

Univerzita Karlova v Praze
2. lékařská fakulta
Studijní program: Experimentální chirurgie



MUDr. Jaroslav Hlubocký

Mechanické vlastnosti mitrálních alograftů

Mechanical properties of mitral allografts

disertační práce

Školitel: prim. MUDr. Jaroslav Špatenka, CSc.
Transplantační centrum a Kardiochirurgická klinika FN Motol a 2. Lékařská fakulta UK, Praha 5

Konzultanti: doc. MUDr. Jan Vojáček, PhD.
Kardiochirurgická klinika FN Hradec Králové a Lékařská fakulta UK v Praze Hradec Králové

prim. MUDr. Aleš Mokráček, CSc.
*Kardiochirurgické oddělení Nemocnice České Budějovice, a.s.
Kardiochirurgická klinika 2. Lékařská fakulta UK a FN Motol, Praha 5,
Centrum experimentální medicíny IKEM Praha.*

Praha 2011

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje.

Současně dávám svolení k tomu, aby tato závěrečná práce byla archivována v Ústavu vědeckých informací 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou přednáškovou nebo publikační aktivitu, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v Digitálním repozitáři Univerzity Karlovy v Praze (<http://repozitar.cuni.cz>). Práce bude zpřístupněna pouze v rámci Univerzity Karlovy v Praze.

V Praze, 6.9.2011

MUDr. Jaroslav Hlubocký

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Na prvním místě bych chtěl poděkovat své rodině, bez jejíž pomoci a obětavosti by nebylo vůbec myslitelné v daném čase práci dokončit.

Rád bych poděkoval svému školiteli prim. MUDr. Jaroslavu Špatenkovi, CSc. a svým konzultantům doc. MUDr. Janu Vojáčkovi, PhD. a prim. MUDr. Aleši Mokráčkovi, CSc.

Dr. Špatenka se velmi zasloužil o můj zájem o chlopenní chirurgii. Pod jeho vedením jsem se seznámil se zpracováním a použitím aortálních a plicnicových alograftů v klinické praxi. Je dodnes neocenitelným pomocníkem při implantaci aortálních alograftů a má velkou zásluhu při zavádění Rossovy operace na řadě pracovišť v České republice a na Slovensku.

Doc. Vojáček, jako dlouholetý přítel a chirurgický učitel, mi velmi usnadnil orientaci v dané problematice.

Má práce je součástí komplexního výzkumného experimentálního projektu prim. Mokráčka vedoucího k použití mitrálních alograftů v klinické praxi. Moje práce navazuje na doktorandskou práci doc. Vojáčka a dr. Burkerta.

Obrovskou zásluhu mají inženýři z katedry mechaniky Západočeské univerzity v Plzni, ing. Vít Nováček, PhD., ing. Petra Kochová, PhD. a ing. Jan Klepáček, PhD. Jejich teoretické znalosti i experimentální zázemí umožnily realizaci experimentu. Tento tým má velké zkušenosti s výzkumem mechanických vlastností biologických materiálů.

Dále bych chtěl poděkovat někdejšímu přednostovi dospělé kardiologie Fakultní nemocnice v Praze-Motole MUDr. Petrovi Pavlovi, CSc., pod jehož vedením jsem práci započal a svému současnému přednostovi II. chirurgické kliniky kardiovaskulární chirurgie Všeobecné fakultní nemocnice a 1. LF UK v Praze prof. MUDr. Jaroslavu Lindnerovi, CSc., který mi velmi pomohl práci úspěšně dokončit. Jsem rád, že oba zároveň mohu považovat nejen za učitele kardiologie, ale i za přátele.

Vlastní experimentální práce na ovčím modelu byla realizována v Centru experimentální medicíny IKEM (přednosta prof. MUDr. Luděk Červenka, CSc., MBA) v rámci experimentálního chirurgického projektu, hodnotícího střednědobé výsledky náhrady trojcípé chlopně mitrálním alograftem – prim. MUDr. Aleš Mokráček, CSc. Grant IGA MZCR č. NR9086-3-2006.

Poděkování rovněž patří firmě Firma Miloš Křeček KK maso - uzeniny, která nám dala bezplatně k dispozici neomezené množství vepřových srdcí se zachovalou mitrální chlopní pro provedení iniciální fáze našeho experimentu.

OBSAH

Prohlášení	1
Poděkování	2
Obsah	4
1. Úvod	7
2. Literární přehled	8
2.1 Stručná historie kardiochirurgie	8
2.2 Fyziologie, patofyziologie a biomechanika srdečních chlopní	12
2.2.1 Aortální chlopeň	13
2.2.2 Mitrální chlopeň	14
2.2.3 Trikuspidální chlopeň	15
2.3 Chlopenní náhrady	15
2.3.1 Mechanické chlopenní náhrady	16
2.3.2 Xenografty	17
2.3.3 Srovnání mechanických chlopenních náhrad a xenograftů	18
2.3.4 Aortální alograft	19
2.3.5 Mitrální alograft	21
2.3.6 Plicnicový autograft	23
2.3.7 Tkáňové inženýrství	25
2.3.8 Perkutánně a transapikálně zaváděné chlopně	27
2.4 Záchovné operace chlopní	28
2.4.1 Záchovné operace mitrální chlopně	28

2.4.2	Záchovné operace aortální chlopně	30
2.4.3	Záchovné operace trikuspidální chlopně	32
2.5	Klinické použití chlopenních alograftů	33
2.5.1	Infekční endokarditida	33
2.6	Dostupnost chlopenních alograftů	40
2.6.1	Kryobiologie srdečních chlopní	41
2.6.2	Metody používané při zpracování chlopenních alograftů v současnosti	42
3.	Cíle vlastní experimentální práce	44
4.	Použitá metodika	46
4.1	Příprava a zpracování mitrálních alograftů	46
4.1.1	Protokol experimentu	46
4.1.2	Odběr mitrálního alograftu	47
4.1.3	Zpracování a kryoprezervace mitrálního alograftu	47
4.1.4	Rozmražení mitrálního alograftu	48
4.2	Metodika experimentu	49
4.2.1	Příprava vzorku před měřením	49
4.2.2	Měřicí zařízení	50
4.2.3	Akvizice dat	51
4.2.4	Maxwellův model	51
4.2.5	Identifikace materiálových parametrů	53
4.2.6	Statistické zpracování	54
5.	Výsledky	56
5.1	Výsledky odběru a zpracování mitrálních alograftů	56
5.2	Naměřené hodnoty	56

5.3	Interpretace výsledků	62
6.	Diskuze	65
6.1	Klinické použití mitrálního alograftu	65
6.1.1	Mitrální alograft v mitrální pozici	65
6.1.2	Mitrální alograft v trikuspidální pozici	67
6.2	Mechanické experimenty s kryoprezervovanými mitrálními alografty	69
6.3	Preconditioning a homogenita měření	73
7.	Závěr vlastní experimentální práce	74
8.	English Summary	75
8.1	Introduction	75
8.2	Materials and Methods	76
8.3	Results	78
8.4	Conclusion	81
9.	Použitá literatura	82

1. ÚVOD

Náhrada srdečních chlopní je prováděna půl století a paralelně jsou vyvíjeny mechanické i biologické chlopní protézy. Ve skupině biologických protéz jsou užívány především komerčně dostupné xenografty, vyrobené z perikardu (hovězí, vepřový, výjimečně koňský) či z vepřových aortálních chlopní. Alternativou xenograftů zůstávají dodnes alografty, produkty tkáňových bank. V současnosti se odhaduje, že z celkového počtu nahrazených chlopní ve světě dostává 49% nemocných mechanickou chlopní protézu, 49% nemocných xenoprotézu a pouze 2% pacientů dostane alotransplantát.

Přestože je historie mitrálních alograftů delší než u alograftů aortálních, jejich použití v klinické praxi bylo sporadické. Nepříliš povzbudivé dlouhodobé výsledky, stále se zlepšující kvalita komerčně dostupných chlopních náhrad a především rozvoj záchovných operací na mitrální chlopni, to vše způsobilo ústup od používání mitrálních alograftů.

Mitrální alografty se ukázaly použitelnými při léčbě infekční endokarditidy trikuspidální chlopně, kde mohou být výhodnou alternativou pro komerčně dostupné chlopní náhrady. Abychom ověřili technické aspekty implantace mitrálního alograftu do trikuspidální pozice, nejprve jsme provedli experiment na ovčím modelu, který potvrdil dobrou střednědobou funkci implantovaného alograftu.^{1,2}

Cílem této práce bylo ověřit, jakým způsobem ovlivňuje proces kryoprezervace mechanické vlastnosti takto ošetřených mitrálních alograftů. Pro jejich kryoprezervaci jsme použili stejný postup, jaký používá specializovaná tkáňová banka transplantačního centra FN Motol v Praze pro ostatní chlopní alografty.

Zatímco ohledně aortálních a plicnicových alograftů existuje několik prací, které se zabývají dopadem jejich zpracování na kvalitu tkáně, data o mitrálních alograftech jsou velmi skromná.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 STRUČNÁ HISTORIE KARDIOCHIRURGIE

Použití alotransplantátů v chirurgické léčbě chlopenních vad úzce souviselo s rozvojem kardiologie. Nad historickým přehledem si můžeme dát do souvislosti vývoj oboru a historii použití alotransplantátů v klinické medicíně.

Rozvoj moderní kardiologie započal po zavedení rutinního používání mimotělního oběhu v klinické praxi.

Chirurgie srdce ale existovala již před érou mimotělního oběhu. První kazuistické práce popisující hlavně řešení bodných poranění orgánů mediastina se objevují koncem 19. století.³ V roce 1908 popsal Trendelenburg embolektomii z plicnicové tepny.⁴ Rozvoj chirurgické léčby poranění srdce a mediastina nastal v období II. světové války, kdy chirurg americké armády Harken popsal v roce 1946 134 případů pacientů s různými poraněními mediastina, perikardu i srdce, kteří přežili operaci.⁵

Před érou mimotělního oběhu se chirurgové rovněž zabývali chirurgickou léčbou vrozených srdečních vad a dokonce i získaného postižení aortální a mitrální chlopně. První operaci vrozené srdeční vady (podvaz Botalovy dučeje) provedl roku 1937 Graybiel. Pacient bohužel zemřel 4. pooperační den na sepsi.⁶ Další operaci vrozené vady úspěšně provedl Crafoord ve Švédsku v roce 1944, jednalo se o resekci koarktace aorty s přímou suturou u 12 letého chlapce.⁷ V roce 1945 provedl Blalock úspěšné přímé spojení levé větve plicnice a levé subklaviální tepny 15 měsíčního dítěte s Fallotovou tetralogií.⁸

Chirurgická léčba získaných chlopenních vad se před érou mimotělního oběhu soustředila především na revmatické stenózy aortální a mitrální chlopně a jejich dilataci různým instrumentariem. Dilataci zúžené aortální chlopně provedl a popsal jako první Tuffier roku 1914,⁹ o několik let později zavřeným způsobem provedl valvulotomii mitrální chlopně Cutler.¹⁰ Tyto výkony se vzhledem k nepříliš dobrým výsledkům nikdy výrazněji nerozšířily a až do 50. let nedošlo v oboru kardiologie k zásadnějšímu rozvoji. Počátkem 50. let Hufnagel vyvinul první mechanickou chlopeň a v experimentu na psech ji implantoval do sestupné hrudní aorty. Tuto chlopeň později použil u 23 pacientů s aortální regurgitací.

Jednalo se o unikátní a jediný soubor pacientů operovaných pro nedomykavost chlopně před érou mimotělního oběhu a vývojem aortálních protéz, které se implantovaly do aortálního anulu.¹¹

V experimentu byl zkoumán i vliv hypotermie při zástavě cirkulace. Bigelow publikoval použití hluboké hypotermie v experimentu na psech v roce 1950.¹² Klinické aplikace se tato technika dočkala o dva roky později, kdy Lewis v hluboké hypotermii uzavřel defekt síňového septa.¹³ Tato technika v éře mimotělního oběhu nenašla mnoho následovníků, byla používána pouze sporadicky v zemích bývalého Sovětského Svazu a v Japonsku. Její teoretický podklad se nadále používá u pacientů, kde je nutné operovat v cirkulační zástavě.

První operaci na otevřeném srdci a mimotělním oběhu provedl Clarence Dennis, který operoval pětiletou dívku v terminální fázi srdečního onemocnění.¹⁴

Princip extrakorporální cirkulace a oxygenace a následně vyvinutí prvních přístrojů pro mimotělní oběh umožnilo obrovský rozmach kardiologie. Mimotělní oběh a principy ochrany myokardu během srdeční zástavy a ischemie umožnily provádět složité operace na otevřeném srdci, korigovat komplexní vrozené srdeční vady, transplantovat srdce event. blok srdce a plíce, řešit poškození hrudní aorty a samozřejmě se tím umožnil rozvoj koronární chirurgie.

Největší zásluha na zavedení mimotělního oběhu do klinické praxe je připisována Gibbonovi, který v roce 1953 jako první úspěšně operoval síňový defekt.^{15, 16} Jedním ze silných stimulů pro práci na vývoji zařízení pro extrakorporální cirkulaci byly neuspokojivé výsledky embolektomií z plicní arterie.¹⁷

Byly vyvíjeny i jiné metody, které umožňovaly operovat na otevřeném srdci. Lillehei publikoval metodu kontrolované zkřížené cirkulace v roce 1954, kdy tímto způsobem odoperoval několik pacientů s vrozenými srdečními vadami.¹⁸ Pochopitelně byla nutná kompatibilita krevní skupiny rodiče a operovaného dítěte.

Rozvoj mimotělního oběhu podnítil výzkum optimální ochrany myokardu při srdeční zástavě, nezbytné pro operace na otevřeném srdci. První experimentální studii s hyperkalemickou srdeční zástavou publikoval v roce 1955 Melrose.¹⁹ Tato technika ale způsobovala nekrózy myokardu, pravděpodobně pro příliš vysokou koncentraci draslíku, proto byly vyvíjeny i další způsoby ochrany myokardu. Mnoho chirurgů používalo techniku normotermické srdeční

ischemie, kdy intermitentně nakládali příčnou svorku. Technika navozené komorové fibrilace je používána sporadicky dodnes.

Koncept hyperkalemické srdeční zástavy se nakonec ukázal jako bezpečný, poté co Gay a spolupracovníci prokázali, že toxicita kalia se výrazně omezí při jeho snížené koncentraci.²⁰ Současně používaný krystaloidní kardioplegický roztok St. Thomas, který je založený na Ringerově roztoku s 16 mmol/l kalia a 16 mmol/l magnesia, popsal po studiu různých kardiologických roztoků Hearse a jeho kolegové v roce 1976.²¹ Dalším pokrokem byl koncept krevní kardioplegie, tento způsob ochrany myokardu výrazně snižoval ischemicko-reperfuční poškození.²² Ačkoliv Melrose v podstatě používal hyperkalemickou krev, klinická aplikace po úpravách koncentrace kalia přišla až o dvacet let později.

Výhody krevní kardioplegie byly zřejmé:²³

- krev zajišťovala oxygenaci myokardu
- zajišťovala vysokou pufrovací kapacitu roztoku
- měla velmi dobré osmotické vlastnosti
- měla fyziologické pH a koncentrace elektrolytů
- obsahovala endogenní antioxidanty a zametače kyslíkových radikálů

V roce 1991 přišel Lichtenstein a jeho kolegové s konceptem teplé (normotermické) krevní kardioplegie. Snaha přiblížit se co nejvíce fyziologické perfuzi myokardu byla logická, publikované výsledky byly přesvědčivé.²⁴ Otázkou zůstává, jak dlouhý je bezpečný ischemický interval u konkrétního pacienta, a jak rozlišit případnou špatnou perfuzi myokardu kardioplegickým roztokem. Vhodným kompromisem se zdá být použití vlažné krevní kardioplegie, která nejlépe redukuje uvolňování kyseliny mléčné po dobu anaerobní ischemie.²⁵

Mimotělní oběh umožnil rozvoj chlopenní chirurgie. První náhrady aortální i mitrální chlopně byly provedeny v roce 1960, v obou případech byla použita kuličková protéza.^{26,27} Ve velmi krátké době se náhrady chlopní staly rutinním výkonem. Mechanické chlopenní protézy zaznamenaly velký úspěch, přesto již v této době byly prováděny experimenty s biologickými chlopenními náhradami, tj. s xenografty a alografty. Jejich vývoj a dobré klinické výsledky postupem času zvyšoval jejich podíl z celkového počtu chlopenních náhrad.

Snaha chirurgů o fyziologické řešení chlopenních vad vedla k rozvoji záchovných operací mitrální, trikuspidální a aortální chlopně. Záchovné operace ukázaly, že mají lepší výsledky než chlopní náhrady. Velkou zásluhu na tom měl francouzský chirurg Carpentier, jehož revoluční přístup k chirurgické léčbě nedomykavosti mitrální chlopně je používán doposud.²⁸

Rozsáhlou oblastí, kterou se zabývá kardiochirurgie, je ischemická choroba srdeční. Podobně jako u vrozených srdečních vad a chorob chlopní se chirurgové pokoušeli léčit toto onemocnění dávno před zavedením mimotělního oběhu do klinické praxe. Ve třicátých letech dvacátého století použil americký chirurg Beck metodu nepřímé revaskularizace myokardu. Vycházel z experimentů, kdy bylo snahou vytvoření kolaterál mezi perikardem, omentem nebo pektorálním svalem a myokardem. Tuto techniku použil u několika pacientů, z nichž někteří udávali po operaci vymizení anginosních potíží.²⁹ Další techniku použil kanadský chirurg Vineberg, který implantoval mamární tepnu do tunelu v myokardu.³⁰ Cílem bylo vytvoření kolaterál s nemocnou věčitou tepnou, vznik takových kolaterál byl potvrzen a operace se používala i v českých zemích.

Pro rozvoj koronární chirurgie až do její současné podoby bylo zásadním přínosem zavedení selektivní angiografie koronárních tepen.³¹ Toto vyšetření, které je i v současnosti zlatým standardem, umožnilo přesně zobrazit morfologii postižení srdečních tepen.

První dokumentovaný aortokoronární bypass byl proveden v roce 1964 Garretem a DeBakeym. U pacienta původně plánovali provedení endarterektomie ramus interventricularis anterior, ale pro příliš difusní postižení se rozhodli provést bypass pomocí vena saphena magna. Tuto operaci publikovali až v roce 1973, kdy měli zdokumentovanou dobrou průchodnost štěpu.³² Levou prsní tepnu (a. thoracica interna) použil jako první leningradský chirurg Kolesov, který svůj soubor pacientů představil v roce 1964.³³ Operace byla provedena cestou levé torakotomie, bez mimotělního oběhu, stejně tak jako bez předoperační angiografie věčitých tepen.

Po dlouhou dobu bylo použití velké safény jako jediného štěpu zlatým standardem. Teprve jednoznačná data z 80. let ukázala, že použití levé prsní tepny jako štěpu na přemostění stenózy především na ramus interventricularis anterior má pozitivní dopad na přežití pacientů po chirurgické revaskularizaci myokardu.^{34, 35, 36} Na potvrzení předpokladu, že použití obou prsních tepen bude mít podobně pozitivní efekt pro průchodnost štěpů a zlepšené přežívání pacientů, bylo potřeba čekat téměř dvacet let. V roce 2004 publikovali Lytle a Blackstone

studii, ve které demonstrovali zlepšené přežívání pacientů v druhé dekádě od operace v případě použití obou prsních tepen.³⁷

V dalších letech dochází k mohutnému rozvoji koronární chirurgie. Její hegemonii přerušil v 90. letech dvacátého století bouřlivý rozvoj katetrizační léčby ischemické choroby srdeční. Tato metoda přináší kromě malé invazivity velké výhody pro pacienty s akutním infarktem myokardu s ST elevacemi. Metoda přímé perkutánní angioplastiky infarktové tepny je nepochybně v současnosti metodou volby. Na druhé straně kardiochirurgie pořád nabízí dlouhodobější průchodnost rekonstrukcí a menší počet opakovaných intervencí.³⁸

Dlouhým vývojem prošla i srdeční transplantace. Od prvních experimentů Carrela a Guthrieho s heterotopickými transplantacemi srdce u psů v roce 1905³⁹ k první transplantaci provedené na člověku uběhlo více než šedesát let. V prosinci 1967 překvapil svět jihoafrický chirurg Barnard první transplantací srdce.⁴⁰ Časné výsledky v této době nebyly uspokojivé a rozvoj transplantologie byl akcelerován až mnohem později. Důležitým postupem pro monitoraci rejekce štěpu se stala transvenosní endomyokardiální biopsie.⁴¹ Opravdový rozvoj transplantací srdce nastal až po zavedení cyklosporinu do klinické praxe, který dramaticky zlepšil přežívání transplantovaných pacientů.⁴²

2.2 FYZIOLOGIE, PATOFYZIOLOGIE A BIOMECHANIKA SRDEČNÍCH CHLOPNÍ

Základní funkcí srdečních chlopní je usměrnění toku krve správným směrem, působí jako jednocestné ventily. Tuto vlastnost musí plnit i chlopenní protézy všech skupin. Další vlastnosti srdečních chlopní souvisejí s jejich anatomii, ze které vyplývají fyziologické mechanismy podílející se především na zmenšení a rozložení stresu na samotné cípy chlopní. Díky tomu většinou překračuje životnost nativních chlopní obvyklou délku života. Mnohé z těchto mechanismů nebyly dodnes plně objasněny a mechanické ani komerčně dostupné biologické chlopenní protézy (xenotransplantáty) nemají většinou ambice tyto další funkce plnit. Důvodem použití chlopenních alotransplantátů je snaha o zachování některých dalších funkčních vlastností chlopní.

2.2.1 AORTÁLNÍ CHLOPEŇ

Na hemodynamických vlastnostech aortální chlopně se podílí celý aortální kořen. Principem dlouhodobé trvanlivosti trojcípé aortální chlopně, která většině populace vydrží po celý život, je symetrický tvar koaptace cípů a interakce mezi nimi a Valsavskými sinými. Valsavské siny mají zásadní význam pro absorpci stresu, kterému jsou cípy aortální chlopně vystaveny v diastole. Pohyby aortálního kořene během srdečního cyklu jsou komplexní. Kromě změn velikosti aortálního kořene a anulu dochází i k rotačním pohybům komisur a aktivním pohybům aortálního anulu, čímž pravděpodobně rovněž dochází ke snižování stresu na samotné cípy, jak prokázali na ovčím modelu Dagum et al.⁴³

Mechanické vlastnosti aortální chlopně korelují s histologickou orientací extracelulární komponenty. Elastický modul je vyšší v circumferenci cípu, zatímco extenzibilita je vyšší v radiálním směru. Tyto anizotropní vlastnosti vycházejí z cirkumferentní orientace kolagenních vláken a radiální orientace elastických vláken hlavně ve ventricularis.⁴⁴

Biomechanické studie prokázaly, že radiální extenzibilita cípu je závislá na věku. Její 40% snížení se projevuje mezi 15 a 25 rokem věku, pak zůstává stabilní do zhruba 40. roku, od kdy se snižuje zhruba o 1% za rok.⁴⁵

U zdravých jedinců je velmi malý tlakový gradient mezi levou komorou a aortou na počátku ejekční fáze, který velmi rychle mizí, čímž jsou tlaky mezi uvedenými oddíly prakticky identické po většinu systoly. Normální aortální ústí (AVA – aortic valve area) má velikost 3-4 cm². Vztah gradientu a plochy ústí chlopně popisuje Gorlinova rovnice: gradient = CO²/AVA² (CO=srdeční výdej). Tedy při CO 5 l/min a AVA 1,3 cm² by měl být transvalvulární gradient okolo 15 mm Hg. Pokud zmenšíme plochu na 0,65 cm², tak při stejném srdečním výdeji gradient překročí 60 mm Hg. Levá komora srdeční tedy musí generovat tlak o 60mm Hg větší pro udržení normotenze.⁴⁶ Podle La Placeova zákona je napětí stěny levé komory rovno tlaku v levé komoře násobené její velikostí a dělené dvojnásobkem tloušťky stěny levé komory. Z této rovnice vyplývá, že pro udržení stejného napětí stěny levé komory je nutný nárůst tloušťky její stěny. Zvyšování napětí stěny levé komory by zvyšovalo afterload a snižovalo ejekční frakci levé komory. Kompenzační mechanismus tohoto přetížení je tedy koncentrická hypertrofie levé komory.⁴⁷

U aortální regurgitace dochází k tlakově – objemovému přetížení levé komory. Ačkoliv tepový objem levé komory je vysoký, dopředný tepový objem je redukován o regurgitační

frakci. Tlak generovaný levou komorou je přímo úměrný její náplni, proto bývá často přítomna systolická hypertenze. Kromě zvětšeného rozměru levé komory je často přítomno i mírné zesílení její stěny.⁴⁸

Morfologie cípů aortální chlopně a Valsalvských sinů je podmínkou fyziologické koronární perfuze. Tento fakt respektují bezstentové aortální protézy, aortální alograft i pulmonální autograft.

2.2.2 MITRÁLNÍ CHLOPEŇ

Biomechanika atriventrikulárních chlopní nezávisí pouze na cípech, ale skládá se i z aktivních pohybů anulu a závěsného aparátu připojeného ke stěně komory prostřednictvím papilárních svalů.

Extracelulární matrix se skládá z 60% z kolagenu typ I, 10% elastických vláken a 20% proteoglykanů. Většina kolagenních vláken je orientována ve svazcích vedoucích paralelně s okrajem cípu.⁴⁹ Nelineární biomechanické vlastnosti byly demonstrovány v testech jak cirkumferentním tak radiálním směrem.⁵⁰ Přední a zadní cíp mají anizotropní vlastnosti. Elastický modul je větší v cirkumferenci než v radiálním směru. Zadní cíp je více extenzibilní než přední.⁵¹

Normální velikost ústí mitrální chlopně se udává 4-6 cm². U mitrální stenozy dochází se současným snižováním plochy mitrálního ústí k růstu tlaku v levé síni a zvyšování transvalvulárního gradientu. Při těžké mitrální stenozě dochází ke snižování srdečního výdeje, dilataci levé síně a vzniku postkapilární plicní hypertenze. Vznikající hypertrofie levé síně vede často ke vzniku síňové fibrilace, která se podílí na dalším snížení srdečního výdeje. Svalovina levé komory nebývá postižena, v důsledku plicní hypertenze ale bývá postižena komora pravá.

U mitrální regurgitace dochází k čistému objemovému přetížení levé komory, které vede k její dilataci a v dalších fázích k poklesu ejekční frakce. Zároveň vznikající dilatace levé komory způsobuje i dilataci mitrálního anulu, což dále zhoršuje insuficienci mitrální chlopně.

2.2.3 TRIKUSPIDÁLNÍ CHLOPEŇ

Trikuspidální chlopeň je komplexní struktura, skládá se z předního, zadního a septálního cípu, šlašinek a papilárních svalů. Přední papilární sval poskytuje podporu přednímu a zadnímu cípu a mediální papilární sval zadnímu a septálnímu cípu. Některé šlašinky vycházejí přímo ze septa a vedou k septálnímu a přednímu cípu.⁵² Tvar trikuspidálního anulu ve trojrozměrném obraze je sedlovitý, zároveň je ale deformovaný tak, že septální a zadní anulus jsou blíže k hrotu pravé komory než přední anulus. Tato data pochází z echokardiografických studií prováděných na zdravých dobrovolnících. Když byli ale vyšetřováni stejným způsobem pacienti s trikuspidální regurgitací, byl tvar anulu mnohem planárnější a zároveň více cirkulární, oproti eliptickému tvaru u zdravých jedinců.⁵³ Přesto je většina komerčně dodávaných prstenců víceméně planárních.

Trikuspidální stenosa bývá v současnosti prakticky výhradně revmatického původu a lze se s ní setkat spíše v rozvojových zemích. Častější trikuspidální regurgitace sice může být způsobena primárním organickým postižením chlopně (jako je myxomatosní degenerace, trauma, infekční endokarditida nebo vrozené vady), ale vůbec nejčastěji souvisí s dilatací trikuspidálního anulu v důsledku změn v plicním řečišti nebo v souvislosti s levostranným srdečním postižením.⁵⁴

Predikce vývoje funkční trikuspidální regurgitace po korekci levostranné vady je obtížná.⁵⁵ Plicní hypertenze, zvýšený tlak v pravé komoře, postupující dilatace trikuspidálního anulu a pravé komory jsou rizikovými faktory perzistence nebo pozdního zhoršení trikuspidální regurgitace.^{56, 57}

2.3 CHLOPENNÍ NÁHRADY

Abychom pochopili problematiku, ke které se snaží tato dizertační práce přispět, je třeba shrnout současné znalosti o náhradách srdečních chlopní – jak z pohledu používaných chlopenních náhrad, tak i z pohledu používaných moderních operačních technik jako je např. Rossova operace při řešení patologie aortální (výjimečně mitrální) chlopně, záchovné operace na aortální či mitrální chlopni, nebo i náhrada chlopní intervenční technologií.

Vsouběžně používané chlopenní náhrady se dělí na mechanické a biologické.

Biologické chlopenní náhrady se dělí na xenografty, alografty a autografty.

- Xenografty (xenotransplantáty, heterografty nebo heterotransplantáty) jsou chlopenní náhrady vyrobené z biologického materiálu, který pochází z jiného živočišného druhu. V současné době se v kardiologii používají hlavně chlopně vyrobené z hovězího osrdečníku nebo z vepřových nekoronárních aortálních cípů. Nejčastěji používané xenografty mají pevnou kostru – stent. Některé nemají žádnou mechanickou podporu – jsou bezstentové (stentless).
- Alografty (homografty, alotransplantáty) jsou biologické chlopenní náhrady pocházející ze stejného druhu – pocházejí z kadaverosních srdcí, která nebyla vhodná k srdeční transplantaci. Nejčastěji se používají aortální a plicnicové, ojediněle mitrální alografty.
- Autografty – chlopenní náhrada pocházející z těla pacienta. Používá se plicnicový autograft u Rossovy operace pro náhradu aortálního kořene. Výjimečně je dodnes používán pulmonální autograft k náhradě mitrální chlopně (tzv. Ross II).

2.3.1 MECHANICKÉ CHLOPENNÍ NÁHRADY

První mechanickou kuličkovou chlopeň implantoval Hufnagel v roce 1952 heterotopicky do sestupné aorty u pacienta s aortální insuficiencí.⁵⁸ Po zavedení mimotělního oběhu do klinické praxe začali Starr, Braunwald nebo Harkin implantovat chlopně do ortotopické pozice. Používané kuličkové chlopně se rychle staly standardem, a je dokumentována jejich trvanlivost až 40 let.^{59, 60} Konstrukce chlopně, silikonová kulička ve stelitové klínce, byla velmi jednoduchá, nicméně charakteristika průtoku chlopni byla velmi turbulentní. Pacienti museli být intenzivně warfarinizováni⁶¹ a ani velikost efektivního ústí protézy nebyla dostatečná.

Vzhledem k nevyhovujícím hemodynamickým parametrům kuličkových chlopenních náhrad byla vyvinuta další generace: mechanické protézy s jedním výklopným diskem. V sedmdesátých a osmdesátých letech byly nejčastěji používané chlopně Björk-Shiley. Problém těchto chlopni byla vysoká trombogenicita menšího ústí a i z tohoto důvodu bylo posléze od jejich používání upuštěno, přestože jejich dlouhodobé výsledky byly poměrně dobré.⁶²

V současnosti se z diskových chlopni nejvíce implantuje protéza Medtronic-Hall, která je dostupná od roku 1977.⁶³ Ve stejném roce byla uvedena na trh první dvoulístková chlopeň St. Jude Medical.⁶⁴ Tyto chlopně v dalších letech prokázaly velmi dobré transvalvulární

gradienty, velmi malou aortální insuficienci a snížený výskyt tromboembolických komplikací.^{65, 66, 67} Antikoagulaci bylo nutné používat nadále, ale bylo možné snížit cílové hladiny INR.⁶⁸ Tyto protézy navíc svým nízkým profilem a menší nutností správné orientace velmi zjednodušily vlastní implantaci.

Za posledních dvacet let se design dvoulístkových chlopní podle různých výrobců mírně odlišoval. Velkým pokrokem bylo uvedení chlopně St. Jude Medical Regent do klinické praxe. Tato chlopeň má přepracovaný velmi úzký našivací prstenec, úpravami jejího skeletu se zvýšila plocha efektivního ústí při stejné zevní velikosti. Ochrana mechanismu otáčení lístků se posunula pod anulus. Jako první z mechanických chlopní tato demonstrovala snížení hypertrofie levé komory po implantaci v celém spektru svých velikostí.⁶⁹



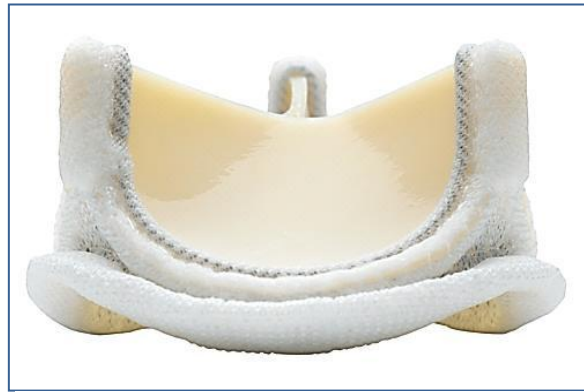
*Obrázek 1 - St. Jude Medical Regent
(s laskavým souhlasem výhradního zástupce
SJM pro ČR Cardion s.r.o.)*

2.3.2 XENOGRAFTY

Stentované biologické chlopní náhrady jsou nejčastěji vyráběny z nekoronárních cípů prasečích chlopní nebo z hovězího perikardu. Vývoj způsobu fixace tkáně a její antikalcifikační úprava se během posledních 40 let zasloužily o zlepšení trvanlivosti biologických protéz.

První biologickou chlopeň vyvinul Binet v roce 1960. Na její konstrukci se podílel i Alan Carpentier.⁷⁰ Právě A. Carpentier začal používat jako první glutaraldehyd k fixaci vepřových chlopní, které upevňoval na stent. Glutaraldehyd stabilizuje vlákna kolagenu a zároveň snižuje antigenicitu tkáně. In vivo snižuje stupeň enzymatické degradace a způsobuje ztrátu viability, čímž prodlužuje trvanlivost bioprotézy.⁷¹

Současné moderní bioprotézy jsou fixovány glutaraldehydem při nulovém nebo nízkém tlaku s použitím různých anti-kalcifikačních úprav jako je například použití kyseliny alfa-amino-oleové. Moderní stenty mají velmi nízký profil a jsou tenčí, aby bylo dosaženo co největší plochy efektivního ústí a zároveň aby byla co nejjednodušší supraanulární implantace těchto chlopní.



Obrázek 2 - perikardiální bioprotéza se stentem Carpentier-Edwards Perimount Magna

(s laskavým svolením Edwards Lifesciences AG)

Vedle bioprotéz se stentem jsou používány i bioprotézy bezstentové. Jsou vyráběny buď z vepřových aortálních kořenů, nebo konstruovány z hovězího perikardu. Tyto protézy se funkčně nejvíce přibližují nativnímu aortálnímu kořeni. Mají velmi dobrou hemodynamiku s dobrou plochou efektivního ústí s malými transvalvulárními gradienty. Po jejich implantaci byla zdokumentována regrese hypertrofie svaloviny levé komory srdeční.^{72, 73} Kromě hemodynamických výhod byla očekávána i lepší trvanlivost takových protéz, ta se ale zatím příliš nepotvrdila. Rovněž existují práce, které nedokázaly zopakovat optimistické výsledky ohledně regrese hypertrofie levé komory.⁷⁴

2.3.3 SROVNÁNÍ MECHANICKÝCH CHLOPENNÍCH NÁHRAD A XENOGRAFTŮ

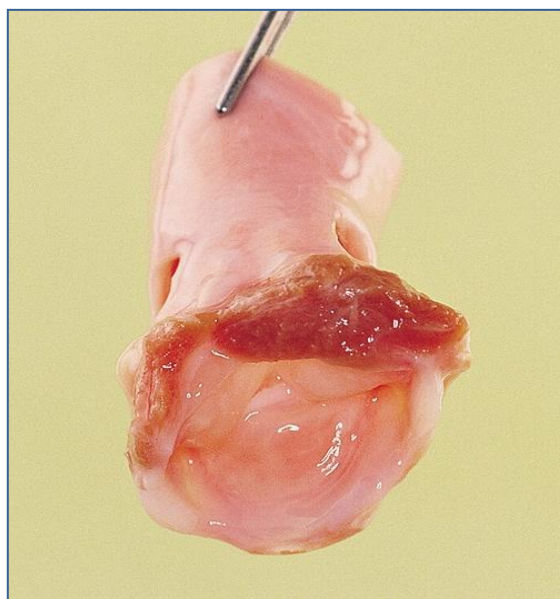
Většina doporučení týkajících se výběru vhodné chlopní protézy užívá věková kritéria, obvykle se po 60. až 65. roce věku pacienta doporučuje použití biologické chlopně. Tato kritéria jsou nastavena s ohledem na degeneraci bioprotéz tak, aby pacienti nebyli vystaveni příliš vysokému riziku reoperace. Také bývají kromě věku brána v úvahu další onemocnění, která mohou výrazně zkrátit předpokládané dožití konkrétního pacienta. Důležité je i přání velmi dobře informovaného pacienta.

Zatím nebylo provedeno mnoho velkých randomizovaných studií, které by porovnávaly dlouhodobé výsledky mechanických a biologických chlopních náhrad. Jediné větší randomizované studie pocházejí ze 70. let 20. století: studie Edinburgh Trial a Veterans Affairs Randomized Trial.^{75, 76, 77} Obě porovnávaly diskovou mechanickou chlopní náhradu

Björk-Shiley a biologickou vepřovou chlopeň Hancock (Edinburgh Trial navíc ještě biologickou chlopeň Carpentier-Edwards). Chlopně byly implantovány do aortální i mitrální pozice s dobou sledování 15 až 20 let. Výsledky byly o obou studiích obdobné: u skupiny pacientů s implantovanou mechanickou chlopní byl zachycen trend k delšímu přežívání ($p=0,08$). U biologických chlopní byly častější reoperace z důvodu strukturální deteriorace chlopně. K degeneraci docházelo dříve v mitrální pozici (8-10 let) než v aortální (10-12 let). Riziko tromboembolických komplikací a vzniku endokarditidy bylo u obou typů chlopní obdobné. Pacienti s implantovanou mechanickou chlopní měli signifikantně vyšší riziko krvácivých komplikací z důvodu antikoagulační léčby. Edinburská studie ukázala, že k degeneraci biologických chlopní dochází nejrychleji u mladších pacientů. Možnost extrapolace výsledků do současné klinické praxe je výrazně omezená, neboť typy chlopní hodnocené v těchto studiích se dnes již nepoužívají.

2.3.4 AORTÁLNÍ ALOGRAFT

V roce 1956 Gordon Murray popsal použití čerstvého aortální alograftu implantovaného do descendentní aorty u pacientů s aortální insuficiencí. Tyto operace předběhly o pět let dostupnost mechanické chlopní náhrady Starr-Edwards.⁷⁸ I když byly tyto operace z hemodynamického hlediska úspěšné pouze částečně, transplantované chlopně měly velmi dobrou životnost, bez kalcifikací a malý gradient i po 13 letech. Dva z těchto pacientů měli excelentní funkci implantované chlopně i po 20 letech.⁷⁹ První úspěšnou implantaci aortální alograftu do ortotopické pozice provedl Donald Ross na základě laboratorních



Obrázek 3 - aortální alograft

(archiv TC FN Motol)

experimentů Brewina publikovaných v roce 1956.^{80,81} Nezávisle a ve stejné době implantoval aortální alograft i Barrat-Boyes v Aucklandu na Novém Zélandu, který o dva roky později publikoval soubor 44 pacientů operovaných touto technikou.⁸² Zajímavé bylo, že při implantaci aortálních alograftů původně nebyl brán zřetel na ABO kompatibilitu a alografty byly implantovány čerstvé, velmi záhy po odběru. Takto implantované chlopně měly velmi

dobrou hemodynamiku a trvanlivost, což motivovalo mnoho dalších následovníků k jejich používání.

Na základě zkušenosti s aortálními alografty se dá konstatovat:

- Určitá podskupina pacientů může dosahovat trvanlivosti alograftu, kterou nepřekoná žádná biologická chlopní náhrada, snad s výjimkou plicního autograftu u Rossovy operace.
- Výborná hemodynamika s laminárním průtokem chlopní minimalizuje problémy s malým aortálním anulem a může mít rovněž pozitivní dopad na regresi hypertrofie svaloviny levé komory srdeční.
- Nízká trombogenicita bez antikoagulace může být výhodou u některých skupin pacientů (mladé ženy, děti, riziková povolání).
- Alografty mají pravděpodobně vyšší rezistenci vůči protetické chlopní endokarditidě.
- Alografty mohou být vhodné pro rozsáhlé rekonstrukce výtokového traktu levé komory, obzvláště u pacientů s infekční endokarditidou.

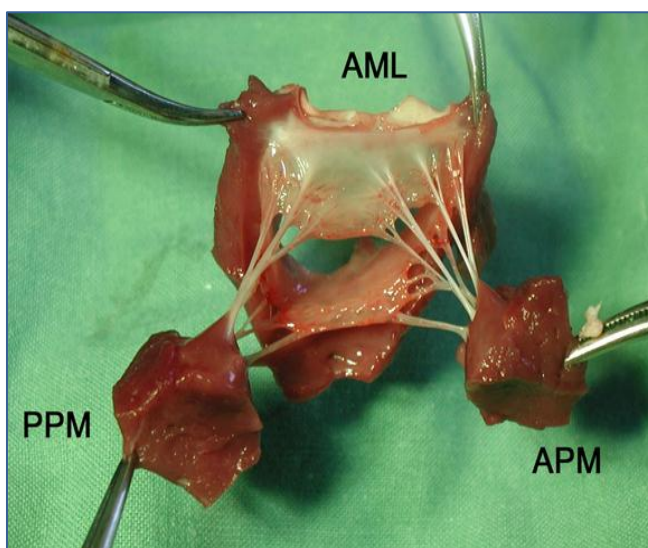
Jsou zde i faktory, které negativně ovlivňují trvanlivost implantovaných alograftů:

- Vyšší věk dárce
- Dilatovaný kořen aorty příjemce (pokud není korigován)
- Onemocnění kořene aorty (Marfanův syndrom, cystická medionekróza aorty)
- Technicky nedokonalá implantace způsobující turbulentní tok
- Dlouhé skladování „fresh wet-stored“ alograftů
- Nešetrná sterilizace, odběr a zpracování alograftů

V současné kardiokirurgii je aortální alograft na některých pracovištích uznávanou alternativou ostatních chlopních náhrad. Má velmi dobré hemodynamické vlastnosti a velkou výhodou je viabilita jeho tkáně, která se pravděpodobně podílí na jeho vysoké odolnosti vůči infekci. Z tohoto důvodu je považován za velmi dobrou volbu u pacientů s infekční endokarditidou aortální chlopně. Nevýhodou je riziko degenerace alograftu, hlavně u dětí a mladších pacientů do 40 let věku.⁸³

2.3.5 MITRÁLNÍ ALOGRAFT

Na výzkumu použití mitrálních alograftů má velký podíl i československá věda. Slovenský chirurg M. Hubka se od počátku 60. let dvacátého století věnoval experimentům na psech, kterým implantoval mitrální alografty jak do mitrální, tak do trikuspidální pozice. Rovněž popsal použití aortálního alograftu v mitrální pozici.^{84, 85, 86}



Obrázek 4 - ovčí mitrální alograft

(archiv TC FN Motol)

2.3.5.1 MITRÁLNÍ ALOGRAFT V MITRÁLNÍ POZICI

První experimentální implantaci mitrálního alograftu provedl v roce 1964 Cachera. Implantoval jak parciální, tak totální mitrální alograft do mitrální pozice, včetně jeho závěsného aparátu.⁸⁷ Rastelli ve stejném roce publikoval experiment, kdy provedl náhradu mitrální chlopně mitrálním alograftem. Po roce byly alografty funkční, papilární svaly byly nahrazeny jizevnatou tkání příjemce.⁸⁸

Podobně příznivé výsledky v průběhu šedesátých let v experimentu zaznamenali i další autoři. O'Brien dosáhl příznivých výsledků ortotopické transplantace mitrálního alograftu.⁸⁹ Pappas popsal dlouhodobé výsledky funkce mitrálního alograftu v experimentu na psech s šestiletým sledováním. U většiny pokusných zvířat vypadaly cípy chlopně jemně, morfologicky normálně. Výsledky byly prokazatelně lepší, když nebyla zvířata léčena imunosupresí a rovněž v případě použití čerstvého alograftu.⁹⁰

První klinické použití mitrálního alograftu bylo publikované v roce 1967 Senningem. Pooperační i krátkodobá funkce alograftu byla dobrá, nicméně relativně časně selhal a bylo nutné pacienta reoperovat.⁹¹ V roce 1975 publikoval Huber et al. první dlouhodobé klinické výsledky. Od roku 1966 do roku 1969 použil mitrální alograft k náhradě mitrální chlopně u 11 pacientů. Tři pacienti zemřeli časně po operaci. Ze zbývajících 8 byla u 4 nemocných nutná

reoperace z důvodu degenerace a špatné funkce chlopně. Výsledky byly neuspokojivé a Senning se poté rozhodl mitrální alografty nadále nepoužívat.⁹²

Úspěšnou implantaci mitrálního alograftu popsal v roce 1973 Ohta, který referoval o dvou pacientech, kterým byl implantován mitrální alograft do mitrální pozice. Tyto pacienty sledoval dva roky, funkce alograftů byla dobrá.⁹³

Své nepříliš povzbudivé výsledky publikoval Sievers, kdy implantoval mitrální alograft třem nemocným s mitrální stenosou. Prvního reoperoval 2 měsíce po operaci. Zbylé dva reoperoval rovněž – 9 a 46 měsíců po operaci. U jednoho byla důvodem endokarditida, u druhého dehiscence papilárního svalu.⁹⁴

Použití parciálního mitrálního alograftu u endokarditidy mitrální chlopně publikoval v roce 1994 Dossche et al. Dvě třetiny zadního cípu nahradil odpovídající částí alograftu včetně závěsného aparátu. Po ročním sledování měl pacient mírnou mitrální regurgitaci. Jako výhodu této techniky uvádí nepřítomnost cizího materiálu v terénu infekční endokarditidy a zároveň zdůrazňuje lepší zachování funkce levé komory oproti náhradě bioprotézou.⁹⁵

Velký soubor 43 pacientů publikoval v roce 1996 Acar et al. Jednalo se převážně o pacienty s infekční endokarditidou mitrální chlopně nebo s porematickou mitrální stenosou. Velká pozornost byla věnována předoperačnímu echokardiografickému vyšetřování pacientů s ohledem na výběr optimální velikosti alograftu.⁹⁶ Acar jako první publikoval náhradu mitrální i trikuspidální chlopně mitrálními alografty u jednoho pacienta s infekční endokarditidou obou těchto chlopní.⁹⁷

Náhrada mitrální chlopně mitrálním alograftem má mnohá technická úskalí. Velkým problémem je dostupnost dostatečného množství zmražených alograftů a správné měření jejich velikosti předoperační echokardiografií. Tato operace má akceptovatelné krátkodobé výsledky po zvládnutí techniky, nicméně střednědobých výsledků je k dispozici velmi málo, takže se tato operace v současnosti opouští.

2.3.5.2 MITRÁLNÍ ALOGRAFT V TRIKUSPIDÁLNÍ POZICI

I když experimenty s mitrálními alografty byly prováděny dokonce dříve než ty s aortálním alograftem, mitrální alograft se nikdy nedočkal širšího klinického použití. Vedly k tomu mimo jiné následující důvody:

- Implantace je technicky obtížná vzhledem ke komplexnosti struktury chlopně.
- Snahy používat mitrální alograft v mitrální pozici ho vystavovaly vysokému namáhání, které vedlo k dehiscencím sutury papilárních svalů a rupturám šlašinek.
- Riziko degenerace alograftu vedlo k nepříznivým dlouhodobým výsledkům.
- Rozvoj záchovných operací mitrální chlopně a kvalitativní zlepšení xenograftů postavilo mitrální alografty do pozadí zájmu kardiologů.

Mnohé z těchto argumentů se ztrácejí, pokud je mitrální alograft implantován do trikuspidální pozice.

Experimenty s implantací mitrálního alograftu do trikuspidální pozice prováděli Pollock,⁹⁸ stejně jako slovenský kardiolog Hubka.^{84, 85, 86} Přežívání zvířat bylo od několika dnů do dvou let, u některých došlo k dobrému vhojení alograftu a nebyla pozorována žádná imunologická reakce. Z těchto experimentálních studií bylo zřejmé, že je nutné implantovat mitrální i trikuspidální alograft jako jeden blok, který se skládá s anulu, chlopních cípů, šlašinek a papilárních svalů.

V roce 1993 byla popsána jediná klinická implantace čerstvého trikuspidálního alograftu do trikuspidální pozice u mladé pacientky s endokarditidou trikuspidální chlopně. Dobrá střednědobá funkce alograftu byla ověřena 6 měsíců po operaci.⁹⁹

V klinické praxi je mitrální alograft implantovaný do trikuspidální pozice používán zřídka. Implantaci mitrálního alograftu do trikuspidálního ústí z důvodu endokarditidy poprvé publikoval v roce 1993 španělský kardiolog Pomar.¹⁰⁰

2.3.6 PLICNICOVÝ AUTOGRAFT

Použití plicnicového autograftu jako konduktu pro rekonstrukci kořene aorty bylo logickým pokračováním snah kardiologů o nalezení ideální chlopní náhrady. První klinické použití, které zúročilo zkušenosti nabyté s aortálními alografty, publikoval Donald Ross v roce 1967.¹⁰¹ Nová technika splňovala mnoho kritérií, která chirurgové od chlopní náhrady požadovali:

- velmi dobrou odolnost vůči degeneraci
- byla neimunogenní
- měla výbornou hemodynamiku
- nevyžadovala antikoagulaci
- byla vitální a schopná růstu, dokonce i určitého stupně auto-reparace¹⁰²

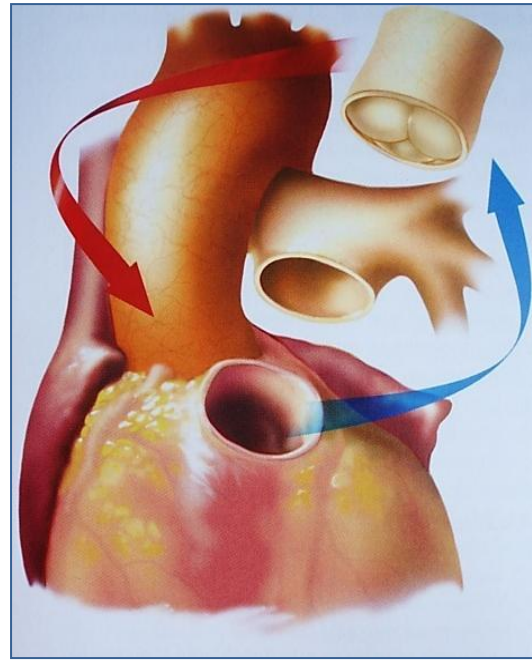
Vzhledem k velké komplexnosti výkonu a technické náročnosti je tato operace vhodná pro úzkou skupinu pacientů, kteří nechťejí nebo nemohou užívat antikoagulancia. Většinou se operace provádí mladším pacientům s dlouhým předpokládaným přežitím, je vhodná pro ženy plánující těhotenství, závodní sportovce a děti.

Kromě obtížnosti výkonu a jeho komplexnosti

panuje největší obava z insuficience autograftu v aortální pozici. Insuficience autograftu časně pooperačně bývá spojena s technickou chybou při operaci. Pokud vznikne regurgitace s odstupem několika měsíců, může být způsobena prostě pouze faktem, že nebyla použita metoda stabilizující anulus, a autograft při systémovém tlaku postupně dilataje.

Incidence regurgitace po Rossově operaci není příliš známá. Dlouhodobé sledování souboru pacientů D. Rosse bylo publikováno v roce 1991. Soubor zahrnoval 339 pacientů, střední doba sledování byla 11.8 roku, nejdelší doba sledování byla 24 roků – byl zde tedy zahrnut i první pacient z roku 1967. V této skupině pacientů bylo reoperováno 33 pacientů pro insuficienci chlopně autograftu. U 19 z nich byla konstatovaná pravděpodobná technická chyba při první operaci, u devíti byla dysfunkce způsobena bakteriální endokarditidou a pouze u 5 byla vysvětlena dilatací autograftu. Linearizovaná incidence regurgitace byla 0,8% na pacienta a rok. Je nutné poznamenat, že většina Rossových pacientů byla operována subkoronární technikou.¹⁰³

Aby bylo možné získat přesnější data, která lépe odrážejí běžnou kardiologickou praxi, byl založen Ross Procedure International Registry. V roce 1996 zahrnoval 1976 operací provedených 126 chirurgy v období 1987-1995. Střední doba sledování tohoto souboru byla 2 roky, s maximem 8 let. Z tohoto počtu pacientů bylo reoperováno pro insuficienci autograftu



Obrázek 5- schéma Rossovy operace

(s laskavým svolením doc. Žáčka,
KCH klinika FN Hradec Králové)

56 pacientů. Linearizovaná incidence regurgitace autograftu byla 1,5% na pacienta a rok. U 66% pacientů byl autograftem nahrazen kořen aorty, u 23% byla provedena subkoronární implantace a u 11% byla použita inkluzní technika.¹⁰⁴

Elkins identifikoval některé faktory, které predikují větší odolnost vůči vzniku regurgitace: přítomnost aortální stenózy předoperačně a použití techniky náhrady aortálního kořene.¹⁰⁵

Problémem zůstává, jaká je skutečná trvanlivost autograftu. Velmi poučné jsou výsledky publikované holandskými autorkami Klieverik a Takkenberg, které analyzují dlouhodobé sledování pacientů po Rossově operaci v Rotterdamu.¹⁰⁶ Sledovaly 146 pacientů, kterým byla provedena Rossova operace. Konstatovaly velmi dobré přežívání těchto pacientů 13 let po operaci, které je srovnatelné s přežíváním zdravé populace. Pět let po operaci bylo bez reoperace 97.7%, ve 13 letech po operaci již pouze 69.2%. Signifikantně menší počet reoperací byl ve skupině pacientů, kteří byli operováni do 16 let věku. Ve sledování zachytili dva případy infekční endokarditidy, jeden případ embolizace do plicnice. Trombóza chlopně, epizoda krvácení nebyly zachyceny. Varovný vzestup výskytu regurgitace v druhé pooperační dekádě byl způsobený dilatací autograftu. U všech těchto pacientů byla použita technika náhrady kořene aorty autograftem.

Sievers a spolupracovníci publikovali soubor 347 pacientů, u kterých provedl Rossovu operaci subkoronární technikou od roku 1994 do 2005. Počet reoperací z celého souboru byl pouze 2,6%.¹⁰⁷ Nicméně je nutné podotknout, že délka sledování nepřesáhla 10 let. Sieversovy výsledky naznačují, že pokud je subkoronární technika chirurgem zvládnuta, může tato technika implantace zajistit dobrou stabilitu autograftu po mnoho let.

2.3.7 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

V současnosti dostupné mechanické a biologické chlopní náhrady sice prokázaly svou účinnost a bezpečnost, nicméně každá protéza je spojena s rizikem s náhradou souvisejících komplikací. Ideální chlopní náhrada by měla splňovat následující podmínky:¹⁰⁸

- být kompatibilní s tělem příjemce
- být neimunogenní
- neměla by degradovat krevní elementy
- být viabilní s velmi dlouhou trvanlivostí (u dětí by měla navíc mít růstový potenciál)

- být neomezeně dostupná v jakémkoli množství
- být netrombogenní

Historicky byly chlopenní náhrady navrhovány tak, aby pasivně reagovaly na tlakové změny, které chlopeň otevíraly a zavíraly. Celý chlopenní aparát nebyl zahrnut do designu chlopenních náhrad, zejména těch, které byly určeny do mitrální nebo trikuspidální pozice.

Při experimentech vedoucím k vývoji chlopně metodou tkáňového inženýrství se používají dva postupy. Jsou vyvíjeny chlopně založené na biodegradabilním skeletu z polymerních materiálů nebo jsou používány decelularizované chlopenní alografty nebo xenografty. Cílem je replikovat anatomickou, histologickou a biomechanickou charakteristiku chlopni.^{109, 110, 111}

2.3.7.1 POLYMEROVÉ DEGRADABILNÍ SKELETY

První experimenty s polymerovým degradabilním skeletem na bázi polyglykolové kyseliny vypadaly velmi slibně, byly však konstruovány jako jednocípá plicnicová chlopeň. Pokus o její trojcípou variantu byl ale neúspěšný v důsledku vlastností použitého polymeru. I když in vivo byla pozorovaná degradace během 6 týdnů (v ovčím modelu), rigidita materiálu si vynutila hledat více flexibilní polymer.^{112, 113, 114}

Dalším studovaným polymerem byl polyhydroxoktanoát, lineární termoplastický polyester, který je velmi dobře ohebný a navíc je možné ho vyrobit porézní, což by mohlo zvyšovat rychlost osidlování buňkami. Tento materiál byl použit opět v ovčím modelu. Po 6 měsících byly stále nalézány nedegradované části polymeru v cípech implantované plicnicové chlopně, což může již vyprovokovat zánětlivou reakci a fibrotickou odpověď. To může mít za následek sníženou trvanlivost cípů chlopně.¹¹⁵

2.3.7.2 SKELETY TVOŘENÉ EXTRACELULÁRNÍ MATRIX

Výzkum skeletů srdečních chlopni založených na použití extracelulární matrix, která je získávána decelularizací alograftů nebo xenograftů, je veden paralelně s výzkumem polymerních skeletů. Problémy s predikovatelnou biodegradabilitou polymerů vedly k použití z tkání získaných struktur. Byly používány různé technologie, které efektivně odstraňovaly celulární komponenty semilunárních chlopni a zároveň ponechávaly většinu extracelulární matrix (hlavně kolagen, elastin a některé proteoglykany). Celá procedura je komplikovaná:

nejprve jsou používány různé kombinace detergentů spolu s inhibitory proteázy, dále bývá používána DNasa a RNasa, která odstraňuje nukleové kyseliny. Zároveň se tímto postupem snižuje imunitní odpověď příjemce. Tyto decelularizované matrix plicnice byly použity ve zvířecích modelech, ale i jako plicnicové konduity u Rossovy operace.^{116, 117, 118} Osidlování autologními buňkami probíhalo ve stěně graftu a bazální části cípu. Nepokračovalo ale směrem k volnému okraji.

2.3.7.3 OSIDLOVÁNÍ DECELULARIZOVANÉ MATRIX IN VITRO

Limitací v současnosti používaných chlopenních náhrad je absence jakýchkoliv mechanismů autoreparace a eventuálního růstu. Tyto požadavky by v budoucnosti mohly splňovat chlopně vyrobené metodami tkáňového inženýrství. Velkou překážkou, podobně jako je tomu u biodegradabilních chlopenních skeletů, jsou neadekvátní mechanické vlastnosti decelularizovaných chlopenních skeletů, které v aortální pozici nemají dostatečnou odolnost, aby osídlení autologními buňkami bylo proveditelné *in vivo*. Z tohoto důvodu se používají bioreaktory, které zajišťují fyziologické tlakové a průtokové poměry osidlovaného skeletu. Tím jsou zajištěny podmínky pro jeho přestavbu, proliferaci a diferenciaci buněk. Touto technikou jsou skelety z extracelulární matrix „předpřipraveny a předosídleny“ *in vitro* předtím než jsou implantovány, kdy dále tento proces probíhá *in vivo*.^{119, 120, 121}

2.3.8 PERKUTÁNNĚ A TRANSAPIKÁLNĚ ZAVÁDĚNÉ CHLOPNĚ

Kardiochirurgie v poslední době dosáhla mimořádně dobrých výsledků i u komplikovaných pacientů s chlopenními vadami. Přesto existuje skupina pacientů, kteří mají degenerativní postižení aortální chlopně a jsou v důsledku svých komorbidit příliš riziková pro komplexní kardiochirurgický výkon. Byla hledána bezpečnější a trvanlivější metoda než balonová valvuloplastika aortální chlopně.¹²²

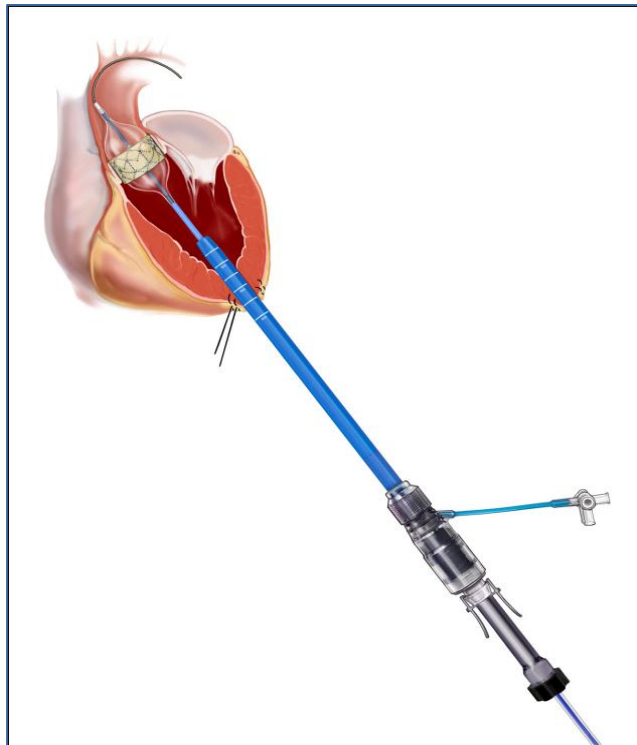
První perkutánní implantaci chlopně v experimentu na psech provedl v roce 1992 Anderson.¹²³ Koncept na podobném principu: do stentu implantovaná biologická chlopeň, dovedl k první klinické perkutánní implantaci stent-chlopně Cribier v roce 2002.¹²⁴

V iniciálním klinickém experimentu Cribier intervenoval 20 pacientů, které odmítli operovat dva na sobě nezávislí kardiochirurgové. U 17 pacientů byl úspěšný, z 3 neúspěšných dva periprocedurálně zemřeli. Střední gradient poklesl ze 43 na 8 mm Hg a plocha aortální

chlopně se zvětšila z 0,56 na 1,69cm². Středně významný paravalvulární leak byl dokumentován u poloviny pacientů.¹²⁵

Některé systémy umožňují chirurgickou transapikální implantaci. Na jedné straně se tak výkon stává více invazivní, na druhé straně může být přesnější umístění implantované chlopně. (viz Obrázek 6).

I když jsou v současnosti perkutánně zaváděné chlopně používány hlavně pro extrémně rizikové pacienty, u kterých je chirurgická náhrada chlopně již příliš velkým rizikem, dá se v budoucnu předpokládat posun k méně rizikovým skupinám. Velmi zajímavou myšlenkou je vyvíjený koncept „valve in valve“, tedy implantace perkutánní chlopně do stenotické bioprotézy. Mohl by umožnit implantovat biologické chlopně podstatně mladším pacientům a v případě strukturální deteriorace protézy by byla použita perkutánní chlopenní náhrada.



Obrázek 6 - systém pro transapikální implantaci aortální bioprotézy Edwards Ascendra

(s laskavým svolením Edwards Lifesciences AG)

2.4 ZÁCHOVNÉ OPERACE CHLOPNÍ

2.4.1 ZÁCHOVNÉ OPERACE MITRÁLNÍ CHLOPNĚ

Po začátku éry operací srdce s použitím mimotělního oběhu byly v 60. letech hlavně operovány vrozené chlopenní malformace a revmaticky postižené chlopně. Diagnóza byla tehdy stanovována pouze klinickým vyšetřením a katetrizací. Spektrum operací, které byly k dispozici, zahrnovalo náhrady chlopenní kuličkovými protézami nebo alografty. Záchovné výkony měly pouze paliativní charakter.

Koncem 60. let přišel A. Carpentier s konceptem „netrombogenní chlopní chirurgie“. Započal tak éru používání xenograftů a záchovných operací chlopní.^{126, 127}

V 80. letech došlo k výraznému vzestupu incidence degenerativních vad chlopní, pravděpodobně také v důsledku zavedení echokardiografie do klinické praxe. Zásadní přínos prof. Carpentiera k analýze mechanismu mitrální regurgitace (viz *Tabulka 1*) a způsobu jejich korekce byl publikován v roce 1983.²⁸

Tabulka 1 - Funkční klasifikace mitrální regurgitace podle Carpentiera

Typ	Mechanismus regurgitace
I	Dilatovaný anulus
II	Prolaps cípu/cípů
IIIa	Restrikce cípů v systole i diastole
IIIb	Restrikce cípů v diastole

Principy léčby mitrální insuficience, které stanovil A. Carpentier jsou platné doposud:

- Zachování nebo obnovení normálního pohybu cípu
- Vytvoření velké plochy koaptace cípů
- Remodelace a stabilizace celého anulu

V současném spektru pacientů u nichž je prováděna záchovná operace mitrální chlopně mají převahu pacienti s ischemickou mitrální regurgitací, kde bývá anuloplastika mitrálním prstencem dostatečným výkonem zajišťujícím kompetentnost chlopně. Otázkou zůstává trvanlivost rekonstrukce u excesivní restrikce cípů mitrální chlopně. Je možné, že by tato podskupina pacientů s ischemickou mitrální regurgitací profitovala více z primární náhrady této chlopně. David a Ho prokázali, že pacienti, kterým byla nahrazena mitrální chlopeň se zachováním závěsného aparátu, mají lepší přežívání než skupina, které byla excidována kompletní mitrální chlopeň.¹²⁸ Mantovani uvádí srovnatelné výsledky u pacientů, kterým byla

provedena plastika nebo náhrada mitrální chlopně pro ischemickou mitrální regurgitaci, jak co se týká peroperační mortality, tak i v 5letém sledování.¹²⁹ Podobně referuje i Magne¹³⁰, který konstatuje vyšší mortalitu u skupiny pacientů, kterým byla nahrazena mitrální chlopeň oproti skupině, které byla provedena mitrální plastika. Nicméně typ operace nebyl identifikován jako nezávislý rizikový faktor. Navíc neprokázal rozdíl v 6letém sledování přežívání a konstatuje, že u pacientů s ischemickou mitrální regurgitací není plastika výhodnější než náhrada mitrální chlopně.

U degenerativních vad je situace odlišná. Výhoda mitrální plastiky nad mitrální náhradou byla opakovaně demonstrována.^{131, 132} Prolaps zadního cípu, jako nejčastější mechanismus degenerativní mitrální regurgitace, byl standardně řešen resekci prolabujícího segmentu a plikací anulu¹³³ nebo „sliding plastikou“.¹³⁴ Zdá se, že obdobné patologie zadního cípu lze řešit pouze korekcí prolapsu goretexovými neochordami, které zajistí výbornou mobilitu cípu a dlouhou zónu koaptace. Tento postup ("respect rather than resect") je vhodný i pro pacienty s nadbytkem tkáně, kdy je cíp neochordami stažen několik milimetrů pod rovinu anulu. Střednědobé výsledky jsou velmi dobré.¹³⁵

Na základě povzbudivých výsledků plastik mitrální chlopně někteří chirurgové operují i asymptomatické pacienty, kteří nesplňují současná doporučení pro indikaci k výkonu na mitrální chlopni. Důvodem tohoto agresivního přístupu je obava z vývoje dysfunkce levé komory, která může ovlivňovat dlouhodobou prognózu pacienta.¹³⁶

Oproti tomuto principu stojí koncept pečlivého sledování asymptomatických pacientů a stanovení indikace k operaci až v okamžiku splnění podmínky symptomů nebo echokardiografických kritérií.¹³⁷

2.4.2 ZÁCHOVNÉ OPERACE AORTÁLNÍ CHLOPNĚ

Záchovné operace na aortální chlopni patří k výkonům, které pacientům přinášejí nesporné výhody, jsou ale technicky podstatně náročnější než náhrada chlopně protézou. Aicher et al. demonstrovali, že počet komplikací souvisejících s výkonem na chlopni se při záchovných operacích aortální chlopně v 15letém sledování pohybuje kolem 12 procent,¹³⁸ zatímco riziko komplikací u nemocných po náhradě aortální chlopně je za stejnou dobu přes 60%.⁷⁶

Tabulka 2- Funkční klasifikace aortální regurgitace podle El Khouriho

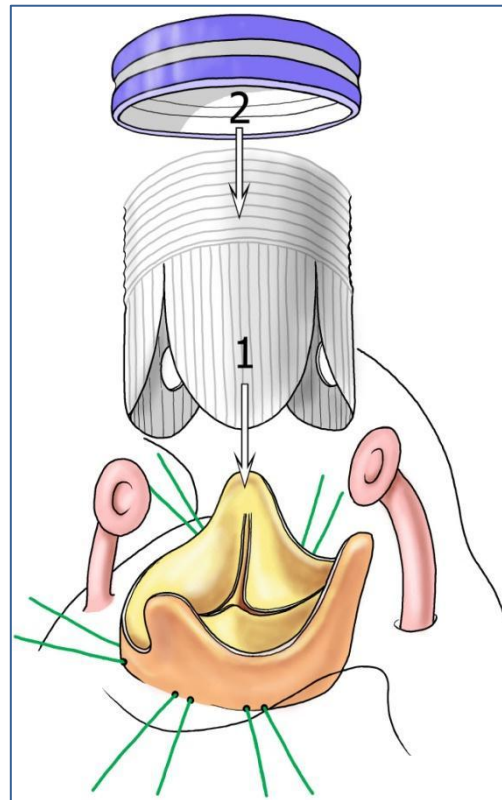
Typ	Mechanismus regurgitace	Typ výkonu
IA	dilatovaná sinotubulární junkce	Remodelace sinotubulární junkce
IB	dilatované Valsavské siny	Remodelace kořene nebo reimplantace
IC	dilatovaná aortoventrikulární junkce	Anuloplastika
ID	perforace cípu	Plastika cípu autologním perikardem
II	Prolaps	Korekce délky volného okraje cípu
III	Restrikce	Plastika – extenze cípu, dekalifikace

Současná léčba aortální insuficience je založena na funkční klasifikaci, kterou použil v roce 1997 Haydar et al., která byla založena na souboru převážně dětských pacientů. Typ I charakterizoval jako normální pohyb cípu při dilatovaném anulu, typ II jako excesivní pohyb cípu, typický pro prolaps, a typ III restriktivní pohyb cípu.¹³⁹ El Khoury tuto klasifikaci rozšířil, kdy u typu I vytvořil čtyři podskupiny. Zároveň jeho klasifikace přímo navrhuje typ výkonu podle typu léze (*Tabulka 2*).¹⁴⁰

V praxi nacházíme obvykle více než jeden mechanismus aortální regurgitace. Navíc při korekci velikosti kořene aorty dochází k indukovanému symetrickému prolapsu všech cípů, který je nutné korigovat.¹⁴¹ Vzhledem k obtížnému intraoperativnímu hodnocení symetrického i izolovaného prolapsu je velmi výhodnou technikou používání konceptu efektivní výšky cípu. Tento parametr je měřen jednoduchým kaliperem od báze cípu k jeho volnému okraji a umožňuje velmi jednoduché zhodnocení míry prolapsu a zároveň predikuje i pozici cípů a koaptace po provedené rekonstrukci.¹⁴²

V současné době jsou při zachovných operacích aortálního kořene nejčastěji používány dvě techniky. Remodelace kořene aorty podle Yacouba¹⁴³ a reimplantace aortální chlopně podle Davida¹⁴⁴. Obě techniky mají své výhody a nevýhody. Yacoubova operace je fyziologičtější,¹⁴⁵ na druhé straně neposkytuje žádnou podporu aortálnímu anulu. Davidova operace vytváří podporu aortální chlopně na všech úrovních, bývá jí však vyčítáno, že vystavuje cípy chlopně jak systolickému stresu, tak neumožňuje dokonalé rozložení diastolického stresu směrem ke kořeni.

Vhodným kompromisem je kombinace remodelace s použitím zevního flexibilního aortálního prstence (viz *Obrázek 7*), kdy spojením těchto technik je zajištěna velmi fyziologická rekonstrukce kořene aorty a zároveň je stabilizována velikost aortálního anulu.^{146, 147} Časné výsledky jsou slibné. Velkou výhodou je reprodukovatelnost a standardizace celé operace. Tato technika je použitelná jak pro trojcípou, tak pro dvojcípou aortální chlopeň. U dvojcípé chlopně navíc umožňuje repozici komisur do výhodnějšího symetrického postavení, které má pozitivní vliv na trvanlivost celé rekonstrukce¹⁴⁸. Na dlouhodobé potvrzení výhod této techniky musíme vyčkat výsledků zpracovávaných mezinárodním registrem CAVIAAR (Conservative Aortic Valve Surgery for Aortic Insufficiency and Aneurysm of the Aortic Root).



Obrázek 7 - schéma použití externího anuloplastického prstence

(autor ilustrace: Mgr. Jan Kacvinský)

2.4.3 ZÁCHOVNÉ OPERACE TRIKUSPIDÁLNÍ CHLOPNĚ

Současná chirurgická léčba funkční trikuspidální regurgitace zahrnuje použití rigidních i flexibilních prstenců, otevřených i zavřených, které mají za cíl korigovat dilataci anulu a tím nastolit dobrou koaptaci cípů. Dilatace trikuspidálního anulu probíhá především v části anulu odpovídající přednímu a zadnímu cípu, což vede k nedostatečné koaptaci cípů.¹⁴⁹ Anulus septálního cípu bývá přirovnáván k intertrigonální části předního cípu mitrální chlopně. Proto

je měření velikosti při implantaci prstence mimo jiné založeno na velikosti anulu septálního cípu.¹⁵⁰

Další používanou technikou je bikuspidalizace: založení matracových stehů od anterioposteriorní komisury k posteroseptální komisuru.¹⁴⁹ Bývá používána i technika podobná Alfieriho plastice edge to edge.¹⁵¹ Často používanou technikou i v současnosti je cirkulární anuloplastika neúplným tabáčkovým stehem podle DeVegy.¹⁵²

V případě velké restrikce cípů doporučuje Dreyfus et al. provádět prodloužení předního cípu trikuspidální chlopně autologním perikardem, čímž dojde ke zlepšení koaptace. Po té je implantován standardním způsobem trikuspidální anuloplastický prstenc.¹⁵³

2.5 KLINICKÉ POUŽITÍ CHLOPENNÍCH ALOGRAFTŮ

Chlopenní alografty jsou v současnosti v Evropě nejvíce používané pro dětské a mladé pacienty s vrozenými srdečními vadami k rekonstrukci pravého i levého komorového výtokového traktu, nebo jen jako chlopenní náhrady pro plicnicovou a aortální chlopeň. Je tomu tak přesto, že právě v této věkové kategorii strukturální degenerace cípů alograftů postupuje nejrychleji. Další skupinou jsou pacienti podstupující Rossovu operaci (kapitola 2.3.6), kde obvykle plicnicový alograft nahrazuje explantovaný plicnicový autograft.¹⁵⁴

Časté je použití chlopenních alograftů u pacientů s nativní a zejména s protetickou infekční endokarditidou, která může devastujícím způsobem postihovat jak samotné struktury chlopně, tak i okolní tkáň. U takových postižení má použití chlopenního alograftu výhodu v nepřítomnosti protetického materiálu a pravděpodobně vyšší odolnosti tkáň alograftu vůči infekci.

2.5.1 INFEKČNÍ ENDOKARDITIDA

Infekční endokarditida bývá bez adekvátní terapie fatálním onemocněním. Průměrná incidence se pohybuje okolo 2-6 případů na 100 000 obyvatel na rok.¹⁵⁵ V populaci narkomanů nebo přestárlé populaci bude incidence jistě vyšší.

Prognóza pacientů závisí na mikrobiologickém agens a typu postižení. Streptokoková endokarditida nativních chlopní má velmi dobrou prognózu s mortalitou okolo 3%, zatímco

stafylokoková 25-40% a mykotická 80%.¹⁵⁶ Podíl nozokomiálních infekcí činí asi 5-29% z celkového počtu případů infekční endokarditidy. Její mortalita ale dosahuje 40-56%.¹⁵⁷ U intravenosních narkomanů dosahuje incidence 1,5-3,3 případů / 1 000 osob. V této skupině se předpokládá 100x vyšší incidence než u normální populace.¹⁵⁶

Rozlišujeme endokarditidu postihující nativní chlopně (NVE - native valve endokarditis) a endokarditidu chlopenních protéz (PVE - prosthetic valve endokarditis). Podle doby od operace rozlišujeme PVE časnou (do 12 měsíců od operace) a pozdní. Jako samostatná jednotka bývá uváděna endokarditida postihující intravenosní narkomany.

2.5.1.1 DIAGNOSTICKÁ KRITÉRIA INFEKČNÍ ENDOKARDITIDY

Pro diagnostiku infekční endokarditidy se používají modifikovaná kritéria Duke University^{158, 159}:

- *Prokázaná infekční endokarditida*: Infekční endokarditida se považuje za prokázanou, jestliže splňuje alespoň jedno z patologických kritérií nebo obě hlavní klinická kritéria nebo jedno hlavní a tři vedlejší klinická kritéria nebo pět vedlejších klinických kritérií.
- *Možná infekční endokarditida*: jedno hlavní a jedno vedlejší klinické kritérium nebo tři vedlejší klinická kritéria.
- *Vyloučená infekční endokarditida*: jiná prokázaná diagnóza vysvětlující příznaky daného onemocnění nebo vymizení příznaků nemoci během méně než 4 dnů antibiotické léčby nebo nepřítomnost peroperačního nebo sekčního nálezu odpovídajícího infekční endokarditidě poté, co pacient byl léčen antibiotiky méně než 4 dny.

Patologická kritéria infekční endokarditidy:

Průkaz mikroorganismů kultivačně nebo histologicky ve vegetaci nebo ve vegetaci, která embolizovala, nebo v nitrosrdečním abscesu nebo průkaz patologických útvarů, jako např. vegetace nebo nitrosrdeční absces, kdy histologické vyšetření potvrdí aktivní endokarditidu.

Klinická kritéria infekční endokarditidy:

▪ *Hlavní kritéria*

- *Pozitivní hemokultury,*
 - tedy ve dvou různých hemokulturách zjištěn typický mikroorganismus vyvolávající infekční endokarditidu: viridující streptokoky, *Streptococcus bovis*, mikroorganismy skupiny HACEK, *Staphylococcus aureus* nebo enterokoky (nejedná-li se o nozokomiální infekci a není znám primární zdroj infekce) *nebo*
 - stejný nález v alespoň dvou hemokulturách odebraných v časovém rozpětí 12 hodin a více *nebo*
 - stejný nález ve 3 ze 4 odebraných hemokultur anebo ve většině ze čtyř a více odebraných hemokultur *nebo*
 - izolace *Coxiella burnetii* z jedné hemokultury nebo průkaz IgG protilátek proti tomuto agens (ve fázi I) v titru > 1 : 800;

- *Známky postižení endokardu* (podle echokardiografického vyšetření)
 - oscilující intrakardiálně uložené těleso, vázané na chlopně nebo jejich podpůrný aparát, pohybující se v místě regurgitačního jetu, nebo lokalizované na implantovaném materiálu, kdy neexistuje jiné anatomické vysvětlení *nebo*
 - intrakardiální absces *nebo*
 - nově vzniklá částečná dehiscence umělé chlopně

▪ *Vedlejší kritéria*

- *Predispozice:*
 - přítomnost onemocnění srdce, které je provázeno vyšším výskytem IE (zejména: mechanická protéza chlopně nebo bioprotéza, IE v anamnéze, cyanotické vrozené vady, uměle vytvořené levo-pravé shunty nebo konduity, bikuspidální aortální chlopeň, významná mitrální nebo aortální regurgitace, aortální stenóza, defekt septa komor, ductus arteriosus patens, koarktace aorty, hypertrofická kardiomyopatie, stav po operaci srdce s přetrvávající hemodynamickou abnormalitou) *nebo*
 - intravenózní narkomanie;
- *Horečka:* 38,0 °C a více;
- *Cévní příznaky:* velké arteriální embolizace, septické plicní infarkty, mykotická aneuryzmata,

- nitrolební krvácení, konjunktivální hemoragie a Janewayovy léze;
- *Imunologické příznaky*: glomerulonefritida, Oslerovy uzlíky, Rothovy skvrny, pozitivní revmatoidní faktor;
- *Mikrobiologický nález*: pozitivní hemokultivace, nesplňující výše uvedená kritéria nebo serologický průkaz aktivní infekce připouštějící IE.

2.5.1.2 INFEKČNÍ ENDOKARDITIDA TRIKUSPIDÁLNÍ CHLOPNĚ

Infekční endokarditida intravenosních narkomanů je poměrně nová forma onemocnění. Nejčastěji se vyskytuje na trikuspidální chlopni (60-70%). Mitrální a aortální chlopeň bývá postižena stejně často (20-30%). Postižení plicnicové chlopně je velmi vzácné, pod 1% případů. Postižení více chlopní se udává mezi 5-10%.¹⁶²

Příčinou je usídlování mikroorganismů na povrchu chlopně v místě, kde je endotel již poškozen. Intravenosně aplikované drogy nejsou obvykle sterilní a navíc obsahují shluky nedokonale rozpuštěných částecek, které v kontaktu s turbulentním prouděním v oblasti trikuspidálního ústí mohou spolu s trombocyty a fibrinem vytvářet možná místa pro uchycení infekčního agens.¹⁶⁰ 60-90% pacientů s infekční endokarditidou trikuspidální chlopně je HIV pozitivních. HIV pozitivní parenterální narkomani mají vyšší riziko postižení pravostranných oddílů oproti HIV negativním.^{161, 162}

Nejčastějším infekčním agens je *Stafylococcus aureus*, dále jsou časté streptokoky, enterokoky, G- tyče a kandidy. Zdrojem zlatého stafylokoka bývá nazopharyngeální nosičství nebo kolonizace kůže, obojí je častější u narkomanů oproti normální populaci. Zdrojem jiných odolnějších kmenů, jako například *Pseudomonada*, bývá kontaminace jehel a stříkaček.¹⁶³

Významnou roli hrají vlastnosti infekčního agens a imunologické mechanismy. *Staphylococcus aureus* např. u nitrožilních narkomanů vykazuje afinitu k trikuspidální chlopni a naopak enterokoky u nemocných se stejnou diagnózou vyvolávají predilekčně postižení chlopní levého srdce.¹⁶⁴

Mortalita infekční endokarditidy se pohybuje v rozmezí 5-17%. Prognóza pacientů s pravostranným postižením je považovaná za příznivější oproti postižení mitrální a aortální chlopně.¹⁶⁴

2.5.1.3 CHIRURGICKÁ LÉČBA INFEKČNÍ ENDOKARDITIDY

Léčba infekční endokarditidy je primárně konzervativní. Po stanovení mikrobiologického agens je nezbytné započít s cílenou antibiotickou léčbou. Rychlému stanovení agens pomáhají genetické metody založené na PCR.¹⁶⁵

Chirurgická léčba je indikována při neúspěšné antibiotické léčbě, při komplikacích (městnavé srdeční selhání, šíření infekce do perivalvulárních tkání, přetrvávání infekce navzdory adekvátní antimikrobní léčbě, hrozící embolizace do systémového řečiště, časná protetická endokarditida, známé obtížně konzervativně zvladatelné agens, dysfunkce protézy) nebo při přítomnosti velkých vegetací.

U nekomplikovaného postižení chlopně, kdy je možné odstranit veškerý infekční materiál, je výhodná plastika chlopně (hlavně mitrální a trikuspidální). Použití umělého materiálu by sice mělo být minimalizováno, ale zdá se, že v případě dostatečné radikality výkonu nemusí znamenat vyšší riziko reinfekce. Na druhé straně byly demonstrovány výhody použití kryoprezervovaných, v antibioticích sterilizovaných aortálních alograftů, které jsou rezistentnější vůči peroperační infekci. Tato odolnost je vysvětlována přetrvávajícím účinkem antibiotik, ale i laminárnějším prouděním implantovaným alograftem.^{166, 167} Aortální alograft navíc umožňuje větší flexibilitu při řešení různých anatomických situací oproti náhradě protézou.

U pacientů s endokarditidou aortální chlopní náhrady je riziko reinfekce při opětovné náhradě protézou mezi 9-20%.¹⁶⁸ Uzávěr abscesových dutin perikardem může být úspěšný za předpokladu, že je tato dutina již sterilní. V opačném případě hrozí vytvoření nové abscesové dutiny. Často však bývá nutné rekonstruovat kořen aorty a v tomto případě je aortální alograft správnou volbou. Alternativou by mohla být i Rossova operace, která je ale mnohem komplexnějším výkonem, který přináší mnohá technická úskalí.

2.5.1.4 CHIRURGICKÁ LÉČBA INFEKČNÍ ENDOKARDITIDY TRIKUSPIDÁLNÍ CHLOPNĚ

Většinou postačí konzervativní léčba. Indikací k operaci jsou přetrvávající febrilie při adekvátní antibiotické léčbě trvající více než tři týdny nebo při mechanickém selhání chlopně. Princip léčby spočívá opět v odstranění infekční a infekcí postižené tkáně, pokud možno rekonstrukčním výkonem na chlopni.

PLASTIKA TRIKUSPIDÁLNÍ CHLOPNĚ

Nejpoužívanější rekonstrukční technikou je použití autologního perikardu. Tato technika umožňuje dostatečnou radikalitu a zároveň zajišťuje kompetentnost chlopně. Nejčastější postiženým bývá přední cíp, potom zadní. Septální cíp bývá postižený výjimečně. Oproti protetické náhradě je v tomto případě nižší riziko perzistující infekce nebo reinfekce. To platí obzvlášť v případě, že je možno provést plastiku bez protetického materiálu (bez anuloplastického prstence). V některých případech velmi rozsáhlého postižení není rekonstrukční výkon možný.^{169, 170}

NÁHRADA TRIKUSPIDÁLNÍ CHLOPNĚ

Excize infekcí postižené chlopně a její náhrada mechanickou chlopní nebo xenograftem představuje u intravenosních narkomanů zvýšené riziko perzistující infekce nebo reinfekce.¹⁷¹ Přetrvávající závislost je třeba léčit ve spolupráci s adiktology, praktickým lékařem a rodinou pacienta.

Nejsou k dispozici jasná data, která by favorizovala mechanické nebo biologické chlopně pro větší odolnost vůči infekci.¹⁷² Na druhou stranu použití mechanické chlopně s nutností warfarinizace, při často obtížné spolupráci drogově závislých pacientů, není optimálním způsobem léčby.

Samotné použití chlopních protéz v trikuspidální pozici je poměrně vzácné. U pacientů, u kterých nebylo možné provést zachovnou operaci, a chlopeň byla nahrazena, bývá často zmiňována vysoká peroperační mortalita.^{173, 174, 175} Sung et al. ale publikovali velmi přijatelné výsledky na souboru 78 pacientů, kterým byla provedena náhrada trikuspidální chlopně s velmi nízkou peroperační mortalitou 1,4%.¹⁷⁶

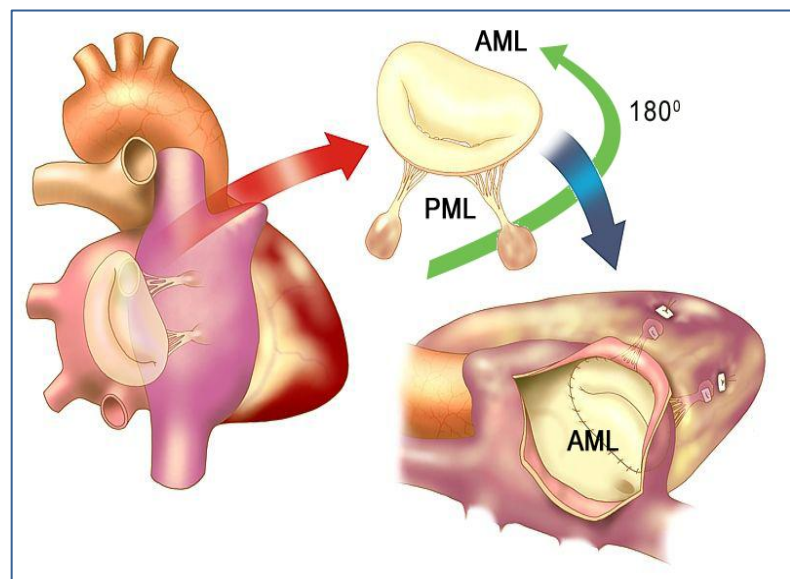
EXCIZE TRIKUSPIDÁLNÍ CHLOPNĚ

Alternativou k výkonu na chlopni může být i prostá excize trikuspidální chlopně postižené infekční endokarditidou. Výhodou je dostatečná radikalita a jednoduché technické provedení. Nevýhodou je pochopitelně vzniklá trikuspidální insuficience, která může být dobře tolerována, pokud není přítomna plicní hypertenze. Jsou udávány dobré dlouhodobé výsledky s touto technikou.¹⁷¹

IMPLANTACE MITRÁLNÍHO ALOGRAFTU DO TRIKUSPIDÁLNÍ POZICE

Kryoprezervovaný alograft je více odolný infekci.¹⁷⁷ U pacientů, u kterých není plastika trikuspidální chlopně možná, může být mitrální alograft výhodou oproti protetickým chlopním svou předpokládanou vyšší rezistencí vůči infekci.

Zatím jsou ale určité otazníky ohledně přípravy a kryoprezervace štěpu, techniky transplantace, a nejsou známy střednědobé a dlouhodobé výsledky.



Obrázek 8 - schéma implantace mitrálního alograftu

(autor ilustrace doc. Žáček, archiv TC Motol)

Technické aspekty implantace mitrálního alograftu zkoumali Vojáček et al. na ovčím modelu. Použili techniku rotace mitrálního alograftu o 180° , kdy přední cíp naléhá na bázi septálního a zadní cíp mitrální chlopně je orientován k volné stěně pravé komory. (viz Obrázek 8) Původní trikuspidální chlopeň byla excidována včetně šlašinek až k papilárním svalům. Byl ponechán malý lem báze septálního cípu, který měl usnadnit implantaci alograftu a zároveň snížit riziko poranění převodního systému. Nejprve byly naloženy podložené stehy k fixaci papilárních svalů, poté byl alograft našit do anulu pokračovacím stehem. Následně byly přes podložky zauzleny stehy fixující transventrikulárně papilární svaly. Autoři konstatují, že tento způsob implantace je technicky schůdný a reprodukovatelný.¹

2.6 DOSTUPNOST CHLOPENNÍCH ALOGRAFTŮ

Limitovaný počet dárců vedl ke snahám vytvářet chlopenní banky. Techniky skladování zahrnovaly prolongovanou expozici různým antibiotikům při teplotě 4°C. Obavy z přenosu infekce vedly k agresivním technikám sterilizace jako inkubace v několikerych antibioticích, ozařování i použití glutaraldehydu. I když se tím zvýšila dostupnost alograftů, tyto techniky vedly ke zhoršení výsledků a proto během 60. a počátkem 70. let přišlo mírné rozčarování z výsledků implantací alograftů.¹⁷⁸ Rozdíl mezi čerstvými a skladovanými alografty byl tak markantní, že se koncem 70. let začala používat metoda „fresh wet-stored“ – neagresivní sterilizace antibiotiky a skladování při 4°C do doby maximálně 6 týdnů.

Analýza souborů pacientů, kterým byly implantovány „fresh wet-stored“ alografty naznačovala, že viabilita tkání v době implantace je spojená s prodlouženou trvanlivostí. Skupina z Harefield Hospital, UK demonstrovala signifikantní negativní vliv teplé ischemie ($p < 0.01$) na trvanlivost alograftu (definované jako interval od smrti dárce k odběru chlopně).^{179, 180} Proto právě snaha transplantovat chlopně s viabilními fibroblasty, které mohou syntetizovat strukturální proteiny chlopně, a tím zlepšit jejich životnost vedla k technikám kryoprezervace, které měly zlepšit viabilitu implantované tkáně.¹⁸¹

V roce 1975 začal O'Brien v Brisbane používat alografty chlopní, které prošly šetrnou sterilizací antibiotiky po odběru tak, aby čas teplé ischemie byl co nejkratší, následně byly chlopně kryoprezervovány v dimethylsulfoxidu (DMSO) a byly programově zmrazeny a uschovány v tekutém dusíku při -196 °C. V jejich sérii navíc zpracovali chlopně několika zemřelých pacientů od 2 měsíců do 9,5 roku od implantace a konstatovali nejen viabilní fibroblasty, ale z chromozomální analýzy potvrdili „dárcovský“ původ těchto fibroblastů.^{182, 183} Stejná skupina následně popsala soubor 192 pacientů operovaných v období 1975-1986, kde v 10letém sledování dosáhli 0% reoperací pro degeneraci alograftu, s minimem tromboembolických příhod a 4% protetické endokarditidy. Důvodem k reoperaci byla většinou technická (geometrická) chyba vedoucí k regurgitaci. Jejich analýza navíc dokázala, že kombinace mladého recipienta a vyšší věk donora jsou rizikový faktor časnější degenerace čerstvých alograftů, tento závěr ale nebyl aplikovatelný na kryoprezervované alografty.

2.6.1 KRYOBIOLOGIE SRDEČNÍCH CHLOPNÍ

Kryoprezervační protokoly byly stanoveny empiricky. Ačkoliv kryoprezervace chlopní dosahuje velmi dobrých výsledků, jejím pochopením bychom mohli získat ještě lepší metody.

Jedna z prvních publikací o kryoprezervaci Polge, Smithe a Perkerse z roku 1949 popsala kryoprotektivní účinky glycerolu.¹⁸⁴ Následně v roce 1959 popsali Lovelock a Bishop jako kryoprotektivum dimethyl sulfoxid (DMSO),¹⁸⁵ který dodnes většina tkáňových bank používá.

I když se ve zmražených tkáních vytváří jak intracelulární tak extracelulární krystalky ledu, je viabilita tkání po rozmrazení velmi dobrá a není možné běžnými histologickými metodami identifikovat místa, ve kterých byl led přítomen. Pokud tomu tak je, bývá postižena hlavně extracelulární matrix, která je buď zdeformována, nebo i jasně poškozena.

Viabilita bývá definována jako schopnost tkání a buněk po zmrazení a rozmrazení vykonávat svou funkci. Chlopně tedy mohou být funkční (viabilní), i když viabilita v buněčném slova smyslu již neexistuje. Nicméně buněčná viabilita může být důležitá pro dlouhodobou funkci a trvanlivost. Například funkce fibroblastů je nepostradatelná pro skutečně dlouhodobé udržení celistvosti extracelulární matrix.¹⁸⁶

Několik autorů přineslo důkazy o tom, že fibroblasty přežívají alespoň týden, pokud jsou chlopně skladovány při 5-7°C.^{187, 188} Oproti tomu se buňky endotelu odpojují poměrně záhy. Srdce jsou při odběru většinou proplachována studeným fyziologickým roztokem nebo Ringem laktátem, aby byly odstraněny všechny zbytky krve a zároveň aby došlo k jeho zchlazení. U lidského srdce dochází k uvolňování endotelu při teplotě 4 °C po 3-8 hodinách,¹⁸⁹ zatímco u ledvin k uvolňování endotelu dochází až po několika dnech.¹⁹⁰

Zdá se, že proplach čerstvých srdečních chlopní Ringer laktátem způsobuje otok endoteliálních buněk a podílí se tak na jejich odpojení od povrchu.¹⁹¹ Fibroblasty jsou pravděpodobně daleko více odolné vůči tomuto mechanismu díky interakcím s extracelulární matrix. Z toho vyplývá, že pokud si přejeme zachovat buněčnou viabilitu je potřeba proplachovat srdeční chlopně protektivními transportními roztoky. Je ale třeba poznamenat, že vrstva endotelu je zodpovědná za imunogenicitu alograftů, a proto nemusí být její viabilita pozitivním faktorem pro dlouhodobou trvanlivost štěpu, protože může způsobit reakci štěpu proti hostiteli.¹⁸³

Mnoho dalších mechanismů, které během kryoprezervace probíhají, až na molekulární úrovni ovlivňují vlastnosti buněčných membrán a jejich iontových kanálů. Velkou roli zde hrají volné kyslíkové radikály, které jsou v normotermii udržovány v rovnováze peroxidázami a antioxidanty. Hypotermie navozuje nerovnováhu mezi jejich odbouráváním a produkcí. Tyto volné kyslíkové radikály posléze tvoří super oxidy, hydrogen peroxidy a hydroxylové radikály. Tyto chemické látky jsou vysoce reaktivní s buněčnými komponentami. Lipidová peroxidace v buněčných membránách vede k poruše permeability pro kalcium, které se dostává do buněk a vede k ireverzibilnímu poškození.^{192, 193}

Je pravděpodobné, že krátká ischemie a minimální manipulace před kryoprezervací vede ke zlepšené funkci štěpu. Zdá se, že drobné změny na subcelulární úrovni, které utrpí alografty při odběru, mohou zvýšit senzitivitu buněk na další kroky zpracování.^{194, 195} Další studie prokázaly, že použití inhibice adenosin deaminázy a nukleosidového transportu mohou předcházet a dokonce i korigovat reverzibilní metabolický deficit buněk.¹⁹⁶

2.6.2 METODY POUŽÍVANÉ PŘI ZPRACOVÁNÍ CHLOPENNÍCH ALOGRAFTŮ V SOUČASNOSTI

Chlopenní alografty jsou obvykle zpracovávány v následujících krocích:

- odběr srdce, nejlépe jako součást multiorgánového odběru, případně od žijícího dárce při transplantaci srdce
- interval teplé ischemie
- chlazení v transportním roztoku
- preparace kořene aorty a plicnice
- desinfekce antibiotickým roztokem
- uložení do kryoprotektivního roztoku
- programované zmrazení

Doba trvání teplé ischemie, tedy čas od zastavení srdce dárce do doby iniciálního ochlazení alograftu, má významný vliv na viabilitu endotelu a buněk cípů v době implantace. Detailní ultrastrukturální studie, prokazující vliv teplé ischemie na buněčné poranění byly provedeny na porcinních i lidských aortálních a pulmonálních chlopních.^{197, 198} První známky reverzibilního poškození byly registrovány už po 40 minutách teplé ischemie. Okolo 40% buněk cípů jevílo známky ireverzibilního poškození po 16-20 hodinovém intervalu teplé

ischemie. Poškození buněk endotelu hlavně v iniciální fázi zpracování alograftu popisuje také Burkert et al.¹⁹¹

Chlopenní alografty jsou zpracovávány v boxu s laminárním prouděním, který poskytuje superaseptické prostředí. Po celou dobu zpracování by měla být teplota zpracovávaného alograftu v rozmezí 1-10°C. Velmi důležité je měření velikosti zpracovávaných alograftů, jeho správným provedením se vyhneme prodloužení svorkového času při případné korekci nepochybně velikostí při transplantaci štěpu.

Desinfekce chlopenních alograftů se provádí inkubací v antibiotických roztocích za použití nízkých koncentrací širokého spektra antibiotik.¹⁹⁹ Před inkubací v antibioticích jsou prováděny odběry mikrobiologické kontaminace. I když by se dalo předpokládat, že srdce odebrané v rámci multiorgánového odběru je sterilní a může být tedy ihned transplantováno nebo kryoprezervováno, až 53% multiorgánových dárců mělo pozitivní kultivace.²⁰⁰ Proto je inkubace v antibioticích před dalším zpracováním obecně akceptována a mikrobiologická kontrola výsledku procesu povinná. Protokoly jednotlivých tkáňových bank ohledně použití konkrétních antibiotik se liší mezi jednotlivými pracovišti, navíc se v určitých intervalech průběžně mění kombinace antibiotik v závislosti na výsledcích kultivací z odebraných vzorků. Spolupráce s klinickým mikrobiologem je povinným standardem všech tkáňových bank.

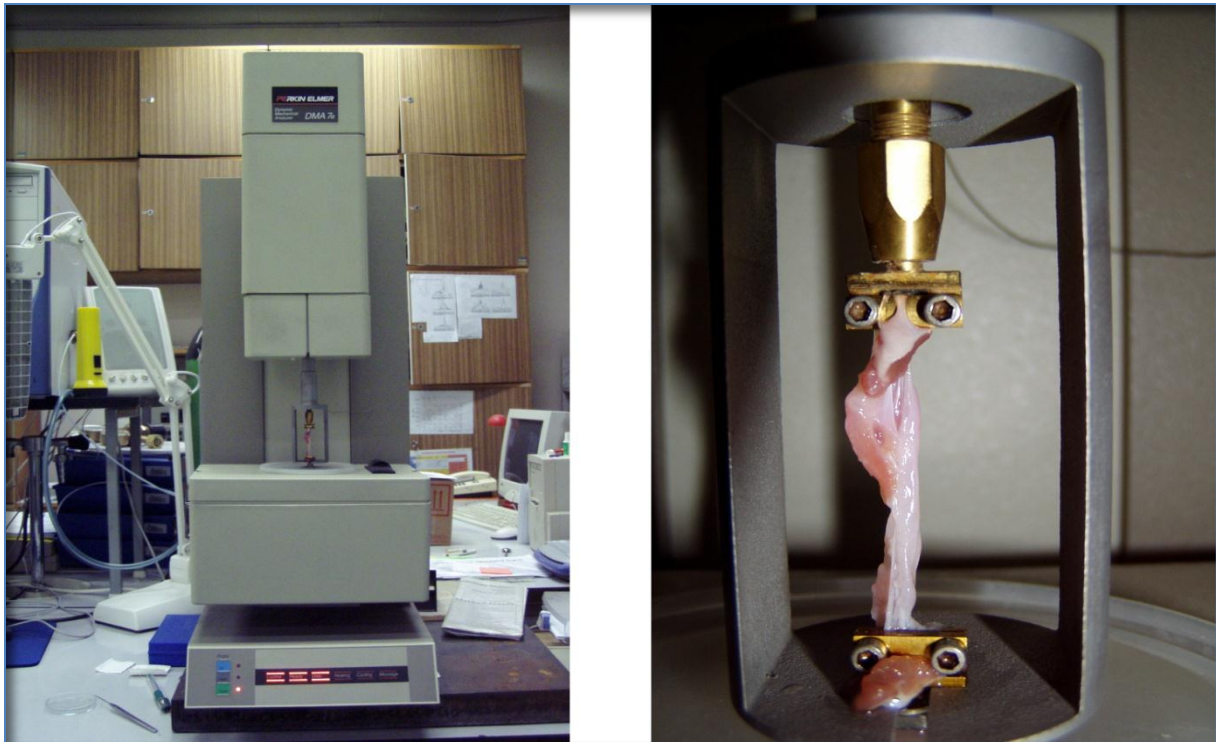
Po inkubaci v antibioticích jsou alografty zabaleny do dvojitého obalu v kryoprotekčním roztoku jehož hlavní součástí bývá dimethylsulfidoxid nebo glycerol. Cílem je vytěsnit ze tkáně štěpu vodu, která při mražení tvoří krystaly ledu. Zmrazování probíhá postupně, tak aby se tkáň ochlazovala o 1 °C za minutu do teploty -60 °C. Proces standardně probíhá v počítačem řízeném přístroji. Po té jsou alografty uloženy v tekuté fázi dusíku s teplotou -196 °C. Je důležitá důsledná monitorace procesu zmrazování u každého jednotlivého vzorku. Některé tkáňové banky dokonce dodávají i záznamy křivek zmrazování, tak aby měl chirurg jistotu, že byl dodržen protokol kryoprezervace a optimální rychlost poklesu teploty štěpu.

3. CÍLE VLASTNÍ EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE

Práce navazuje na výzkumný záměr autorů Vojáčka a Mokráčka, kteří zkoumali technické aspekty implantace mitrálního alograftu do trikuspidální pozice na ovčím modelu.^{1,2} V první fázi experimentu nejprve ovce echokardiograficky vyšetřili, poté odebrali 20 ovčích mitrálních alograftů. Tyto alografty byly zpracovány a uloženy stejným způsobem, jaký používá tkáňová banka transplantačního centra Fakultní nemocnice v Motole v Praze. Alografty byly uskladněny na 3 měsíce v tkáňové bance a po té implantovány 13 ovčím. Implantované alografty byly hodnoceny jak přímým simultánním měřením tlaků v pravé síni a v plicnici, tak také epikardiální echokardiografií. Poté byla zvířata usmrcena a mitrální alografty byly explantovány, a byly hodnoceny jejich mechanické vlastnosti prostou trhací zkouškou. Byla zjištěna uspokojivá funkce mitrálního alograftu: 8 bylo bez regurgitace, 3 se stopovou regurgitací a 2 s mírnou. Hodnocení orientační trhací zkouškou prokázalo dobré mechanické vlastnosti jak tkáně samotné chlopně, tak šlašinek i papilárních svalů, stejně tak jako anulu. Trhací zkouška byla prováděna naložením polypropylenového stehu do středu předního a zadního cípu. Operátér poté hodnotil, jak velkou sílu musel vynaložit na vytržení stehu z cípu. Pochopitelně tato zkouška testuje mechanické vlastnosti pouze orientačně. Cílem této experimentální práce bylo zhodnotit mechanické vlastnosti objektivnější metodou než jen jednoduchou trhací zkouškou.

Nejprve jsme na prasečích srdcích provedli pilotní studii, kde jsme připravovali matematický model a zároveň řešili praktické aspekty měřicího zařízení, různé způsoby uchycení vzorků, jejich tvar a vhodnou velikost. Původní dynamický mechanický analyzátor DMA7e Elmer-Perkins z laboratoří Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy v Praze se ukázal jako obtížně použitelný pro velmi nepraktický způsob upínání vzorků i jejich nevyhovující velikost.

Původní záměr měřit vlastnosti jednotlivých částí mitrální chlopně (cíp v různých směrech, anulus, šlašinky) se ukázal jako prakticky nerealizovatelný. Takové množství čerstvých i zmražených mitrálních alograftů nebylo z finančních důvodů možné použít. Navíc vysoká variabilita mitrální chlopně by stejně neumožňovala získat reprodukovatelné výsledky měření získaných původně zamýšleným způsobem.



Obrázek 9 - dynamický mechanický analyzátor DMA7e Elmer-Perkins (vlevo) s detailem upnutí vzorku mitrálního alograftu (vpravo)

Proto jsme se rozhodli zaměřit se na visko-elastické vlastnosti mitrální chlopně jako celku. V pilotní studii na prasečích srdcích jsme si ověřili, že tento způsob je realizovatelný a dobře reprodukovatelný. Vhodné měřicí zařízení (trakční zařízení ZwickRoel) jsme zajistili na katedře mechaniky Západočeské univerzity. Na tomto stroji bylo možné realizovat plánovaná měření, která dobře korespondovala s teoretickým modelem. Upnutí celého mitrálního alograftu do čelistí zařízení za anulus a papilární sval umožnilo hodnotit vlastnosti alograftu jako celku, tj. anulus, přední cíp, šlašinky a papilární sval najednou.

Cílem naší studie bylo ověřit, jestli proces kryoprezervace mitrálních alograftů nemění jejich mechanické vlastnosti. Použitý způsob kryoprezervace byl shodný s tím, jaký používá tkáňová banka Transplantačního centra Fakultní nemocnice v Motole pro kryoprezervaci a skladování lidských aortálních a plicnicových alograftů.

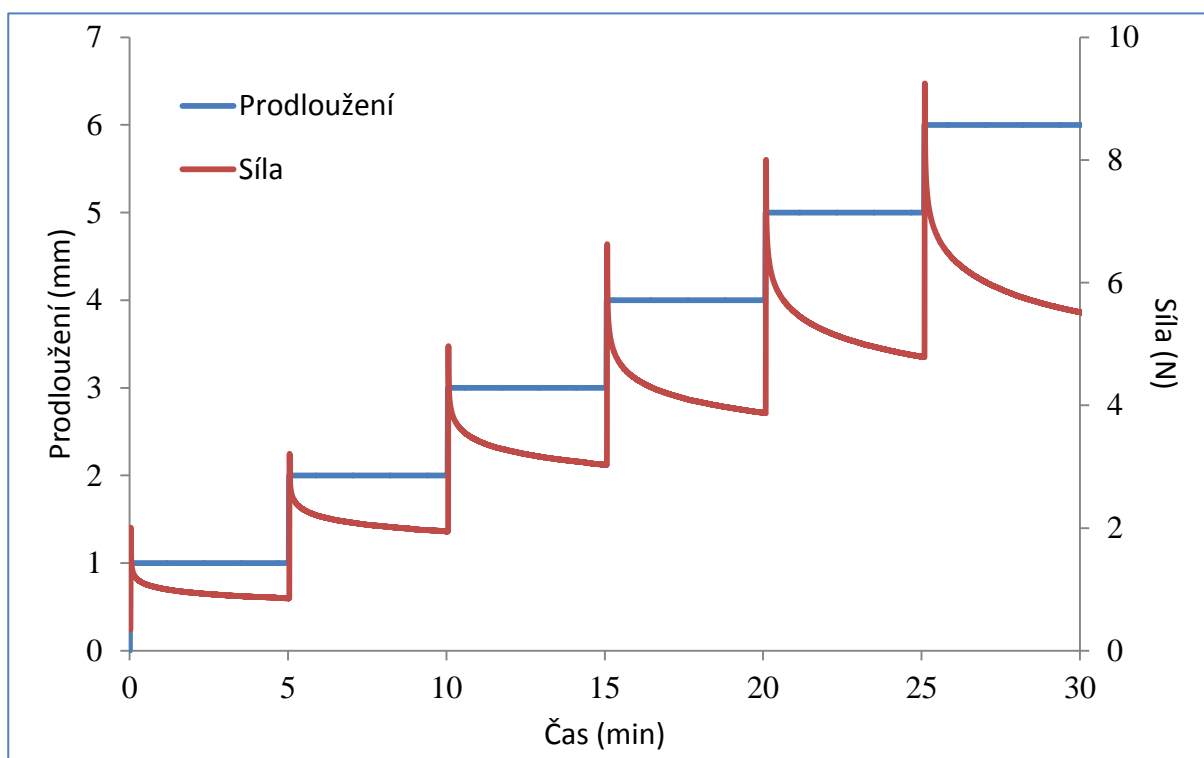
4. POUŽITÁ METODIKA

4.1 PŘÍPRAVA A ZPRACOVÁNÍ MITRÁLNÍCH ALOGRAFTŮ

Všechny pokusy provedené v rámci studie byly provedeny dle celosvětově přijatých standardů a v souladu s doporučeními odborné komise na ochranu zvířat v Institutu Klinické a Experimentální Medicíny v Praze a podle vyhlášky č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat.

4.1.1 PROTOKOL EXPERIMENTU

Vzorek byl zatížen skokovým prodloužením 1 mm po dobu 5-ti minut a tato zátěž byla vzorku předepsána v šesti zatěžovacích cyklech. Přístroj zaznamenával sílu, kterou vzorek reagoval na zatížení. Výstupem z přístroje tedy byla křivka závislosti síly na čase. Ukázkou křivky



Obrázek 10 - Ukázkou křivky předepsaného prodloužení a zaznamenané síly pro jeden vybraný vzorek

předepsaného prodloužení a zaznamenané síly pro jeden vybraný vzorek znázorňuje *Obrázek 10*. Celková doba měření jednoho vzorku tedy byla 30 minut.

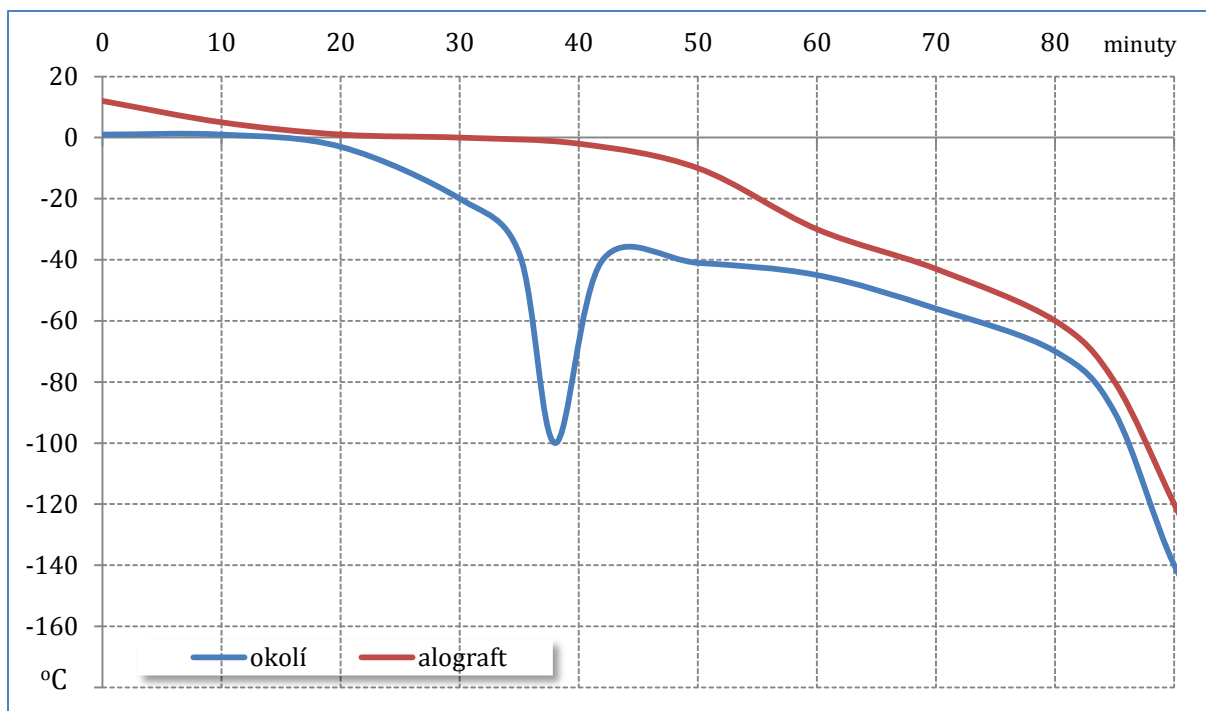
Doba trvání cyklu byla zvolena tak, aby na konci cyklu došlo přibližně k ustálenému stavu, kdy se síla (napětí) ve vzorku mění již jen minimálně, a zároveň tak, aby celková doba testu byla co nejkratší a ve tkáních nedocházelo k degradačním procesům.

4.1.2 ODBĚR MITRÁLNÍHO ALOGRAFTU

V první fázi experimentu bylo odebráno 13 mitrálních alograftů. Třináct ovcí ve věku 1 roku a hmotnosti 25 – 34 kg bylo operováno v celkové anestézii. Pro přístup k odběru srdce byla zvolena anterolaterální pravostranná torakotomie v 5. mezižebří. Zvíře bylo usmrceno intravenózním podáním Thiopentalu (Thiopental, ICN, Czech Republic a.s. - 10mg/kg) a KCl (Kalium Chloratum, Zentiva a.s., Praha - 20ml/kg) a srdce explantováno. Za sterilních podmínek byl odebrán mitrální alograft s okraji levé síně a levé komory a s celým subvalvulárním aparátem včetně obou papilárních svalů a přilehlého myokardu levé komory.

4.1.3 ZPRACOVÁNÍ A KRYOPREZERVACE MITRÁLNÍHO ALOGRAFTU

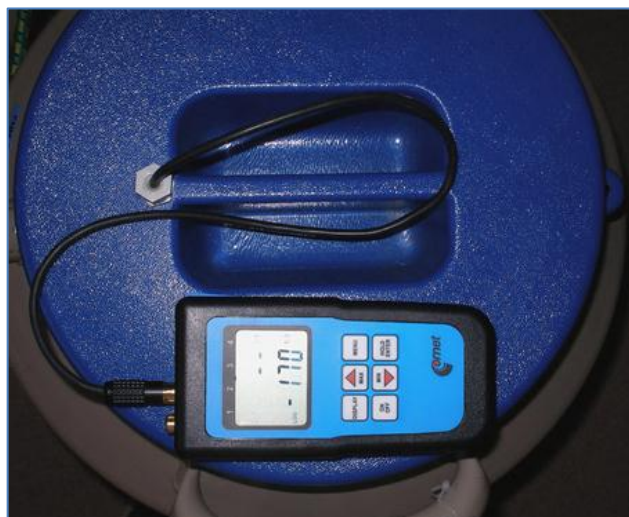
Mitrální alografty byly zpracovány a kryoprezervovány ve Specializované tkáňové bance Transplantačního centra FN Motol (kód Ministerstva zdravotnictví ČR: STB85), a to stejným způsobem jako lidské alografty.^{201, 202} Odebrané mitrální chlopně byly spolu se svým subvalvulárním aparátem uloženy přímo do kultivačního media E 199 s antibiotiky - Cefuroxime 0.2 mg/ml, (Zinacef, GlaxoWellcome) + Piperacillin 0.2 mg/ml (Pipril, Lederle) + Amikacin 0.1 mg/ml (Amikin, Bristol-Myers Squibb) + Fluconazol 0.1 mg/ml (Diflucan, Pfizer). Po 24 hodinovém uložení při teplotě 37.0 °C byly chlopně skladovány při teplotě +5-7°C po dobu 3–5 dnů. V laminárním boxu byly potom přemístěny superseptickou technikou do kryoprotekčního roztoku (E 199 s 10% dimethylsulfidoxidem) a zataveny do plastických vaků (Gambro Hemofreeze bags NPBI BV DF 1200, The Netherlands) dvouvrstevnou technikou. Nakonec byly programově zmrazeny s řízeným poklesem teploty v rozmezí +10 až -60 °C (-1 °C/min.) jak znázorňuje *Obrázek 11* a uloženy do samostatného kontejneru do tekuté fáze tekutého dusíku s teplotou -196°C.



Obrázek 11 – teplota ovčího mitrálního alograftu během programového zmrazování. (červená křivka znázorňuje teplotu zmrazovaného alograftu, modrá znázorňuje teplotu v mrazící komoře)

4.1.4 ROZMRAŽENÍ MITRÁLNÍHO ALOGRAFTU

Po skladování po dobu 6 měsíců byly štěpy transportovány stejným způsobem jako lidské alografty a byly rozmrazeny opět standardním způsobem, který se používá pro lidské alografty aortální i pulmonální. Alografty byly na experimentální pracoviště dopraveny v kontejneru (Transportní Dewarova nádoba CP 500, Tailor Wharton HARSCO) v plynné fázi tekutého dusíku s trvale kontrolovanou teplotou (Registrační teploměr D0221, COMET SYSTEM s.r.o. Rožnov pod Radhoštěm) v rozmezí -160 – 190°C



Obrázek 12 - detail víka transportní nádoby s registračním teploměrem (archiv TC FN Motol)

(Obrázek 12). Štěpy byly vyjmuty z obalu a během 30 minut rozmrazeny (15 minutová ekvilibrace při pokojové teplotě a dalších 30 minut ve vodní lázni, teplé 37°C). Následně byl

otevřen dvouvrstevný vak a štěpy byly položeny na instrumentační stolek. Vyplavení kryoprotektiva (10% dimetylsulfidoxid) bylo provedeno postupným trojnásobným promytím štěpů v ledovém fyziologickém roztoku.

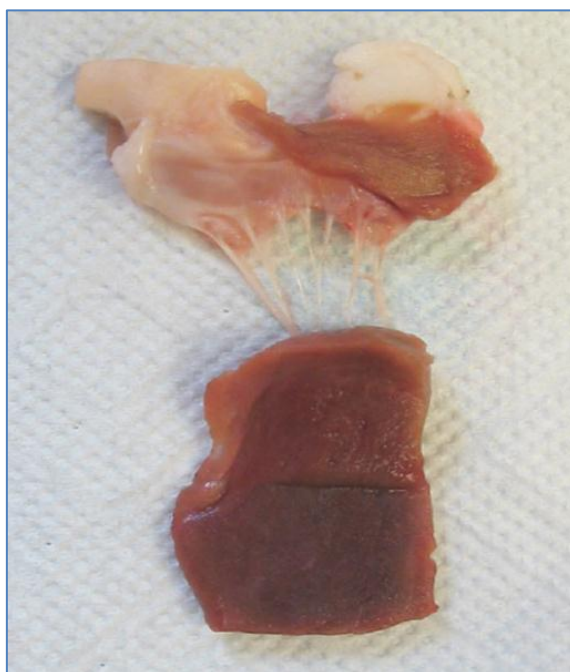
Čerstvé mitrální alografty byly po odběru uloženy do fyziologického roztoku při teplotě 5-7 °C. Byly zpracovány do 24 hodin.

4.2 METODIKA EXPERIMENTU

4.2.1 PŘÍPRAVA VZORKU PŘED MĚŘENÍM

V experimentu jsme použili 13 kryoprezervovaných a 39 čerstvých mitrálních alograftů. Všechny chlopně byly zpracovány způsobem popsaným v kapitolách 4.1.3 a 4.1.4. Příprava kryoprezervovaných chlopní po jejich rozmražení dále probíhala již stejným způsobem jako byly připravovány čerstvé mitrální alografty.

Z celého alograftu byla vypreparovaná ve všech vzorcích co nejvíce podobná část chlopně, která byla použita pro měření. Obsahovala část předního cípu v místě aorto-mitrální kontinuity s částí aortální stěny a ostatních přilehlých tkání tak, aby korespondující šlašinky vedly k jednomu papilárnímu svalu, který byl ponechán i s částí svaloviny levé komory. Papilární sval byl upraven do tvaru, který umožňoval upnutí do měřícího zařízení. Obdobným způsobem musela být téměř vždy upravena i anulární část předního cípu (*Obrázek 13*).



Obrázek 13 - vzorek mitrálního alograftu po provedeném měření

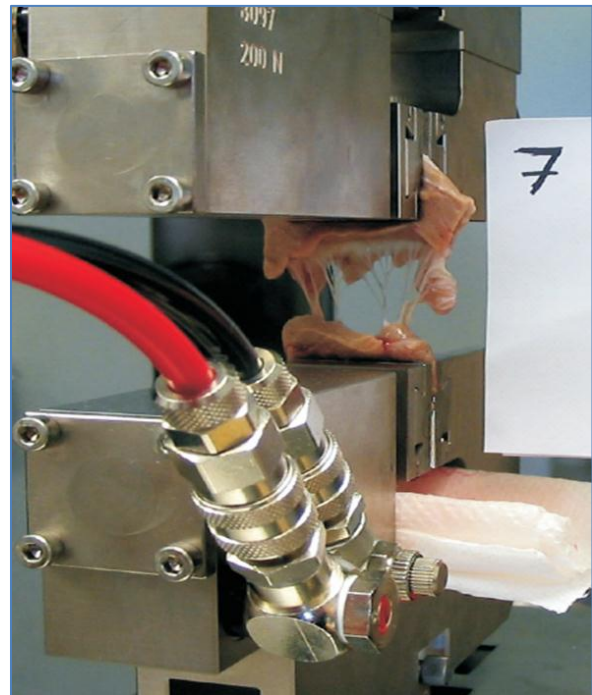
Tímto způsobem bylo upraveno všech 52 měřených vzorků. Nešetkali jsme se s anatomickou variantou, která by neumožňovala tento způsob přípravy vzorku z celého mitrálního alograftu.

4.2.2 MĚŘÍCÍ ZAŘÍZENÍ

Všechna mechanická měření jsme prováděli na bezprostředně připravených vzorcích mitrálních alograftů. K měření jsme použili trakční stroj Zwick Roell Z050 (*Zwick GmbH & Co, Germany, <http://www.zwick.de>*), který umožňuje testovat normalizované i nenormalizované vzorky různých materiálů a zaznamenávat jejich mechanické vlastnosti. Základní silový měřicí rozsah je od 0 do 50 kN s možností jeho ponížení pomocí zvolené měřicí buňky. Na stroji lze provádět tahové, tlakové, ohybové a v omezené míře i cyklické a smykové zkoušky. Základ stroje tvoří uzavřený rám, který je stavitelně přišroubován na dvou nohách. Konstrukce nohou umožňuje nastavení rámu a tím pracovního prostoru stroje do potřebné výšky. V rámci základního vybavení stroje jsou k dispozici univerzální čelisti. Jedna z nich je připojena ke spodní části uzavřeného rámu, druhá je spojena k pohyblivému příčnicku. Pohyb příčnicku je umožněn vestavěným pohonem, který tvoří dva kuličkové šrouby spojené ozubeným řemenem s elektromotorem. K dalšímu vybavení stroje patří extenzometr pro měření relativního prodloužení, termokomora s rozsahem teplot od -80 do 250 °C a pneumatické čelisti s nastavitelným pracovním tlakem sevření pro uchycení např. biologických tkání. Stroj využívá měřicí a vyhodnocovací grafické rozhraní programu testXpert v 10.11, kde lze sledovat konkrétní hodnoty včetně grafické závislosti napětí – deformace nebo síla – prodloužení. Prodloužení, stlačení nebo průhyb lze odměřovat z pohyblivého příčnicku (absolutní hodnoty) nebo z extensometru (relativní hodnoty). Vše řídí elektronika stroje.

Pro měření jsme použili pneumatické čelisti pro fixaci vzorku a 200N měřicí buňkou. Vzorek byl upnut do čelistí měřícího zařízení za mitrální anulus s lemem tkáně aorty a za tvarově vhodně upravený papilární sval (*Obrázek 14*).

Během experimentu jsme nebyli nuceni přerušit měření v důsledku uvolnění vzorku z čelistí.



Obrázek 14 - vzorek upevněný v čelistech trakčního stroje Zwick Roell Z050

4.2.3 AKVIZICE DAT

Frekvence ukládání dat je automaticky nastavena přístrojem a může se pro každý vzorek lišit. Počet datových bodů závislosti síly na čase byl tedy pro každý vzorek jiný a pohyboval se okolo 2800 bodů na jeden zatěžovací cyklus. To odpovídá frekvenci akvizice přibližně 10 Hz. Aby mohly být porovnány mezi sebou křivky různých cyklů i vzorků, interpolovali jsme data kubickým splinem na přesně 1200 datových bodů.

Poznamenejme, že spline je lokální interpolace taková, že kromě průchodu všemi uzlovými (datovými) body má v těchto bodech (kromě bodů okrajových) spojitou alespoň první derivaci. Je známo, že existence n -té derivace zajišťuje spojitost $(n-1)$ -té derivace. Kubický spline používá pro konstrukci interpolačního splinu kubické polynomy (polynomy třetího řádu). Lokální proložení umožňuje ve srovnání s globálním proložení použití jednoduchého polynomu a navíc nízkého řádu. Polynomy vyšších řádů totiž vedou k nechtěným oscilacím (tzv. Rungeho jev). Zjednodušeně řečeno jde tedy o lokální proložení dat dostatečně spojitou a hladkou funkcí, která poskytuje přesné výsledky a zároveň je jednoduchá a nenáročná na výpočetní kapacitu.

4.2.4 MAXWELLŮV MODEL

Výše popsany test patří mezi tzv. relaxační testy, v nichž je materiál skokově zatížen předepsanou deformací a tato deformace se nemění po předepsanou dobu. Napětí v materiálu se skokově zvýší, aby následně začalo klesat. Říkáme, že v materiálu dochází k relaxaci napětí. Matematickým modelem vhodným k popisu relaxace napětí je zobecněný Maxwellův model. Zobecněný Maxwellův model sestává z n paralelně spojených Maxwellových těles. Maxwellovým tělesem nazýváme do série zapojený elastický (E) a viskózní prvek (η). Elastický prvek si lze představit jako pružinu, zatímco viskózní prvek jako tlumič. K paralelně řazeným Maxwellových tělesům je často navíc zařazen paralelně jeden elastický prvek (E_p). Zobecněný Maxwellův model schematicky znázorňuje *Obrázek 15*.

Předpokládáme, že chování všech prvků je lineární. Celková síla $F(t)$ je součtem sil všech paralelních větví:

$$(1) \quad F(t) = F_p + \sum_{i=1}^n F_i(t).$$

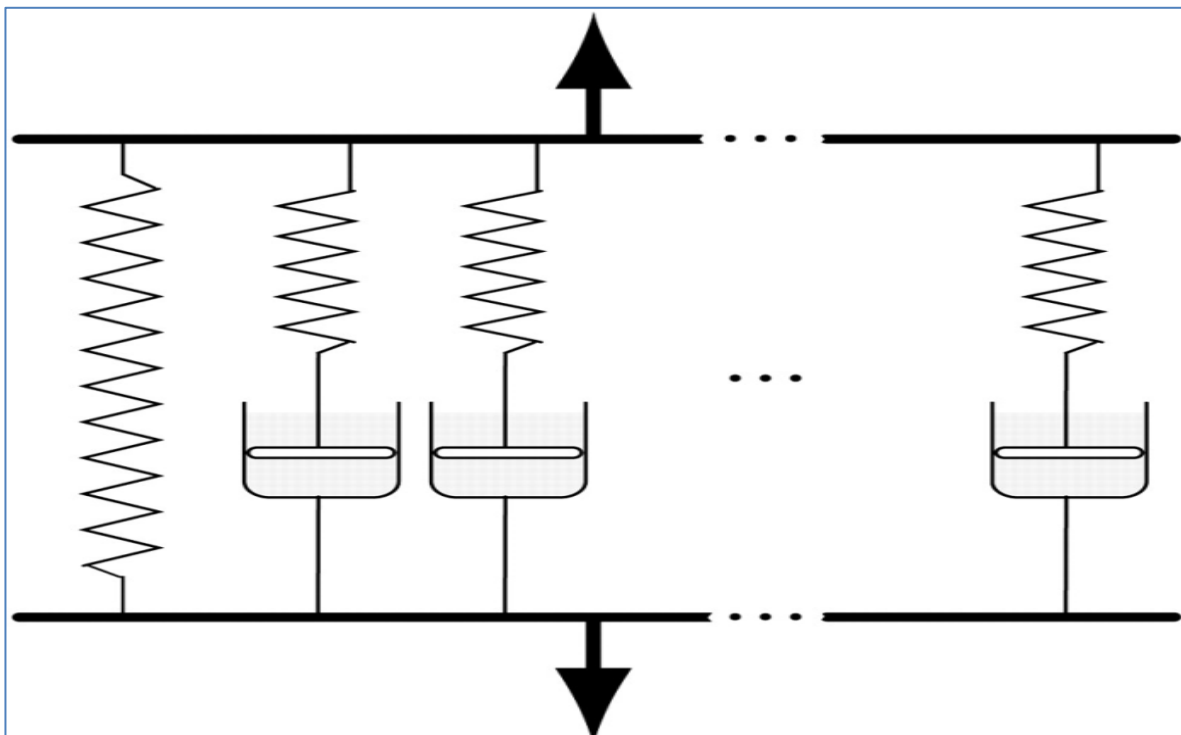
$F_P = e_0 E_P$ je síla samostatného elastického prvku. Tato síla je úměrná elastickému modulu E_P a skokovému zatížení (deformaci) e_0 . Předpokládáme, že zatížení $e(t) = e_0$ je v každém zatěžovacím cyklu okamžité a po dobu cyklu konstantní. Derivace zatížení $e(t)$ podle času je tedy v průběhu cyklu nulová a diferenciální rovnice popisující chování Maxwellova tělesa (i -té větve Maxwellova zobecněného modelu) získává tvar:

$$(2) \quad dF_i(t)/dt + \tau_i^{-1}F_i(t) = 0.$$

Povšimněme si tzv. relaxační doby $\tau_i = \eta_i/E_i$. Ta vyjadřuje čas nutný k relaxaci části napětí úměrné modulu E_i . Počáteční podmínka v čase $t = 0$ má tvar $F_i(0) = e_0 E_i$. Na samém počátku zatížení má tedy vliv pouze elastická složka modelu. Viskózní složka se projeví až s narůstajícím časem. Řešení výše uvedené diferenciální rovnice pro i -tou větev Maxwellova zobecněného modelu má tvar:

$$(3) \quad F_i(t) = e_0 E_i \exp(-t/\tau_i).$$

S rostoucím časem tedy dochází k exponenciálnímu poklesu síly (a potažmo napětí) v každé větvi Maxwellova zobecněného modelu. Tento pokles závisí na elastickém parametru E_i a viskózním parametru η_i . Jsou-li tyto materiálové parametry odlišné pro každou z větví, pokles



Obrázek 15 – schematické zobrazení zobecněného Maxwellova modelu

síly (napětí) bude v každé větvi jinak rychlý a v limitě (nekonečném čase) bude směřovat k jiné hodnotě síly (napětí). Součet všech složek (větví) vede ke konečnému výrazu pro výpočet síly Maxwellova zobecněného modelu:

$$(4) \quad F(t) = e_0 E_p + \sum_{i=1}^n e_0 E_i \exp(-t/\tau_i).$$

V našem případě bylo $n = 2$. Ve výrazu pro výpočet síly tedy vystupuje pět materiálových parametrů (E_p , E_1 , E_2 , η_1 a η_2), které musejí být určeny z experimentálních dat.

Poznamenejme, že výše uvedená rovnice (4) je též nazývána Pronyho řadou. Ta je často vyjadřována pomocí Pronyho koeficientů $p_i = E_i/E_0$, kde $E_0 = E_p + \sum E_i$ je tzv. okamžitý elastický modul. Jedná se o elastický modul materiálu v čase $t = 0$. S rostoucím časem dochází k relaxaci napětí a projevu viskózní složky materiálu. V čase $t \rightarrow \infty$ má materiál elastický modul E_p , který je někdy rovněž nazýván rovnovážným modulem, neboť v nekonečném čase předpokládáme, že celý systém se nachází v rovnováze a nedochází k další relaxaci napětí. Pronyho koeficient p_i tedy ukazuje zlomek okamžitého elastického modulu, k jehož poklesu dojde za relaxační dobu τ_i .

4.2.5 IDENTIFIKACE MATERIÁLOVÝCH PARAMETRŮ

Pro každý zatěžovací cyklus tedy bylo nutno určit pětici materiálových parametrů. K identifikaci materiálových parametrů jsme použili vyrovnávacího počtu a statistického balíku R (The R Project for Statistical Computing, <http://www.R-project.org>). K výpočtu jsme použili Gaussova-Newtonova algoritmu založeného na nelineární metodě nejmenších čtverců. Pětice hodnot materiálových parametrů tak byla určena pro všechny měřené vzorky ve všech šesti zatěžovacích cyklech.

Metoda nejmenších čtverců je matematicko-statistická metoda používaná hojně v mnoha vědních oborech při zpracování nepřesných dat. Jejím typickým použitím je zpracování experimentálních dat obdržených měřeními. Obecně je cílem metody eliminace chyb prováděná vzhledem k danému kritériu. Častou aplikací této metody je prokládání naměřených dat známou analytickou funkcí. To je i případ našeho použití této metody, kdy prokládáme naměřenou závislost síly na čase analytickou funkcí vyjádřenou rovnicí (4). V určitém smyslu jde o analogii ke kubickému splinu, ale v případě metody nejmenších

čtverců nemusí daná funkce nutně procházet datovými body a často jimi ani neprochází. V každém bodě tak dochází k lokální chybě (rozdíl mezi naměřenými hodnotami a hodnotami teoretické funkce) a součet čtverců těchto chyb představuje kritérium, které se snažíme minimalizovat. Gaussův-Newtonův algoritmus je pak jen návodem, jak daný minimalizační problém co nejefektivněji řešit.

Každá numerická úloha vyrovnávacího počtu vyžaduje počáteční odhad hledaných parametrů. Algoritmus řešení potom vychází z těchto počátečních parametrů a hledá jejich optimální hodnoty tak, aby bylo splněno dané optimalizační kritérium, v našem případě minimální součet čtverců lokálních chyb. Problém vyrovnávacího počtu spočívá často v nejednoznačnosti řešení. V praxi to znamená, že pro jednu skupinu naměřených dat či jednu experimentální křivku je možno obdržet nekonečně mnoho skupin hledaných parametrů, které vyhovují optimalizačnímu kritériu. Tento problém je vlastní samotné úloze optimalizace a obecně nezávisí na tvaru teoretické funkce, která představuje matematický model. Může se stát, že výsledkem bude skupina parametrů, která dobře vyhovuje optimalizačnímu kritériu, ale neposkytuje fyzikálně smysluplný model. Příkladem může být záporný modul pružnosti. V případě, že jsou známa termodynamická omezení hodnot fyzikálních parametrů, lze tato učinit součástí optimalizačního procesu. Hovoříme pak o optimalizaci s vazbami. Optimalizační úloha se tím však komplikuje a často nedává uspokojivé výsledky.

Výsledek úlohy vyrovnávacího počtu může silně záviset na počátečním odhadu parametrů. Je na zkušenosti experimentátora, aby vybral (alespoň řádově) dostatečně fyzikálně smysluplné počáteční hodnoty hledaných parametrů. V této studii jsme volili počáteční hodnoty řádově blízké výsledným parametrům. Úloha optimalizace s vazbami, v níž jsme omezili hledané hodnoty na kladná reálná čísla, nevedla k uspokojivým výsledkům a často i numericky selhala. Přiklonili jsme se tedy k jednodušší optimalizaci bez vazeb. Ta sice v několika málo případech vedla k záporným hodnotám některých koeficientů, ale odpovídající vzorky byly vyřazeny ze statistického souboru jako odlehlé (vybočující) hodnoty.

4.2.6 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ

Obdržené hodnoty materiálových parametrů byly prozkoumány zvlášť pro každý zatěžovací cyklus. Odlehlé hodnoty byly určeny standardními metodami průzkumové analýzy a ze statistického souboru byly vyřazeny. Poznamenejme, že účelem průzkumové analýzy dat je odhalit zvláštnosti v datech a ověřit předpoklady pro jejich následné statistické zpracování.

Průzkumová analýza dat používá především grafických metod, které slouží ke zjednodušení popisu dat a zjištění či zlepšení jejich rozdělení. My jsme ke studiu dat a k odhalení vybočujících hodnot použili grafickou metodu krabicového grafu a vestavěné funkce statistického balíku R. K vyřazení odlehlých dat bylo použito iterativního procesu. Pokaždé, když byla odhalena odlehlá hodnota jednoho z pěti viskoelastických parametrů, byl ze statistického souboru vyřazen celý vzorek, t.j. všech pět viskoelastických parametrů tohoto vzorku. To samozřejmě vedlo ke změně rozdělení všech pěti parametrů, a proto byl celý proces identifikace znovu opakován pro všech pět parametrů, dokud nedošlo k vyřazení všech odlehlých hodnot.

Všechna data měla po vyřazení odlehlých hodnot normální rozdělení. K otestování nulové hypotézy, že jednorozměrná populace dat pochází z normálního rozložení, jsme použili Shapirova-Wilkova testu. Tento test byl aplikován na všech pět viskoelastických parametrů.

Pro každý viskoelastický parametr a každý zatěžovací cyklus jsme testovali dvě nulové hypotézy: hypotézu shody středních hodnot a hypotézu shody rozptylu kontrolní a testované skupiny. Pro porovnání středních hodnot jsme použili t-test a pro porovnání rozptylů F-test. T-test předpokládá, že oba výběry pocházejí z normálního rozložení. Tento předpoklad byl v našem případě dodržen, i když tomu tak obecně nemusí být za každou cenu. T-test pracuje s průměry obou výběrů a ty mají při rozsahu výběru v řádu desítek přibližně normální rozdělení díky centrální limitní větě. Dalším předpokladem t-testu je shoda rozptylu obou náhodných výběrů. K ověření tohoto předpokladu byl použit právě F-test. Poznamenejme, že existují i modifikace t-testu pro výběry s různými rozptyly. Všechny statistické testy byly provedeny se zvolenou hladinou významnosti $\alpha = 0,05$.

5. VÝSLEDKY

5.1 VÝSLEDKY ODBĚRU A ZPRACOVÁNÍ MITRÁLNÍCH ALOGRAFTŮ

U všech laboratorních zvířat se podařilo po jejich usmrcení odebrat kvalitní mitrální alograft. U žádného zvířete jsme nenalezli papilární sval IV. typu, kdy vyrůstají šlašinky přímo ze stěny levé komory.²⁰³ Nebylo tedy nutné žádný alograft vyřadit z experimentu.

Vlastnosti a kvalita kryoprezervovaných mitrálních alograftů byly po rozmražení velmi dobré, bez viditelných defektů.

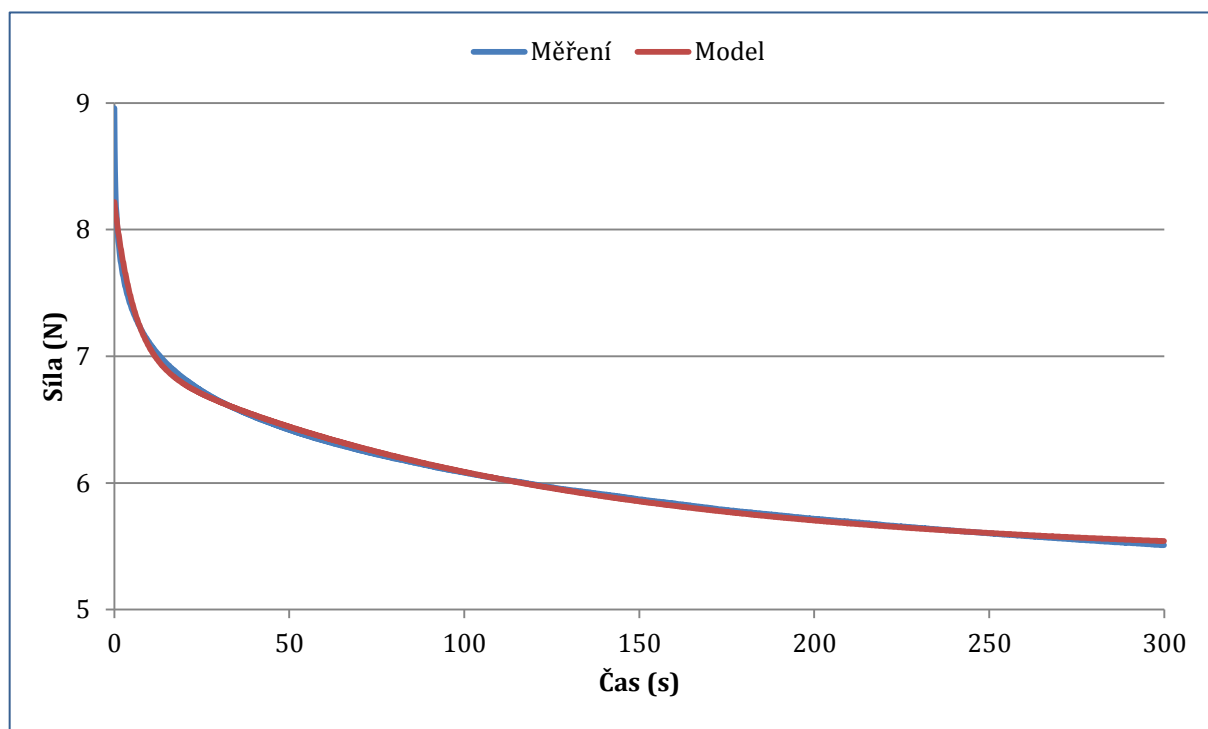
5.2 NAMĚŘENÉ HODNOTY

Kvalitu proložení naměřených bodů teoretickou křivkou jsme posuzovali prostřednictvím indexu korelace R , který je definován následovně:

$$(5) \quad R = \frac{\sum [F(t_j) - \bar{F}(t_j)] [F_m(t_j) - \bar{F}_m(t_j)]}{\sqrt{\sum [F(t_j) - \bar{F}(t_j)]^2 \sum [F_m(t_j) - \bar{F}_m(t_j)]^2}}.$$

Zde t_j představuje diskretizovaný vektor času, tedy okamžiky, ve kterých přístroj zaznamenal měřené hodnoty. $F(t_j)$ označuje hodnotu teoretické (modelem předpovězené) síly v čase t_j a $F_m(t_j)$ hodnotu síly naměřenou v témže časovém okamžiku t_j . Symbol \bar{F} značí střední hodnotu odpovídající veličiny. Čím více se R blíží 1, tím lepší je kvalita proložení experimentálních dat teoretickou křivkou. Ve všech případech byl index korelace větší než 0.99, což ukazuje na vynikající shodu naměřených a teoretických křivek. *Obrázek 16* ukazuje proložení naměřených dat s teoretickou křivkou.

Průměrné hodnoty naměřených materiálových parametrů společně se směrodatnými odchylkami uvádí *Tabulka 3* pro všechny zatěžovací cykly jak pro kontrolní tak i testovanou skupinu. Stejná data jsou zobrazena v grafech (*Obrázek 17* až *Obrázek 21*).



Obrázek 16 – ukázka proložení naměřených dat (modrá křivka) teoretickou funkcí popisující chování zvoleného modelu (červená křivka).

Průměrné hodnoty elastických modulů se pohybují v řádech 10^2 – 10^3 N/m a nenaznačují, že by jedna skupina převládala nad druhou. Hodnoty rovnovážného elastického modulu E_P se pohybují od 0.44 ± 0.24 kN/m v prvním cyklu do 4.65 ± 1.70 kN/m v posledním cyklu pro kontrolní skupinu a od 0.58 ± 0.19 kN/m do 3.91 ± 1.79 kN/m pro testovanou skupinu. V prvním zatěžovacím cyklu je modul testované skupiny vyšší, zatímco směrodatná odchylka testované skupiny zůstává nižší. V dalších zatěžovacích cyklech je modul E_P kontrolní skupiny vyšší.

Sériový elastický modul E_I je menší než rovnovážný modul, ale zůstává stejného řádu. V kontrolní skupině se pohybuje od 0.29 ± 0.13 kN/m do 1.40 ± 0.43 kN/m a v testované skupině od 0.36 ± 0.12 kN/m do 1.30 ± 0.56 kN/m. Hodnoty kontrolní skupiny jsou vyšší až do čtvrtého cyklu, v pátém cyklu jsou téměř shodné pro obě skupiny a v posledním cyklu je modul testované skupiny nepatrně vyšší.

Hodnoty sériového elastického modulu E_2 jsou velmi podobné hodnotám modulu E_I . V případě kontrolní skupiny se pohybují od 0.25 ± 0.12 kN/m do 1.28 ± 0.48 kN/m a v případě testované skupiny od 0.23 ± 0.12 kN/m do 1.18 ± 0.64 kN/m. Hodnoty testované

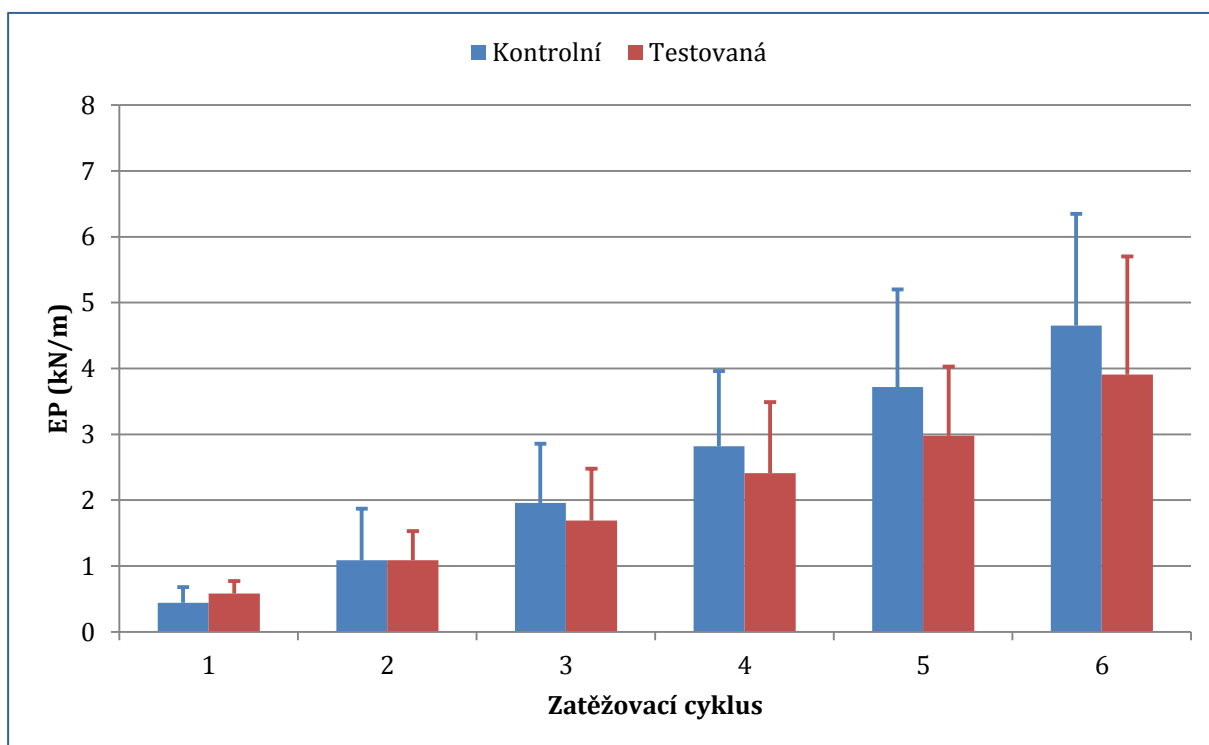
skupiny jsou nepatrně větší ve druhém a třetím cyklu. Rozdíl mezi skupinami činí pouhých 0.05 kN/m až do čtvrtého cyklu.

Statistické testy neprokázaly žádný významný rozdíl ($p > 0.05$) v elastických parametrech mezi kontrolní a testovanou skupinou, a to jak ve středních hodnotách, tak ve směrodatných odchylkách.

Viskózní modul η_1 se řádově pohybuje v rozmezí od 10^4 do 10^5 Ns/m. Modul testované skupiny je větší než modul kontrolní skupiny. Jedná se též o jediný viskoelastický parametr, který ukazuje na dominantní postavení jedné skupiny vůči druhé. Hodnoty tohoto parametru leží v rozmezí od 33.75 ± 13.36 kNs/m do 159.99 ± 48.48 kNs/m pro kontrolní skupinu a od 44.08 ± 15.19 kNs/m do 163.30 ± 90.85 kNs/m pro testovanou skupinu. Žádný významný rozdíl ($p > 0.05$) mezi kontrolní a testovanou skupinou nebyl nalezen ve středních hodnotách tohoto parametru. Směrodatná odchylka ukázala na významný rozdíl mezi oběma skupinami ve třetím ($p = 0.027$), pátém ($p = 0.042$) a šestém ($p = 0.004$) zatěžovacím cyklu. Směrodatná odchylka parametru η_1 testované skupiny je v těchto kritických zatěžovacích cyklech více než 1.65krát větší než směrodatná odchylka kontrolní skupiny.

Shoda rozptylu obou náhodných výběrů je jedním z předpokladů Studentova t-testu shody středních hodnot. Výsledky t-testu by mohly být ve třetím, pátém a šestém zatěžovacím cyklu zkresleny. Rozdíl středních hodnot vyjádřen v procentech jako jejich poměr dává pro všechny cykly 23%, 25%, 27%, 14%, 19% a 2%. Rozdíly 27% ve třetím cyklu a 19% v pátém cyklu spadají do rozumných hodnot. Rozdíl 2% v šestém cyklu je v podstatě zanedbatelný. Z tohoto pohledu lze usoudit, že porušení předpokladu shody rozptylů obou výběrů v případě parametru η_1 ve třetím, pátém a šestém zatěžovacím cyklu nemá vliv na závěry t-testu v těchto cyklech a rozdíl mezi oběma skupinami není významný.

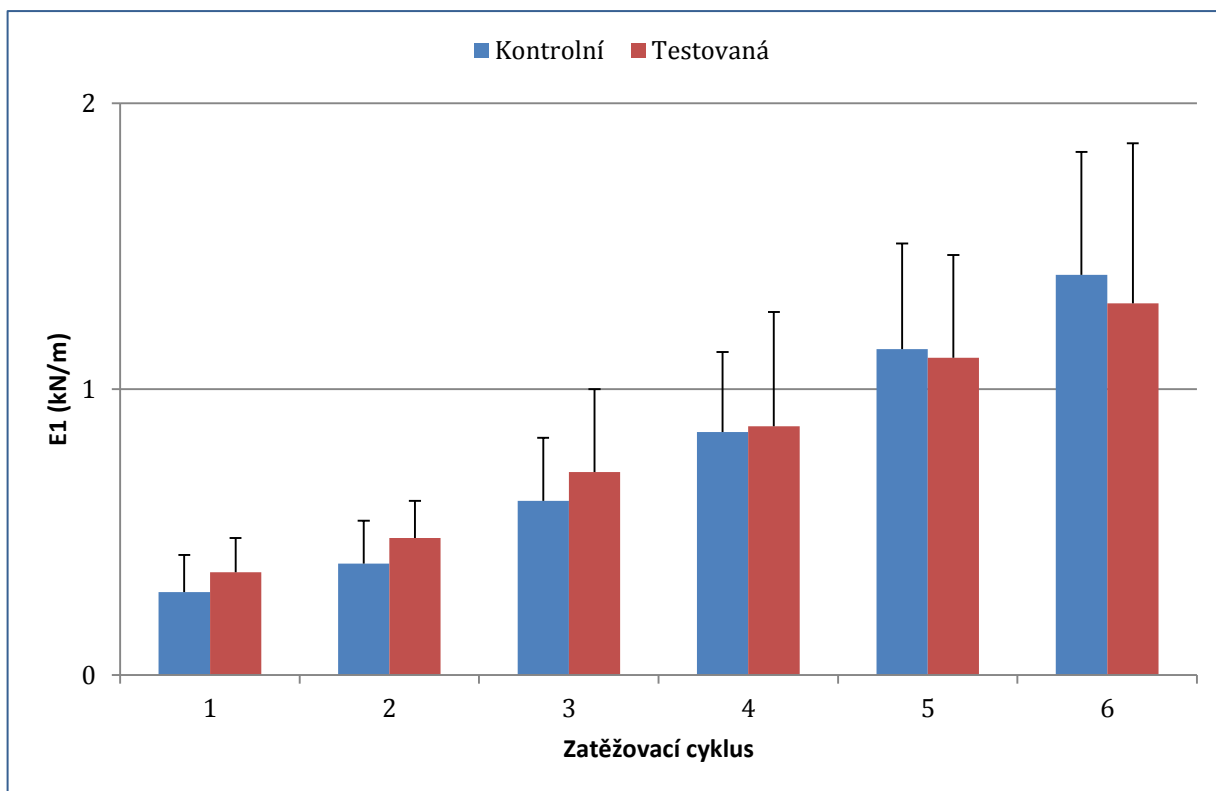
Viskózní modul η_2 se řádově pohybuje v řádu 10^3 Ns/m. Hodnoty kontrolní skupiny jsou větší než hodnoty testované skupiny. V případě kontrolní skupiny se pohybují od 1.63 ± 0.79 kNs/m do 7.57 ± 2.49 kNs/m a v případě testované skupiny od 1.74 ± 1.13 kNs/m do 5.84 ± 3.56 kNs/m. Stejně jako v případě předchozích parametrů, ani zde nebyl nalezen žádný významný rozdíl ($p > 0.05$) ve středních hodnotách mezi oběma skupinami. Významný rozdíl ($p = 0.031$) v rozptylech se objevuje ve čtvrtém cyklu. Rozdíl středních hodnot v tomto cyklu je však prakticky zanedbatelný.



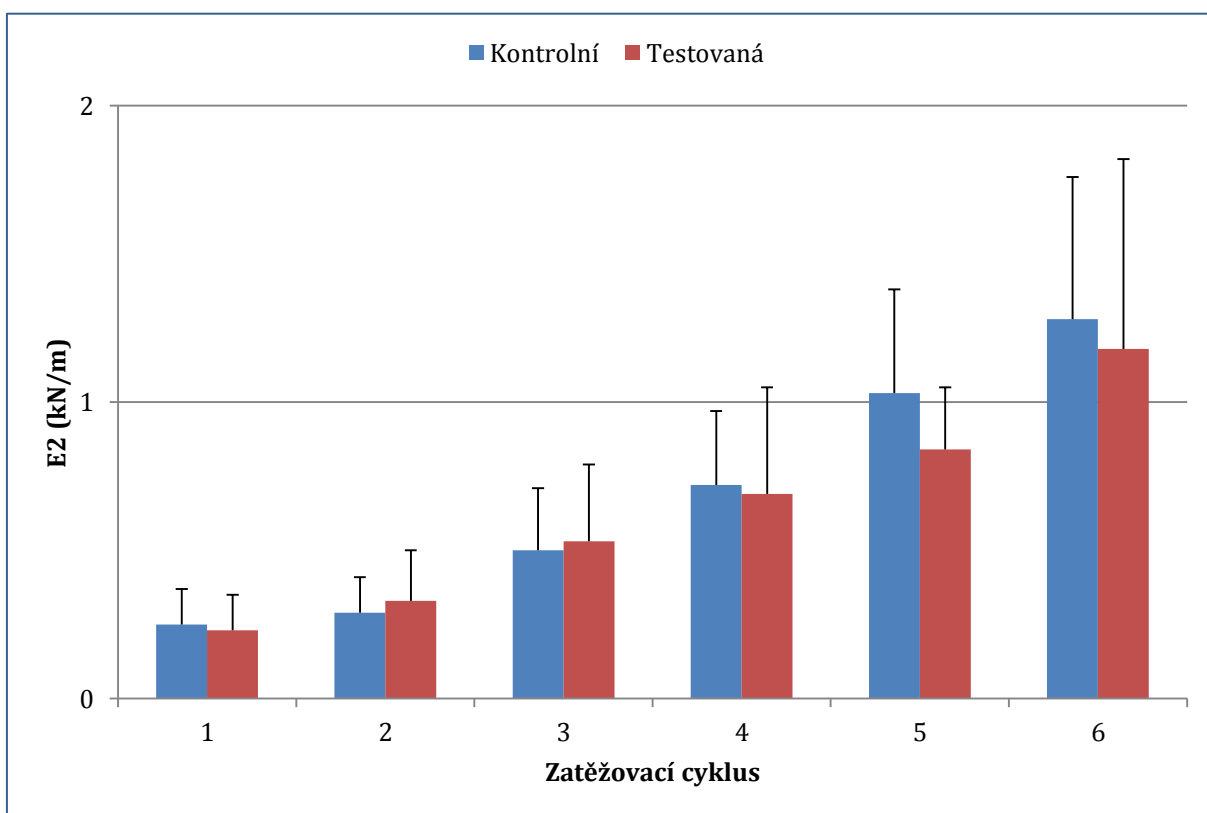
Obrázek 17 - Hodnoty rovnovážného elastického modulu E_p

Tabulka 3 - Naměřené hodnoty testované a kontrolní skupiny ve všech měřicích cyklech

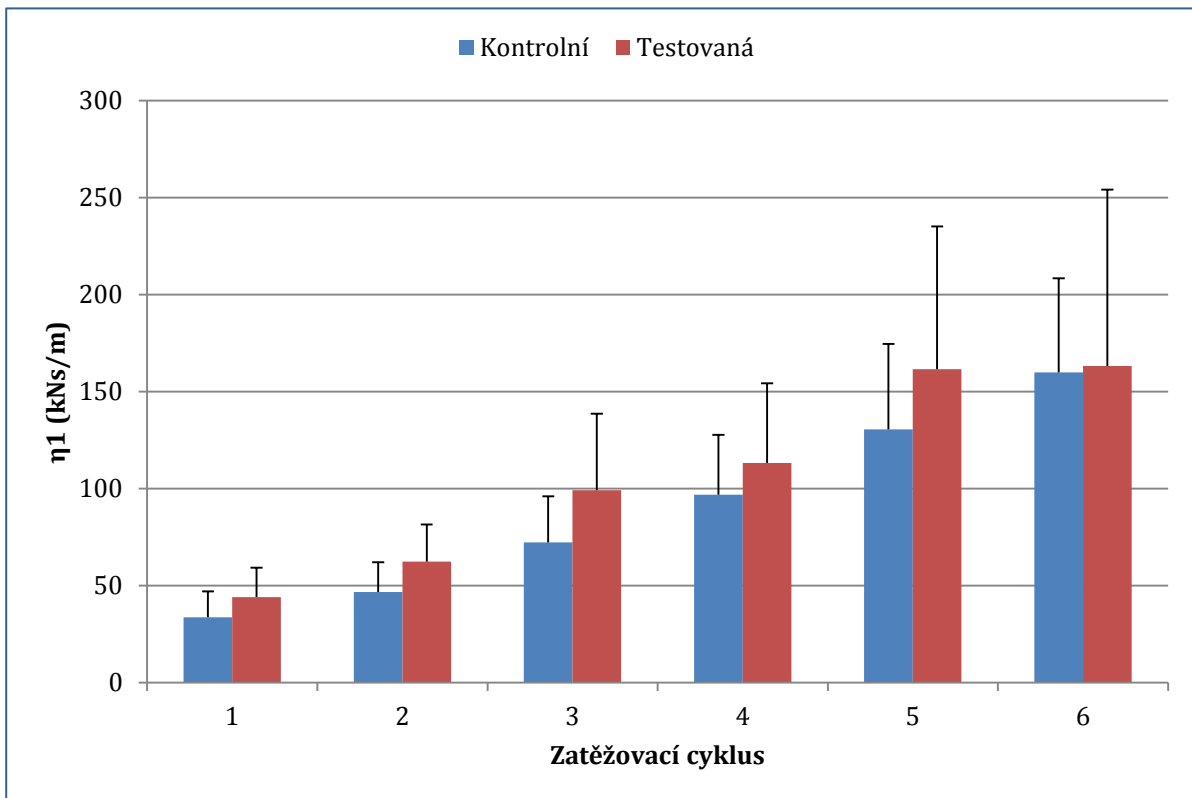
Parametr	Skupina	Zatěžovací cyklus					
		1	2	3	4	5	6
E_p (kN/m)	kontrolní	0.44±0.24	1.09±0.78	1.96±0.90	2.82±1.14	3.72±1.48	4.65±1.70
	testovaná	0.58±0.19	1.09±0.44	1.69±0.79	2.41±1.08	2.98±1.05	3.91±1.79
E_1 (kN/m)	kontrolní	0.29±0.13	0.39±0.15	0.61±0.22	0.85±0.28	1.14±0.37	1.40±0.43
	testovaná	0.36±0.12	0.48±0.13	0.71±0.29	0.87±0.40	1.11±0.36	1.30±0.56
E_2 (kN/m)	kontrolní	0.25±0.12	0.29±0.12	0.50±0.21	0.72±0.25	1.03±0.35	1.28±0.48
	testovaná	0.23±0.12	0.33±0.17	0.53±0.26	0.69±0.36	0.84±0.21	1.18±0.64
η_1 (kNs/m)	kontrolní	33.75±13.36	46.64±15.38	72.29±23.84	96.81±30.94	130.51±44.06	159.99±48.48
	testovaná	44.08±15.19	62.43±19.10	99.22±39.50	113.24±41.14	161.62±73.61	163.30±90.85
η_2 (kNs/m)	kontrolní	1.63±0.79	2.06±0.83	3.36±1.31	4.46±1.63	6.27±2.42	7.57±2.49
	testovaná	1.74±1.13	1.94±0.86	3.24±1.69	4.40±2.67	4.70±2.13	5.84±3.56
Odlehle hodnoty	kontrolní	14	7	4	4	4	3
	testovaná	6	6	2	2	5	0



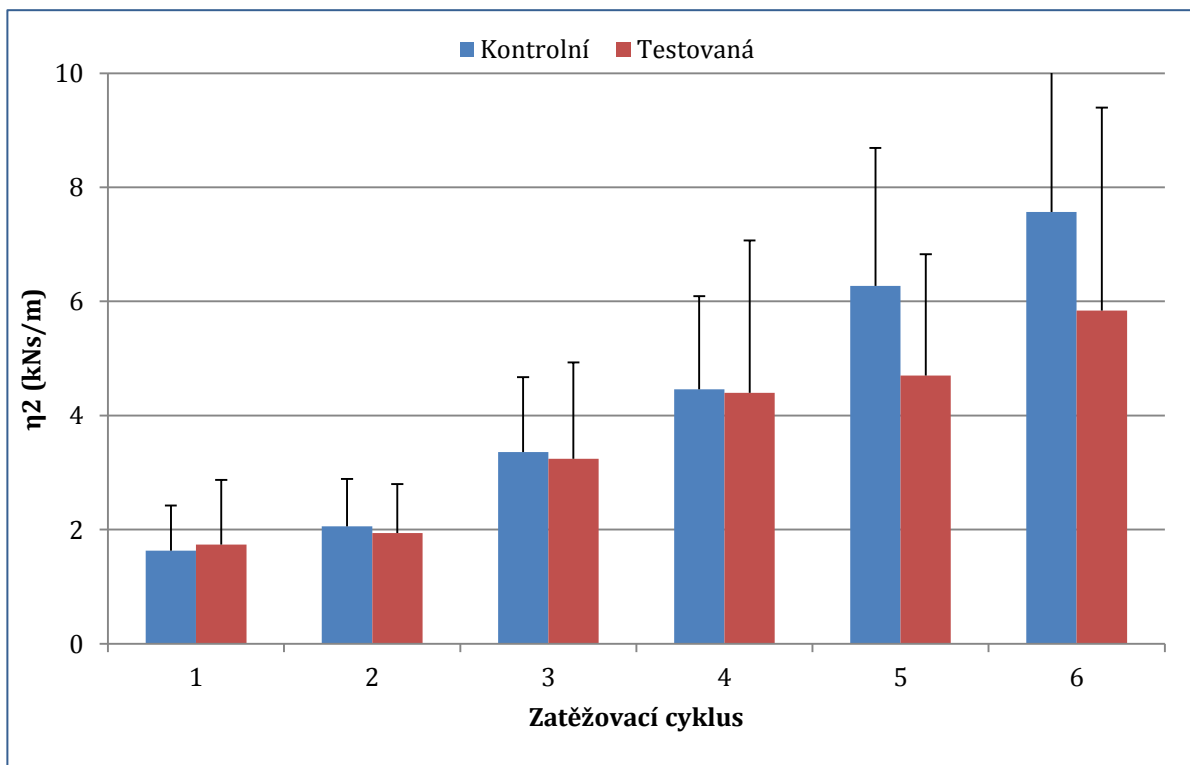
Obrázek 18 - Hodnoty sériového elastického modulu E_1



Obrázek 19 - Hodnoty sériového elastického modulu E_2



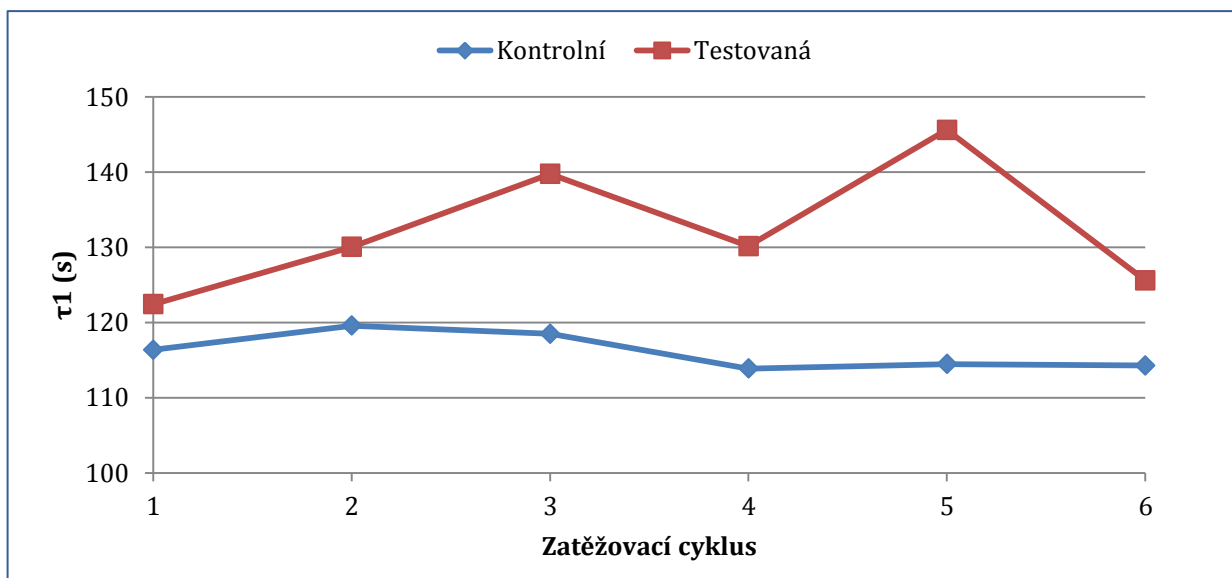
Obrázek 20 - Viskózní modul η_1



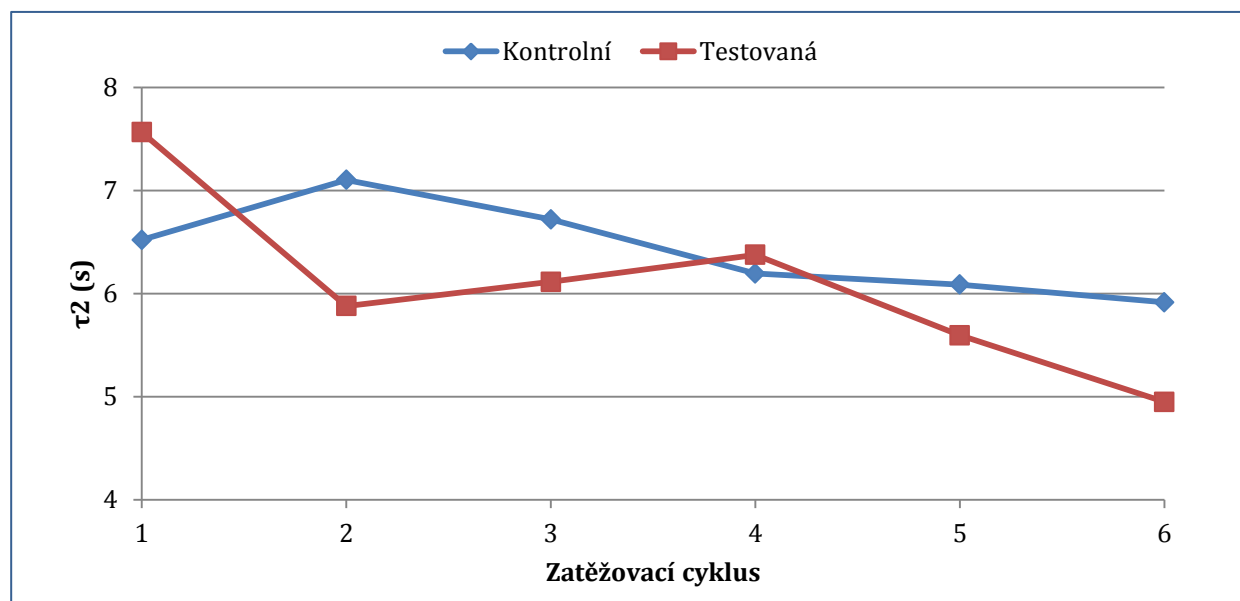
Obrázek 21 - Viskózní modul η_2

5.3 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

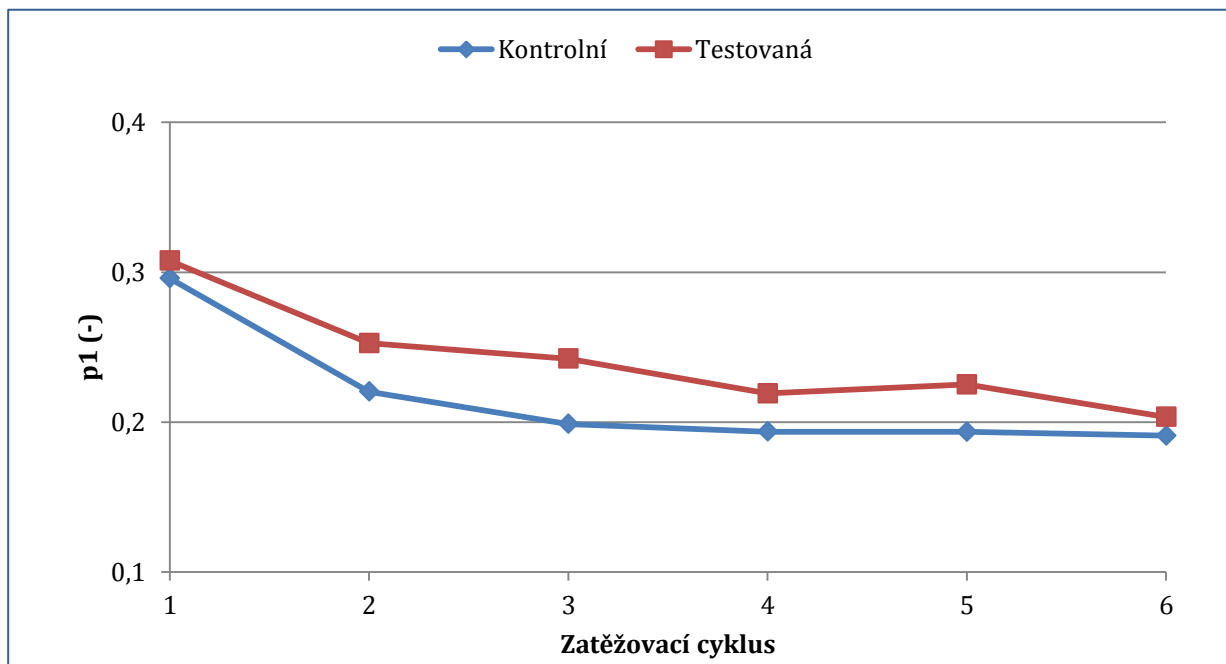
Jak bylo uvedeno výše, elastické a viskózní parametry spolu souvisejí a jejich poměr $\tau_i = \eta_i/E_i$ představuje relaxační dobu. Jako parametr je relaxační doba snáze uchopitelná než viskózní koeficient. Navíc nám dává jasnou představu o časových škálách relaxačních procesů, ke kterým ve tkáních dochází. Obě relaxační doby pro kontrolní i testovanou skupinu jsou zobrazeny na následujících grafech (Obrázek 23 a Obrázek 22).



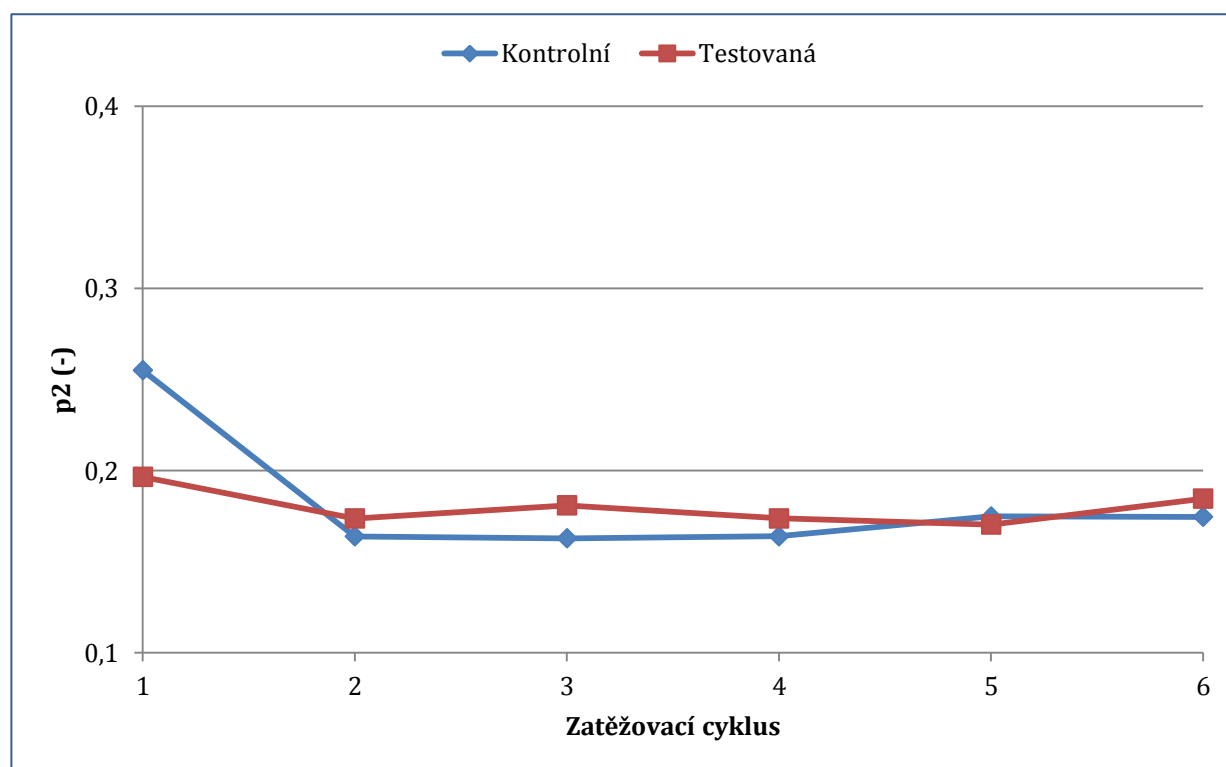
Obrázek 23 - Relaxační doba τ_1



Obrázek 22 - Relaxační doba τ_2



Obrázek 25- Pronyho koeficient p_1



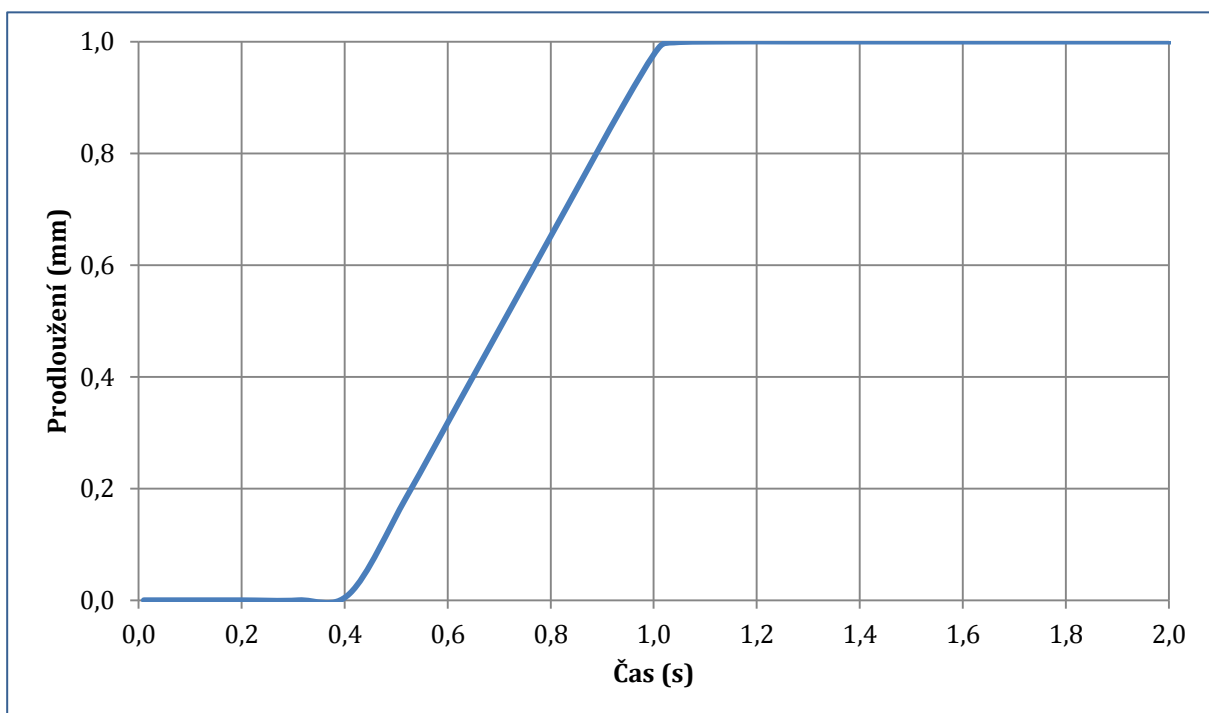
Obrázek 24 - Pronyho koeficient p_2

Z uvedených grafů je patrné, že obě relaxační doby se řádově nemění. V rámci variability vzorků bychom je mohli považovat za téměř konstantní. K relaxaci části napětí dochází nejprve v rozmezí 4 až 8 sekund a ve druhé fázi v rozmezí 113 až 145 sekund. Mezi oběma skupinami není významný rozdíl. V každé fázi dojde k relaxaci určitého zlomku napětí. Tento

zlomek je vyjádřen Pronyho koeficienty p_i . Oba koeficienty jsou zobrazeny na následujících grafech (*Obrázek 25* a *Obrázek 24*). Z nich je patrné, že v obou relaxačních dobách dojde k relaxaci vždy 20 – 30% napětí.

Relaxační doba má ještě jeden důležitý význam. Matematická teorie Maxwellova modelu předpokládá, že zátěž vzorku je okamžitá. Toho nelze v reálných podmínkách dosáhnout a k zatížení tak dochází po určitou dobu, nikoli okamžitě. Podívejme se podrobně, jak dlouho trvá, než přístroj prodlouží vzorek o 1 mm. *Obrázek 26* zobrazuje první dvě sekundy předepsaného posuvu. Z grafu je patrné, že k zatížení vzorku dochází lineárně během 0.6 sekund. Ve srovnání s relaxačními časy tedy dochází k zatížení vzorků dostatečně rychle.

V opačném případě by začalo docházet k relaxaci ještě před dokončením zatížení. Maxwellův model by pak nevyhovoval popisu zkoumaného materiálu.



Obrázek 26 - Průběh předepsaného prodloužení o 1mm v čase

6. DISKUZE

6.1 KLINICKÉ POUŽITÍ MITRÁLNÍHO ALOGRAFTU

Z důvodu komplexního pohledu na problematiku použití mitrálních alograftů je třeba zmínit problematiku klinického použití.

6.1.1 MITRÁLNÍ ALOGRAFT V MITRÁLNÍ POZICI

Jak bylo zmíněno v kapitole 2.3.5.1 první klinickou implantací mitrálního alograftu do ortotopické pozice provedl v roce 1961 Senning.²⁰⁴ I když byly popsány i další implantace, výsledky byly rozporuplné. V devadesátých letech byla tato technika znovuobjevena, největší soubory publikoval Acar.

Osmileté sledování velkého souboru pacientů, kterým byl implantován mitrální alograft do mitrální pozice publikoval Ali z Acarovy skupiny v roce 2004.²⁰⁵ 104 mladých pacientů (38±15let) podstoupilo náhradu mitrální chlopně alograftem, z toho 76 pro revmatickou vadu a 24 pro infekční endokarditidu mitrální chlopně. 65 pacientům byl implantován totální mitrální alograft, 39 parciální alograft. Celková nemocniční mortalita byla 3,8%. Skupina s infekční endokarditidou měla mortalitu 8,7% oproti 2,5% bez endokarditidy ($p < 0,19$). Pozdních úmrtí bylo 9, z toho 4 z kardiální příčiny. Do 3 měsíců bylo reoperováno 5 pacientů, v dalším sledování bylo reoperováno 10 dalších pacientů. Byl zachycen trend k menšímu výskytu kardiálních příhod u pacientů s parciálním alograftem. Riziko časných dysfunkcí bylo dáno hlavně nepoměrem velikosti vlastní chlopně a velikosti implantovaného alograftu. Jinak byly výsledky srovnatelné s kohortou mladých pacientů, kterým byla implantována biologická chlopní náhrada.

Dobrých výsledků s kryoprezervovanými mitrálními alografty dosáhl i Doty et al.²⁰⁶ Inspirováni Acarem operovali 14 pacientů (věku od 16 do 70 let), kterým nahradili mitrální chlopně alograftem. Ve sledování 1,5 roku zachytili jednu dehiscenci papilárního svalu (pacientovi byla chlopně při reoperaci nahrazena) a 3 mírné mitrální regurgitace.

Přijatelné výsledky publikoval Gublins et al.²⁰⁷ Čtrnácti pacientům implantovali buď parciální (6 pacientů) nebo totální mitrální alograft (8 pacientů). Indikací k operaci byla nejčastěji infekční endokarditida. Střední doba sledování byla 30 měsíců (6-60). Pacientů, u kterých nebyla zaznamenána žádná s chlopní spojená nežádoucí příhoda v 1, 2 a 3 letech od operace bylo 93%, 86%, 79%. Echokardiograficky ověřená funkce transplantované chlopně byla rovněž u většiny z nich příznivá.

Výsledky z dalších publikovaných prací již tak dobré nejsou. Soubor 13 dětských a adolescentních pacientů průměrného věku 15±6 let představil Chauvaud et al.²⁰⁸ Důvodem k operaci bylo většinou revmatické postižení mitrální chlopně, endokarditida nebo vrozená mitrální vada. Pooperační funkce implantovaného alograftu byla vždy dobrá, nicméně ve střednědobém sledování (4,1±2,2 roku) bylo 7 pacientů reoperováno z důvodu selhání alograftu. Navíc další dva pacienti zemřeli bez reoperace, ale s potvrzenou významnou stenózou alograftu. Všechny explantované chlopně byly kalcifikované.

Podobně nepříznivé výsledky pětiletého sledování mitrálních alograftů publikoval i Kumar et al.²⁰⁹ Použil kryoprezervované i čerstvé alografty u 37 pacientů v ortotopické pozici. Průměrný věk byl 32±10 let, nejčastějším důvodem k operaci byla porevmatická mitrální vada. V souboru byla zaznamenána 14% peroperační mortalita a během sledování (27±12 měsíců) byla zjištěna těžká mitrální regurgitace u 25 z 32 přeživších pacientů. Pouze 7 (22%) pacientů mělo uspokojivou funkci mitrálního alograftu. Nebyl nalezen statisticky významný vliv typu použitého alograftu, předoperační patologie na mitrální chlopně, ani provedení mitrální anuloplastiky na selhání implantovaného alograftu. Ve dvou případech došlo k odtržení papilárního svalu.

Stejná skupina autorů zkoumala 6 explantovaných alograftů (od 6 týdnů do 60 měsíců od operace). Tkáň cípů byly kalcifikované, byly popsány ruptury šlašinek u úponu na papilární sval. Mikroskopicky byly cípy bez endotelu s minimem buněk, ale s dobře zachovanou strukturou kolagenních vláken. Papilární svaly podlely koagulační nekróze, aniž by v jejich okolí byly známky zánětu.²¹⁰

Je zřejmé, že pro mitrální alografty implantované ortotopicky není v klinickém použití příliš mnoho prostoru. Obzvláště vezmeme-li v úvahu rozvoj záchovných výkonů mitrální chlopně. Z výše uvedených prací se dá konstatovat:

- Mitrální alograft v mitrální pozici u velmi mladých pacientů má zcela nepříjemné výsledky. Tento tkáňový štěp neroste a urychlená degenerace implantované chlopně má za důsledek velmi malou trvanlivost.
- Způsob zpracování a kryoprezervace nemá pravděpodobně vliv na trvanlivost alograftu. Ani čerstvé alografty neprokázaly lepší dlouhodobé výsledky.
- Na správnou funkci má velký vliv správný výběr velikosti alograftu. U pacientů, kde byl nepoměr mezi velikostí chlopně příjemce a dárce, byly horší výsledky.
- Použití mitrálního alograftu u dospělých je rovněž problematické. Hraniční indikací může být excesivní infekční endokarditida, kde se dá předpokládat tendence k větší odolnosti alograftu vůči infekci, podobně jako u aortálních alograftů.
- Implantace je technicky náročná. Klíčová je fixace papilárního svalu. Důležité je rovněž použití anuloplastického prstence.
- Velkou roli hraje zkušenost chirurga.

6.1.2 MITRÁLNÍ ALOGRAFT V TRIKUSPIDÁLNÍ POZICI

Nevýhody mitrálního alograftu v ortotopické pozici nemusí platit v nízkotlakém systému pravého srdce.

Výběr protézy vhodné k náhradě trikuspidální chlopně je obtížný. Jak mechanické, tak biologické chlopně mají své nevýhody. Biologické chlopně v trikuspidální pozici mají tendenci k strukturální deterioraci zhruba 10 let od operace. Degenerace je ještě rychlejší u dětí.^{211, 212} Problematické je ale i použití mechanických chlopenních náhrad, kdy je velkým nebezpečím trombóza protézy, pravděpodobně v důsledku charakteristiky průtoku trikuspidálního ústí.²¹³ V tomto případě doporučené INR 3,5-4,5 pochopitelně přináší zvýšení rizika krvácení.

Mitrální alograft v trikuspidální pozici není využíván příliš často, nejčastěji u pacientů s infekční endokarditidou trikuspidální chlopně. V této indikaci použil mitrální alograft Pomar et al. v roce 1993.¹⁰⁰ Stejná skupina publikovala výsledky 6letého sledování 5 HIV pozitivních intravenosních narkomanů s infekční endokarditidou trikuspidální chlopně, kterým byla tato chlopeň nahrazena kryoprezervovaným mitrálním alograftem. Tři z těchto pacientů měli následně rekurentní infekční endokarditidu implantovaného mitrálního alograftu, která byla léčena antibiotiky. Echokardiografické kontroly alograftu ukázaly dobrou

bezprostřední funkci alograftu. V průběhu sledování měli tři pacienti významnou regurgitaci. Funkční stav pacientů byl velmi dobrý NYHA I.-II. Echokardiografická vyšetření neprokázala přítomnost kalcifikací nebo ruptury šlašinek.²¹⁴

Soubor 7 pacientů s infekční endokarditidou, kterým byla nahrazena trikuspidální chlopeň za použití mitrálního alograftu popsal Couetil et al.²¹⁵ Nejčastěji byl postižen přední cíp, septální cíp nebyl postižen nikdy. U 3 použili přední cíp mitrálního alograftu, u 4 i část zadního. Navíc 4 pacientům byla nahrazena postižená aortální chlopeň aortálním alograftem a u 1 byla provedena rekonstrukce chlopně plicnice. Třicet měsíců od operace registrovali dobrý výsledek rekonstrukce.

Miyagishima et al. publikovali střednědobé výsledky souboru 5 pacientů, kterým byla nahrazena trikuspidální chlopeň z důvodu infekční endokarditidy mitrálním alograftem.²¹⁶ Alograft orientovali tak, že přední list alograftu byl našit u septa. Všem pacientům implantovali rigidní mitrální prstenec. Papilární svaly byly fixovány transventrikulárně. Po roce byla funkce alograftu hodnocena echokardiograficky. 2 pacienti byli bez regurgitace, 1 měl regurgitaci stopovou, 2 vypadli ze sledování. Nebyla zaznamenána nová endokarditida. 2 pacienti měli pooperačně atrioventrikulární blok III. stupně.

Z uvedeného přehledu je patrné, že soubory pacientů s mitrálním alograftem v trikuspidální pozici nejsou příliš rozsáhlé. Je také zřejmá velká technická obtížnost takového výkonu.

Většina autorů (kromě Pomara) používá tzv. anatomickou orientaci. Důvodem je obava, že v případě antianatomické orientace by přední cíp mohl vytvářet obstrukci výtokového traktu pravé komory. Většina autorů (opět s výjimkou Pomara) také používá mitrální anuloplastický prstenec, který má zajistit dlouhodobou stabilizaci neoanulu a zabránit pozdnímu selhání metody. Použití prstence je ale především u intravenosních narkomanů kontroverzní, protože protetický materiál může znamenat riziko pro reinfekci. Implantace mitrálního prstence navíc přináší riziko poškození převodního systému.

Přes všechny uvedené okolnosti se domníváme, že mitrální alograft v trikuspidální pozici může být alternativou komerčním chlopním náhradám u pacientů, kde záchovný výkon není možný. Zkušenosti s touto technikou jsou v České republice velmi omezené. Malý (doposud nepublikovaný) soubor pacientů operoval prim. Mokráček, ale vzhledem k počtu pacientů a jejich velmi omezené spolupráci (jednalo se výhradně o intravenosní narkomany) je zatím obtížné jakkoliv hodnotit klinické výsledky.

6.2 MECHANICKÉ EXPERIMENTY S KRYOPREZERVOVANÝMI MITRÁLNÍMI ALOGRAFTY

Z hlediska biomechaniky má uchovávání tkání dvojí důvod. První důvod je experimentální a souvisí tedy s výzkumem a výukou. Experimentální vyšetřování mechanických vlastností je zdlouhavé a často se nelze vyhnout uchování vzorků tkání „na později“. Degradáční procesy však mohou významně ovlivnit a změnit mechanické vlastnosti tkání, proto se často uchylujeme k jejich prezervaci. Nicméně i proces prezervace a jeho dopad na vlastnosti tkání je nutno charakterizovat. Druhý důvod uchovávání tkání je klinický a týká se transplantací. V tomto případě jsou metody prezervace mnohem komplexnější a výsledné použití uchovávaných tkání mnohem specifičtější.

Na poli konzervace tkání a vlivu konzervačních metod na jejich mechanické vlastnosti byly podrobně zkoumány vlivy konzervačních metod na vlastnosti tkání především v souvislosti s cévami a šlachami. Výsledky obecně ukazují, že kryoprezervační metody nemění významně důležité elastické vlastnosti tkání.

L'Italien et al. nenalezli žádný významný rozdíl v poddajnosti a elastických koeficientech u hrdelních žil psa. Krátkodobé zmrazení dle autorů zachovává důležité funkční elastické vlastnosti žil nezávisle na použití DMSO.²¹⁷ Vesely et al. rovněž nezaznamenali žádné významné změny mechanického chování alograftů aortálních chlopní ve srovnání s čerstvou tkání.²¹⁸ Ani kryogenicky zpracovaná hrudní aorta uložená při teplotě $-135\text{ }^{\circ}\text{C}$ po 2 až 4 měsíce nevykazuje významné změny mechanických vlastností.^{219, 220} Kryoprezervace při teplotě $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ nemá u člověka vliv na Youngův modul, radiální napětí ani viskoelastické vlastnosti karotidy ani femorální cévy.²²¹ Kryoprezervace a rychlé rozmrazení neovlivňují elastický modul a pevnost v tahu kyčelních cév prasete.²²² Kryoprezervace segmentů iliofemorálních alograftů zachovává důležité elastické vlastnosti tkání při průměrné době uložení 22 dní.²²³ Stemper et al. studovali fyziologické i limitní vlastnosti aort v prasečím modelu. Tkáně byly buď uloženy při $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po 24 nebo 48 hodin nebo zmrazeny při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu třech měsíců. Autoři doporučují zmrazení, které na rozdíl od podchlazení nemění mechanické vlastnosti tkání.²²⁴ Zmrazení rovněž doporučují Chow et al., kteří studovali mechanické vlastnosti karotid novozélandských králíků.²²⁵

V dostupné literatuře se mnohem méně publikací věnuje vlivu kryogenického zpracování na mechanické vlastnosti srdečních chlopní. Studium vlivu kryoprezervace na mechanické

vlastnosti alograftů aortálních chlopní podrobených dvouosému zatížení v tahu ukazuje významný pokles maximálního radiálního prodloužení chlopní ve srovnání s kontrolní skupinou.²²⁶ Courtman et al. se zabývali vlivem kryoprezervace a celulární extrakce na mechanické vlastnosti prasečích aortálních chlopní. Autoři studovali strukturu, mechanismus poškození i viskoelastické vlastnosti tkáně podrobené testu s předepsanou vysokou rychlostí deformace. Kryoprezervace způsobuje poškození buněk a nekrózu tkáně, zatímco extrakce odstraňuje všechny buňky a buněčné membrány. Oba procesy zachovávají kolagen a strukturní matici elastinu, čímž dochází k uchování viskoelastických charakteristik materiálu.²²⁷ Vliv kryoprezervace na Youngův modul a mez pevnosti aortálních homograftů nebyl prokázán u člověka.²²⁸

Alografty ovčího modelu se zabývali Aidulis et al.. Autoři se zaměřili na porovnání čtyř různých metod konzervace tkání, při nichž posuzovali nejen mechanické a klinické charakteristiky tkání, ale rovněž ekonomické aspekty těchto metod. Metodami byly kryoprezervace s použitím DMSO, uložení tkáně při +4°C ve vysoké koncentraci (85%) glycerolu (podobná metoda se používá pro konzervaci kůže), zmrazení v tekutém dusíku a vitrifikace. Poslední dvě metody vedly k přílišnému poškození tkání a po předběžných pokusech jim již nebyla věnována pozornost. Kryoprezervace zachovává buňky, mikrostrukturu tkáně i její mechanické vlastnosti. Konzervace v glycerolu vede k odstranění buněk, ale zachovává extracelulární matici vláken a rovněž její mechanické vlastnosti. Dle autorů je z hlediska mechaniky význam živých buněk v alograftech nejistý. Prezervace v glycerolu by pak mohla být výhodnou volbou z hlediska jednoduchosti metody i finančních nákladů.^{229, 230, 231}

Jedinečnou se jeví práce Jensena et al.. Autoři se zabývali vlivem fixačních metod (glutaraldehyd vs. genipin) a kryoprezervace na hemodynamiku mitrálních chlopní v prasečím modelu. Chlopně byly upevněny do anulárního prstence a ten byl vložen do průhledného modelu levého srdce. Model srdce umožňoval studium hemodynamiky za použití vysokorychlostní kamery a UVP (Ultrasound Velocity Profilometer). Poznamenejme, že UVP je metoda měření dynamiky kapalin využívající ultrazvuku a Dopplerova efektu. Autoři rovněž studovali vliv pozice papilárního svalu. Na rozdíl od fixačních metod kryoprezervace nevedla k žádným významným změnám morfologie a hemodynamiky chlopní.²³²

Výše uvedená studie má velký význam ze dvou důvodů. Za prvé, jako jedna z mála se zabývá mitrálními chlopněmi. Za druhé, studuje alograft jako celek v jeho (téměř) přirozeném

prostředí za fyziologických podmínek včetně mechanického zatížení. My jsme v naší studii postupovali tradiční cestou mechanického testování.

Zobecněný Maxwellův model bývá v biomechanice často používán, jelikož je vhodný k popisu relaxace napětí ve tkáních. Pětiparametrový model jsme vybrali proto, že tříprvkový model nedosahoval dostatečné přesnosti a sedmiprvkový model už přesnost nijak nevylepšoval.

Viskoelastické modely jsou v biomechanice používány často k posouzení vlivu různých jevů na mechanické chování tkání či celých jejich struktur. Kuroiwa et al. použili Maxwellův tříprvkový model ke studiu vlivu ischemie na mozkovou tkáň mongolských pískomilů. Relaxační křivka byla získána z indentačního experimentu. Jeden den po ischemii došlo k razantnímu poklesu elastického i viskózního koeficientu o více než 70%.²³³

Liu a Bilston použili obecného Maxwellova modelu k popisu viskoelastického chování jater.²³⁴ Hovězí játra použili ve své studii Ocal et al.²³⁵ Ti zkoumali vliv uložení tkání za nízké teploty na jejich viskoelastické vlastnosti při zatížení v tlaku. Vzorky tkání byly před testováním uloženy v Ringerově roztoku při 4 °C po dobu 1, 2, 4, 8, 12, 24 a 36 hodin a výsledky bylo srovnány s kontrolní skupinou (bez zpracování). Autoři konstatovali, že s rostoucí dobou uchování tkáně roste její tuhost i viskozita. Vzhledem k tomu, že vzorky měly dobře definovaný průřez, mohlo být určeno napětí v materiálu a elastické moduly byly vyjádřeny v kPa. Srovnání elastických modulů s naší studií, která posuzuje chlopenní náhradu jako celek, tedy strukturu, a ne jen její složku, by bylo komplikované a pravděpodobně i zavádějící. Ke srovnání se nabízejí doby relaxace. Autoři použili sedmiprvkový model a odvodili tedy tři doby relaxace: 0.4 s, 40 s a 250 s. Tyto hodnoty se poněkud vzdalují našim, což bude zapříčiněno zásadně odlišným typem tkáně. Povšimněme si podezřele krátké první relaxační doby. Vystává otázka, zda doba aplikace skokového zatížení nebyla delší, než nejkratší relaxační doba.

Různé viskoelastické modely použité k popisu cév porovnali Orosz et al. Autoři jednoduché Maxwellovy a Kelvinovy modely nedoporučují z důvodu ne zcela jasné interpretace vztahu mezi modelem a strukturními složkami tkáně a navrhují vlastní jednorozměrný model, jehož chování nezávisí na roli a významu jednotlivých složek tkáně, ale souvisí pouze s chováním tkáně jako celku.²³⁶ Domníváme se, že každý empirický model by měl umožnit interpretaci vlastností a chování materiálu či struktury vzhledem ke složkám a komponentám studovaného

objektu. Pětivrzkový Maxwellův model byl použit k výzkumu viskoelastických vlastností podkožní tkáně.²³⁷ Výsledky ukazují relaxační doby přibližně 4 sekundy a 30 sekund. Podkožní tkáň tedy relaxuje rychleji. Viskózní koeficienty nabývají velmi nízkých hodnot 0,95 Ns/m a 8,49 Ns/m. Ve srovnání s námi naměřenými hodnotami jde o rozdíl až čtyřech řádů. Tento rozdíl je způsoben vysokou poddajností podkožní tkáně, která plyne z její struktury.

Výše uvedené srovnání pouze demonstruje použití Maxwellova modelu v biomechanice. Porovnání hodnot viskoelastických koeficientů je vzhledem k různorodosti tkání pouze orientační a řádové. Zdá se, že Maxwellův model ještě nebyl použit k výzkumu viskoelastického chování mitrálních chlopní, a v tomto ohledu je tato práce průkopnická.

Naše studie neprokázala žádný významný rozdíl mezi kontrolní a testovanou skupinou vzorků ve středních hodnotách viskoelastických parametrů. Usuzujeme tedy, že zpracováním a kryoprezervací tkáně nedochází k významným změnám jejich strukturních složek, které hrají důležitou roli ve viskoelastickém chování materiálu jako celku. Elastické chování tkání, které reaguje na okamžitě aplikované zatížení, přisuzujeme především kolagenním vláknům zastoupeným bohatě v cípech a šlašinkách. Viskózní chování přispívající k relaxaci materiálu bude převládat ve svalové tkáni a její extracelulární matici.

Významné rozdíly v rozptylu viskózních parametrů v některých zatěžovacích cyklech jsou odrazem vyšších hodnot těchto parametrů v případě testované skupiny. Tento rozdíl nemůže být připsán vynechání fáze trénování (preconditioning), jelikož by musely být ovlivněny obě skupiny. Rozdíl by mohl souviset s variabilitou geometrického tvaru papilárního svalu, který přispívá k viskózní části mechanické odezvy vzorku. Podobnost ve velikosti a tvaru papilárního svalu mitrálního alograftu nelze zaručit ani v laboratorních podmínkách, neboť závisí na mnoha nekontrolovaných faktorech včetně variability mezi subjekty. Vzorek je navíc za část svalu uchycen v čelistech přístroje, čímž v okolí čelistí dochází k další deformaci a změně tvaru vzorku. K pozorovaným rozdílům v rozptylech může přispívat i různý počet vzorků v obou skupinách. Relaxační doby a Pronyho koeficienty ukazují na konzistenci dat mezi oběma skupinami a velmi podobný charakter relaxačních procesů v čerstvé i zpracované tkáni.

6.3 PRECONDITIONING A HOMOGENITA MĚŘENÍ

Aktuální konfigurace experimentálního zařízení neumožňuje ponoření vzorku do kapaliny (např. fyziologického roztoku), která by zabránila vysychání vzorku a zpomalila degrační procesy odehrávající se ve tkáni. Vzorky byly během testování navlhčovány a celková doba testu byla snížena na 30 minut. Zkrácení celkové doby testu vedlo k vynechání tzv. trénování (preconditioning). Trénování, především měkkých tkání, je doporučeno ke stabilizaci vnitřních struktur tkáně. Tato stabilizace má vést ke snížení variability a zlepšení opakovatelnosti měření.²³⁸ Za trénování však může být považováno i samotné zpracování tkání. Výsledky experimentu, který porovnával čerstvou a zmraženou tkáň jater, byly konzistentní a měření byla s dostatečnou přesností opakovatelná.²³⁹ Trénování prasečích aortálních chlopní bez odpovídající doby odlehčení před samotným testem zvyšuje chybu predikce modelu.²⁴⁰ Trénování může rovněž vést ke ztrátě tuhosti²⁴¹ či plastické deformaci. Trénování ve formě cyklického zatěžování vede rovněž k potlačení viskoelastických efektů.²⁴² Ty jsou však předmětem naší studie. Vedou k časově závislému viskoelastickému chování a komplexním jevům jako tečení materiálu či relaxace. Cílem naší práce bylo prozkoumat viskoelastické chování mitrálních chlopní jako celku prostřednictvím materiálových koeficientů, které toto chování vystihují. Výše uvedené argumenty ospravedlňují vynechání fáze trénování, které nám umožnilo vyšetření skutečných vlastností tkáně bez dalšího ovlivňování napětově-deformační historie vzorků.

7. ZÁVĚR VLASTNÍ EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE

Naše studie splnila vytyčený cíl a v popsaném experimentu předkládá povzbuzující výsledky, které ukazují, že kryogenní zpracování mitrálních alograftů nemění významně jejich viskoelastické parametry a potažmo jejich viskoelastické chování. V provedeném experimentu jsme ověřili, že protokol zpracování a kryoprezervace chlopní používaný Transplantačním centrem FN Motol výrazně neovlivňuje mechanické vlastnosti mitrálních alograftů.

Výzkum mechanických vlastností mitrálních alograftů v ovčím modelu je součástí přípravy klinického použití v rámci Specializované tkáňové banky Transplantačního centra FN Motol.

Po ověření technických aspektů implantace, kde byla zhodnocena dobrá funkce implantovaných alograftů, a po ověření dobrých mechanických vlastností mitrálních alograftů po kryoprezervaci se domníváme, že je možné přistoupit k realizaci klinické fáze výzkumu.

8. ENGLISH SUMMARY

MECHANICAL PROPERTIES OF MITRAL ALLOGRAFTS ARE NOT REASONABLY INFLUENCED BY CRYOPRESERVATION

8.1 INTRODUCTION

During last half century the heart valve surgery has been developed – recently, heart valves are repaired, if possible, or replaced, mainly using commercially available prostheses. Both lines of valvular substitutes, mechanical as well as biological ones, underwent huge technological development. Mechanical prostheses remain popular for their durability, while the biological (xenograft tissue) valves are preferred for low thrombogenicity. Both heart valve prosthesis types are simple to implant, but the main limitation remains the need for lifelong anticoagulation therapy in the mechanical prosthesis group and structural valve deterioration after 10 to 15 years in the xenograft group respectively.

Although first experiments with mitral allografts have been reported even earlier than those with aortic allografts, mitral allograft was never widely used in clinical practice. The durability of mitral allografts was very disappointing even when operated by very experienced surgeons. Many disadvantages of mitral allograft in mitral position disappear when it is implanted into tricuspid position, e.g. to low pressure system. Patients with tricuspid valve bacterial endocarditis, in particular, can theoretically benefit from mitral allograft transplantation, and that awakened our interest.

We decided to evaluate methods of tricuspid valve replacement by mitral allograft in a sheep model. The allograft heart valve tissue banking facilities are essential for starting the mitral allograft transplantation program. For aortic and pulmonary allografts banking many protocols of processing and cryopreservation are available, but no recent protocol was published for mitral allografts banking. As a basic step we decided to use the same protocol, which our bank uses for human aortic and pulmonary allografts in our sheep experiments. At experimental settings the simple tearing test performed by the surgeon proved quite reliable for determining mechanical tissue properties. Short term as well as long-term sheep experimental results proved to be promising.

In aortic allografts no detectable differences were found between the mechanical behavior of the cryopreserved allograft aortic leaflets and fresh tissue. There is not much data concerning mechanical properties of mitral allografts.

8.2 MATERIALS AND METHODS

A control group of 39 fresh sheep mitral allografts and a test group of 13 cryopreserved sheep mitral allografts were studied.

The study was performed according to guidelines & practice, established by institutional Committee for Animal Care and Use, and was in compliance with the Czech Republic legislation. All animals received human care in compliance with the European Convention on Animal Care and the study was approved by the Institutional Ethical Committee.

Surgical exposure for the mitral allograft harvesting was achieved via a right anterolateral thoracotomy, through the 5th intercostal space. Afterwards the animals were put to death by intravenous administration of Thiopentone (Thiopental, ICN, Czech Republic a.s. - 10mg/kg) and potassium chloride (Kalium Chloratum, Zentiva a.s., Praha - 20ml/kg). Their hearts were explanted under sterile conditions; mitral valves were harvested with rims of left atrial and left ventricular muscle and with the entire subvalvular apparatus, including both papillary muscles.

After harvesting, 39 fresh mitral allografts were stored in saline, in cool box at +5 to +7 °C, and were mechanically tested within 24 hours. Another 13 mitral allografts were processed according to the standard protocol of the Cardiovascular Tissue Bank, Transplant Center, University Hospital Motol, Prague. They were deposited directly into the cultivation medium E 199 with the antibiotic cocktail - cefuroxime 0.2 mg/ml, (Zinacef, GlaxoWellcome) + piperacillin 0.2 mg/ml (Pipril, Lederle) + amikacin 0.1 mg/ml (Amikin, Bristol-Myers Squibb) + fluconazol 0.1 mg/ml (Diflucan, Pfizer). After 24 hours storage at the temperature of 37.0 °C the valves were kept at + 5 to + 7 °C over the period of 3-5 days. Then they were transferred under sterile conditions into the cryoprotective solution (E 199 with 10% dimethylsulfoxide) in a laminar flow box, and sealed into plastic bags (Gambro Hemofreeze/Haemo bags NPBI BV DF 1200, the Netherlands) using two-layer technique. Finally, MA were programmed cooled (between temperatures of + 10 to - 60 °C at the rate of - 1 °C/min.) and then stored in liquid phase of liquid nitrogen (- 196 °C) in a separate container.

Average storage time in tissue bank was 5.3month (from 3.5 to 12 month). During the transportation from cryostore to the experimental facilities mitral allografts were kept in a container CP500 (Wharton & Taylor, USA) at gaseous phase of liquid nitrogen (temperature below -140°C). Thirty minutes before the operation they were removed from the container and thawed in a standard way used for human aortic and pulmonary allografts (15 minutes in room temperature followed by 15 minutes in 37°C water bath). We used exactly the same procedure for human tissue in clinical practice, as for the experimental mitral allograft transplantation in the sheep model.

In the experimental laboratory we used a similar shape of sample in all cases so we were measuring the mechanical properties of all parts of mitral valve at one time. Samples always contained the mitral annulus, part of the anterior leaflet, corresponding chordae tendineae and the postero-medial papillary muscle. For mechanical testing, the mitral allograft tissue was fixed to the traction machine jaws with mitral annulus and papillary muscle.

Stepwise stress-relaxation measurements were made on all tissue samples. Zwick Roell Z050 traction machine equipped with pneumatic grips and 200 N loading cell was used for the mitral allograft tissue testing. The specimens were fixed between the grips of the apparatus with a free length corresponding to the specimens' dimensions. The samples were stretched in steps of 1 millimeter every 5 minutes and the loading protocol consisted in six loading cycles. The time elapsed from the beginning of the step was chosen to reach approximately the steady state. The force-elongation curves were recorded.

A five element generalized Maxwell model was used in this study for the description of the relaxation behavior of the tissue. A simple Maxwell body includes a viscous element, η , and an elastic element, E , connected in series. Generalized Maxwell models consist of some simple Maxwell bodies coupled in parallel. In addition, an elastic element, E_p , may be connected in parallel to them. In stress relaxation experiments, the applied stretch $e(t) = \hat{e}$ is instantaneous and constant throughout the loading cycle. Constitutive equation of the generalized Maxwell model consisting in n Maxwell bodies with parallel elastic element E_p may be written as:

$$F(t) = \hat{e}E_p + \sum_{i=1}^n \hat{e}E_i \exp(-t / \tau_i),$$

where the time constant $\tau_i = \eta_i/E_i$ represents the corresponding relaxation time for one step of stretching and η_i and E_i denote the viscous and elastic modulus of i -th Maxwell body, respectively. For five element Maxwell model with $n = 2$, the above equation is the final force-time relation with five material parameters E_P , E_1 , E_2 , η_1 , and η_2 to be identified.

8.3 RESULTS

The above equations describe a single step of stretching at constant values of the parameters E_P , E_1 , E_2 , η_1 , and η_2 . Their values are different for each relaxation step. To identify these parameters, a direct exponential fitting to the experimental data was performed using statistical software R. The fitting process was the Gauss-Newton algorithm based on the nonlinear least-squares method. A set of material parameters was determined for each stretching step and for each specimen of the control group of fresh tissue and the test group of thawed cryopreserved MA, respectively. Coefficient of correlation R of the fitting procedure was better than 0.99 for all specimens and every loading cycle.

From the total number of 52 heart valves, the control group of fresh tissue contained 39 specimens while the test group of cryopreserved mitral allografts was represented by 13 specimens. The fitted values of material parameters were examined cycle by cycle. For each loading cycle, the outliers were carefully detected using standard techniques of exploratory data analysis and they were removed from the statistical files.

For each viscoelastic parameter and each loading cycle, null hypotheses were formulated stating that the means and the variances of the two groups under consideration do not differ significantly. To test the hypotheses, t-test and F-test were carried out in R statistical package. The assumed normality of the populations was tested and confirmed before the execution of the above mentioned tests. Both statistical tests were carried out at 95% confidence level.

The mean values of identified elastic moduli E_P , E_1 , and E_2 do not manifest any pronounced dominancy of one group of specimens over the other. Order of magnitude of all three elastic moduli ranges from 10^2 to 10^3 N/m.

The identified values of the parallel elastic modulus E_P range from 0.44 ± 0.24 kN/m in the first loading cycle to 4.65 ± 1.70 kN/m in the last loading cycle for the control group and from 0.58 ± 0.19 kN/m to 3.91 ± 1.79 kN/m for the test group. In the first loading cycle, the

modulus of the test group is slightly higher than that of the control group while its standard deviation remains lower. Control group modulus is then slightly higher in the next loading cycles.

Serial elastic modulus E_I is lower than parallel elastic modulus E_P but of the same order. For the control group, the values range from 0.29 ± 0.13 kN/m to 1.40 ± 0.43 kN/m, and for the test group from 0.36 ± 0.12 kN/m to 1.30 ± 0.56 kN/m. The values of the test group are slightly higher than the control group values up to the fourth loading cycle, almost equal in the fifth loading cycle, and finally little bit lower in the last loading cycle.

The identified values of serial elastic modulus E_2 are very similar to those of serial elastic coefficient E_I . The identified data encompass the interval from 0.25 ± 0.12 kN/m in the first loading cycle to 1.28 ± 0.48 kN/m in the last loading cycle in the case of the control group and from 0.23 ± 0.12 kN/m to 1.18 ± 0.64 kN/m in the case of the test group. The mean values of the test group are higher than means of the control group in the second and third loading cycle. This difference, however, is less than 0.05 kN/m up to the fourth loading cycle.

No significant difference ($p > 0.05$) was found for elastic parameters between the two groups of specimens, neither between the mean values, nor between the variances.

Test group serial viscous modulus η_I has higher values than that of the control group as apparent from Table 1. Order of magnitude of viscous modulus η_I lies between 10^4 and 10^5 Ns/m. It is the only viscoelastic parameter determined with such strongly pronounced dominance of one specimen group. The values range from 33.75 ± 13.36 kNs/m to 159.99 ± 48.48 kNs/m for the control group and from 44.08 ± 15.19 kNs/m to 163.30 ± 90.85 kNs/m for the test group. No significant difference ($p > 0.05$) was found between the mean values of the two groups of specimens. Significant difference in variances was observed in the third, fifth, and sixth loading cycle with p equal to 0.027, 0.042, and 0.004, respectively. Test group standard deviation is more than 1.65 higher than control group standard deviation in these three critical loading cycles.

As the equality of variances is one of the assumptions of the Student's t-test, the relevance of its results in the third, fifth, and sixth loading cycle may be compromised. Nevertheless, the difference of the mean values expressed as percentage of the higher mean gives 23%, 25%, 27%, 14%, 19%, and 2%. It is obvious that the differences 27% in the third cycle and 19% in the fifth cycle fall into reasonable limits. Note only 2% difference in means in the sixth

loading cycle. In this respect, the difference in means between the two groups remains negligible.

Viscous modulus η_2 of the test group has lower values than that of the control group and it has values of order of magnitude 10^3 Ns/m. Identified values of the viscous modulus η_2 encompass the interval from 1.63 ± 0.79 kNs/m to 7.57 ± 2.49 kNs/m in the control group and from 1.74 ± 1.13 kNs/m to 5.84 ± 3.56 kNs/m in the test group. As well as in the previous cases, no significant difference ($p > 0.05$) was found between the mean values of the two groups of specimens. Significant difference ($p = 0.031$) in variances was observed in the fourth loading cycle. However, the difference between mean values in this loading cycle is practically negligible.

In the present study, no significant difference between the control and testing group was found in mean values of determined parameters suggesting that the tissue processing and cryopreservation do not alter the tissue's structural components that play crucial role in its viscoelasticity. Tissue elasticity compensating mostly for the instantaneously applied load may be attributed to collagenous tissue, more precisely to the anterior leaflet and especially to the corresponding chordae tendineae. The viscous response corresponding to the relaxation of the specimen would be dominant mostly in muscular tissue. Significant differences observed in the variances of viscous parameters in certain loading cycles reflect a wider range of values of the test group compared to the control group. This difference cannot be attributed to the lack of a precondition phase since it would affect the control group as well. The difference may be due to variability in the geometry of the papillary muscle that contributes to the viscous response of the specimen and, so, to variability in its cross-section bearing the mechanical load. A similar size and geometrical shape of papillary muscle of harvested mitral allografts samples cannot be guaranteed since it depends on many factors including surgeon's judgment and experience. Moreover, attaching the muscle between the grips of the testing device may considerably change the free size of the muscle tissue that is not squeezed between the jaws and that participates on the viscous response to the applied load. Together with relatively low number of specimens in testing group and different number of specimens in each group, this factor may play a role in statistical analysis. Nonetheless, the results of the present study are very encouraging as they show that the tissue processing and cryopreservation do not alter significantly the overall viscoelastic behavior and mechanical performance of the tissue.

8.4 CONCLUSION

Our study shows that current allograft heart valve tissue processing and cryopreservation protocol could be applied on mitral allograft tissue as well. The mechanical properties of cryopreserved MA tissue do not differ significantly from the quality of the native mitral valve tissue in sheep model. On the basis of this experimental mechanical testing the standard allograft heart valve bank protocol will be used even for MA processing for clinical purposes.

9. POUŽITÁ LITERATURA

¹ Vojáček J, Mokráček A, Špatenka J, Vambera M, Šulda M, Šetina M, Burkert J, Pavel P, 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 Dec;131(6):511-6.

² Mokráček A., Hlubocký J., Burkert J., Vojáček J., Šulda M., Vambera M., Kursá J., Kroupová V., Kobylka P., Špatenka J.: Transplantation of Mitral Allograft into the Tricuspid Position – Sheep Experimental Model, *Acta Veterinaria Brno* 2007; 76, 149 – 155

³ Hill LL: A report of a case of successful suturing of the heart, and table of thirty seven other cases of suturing by different operators with various terminations, and the conclusions drawn. *Med Rec* 1902; 2:846.

⁴ Trendelenburg F: Zur operation der embolie der lungenarterie. *Dtsch Med Wochenschr* 1908; 34:1172.

⁵ Harken DE: Foreign bodies in and in relation to the thoracic blood vessels and heart: I. Techniques for approaching and removing foreign bodies from the chambers of the heart. *Surg Gynecol Obstet* 1946; 83:117.

⁶ Graybiel A, Strieder JW, Boyer NH: An attempt to obliterate the patent ductus in a patient with subacute endarteritis. *Am Heart J* 1938; 15:621.

⁷ Crafoord C, Nylin G: Congenital coarctation of the aorta and its surgical treatment. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1945; 14:347.

⁸ Blalock A, Taussig HB: The surgical treatment of malformations of the heart in which there is pulmonary stenosis or pulmonary atresia. *JAMA* 1945; 128:189.

⁹ Tuffier T: Etat actuel de la chirurgie intrathoracique. *Trans Int Congr Med* 1913(London, 1914), 7; *Surgery* 1914; 2:249.

¹⁰ Cutler EC, Levine SA: Cardiomy and valvulotomy for mitral stenosis. *Boston Med Surg J* 1923; 188:1023.

-
- ¹¹ Hufnagel CA, Harvey WP, Rabil PJ, et al: Surgical correction of aortic insufficiency. *Surgery* 1954; 35:673.
- ¹² Bigelow WG, Callaghan JC, Hopps JA: General hypothermia for experimental intracardiac surgery. *Am Surg* 1950; 132:531.
- ¹³ Lewis FJ, Taufic M: Closure of atrial septal defects with the aid of hypothermia: Experimental accomplishments and the report of one successful case. *Surgery* 1953; 33:52.
- ¹⁴ Johnson SL: *The History of Cardiac Surgery, 1896–1955*. Baltimore, Johns Hopkins Press, 1970; 148.
- ¹⁵ Gibbon JH Jr: Artificial maintenance of circulation during experimental occlusion of the pulmonary artery. *Arch Surg* 1937; 34:1105.
- ¹⁶ Gibbon JH Jr: Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. *Minn Med* 1954; 37:171.
- ¹⁷ Gibbon JH: Artificial maintenance of circulation during experimental occlusion of pulmonary artery. *Arch Surg* 1937; 34:1105.
- ¹⁸ Lillehei CW, Cohen M, Warden HE, et al: The results of direct vision closure of ventricular septal defects in eight patients by means of controlled cross circulation. *Surg Gynecol Obstet* 1955; 101:446.
- ¹⁹ Melrose DG, Dreyer B, Bentall MB, Baker JBE: Elective cardiac arrest. *Lancet* 1955; 2:21.
- ²⁰ Gay WA Jr, Ebert PA: Functional metabolic and morphologic effects of potassium-induced cardioplegia. *Surgery* 1973; 74:284.
- ²¹ Hearse DJ, Stewart DA, Braimbridge MV: Cellular protection during myocardial ischemia: The development and characterization of a procedure for the induction of reversible ischemic arrest. *Circulation* 1976; 54:193.
- ²² Follette DM, Mulder DG, Maloney JV, et al: Advantages of blood cardioplegia over continuous coronary perfusion or intermittent ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1978; 76:604.

-
- ²³ Rousou JA, Engelman RM, Breyer RH, et al: The effect of temperature and hematocrit level of oxygenated cardioplegic solutions on myocardial preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1988; 95:625.
- ²⁴ Lichtenstein SV, Ashe KA, El Dalati H, et al: Warm heart surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991; 101:269.
- ²⁵ Hayashida N, Ikonomides JS, Weisel RD, et al: The optimal cardioplegic temperature. *Ann Thorac Surg* 1994; 58:961.
- ²⁶ Harken DE, Soroff HS, Taylor WJ, et al: Partial and complete prostheses in aortic insufficiency. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1960; 40:744.
- ²⁷ Starr A, Edwards ML: Mitral replacement: Clinical experience with a ball-valve prosthesis. *Ann Surg* 1961; 154:726.
- ²⁸ Carpentier A: Cardiac valve surgery: the French correction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983; 86(3):323-37.
- ²⁹ Beck CS: The development of a new blood supply to the heart by operation. *Ann Surg* 1935; 102:805.
- ³⁰ Vineberg AM: Development of an anastomosis between the coronary vessels and a transplanted internal mammary artery. *Can Med Assoc J* 1946; 55:117.
- ³¹ Sones FM, Shirey EK: Cine coronary arteriography. *Mod Concepts Cardiovasc Dis* 1962; 31:735.
- ³² Garrett EH, Dennis EW, DeBakey ME: Aortocoronary bypass with saphenous vein grafts: seven-year follow-up. *JAMA* 1973; 223:792.
- ³³ Kolessov VI: Mammary artery–coronary artery anastomosis as a method of treatment for angina pectoris. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1967 Oct;54(4):535-44.
- ³⁴ Lytle BW, Loop FD, Cosgrove DM, Ratliff NB, Easley K, Taylor PC. Long-term (5 to 12 years) serial studies of internal mammary artery and saphenous vein coronary bypass grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1985 Feb;89(2):248-58.

-
- ³⁵ Loop FD, Lytle BW, Cosgrove DM, Stewart RW, Goormastic M, Williams GW, Golding LA, Gill CC, Taylor PC, Sheldon WC, et al. Influence of the internal-mammary-artery graft on 10-year survival and other cardiac events. *N Engl J Med*. 1986 Jan 2;314(1):1-6.
- ³⁶ Cameron A, Davis KB, Green G, Schaff HV. Coronary bypass surgery with internal-thoracic-artery grafts--effects on survival over a 15-year period. *N Engl J Med*. 1996 Jan 25;334(4):216-9.
- ³⁷ Lytle BW, Blackstone EH, Sabik JF, Houghtaling P, Loop FD, Cosgrove DM. The effect of bilateral internal thoracic artery grafting on survival during 20 postoperative years. *Ann Thorac Surg*. 2004 Dec;78(6):2005-12; discussion 2012-4.
- ³⁸ Mohr FW, Rastan AJ, Serruys PW, Kappetein AP, Holmes DR, Pomar JL, Westaby S, Leadley K, Dawkins KD, Mack MJ. Complex coronary anatomy in coronary artery bypass graft surgery: impact of complex coronary anatomy in modern bypass surgery? Lessons learned from the SYNTAX trial after two years. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2011 Jan;141(1):130-40.
- ³⁹ Carrel A, Guthrie CC: The transplantation of veins and organs. *Am Med* 1905; 10:1101.
- ⁴⁰ Barnard CN: A human cardiac transplant: An interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Capetown. *S Afr Med J* 1967; 41:1271.
- ⁴¹ Caves PK, Stinson EB, Billingham ME, et al: Percutaneous endomyocardial biopsy in human heart recipients. *Ann Thorac Surg* 1973; 16:325.
- ⁴² Oyer PE, Stinson EB, Jamieson SA, et al: Cyclosporin A in cardiac allografting: A preliminary experience. *Transplant Proc* 1983; 15:1247.
- ⁴³ Dagum P, Green GR, Nistal FJ, Daughters GT, Timek TA, Foppiano LE, Bolger AF, Ingels NB Jr, Miller DC. Deformational dynamics of the aortic root: modes and physiologic determinants. *Circulation*. 1999 Nov 9;100(19 Suppl):II54-62.
- ⁴⁴ Thubrikar MJ, Aouad J, Nolan SP. Comparison of the in vivo and in vitro mechanical properties of aortic valve leaflets. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1986 Jul;92(1):29-36.
- ⁴⁵ Christie GW, Barratt-Boyes BG. Age-dependent changes in the radial stretch of human aortic valve leaflets determined by biaxial testing. *Ann Thorac Surg*. 1995 Aug;60(2 Suppl):S156-8; discussion S159.

⁴⁶ Carabello BA. Is it ever too late to operate on the patient with valvular heart disease? *J Am Coll Cardiol.* 2004 Jul 21;44(2):376-83.

⁴⁷ Gunther S, Grossman W. Determinants of ventricular function in pressure-overload hypertrophy in man. *Circulation.* 1979 Apr;59(4):679-88.

⁴⁸ Feiring AJ, Rumberger JA. Ultrafast computed tomography analysis of regional radius-to-wall thickness ratios in normal and volume-overloaded human left ventricle. *Circulation.* 1992 Apr;85(4):1423-32.

⁴⁹ Kunzelman KS, Cochran RP, Murphree SS, Ring WS, Verrier ED, Eberhart RC. Differential collagen distribution in the mitral valve and its influence on biomechanical behaviour. *J Heart Valve Dis.* 1993 Mar;2(2):236-44.

⁵⁰ Kunzelman KS, Cochran RP. Stress/strain characteristics of porcine mitral valve tissue: parallel versus perpendicular collagen orientation. *J Card Surg.* 1992 Mar;7(1):71-8.

⁵¹ May-Newman K, Yin FC. Biaxial mechanical behavior of excised porcine mitral valve leaflets. *Am J Physiol.* 1995 Oct;269(4 Pt 2):H1319-27.

⁵² Silver MD, Lam JH, Ranganathan N, Wigle ED. Morphology of the human tricuspid valve. *Circulation.* 1971; 43: 333–348.

⁵³ Fukuda S, Saracino G, Matsumura Y, Daimon M, Tran H, Greenberg NL, Hozumi T, Yoshikawa J, Thomas JD, Shiota T. Three-dimensional geometry of the tricuspid annulus in healthy subjects and in patients with functional tricuspid regurgitation: a real-time, 3-dimensional echocardiographic study. *Circulation.* 2006; 114 (suppl): I-492–I-498.

⁵⁴ Vahanian A, Baumgartner H, Bax J, Butchart E, Dion R, Filippatos G, Flachskampf F, Hall R, Jung B, Kasprzak J, Nataf P, Tornos P, Torracca L, Wenink A; Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology; ESC Committee for Practice Guidelines. Guidelines on the management of valvular heart disease: The Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 2007 Jan;28(2):230-68.

⁵⁵ Porter A, Shapira Y, Wurzel M, Sulkes J, Vaturi M, Adler Y, Sahar G, Sagie A. Tricuspid regurgitation late after mitral valve replacement: clinical and echocardiographic evaluation. *J Heart Valve Dis* 1999; 8:57–62.

-
- ⁵⁶ Colombo T, Russo C, Ciliberto GR, Lanfranconi M, Bruschi G, Agati S, Vitali E. Tricuspid regurgitation secondary to mitral valve disease: tricuspid annulus function as guide to tricuspid valve repair. *Cardiovasc Surg* 2001;9:369–377.
- ⁵⁷ Dreyfus GD, Corbi PJ, Chan KM, Bahrami T. Secondary tricuspid regurgitation or dilatation: which should be the criteria for surgical repair? *Ann Thorac Surg* 2005;79:127–132.
- ⁵⁸ Hufnagel CA, Harvey WP: The surgical correction of aortic regurgitation preliminary report. *Bull Georgetown Univ Med Cent* 1953; 6:60.
- ⁵⁹ Shiono M, Sezai Y, Sezai A, et al: Long-term results of the cloth-covered Starr-Edwards ball valve. *Ann Thorac Surg* 2005; 80:204.
- ⁶⁰ Gao G, Wu Y, Grunkemeier GL, et al: Forty-year survival with the Starr-Edwards heart valve prosthesis. *J Heart Valve Dis* 2004; 13:91.
- ⁶¹ Ezekowitz MD: Anticoagulation management of valve replacement patients. *J Heart Valve Dis* 2002; 11(Suppl 1):S56.
- ⁶² Oxenham H, Bloomfield P, Wheatley DJ, et al: Twenty-year comparison of a Bjork-Shiley mechanical heart valve with porcine bioprostheses. *Heart* 2003; 89:697.
- ⁶³ Dominik J. *Kardiochirurgie*. Grada Publishing, 1998; 61-67.
- ⁶⁴ Gott VL, Alejo DE, Cameron DE: Mechanical heart valves: 50 years of evolution. *Ann Thorac Surg* 2003; 76:S2230.
- ⁶⁵ Nicoloff DM, Emery RW, Arom KV, et al: Clinical and hemodynamic results with the St. Jude Medical cardiac valve prosthesis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982; 82:674.
- ⁶⁶ Emery RW, Nicoloff DM: The St. Jude Medical cardiac valve prosthesis: In vitro studies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1979; 78:269.
- ⁶⁷ Emery RW, Anderson RW, Lindsay WG, et al: Clinical and hemodynamic results with the St. Jude Medical aortic valve prosthesis. *Surg Forum* 1979; 30:235.
- ⁶⁸ Kumar D, Elefteriades J, Ezekowitz MD: Anticoagulation in patients with prosthetic heart valves. *Cardiac Surg Today* 2004; 2:126.

⁶⁹ Bach DS, Sakwa MP, Goldbach M, et al: Hemodynamics and early clinical performance of the St. Jude Medical Regent mechanical aortic valve. *Ann Thorac Surg.* 2002 Dec;74(6):2003-9; discussion 2009.

⁷⁰ Binet JP, Carpentier A, Langlois J, Duran C, Colvez P. Implantation of heterogenic valves in the treatment of aortic cardiopathies. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* 1965 Dec 20;261(25):5733-4

⁷¹ Schoen FJ, Levy RJ: Founder's Award, 25th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, perspectives. Providence, RI, April 28–May 2, 1999. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives. *J Biomed Mater Res.* 1999 Dec 15;47(4):439-65.

⁷² David TE, Feindel CM, Scully HE, et al: Aortic valve replacement with stentless porcine aortic valves: a ten-year study. *J Heart Valve Dis.* 1998 May;7(3):250-4.

⁷³ Borger MA, Carson SM, Ivanov J, Rao V, Scully HE, Feindel CM, David TE. Stentless aortic valves are hemodynamically superior to stented valves during mid-term follow-up: a large retrospective study. *Ann Thorac Surg.* 2005 Dec;80(6):2180-5.

⁷⁴ Doss M, Martens S, Wood JP, Aybek T, Kleine P, Wimmer Greinecker G, Moritz A. Performance of stentless versus stented aortic valve bioprostheses in the elderly patient: a prospective randomized trial. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2003 Mar;23(3):299-304.

⁷⁵ Bloomfield P, Wheatley DJ, Prescott RJ, et al. Twelve-year comparison of a Bjork-Shiley mechanical heart valve with porcine bioprostheses. *N Engl J Med* 1991;324:573–9.

⁷⁶ 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.

⁷⁷ Oxenham H, Bloomfield P, Wheatley DJ, Lee RJ, Cunningham J, Prescott RJ, Miller HC. Twenty year comparison of a Bjork-Shiley mechanical heart valve with porcine bioprostheses. *Heart.* 2003 Jul;89(7):715-21.

⁷⁸ Murray G. Homologous aortic-valve-segment transplants as surgical treatment for aortic and mitral insufficiency. *Angiology.* 1956 Oct;7(5):466-471.

⁷⁹ Heimbecker RO. Durability of fresh homograft. *Ann Thorac Surg.* 1986 Nov;42(5):602-3.

-
- ⁸⁰ Ross DN Homograft replacement of the aortic valve. *Lancet*. 1962 Sep 8;2(7254):487.
- ⁸¹ Brewin EG. The use of tissue transplants in the surgery of cardiac valvar disease: an experimental study. *Guys Hosp Rep*. 1956;105(3):328-40.
- ⁸² Barrat-Boyes BG. Homograft aortic valve replacement in aortic incompetence and stenosis. *Thorax* 1964; 19: 131 - 150.
- ⁸³ Cohn LH, Edmunds LH. *Cardiac surgery in the adult*. Second Edition. McGRAW-HILL, Medical Publishing Division 2003: 867-888.
- ⁸⁴ Hubka M, Kay EB. Replacement of the mitral valve with a mitral or aortic valve homograft. *Bull Soc Int Chir*. 1969 May-Jun;28(3):359-65.
- ⁸⁵ 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.
- ⁸⁶ 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.
- ⁸⁷ Cachera JP, Salvatore L, Hermann TJ, Herbinet B: Reconstruction plastiques de l'appareil mitral chez aunoien de valves mitrale homologues conservees, *Ann Chir Thorac Cardiovasc* 1964, 3:494-501.
- ⁸⁸ Rastelli GC, Berghius J, Stan JH: Evaluation of function of mitral valve after homo-transplantation in the dog. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1965, 49:459-474.
- ⁸⁹ O'Brien MF, Gerdobe F. Homotransplantation of the mitral valve. Preliminary experimental report and review of the literature. *Aust and New Zealand J of Surg* 1964;34:81-88.
- ⁹⁰ Pappas G, Titus JL, Berghuis J et al. Dog mitral valve homografts and heterografts. *Surg Forum* 1966;17:175-176.
- ⁹¹ Senning A, Largiader F: Homologe transplantation von mitralklappen bel menshchen. *Transplant atbeschaffung und erste anwendung*. *Melsunger Medizinische Mitteilungen* 1967;41:79-84.

⁹² Huber R, Rothling M, Senning A. Spätresultate nach Atrioventrikularklappenersatz mit Mitralallotransplantat. *Thoraxchirurgie* 1975;23:33-38.

⁹³ Okha S. Late results of valve replacement with biological grafts. *Nippon Kyoto Geko* 1973;5:499-509.

⁹⁴ Sievers HH, Lange PE, Yankah AC et al. Allogeneous transplantation of the mitral valve. An open question. *Thorac Cardiovasc Surgeon* 1985;33:227-229.

⁹⁵ Dossche K, Vanermen H, Wellens F. Partial mitral valve replacement with a mitral homograft in subacute endocarditis. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1994 Aug;42(4):240-2.

⁹⁶ Acar C, Tolan M, Berrebi A, Gaer J, Gouezo R, Marchix T, Gerota J, Chauvaud S, Fabiani JN, Deloche A, Carpentier A. Homograft replacement of the mitral valve. Graft selection, technique of implantation, and results in forty-three patients. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996 Feb; 111(2):367-78; discussion 378-80.

⁹⁷ Acar C, lung B, Cormier B, Grare P, Berrebi A, D'Attellis N, Acar J, Carpentier A. Double mitral homograft for recurrent bacterial endocarditis of the mitral and tricuspid valves. *J Heart Valve Dis.* 1994 Sep;3(5):470-2.

⁹⁸ Pollock AV, Thomas V. Replacement of tricuspid cusp by homologous cusp in dogs. *Surg Gyn Obst* 1965;103:731-735.

⁹⁹ Summa M, Donegani E, Zatlana G et al. Successful orthotopic transplantation of fresh tricuspid valve homograft in a human. *Ann Thorac Surg* 1993;56:1407-1408.

¹⁰⁰ Pomar JL, Mestres CA. Tricuspid valve replacement using a mitral homograft. Surgical technique and initial results. *J Heart Valve Dis.* 1993 Mar;2(2):125-8.

¹⁰¹ Ross DN. Replacement of aortic and mitral valves with a pulmonary autograft. *Lancet.* 1967 Nov 4;2(7523):956-8.

¹⁰² Elkins RC, Knott-Craig CJ, Ward KE, Lane MM. The Ross operation in children: 10-year experience. *Ann Thorac Surg.* 1998 Feb;65(2):496-502.

¹⁰³ Ross D, Jackson M, Davies J. Pulmonary autograft aortic valve replacement: long-term results. *J Card Surg.* 1991 Dec;6(4 Suppl):529-33.

-
- ¹⁰⁴ Oury JH. The International Registry of the Ross procedure: 1996 results. *J Heart Valve Dis.* 1997 Jul;6(4):333-4.
- ¹⁰⁵ Elkins RC, Lane MM, McCue C. Pulmonary autograft reoperation: incidence and management. *Ann Thorac Surg.* 1996 Aug;62(2):450-5.
- ¹⁰⁶ Klieverik LM, Takkenberg JJ, Bekkers JA, Roos-Hesselink JW, Witsenburg M, Bogers AJ. The Ross operation: a Trojan horse? *Eur Heart J.* 2007 Aug;28(16):1993-2000.
- ¹⁰⁷ Sievers HH, Hanke T, Stierle U, Bechtel MF, Graf B, Robinson DR, Ross DN. A critical reappraisal of the Ross operation: renaissance of the subcoronary implantation technique? *Circulation.* 2006 Jul 4;114(1 Suppl):I504-11.
- ¹⁰⁸ Harken DE, Curtis LE. Heart surgery--legend and a long look. *Am J Cardiol.* 1967 Mar;19(3):393-400.
- ¹⁰⁹ Sodian R, Hoerstrup SP, Sperling JS, Daebritz S, Martin DP, Moran AM, Kim BS, Schoen FJ, Vacanti JP, Mayer JE Jr. Early in vivo experience with tissue-engineered trileaflet heart valves. *Circulation.* 2000 Nov 7;102(19 Suppl 3):III22-9.
- ¹¹⁰ Hoerstrup SP, Sodian R, Sperling JS, Vacanti JP, Mayer JE Jr. New pulsatile bioreactor for in vitro formation of tissue engineered heart valves. *Tissue Eng.* 2000 Feb;6(1):75-9.
- ¹¹¹ Sodian R, Hoerstrup SP, Sperling JS, Martin DP, Daebritz S, Mayer JE Jr, Vacanti JP. Evaluation of biodegradable, three-dimensional matrices for tissue engineering of heart valves. *ASAIO J.* 2000 Jan-Feb;46(1):107-10.
- ¹¹² Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE, Zund G, Miura T, Ma PX, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE Jr. Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. *Ann Thorac Surg.* 1995 Dec;60(6 Suppl):S513-6.
- ¹¹³ Shinoka T, Shum-Tim D, Ma PX, Tanel RE, Isogai N, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE Jr. Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998 Mar;115(3):536-45; discussion 545-6.
- ¹¹⁴ Stock UA, Nagashima M, Khalil PN, Nollert GD, Herden T, Sperling JS, Moran A, Lien J, Martin DP, Schoen FJ, Vacanti JP, Mayer JE Jr. Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000 Apr;119(4 Pt 1):732-40.

¹¹⁵ Shum-Tim D, Stock U, Hrkach J, Shinoka T, Lien J, Moses MA, Stamp A, Taylor G, Moran AM, Landis W, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE Jr. Tissue engineering of autologous aorta using a new biodegradable polymer. *Ann Thorac Surg.* 1999 Dec;68(6):2298-304; discussion 2305.

¹¹⁶ Elkins RC, Goldstein S, Hewitt CW, Walsh SP, Dawson PE, Ollerenshaw JD, Black KS, Clarke DR, O'Brien MF. Recellularization of heart valve grafts by a process of adaptive remodeling. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2001 Oct;13(4 Suppl 1):87-92.

¹¹⁷ Brown JW, Ruzmetov M, Eltayeb O, Rodefeld MD, Turrentine MW. Performance of SynerGraft decellularized pulmonary homograft in patients undergoing a Ross procedure. *Ann Thorac Surg.* 2011 Feb;91(2):416-22; discussion 422-3.

¹¹⁸ O'Brien MF, Goldstein S, Walsh S, Black KS, Elkins R, Clarke D. The SynerGraft valve: a new acellular (nonglutaraldehyde-fixed) tissue heart valve for autologous recellularization first experimental studies before clinical implantation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 1999 Oct;11(4 Suppl 1):194-200.

¹¹⁹ Baraki H, Tudorache I, Braun M, Höffler K, Görler A, Lichtenberg A, Bara C, Calistru A, Brandes G, Hewicker-Trautwein M, Hilfiker A, Haverich A, Cebotari S. Orthotopic replacement of the aortic valve with decellularized allograft in a sheep model. *Biomaterials.* 2009;30(31):6240–6246.

¹²⁰ Hoerstrup SP, Zund G, Schnell AM, Kolb SA, Visjager JF, Schoeberlein A, Turina M. Optimized growth conditions for tissue engineering of human cardiovascular structures. *Int J Artif Organs.* 2000;23(12):817–823.

¹²¹ Ku CH, Johnson PH, Batten P, Sarathchandra P, Chambers RC, Taylor PM, Yacoub MH, Chester AH. Collagen synthesis by mesenchymal stem cells and aortic valve interstitial cells in response to mechanical stretch. *Cardiovasc Res.* 2006;71(3):548–556.

¹²² Cribier A, Savin T, Saoudi N, et al : Percutaneous transluminal valvuloplasty of acquired aortic stenosis in elderly patients: An alternative to valve replacement? *Lancet* 1986; 1:63.

¹²³ Andersen HR, Knudsen LL, Hasenkam JM: Transluminal implantation of artificial heart valves: Description of an expandable aortic valve. Initial results with implantation by catheter technique in closed chest pigs. *Eur Heart J* 1992; 13:704.

¹²⁴ Cribier A, Eltchaninoff H, Bash A, et al: Percutaneous transcatheter implantation of an aortic valve prosthesis for calcific aortic stenosis: First human case description. *Circulation*. 2002 Dec 10;106(24):3006-8.

¹²⁵ Cribier A, Eltchaninoff H, Tron C, et al: Treatment of calcific aortic stenosis with the percutaneous heart valve: Midterm follow-up from the initial feasibility studies—the French experience. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47:1214.

¹²⁶ Carpentier A, Guilmet D, Dubost C. Aortic mitral and tricuspid valve replacement with frame mounted aortic heterografts. *Thoraxchir Vask Chir*. 1968 Dec;16(6):615-8.

¹²⁷ Carpentier A, Deloche A, Dauptain J, Soyer R, Blondeau P, Piwnica A, Dubost C, McGoon DC. A new reconstructive operation for correction of mitral and tricuspid insufficiency. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1971 Jan;61(1):1-13.

¹²⁸ David TE, Ho WC. The effect of preservation of chordae tendineae on mitral valve replacement for postinfarction mitral regurgitation. *Circulation*. 1986 Sep;74(3 Pt 2):1116-20.

¹²⁹ Mantovani V, Mariscalco G, Leva C, Blanzola C, Cattaneo P, Sala A. Long-term results of the surgical treatment of chronic ischemic mitral regurgitation: comparison of repair and prosthetic replacement. *J Heart Valve Dis*. 2004 May;13(3):421-8; discussion 428-9.

¹³⁰ Magne J, Girerd N, Sénéchal M, Mathieu P, Dagenais F, Dumesnil JG, Charbonneau E, Voisine P, Pibarot P. Mitral repair versus replacement for ischemic mitral regurgitation: comparison of short-term and long-term survival. *Circulation*. 2009 Sep 15;120(11 Suppl):S104-11.

¹³¹ Suri RM, Schaff HV, Dearani JA, Sundt TM III, Daly RC, Mullany CJ, Enriquez-Sarano M, Orszulak TA. Survival advantage and improved durability of mitral repair for leaflet prolapse subsets in the current era. *Ann Thorac Surg*. 2006; 82: 819–826.

¹³² Enriquez-Sarano M, Schaff HV, Orszulak TA, Tajik AJ, Bailey KR, Frye RL. Valve repair improves the outcome of surgery for mitral regurgitation. A multivariate analysis *Circulation* 1995;91:1022-1028.

¹³³ Carpentier A, Relland J, Deloche A, Fabiani JN, D'Allaines C, Blondeau P, Piwnica A, Chauvaud S, Dubost C. Conservative management of the prolapsed mitral valve. *Ann Thorac Surg*. 1978 Oct;26(4):294-302.

¹³⁴ Jebara VA, Mihaileanu S, Acar C, Brizard C, Grare P, Latremouille C, Chauvaud S, Fabiani JN, Deloche A, Carpentier A. Left ventricular outflow tract obstruction after mitral valve repair. Results of the sliding leaflet technique. *Circulation*. 1993 Nov;88(5 Pt 2):II30-4.

¹³⁵ Perier P, Hohenberger W, Lakew F, Batz G, Urbanski P, Zacher M, Diegeler A. Toward a new paradigm for the reconstruction of posterior leaflet prolapse: midterm results of the "respect rather than resect" approach. *Ann Thorac Surg*. 2008 Sep;86(3):718-25; discussion 718-25.

¹³⁶ Kang DH, Kim JH, Rim JH, Kim MJ, Yun SC, Song JM, Song H, Choi KJ, Song JK, Lee JW. Comparison of early surgery versus conventional treatment in asymptomatic severe mitral regurgitation. *Circulation*. 2009 Feb 17;119(6):797-804.

¹³⁷ Rosenhek R, Rader F, Klar U, Gabriel H, Krejc M, Kalbeck D, Schemper M, Maurer G, Baumgartner H. Outcome of watchful waiting in asymptomatic severe mitral regurgitation. *Circulation*. 2006; 113: 2238–2244.

¹³⁸ Aicher D, Fries R, Rodionychewa S, Schmidt K, Langer F, Schäfers HJ. Aortic valve repair leads to a low incidence of valve-related complications. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2010 Jan;37(1):127-32.

¹³⁹ Haydar HS, He GW, Hovaguimian H, McIrvine DM, King DH, Starr A. *Eur J Cardiothorac Valve repair for aortic insufficiency: surgical classification and techniques*. *Surg*. 1997 Feb;11(2):258-65.

¹⁴⁰ El Khoury G, Glineur D, Rubay J, Verhelst R, d'Acoz Y, Poncelet A, Astarci P, Noirhomme P, van Dyck M. Functional classification of aortic root/valve abnormalities and their correlation with etiologies and surgical procedures. *Curr Opin Cardiol*. 2005 Mar;20(2):115-21.

¹⁴¹ Langer F, Graeter T, Nikoloudakis N, Aicher D, Wendler O, Schäfers HJ. Valve-preserving aortic replacement: does the additional repair of leaflet prolapse adversely affect the results? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001 Aug;122(2):270-7.

¹⁴² Schäfers HJ, Bierbach B, Aicher D. A new approach to the assessment of aortic cusp geometry. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006 Aug;132(2):436-8.

¹⁴³ Yacoub MH, Gehle P, Chandrasekaran V, Birks EJ, Child A, Radley-Smith R. Late results of a valve-preserving operation in patients with aneurysms of the ascending aorta and root. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998 May;115(5):1080-90.

¹⁴⁴ David TE, Feindel CM. An aortic valve-sparing operation for patients with aortic incompetence and aneurysm of the ascending aorta. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992 Apr;103(4):617-21; discussion 622.

¹⁴⁵ Fries R, Graeter T, Aicher D, Reul H, Schmitz C, Böhm M, Schäfers HJ. In vitro comparison of aortic valve movement after valve-preserving aortic replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006 Jul;132(1):32-7.

¹⁴⁶ Lansac E, Di Centa I, Raoux F, Bulman-Fleming N, Ranga A, Abed A, Ba M, Paolitto A, Letourneur D, Meddahi-Pellé A. An expansible aortic ring for a physiological approach to conservative aortic valve surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009 Sep;138(3):718-24.

¹⁴⁷ Lansac E, Di Centa I, Sleilaty G, Crozat EA, Bouchot O, Hacini R, Blin D, Doguet F, Bessou JP, Albat B, De Maria R, Villemot JP, Portocarrero E, Acar C, Chatel D, Lopez S, Folliguet T, Debauchez M. An aortic ring: from physiologic reconstruction of the root to a standardized approach for aortic valve repair. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010 Dec;140(6 Suppl):S28-35; discussion S45-51.

¹⁴⁸ Aicher D, Kuniyama T, Abou Issa O, Brittner B, Gräber S, Schäfers HJ. Valve configuration determines long-term results after repair of the bicuspid aortic valve. *Circulation.* 2011 Jan 18;123(2):178-85.

¹⁴⁹ Deloche A, Guerinon J, Fabiani JN, Morillo F, Caramanian M, Carpentier A, Maurice P, Dubost C. [Anatomical study of rheumatic tricuspid valve diseases: Application to the study of various valvuloplasties]. *Ann Chir Thorac Cardiovasc.* 1973; 12: 343–349.

¹⁵⁰ Yiwu L, Yingchun C, Jianqun Z, Bin Y, Ping B. Exact quantitative selective annuloplasty of the tricuspid valve. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001; 122: 611–614.

¹⁵¹ Castedo E, Monguio E, Cabo RA, Ugarte J. Edge-to-edge technique for correction of tricuspid valve regurgitation due to complex lesions. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005; 27: 933–934.

¹⁵² DeVega NG. La anuloplastia selectiva, regulable y permanente. *Rev Esp Cardiol.* 1972; 25: 6–9.

¹⁵³ Dreyfus GD, Raja SG, John Chan KM. Tricuspid leaflet augmentation to address severe tethering in functional tricuspid regurgitation. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008 Oct;34(4):908-10.

¹⁵⁴ Jashari R, Goffin Y, Vanderkelen A, Van Hoeck B, du Verger A, Fan Y, Holovska V, Brahy O. European homograft bank: twenty years of cardiovascular tissue banking and collaboration with transplant coordination in Europe. *Transplant Proc*. 2010 Jan-Feb;42(1):183-9.

¹⁵⁵ Horstkotte D, Follath F, Gutschik E, et al. Guidelines on prevention, diagnosis and treatment of infective endocarditis. ESC guidelines. *Eur Heart J* 2004;25:1.

¹⁵⁶ Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, Fowler VG Jr, Bolger AF, Levison ME, Ferrieri P, Gerber MA, Tani LY, Gewitz MH, Tong DC, Steckelberg JM, Baltimore RS, Shulman ST, Burns JC, Falace DA, Newburger JW, Pallasch TJ, Takahashi M, Taubert KA; Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease; Council on Cardiovascular Disease in the Young; Councils on Clinical Cardiology, Stroke, and Cardiovascular Surgery and Anesthesia; American Heart Association; Infectious Diseases Society of America. Infective endocarditis: diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications: a statement for healthcare professionals from the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Councils on Clinical Cardiology, Stroke, and Cardiovascular Surgery and Anesthesia, American Heart Association: endorsed by the Infectious Diseases Society of America. *Circulation*. 2005 Jun 14;111(23):e394-434.

¹⁵⁷ Horstkotte D, Follath F, Gutschik E, Lengyel M, Oto A, Pavie A, Soler-Soler J, Thiene G, von Graevenitz A, Priori SG, Garcia MA, Blanc JJ, Budaj A, Cowie M, Dean V, Deckers J, Fernández Burgos E, Lekakis J, Lindahl B, Mazzotta G, Morais J, Oto A, Smiseth OA, Lekakis J, Vahanian A, Delahaye F, Parkhomenko A, Filipatos G, Aldershvile J, Vardas P; Task Force Members on Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG); Document Reviewers. Guidelines on prevention, diagnosis and treatment of infective endocarditis executive summary; the task force on infective endocarditis of the European society of cardiology. *Eur Heart J*. 2004 Feb;25(3):267-76.

¹⁵⁸ Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, et al. Infective endocarditis. Diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications. AHA scientific statement. *Circulation* 2005;111:e394-e433.

¹⁵⁹ Beneš J, Gregor P, Mokráček A. Infekční endokarditida: Doporučené postupy diagnostiky, léčby, dispenzarizace a profylaxe. *Cor Vasa* 2007; 49(11) suppl.: 106-120.

¹⁶⁰ Mathew J, Adai T, Nand A et al. Clinical features, site of involvement, bacteriologic findings, and outcome of infective endocarditis in intravenous drug users. *Arch Intern Med* 1995; 155:1641-8.

¹⁶¹ Beneš J, Kabelková M, Džupová O, Vacek V, Helcl M, Myslivec O, Feuereisl R, Vondráček V. Infekční endokarditida - pacienti hospitalizovaní na Infekční klinice Fakultní nemocnice Bulovka v letech 1990-1999. *Cor Vasa* 2000;42(8):389-396.

¹⁶² Miro JM, Moreno A, Mestres CA. Infective Endocarditis in Intravenous Drug Abusers. *Curr Infect Dis Rep.* 2003 Aug;5(4):307-316.

¹⁶³ Kabelková M, Beneš J, Helcl M, Příhodová J, Feuereisl R, Zeman J. Infekční endokarditidy u nitrožilních narkomanů. Pacienti hospitalizovaní na Infekční klinice Fakultní nemocnice Bulovka v letech 1981–2002. *Cor Vasa* 6/2004; 46(6):274 – 280.

¹⁶⁴ Frontera JA, Gradon JD. Right-side endocarditis in injection drug users: Review of proposed mechanisms of pathogenesis. *Clin Infect Dis* 2000; 30:374-9.

¹⁶⁵ Goldenberger D, Kunzil A, Vogt P, et al. Molecular diagnosis of bacterial endocarditis using broad-range PCR amplification and direct sequencing. *J Clin Microbiol* 1997;35: 2733-9.

¹⁶⁶ McGiffin DC, Galbraith AJ, Mc Lachlan GJ, et al. Aortic valve infection. Risk factors for death and recurrent endocarditis after aortic valve replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;104:511-20.

¹⁶⁷ Haydock D, Barratt Boyes B, Macedo T, et al. Aortic valve replacement for active infectious endocarditis in 108 patients. A comparison of freehand allograft valves with mechanical prostheses and bioprostheses. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;103:130-9.

¹⁶⁸ Kuyvenhoven JP, van Rijk-Zwikker GL, Hermans J, et al. Prosthetic valve endocarditis: Analysis of risk factors for mortality. *Eur J Cardiothorac Surg* 1994;8: 420-4.

¹⁶⁹ Sasaki H, Ihashi K, Ishikawa K. Sliding plasty using the triple-orifice technique for tricuspid endocarditis. *Ann Thorac Surg.* 2005 Aug;80(2):721-3.

¹⁷⁰ Ide H, Ino T, Adachi H, Mizuhara A, Yamaguchi A, Kawahito K. A case report of tricuspid valve valvoplasty for tricuspid endocarditis. *Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi.* 1994 Oct;42(10):1995-9.

-
- ¹⁷¹ Arbulu A, Holmes RJ, Asfaw I. Surgical treatment of intractable right-side endocarditis in drug addicts: 25 years' experience. *J Heart Valve Dis* 1993; 2:129-137.
- ¹⁷² Moon MR, Miller DC, Moore KA, et al: Treatment of endocarditis with valve replacement: the question of tissue versus mechanical prosthesis. *Ann Thorac Surg* 2001; 71:1164.
- ¹⁷³ Fisoufi F, Anyanwu AC, Salzberg SP, Frankel T, Cohn LH, Adams DH. Long-term outcomes of tricuspid valve replacement in the current era. *Ann Thorac Surg* 2005;80:845-850.
- ¹⁷⁴ Mangoni AA, DiSalvo TG, Vlahakes GJ, Polanczyk CA, Fifer MA. Outcome following isolated tricuspid valve replacement. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001;19:68-73.
- ¹⁷⁵ Iscan ZH, Vural KM, Bahar I, Mavioglu L, Saritas A. What to expect after tricuspid valve replacement? Long-term results. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007;32:296-300.
- ¹⁷⁶ Sung K, Park PW, Park KH, Jun TG, Lee YT, Yang JH, Kim WS, Hwang J. Is tricuspid valve replacement a catastrophic operation? *Eur J Cardiothorac Surg*. 2009 Nov;36(5):825-9.
- ¹⁷⁷ 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.
- ¹⁷⁸ Merin G, McGoon DC. Reoperation after insertion of aortic homograft as a right ventricular outflow tract. *Ann Thorac Surg*. 1973 Aug;16(2):122-6.
- ¹⁷⁹ Ross D, Yacoub MH. Homograft replacement of the aortic valve. A critical review. *Prog Cardiovasc Dis*. 1969 Jan;11(4):275-93.
- ¹⁸⁰ 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):II77-83.
- ¹⁸¹ Angell WW, Angell JD, Oury JH, Lamberti JJ, Grehl TM. Long-term follow-up of viable frozen aortic homografts. A viable homograft valve bank. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1987 Jun;93(6):815-22.
- ¹⁸² 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.

-
- ¹⁸³ 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.
- ¹⁸⁴ Polge C, Smith AU, Parkers AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature.* 1949 Oct 15;164(4172):666.
- ¹⁸⁵ Lovelock JE, Bishop MW. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature.* 1959 May 16;183(4672):1394-5.
- ¹⁸⁶ van der Kamp AW, Nauta J. Fibroblast function and the maintenance of the aortic-valve matrix. *Cardiovasc Res.* 1979 Mar;13(3):167-72.
- ¹⁸⁷ 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.
- ¹⁸⁸ Brockbank KG, Carpenter JF, Dawson PE. Effects of storage temperature on viable bioprosthetic heart valves. *Cryobiology.* 1992 Oct;29(5):537-42.
- ¹⁸⁹ Billingham ME, Baumgartner WA, Watson DC, Reitz BA, Masek MA, Raney AA, Oyer PE, Stinson EB, Shumway NE. Distant heart procurement for human transplantation. Ultrastructural studies. *Circulation.* 1980 Aug;62(2 Pt 2):111-9.
- ¹⁹⁰ Gattone VH 2nd, Filo RS, Evan AP, Leapman SB, Smith EJ, Luft FC. Time course of glomerular endothelial injury related to pulsatile perfusion preservation. *Transplantation.* 1985 Apr;39(4):396-9.
- ¹⁹¹ Burkert J, Krs O, Vojáček J, Mokráček A, Slízová D, Hlubocký J, Kobylka P, Spatenka J. Cryopreserved semilunar heart valve allografts: leaflet surface damage in scanning electron microscopy. *Zentralbl Chir.* 2008 Aug;133(4):367-73.
- ¹⁹² Southard JH, Marsh DC, McAnulty JF, Belzer FO. Oxygen-derived free radical damage in organ preservation: activity of superoxide dismutase and xanthine oxidase. *Surgery.* 1987 May;101(5):566-70.
- ¹⁹³ Fuller BJ, Gower JD, Green CJ. Free radical damage and organ preservation: fact or fiction? A review of the interrelationship between oxidative stress and physiological ion disbalance. *Cryobiology.* 1988 Oct;25(5):377-93.

¹⁹⁴ Messier RH Jr, Domkowski PW, Aly HM, Abd-Elfattah AS, Crescenzo DG, Wallace RB, Hopkins RA. High energy phosphate depletion in leaflet matrix cells during processing of cryopreserved cardiac valves. *J Surg Res.* 1992 May;52(5):483-8.

¹⁹⁵ 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.

¹⁹⁶ Abd-Elfattah AS, Messier RH Jr, Domkowski PW, Jones JL, Aly HM, Crescenzo DG, Wallace RB, Hopkins RA. Inhibition of adenosine deaminase and nucleoside transport. Utility in a model of homograft cardiac valve preimplantation processing. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993 Jun;105(6):1095-105.

¹⁹⁷ 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.

¹⁹⁸ Crescenzo DG, Hilbert SL, Barrick MK, Corcoran PC, St Louis JD, Messier RH, Ferrans VJ, Wallace RB, Hopkins RA. Donor heart valves: electron microscopic and morphometric assessment of cellular injury induced by warm ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992 Feb;103(2):253-7; discussion 257-8.

¹⁹⁹ Strickett MG, Barratt-Boyes BG, MacCulloch D. Disinfection of human heart valve allografts with antibiotics in low concentration. *Pathology.* 1983 Oct;15(4):457-62.

²⁰⁰ Gonzales-Lavin L, McGrath L, Alvares M, Graf D. Antibiotic sterilization in the preparation of homovital homograft valves: Is it Necessary? *Cardiac Valve Allografts 1962-1987.* New York: Springer-Verlag 1987:17-21.

²⁰¹ 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.

²⁰² 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.

²⁰³ Ramsheyi SA, Pargaonkar S, Lassau JP, Acar C. Morphologic classification of the mitral papillary muscles. *J Heart Valve Dis.* 1996 Sep;5(5):472-6.

²⁰⁴ Senning A, Largiader F: Homologe transplantation von mitralklappen bel menshchen. Transplant atbeschaffung und erste anwendung. Melsunger Medizinische Mitteilungen 1967;41:79-84.

²⁰⁵ Ali M, lung B, Lansac E, Bruneval P, Acar C. Homograft replacement of the mitral valve: eight-year results. J Thorac Cardiovasc Surg. 2004 Oct;128(4):529-34.

²⁰⁶ Doty DB, Flores JH, Doty JR, Millar RC. Mitral valve replacement with homograft. Semin Thorac Cardiovasc Surg. 1999 Oct;11(4 Suppl 1):191-3.

²⁰⁷ Gulbins H, Anderson I, Kilian E, Schrepfer S, Uhlig A, Kreuzer E, Reichart B. Five years of experience with mitral valve homografts. Thorac Cardiovasc Surg. 2002 Aug;50(4):223-9.

²⁰⁸ Chauvaud S, Waldmann T, d'Attellis N, Bruneval P, Acar C, Gerota J, Jarraya M, Carpentier A. Homograft replacement of the mitral valve in young recipients: mid-term results. Eur J Cardiothorac Surg. 2003 Apr;23(4):560-6.

²⁰⁹ Kumar AS, Choudhary SK, Mathur A, Saxena A, Roy R, Chopra P. Homograft mitral valve replacement: five years' results. J Thorac Cardiovasc Surg. 2000 Sep;120(3):450-8.

²¹⁰ Ray R, Choudhary SK, Kumar AS. Pathological aspects of explanted homograft valve. Cardiovasc Pathol. 2002 May-Jun;11(3):177-80.

²¹¹ McGrath LB, Chen C, Bailey BM, Fernandez J, Laub GW, Adkins MS. Early and late phase events follow in bioprosthetic tricuspid valve replacement. J Card Surg. 1992;7:245–249.

²¹² Dunn JM. Porcine valve durability in children. Ann Thorac Surg. 1981;32:357–368.

²¹³ Kawashira Y, Yagihara T, Uemura H, Yoshizumi K, Yoshikawa Y, Kitamura S. Replacement of the tricuspid valve in children with congenital cardiac malformations. J Heart Valve Dis. 2000;9:636–640.

²¹⁴ Mestres CA, Miro JM, Pare JC, Pomar JL. Six-year experience with cryopreserved mitral homografts in the treatment of tricuspid valve endocarditis in HIV – infected drug addicts. J Heart Valve Dis 1999; 8:575-577.

²¹⁵ Couetil JP, Argyriadis PG, Shafy A, Cohen A, Berrebi AJ, Loulmet DF, Chachques JC, Carpentier AF. Partial replacement of the tricuspid valve by mitral homografts in acute endocarditis. Ann Thorac Surg. 2002 Jun;73(6):1808-12.

-
- ²¹⁶ Miyagishima RT, Brumwell ML, Jamieson WRE, Munt BI. Tricuspid valve replacement using a cryopreserved mitral homograft. Surgical technique and initial results. *J Heart Valve Dis* 2000;9:805-8.
- ²¹⁷ L'Italien GJ, Maloney RD, Abbott WM. The preservation of the mechanical properties of venous allografts by freezing. *J Surg Res* 1979 Oct;27(4):239-43.
- ²¹⁸ Vesely I, Gonzalez-Lavin L, Graf D, Boughner D. Mechanical testing of cryopreserved aortic allografts. Comparison with xenografts and fresh tissue. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990 Jan;99(1):119-23.
- ²¹⁹ Adham M, Gournier JP, Favre JP, De La Roche E, Ducerf C, Baulieux J, Barral X, Pouyet M. Mechanical characteristics of fresh and frozen human descending thoracic aorta. *J Surg Res* 1996 Jul 15;64(1):32-4.
- ²²⁰ Gournier JP, Adham M, Favre JP, Raba M, Bancel B, Lepetit JC, Barral X. Cryopreserved arterial homografts: preliminary study. *Ann Vasc Surg* 1993 Nov;7(6):503-11.
- ²²¹ Rosset E, Friggi A, Novakovitch G, Rolland PH, Rieu R, Pellissier JF, Magnan PE, Branchereau A. Effects of cryopreservation on the viscoelastic properties of human arteries. *Ann Vasc Surg* 1996 May;10(3):262-72.
- ²²² Bujan J, Pascual G, Garcia-Honduvilla N, Gimeno MJ, Jurado F, Carrera-San Martin A, Bellon JM. Rapid thawing increases the fragility of the cryopreserved arterial wall. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000 Jul;20(1):13-20.
- ²²³ Pukacki F, Jankowski T, Gabriel M, Oszkinis G, Krasinski Z, Zapalski S. The mechanical properties of fresh and cryopreserved arterial homografts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000 Jul;20(1):21-4.
- ²²⁴ Stemper BD, Yoganandan N, Stineman MR, Gennarelli TA, Baisden JL, Pintar FA. Mechanics of fresh, refrigerated, and frozen arterial tissue. *J Surg Res* 2007 May 15;139(2):236-42.
- ²²⁵ Chow MJ, Zhang Y. Changes in the Mechanical and Biochemical Properties of Aortic Tissue due to Cold Storage. *J Surg Res* 2010 May 20.

²²⁶ Christie GW, Barratt-Boyes BG. Biaxial mechanical properties of explanted aortic allograft leaflets. *Ann Thorac Surg*1995 Aug;60(2 Suppl):S160-4.

²²⁷ Courtman DW, Pereira CA, Omar S, Langdon SE, Lee JM, Wilson GJ. Biomechanical and ultrastructural comparison of cryopreservation and a novel cellular extraction of porcine aortic valve leaflets. *J Biomed Mater Res*1995 Dec;29(12):1507-16.

²²⁸ Langerak SE, Groenink M, van der Wall EE, Wassenaar C, Vanbavel E, van Baal MC, Spaan JA. Impact of current cryopreservation procedures on mechanical and functional properties of human aortic homografts. *Transpl Int*2001 Aug;14(4):248-55.

²²⁹ Aidulis D, Pegg DE, Hunt CJ, Goffin YA, Vanderkelen A, Van Hoeck B, Santiago T, Ramos T, Gruys E, Voorhout W. Processing of ovine cardiac valve allografts: 1. Effects of preservation method on structure and mechanical properties. *Cell Tissue Bank*2002;3(2):79-89.

²³⁰ Farrington M, Wreghitt T, Matthews I, Scarr D, Sutehall G, Hunt CJ, Santiago T, Gruys E, Voorhout W, Ramos T, Pegg DE. Processing of cardiac valve allografts: 2. Effects of antimicrobial treatment on sterility, structure and mechanical properties. *Cell Tissue Bank*2002;3(2):91-103.

²³¹ Neves J, Abecassis M, Santiago T, Ramos T, Melo J, Gruys E, Hulskamp-Koch C, Ultee A, Verkaar EL, Lenstra JA, Goffin YA, Vanderkelen A, Van Hoeck B, Hunt CJ, Pegg DE. Processing of ovine cardiac valve allografts: 3. Implantation following antimicrobial treatment and preservation. *Cell Tissue Bank*2002;3(2):105-19.

²³² Jensen MO, Lemmon JD, Gessaghi VC, Conrad CP, Levine RA, Yoganathan AP. Harvested porcine mitral xenograft fixation: impact on fluid dynamic performance. *J Heart Valve Dis*2001 Jan;10(1):111-24.

²³³ Kuroiwa T, Yamada I, Katsumata N, Endo S, Ohno K. Ex vivo measurement of brain tissue viscoelasticity in postischemic brain edema. *Acta Neurochir Suppl.* 2006;96:254-7.

²³⁴ Liu Z, Bilston L. On the viscoelastic character of liver tissue: experiments and modelling of the linear behavior. *Biorheology.* 2000;37(3):191-201.

²³⁵ Ocal S, Ozcan MU, Basdogan I, Basdogan C. Effect of preservation period on the viscoelastic material properties of soft tissues with implications for liver transplantation. *J Biomech Eng.* 2010 Oct;132(10):101007.

-
- ²³⁶ Orosz M, Molnarka G, Nadasy G, Raffai G, Kozmann G, Monos E. Validity of viscoelastic models of blood vessel wall. *Acta Physiol Hung.* 1999;86(3-4):265-71.
- ²³⁷ Iatridis JC, Wu J, Yandow JA, Langevin HM. Subcutaneous tissue mechanical behavior is linear and viscoelastic under uniaxial tension . *Connect Tissue Res.* 2003;44(5):208-17.
- ²³⁸ Fung YC: Bioviscoelastic solids. In: *Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues.* Springer Verlag, New York, 1993, 242-314.
- ²³⁹ Gao Z, Lister K, Desai JP: Constitutive modeling of liver tissue: experiment and theory. *Ann Biomed Eng.* 2010 Feb;38(2):505-16.
- ²⁴⁰ Carew EO, Barber JE, Vesely I. Role of preconditioning and recovery time in repeated testing of aortic valve tissues: validation through quasilinear viscoelastic theory. *Ann Biomed Eng.* 2000 Sep;28(9):1093-100.
- ²⁴¹ Liao D, Zhao J, Kunwald P, Gregersen H. Tissue softening of guinea pig oesophagus tested by the tri-axial test machine. *J Biomech.* 2009 May 11;42(7):804-10.
- ²⁴² Ghaemi H, Behdinan K, Spence AD. In vitro technique in estimation of passive mechanical properties of bovine heart part I. Experimental techniques and data. *Med Eng Phys.* 2009 Jan;31(1):76-82.