty a proximální části sestupné aorty. Pravá pinzeta drží část předního cípu mitrální chlopně.

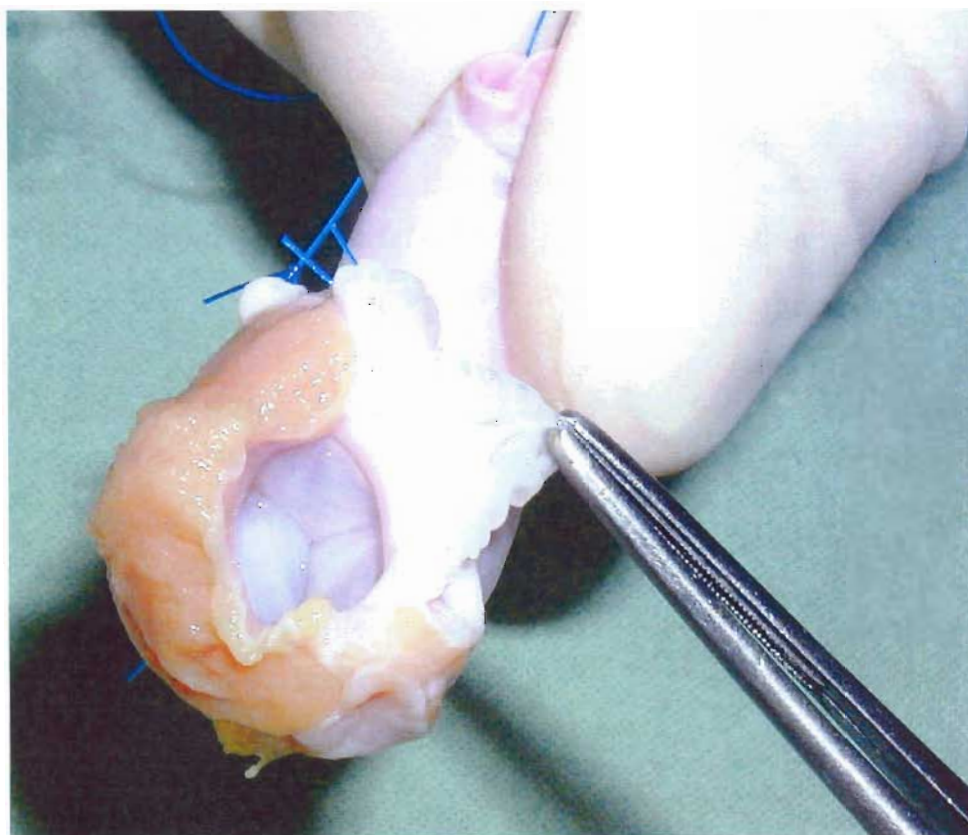


Foto 2: Odebraný aortální alograft od dětského dárce. Pohled z komorové strany. Pinzeta opět drží část předního cípu mitrální chlopně. Štěp je injekční stříkačkou (pod tlakem) naplněn Ringerovým roztokem a je konstatována perfektní kompetence aortální chlopně (věčnitě tebnv isou ligovánv).

3. Materiál a metodika

Studie byla založena na vyšetření a hodnocení chlopenních alograftů, které byly zpracovány podle protokolu Banky kardiovaskulární tkáně FN Motol, Praha^{60, 61}. Byly použity rutinně připravené štěpy (splňující všechna kritéria k implantaci), které nebyly propuštěny k použití pro mechanické poškození při zpracování. Stěna velké cévy a minimálně jeden cíp byly intaktní a představovaly tedy reprezentativní vzorky tkáně štěpů.

3.1. Protokol Banky kardiovaskulární tkáně ve FN Motol, Praha

3.1.1. Odběr srdce pro účely získání chlopenních alograftů

Srdce pro přípravu chlopenních alograftů (AHV – allograft heart valve) jsou získávána v souladu s Českou legislativou, tedy s „Transplantačním zákonem“ (Zákon č. 285/2002 Sb.) i se „Zákonem o lidských buňkách a tkáních“ (Zákon č. 296/2008 Sb.). Za dodržování legislativy zodpovídá transplantační koordinátor regionálního transplantačního centra, případně vedoucí odběrového týmu tkáňové banky (tkáňového zařízení). Jsou sterilně odebírána od zemřelých, u kterých byla prokázána smrt mozku, ale oběh funguje, tedy během multiorgánových odběrů (MOO), v případě, že srdce dárce není vhodné k transplantaci jako orgán (tzv. heart-beating dárce – HBD). Další možností je odběr od zemřelých s ireverzibilní zástavou oběhu), tedy od tzv. non heart-beating dárců (NHBD). Takový odběr probíhá buď sterilně na operačním sále, nebo „občansky čistě“ na pitevně.

Medicínská kritéria k odběru AHV v době výzkumu:

- obecná kritéria k multiorgánovým odběrům, především negativní sérologický screening na HIV, hepatitidy B a C, syfilis a CMV, vyloučení rizikového sexuálního chování a pod.
- odběr „bijícího srdce“, až 48 hodin po zástavě oběhu
- nejnižší věk: donošený novorozenec, nejvyšší věk: 55 let
- následující nemoci byly **kontraindikací odběru**: aortální stenóza nebo kalcifikace, bikuspidální aortální chlopeč, disekce ascendentní aorty, koarktace aorty, syfilitická aortitis, nádory srdce, tuberkulóza, sepse, mnohočetná ateroskleróza, Creutzfeldt-Jacobsova nemoc
- Ischemická choroba srdeční naopak nebyla a není kontraindikací

3.1.1.1. Sterilní odběr srdce od zemřelých s bijícím srdce během multiorgánových odběrů a od NHBD v době výzkumu

Postup odběru srdce pro přípravu chlopenních alograftů

Operováno bylo standardní chirurgickou technikou, přísně asepticky. Přístupem k srdci byla střední sternotomie, na konci multiorgánového odběru nebo při odběru od NHBD.

U multiorgánového odběru je nezbytné na bijícím srdci vyloučit signifikantní aortální a mitrální regurgitaci nebo stenózu, a to palpací šelestu, případně echokardiograficky. Odběr srdce následuje během multiorgánových odběrů po event. odběru abdominálních orgánů (ledviny, játra, pankreas) a/nebo plic. Srdce je odebráno s dlouhými segmenty aorty (ascendentní aorty a oblouku až po odstup levé podklíčkové tepny) a plicnice (odběr včetně bifurkace a jejich větví – přerušení až v hilu). Srdce je následně uloženo do sterilní nádoby s 200 – 300 ml Ringerova roztoku a jemnou masáží se vypláchne krev ze srdečních dutin.

Odebrané srdce je následně uloženo k transportu do tkáňové banky trojvrstevnou technikou, tedy do sterilního plastického sáčku s cca 250 ml Ringerova roztoku o teplotě +4°C, který je dále vložen do dvou dalších stejných plastických sáčků. Tyto sáčky jsou uloženy v nesterilním polystyrénovém transportním kontejneru, kde jsou zasypány ledem a převezeny do Transplantačního centra FN Motol k dalšímu zpracování.

3.1.1.2. Odběr srdce od dárců s nebijícím srdcem mimo operační sály

Zúžená kritéria k nesterilnímu odběru srdce pro přípravu AHV od dárců s **nebijícím srdcem**:

- preference mladších dárců, horní věková hranice je 40 let
- preferenčně odběr od dárců, kteří zemřeli náhodně (nehoda, sebevražda), než od dárců, kteří zemřeli z důvodu nemoci

Postup odběru chlopenních alograftů

Odběr srdce se provádí před, a nebo na začátku pitvy. Přístupem k srdci je opět střední sternotomie. Srdce je také odebráno s dlouhými segmenty aorty (ascendentní aorty a oblouku až po odstup levé podklíčkové tepny) a plicnice (odběr včetně bifurkace a jejich větví). Srdce

je následně uloženo do sterilní nádoby s 200 – 300 ml Ringerova roztoku tak, aby se odstranily zbytky krve z jeho dutin.

Odebrané srdce je následně k transportu do tkáňové banky uloženo stejně jako při MOO trojvrstevnou technikou, tedy do sterilního plastického sáčku s cca 250 ml Ringerova roztoku o teplotě +4°C, který je dále vložen do dvou dalších stejných plastických sáčků. Tyto sáčky jsou uloženy v nesterilním polystyrénovém transportním kontejneru, kde jsou zasypány ledem a převezeny do Transplantačního centra FN Motol.

3.1.2. Vlastní příprava aortálního a plicnicového alograftu

Příprava chlopenních alograftů by měla proběhnout co nejdříve po odběru srdce, a to z důvodu co nejkratší doby studené ischemie, tak aby se udržela viabilita zpracovávané tkáně. Aortální a pulmonální alograft je odebírán kardiochirurgem, za sterilních podmínek, v boxu s laminárním prouděním vzduchu (třída 100); odebíraná tkáň je během odběru vlhká a oplachovaná v Ringerově roztoku.

Kvalita cípů chlopně, anulu a endotelu přilehlé aorty nebo plicnice je rutinně kontrolována tak, že se celý odebraný kořen aorty nebo kmen a větve plicnice obrátí „naruby“ – viz. **foto 3 a 4**. Kompetence chlopně je testována tak, že se kořen naplní 20 ml Ringerova roztoku – viz foto č. 2. Alografty s vrozeným nebo získaným postižením chlopně nebo s významnou aterosklerózou cípů nebo/a přilehlé cévní stěny nejsou dále zpracovávány a jsou vyřazeny. Konečně se změří vnitřní průměr chlopně (v milimetrech) a délka velkých cév (v centimetrech). K měření vnitřního průměru chlopně (anulu) se používají Hegarovy dilatátory (10 – 30mm). Části stěny aorty a plicnice jsou odebrány na histologické vyšetření (uskladněny v 10% formolu). Tři vzorky z aorty i plicnice jsou připraveny k samostatné sterilizaci, a to stejným způsobem, jakým proběhne sterilizace vlastních alograftů (z důvodu následného mikrobiologického vyšetření).

Patolog, nebo soudní lékař, kteří ze zákona zajišťují povinnou pitvu každého dárce orgánů a tkání nemají možnost srdce dárce vyšetřit. Proto je povinností kardiochirurga prohlédnout a makroskopicky vyšetřit celé srdce a velké cévy. Přesně popíše anatomii, všechny patologické změny chlopní, stěny aorty a plicnice i myokardu včetně event. aterosklerotického poškození věnčitých tepen. Z forenzního hlediska (a z pohledu zdravotní pojišťovny) totiž kardiochirurg současně provádí parciální pitvu srdce. Protokol o parciální pitvě srdce podepisuje kardiochirurg a tento dokument je přílohou pitevního protokolu příslušného zemřelého – viz **příloha 1**.

3.1.3. Sterilizace chlopenních alograftů

Odebrané aortální i pulmonální alografty jsou uloženy v plastických kelímcích s 200 ml nutričního media s roztokem antibiotik. Ke sterilizaci alograftů od BHD a NHBD nebo od mrtvých dárců se používají rozdílné roztoky. Oba jsou založené na kombinaci kultivačního média E 199 a směsi antibiotik (koncentrace v mg/ml):

Odběr alograftů od HBD a NHBD:

Amikacin	0,1	(Amikin, Bristol-Myers Squibb)
Ampicillin	0,2	(Ampicillin, Pliva d.d. Zagreb)
Cefoperazon	0,2	(Cefobid, Pfizer)
Fluconazol	0,1	(Mycamax, Léčiva a.s.)

Odběr alograftů od kadaverózních dárců při sekci:

Amikacin	0,1	(Amikin, Bristol-Myers Squibb)
Ampicillin	0,2	(Ampicillin, Pliva d.d. Zagreb)
Cefoperazon	0,2	(Cefobid, Pfizer)
Amphotericine B	0,1	(Amphotericine B, Squib)

Roztok nutričního media s antibiotiky musí být čerstvý, připraven bezprostředně před použitím, s pH 7.3 – 7.4 (E 199 obsahuje barevný indikátor, který zůstává jasně červený, má-li roztok požadované pH). Pokud dojde k barevné změně, musí se pH zkontrolovat a event. přidat 8.4% NaHCO₃.

Mikrobiologický screening

Dárci z multiorgánových odběrů a NHBD jsou rutinně testováni na HIV, hepatitidu B a C, CMV, EBV a syfilis. Stejný sérologický screening je nutný i z krve zemřelých dárců chlopenních štěpů, pokud nešlo o odběr v rámci MOO.

Dále se pátrá po případné reziduální infekci tkáň AHV. Po 24 hodinové inkubaci v roztoku antibiotik jsou předem připravené vzorky zaslány na mikrobiologické vyšetření (aerobní & anaerobní kultivace včetně detekce fugální a mykotické kontaminace a kultivace na mykobakteria).

3.1.4. Kryoprezervace chlopenních alograftů

Kryoprezervace prodlužuje limit studené ischémie štěpů ze 6 týdnů na 5 let. Kryokonzervace aortálních i pulmonálních alograftů od jednoho dárce se většinou provádí simultánně. V laminárním boxu jsou chlopně přemístěny ze sterilizačního kultivačního roztoku superaseptickou technikou do kryoprotekčního roztoku (E 199 s 10% dimethylsulfidoxydem) a zataveny do plastických vaků (Gambro Hemofreeze bags NPBI BV DF 1200, The Netherlands) dvouvrstevnou technikou.

Příprava kryoprotektivního roztoku

20 ml studeného (+ 4 °C) fetálního hovězího séra nebo 5% lidského albuminu je přidáno do 70 ml studeného (+ 4 °C) kultivačního média E 199 bez antibiotik a promícháno. Nakonec se přidá 10 ml dimethylsulfidoxydu (DMSO) s cílovou koncentrací DMSO 10%.

Programované zmrazení alograftů

Šetrná manipulace s alograftem se provádí pomocí jemné cévní pinzety, je zakázáno se dotýkat cípů chlopně. Plastické kelímky, ve kterých jsou uloženy chlopenní alografty, jsou za sterilních podmínek otevřeny, chlopně vyjmuty a jsou z nich odebrány 3 další malé vzorky k mikrobiologickému vyšetření (obdobné vyšetření jako po sterilizaci antibiotiky kromě vyšetření na mykobakterium). Následně je alograft umístěn na 1 minutu do lázně s kultivačním médiem E 199 bez antibiotik a pak přenesen do menšího plastického vaku (Gambro) s 40 – 50 ml kryoprotektivního roztoku. Z vaku je pečlivě odstraněn vzduch, je zataven a konečně sterilně uložen a zataven ve druhém větším plastickém vaku, který je rovněž zataven. Další fáze kryoprezervace již probíhá za nesterilních podmínek.

Teplota vaků, před vložením do mrazicí komory se musí udržovat přibližně + 4 °C, protože při této teplotě je DMSO méně cytotoxické. K zamezení teplotních výkyvů během přesunu alograftu do skladovacího kontejneru s tekutým dusíkem se vak ukládá do kartónové obálky, která jej mechanicky chrání a významně snižuje i teplotní výkyvy později, během přesunu chlopni v kontejneru ke klinickému použití.

Vlastní šetrné mražení tkání zajišťovalo programovatelné chladicí zařízení IceCube (SY-LAB Ltd., A-3002 Purkersdorf, Austria). Program byl empiricky nastaven tak, aby teplota alograftů stejnoměrně klesala zhruba o $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ za minutu. Průběh nastavení teploty v komoře přístroje a v mražené tkáni ukazuje **graf 1**. Program zastavil chlazení při dosažení teploty $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ a čekal 5 minut.

Alografty jsou uloženy v tekuté fázi tekutého dusíku při teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ v kryoprezervačním kontejneru (Tailor-Wharton Cryostorage Container 8K) v policovém skladovacím systému ICS – 8K – BM (SY-LAB Ltd., A-3002 Purkersdorf, Austria), který pojme 48 štěpů v kartonových obalech.

3.1.5. Rozmrazovací proces a vyjmutí štěpu k vlastní transplantaci

Alespoň 30 minut před implantací je alograft vyjmut z transportního kontejneru (Transportní Dewarova nádoba CP 500, Tailor Wharton HARSCO s možností měření teploty). Kartónová obálka se otevře a dvojrstevný vak se nechá rozmrazovat po dobu 15 minut při pokojové teplotě. Dále je vak umístěn na dalších 15 minut do nesterilní vodní lázně o teplotě $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně je vnější vak sterilními nůžkami otevřen a vnitřní vak vyjme sterilně sálová instrumentárka na instrumentační stolek. Chirurg již sterilně otevírá vnitřní vak a vyjímá štěp k transplantaci. Doporučený postup správného a pomalého vymytí spočívá v postupném, 3x se za sebou opakujícím naředěním kryoprotektivního roztoku 1:1 Ringerovým roztokem o teplotě $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakonec je alograft dvakrát opláchnut v Ringerově roztoku a odeberou se dva vzorky na mikrobiologické vyšetření (anaerobní & anaerobní vyšetření). **Foto 5** ukazuje rozmražený aortální alograft, který je připravený k implantaci. Stejný postup byl dodržen v našem experimentu.

Graf 1: Průběh teploty během programovaného mražení chlopenních štěpů. Spodní křivka ukazuje průběh teploty v chladicí komoře přístroje. Horní křivka potom dokumentuje skutečný průběh teploty ve tkáni podchlazovaného štěpu během procesu programovaného zamrazování.

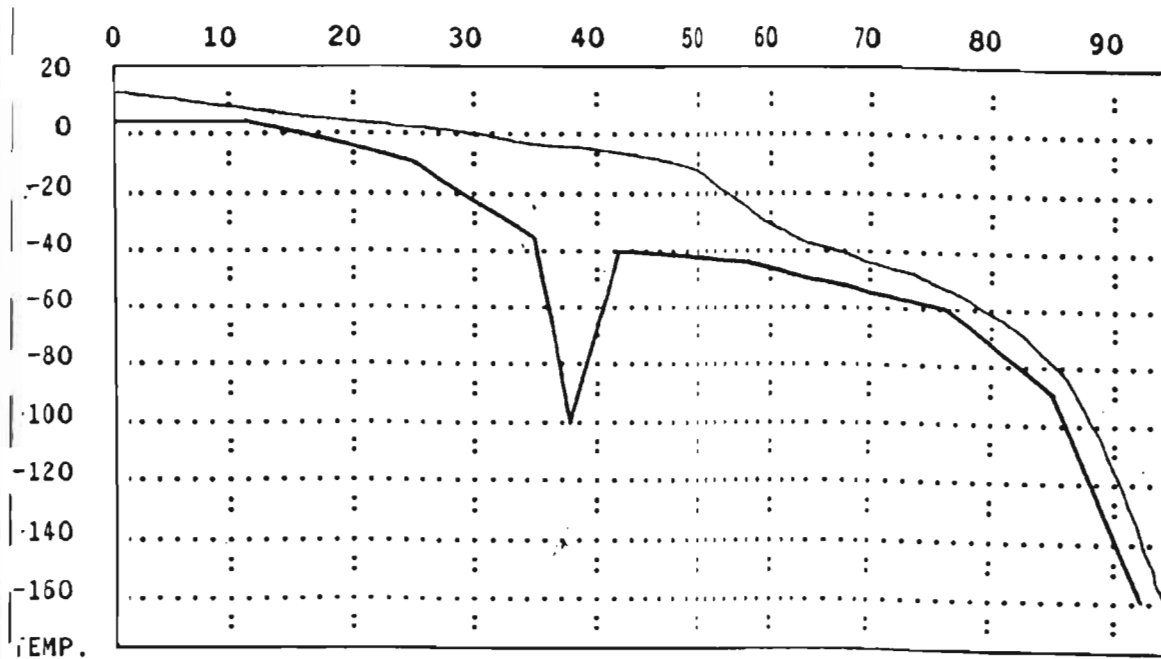


Foto 3: Chirurgicky připravený aortální alograft. Pro usnadnění hodnocení kvality stěny, kvality subanulární tkáně a zejména cípů (vyloučení event. vrozených, či získaných změn) je obrácen „naruby“.



Foto 4: Vypreparovaný plicnicový alograft včetně bifurkace a odstupu obou větví. Obdobně jako aortální alograft je obrácen „naruby“ a je hodnocena kvalita jeho cípů a subanulární svaloviny (kritické pro vlastní implantaci).

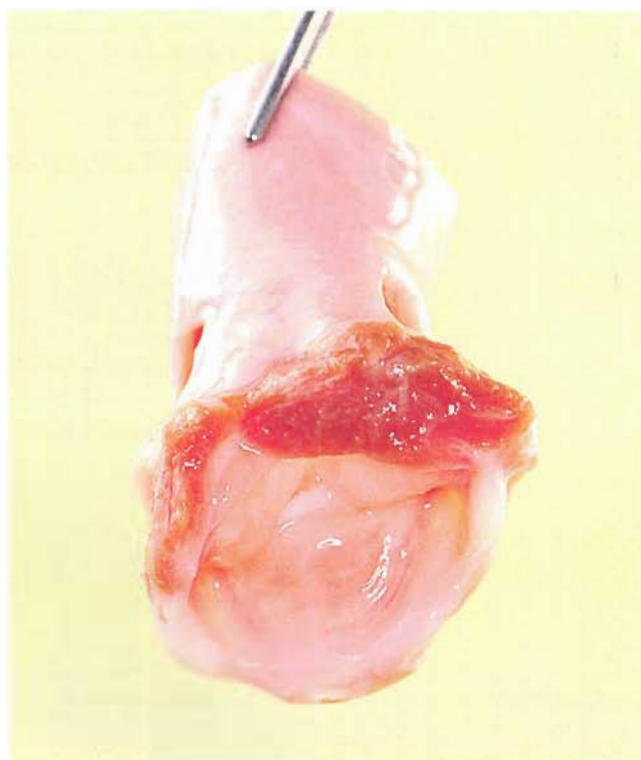


Foto 5: Aortální alograft bezprostředně před transplantací - tj. stav po předchozí kryoprezervaci, rozmražení a chirurgické přípravě. V ascendentní aortě jsou již vytvořeny dva otvory pro implantaci věnčitých tepen (odstřížením odstupů věnčitých tepen dárce).

Příloha 1

TRANSPLANTAČNÍ CENTRUM MOTOL

Banka kardiovaskulární tkáně

Vedoucí lékař: MUDr. Jaroslav ŠPATENKA, CSc.

FN Motol, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

Tel.: 257 221 056, 224 433 000-1, FAX 257 221 056

Mobilní telefon 602 228 657 (trvalé spojení na koordinátorky!)

E - mail: jaroslav.spatenka@lfmotol.cuni.cz

Parciální pitva srdce, které bylo získáno při multiorgánovém odběru pro transplantační účely

Jméno, PŘÍJMENÍ dárce	:		
R. č.	:	Pojišťovna:	PSČ:
Příčina úmrtí	:	Hmotnost:	Výška:
Datum, hodina úmrtí	:	KS, Rh faktor:	
Virologie	:	CMV:	
	:	HCV :	EBV :
	:	HIV :	BWR:

Srdce bylo odebráno dne ... / ... 200... v ... hod. ... min.

Chirurg: MUDr.

Pracoviště:

Tělo zemřelého dárce bude převezeno na oddělení patologie – soudního lékařství – adresa:

Alotransplantáty srdečních chlopní připravil a srdce makroskopicky vyšetřil:

MUDr. :

Dne: ... / ... 200... v ... hod. ... min.

Makroskopický nálezn při parciální pitvě:

Hrubá anatomie:

Koronární tepny:

Aterosklerotické změny stěny ascendentní aorty:

Aterosklerotické změny chlopně aorty:

Srdeční chlopně:

Stav myokardu:

Další nálezy:

Závěr pro klinické použití: Aortální štěp -

Pulmonální štěp -

V Motole dne:

podpis:

3.2. Vyšetření vzorků chlopenních alograftů elektronovým mikroskopem

V průběhu studie bylo vyšetřeno celkem 20 chlopenních alograftů (9 aortálních a 11 pulmonálních), ze kterých vzniklo celkem 40 vzorků (20 x cévní povrch, 20x komorový povrch chlopně). Tyto vzorky byly dále rozděleny do 5 skupin k porovnání dle způsobu zpracování a uskladnění. Povrchy vzorků byly hodnoceny pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu Tesla BS 301 a byl stanoven stupeň morfologického poškození povrchů chlopně, tj. endotelové výstelky, basální membrány event. i hlubších subendoteliálních struktur. Byl zvolen rozsah zvětšení od 400 x do 3000x pro přehledné zobrazení až střední detaily. Některé vzorky byly rovněž vyšetřeny pomocí světelné mikroskopie.

3.2.1. Rozdělení vzorků do skupin

Jedna aortální chlopeň byla získána pooperačně, její cípy byly rozděleny na dvě části a použity jako **kontrolní vzorek**. Jednalo se o pacienta mužského pohlaví, středního věku. Indikací k operaci byla významná aortální regurgitace z důvodu anuloaortální ektazie. Cípy aortální chlopně nebyly makroskopicky ani mikroskopicky morfologicky postižené. Chlopeň byla po explantaci fixována v Bakerově roztoku (4 % vodný roztok formaldehydu s chloridem vápenatým).

Ostatní vzorky („experimentální“) byly následně rozděleny do 4 skupin (2. – 5.), které odpovídaly jednotlivým fázím procesu uskladnění a zpracování chlopenních alograftů včetně kryoprezervace. Porovnáním povrchů těchto vzorků s kontrolním vzorkem v rastrovacím elektronovém mikroskopu jsme zjistili, jak se jednotlivé fáze zpracování chlopní odráží v jejich povrchové morfologii.

1. **Kontrolní vzorek** byl porovnán s těmito skupinami:

2. **Vzorky semilunárních chlopní získaných od non heart-beating dárce**

Získáno při odběru na pitevň od mrtvého dárce. Bezprostředně po odběru byly chlopně fixovány v Bakerově roztoku.

Doba teplé ischémie 12 a 48 hodin.

(3 aortální a 3 pulmonální alografty, celkem 12 vzorků).

3. Vzorky semilunárních chlopní uložených ve fyziologickém roztoku při teplotě +4°C

Získáno během multiorgánového odběru.

Doba studené ischemie **4 hodiny a 15 hodin.**

(2 pulmonální alografty, celkem 4 vzorky).

4. Vzorky uložené v kultivačním tkáňovém médiu E 199 s roztokem antibiotik (Cefuroxime 0.2 mg/ml + Piperacillin 0.2 mg/ml + Netilmicin 0.1mg/ml + Fluconazol 0.1 mg/ml)

Získáno během multiorgánového odběru.

Doba teplé ischemie: **24 hodin** při teplotě + 37 °C.

(2 aortální a 3 pulmonální alografty, celkem 10 vzorků)

Pozn.: tato doba teplé ischemie 24 hodin při teplotě + 37 °C odpovídá v našich podmínkách u většiny chlopní i realitě, tj. výsledné době teplé ischemie, kdy jsou chlopně sterilizovány po dobu 24 hodin při teplotě + 37 °C.

5. Kryoprezervované vzorky

Doba uskladnění **6 – 36 měsíců.**

Vzorky byly před zpracováním rozmrazeny standardním způsobem, tj. podle protokolu Banky kardiiovaskulární tkáně Transplantačního centra Motol.^{68, 69}

(3 aortální a 3 pulmonální alografty, celkem 12 vzorků).

Zásadní je, že tyto kryoprezervované vzorky byly před zmražením zpracovány podle rutinního protokolu, tj. včetně antibiotické sterilizace a dalšího uchování v kultivačním médiu E 199 při teplotě + 4 °C po dobu několika dnů. Morfologie povrchů těchto vzorků potom odráží kombinaci vlivu zpracování, kryoprezervace i rozmrazení.

3.2.2. Příprava vzorků a metoda rastrovací elektronové mikroskopie

Nejprve byly vzorky fixovány v Bakerově roztoku po dobu jednoho týdne a následně byly přikrojeny na bločky o velikosti maximálně 3 x 5 x 10 mm. Vzorky byly následně archivovány v Bakerově fixačním roztoku. Vybrané části cípů chlopní byly pak nataženy na kousky lisovaného pěnového polystyrenu a fixovány po okrajích ježčími bodlinami (důvodem je zabránit zkroucení cípu při sušení, ježčí bodliny nekorodují v používaných chemikáliích). K rychlému a šetrnému vysušení vzorků jsme použili námi modifikovanou a standardizovanou chemickou metodu využívající silikačních a hydrofobizačních vlastností hexamethyldisilazanu (HMDS), /CAS No. 999-97-3, chemický vzorec : $(\text{CH}_3)_3\text{-Si-NH-Si}(\text{CH}_3)_3/$. Tato extrémně těkavá organokřemičitá sloučenina, která se používá v plynové chromatografii a při výrobě polovodičů, začala být v posledních letech využívána i k šetrnému vysušení některých biologických tkání.⁷⁰

Postup vysoušení:

1. vyprání vzorků v destilované vodě – 5 minut
2. odvodnění vzestupnou etanolovou řadou - 70%, 85%, 95% a 100% - po 5 minutách
3. ponoření do směsi 100% etanolu a 100% HMDS v poměru 1:1 na 10 minut
4. ponoření do 100% HMDS (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland) na 30 minut
5. vysušení na vzduchu v digestoři při pokojové teplotě během 30 minut (vzorky zbledají a dostanou vzhled cigaretového popela)
6. vysušené vzorky se přechovávají v exsikátoru nad silikagelem

Dehydratované tkáňové bločky byly montovány resp. lepeny vteřinovým lepidlem Loctite ve formě gelu na kovové podložní destičky (plech z nerezové oceli tloušťky 0,8 mm, odmaštěný acetonem), následně pokoveny napařením vrstvy zlata o tloušťce 10 nm ve vakuu (firma Krystaly a.s., Hradec Králové) a prohlíženy v rastrovacím elektronovém mikroskopu Tesla BS 301 v režimu sekundárních elektronů při urychlovacím napětí 25 kV.

Dokumentární snímky zhotovené klasickým fotografickým procesem (fotoaparát Praktica na kinofilm Konica VX400 monochrome – černobílý negativní film vyvolávaný barevným procesem (proto mají některé snímky barevný podtón) byly naskenovány a počítačově editovány (pouze ořezání okrajů a zmenšení velikosti obrazu v pixelech)

3.3. Hodnocení vzorků chlopenních alograftů

Pro hodnocení strukturální integrity a morfologických změn endotelu pomocí skenovacího elektronového mikroskopu bylo vypracováno následující **skóre 1 – 6**⁶³:

1. **Morfologicky intaktní endotel** – předpokládané morfologické změny nejsou v povrchové morfologii endoteliálních buněk pozorovatelné.
2. **Splývající endotel se strukturální nehomogenitou** endotelu a s detekovatelnými změnami membrán endotelových buněk.
3. **Porušení intercelulárních kontaktů** – kontinuita endoteliální výstelky je ztracena. Svráštělé endoteliální buňky stále adherují k basální membráně.
4. **Separace endoteliálních buněk** – endotel je odpojen od basální membrány. Nejprve buňky „vyčnívají“ svými intercelulárními okraji do lumina, později je možno pozorovat až slupování endoteliální výstelky.
5. **Kompletní ztráta endotelu s obnažením basální membrány.**
6. **Poškození subendoteliálních struktur** – chlopenní povrch je kryt pouze zbytky basální membrány, vláknitá struktura lamina fibrosa a lamina ventricularis může být částečně destruována .

Histologické preparáty, které byly vyšetřeny pomocí světelné mikroskopie, byly připraveny standardní technikou parafinových řezů a barveny orceinem a indigokarminem podle Fraenkela (elastická vlákna hnědč, kolagenní vazivo zelenč).

V rastrovacím elektronovém mikroskopu byly prohlédnuty povrchy všech vzorků, pro každý preparát bylo stanoveno skóre podle charakteru převažujících a nejzávažnějších změn. Zároveň byly ze skórování vyloučeny preparační artefakty. Fotograficky byla dokumentována jen část preparátů. Vzhledem k malému počtu vzorků celkově i v jednotlivých skupinách nebylo možno pro hodnocení statistické významnosti rozdílů použít exaktních statistických metod.

4. Výsledky

1. **Kontrolní vzorek** (odběr od dárce s bijícím srdcem - HBD, nativní cípy, dále nezpracovány).

Ventrikulární strana cípu byla převážně pokryta souvislým endotelem, jehož vzor byl nepravidelný. Na většině endotelových buněk je patrná perinukleární exkavace způsobená dočasným uložením vzorku ve fyziologickém roztoku při teplotě běžné na operačním sále. Hypoteticky lze usuzovat na buněčnou depleci draslíku.

(skóre 2).

(foto 1 – 2)

2. **Vzorky od dárce po zástavě oběhu - NHBD** (odebráno během pitvy, doba teplé ischemie 12 – 48 hodin po smrti).

Doba teplé ischemie 12 hodin:

Na ventrikulárních površích vyšetřovaných vzorků, které byly odebrány 12 hodin po smrti, byla zjištěna počínající separace endoteliálních buněk od basální membrány (skóre 3 - 4). Některé endoteliální buňky směřovaly k povrchu svými intercelulárními okraji. Povrch aortálních i pulmonálních cípů byl zvrásnělý, a to na podkladě zvlněné lamina fibrosa. Rozpuštění intercelulárních kontaktů a separace endoteliálních buněk byla pozorována na arteriální straně cípů (skóre 3 - 4).

Doba teplé ischemie 48 hodin:

U dalších vzorků s delším časem teplé ischemie až 48 hodin byly výše popsané změny více vyjádřeny a byly zde přítomny i pokročilejší známky poškození endotelu – slupování endoteliální výstelky (skóre 4 – 5) až úplná ztráta endotelu (skóre 5).

(elektronová mikroskopie: foto 3 – 6, světelná mikroskopie: foto 19)

3. **Vzorky pulmonálních alograftů dárce s bijícím srdcem, uložených ve „fyziologickém roztoku“ (doba studené ischemie 4 a 15 hodin).**

Doba studené ischemie 4 hodin:

Na cípech pulmonální chlopně bylo pozorováno široké spektrum změn, a to od částečné ztráty endotelu (skóre 4) až k úplné ztrátě endotelu (skóre 5).

Doba studené ischemie 15 hodin:

Místy dosahovalo poškození tkáně u vzorů odebraných 15hodin po smrti až posledního stupně s poškozením hlubších vrstev tkáně (skóre 6).

(elektronová mikroskopie: foto 7 – 10)

4. Vzorky chlopenních alograftů uložené v kultivačním médiu E 199 s roztokem antibiotik při teplotě + 37 °C.

Doba teplé ischemie 24 hodin.

Vyšetření těchto vzorků prokázalo téměř kompletní endotelovou výstelku (skóre 5). Zvlnění povrchu vzorků je způsobeno korugací hlouběji uložené lamina fibrosa.

(elektronová mikroskopie: foto 11-14)

5. Kryoprezervované vzorky.

Doba uskladnění při teplotě tekutého dusíku (- 196 °C) 6 – 38 měsíců.

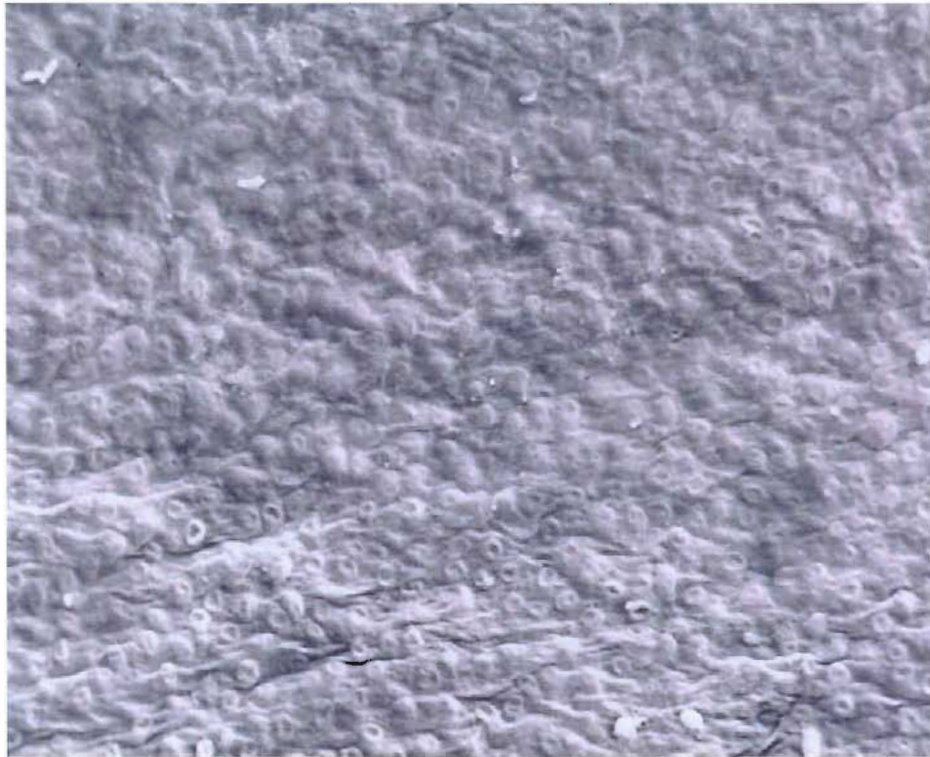
Vyšetřené vzorky prokázaly kompletní ztrátu endotelu na ventrikulární i vaskulární straně cípů aortálních i pulmonálních alograftů (skóre 5). Byla viditelná lamina fibrosa i lamina ventricularis. Místy došlo k poškození i hlubších subendoteliálních struktur (bylo možno sledovat kolmo se křížící vrstvy elastických vláken) (skóre 6).

(elektronová mikroskopie: foto 15 – 18, světelná mikroskopie: foto 20 - 21)

Na základě pozorování povrchů preparátů lze říci, že většina povrchů měla charakter nepravidelné mozaiky, kde změny většinou spadaly do dvou sousedních hodnot skóre. Nebyly pozorovány žádné gradienty změn ve směru toku krve (kolmo na dlouhou osu endotelových buněk), vždy se jednalo o zmíněnou mozaiku, která po vyloučení artefaktů spolehlivě charakterizovala kvalitu povrchu. Mozaikové rozložení změn je patrně možné přičíst nestejněmu napětí lístku chlopně při jeho vysoušení.

tabulka 1: Výsledky elektronové mikroskopie (dle skóre) podle způsobu zpracování

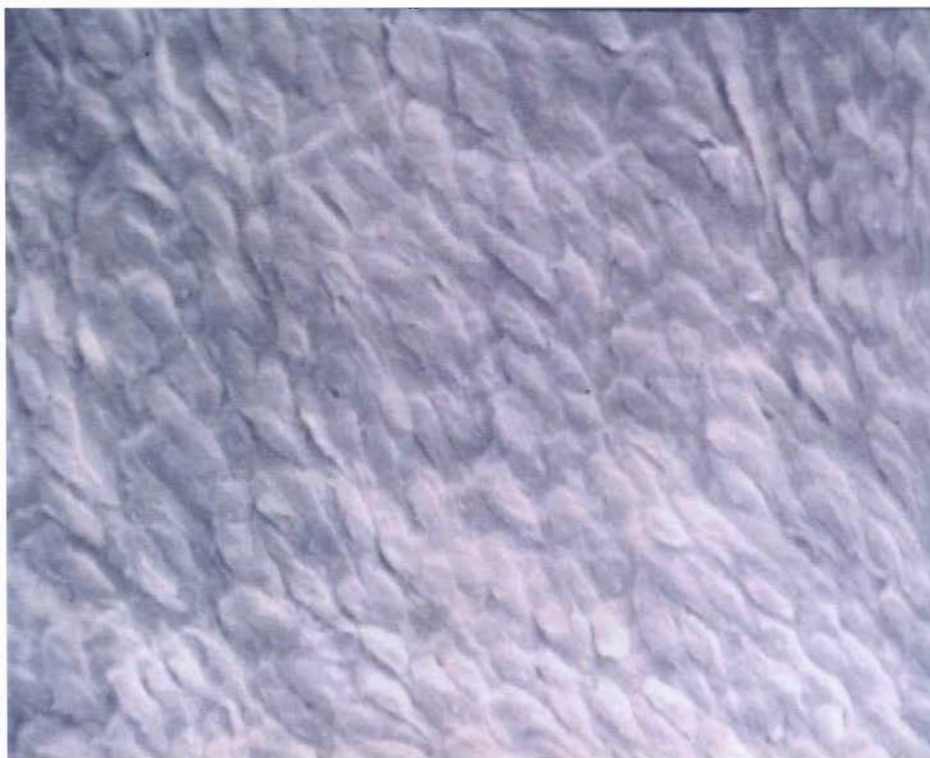
Vzorky chlopních alograftů podle způsobu zpracování		Skóre
Kontrolní vzorek Aortální chlopeň		2
Vzorky od NHBD 12 vzorků (aortální i pulmonální alograft)	teplá ischemie 12 hodin	3 - 4
	teplá ischemie 48 hodin	4 - 5
Vzorky uložené ve fyziologickém roztoku 4 vzorky (aortální i pulmonální alograft)	studená ischemie 4 hodiny	5
	studená ischemie 15 hodin	6
Vzorky uložené v kultivačním mediu E 199 s roztokem antibiotik. Teplá ischemie 24 hodin 10 vzorků (aortální i pulmonální alograft)		5
Kryoprezervované vzorky Doba uskladnění 6 – 36 měsíců 12 vzorků (aortální i pulmonální alograft)		5 - 6



1. Aortální chlopeň, kontrolní vzorek - komorová plocha, zvětšení 470 x. Endotel souvisle pokrývá povrch.



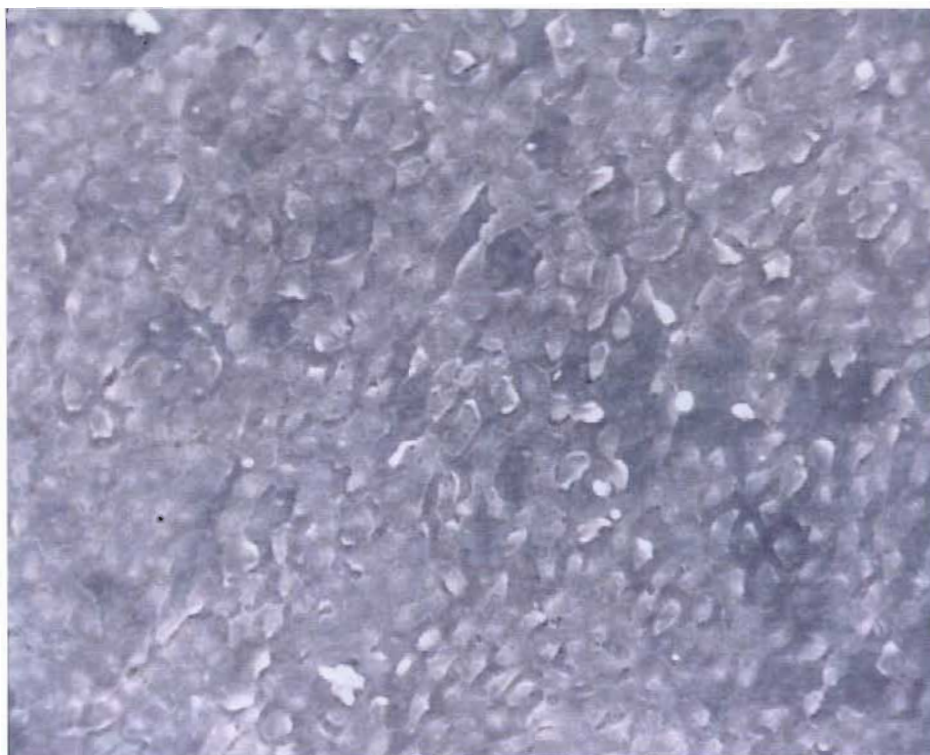
2. Aortální chlopeň, kontrolní vzorek - komorová plocha, zvětšení 1170x. V detailu není povrch endotelu hladký, plochý, jak by měl být v normě, buňky jsou mírně zduřelé, jejich membránový povrch je zdrsnělý – počínající degenerativní změny. Místy se buňky začínají oddělovat od bazální membrány, intercelulární kontakty se rozrušují.



3. Aortální chlopeň, NHBD, teplá ischemie 12 hod., komorová plocha, zvětšení 1000 x. Souvislá endotelová vrstva. Degenerativní změny: zduření buněk, které mají spíše vřetenovitý tvar než oploštělý. (*odběr kontrolního vzorku během pitvy*)



4. Detail obrázku č. 3, ale jiné místo povrchu, zvětšení 2200 x. Buňky se výrazně oddělují od bazální membrány (BM), endotelová vrstva je neúplná, intercelulární kontakty rozrušené, místy je vidět holá BM. Tyto změny jsou způsobeny několikahodinovým intervalem mezi smrtí a pitvou.



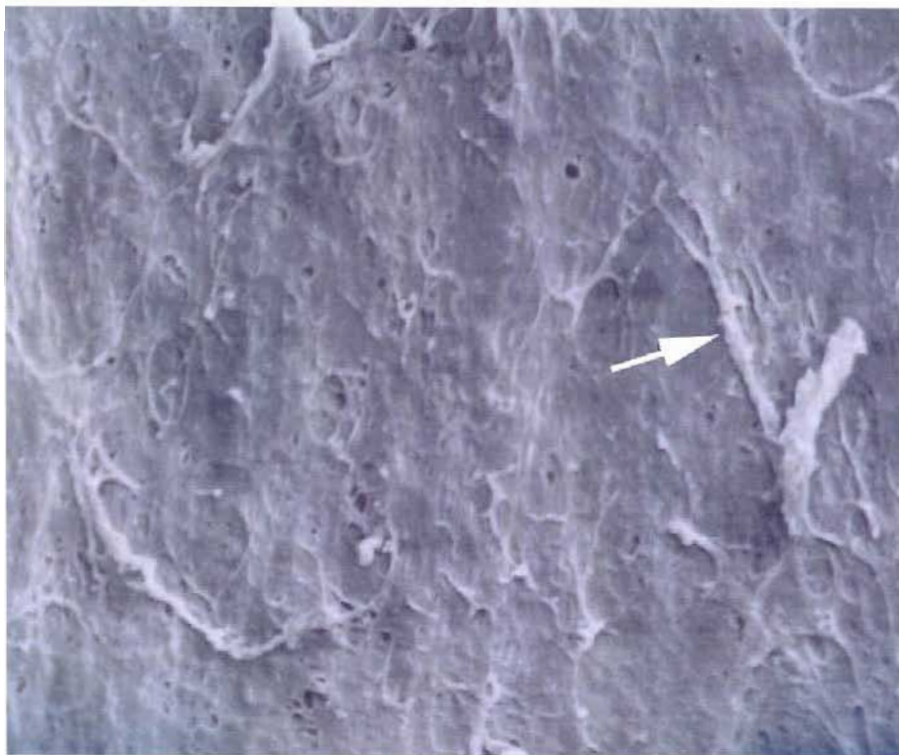
5. Chlopeň plicnice, NHBD, teplá ischemie 48 hod., komorová plocha, zvětšení 410x. Na obrázku je vidět místy souvislý endotel, jinde se degenerované buňky již odlupují a basální membrána je obnažená



6. Chlopeň plicnice z obr. č. 5, komorová plocha, zvětšení 1800 x. V detailu je vidět odlučujících se endoteliální buňky (viz šipka).



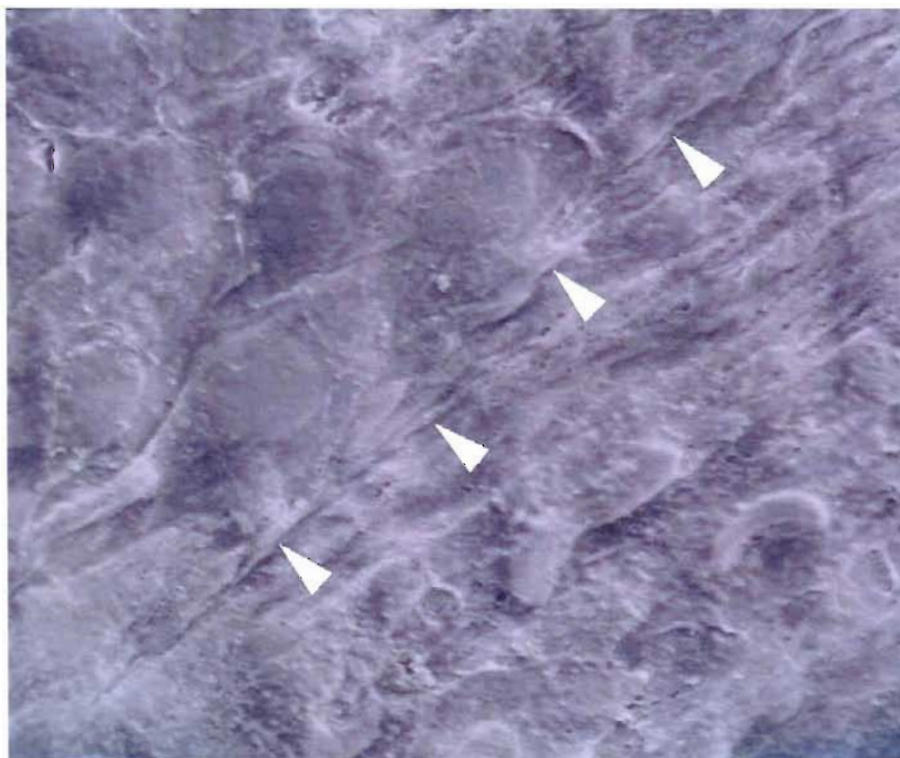
7. Plicnice, dárce s bijícím srdcem, studená ischemie 15 hodin ve „fyziologickém roztoku“ - komorová plocha, zvětšení 360x. Plocha je zcela zbavena endotelu, je viditelný povrch vazivové lamina ventricularis. Zvrásnění odpovídá uspořádání vnitřní (hlubší) vrstvy lamina spongiosa, jistě zvýrazněné fixací preparátu



8. Plicnice z obr. č. 7 - komorová plocha, zvětšení 3000x. Na ploše je vidět vazivová lamina ventricularis i zbytky basální membrány (viz. šipka).



9. Plicnice, stejná chlopeň jako na preparátu 7 a 8, cévní plocha, zvětšení 1430x.
 Zachované záplátovité úseky degenerujícího endotelu – vpravo. Vlevo tenká basální membrána kryjící prominující buňky lamina fibrosa, jedná se pravděpodobně o myofibroblasty.

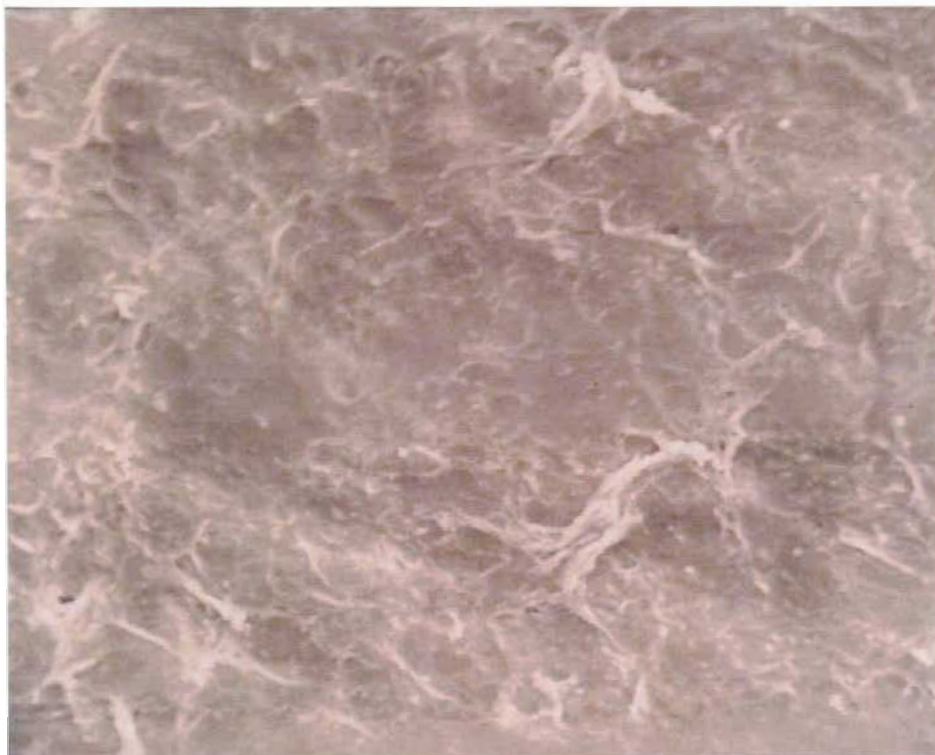


10. detail obrázku 9 (plicnice, cévní plocha), zvětšení 2400x.
 Preparát rozdělen na dva trojúhelníky. Levý horní: pozorovatelná endotelová výstelka. V dolním trojúhelníku endotel chybí a je odhalena basální membrána.



11. Plicnice, dárce s bijícím srdcem, 24 hod. v E 199 s koktejlem antibiotik, komorová plocha, zvětšení 480x.

Viditelné ojedinělé endotelové buňky, které ještě adherují k basální membráně.



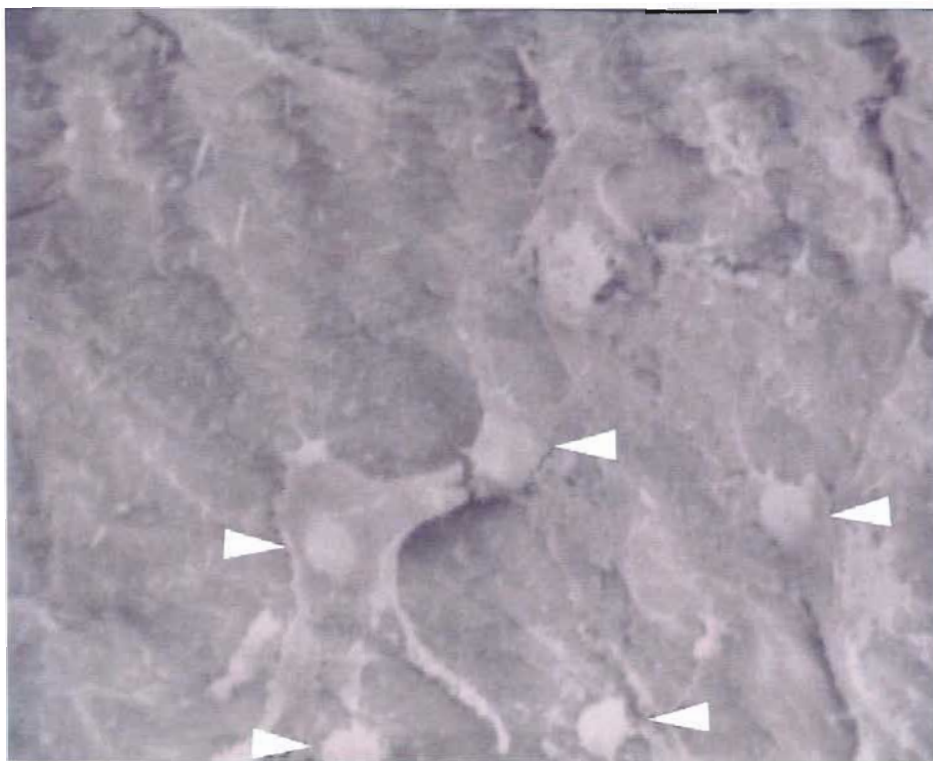
12. Plicnice z obr. č. 11, komorová plocha, zvětšení 1210x.

Detail basální membrány, která je zcela bez endotelu. Je viditelná lamina ventricularis.



13. Plicnice z obr. č. 11, cévní plocha, zvětšení 710x.

Odhalená basální membrána s ojedinělými buňkami endotelu (viz. šipka). Pod ní je pozorovatelná lamina fibrosa, opět zvrásněná.

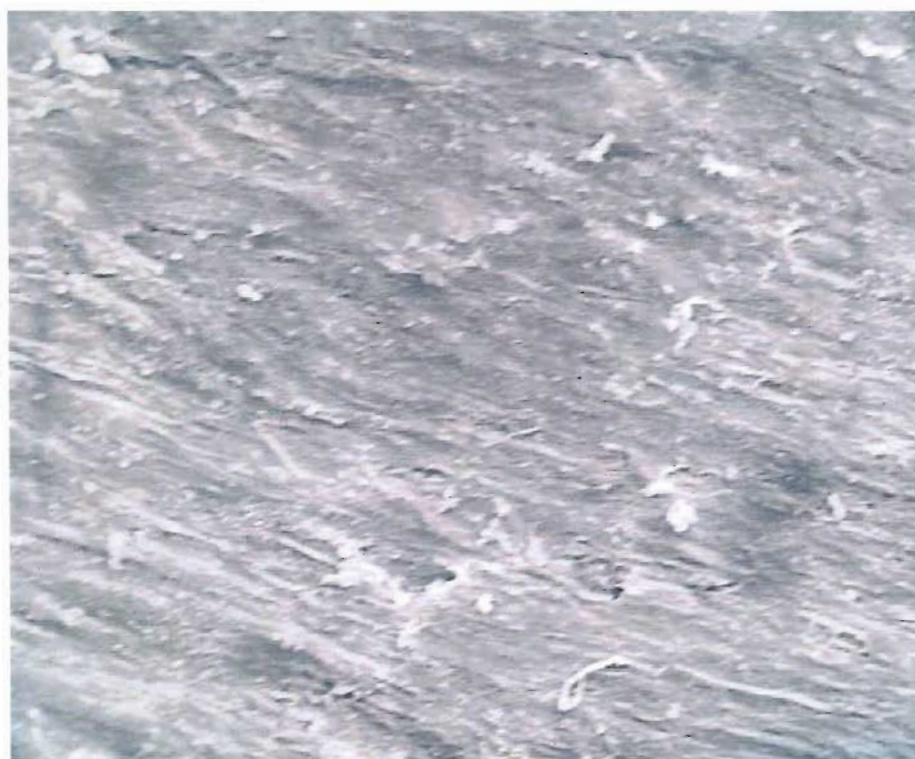


14. Plicnice z obr. č. 11, cévní plocha – detail, zvětšení 2400x.

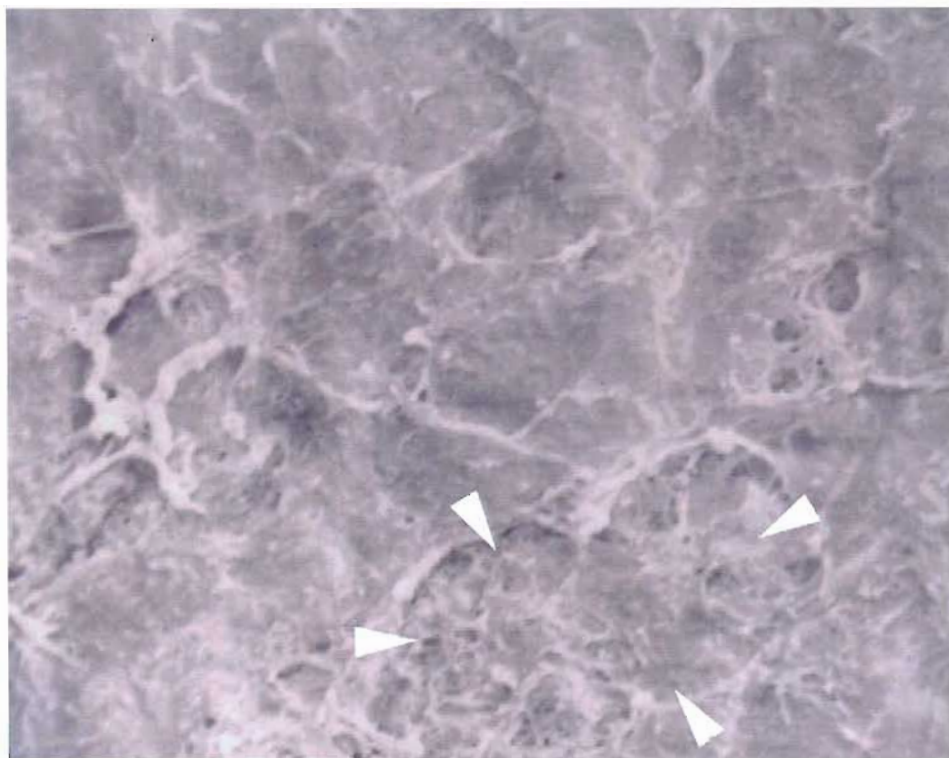
Je vidět detail bazální membrány a ojedinělé endoteliální buňky (viz. šipky).



15. Aortální chlopeň, dárce s bijícím srdcem, sterilizace antibiotiky, programované zamražení a kryoprezervace při teplotě tekutého dusíku 12 měsíců, rozmražená, komorová plocha, zvětšení 1900x.



16. Aortální chlopeň z obr. č. 15, cévní plocha, zvětšení 2000x.
Je vidět vazivová lamina fibrosa, která je místy lehce popraskaná. Endoteliální buňky ani basální membrána nejsou přítomny.



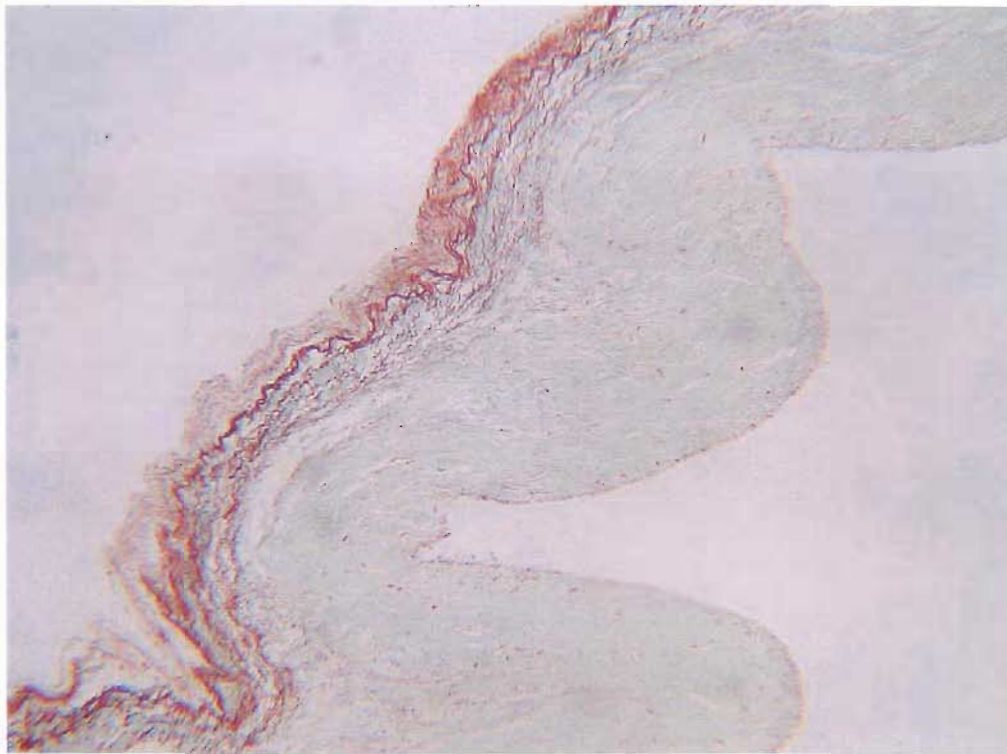
17. Plicnice, dárce s bijícím srdcem, sterilizace antibiotiky, programované zamražení a kryoprezervace při teplotě tekutého dusíku 12 měsíců, rozmražená, komorová plocha, zvětšení 2700x.

Ventrikulární plocha je zcela zbavená endotelu, rozrušená. Objevují se její hlubší vrstvy

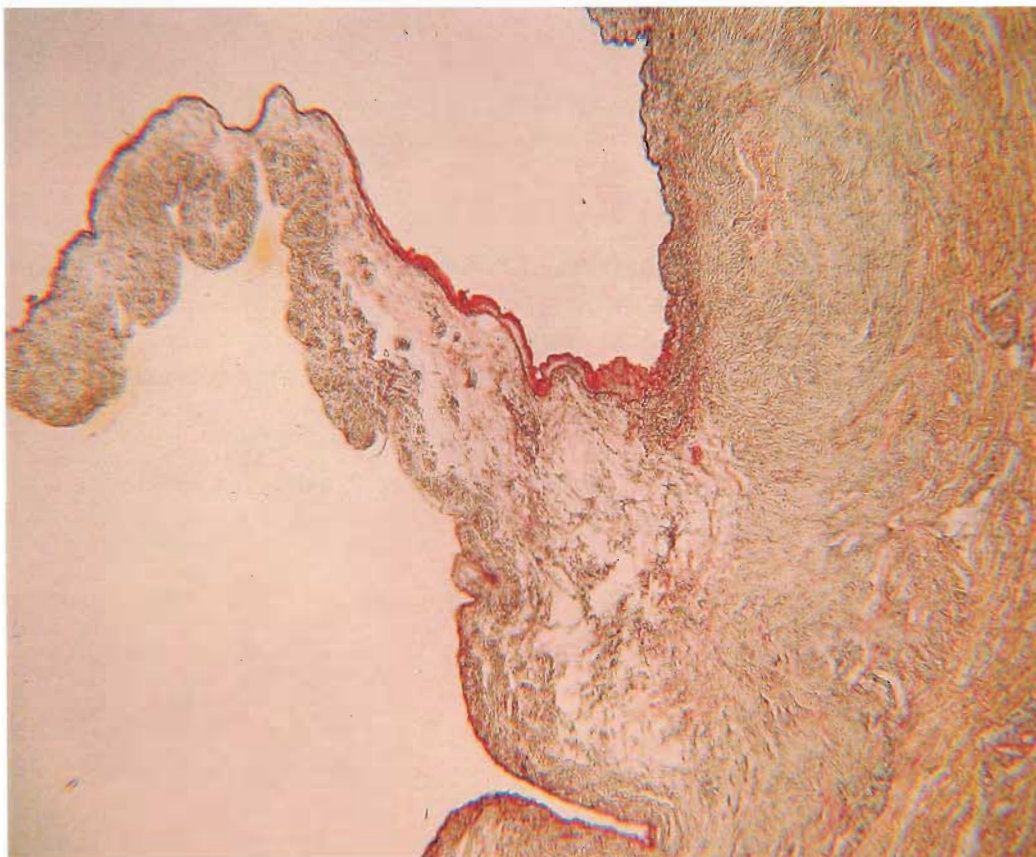


18. Plicnice z obr. č. 17, cévní plocha, zvětšení 2700x.

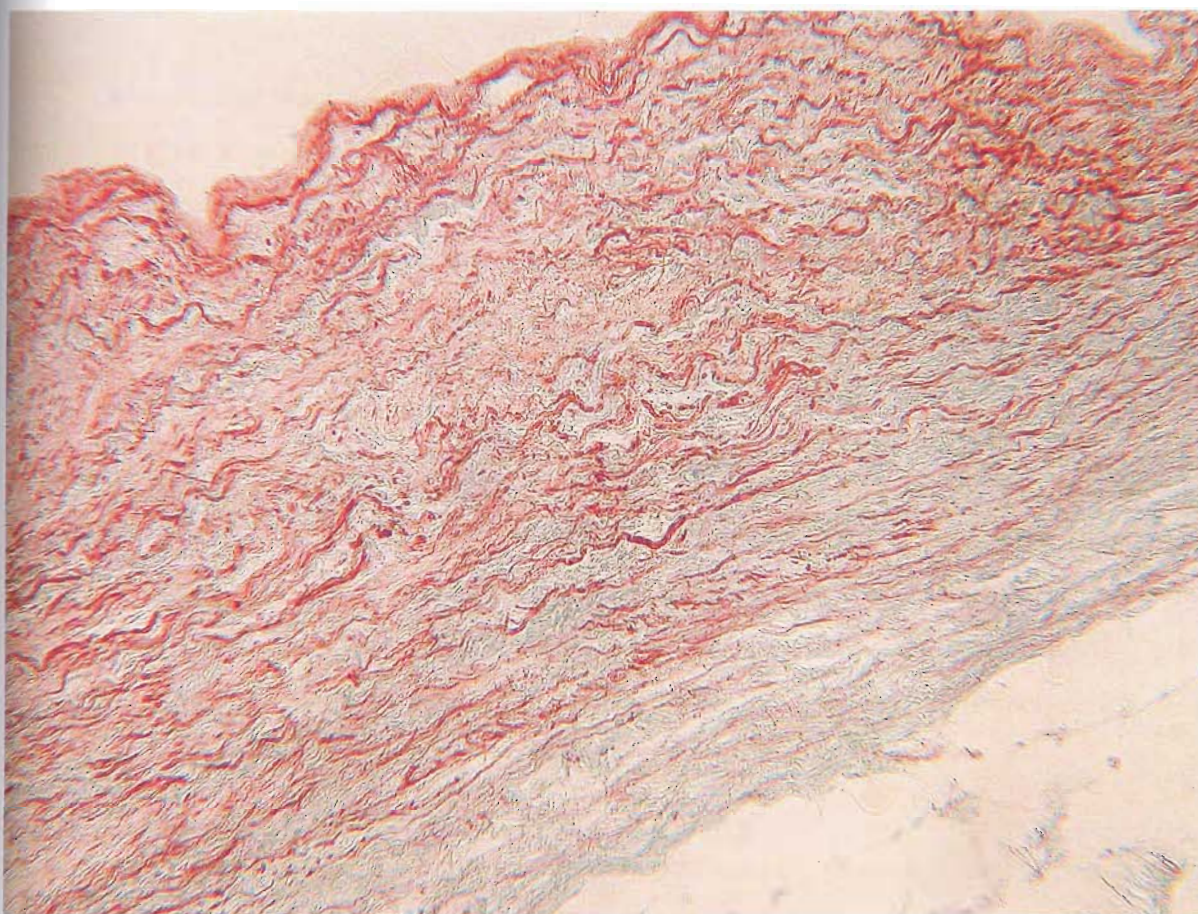
Lamina fibrosa, která je zcela bez endotelu. Její povrch je souvislý, jen místy mírně porušený.



19. Pulmonální chlopeň, NHBD, teplá ischemie 12 hod., odběr během pitvy, zvětšení 100x (odběr ze soudního lékařství během pitvy). Vpravo je cévní strana lemovaná řetízkem endotelových jader a kolagenního vazivo, levá komorová strana je lemovaná více elastinem, jader je méně a jsou hůře čitelná.



20. Plicnice, dárcce s bijícím srdcem, sterilizace antibiotiky, programované zamražení a kryoprezervace 12 měsíců, rozmražená,, Přehledný snímek - průřez cípem včetně jejího připojení ke stěně, malé zvětšení – 40x. Změny při tomto zvětšení nejsou výrazné. Horní okraj s elastinem je ventrikulární. Jedná se chlopeň, znázorněnou pomocí elektronové mikroskopie na obr. 17, 18.



21. Pulmonální chlopeň, detail obrázku 12, zvětšení 200x. Oba okraje jsou bez endotelu, vazivo částečně rozrušené. Vpravo okraj cévní s kolagenním vazivem, směrem k ventrikulárnímu okraji přibývá elastinu. Jedná se o původně kryoprezervovanou chlopeň, její znázornění pomocí elektronové mikroskopie – viz. obr. 17, 18.

5. Diskuze

Odběr, zpracování i transplantace chlopenních alograftů se ve FN Motol datuje od roku 1982, klinické použití od r. 1983. Původně byly alografty používány jako tzv. čerstvé, tj. pouze antibioticky sterilizované. V roce 1992 vznikla Banka chlopenní alograftů (rozhodnutím Ministerstva zdravotnictví z r. 1996 se dnes jmenuje **Specializovaná tkáňová banka STB85 - Banka kardiovaskulární tkáně**) a od té doby se stal odběr, kryoprezervace a transplantace alograftů rutinní metodou.

Cílem této studie bylo ověřit protokol zpracování a kryoprezervace aortálních a pulmonálních alograftů, který se používá v Bance kardiovaskulární tkáně Transplantačního centra FN Motol. ^{68, 69} Konkrétně pak **zjistit, jak se jednotlivé fáze zpracování, které jsou součástí našeho protokolu, odrážejí morfologii povrchu zpracovávaných chlopní.** Změny v povrchové morfologii chlopenních cípů **jsme hodnotili pomocí skenovací elektronové mikroskopie.** ⁷¹

Výhody elektronové mikroskopie při hodnocení povrchu chlopní popsal již Hammon v roce 1974. ⁷² Metodiku zpracování vzorků originálně modifikovali hradečtí autoři, kteří upravili a zjednodušili zejména vysoušení vzorků. Významným přínosem této modifikace je zlevnění procesu. ⁷⁰ V současnosti je možno vyšetřovat vzorky o velikosti řádově až čtverečních centimetrů. To umožňuje kvalitní hodnocení povrchových struktur za různých podmínek, např. reologických nebo osmotických. ^{73, 74}

Elektronová mikroskopie je zejména výhodná ke stanovení změn endoteliálních buněk a dá se použít i k hodnocení povrchů např. explantovaných chlopní. ⁷⁵ Pomocí určení morfologických změn se rovněž můžeme nepřímo vyjádřit k event. viabilitě buněk. Jedná se ale pouze o orientační stanovení viability. Ke kvantitativnímu nebo kvalitativnímu stanovení viability endoteliálních buněk nebo fibroblastů jsou nutné jiné metody (kapitola 6. 2 Metody hodnocení viability).

Konkrétní výhody použité metodiky jsou:

- **šetrné vysušení vzorků** relativně rychlou a jednoduchou chemickou metodou, na rozdíl od CPD (critical point drying) je možné zpracovat desítky vzorků najednou,

- možnost přehlednutí velkého rozsahu povrchu chlopní (zde byla velikost vzorku limitována velikostí podložní destičky (12 x 12 mm), bez obtíží lze připravit preparát z celého cípu poloměsíčité chlopně,
- právě pro možnost hodnocení velkého rozsahu povrchů se domnívám, že by bylo možno doporučit tuto metodu jako metodu volby pro screening morfologických změn po různých způsobech zpracování chlopní ve tkáňové bance, případě v průmyslu při přípravě xenograftů
- klasické histologické metody zde mohou selhávat (problémy zejména s průkazem přítomnosti endotelu, který může „opadat“ při histologickém zpracování (odvodnění a zalití do parafinu) a krájení na mikrotomu,
- ukazuje se, že zejména **endotel chlopní je velmi citlivý na vnější vlivy** (fyziologický roztok, poškození nástroji při preparaci, přílišné napnutí lístku chlopně při vysoušení, apod.)

Z výsledků naší studie vyplývá, že jednotlivé fáze zpracování vedou k významnému poškození až k úplné ztrátě endotelu (skóre 3 – 4 u teplé ischémie 12 hodin a skóre 5 – 6 u teplé ischémie 48 hodin, skóre 5 – 6 při uskladnění alograftů 24 hodin ve fyziologickém roztoku o teplotě + 4 °C, skóre 5 při uložení alograftů v kultivačním médiu E 199 s roztokem antibiotik při teplotě + 37 °C po dobu 24 hodin a konečně skóre 5 – 6 po kryoprezervaci).

Uskladnění alograftů ve fyziologickém roztoku vedlo uniformně k naprosté ztrátě endotelu i subendoteliálních struktur a to přesto, že se jednalo o studenou ischémii s omezenou délkou expozice do 24 hodin. Devastující účinek fyziologického roztoku byl v minulosti již popsán.^{76,77} V původním protokolu jsou chlopně bezprostředně po odběru skladované ve fyziologickém roztoku. **Vzhledem k výsledkům této studie jsme ustoupili od krátkodobého kontaktu alograftů s fyziologickým roztokem a chlopně ihned po odběru ukládat ve perfúzním roztoku pro odběr orgánů, nebo přímo v kultivačním médiu E 199.**

Je zjevné, že kombinace jednotlivých fází zpracování, a to i při vynechání uskladnění ve fyziologickém roztoku, vede k těžkému poškození endotelu nebo event. až ke ztrátě endotelové výstelky. Ví se, že kritické je složení směsi a koncentrace antibiotik, a určitě také

teplota během sterilizace antibiotiky. Některé tkáňové banky užívají sterilizaci při nízké teplotě.⁷⁸

Kryoprezervace a její vliv na strukturální integritu alograftů

Jak již bylo uvedeno v předchozí kapitole, vyhodnocené kryoprezervované vzorky byly před vlastním zmražením zpracovány podle výše uvedeného protokolu Transplantačního centra FN Motol, tj. včetně antibiotické sterilizace a teplé i studené ischemie. Výsledné skóre před kryoprezervací bylo tedy nejméně 5. Skóre po kryoprezervaci bylo 5 – 6, tj **samotný proces kryoprezervace poškození tkáně dále významněji neprohloubil**. Chlopně, které byly kryoprezervovány, měly ale již před vlastním zmražením endotel výrazně poškozený anebo byly endotelu zcela zbavené. Proto se z této práce nedá usuzovat, zda-li samotná kryoprezervace poškozuje endotel či nikoli. Z dalších prací, které budou v průběhu této kapitoly diskutovány vyplývá, že samotný proces zmražení chlopní nemá významně negativní vliv na strukturální integritu a povrchovou morfologii alograftů. Ty jsou primárně determinovány procesem, který kryoprezervaci předchází.

Zpracované alografty jsou v našich podmínkách implantovány bez endotelu. Není jasné, jestli poškození fibroblastů a extracelulární matrix probíhá simultánně s poškozením povrchovým struktur anebo k němu dochází opožděně. Předpokládáme, že alespoň částečně jsou hlubší struktury chráněny endotelem a basální membránou a že tedy k jejich poškození dochází s časovým odstupem tj. až po ztrátě endotelu a basální membrány, kdy jsou hlubší struktury vystaveny toxickým účinkům.⁷⁹

Vzhledem k tomu, že zachování integrity extracelulární matrix je jedním z předpokladů dobrých mechanických vlastností i dlouhodobé funkčnosti a trvanlivosti alograftu, je nutné omezit poškození povrchových struktur na co nejmenší možnou míru. V tomto smyslu **studie splnila to, co jsme od ní očekávali a povede ke konkrétní změně postupu zpracování chlopních alograftů, tj. vynechání lázně alograftů ve fyziologickém roztoku. Tyto změny se netýkají pouze zpracování aortálních a pulmonálních alograftů, ale v budoucnosti budou platit i pro zpracování mitrálních alograftů.** Tento program chystá Banka kardiovaskulární tkáně a Transplantační centrum Motol v nejbližší budoucnosti zahájit. Experimentální fáze přípravy tohoto programu již

úspěšně proběhla.^{1,2} Rovněž byly již kryoprezervovány dva lidské mitrální alografty, prozatím pro experimentální účely.

Výsledky naší studie jsou v určitém rozporu s některými publikovanými studii, které se zabývaly morfologickými změnami povrchů kryoprezervovaných alograftů a event. jejich viabilitou a které, za předpokladu zachování určitého postupu zpracování, prokázaly zachování viability endotelových buněk nebo fibroblastů. Jak bude probráno dále, pro strukturální integritu a viabilitu kryoprezervovaných alograftů je nezbytné minimalizovat dobu studené a teplé ischémie. Zachování těchto podmínek je primární předpoklad k udržení viability zpracovávaných chlopní. Zde má protokol zpracování alograftů Banky kardiiovaskulární tkáně FN Motol určité rezervy, a to zejména v délce studené ischémie (doba než jsou chlopně kryoprezervovány). Tato prodleva je ale v současnosti těžko ovlivnitelná, neboť je dána kapacitními možnostmi kryoprezervačního střediska, které zatím banka nevládní.

Doba teplé ischémie je v našich podmínkách poměrně krátká. Naprostá většina alograftů je získána během multiorgánových odběrů, kdy jsou chlopně po odběru ihned zaledovány. Trvání teplé ischémie je tedy cca 24 hodin, kdy jsou alografty uloženy v kultivačním médiu E 199 s roztokem antibiotik při teplotě + 37 °C. Následně jsou již chlopně skladovány při teplotě + 4 až + 8 °C a to až do kryoprezervace.

V další fázi tohoto projektu chceme zjistit, jak by se optimalizace postupu (teplá ischémie do 12 hodin, studená ischémie 24 hodin s následnou neodkladnou kryoprezervací) odrazila ve strukturální integritě/povrchové morfologii alograftů. Změny v morfologii chlopní se budou hodnotit opět pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Viabilita se stanoví pomocí světelné mikroskopie a to jednoduchou metodou vylučování barviva buňkami – viz kapitola 5.2 Metody hodnocení viability.

Limitace studie

Omezení (limitace) studie - jde pouze o povrchové struktury znázorněné na **rastrovacích elektronogramech**. Dochází však i ke změnám ve hlubokých strukturách chlopně.⁷⁹ Proto se může zdát histologický popis do jisté míry „amatérský“, i když zde nejde o histologický popis, ale o popis rastrovacích elektronogramů (nejedná se o barvené řezy, ale

o černobílé povrchy). Je obtížné jednoznačně identifikovat buněčné elementy a typ vláken (elastická, kolagenní). Zde je možná korelace s histologickými a imunohistochemickými metodami, které zachycují specifické prvky tkáně v řezech, což však neposkytuje představu o celém povrchu chlopně. Tyto metody poskytují pouze parciální pohled a detekují jen některé struktury. Takovýto pohled však nebyl především z ekonomických důvodů cílem této práce, a proto byla klasická histologie použita jen orientačně.

Statistika: Výše uvedené výsledky nebyly statisticky zpracovány. Důvodem je malý počet vzorků a značná variabilita podmínek uvnitř jednotlivých experimentálních skupin. Proto nelze použít parametrické ani neparametrické (vhodné pro malé počty vzorků) statistické testy. Malý počet vzorků je bohužel dán vzácností materiálu.

V průběhu posledních několika desetiletí, v důsledku výsledků retrospektivních studií, které se zabývaly používáním chlopních alograftů, došlo v procesu odběru, zpracování a uskladnění, k mnoha významným změnám.^{80, 81, 82, 83} Od původní chemické prezervace (aldehydy, β -propiolakton), ozáření, prezervace v etylén oxidu, se postupně přešlo k současnosti používanému uskladňování v nutričním médiu a konečně ke kryoprezervaci. Alografty, které byly zpracovávány původními, dnes již historickými a velmi nešetrnými způsoby, jako je chemická prezervace nebo ozáření, prokazovaly, ve srovnání se současnými technikami prezervace, velmi malou trvanlivost. Proto je viabilitě tkání chlopně dodnes připisována klíčová úloha v udržení dlouhodobé trvanlivosti a funkci implantovaných chlopních alograftů.⁸⁴ Toto tvrzení je podpořeno dlouhodobými výsledky alograftů, které byly zpracovány současnými technikami a které jsou, ve srovnání s „historickými“, podstatně lepší.^{85, 86, 87, 82, 83}

V současnosti máme podle způsobu zpracování 3 druhy chlopních alograftů:

- **Homovitalní alografty:** alografty odebrané za sterilních podmínek během srdeční transplantace od příjemce nového transplantovaného srdce anebo alografty získané během multiorgánových odběrů. Jsou uskladněny v tkáňovém kultivačním médiu bez antibiotik a implantovány v co možná nejkratším čase. V současnosti se používají již naprosto ojediněle, ale nemocní s těmito štěpy jsou pečlivě sledováni a srovnání dlouhodobých výsledků této skupiny s dalšími je s napětím očekáváno.

- **Čerstvé alografty** („fresh allografts“), tzv. antibiotiky sterilizované alografty: Tyto alografty jsou odebírány během multiorgánových odběrů anebo od mrtvých dárců a to až 72 hodin po smrti dárce. Jsou antibioticky sterilizovány a následně uchovány v kultivačním médiu při teplotě okolo +4 °C až do implantace (až 6 týdnů). V současnosti jsou používány zcela ojediněle.
- **Kryoprezervované alografty**: iniciálně obdobný postup jako u čerstvých alograftů. Po antibiotické sterilizaci jsou alografty kryoprezervovány a skladovány při teplotě pod -140 °C v plynné fázi dusíku, případně v tekuté fázi dusíku při teplotě -196 °C (jako např. v naší bance), a to po dobu až 5 let.

Z výše uvedených skupiny alograftů je v současnosti jednoznačně nejpoužívanější tzv. kryoprezervovaný alograft. Výhodou kryoprezervace je možnost skladovat alografty po dlouhou dobu, z čehož následně vyplývá snadná dostupnost štěpů různých velikostí a dalších parametrů (věk, pohlaví, krevní skupina ABO a pod)..

5.1. Podstata a význam viability chlopenních alograftů

Viabilita je schopnost tkáně udržet si svoji fyziologickou funkci, tj. **pokud tkáň chlopenního alograftu nebo alespoň některé jeho buňky (např. endotel nebo fibroblasty) žijí, je schopná zachovat svoji strukturální integritu a tedy i dlouhodobou funkci. Proto se všechny v současnosti používané techniky prezervace alograftů snaží viabilitu alespoň z části zachovat. My jsme nakonec neměli možnost viabilitu našich štěpů určit.**

Jedna z dalších teorií dlouhodobě dobré funkce a trvanlivosti alograftů je, na rozdíl od konceptu viability, zachování kvalitní a strukturálně neporušené základní hmoty – kolagenního stromatu alograftu jako strukturálního základu dlouhodobé funkce.

88

Nicméně hlavní tezí velké většiny v současnosti probíhajícího výzkumu je: „zachování předimplantační viability alograftu = dlouhodobě dobrá funkce a trvanlivost implantované chlopně“.^{18, 82, 87, 89} Bylo opakovaně prokázáno, že fibroblasty dlouhodobě v implantovaných chlopních po kryoprezervaci přežívají a pomocí chromozomálních studií potvrzeno, že se skutečně jedná o dárcevé fibroblasty.⁹⁰ Dlouhodobé výsledky z hlediska strukturálního

poškození a frekvence reoperací jsou u těchto skupin vynikající ve srovnání s čerstvým alograftem, kde je viabilita sporná.⁸¹

Na udržení strukturální integrity alograftu má pravděpodobně větší vliv viabilita fibroblastů než endoteliálních buněk. Fibroblasty produkují kolagen a ostatní součásti extracelulární matrix, která tvoří základ skeletu chlopně.^{53, 88, 91, 92}

Endotelové buňky mají vliv na trombogenicitu chlopně a některé práce poukazují na význam zachování endotelu jako prevence předčasné kalcifikace alograftu⁹³
Teoretickou nevýhodou viabilního endotelu je jeho imunogenicita. Endotel je prezentuje antigeny MHC, včetně HLA antigenů a může tedy vyvolat, podobně jako u orgánových transplantací, imunitní reakci, která povede k předčasné degeneraci alograftu. Imunologie alograftů bude podrobněji rozebrána v dalších částech diskuze.

Původní viabilní buňky alograftu (endoteliální buňky a/nebo fibroblasty) mohou ale postupně vymizet, mohou být nahrazeny buňkami příjemce anebo zde mohou přežívat společně jak dárcovské buňky tak i buňky příjemce^{94, 95, 96} **Ztráta celularizace, tj. zejména fibroblastů, se stupňuje s časem od implantace. Do jaké míry jsou „nové buňky“ od příjemce metabolicky aktivní a mají-li vliv na dlouhodobou funkci alograftů, není jasné. Tyto poznatky jsou založeny na výsledcích vyšetření explantovaných chlopenních alograftů.**

Koolbergen a spol. pozorovali po uplynutí jednoho roku u většiny explantovaných chlopní prakticky acelularitu.^{75, 96} Původní buňky byly u některých chlopní v omezené míře nahrazeny fibroblasty příjemce a dále zde byla prokázána přítomnost zánětlivých buněk, tj. makrofágů a T-lymfocytů, což svědčí pro imunitní reakci. Ta byla ale velmi mírná a nebyly zde další známky imunologicky zprostředkovaného poškození chlopně. Vzhledem k velmi omezenému množství příjemcovských fibroblastů nalezených v explantovaných chlopních, je jejich přítomnost z hlediska zachování struktury a integrity chlopně pravděpodobně nevýznamná. Podstatné je rovněž zjištění, že i u alograftů, které byly explantovány z technických důvodů (jiných než strukturální poškození), byla celularita dárcovskými buňkami rovněž snížena, podobně jako u chlopní, které byly explantovány z důvodu degenerace.

Na základě této významné studie lze tvrdit, že v současnosti dosahovaná akceptovatelná trvanlivost kryoprezervovaných alograftů je zejména dána relativně dobrou prezervační kolagenového skeletu a extracelulární matrix.⁹⁷

Další variantou je komerčně již dostupný acelulární (neviabilní) alograft – decelularizovaný alograft se zachovalou strukturou extracelulární matrix, který se in vitro nebo in vivo osídí buňkami příjemce.⁹⁸

5.2. Metody hodnocení viability

Pro přehled zde uvádíme nejčastější metody, podle kterých se stanovuje viabilita tkání. Jsou založeny na různých principech, tj. na detekci proteosyntézy, syntézy nukleových kyselin, stanovení funkce plasmatické membrány, kultivace buněk in vitro atd. Podstatné je hodnocení viability na kvantitativním základě, protože nám umožňuje porovnávat různé druhy zpracování a prezervace tkání.

1. Stanovení metabolické aktivity buněčných komponent

- a. **Stanovení syntézy a uvolňování vasoaktivních molekul (Prostacyclin – PGI₁) a oxidu dusného (NO), které jsou uvolňovány endoteliálními buňkami.** Tato metoda se tedy používá k určení viability endotelu. Obě tyto látky snižují trombogenicitu endoteliální výstelky.^{80, 89, 94, 99} Endoteliální buňky hrají významnou roli ve výživě fibroblastů, stimulují produkci kolagenu a hrají důležitou roli v prevenci kalcifikace chlopních cípů.^{93, 100, 101} Tyto buněčné aktivity (uvolňování PGI₁ nebo NO) můžeme stanovovat za bazálních podmínek a/nebo během farmakologické stimulace. I neviabilní endoteliální buňky mohou za bazálních podmínek uvolňovat vasoaktivní látky. Během stimulace se ale tato sekrece nezvyšuje. To nám umožňuje bezpečně stanovit viabilitu i její stupeň.^{80, 102}
- b. **Stanovení intracelulární absorpce aminokyselin, které jsou nezbytné k proteosyntéze.** Toto je osvědčená metoda, která se používá ke stanovení viability fibroblastů. Principem je intracelulární detekce izotopem označených

aminokyselin, nejčastěji ^3H prolin.^{83, 103, 104} Obecně se více studií zaměřuje na stanovení viability fibroblastů, tj. častěji než endotelu. Je to proto, že se viabilita fibroblastů považuje za esenciální pro dlouhodobou dobrou funkci chlopně.

2. **Buněčná proliferace** (in vitro a in vivo)

Tato zkouška potvrzuje reprodukční potenciál buňky, tj. schopnost inkorporovat izotopem označené prekurzory nukleových kyselin, nejčastěji ^3H thymidin, do nově syntetizovaných nukleových kyselin.⁸² Tato metoda ale není příliš senzitivní.

3. **Vylučování barviva**

Tato zkouška je založena na rozdílu v permeabilitě buněčné membrány mezi živou a mrtvou buňkou. Barviva (např. trypanová modř) nejsou schopny penetrovat membránu viabilních fibroblastů, takže přetrvává zabarvení pouze mrtvých buněk. Takto zabarvené buňky jsou pozorovatelné pomocí světelné mikroskopie.^{99, 105}

4. **Průtoková cytometrie**

Podobný princip jako u metody vylučování barviva. Fluorescein diacetat barví viabilní buňky tak, že se váže na jejich nukleové kyseliny, kyselé mukopolysacharidy a fosfáty. Propidium chlorid vstupuje do poraněných nebo mrtvých buněk a tvoří komplex s nukleovými kyselinami. Fluoreskující buňky jsou počítány a stanovuje se intenzita fluorescence. Jedná se o rychlou a senzitivní metodu stanovení viability, resp. počtu „živých“ buněk.¹⁰⁶

5. **Stanovení viability pomocí morfologie buňky**

Morfologická integrita chlopně může být stanovena za použití imunohistochemických metod nebo pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. Nevýhodou těchto technik je obecně technická náročnost a nutnost speciálního vybavení.^{83, 88, 89}

6. **Stanovení viability pomocí buněčných kultur**

Stanovuje se proliferační schopnost buněk izolovaných z chlopenního alograftu.^{99, 107}

7. Stanovení viability pomocí vysoko výkonné kapalně chromatografie (HPLC)

Metabolicky aktivní (a tedy viabilní) buňky mají relativně vysoký obsah vysokoenergetických makroergních fosfátů (ATP). Tyto fosfáty a jejich katabolity mohou být kvantitativně stanoveny pomocí HPLC.^{108, 109}

8. Spektroskopická magnetická rezonance¹¹⁰

5.3. Faktory ovlivňující viabilitu alograftů

Zachování strukturální integrity a viability chlopenních alograftů je ovlivněno celou řadou faktorů, ke kterým dochází během odběru a procesu zpracování a uskladnění. Jsou to typ odběru (multiorgánový odběr, heart-beating, non heart-beating), doba teplé ischémie, druh kultivačního tkáňového media, cytotoxicita a teplota antibiotik během sterilizace chlopní, doba studené ischémie, kryoprezervace a konečně způsob rozmražení. Všechny tyto faktory mají zásadní vliv na zachování struktury extracelulární matrix a viability endoteliálních buněk a fibroblastů.

5.3.1. Teplá a studená ischémie a její vliv na strukturální integritu/viabilitu endotelu a fibroblastů chlopně

Zásadní význam pro zachování strukturální integrity a viability endotelu má doba tzv. teplé ischémie, tj. doba od zástavy srdce do odběru a zchlazení na teplotu alespoň +4°C. S tím souvisí i fakt, jestli se odběr provádí během multiorgánového odběru event. srdeční transplantace - HBD nebo až s odstupem po smrti - NHBD.

Niwaya a spol. zjistili dobrou prezervaci fibroblastů, které byly odebrány do 9 hodin po úmrtí.¹⁰⁶ Fakt, že k reverzibilním změnám (cytoplasmatický a mitochondriální edém, dilatace endoplasmatického retikula) dochází do 12 hodin trvání teplé ischémie a naopak k ireverzibilnímu poškození (vločkovitá densita mitochondrií, karyolýza, porušení

plasmatické membrány) až po intervalu teplé ischémie nad 12 hodin, potvrdil i Crescenzo a spol.¹¹¹

Fischlein a spol. ve své práci prokázali, že kryoprezervace zachovává integritu a viabilitu endotelu chlopenních alograftů, ale pouze za předpokladu krátké doby teplé ischémie (pokud možno odběr on HBD) a kryoprezervace, která proběhla do 24 hodin po odběru.⁸⁹ Zachování endotelu může mít význam z hlediska nízké trombogenicity i prevence kalcifikace alograftu. Zároveň se ale může zvýšit imunogenicita chlopně. Obdobné závěry, týkající se délky teplé ischémie, zjistil i Suh a spol., kteří doporučují zkrátit délku teplé ischémie pod 12 hodin. I z jejich výsledků vyplývá, že následná kryoprezervace patologické změny dále neprohlubuje.¹¹²

Destruktivní vliv teplé ischémie na endotel chlopenních alograftů dokumentuje i experimentální práce autorů Pompilio a spol.¹¹³ V experimentu na prasatech hodnotili strukturální poškození endotelu pomocí světelné mikroskopie, elektronové mikroskopie, stanovení endoteliálních funkcí (sekrece prostacyklinu), a to v závislosti na délce teplé ischémie. Jako bezpečnou hranici určili interval 6ti hodin, kdy pozorovali pouze mírné ireverzibilní změny. S postupem času (12, 24, 36 hodin) docházelo postupně k prohlubování patologických strukturálních změn, které vyústily v úplnou ztrátu viability a endotelové výstelky.

Obdobné závěry prokázal i St Louis a spol.¹¹⁰ Autoři pomocí spektroskopické magnetické rezonance sledovali vliv teplé ischémie a to tak, že měřili akumulaci radionuklidem značené aminokyseliny prolin fibroblasty u 224 vepřových semilunárních chlopní během teplé ischémie. Dále sledovali akumulaci laktátu a degradaci vysokoenergetických makroergních fosfátů (ATP). Zásoby ATP se během teplé ischémie vyčerpaly do 2 hodin a produkce laktátu, která prokazovala anaerobní metabolismus fibroblastů, přetrvávala až 24 hodin.

Dalším faktorem, který ovlivňuje strukturální integritu alograftů, je délka a stupeň studené ischémie. Yankah a spol. sledovali vliv studené ischémie na viabilitu fibroblastů pomocí technik vylučování barviva. Prokázali, že studená ischémie +4°C způsobuje poruchu buněčných funkcí; viabilitu prokázali u 76%, 65%, 53% při délce studené ischémie 2, 20 a 30 hodin.¹¹⁴ Ke ztrátě viability endoteliálních buněk tedy dochází i při studené ischémie poměrně rychle, tj. do 24 hodin. O něco delší interval „bezpečné studené ischémie“ prokázal v experimentální práci s vepřovými chlopněmi Mochtar a spol.¹¹⁵ Při skladování alograftů za

teploty + 4 °C prokázal přetrvávající viabilitu maximálně do 1 týdne. Al-Janabi a spol. publikovali, že „bezpečná doba“ studené ischemie při teplotě + 4 °C je ještě delší, tj. přesahující interval jednoho týdne.¹¹⁶ Většina autorů udává spíše ale kratší interval, maximálně 1 týden.¹¹⁴

Účinkem studené ischemie na tepenné alografty (nikoli chlopenní alografty) jsme se v jedné z našich prací zabývali i my, také díky kolegům z Anatomického ústavu LF UK v Hradci Králové. V této studii se hodnotila kvalita povrchů (endotelu) pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu.¹¹⁷ Tepenné alografty, které byly uloženy v kultivačním médiu E 199, byly rozděleny na dvě skupiny (hypotermie +4°C a normo/hypotermie – nejprve teplota + 37 °C po dobu 24 hodin a následně hypotermie +4°C). Bylo stanoveno 12 časových intervalů (12 a 24 hodin, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 21 a 30 dní), kdy se hodnotil povrch alograftů pomocí světelné a elektronové mikroskopie. Práce je v souladu s dalšími výše citovanými pracemi a potvrdila bezpečnou dobu studené ischemie 4 – 6 dní při teplotě + 4 °C. Vzhledem k tomu, že se chlopenní alograft skládá kromě cípů semilunární chlopně i z přilehlé části aorty nebo plicnice, je tato práce velice přínosná. Navíc je endotel chlopní i tepen totožný a lze předpokládat, že budou obdobné i mechanismy jeho poškození.

Autoři Feng a kol. porovnávali v experimentu viabilitu čerstvých vepřových aortálních chlopní při skladování v kultivačním médiu při teplotě + 4 °C po dobu 1, 2, 4, 7, 14, 21 a 28 dní a dále při kryoprezervaci při teplotě – 80 °C nebo – 170 °C po dobu 2, 4, 8 týdnů a dále po 6 měsících a 1 roce.¹¹⁸ Viabilita endoteliálních buněk byla hodnocena pomocí měření produkce prostacyklinu za bazálních podmínek a po stimulaci bradykininem během in vitro inkubace chlopenních cípů. Morfologie cípů byla hodnocena pomocí elektronové mikroskopie. Při uskladnění při teplotě + 4 °C došlo k signifikantnímu snížení produkce prostaglandinu po 4 dnech a k úplnému vymizení produkce a tedy i ztrátě viability po 14 dnech. Kryoprezervace při teplotě – 80 °C vedla ke ztrátě viability po 8 týdnech. Kryoprezervace při teplotě – 170 °C měla za následek významné snížení produkce prostaglandinu po 6 měsících a tato produkce se dále již nesnižovala (interval 1 rok).

Z této důležité práce vyplývá následující: skladování alograftu v nutričním médiu při teplotě + 4 °C prodlužuje bezpečný interval z 12 hodin teplé ischemie až na 4 dny. Po tomto intervalu dochází již k významnému odumírání endotelových buněk. Kryoprezervace při teplotě - 80 °C je nedostatečná. Kryoprezervace při teplotě - 170 °C vede z dlouhodobého

hlediska k snížení produkce prostaglandinu, ale po době 1 roku jsou stále přítomné viabilní endotelové buňky.

Další, velice důležitý fakt, který z této práce vyplývá je, že morfologické změny pozorované pomocí elektronové mikroskopie, nastaly až po jednom týdnu studené ischémie +4°C. Jednalo se o počínající porušení kontinuity endotelové výstelky, tedy dle morfologického stagingu, o změny počínající až středně významné. Viabilita endotelu byla ale snížena již na polovinu. Morfologické změny tedy vznikají opožděně, v době, kdy je již značná část buněk nevitálních. Obdobné závěry jako Feng publikovali i jiní autoři.¹¹⁹ Niwaya prokázal kvantitativní zachování viability alograftů po kryoprezervaci až v 70 %, a to za předpokladu krátkého času teplé ischémie (méně než 9 hodin).¹⁰⁶ S touto prací jsou ve shodě i další studie, které zdůrazňují nutnost optimalizace prezervačních metod (teplá a studená ischémie, antibiotická sterilizace). To ve svém důsledku snižuje negativní efekt kryoprezervace na buněčnou viabilitu alograftů.^{120, 121}

Jeden z faktorů, který může ovlivňovat strukturální integritu kryoprezervovaných chlopní, je intracelulární krystalizace.^{122, 123} Ta je ale většinou popisována u teplot vyšších než -130 °C.¹²³ Z tohoto hlediska je teplota -196 °C, která se používá v **Transplantačním centru FN Motol, bezpečná.**

Je zjevné, že kombinace teplé a studené ischémie ve větší či menší míře vedou ke snížení viability alograftů. Někteří autoři dokonce zjistili aviabilitu kryoprezervovaných alograftů, a to ve stádiu po rozmrazení a před implantací chlopně.^{124, 125} S tím je spojené i poškození buněčné ultrastruktury i extracelulární matrix.¹²⁴

Armiger a spol. ve své práci hodnotili viabilitu kryoprezervovaných chlopních alograftů před implantací.¹⁰³ Hodnotila se skupina 45 chlopní, které nebyly z různých důvodů vhodné k implantaci. Chlopně byly odebrané od HBD. Dále byla zjišťována viabilita alograftů odebraných od NHBD, a to v průběhu jejich zpracování. Chlopně odebrané do 24 hodin po srdeční zástavě měly obecně dostatečně zachovanou viabilitu fibroblastů. Až na malé výjimky vedla ale antibiotická sterilizace a dále kryoprezervace ke ztrátě viability. Ve skupině 45 kryoprezervovaných aortálních a pulmonálních autograftů se tedy pouze u malé části prokázala přítomnost viabilních fibroblastů po rozmrazení, a to v omezeném množství. Tato studie potvrzuje, že způsob zpracování je pro viabilitu zásadní. Rovněž odběr alograftů

od NHBD, narozdíl od HBD, snižuje pravděpodobnost viability alograftů před i po zpracování.

V souladu s výše uvedenými pracemi, které prokázaly malou nebo žádnou viabilitu kryoprezervovaných alograftů, jsou i studie, které hodnotily viabilitu u explantovaných chlopních alograftů během reoperace nebo event. v případě úmrtí. Mitchell a spol. zjistili naprosto minimální přítomnost dárcovských viabilních buněk. Pozorovali ale poměrně zachovalý kolagenový skelet chlopně, což považovali za strukturální základ dlouhodobě dobré funkce chlopně.⁸⁸

Stejní autoři rovněž porovnali výsledky explantovaných chlopních alograftů s chlopněmi získaných při explantaci transplantovaných srdcí.¹²⁶ Jedná se o velmi zajímavou práci, která popírá zachování viability explantovaných kryoprezervovaných chlopních alograftů. Dále se zabývá úlohou imunitní reakce v procesu degenerace alograftu. Explantované chlopně byly hodnoceny pomocí světelné a elektronové mikroskopie a imunohistochemických metod. Výsledky jejich studie jsou tyto: explantované kryoprezervované alografty měly progresivně hyalinizovaný kolagen a ztrátu normální strukturální komplexity a celularizace včetně endotelu a pojivové tkáně. Infiltrace alograftu zánětlivými buňkami byla buďto minimální nebo nebyla přítomna vůbec. Elektronová mikroskopie prokázala absenci viabilních buněk a deformovaný, ale zachovalý kolagen.

Výsledky chlopní z explantovaných srdcí po transplantaci byly tyto: byla zachována strukturální integrita včetně endotelu a pojivové tkáně. Infiltrace zánětlivými buňkami byla obecně mírná a nezpůsobovala morfologické poškození chlopně a to ani u pacientů, kteří zemřeli na rejekci štěpu. Jejich závěry jsou tedy takové, že kryoprezervovaný alograft je již i z krátkodobého hlediska neviabilní a jeho degenerace není v souvislosti s imunologickou reakcí.

Naopak chlopně u transplantovaných srdcí mají normální strukturální integritu a celularizaci včetně endotelu a přesto u nich dochází pouze k minimální až mírné imunologické reakci. Přítomnost viabilních buněk a normální struktury chlopně je pravděpodobně daná velmi krátkou dobou studené ischémie, nepřítomností teplé ischémie a absencí dalších prezervačních technik jako jsou sterilizace nebo kryoprezervace. Nepřítomnost výraznější imunologické reakce, a to dokonce u pacientů, kteří zemřeli na akutní rejekci, je vysvětlitelná tím, že cípy aortální chlopně jsou avaskulární a že pacienti užívali imunosupresivní terapii.

Autoři v této studii neprokázali přítomnost viabilních buněk u explantovaných kryoprezervovaných alograftů, což je v rozporu s celou řadou jiných studií. Určitým vysvětlením může být to, že právě aviabilita některých alograftů vedla k degeneraci a nutnosti reoperace. U zbytku nereoperovaných alograftů je tedy viabilita teoreticky možná. Pochopitelně má na viabilitu zásadní význam způsob zpracování, tj. délka teplé ischemie, sterilizace a způsob kryoprezervace. Proto pochopitelně nelze závěry této práce generalizovat.

Výsledky této práce mohou teoreticky podporovat snahu některých cévních chirurgů v jistých indikacích transplantovat cévní alotransplantáty v „režimu transplantace orgánů“, tedy odebrané v rámci multiorgánových odběrů od BHD, uložené jen krátkodobě v prezervačních, endotel chránících roztocích a transplantované po studené ischemii v řádu hodin. ^{127,128}

5.3.2. Sterilizace alograftu pomocí antibiotik a jejich vliv na viabilitu zpracovávaných chlopní

V minulosti se při odběru od mrtvých dárců používaly chemické, iradiační nebo i jiné metody sterilizace chlopně, které vedly ke ztrátě viability a zhoršené trvanlivosti alograftu. ^{129, 130} Kontaminace chlopně, která se získává posmrtně od mrtvých dárců je dána jednak nesterilním prostředím, kde se odběr provádí (pitevna) a samozřejmě i vnitřní kontaminací z gastrointestinálního traktu a plic při počínajícím rozkladu mrtvého těla. Během multiorgánového oděru má až 60% dárců pozitivní hemokulturu. Proto bylo nutné vypracovat šetrnou techniku sterilizace alograftů. V současné době se uniformně používá sterilizace pomocí směsi několika antibiotik. Složení antibiotického roztoku by mělo být takové, aby se dosáhlo šetrné sterilizace, která by nenarušila viabilitu chlopně. Jde tedy o titraci baktericidní koncentrace s cytotoxickou, kterou provádí klinický mikrobiolog na základě průběžného vyhodnocování kultivace odebrané tkáně a štěpů po základním zpracování. U některých, dříve často používaných antibiotik se prokázala cytotoxicita a proto se dnes již nepoužívají anebo se alespoň snížila jejich koncentrace. Jasně cytotoxické je např. fungicidní antibiotikum Amphotericin B.

Amphotericin B je vysoce účinná antifungicidní látka, jejíž mechanismus účinku je dán vazbou na steroly v plazmatické membráně plísni, čímž porušuje jejich permeabilitu a osmotickou bariéru. ^{131, 132}

Je prokázána vysoká cytotoxicita Amphotericinu B, a to zejména při vyšších koncentracích a teplotě + 37 °C.^{121, 133} Při nižších teplotách (+ 4 °C) je jeho cytotoxický efekt nižší. Z některých prací vyplývá, že při nižších koncentracích Amphotericinu B (5 µg/ml) je antifungicidní účinnost dostatečná při minimální cytotoxicitě. Na rozdíl od endoteliálních buněk, které jsou na přítomnost Amphotericinu B vysoce citlivé, jsou fibroblasty mnohem odolnější vůči jeho cytotoxickým účinkům.¹²⁰

Někteří autoři od použití tohoto antibiotika zcela ustoupili, jiní alespoň snížili jeho koncentraci anebo toto antibiotikum používají pouze ke sterilizaci alograftů, které byly odebrány kadaverózním dárčům při sekci, kde je obecně poměrně vysoké riziko fungální infekce.^{106, 134, 135}

Škodlivý účinek antibiotik na viabilitu chlopních alograftů prokázal ve své práci také Feng a spol.¹⁰² Jeho práce prokázala škodlivý efekt antibiotik v experimentu, při kterém se posuzovala viabilita endotelu vepřových aortálních chlopní, a to pomocí sekrece prostaglandinu. Studoval se účinek antibiotik, které se ke sterilizaci alograftů často používají, a to buď samostatně nebo v jejich kombinaci (Gentamycin 80 mg/ml, Azlocillin 500 mg/ml, Cloxacillin 25 mg/ml, Metronidazole 100 mg/ml, Amphotericin B 50 mg/ml). Obecně tento experiment prokázal snížení produkce prostacyklinu (snížení viability), a to u všech antibiotik, samostatně anebo v kombinaci. Jednoznačně nejnižší produkce prostacyklinu (nejmenší viabilita) byla zjištěna při použití Amphotericinu B. Tento cytotoxický účinek Amphotericinu B je ale v závislosti na dávce, při nižších koncentracích nebyl pozorován. Z práce vyplývá, že by se sterilizace měla provádět co nejkratší nutnou dobu. Obdobné výsledky udává i Armiger a spol, kteří prokázali, v porovnání s kontrolním vzorkem, snížení viability alograftů po sterilizaci antibiotiky.¹⁰³

Antibiotika jsou obvykle rozpuštěna v kultivačním tkáňovém médiu (v našem případě kultivační medium E 199) a inkubace probíhá při teplotě + 37 °C. Vzhledem k tomu, že antibiotika nejvíce účinkují na mikroorganismy během jejich replikace, je vhodná teplota + 37 °C. Během hypotermie je proces replikace pomalejší, a proto již nemají antibiotika takovou účinnost.¹³⁶ Doporučená doba sterilizace je alespoň 24 hodin. Některá pracoviště se snaží, v zájmu omezení toxického účinku antibiotik, tento čas zkrátit, a to až na 6 hodin.¹³⁶ Při takto zkrácené sterilizaci nedošlo k navýšení počtu pozitivních kultivačních nálezů ani k zvýšení incidence bakteriální endokarditidy implantovaných alograftů.

V Transplantačním centru FN Motol a Specializované tkáňové bance STB85 - Banka kardiovaskulární tkáně se v současnosti používají ke sterilizaci chlopenních alograftů dvě různé směsi antibiotik, a to v závislosti na způsobu odběru a typu dárce.^{68, 69} Motolská banka kardiovaskulární tkáně spolupracuje od svého vzniku úzce s klinickými mikrobiology a složení antibiotického koktailu bylo několikrát po vyhodnocení nálezů měněno.

Jak vyplývá z protokolu Specializované tkáňové banky FN Motol, po úvodní inkubaci alograftu v dané směsi antibiotik po dobu 24hodin při teplotě + 37 °C (teplá ischemie), se posílají vzorky na aerobní i na aerobní kultivace. Následně je alograft skladován v téže směsi při teplotě + 4 °C, a to až do kryoprezervace (studená ischemie). V případě pozitivního nálezu se před vlastní kryoprezervací odebírají další vzorky na mikrobiologické vyšetření. Při opětovném přetrvávání pozitivity je alograft vyřazen.

Cytotoxický Amphotericin B se u nás používá v nízké koncentraci a pouze v případě, že byl alograft odebrán mrtvému dárce až při sekci, což je v podmínkách Transplantačního centra velmi zřídka. V letech 1992 – 1995 to bylo pouze v 11 %.^{68, 69} V současnosti se odběr od mrtvých dárců již prakticky neprovádí a naprostá většina alograftů je odebrána během multiorgánových odběrů. Vzhledem k tomu, že alografty získané během těchto multiorgánových odběrů nebo event. od non heart-beating dárců stačí pokrýt potřeby republiky, není nutno tento počet navyšovat odběrem alograftů od mrtvých dárců. Pokud by se zvýšil zájem o chlopenní štěpy v rámci republiky a/nebo v rámci mezinárodní spolupráce, má národní program „rezervu“ zavést odběry v programu transplantace srdce (většina srdcí příjemců štěpu splňuje kritéria pro použitelnost aortální chlopně), rozšířit odběry od NHBD a přistoupit ke spolupráci s ostatními tkáňovými bankami a odebírat srdce při odběrech tkání v průběhu sekce.

Občansky čistý odběr alograftu kadaverózního dárce při sekci zvyšuje, ve srovnání s multiorgánovým odběrem nebo odběrem od non heart-beating dárce, riziko kontaminace.

Při validaci sterilizačního procesu banky (při rutinním mikrobiologickém vyšetření) v Transplantačním centru FN Motol (v době kdy se prováděly odběry kadaverózních dárců na pitevně) byla zjištěna kontaminace 15ti tkání ze 35ti odebraných při sekci (43 %) a 34 ze 188 (18 %) odebraných sterilně. Rozdíl v incidenci infekce tkání získaných při nesterilních a sterilních odběrech byl statisticky významný ($p < 0.01$). Přehled patologických agens ukazuje **tabulka. č. 1.**

Tabulka 1: přehled patologických agens zjištěných při rutinním mikrobiologickém vyšetření alograftů v závislosti na typu odběru (odběr při sekci versus multiorganový odběr).

Agens	Sekční odběr (35 srdcí)	Sterilní odběr (188 srdcí)
Staphylococcus epidermidis	1	3
Staphylococcus faecalis	0	5
Enterobacter	0	6
Streptococcus	0	4
Pseudomonas aeruginosa	4	2
Candida	3	2
Acinetobacter	1	2
Escherichia coli	2	2
Vzdušné mikroorganismy	2	2
Aspergillus	0	3
Klebsiella	0	1
Serratia	0	1
Bacteroides	2	0
Kvasinky a plísňe	0	1
Celkem	15	34

Účinnost naší současné antibiotické sterilizace (Specializovaná tkáňová banky STB85 Banka kardiovaskulární tkáně) dokumentujeme daty za roky 2004 - 2005:

- V roce 2004 bylo odebráno celkem 176 chlopenních alograftů (84 aortálních, 92 pulmonálních chlopní). Z toho bylo pozitivních při první kultivaci 8 (10 %), opakovaně pozitivních 2 (1 %). Dvě chlopně tedy byly definitivně vyřazeny pro přetrvávající pozitivní kultivaci. Ani jeden z těchto dvou alograftů nebyl od mrtvého dárce.
- V roce 2005 odebráno 139 chlopenních alograftů (63 aortálních a 76 pulmonálních). Z toho pozitivních při první kultivaci 13 chlopní (9 %), opakovaně pozitivní bylo 7 chlopní (5 %). Sedm chlopní bylo tedy definitivně vyřazeno pro přetrvávající pozitivní kultivaci bezprostředně před kryoprezervací. Ani jedna chlopeň nebyla od mrtvého dárce.

Z validace procesu vyplývá dobrá účinnost naší antibiotické sterilizace. Fakt, že po úvodní 24 hodinové sterilizaci při teplotě + 37 °C, jsou alografty uloženy až do kryoprezervace nadále v tkáňovém médiu E 199 s roztokem antibiotik, dále snižuje mikrobiální kontaminaci a snížil výsledný počet iniciálně kontaminovaných chlopní o cca 3/4. Tato lepší výtěžnost odběru a zpracování alograftů je ale za cenu delšího kontaktu alograftu s potenciálně cytotoxickými antibiotiky, která mohou alterovat strukturální integritu a viabilitu chlopní.

5.3.3. Imunogenicitá alograftů

Transplantace chlopních alograftů, na rozdíl od orgánových transplantací, kde se striktně dodržuje ABO kompatibilita (u transplantací ledvin dokonce HLA typizace) a kde je nezbytné celoživotní užívání imunosupresivní terapie, má jiná pravidla a klinický význam imunitní reakce je zde teoreticky ne zcela jasný.

S imunitní reakcí příjemce proti transplantovanému alograftu souvisí zejména viabilita implantované chlopně, která byla podrobně probrána v předchozích statích. Významná je zejména role endotelu, dále zde mohou být přítomny viabilní fibroblasty, buňky hladkého svalstva, které se nacházejí ve stěně aorty a rovněž kardiomyocyty v oblasti anulu chlopního štěpu.

Přítomnost viabilního endotelu může snižovat trombogenicitu povrchu chlopně a riziko kalcifikace, na druhou stranu je endotel nejvíce imunogenní součástí chlopního alograftu, prezentující pro rejekci zásadní MHC II antigeny (HLA).

Na rozdíl od tzv. čerstvých alograftů mají kryoprezervované chlopně lépe zachovalou viabilitu endotelu a fibroblastů.¹³⁷ Je známo, že na membránách endoteliálních buněk jsou HLA antigeny třídy I + II, a to i po kryoprezervaci.¹³⁸

Imunologické faktory

Faktory, které přispívají k imunitnímu poškození jsou ABO a HLA inkompatibilita. Role prezervace alograftu včetně kryoprezervace a její význam v imunogenicitě implantovaných alograftů, je předmětem výzkumu od doby implantace prvních alograftů.¹³⁹ Jednotlivé kroky zpracování, včetně délky teplé a studené ischemie, antibiotická sterilizace, kryoprezervace včetně rozmrazovacího procesu ovlivňují výslednou viabilitu alograftu.¹⁴⁰ Ačkoli je důležitost viability diskutabilní, více viabilní alograft může mít lepší funkci. Na druhou stranu je pravděpodobně více imunogenní.¹²¹ Antibiotická sterilizace dále snižuje imunologickou reaktivitu alograftu.¹⁴¹ Ačkoli někteří autoři tvrdí, že kryoprezervace může snižovat imunogenicitu alograftu, někteří říkají opak.^{142, 139, 143} Zjednodušeně, kryoprezervace může zachovávat viabilitu endoteliálních buněk a ve větší míře i fibroblastů, což vyplývá z pokračující syntézy prokolagenu po implantaci chlopně a z perzistující přítomnosti viabilních dárcovských fibroblastů po explantaci alograftu.^{97, 125, 144}

Jiní autoři neprokázali přítomnost zánětlivých buněk v explantovaných alograftech. Z jejich výsledků vyplývá, že tyto explantované alografty mají minimální nebo žádnou celularitu, ale mají poměrně dobře zachovalý kolagenový skelet.^{88, 126} Některé ze současných prací ale prokázaly signifikantní buněčnou infiltraci T-lymfocyty a B-lymfocyty u alograftů explantovaných z důvodu degenerace u dětí.^{145, 146} Imunitně zprostředkované poškození alograftů bylo prokázáno v experimentu i v humánní medicíně. Implantace aortálního alograftu v experimentu na laboratorních potkanech vedla k masivní celulární infiltraci, intimálnímu ztluštění a mediální nekróze. Tato reakce je zprostředkovaná T-lymfocyty.¹⁴⁷ Tyto změny nejsou pozorovány v případě potkaního izograftu nebo autograftu.^{148, 149, 150}

Vliv věku na degeneraci alograftů

U mladších jedinců dochází k předčasné degeneraci alograftu ve srovnání se starší populací. Tento jev je zvýrazněn u pacientů mladších jednoho roku.^{151, 152, 153} Příčina takovéto degenerace není jasná. Jedno z možných vysvětlení je intenzivní imunitní reakce. Toto tvrzení ale není podpořeno výsledky imunologických vyšetření, která neprokázala humorální nebo T-lymfocyty zprostředkovanou reakci na implantované alografty u dětí s předčasně zdegenerovaným alograftem.^{154, 155} Když k tomuto problému přičteme rychlý

růst dítěte v prvním roce života, pochopíme, proč transplantace chlopenního štěpu nemocným této věkové kategorie znamená pacienta odsoudit k sérii reoperací.

ABO inkompatibilita

Význam ABO inkompatibility je stále nejasný, i když se spíše ukazuje, že ABO inkompatibilita nehraje významnou úlohu v degeneraci alograftů.¹⁵⁶

ABO inkompatibilitou a stanovením stupně imunitní odpovědi příjemce alograftu se zabývali rovněž autoři Schütz a spol., a to pomocí tzv. cytoimunologického monitorování, které se běžně používá během orgánových transplantací k určení rejekce.^{157, 158} Tato metoda je spíše vhodná k určení akutní rejekce v časném pooperačním období po implantaci alograftu.

Cytoimunologické monitorování je poměrně jednoduchá metoda, kdy se ze vzorku periferní krve pomocí centrifugace a dalších metod získá koncentrát monocelulárních buněk.¹⁵⁹

Aktivační index (AI) se stanovuje jako poměr lymfoblastů k celkovému počtu lymfoidních buněk.

$$AI = \frac{\text{Lymfoblasty}}{\text{Lymfoidní bb.}} \times 100$$

Hodnota aktivačního indexu > 1 je hodnocena jako imunologická reakce.

Schütz a spol. zjišťovali pomocí stanovení aktivačního indexu časnou imunitní reakci příjemců kryoprezervovaných aortálních alograftů. Tito pacienti byli rozděleni do dvou skupin (ABO kompatibilní a ABO nekompatibilní). Jako kontrolní skupinu určili pacienty po implantaci xenograftů. Hodnota AI se u všech nemocných stanovovala denně, a to 0. – 21. den od operace. Všichni pacienti po implantaci aortálního alograftu měli zvýšený aktivační index z důvodu aktivace T-lymfocytů, tj. měli známky aktivace imunitního systému. Průměrná hodnota maximálního AI byla u ABO kompatibilní skupiny $1,5 \pm 0,9$ s průměrnou dobou trvání $1,5 \pm$ dní. U ABO nekompatibilní skupiny byla průměrná hodnota maximálního

AI $2,3 \pm 1,9$ a trvala $3,3 \pm 1,4$ (rozdíl byl statisticky významný – $p < 0,05$). U kontrolního vzorku pacientů s implantovaným xenograftem nedošlo k navýšení aktivačního indexu.

Tato studie tedy potvrdila představu, že implantace alograftů vyvolává imunitní reakci, kdy dochází k aktivaci T-lymfocytů.¹⁵⁸ Naopak pacienti po implantaci xenograftů tuto reakci neměli a proto se tedy tato imunologická reakce nedá vysvětlovat např. tzv. celkovou zánětlivou reakcí organismu, ke které dochází po kardiochirurgických operacích v mimotělním oběhu.

Aktivace imunitního systému začala uniformně pátý pooperační den, byla mírného charakteru (i když u skupiny pacientů bez ABO kompatibility byla významněji). Reakce trvala maximálně 5 dní a následně u obou skupin pacientů zcela odezněla. Tato mírná reakce se neprojevila na funkci alograftu, která byla během studie pravidelně echokardiograficky sledována. Podstatné je, že kryoprezervované alografty, které byly použity v této studii, měly při vyšetření pomocí elektronové mikroskopie téměř intaktní endotelovou výstelku a jejich viabilita byla prokázána pomocí bazální i stimulované sekrece prostaglandínů.

Kadner a spol. prokázali, že na rozdíl od čerstvého alograftu, jehož endotel exprimuje ABO antigeny, kryoprezervované alografty nemají tyto ABO karbohydrátové antigeny na buněčné membráně přítomny, a proto ABO inkompatibilita nehraje významnou roli v degeneraci alograftů.¹⁶⁰

HLA inkompatibilita

Efekt HLA inkompatibility se stal v poslední době předmětem intenzivního výzkumu. V buněčných kulturách endoteliální buňky čerstvých i kryoprezervovaných alograftů stimulují imunokompetentní buňky.^{161, 162, 163}

V experimentální studii se zjistilo, že potkani, kteří měli implantovaný aortální alograft, vykazovali humorální a buněčně zprostředkovanou imunitní odpověď.¹⁶⁴ První, kdo prokázal HLA protilátky v humánní medicíně u pacientů s implantovaným chlopenním alograftem, byl Smith a spol.¹⁶⁵ Tito autoři zjistili, že chlopenní alograft způsobuje specifickou imunitní odpověď proti HLA antigenům, která může přetrvávat až 15 let od

operace. Shaddy a spol. prokázali v prospektivní studii HLA protilátky u pediatrických pacientů po implantaci chlopenního alograftu.¹⁵⁴ Tyto protilátky přetrvávaly až do jednoho roku od operace. Protilátky proti HLA antigenům u pacientů po implantaci alograftu byly dále prokázány dalšími autory v dospělé i dětské kardiokirurgii.¹⁶⁶

Důsledky imunitní reakce na chlopenní alografty jsou ale v klinické medicíně stále nejasné. Někteří pacienti vykazují předčasnou degeneraci alograftů, jiní naopak nikoli. Negativní efekt imunitní reakce potvrzuje v experimentu příznivý efekt imunomodulační a imunosupresivní terapie.^{167, 168} V klinické medicíně neměla přítomnost protilátek nepříznivý vliv na funkci alograftu, která byla hodnocena pomocí echokardiografie. Je tedy pravděpodobné, že variabilita v dlouhodobé funkci a trvanlivosti alograftů je dána jak imunologickými tak i neimunologickými faktory.

Metody snižující imunitní odpověď organismu po implantaci chlopenních alograftů

Pokud budeme akceptovat, že imunitní reakce příjemce je škodlivá a přispívá k předčasné degeneraci, máme několik možností, jak tuto reakci ovlivnit.

První možností je **ABO a HLA typizace**, která je ale vzhledem k obecnému nedostatku alograftů nereálná.

Další možností je zbavit alografty jejich imunogenicity, tj. zbavit alografty antigenů přítomných na membránách jejich buněk. V této oblasti v současnosti probíhá intenzivní výzkum, jehož cílem je vytvořit **decelularizovanou chlopeň**.^{98, 169} První výsledky klinických studií jsou příznivé.¹⁶⁹

Další možností je vytvoření **chlopně na bázi tkáňového inženýrství** (chlopeň vytvořená z biodegradabilního skeletu nebo decelularizovaného alograftu, která je osídlená autologními buňkami schopnými se diferencovat v chlopenní tkáň).¹⁷⁰

Poslední možností je **imunomodulační a imunosupresivní terapie**. Některé experimentální práce prokázaly, že cyklosporin u psů a potkanů snižuje imunitní odpověď na implantovaný tepenný nebo žilní alograft.^{171, 172, 173} Naopak v klinické praxi, u pediatrických pacientů s implantovaným chlopenním alograftem, nevedla léčba azathioprinem ke snížení imunitní reakce.¹⁷⁴ Intenzivnější imunosupresivní léčba, která se používá u orgánových

transplantací, by velmi pravděpodobně tuto imunitní reakci potlačila. Takováto terapie má ale své komplikace a nežádoucí účinky.

Jak vyplývá z výše uvedeného textu, většina autorů při alokaci chlopenních štěpů ignoruje krevní skupinu dárce a příjemce. Naše banka kompatibilitu krevních skupin ABO systému respektuje, pokud si to transplantační kardiochirurg přeje a pokud je to možné, tedy ve většině případů. Žádné pracoviště ale neuzívá v humánní medicíně po transplantaci chlopenního štěpu imunosupresní léčbu příjemce.

6. Závěr

Experimentální studie připravila vlastní elektronmikroskopické skóre, přesně definující stupeň poškození endotelu aortálních a pulmonálních alograftů během jednotlivých fází přípravy štěpů ke klinickému použití. Definovala tedy poškození endotelu při odběru, vlastním zpracování a během dlouhodobého uskladnění metodou kryokonzervace.

Proces získávání a zpracování štěpů vede k významnému poškození až k úplné ztrátě endotelu (skóre 3 – 4 po teplé ischémii 12 hodin a skóre 5 – 6 po teplé ischémii 48 hodin. K těžkému poškození endotelu ale vede již pouhé uskladnění alograftů 24 hodin ve „fyziologickém roztoku“ o teplotě + 4 °C - skóre 5 – 6.

Uložení alograftů v kultivačním médiu E 199 s roztokem antibiotik při teplotě + 37 °C má za následek závažné poškození - skóre 5 a konečně po závěrečné kryoprezervaci a rozmrazení tkáň nacházíme těžké poškození, kvalifikované jako zničení endotelu a poškození i hlubších vrstev - skóre 5 – 6.

Jak jsme již ale opakovaně uvedli, před kryoprezervací byly vzorky chlopní zpracovány podle rutinního protokolu, tj. byly vystaveny škodlivým účinkům teplé a studené ischémie, „fyziologického roztoku“ a antibiotické sterilizaci. Výsledné skóre před kryoprezervací bylo 5, po zmrazení pak 5 – 6. Samotná kryoprezervace tedy poškození tkáň dále výrazněji neprohlubuje. To je primárně determinováno procesy před kryoprezervací.

Kombinace jednotlivých fází zpracování, a to i při vynechání uskladnění ve fyziologickém roztoku, vede k těžkému poškození endotelu nebo event. až ke ztrátě endotelové výstelky. Takovéto morfologické poškození odpovídá jistě ztrátě viability. **Výsledkem celého procesu je to, že implantujeme chlopní alografty bez endotelu a již se známkami poškození i hlubších struktur, tzn. je již narušena struktura extracelulární matrix.**

Přínosem práce tedy je, že přinesla pro české a zahraniční kardiochirurgy, implantující štěpy ze specializované banky kardiovaskulární tkáně STB85 **konkrétní informaci o stupni poškození povrchu AHV semilunárních chlopní**. Vzhledem ke zničení endotelu dnes víme, že **není u našich štěpů důležité respektovat kompatibilitu krevní skupiny ABO systému dárce a příjemce, či dokonce HLA typizaci**.

Naopak práce ukázala teoretickou výhodu náhrady aortální chlopně pulmonálním autografem (Rossovy operace), protože ukazuje, že **endotel pulmonálního autografu zůstává zachován**. Proto i na základě této práce je **doporučováno uložení pulmonálního autografu do implantace v chladné autologní krvi**.

Výsledky studie vedly ke konkrétní změně postupu při získávání chlopních alograftů, tj. vynechání lázně alograftů ve fyziologickém roztoku. **Ve spolupráci s regionálními TC jsou srdce pro přípravu štěpů po odběru ukládána a transportována v chladném perfúzním orgánovém roztoku**. Tyto změny se netýkají pouze zpracování aortálních a pulmonálních alograftů, ale byly uplatněny i pro zpracování mitrálních alograftů.

Co přinesla studie pro budoucnost:

Dále je možno, po pečlivém uvážení včetně ekonomické kalkulace, **navrhnout event. další opatření, která by mohla vést k lepší prezervaci strukturální integrity/viability chlopních alograftů**.

Jsou to:

- **odběry pouze od HBD** (s výjimkou odběrů od pediatrických dárců na JIP). Toto jistě není problém a prakticky se tak již postupuje (za posledních 8 let se odběr od mrtvého dárce neuskutečnil). Důvodem je dostatečné množství alograftů získaných během multiorganových odběrů (t.č. má BKVT STB85 pro klinické použití k dispozici více než 350 kryokonzervovaných aortálních a pulmonálních štěpů a tři mitrální alografty)
- **zkrácení doby teplé ischemie**. Teplá ischemie má katastrofální vliv na povrchovou morfologii i strukturální integritu chlopních alograftů. Doba teplé ischemie je v našich podmínkách cca 24 hodin, kdy probíhá antibiotická sterilizace za teploty

- **minimalizovat toxický účinek antibiotik.** Doba trvání antibiotické sterilizace pouze 6 - 12 hodin, následně pak uchovávat alografty do kryoprezervace pouze v kultivačním médiu E 199. Z našich výsledků vyplývá, že by došlo k mírnému navýšení počtu sekundárních pozitivních kultivací a tedy mírnému navýšení počtu vyřazených alograftů z důvodu kontaminace.
- **zkrácení doby studené ischémie.** Chlopenní alografty jsou do kryoprezervace skladovány při teplotě +4 °C, a to po různě dlouhou, tj. dnů event. i týdnů. Je nezbytné tuto dobu zkrátit na co nejmenší, v ideálním případě pak alografty kryoprezervovat bezprostředně po ukončení sterilizace.

Je prokázáno, že samotná kryoprezervace jen částečně snižuje viabilitu chlopenních alograftů (a má tedy malý vliv na povrchovou morfologii a strukturální integritu). Výsledný stav po kryoprezervaci je tedy primárně determinován proces před zmražením, a proto se musíme pokusit omezit všechny škodlivé noxy, které viabilitu alograftů před vlastní kryoprezervací alterují. Výše navržené změny by mohly v současnosti používaný protokol Transplantačního centra FN Motol z hlediska morfologie a viability chlopenních alograftů vylepšit.

Navrhovaná opatření by vedla k mírnému snížení výtěžnosti chlopenních alograftů během procesu jejich zpracování. Jak vyplývá z kultivačních nálezů Transplantačního centra FN Motol, cca 5 -10 % alograftů by bylo nutné vyřadit z důvodu kontaminace. Přesto by výsledná efektivita byla lepší než jaká je např. u Evropské banky homograftů, kde je v průběhu zpracování vyřazeno až 42 % chlopní. Toto mírné snížení efektivy (výtěžnosti) by bylo za cenu zlepšení kvality chlopenních alograftů, a to ve smyslu zachování jejich strukturální integrity a pravděpodobně i viability.

Jak již ale bylo uvedeno v úvodu tohoto závěru, tyto změny, které navrhuje na základě výsledků předkládané práce a také současných literárních znalostí, je nutno nejprve ověřit v připravovaném experimentu.

Předkládaná práce také dokumentuje činnost Banky kardiovaskulární tkáně STB85 při Transplantačním centru FN Motol. Jde o jedinou tkáňovou banku v zemi, která má díky svému unikátnímu zařazení do systému zdravotnictví přímý přístup do poolu dárců orgánů země. Pracoviště vzniklo více než 25 let trvající evolucí na skutečně multidisciplinární bázi - ze spolupráce dětských kardiologů a kardiologů s patologi, soudními lékaři, anatomy, histology, klinickými mikrobiology, ale také legislativci, administrativou nejen fakultní nemocnice, ale i Ministerstva zdravotnictví ČR a Koordinačního střediska transplantací. Jedná se o unikátní pracoviště, které je srovnatelné s nejlepšími evropskými i světovými pracovišti a které zajišťuje dodávku chlopenních alograftů pro všechna kardiologická pracoviště v České Republice.

Autor si uvědomuje limitace studie. Teoreticky byl připraven na zkoumání dalších biologických parametrů chlopenních alograftů, ale z ekonomických důvodů nemohla být studie tímto směrem rozšířena.

7. Seznam použitých zkratk

AHV:	chlopenní alograft
BKVT:	banka kardiovaskulární tkáně
BM:	basální membrána
DMSO:	dimethylsulfoxid
HBD:	heart-beating donor
HLA:	human leukocyte antigens
HTx:	transplantace srdce
MHC:	hlavní histokompatibilní systém
MOO:	multiorgánový odběr
NHBD:	non heart-beating donor
STB85:	Specializovaná tkáňová banka č. 85 – Kód Ministerstva zdravotnictví ČR pro BKVT při TC Motol
TC	transplantační centrum

8. Literatura

- ¹ Mokráček A., Hlubocký J., Burkert J., Vojáček J., Šulda M., Vambera M., Kursa J., Kroupová V., Kobyłka P., Špatenka J.: Transplantation of Mitral Allograft into the Tricuspid Position – Sheep Experimental Model, *Acta Veterinaria Brno* 2007; 76, 149 – 155
- ² Vojáček J, Mokráček A, Špatenka J, Vambera M, Šulda M, Šetina M, Pavel P, Burkert J, Pepper J. Implantation of cryopreserved mitral allograft into the tricuspid position in an experimental study in sheep: Technical aspects of implantation and immediate results evaluated by epicardial echocardiography. *Zentralbl Chir* 2006;131:511-516
- ³ Bonow et al. ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease. *JACC* Vol. 32, No. 5, November 1998:1486-1588
- ⁴ Hammermeister K, Sethi GK, Henderson WG, et al. Outcomes 15 years after valve replacement with a mechanical versus a bioprosthetic valve: final report of the Veterans Affairs randomized trial. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:1152–8
- ⁵ Bloomfield P, Wheatley DJ, Prescott RJ, et al. Twelve-year comparison of a Björk-Shiley mechanical heart valve with porcine bioprostheses. *N Engl J Med* 1991;324:573–9
- ⁶ Oxenham H, Bloomfield P, Wheatley DJ, Lee RJ, Cunningham J, Prescott RJ, Miller HC. Twenty year comparison of a Björk-Shiley mechanical heart valve with porcine bioprostheses. *Heart*. 2003 Jul;89(7):715-21
- ⁷ Bottio T, Rizzoli G, Caprili L, Testolin L, Thiene G, Gerosa G. Biological versus mechanical aortic prosthesis? A nineteen-year comparison in a propensity-matched population. *J Heart Valve Dis*. 2005 Jul;14(4):493-500
- ⁸ Bloomfield P. Choice of heart valve prosthesis. *Heart* 2002;87:583-589
- ⁹ Hučín B. Dětská kardiologie. Grada Publishing, spol. s. r. o., 2001
- ¹⁰ Popelová J. Vrozené srdečné vady v dospělosti. Grada Publishing, spol. s. r. o., 2003
- ¹¹ Stark J, M. De Leval. Surgery for congenital heart defects. Grune & Stratton LTD. 1983
- ¹² Kirklin JW, Barratt-Boyes BG (eds): *Cardiac Surgery*, 2d ed. New York, Churchill Livingstone, 1993.
- ¹³ LoGrippo GA, Rupe CE: Procedure for sterilization of arterial homografts with beta-propiolactone. *Lab Invest* 1955; 4:217.
- ¹⁴ Davies H, Lessof MH, Roberts CI, Ross DN: Homograft replacement of the aortic valve. *Lancet* 1965 (1 May); 926.

-
- ¹⁵ Pacifico AD, Karp RB, Kirklin JW: Homografts for replacement of the aortic valve. *Circulation* 1972; 45/46:1-36.
- ¹⁶ Sands MP, Nelson RJ, Mohri H, Merendino KA: The procurement and preparation of aortic valve homografts. *Surgery* 1967; 62:839.
- ¹⁷ Barratt-Boyes BG: Long-term follow-up of aortic valvar grafts. *Br Heart J* 1971; 33:60.
- ¹⁸ O'Brien MF, Stafford EG, Gardner MA, Pohlner PG, McGiffin DC. A comparison of aortic valve replacement with viable cryopreserved and fresh allograft valves, with a note on chromosomal studies. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1987 Dec;94(6):812-23.
- ¹⁹ Yacoub M, Rasmi NR, Sundt TM, Lund O, Boyland E, Radley-Smith R, Khaghani A, Mitchell A. Fourteen-year experience with homovital homografts for aortic valve replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995 Jul;110(1):186-93; discussion 193-4.
- ²⁰ Burkert, J, Špatenka, J, Laca, B., Šetina, M., Honěk, T.: Dlouhodobé výsledky náhrady aortální chlopně alograftem, III. Sjezd české společnosti kardiovaskulární chirurgie, 6.-7. 11. 2008, Brno, Sborník abstrakt č. 12.
- ²¹ Murray G, Roschlau W, Lougheed W: Homologous aortic-valve-segment transplants as surgical treatment for aortic and mitral insufficiency. *Angiology* 1956;7:466
- ²² Murray G: Aortic valve transplants. *Angiology* 1960; 11:99
- ²³ Beall ACJ, Morfia GJ, Cooley D, Debaquey M: Homotransplantation of the aortic valve. *J Thorax Cardiovasc Surg* 1961;42:497
- ²⁴ Erwin AJ, Willson DR: Aortic-valve homograft in the treatment of aortic insufficiency. *N Engl J Med* 1962; 266:852
- ²⁵ Bigelow WG, Kuypers PG, Heimbecker RO, Gunton RW: Clinical assessment of the efficiency and durability of direct vision annuloplasty. *Ann Surg* 1961; 154:320
- ²⁶ Ross DN: Homograft replacement of the aortic valve. *Lancet* 1962; 2:487
- ²⁷ Barratt-Boyes BG: Homograft aortic valve replacement in aortic incompetence and stenoses. *Torax* 1964; 19:131.
- ²⁸ Angell WW, Wuerflein RD, Shumway NE: Mitral valve replacement with the fresh aortic valve homograft: Experimental results and clinical application. *Surgery* 1967; 62:807
- ²⁹ Ross JK. Mitral valve replacement with the inverted aortic valve homograft. *Br Heart J.* 1969;31(6):796
- ³⁰ Angell WW, Iben AB, Gianelly R, Shumway NE. Aortic homografts for mitral valve replacement. *Circulation.* 1969 May;39(5 Suppl 1):I39-45

- ³¹ Oh W, Somerville J, Ross DN, Ross KJ, Emanuel R. Mitral valve replacement with preserved cadaveric aortic homografts. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1973 May;65(5):712-21
- ³² Hubka M, Siska K, Holec V. Replacement of the mitral valve with an aortic valve homograft implanted into the left atrium. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1967 Feb;53(2):260-7
- ³³ Hubka M, Holec V, Slezak J, Sventekova A. Experimental replacement of the mitral valve using an aortic valve homograft. *Rozhl Chir*. 1967 Mar;46(3):184-95
- ³⁴ Maliarikova O, Hubka M, Simkovic I, Smrecansky V. Congenital mitral valve stenosis treated by an aortic valve homograft. *Bratisl Lek Listy*. 1973;60(6):724-30
- ³⁵ Knott-Craig CJ, Elkins RC, Stelzer PL, Randolph JD, McCue C, Wright PA, Lane MM. Homograft replacement of the aortic valve and root as a functional unit. *Ann Thorac Surg*. 1994 Jun;57(6):1501-5; discussion 1505-6.
- ³⁶ Daicoff GR, Botero LM, Quintessenza JA. Allograft replacement of the aortic valve versus the miniroot and valve. *Ann Thorac Surg*. 1993 Apr;55(4):855-8; discussion 859.
- ³⁷ Penta A, Qureshi S, Radley-Smith R, Yacoub MH. Patient status 10 or more years after „fresh“ homograft replacement of the aortic valve. *Circulation*. 1984 Sep;70(3 Pt 2):1182-6.
- ³⁸ Ali A, Abu-Omar Y, Patel A, Sheikh AY, Ali Z, Saeed A, Akhtar A, Athanasiou T, Pepper J. Propensity analysis of survival after subcoronary or root replacement techniques for homograft aortic valve replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2009 Feb;137(2):334-41.
- ³⁹ Ali A, Abu-Omar Y, Patel A, Ali Z, Sheikh AY, Akhtar A, Pavlovic A, Theodorou P, Athanasiou T, Pepper J. Valve failure following homograft aortic valve replacement: does implantation technique have an effect? *Eur Heart J*. 2008 Jun;29(11):1454-62. Epub 2008 May 2.
- ⁴⁰ Eriksson MJ, Kallner G, Rosfors S, et al: Hemodynamic performance of cryopreserved aortic homograft valves during midterm follow-up. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32:1002.
- ⁴¹ Hasegawa J, Kitamura S, Taniguchi S, et al: Comparative rest and exercise hemodynamics of allograft and prosthetic valves in the aortic position. *Ann Thorac Surg* 1997; 64:1753.
- ⁴² O'Brien MF, Harrocks S, Stafford EG, et al: The homograft aortic valve: a 29-year, 99.3% follow up of 1,022 valve replacements. *J Heart Valve Dis* 2001; 10:334
- ⁴³ Langley SM, McGuirk SP, Chaudhry MA, et al: Twenty-year follow-up of aortic valve replacement with antibiotic sterilized homografts in 200 patients. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 11:28.
- ⁴⁴ Lund O, Chandrasekaran V, Grocott-Mason R, et al: Primary aortic valve replacement with allografts over twenty-five years: valve-related and procedure related determinants of outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 117:77.

-
- ⁴⁵ Saito A, Motomura N, Kakimi K, Narui K, Noguchi N, Sasatsu M, Kubo K, Koezuka Y, Takai D, Ueha S, Takamoto S. Vascular allografts are resistant to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* through indoleamine 2,3-dioxygenase in a murine model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008 Jul;136(1):159-67. Epub 2008 May 22.
- ⁴⁶ Haydock D, Barratt-Boyes B, Macedo T, et al: Aortic valve replacement for active infective endocarditis in 108 patients: a comparison of free-hand allograft valves with mechanical prostheses and bioprostheses. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992; 103:130.
- ⁴⁷ McGiffin DC, Galbraith AJ, McLachlan GJ, Stower RE, Wong ML, Stafford EG, Gardner MA, Pohlner PG, O'Brien MF. Aortic valve infection. Risk factors for death and recurrent endocarditis after aortic valve replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992 Aug;104(2):511-20.
- ⁴⁸ Ross DN, Somerville J. Correction of pulmonary atresia with a homograft aortic valve. *Lancet.* 1966 Dec 31;2(7479):1446-7.
- ⁴⁹ Brock L. Long-term degenerative changes in aortic segment homografts, with particular reference to calcification. *Thorax* 1968;23:249-255
- ⁵⁰ Angell JD, Christopher BS, Hawtrey O, Angell WM. A fresh, viable human heart valve bank: sterilization, sterility testing, and cryogenic preservation. *Transplant Proc.* 1976 Jun;8(2 Suppl 1):139-47.
- ⁵¹ Moodie DS, Mair DD, Fulton RE, Wallace RB, Danielson GK, McGoon DC. Aortic homograft obstruction. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1976 Oct;72(4):553-61.
- ⁵² Saravalli OA, Somerville J, Jefferson KE. Calcification of aortic homografts used for reconstruction of the right ventricular outflow tract. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1980 Dec;80(6):909-20.
- ⁵³ Livi U, Abdulla AK, Parker R, Olsen EJ, Ross DN. Viability and morphology of aortic and pulmonary homografts. A comparative study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1987 May;93(5):755-60.
- ⁵⁴ Agarwal KC, Edwards WD, Mair DD, Julsrud PR, Seward JB, Danielson GK, Feldt RH. Severe fibrotic obstruction of Hancock conduit after Fontan operation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1982 May;83(5):791-4.
- ⁵⁵ Jonas RA, Freed MD, Mayer JE Jr, Castaneda AR. Long-term follow-up of patients with synthetic right heart conduits. *Circulation.* 1985 Sep;72(3 Pt 2):1177-83.
- ⁵⁶ Selamet Tierney ES, Gersony WM, Altmann K, Solowiejczyk DE, Bevilacqua LM, Khan C, Krongrad E, Mosca RS, Quaegebeur JM, Apfel HD. Pulmonary position cryopreserved homografts: durability in pediatric Ross and non-Ross patients. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005 Aug;130(2):282-6.

-
- ⁵⁷ Brown JW, Ruzmetov M, Rodefeld MD, Vijay P, Turrentine MW. Right ventricular outflow tract reconstruction with an allograft conduit in non-ross patients: risk factors for allograft dysfunction and failure. *Ann Thorac Surg.* 2005 Aug;80(2):655-63; discussion 663-4.
- ⁵⁸ Hawkins JA, Bailey WW, Dillon T, et al. Midterm results with cryopreserved allograft valved conduits from the right ventricle to the pulmonary arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992;104:910-916.
- ⁵⁹ Bando K, Danielson GK, Schaff HV, et al. Outcome of pulmonary and aortic homografts for right ventricular outflow tract reconstruction. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995;109:509-518.
- ⁶⁰ Stark J, Bull C, Stajevic M, et al. Fate of subpulmonary homograft conduits: determinants of late homograft failure. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998;115:506-516.
- ⁶¹ Niwaya K, Knott-Craig CJ, Lane MM, et al. Cryopreserved homograft valves in the pulmonary position: risk analysis for intermediate-term failure. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;117:141-147.
- ⁶² Albert JD, Bishop DA, Fullerton DA, et al. Conduit reconstruction of the right ventricular outflow tract: lessons learned in a 12 year experience. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993;106:228-235.
- ⁶³ Wells WJ, Arroyo H Jr, Bremner RM, Wood J, Starnes VA. Homograft conduit failure in infants is not due to somatic outgrowth. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002 Jul;124(1):88-96.
- ⁶⁴ Tweddell JS, Pelech AN, Frommelt PC, Mussatto KA, Wyman JD, Fedderly RT, Berger S, Frommelt MA, Lewis DA, Friedberg DZ, Thomas JP Jr, Sachdeva R, Litwin SB. Factors affecting longevity of homograft valves used in right ventricular outflow tract reconstruction for congenital heart disease. *Circulation.* 2000 Nov 7;102(19 Suppl 3):III130-5.
- ⁶⁵ Boethig D, Thies WR, Hecker H, Breymann T. Mid term course after pediatric right ventricular outflow tract reconstruction: a comparison of homografts, porcine xenografts and Contegras. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005 Jan;27(1):58-66.
- ⁶⁶ Ministerstvo zdravotnictví ČR: Zákon č. 285/2002 Sb. ze dne 30. května 2002 o darování, odběrech a transplantacích tkání a orgánů a o změně některých zákonů (t. zv. „Transplantační zákon“). *Sbírka zákonů ČR No. 285/2002, částka 103, s. 6050.*
- ⁶⁷ Ministerstvo zdravotnictví České republiky: Zákon 296/2008 Sb o zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání a buněk určených k použití u člověka a o změně souvisejících zákonů (t. zv. „Zákon o lidských tkáních a buňkách“)
- ⁶⁸ Špatenka J, Honěk T, Kostelka M, Hučín B, Fišer B., Hájek T, Povýšilová V, Kobyłka P. Harvesting the heart for preparation of heart valve allografts. *Rozhl Chir* 1997; 76: 113-7.

- ⁶⁹ Špatenka J., Kostelka M., Kobyłka P., Hučín B., Honěk T., Lochman O., Hájek T., Tláškal T., Povýšilová V., Fišer B. Preparation, storage, transportation and use of heart valves for allotransplantation. *Rozhl Chir* 1997;76:118-25.
- ⁷⁰ Slížová D, Krs O, Pospíšilová B. Alternative method of rapid drying vascular specimens for scanning electron microscopy. *J Endovasc Ther.* 2003 Apr;10(2):285-7.
- ⁷¹ Krs O, Burkert J, Slizova D, Kobyłka P, Špatenka J. Allograft semilunar cardiac valves processing and cryopreservation – morphology in scanning electron microscope. *Cell Tissue Bank.* 2006;7(3):167-73.
- ⁷² Hammon JW Jr, O'Sullivan MJ, Oury J, Fosburg RG. Allograft cardiac valves. A view through the scanning electron microscope. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1974 Sep;68(3):352-60.
- ⁷³ Nicosia MA, Cochran RP, Einstein DR, Rutland CJ, Kunzelman KS. A coupled fluid-structure finite element model of the aortic valve and root. *J Heart Valve Dis.* 2003 Nov;12(6):781-9.
- ⁷⁴ Špatenka J., Krs O., Burkert J., Slížová D., Kobyłka P.: Allograft semilunar cardiac valves processing and cryopreservation – morphology in scanning electron microscope. *Advances in Tissue Engineering and Biology of Heart Valves*, Florencie, Itálie, 15. – 18. 9. 2004, Sborník abstrakt str. 72.
- ⁷⁵ Koolbergen DR, Hazekamp MG, de Heer E, Bruggemans EF, Huysmans HA, Dion RA, Bruijn JA. The pathology of fresh and cryopreserved homograft heart valves: an analysis of forty explanted homograft valves. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002 Oct;124(4):689-97.
- ⁷⁶ Stadler P, Sebesta P, Klika T, Sedivy P, Slizova D, Krs O. Allografts in the vascular surgery. *Rozhl Chir.* 2005 Jul;84(7):350-5.
- ⁷⁷ Páral J, Ferko A, Měřická P, Slížová D, Nozicka J, Chovanec V, Raupach J.: Preservace žilních štěpů. *Rozhl. Chir.*, 2000, 79 (6), 244-249
- ⁷⁸ Jashari R, Tabaku M, Van Hoeck B, Cochéz C, Callant M, Vanderkelen A.: Decontamination of heart valve and arterial allografts in the European Homograft Bank (EHB): comparison of two different antibiotic cocktails in low temperature conditions. *Cell Tissue Bank.* 2007;8(4):247-55
- ⁷⁹ Schenke-Layland K, Madershahian N, Riemann I, Starcher B, Halbhuber KJ, König K, Stock UA. Impact of cryopreservation on extracellular matrix structures of heart valve leaflets. *Ann Thorac Surg* 2006; 81:918-927.
- ⁸⁰ Lupinetti FM, Tsai TT, Kneebone JM. Endothelial cell replication in an *in vivo* model of aortic allografts. *Ann Thorac Surg.* 1993 Aug;56(2):237-41.
- ⁸¹ Yacoub M, Kittle CF. Sterilization of valve homografts by antibiotic solutions. *Circulation.* 1970 May;41(5 Suppl):II29-32.
- ⁸² O'Brien MF, McGiffin DC, Stafford EG, Gardner MA, Pohlner PF, McLachlan GJ, Gall K, Smith S, Murphy E. Allograft aortic valve replacement: long-term comparative clinical

analysis of the viable cryopreserved and antibiotic 4 degrees C stored valves. *J Card Surg.* 1991 Dec;6(4 Suppl):534-43.

⁸³ van der Kamp AW, Visser WJ, van Dongen JM, Nauta J, Galjaard H. Preservation of aortic heart valves with maintenance of cell viability. *J Surg Res.* 1981 Feb;30(1):47-56.

⁸⁴ Daly RC, Orszulak TA, Schaff HV, McGovern E, Wallace RB. Long term results of aortic valve replacement with nonviable homografts. *Circulation* 84: III81-8

⁸⁵ Matsuki O, Robles A, Gibbs S, Bodnar E, Ross DN. Long-term performance of 555 aortic homografts in the aortic position. *Ann Thorac Surg.* 1988 Aug;46(2):187-91.

⁸⁶ Ross D, Yacoub MH. Homograft replacement of the aortic valve. A critical review. *Prog Cardiovasc Dis.* 1969 Jan;11(4):275-93.

⁸⁷ Yacoub M, Rasmi NR, Sundt TM, Lund O, Boyland E, Radley-Smith R, Khaghani A, Mitchell A. Fourteen-year experience with homovital homografts for aortic valve replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995 Jul;110(1):186-93; discussion 193-4.

⁸⁸ Mitchell RN, Jonas RA, Schoen FJ. Structure-function correlations in cryopreserved allograft cardiac valves. *Ann Thorac Surg.* 1995 Aug;60(2 Suppl):S108-12; discussion S113.

⁸⁹ Fischlein T, Schutz A, Uhlig A, Frey R, Krupa W, Babic R, Thiery J, Reichart B. Integrity and viability of homograft valves. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1994;8(8):425-30.

⁹⁰ O'Brien MF, Johnson N, Stafford EG, et al. A study of the cells in the explanted viable cryopreserved allograft valve. *J Cardiac Surg* 1988;3(Suppl):279-87.

⁹¹ al-Janabi N, Gonzalez-Lavin L, Neirotti R, Ross DN. Viability of fresh aortic valve homografts: a quantitative assessment. *Thorax.* 1972 Jan;27(1):83-6.

⁹² van der Kamp AW, Nauta J. Fibroblast function and the maintenance of the aortic-valve matrix. *Cardiovasc Res.* 1979 Mar;13(3):167-72.

⁹³ Ferrans VJ, Spray TL, Billingham ME, Roberts WC. Structural changes in glutaraldehyde-treated porcine heterografts used as substitute cardiac valves. Transmission and scanning electron microscopic observations in 12 patients. *Am J Cardiol.* 1978 Jun;41(7):1159-84.

⁹⁴ Gonzalez-Lavin L, Spotnitz AJ, Mackenzie JW, Gu J, Gadi IK, Gullo J, Boyd C, Graf D. Homograft valve durability: host or donor influence? *Heart Vessels.* 1990;5(2):102-6.

⁹⁵ Hazekamp MG, Koolbergen DR, Braun J, Sugihara H, Cornelisse CJ, Goffin YA, et al. In situ hybridization: a new technique to determine the origin of fibroblasts in cryopreserved aortic homograft valve explants. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995;110:248-57.

⁹⁶ Koolbergen DR, Hazekamp MG, Kurvers M, de Heer, Cornelisse CJ, Huysmans HA, et al. Tissue chimerism in cryopreserved homograft valve explants demonstrated by in situ hybridization. *Ann Thorac Surg.* 1998;66:S225-32.

- ⁹⁷ Armiger LC. Postimplantation leaflet cellularity of valve homografts: are donor cells beneficial or detrimental? *Ann Thorac Surg* 1998;66(Suppl):233-5.
- ⁹⁸ Elkins RC, Dawson PE, Goldstein S, Walsh SP, Black KS. Decellularized human valve allografts. *Ann Thorac Surg*. 2001 May;71(5 Suppl):S428-32.
- ⁹⁹ Lang SJ, Giordano MS, Cardon-Cardo C, Summers BD, Staiano-Coico L, Hajjar DP. Biochemical and cellular characterization of cardiac valve tissue after cryopreservation or antibiotic preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1994 Jul;108(1):63-7.
- ¹⁰⁰ Feng XJ, van Hove CE, Mohan R, Andries L, Rampart M, Herman AG, Walter PJ. Improved endothelial viability of heart valves cryopreserved by a new technique. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1992;6(5):251-5.
- ¹⁰¹ Villanueva AG, Farber HW, Rounds S, Goldstein RH. Stimulation of fibroblast collagen and total protein formation by an endothelial cell-derived factor. *Circ Res*. 1991 Jul;69(1):134-41.
- ¹⁰² Feng XJ, van Hove CE, Mohan R, Walter PJ, Herman AG. Effects of different antibiotics on the endothelium of the porcine aortic valve. *J Heart Valve Dis*. 1993 Nov;2(6):694-704.
- ¹⁰³ Armiger LC. Viability studies of human valves prepared for use as allografts. *Ann Thorac Surg*. 1995 Aug;60(2 Suppl):S118-20.
- ¹⁰⁴ Hu J, Gilmer L, Hopkins R, Wolfenbarger L Jr. Assessment of cellular viability in cardiovascular tissue as studied with 3Hproline and 3HInulin. *Cardiovasc Res*. 1990 Jul;24(7):528-31.
- ¹⁰⁵ Aguirregoicoa V, Kearney JN, Davies GA, Gowland G. Effects of antifungals on the viability of heart valve cusp derived fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 1989 Dec;23(12):1058-61.
- ¹⁰⁶ Niwaya K, Sakaguchi H, Kawachi K, Kitamura S. Effect of warm ischemia and cryopreservation on cell viability of human allograft valves. *Ann Thorac Surg*. 1995 Aug;60(2 Suppl):S114-7.
- ¹⁰⁷ McGregor CG, Bradley JF, McGee JO, Wheatley DJ. Viability in human heart valves prepared for grafting. *Cardiovasc Res*. 1976 May;10(3):394-7.
- ¹⁰⁸ Messier RH Jr, Domkowski PW, Aly HM, Jones JL, Hilbert SL, Crescenzo DG, Abd-Elfattah AS, Wallace RB, Bass BL, Hopkins RA. Adenine nucleotide depletion in cryopreserved human cardiac valves: the "stunned" leaflet interstitial cell population. *Cryobiology*. 1995 Jun;32(3):199-208.
- ¹⁰⁹ Domkowski PW, Messier RH Jr, Crescenzo DG, Aly HS, Abd-Elfattah AS, Hilbert SL, Wallace RB, Hopkins RA. Preimplantation alteration of adenine nucleotides in cryopreserved heart valves. *Ann Thorac Surg*. 1993 Feb;55(2):413-9.

¹¹⁰ St Louis J, Corcoran P, Rajan S, Conte J, Wolfinbarger L, Hu J, Lange PL, Wang YN, Hilbert SL, Analoui A, et al. Effects of warm ischemia following harvesting of allograft cardiac valves. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1991;5(9):458-64; discussion 465.

¹¹¹ Crescenzo DG, Hilbert SL, Messier RH Jr, Domkowski PW, Barrick MK, Lange PL, Ferrans VJ, Wallace RB, Hopkins RA. Human cryopreserved homografts: electron microscopic analysis of cellular injury. *Ann Thorac Surg.* 1993 Jan;55(1):25-30; discussion 30-1.

¹¹² Suh H, Lee JE, Park JC, Han DW, Yoon CS, Park YH, Cho BK. Viability and enzymatic activity of cryopreserved porcine heart valve. *Yonsei Med J.* 1999 Apr;40(2):184-90.

¹¹³ Pompilio G, Polvani GL, Rossoni G, Porqueddu M, Berti F, Barajon I, Petruccioli MG, Guarino A, Aguggini G, Biglioli P, Sala A. Effects of warm ischemia on valve endothelium. *Ann Thorac Surg.* 1997 Mar;63(3):656-62.

¹¹⁴ Yankah AC, Hetzer R. Procurement and viability of cardiac valve allografts. In: Yankah AC, Hetzer R, Miller DC, Ross DN et al. *Cardiac Valve Allografts 1962-1987.* New York:Springer-Verlag, pp-23-26

¹¹⁵ Mochtar B, van der Kamp AW, Roza-de Jongh EJ, Nauta J. Cell survival in canine aortic heart valves stored in nutrient medium. *Cardiovasc Res.* 1984 Aug;18(8):497-501.

¹¹⁶ al-Janabi N, Gibson K, Rose J, Ross DN. Protein synthesis in fresh aortic and pulmonary valve allografts as an additional test for viability. *Cardiovasc Res.* 1973 Mar;7(2):247-50.

¹¹⁷ Štádlér P, Slížová D, Krs O, Zdráhal P, Vojáček J. Microscopic study of vascular allografts. *Cor Vasa* 2005;47(1):10-13.

¹¹⁸ Feng XJ, Van Hove CE, Walter PJ, Herman AG. Effects of storage temperature and fetal calf serum on the endothelium of porcine aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996 Jan;111(1):218-30.

¹¹⁹ Kashima I, Yozu R, Shin H, Yamada T, Hata J, Kawada S. Effect of storage temperature on cell viability in cryopreserved canine aortic, pulmonic, mitral, and tricuspid valve homografts. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999 Apr;47(4):153-7.

¹²⁰ Rendal Vazquez ME, Roman TD, Cuesta MG, Botta CZ, Ibanez JS, Diaz SP, Nunez CA. Viability and histologic structure of porcine valves after cryopreservation. *Ann Thorac Surg.* 2004 Jan;77(1):186-90.

¹²¹ Gall KL, Smith SE, Willmette CA, O'Brien MF. Allograft heart valve viability and valve-processing variables. *Ann Thorac Surg.* 1998 Apr;65(4):1032-8.

¹²² Karow AM, Legy DE. *Organ preservation for transplantation.* New York:Marcel Dekker, 1981, p118

¹²³ Lange PL, Hopkins RA. Allograft valve banking. Techniques and technology. In: Hopkins RA et al. *Cardiac reconstruction with allografts.* Springer-Verlag, New York, 1989, pp.37-64.

-
- ¹²⁴ Messier RH Jr, Bass BL, Domkowski PW, Hopkins RA. Interstitial cellular and matrix restoration of cardiac valves after cryopreservation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999 Jul;118(1):36-49.
- ¹²⁵ Lupinetti FM, Tsai TT, Kneebone JM, Bove EL. Effect of cryopreservation on the presence of endothelial cells on human valve allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993 Nov;106(5):912-7.
- ¹²⁶ Mitchell RN, Jonas RA, Schoen FJ. Pathology of explanted cryopreserved allograft heart valves: comparison with aortic valves from orthotopic heart transplants. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998 Jan;115(1):118-27.
- ¹²⁷ Matia, I, Adamec, M, Janousek, L, Lipar, K and Viklicky, O: Fresh arterial grafts as conduits for vascular reconstructions in transplanted patients. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 32:5, 549-56 (2006)
- ¹²⁸ Matia, I, Adamec, M, Varga, M, Janousek, L, Lipar, K and Viklicky, O: Aortoiliac reconstruction with allograft and kidney transplantation as a one-stage procedure: long term results. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 35:3, 353-7 (2008)
- ¹²⁹ Longmore DB, Lockey E, Ross DN, Pickering BN. The preparation of aortic valve homografts. *Lancet* 1966;2:463-4.
- ¹³⁰ Beech PM, Bowman FO Jr, Kaiser GA, Malm JR. Frozen irradiated aortic valve homografts. *N Y State J Med* 1973;19:651-4.
- ¹³¹ Kinsky SC. Antibiotic interaction with model membranes. *Annu Rev Pharmacol* 10: 119-142.
- ¹³² Woloszyn D, Johnson D, Yacoub MH. Homograft viability, assessment and significance. In: Yankah AC, Yacoub MH, Hetzer R. *Cardiac valve allografts*, Springer, 1997.
- ¹³³ Gall KL, Smith SE, Willmette CA, O'Brien MF. Allograft heart valve viability and valve-processing variables. *Ann Thorac Surg.* 1998 Apr;65(4):1032-8.
- ¹³⁴ Verghese S, Sudha P, Padmaja P, et al. Cryopreservation of cardiac homografts. *Indian Heart J* 1999;51:301-6.
- ¹³⁵ Armiger LC. Postimplantation leaflet cellularity of valve homografts: are donor cells beneficial or detrimental? *Ann Thorac Surg* 1998;66(Suppl):233-5.
- ¹³⁶ Gall K, Smith S, Willmette C, Wong M, O'Brien M. Allograft heart valve sterilization: a six-year in-depth analysis of a twenty-five-year experience with low-dose antibiotics. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995 Sep;110(3):680-7.
- ¹³⁷ O'Brien MF, Stafford G, Gardner M, Pohlner P, McGiffin D, Johnston N, Brosnan A, Duffy P. The viable cryopreserved allograft aortic valve. *J Card Surg.* 1987 Mar;2(1 Suppl):153-67.

- ¹³⁸ Yankah AC, Feller AC, Thiede A, Westphal E, Bernard A. Identification of surface antigen of endothelial cells of fresh preserved heart allografts. *Thorac Cardiovasc Surg*, 1986;34, Suppl. 1-10
- ¹³⁹ Ross D.N. Evolution of the homograft valve. *Ann Thorac Surg* 1995;59:565-567.
- ¹⁴⁰ McNally R.T., Brockbank K.G. The correlation between improved cellular viability and clinical performance in 5,000 cryopreserved human heart valves. *ASAIO Trans* 1991;37:M355-356.
- ¹⁴¹ Johnson D.L., Sloan C., O'Halloran A., Yacoub M.H. Effect of antibiotic pretreatment on immunogenicity of human heart valves and component cells. *Ann Thorac Surg* 1998;66(Suppl):S221
- ¹⁴² Motomura N., Imakita M., Yutani C., et al. Histologic modification by cryopreservation in rat aortic allografts. *Ann Thorac Surg* 1995;60(Suppl):S168
- ¹⁴³ Cochran R.P., Kunzelman K.S. Cryopreservation does not alter antigenic expression of aortic allografts. *J Surg Res* 1989;46:597-599.
- ¹⁴⁴ Kneebone J.M., Lupinetti F.M. Procollagen synthesis by fresh and cryopreserved rat pulmonary valve grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120:596-603.
- ¹⁴⁵ Rajani B., Mee R.B., Ratliff N.B. Evidence for rejection of homograft cardiac valves in infants. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115:111-117.
- ¹⁴⁶ Vogt P.R., Stallmach T., Niederhauser U., et al. Explanted cryopreserved allografts: a morphological and immunohistochemical comparison between arterial allografts and allograft heart valves from infants and adults. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999;15:639-645.
- ¹⁴⁷ Legare J.F., Issekutz T., Lee T.D., Hirsch G. CD8+ T lymphocytes mediate destruction of the vascular media in a model of chronic rejection. *Am J Pathol* 2000;157:859-865.
- ¹⁴⁸ Motomura N., Imakita M., Yutani C., et al. Histological change in cryopreserved rat aortic allograft. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 1995;36:53-60.
- ¹⁴⁹ Green M.K., Walsh M.D., Dare A., et al. Histologic and immunohistochemical responses after aortic valve allografts in the rat. *Ann Thorac Surg* 1998;66(Suppl):S216.
- ¹⁵⁰ Moustapha A., Ross D.B., Bittira B., et al. Aortic valve grafts in the rat: evidence for rejection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;114:891-902.
- ¹⁵¹ Hawkins J.A., Bailey W.W., Dillon T., Schwartz D.C. Midterm results with cryopreserved allograft valved conduits from the right ventricle to the pulmonary arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;104:910-916.
- ¹⁵² Clarke D.R., Campbell D.N., Hayward A.R., Bishop D.A. Degeneration of aortic valve allografts in young recipients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;105:934-942.

- ¹⁵³ Yankah A.C., Alexi-Meskishvili V., Weng Y., et al. Accelerated degeneration of allografts in the first two years of life. *Ann Thorac Surg* 1995;60(Suppl):S71.
- ¹⁵⁴ Shaddy R.E., Hunter D.D., Osborn K.A., et al. Prospective analysis of HLA immunogenicity of cryopreserved valved allografts used in pediatric heart surgery. *Circulation* 1996;94:1063-1067.
- ¹⁵⁵ Welters M.J., Oei F.B., Vaessen L.M., et al. Increased numbers of circulating donor-specific T helper lymphocytes after human heart valve transplantation. *Clin Exp Immunol* 2001;124:353-358.
- ¹⁵⁶ Shaddy R.E., Tani L.Y., Sturtevant J.E., et al. Effects of homograft blood type and anatomic type on stenosis, regurgitation and calcium in homografts in the pulmonary position. *Am J Cardiol* 1992;70:392-393.
- ¹⁵⁷ Schütz A. Immunology of homograft valve. In: Yankah AC, Yacoub MH, Hetzer R. *Cardiac Valve Allografts*. Springer, 1997.
- ¹⁵⁸ Schutz A, Fischlein T, Breuer M, Haushofer M, Uhlig A, Detter C, Kemkes BM, Hammer C, Reichart B. Cytoimmunological monitoring after homograft valve replacement. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1994;8(11):609-12.
- ¹⁵⁹ Reichenspurner H, Hammer C. Cytoimmunologic monitoring after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 1994 Sep-Oct;13(5):876.
- ¹⁶⁰ Kadner A., Chen R.H., Mitchell R.N., Adams D.H. Hemograft crossmatching is unnecessary due to the absence of blood group antigens. *Ann Thorac Surg* 2001;71(Suppl):S349
- ¹⁶¹ Hoekstra F., Knoop C., Jutte N., et al. Effect of cryopreservation and HLA-DR matching on the cellular immunogenicity of human cardiac valve allografts. *J Heart Lung Transplant* 1994;13:1095-1098.
- ¹⁶² Hoekstra F., Knoop C., Aghai Z., et al. Stimulation of immune-competent cells in vitro by human cardiac valve-derived endothelial cells. *Ann Thorac Surg* 1995;60(Suppl):S131
- ¹⁶³ Hoekstra F., Knoop C., Vaessen L., et al. Donor-specific cellular immune response against human cardiac valve allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;112:281-286.
- ¹⁶⁴ Zhao X.M., Green M., Frazer I.H., et al. Donor-specific immune response after aortic valve allografting in the rat. *Ann Thorac Surg* 1994;57:1158-1163.
- ¹⁶⁵ Smith J.D., Ogino H., Hunt D., et al. Humoral immune response to human aortic valve homografts. *Ann Thorac Surg* 1995;60(Suppl):S127.
- ¹⁶⁶ Hoekstra F., Witvliet M., Knoop C., et al. Donor-specific anti-human leukocyte antigen class I antibodies after implantation of cardiac valve allografts. *J Heart Lung Transplant* 1997;16:570-572.

¹⁶⁷ Legare J.F., Ross D.B., Issekutz T.B., et al. Prevention of allograft heart valve failure in a rat model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122:310-317.

¹⁶⁸ Yankah A.C., Wottge H.U., Muller-Ruchholtz W. Short-course cyclosporin A therapy for definite allograft valve survival immunosuppression in allograft valve operations. *Ann Thorac Surg* 1995;60(Suppl):S146.

¹⁶⁹ Elkins R.C., Lane M.M., Capps S.B., et al. Humoral immune response to allograft valve tissue pretreated with an antigen reduction process. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2001;13(Suppl 1):82.

¹⁷⁰ Steinhoff G., Stock U., Karim N., et al. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue. *Circulation* 2000;102(Suppl 3):III50.

¹⁷¹ Wagner E., Roy R., Marois Y., et al. Fresh venous allografts in peripheral arterial reconstruction in dogs. Effects of histocompatibility and of short-term immunosuppression with cyclosporine A and mycophenolate mofetil. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:1732-1744.

¹⁷² Schmitz-Rixen T., Megerman J., Colvin R.B., et al. Immunosuppressive treatment of aortic allografts. *J Vasc Surg* 1988;7:82-92.

¹⁷³ Vischjager M., Van Gulik T.M., De Kleine R.H., et al. Experimental arterial allografting under low and therapeutic dosages of cyclosporine for immunosuppression. *Transplantation* 1996;61:1138-1142.

¹⁷⁴ Shaddy R.E., Lambert L.M., Fuller T.C., et al. Prospective randomized trial of azathioprine in cryopreserved valved allografts in children. *Ann Thorac Surg* 2001;71:43-48.