

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta



Mechanické a morfologické vlastnosti lidských chlopenních štěpů v závislosti na délce kryoprezervace

MUDr. Radovan Fiala

Praha 2019

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Studijní program: experimentální chirurgie

MUDr. Radovan Fiala

**Mechanické a morfologické vlastnosti lidských
chlopenních štěpů v závislosti na délce kryoprezervace**

**Human heart valve allografts mechanical and
morphological properties according to duration of
tissue cryopreservation**

Disertační práce

Školitel: MUDr. Jan Burkert, Ph.D.

Konzultant: Ing. Petra Kochová, Ph.D.

Praha 2019

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 28.5. 2019

MUDr. Radovan Fiala

IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM

FIALA, Radovan. *Mechanické a morfologické vlastnosti lidských chlopenních štěpů v závislosti na délce kryoprezervace [Human heart valve allografts mechanical and morphological properties according to duration of tissue cryopreservation]*. Praha, 2019. 118 s., 4 příl. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Klinika kardiovaskulární chirurgie. Školitel Burkert, Jan.

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych rád poděkoval především:

MUDr. Janu Burkertovi, Ph.D., mému školiteli, za příkladné vedení, myšlenkovou podporu a pomoc při zpracování disertační práce. Jeho cenné rady a věcné připomínky zásadní měrou přispěly ke zdárnému dokončení této práce. MUDr. Jaroslavu Špatenkovi, CSc., který mne k výzkumné práci přivedl, za jeho neustále nové podněty a trpělivé konzultace. Jeho entuziasmus, vědomosti a ryzí přístup k poctivé vědecké práci jsou velkou inspirací. Oba pro mne svým širokým rozhledem, rozsáhlými klinickými, vědeckými a publikačními zkušenostmi, ale i vřelým lidským přístupem vždy byli a jsou velkým vzorem nejen v profesní oblasti. Od počátku mé klinické i výzkumné praxe jsou mými velkými učiteli, kteří pomáhají formovat moji lékařskou i vědeckou osobnost. Je pro mne velikou ctí, že jsme nejen kolegové, ale i osobní přátelé.

Ing. Petře Kochové, Ph.D., mé konzultantce, bez jejíhož odborného vedení, trpělivosti a ochoty by výzkumná část projektu v tak komplexním rozsahu nikdy nevznikla. Patří jí mé převeliké díky za nesmírné osobní nasazení, které věnovala realizaci experimentu, zpracování dat a přípravě jejich prezentace. Její obrovské zkušenosti, vědecké nadšení a orientace v problematice testování mechanických vlastností biomateriálů mají můj hluboký respekt.

Doc. MUDr. Mgr. Zbyňku Tonarovi, Ph.D. za odborný dohled a věcné připomínky k uspořádání, přípravě a realizaci projektu. Mgr. Tereze Kubíkové, Ph.D. za čas a energii, kterou věnovala histologickému zpracování vzorků v průběhu experimentu. Doc. MUDr. Vilému Rohnovi, CSc., přednostovi Kliniky kardiovaskulární chirurgie FN Motol a 2. LF UK, za umožnění mého postgraduálního studia a podporu v jeho dokončení. Velké díky patří i transplantačním koordinátorkám a koordinátorům, kteří jsou neodmyslitelnou součástí rozsáhlého týmu podílejícího se na přípravě, realizaci a technickém zajištění projektu. Stejný vděk patří i všem technikům, kteří se zajišťovali mechanické testování vzorků a sběr dat v experimentu.

V neposlední řadě bych rád poděkoval své manželce Kláře a synovi Matyášovi za jejich podporu a pochopení pro mou práci. Stejný vděk patří mým rodičům i všem členům mé široké rodiny, kteří mi vždy pomáhali a vytvářeli podmínky pro můj osobní i odborný růst.

Pozn.: Celý projekt byl financován z prostředků Národní banky alogenních chlopenních štěpů a vznikl i za podpory projektu Aplikace moderních technologií v medicíně a průmyslu reg.č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007280 financovaného z EFRR a projektu LO1506 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR v rámci programu NPU I, za což jsem samozřejmě velmi vděčný.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	7
1. ÚVOD	8
1.1. HISTORIE CHLOPENNÍCH NÁHRAD	9
1.2. TYPY CHLOPENNÍCH NÁHRAD	12
1.3. CHLOPENNÍ ALOGRAFTY	15
1.3.1. <i>Indikace použití chlopenních alograftů</i>	15
1.3.2. <i>Typy chlopenních alograftů</i>	20
1.3.3. <i>Odběr, příprava a uchování chlopenního alograftu</i>	22
1.4. KRYOBANKA	26
1.5. ANATOMIE ALOGRAFTŮ SEMILUNÁRNÍCH CHLOPNÍ	29
1.6. MECHANIKA SRDEČNÍCH CHLOPNÍ	31
1.6.1. <i>Srdeční cyklus</i>	31
1.6.2. <i>Dynamika semilunárních chlopní</i>	32
1.7. PATOLOGIE SEMILUNÁRNÍCH CHLOPNÍ	33
1.8. TESTOVÁNÍ MECHANICKÝCH VLASTNOSTÍ BIOMATERIÁLŮ	35
1.9. MORFOLOGICKÉ HODNOCENÍ	38
1.9.1. <i>Základní struktura pojivové tkáně</i>	39
1.9.2. <i>Příprava histologického preparátu</i>	39
1.9.3. <i>Hodnocení preparátů a analýza obrazu</i>	41
2. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE.....	44
3. MATERIÁL A METODY	45
3.1. CHARAKTERISTIKA SOUBORU	45
3.2. ZPRACOVÁNÍ A VÝBĚR ŠTĚPŮ	46
3.3. PŘÍPRAVA VZORKŮ	48
3.4. MECHANICKÉ TESTOVÁNÍ	50
3.5. HISTOLOGICKÉ HODNOCENÍ	53
3.6. STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT	54
4. VÝSLEDKY	56
4.1. MECHANICKÉ A MORFOLOGICKÉ VLASTNOSTI ČERSTVÝCH ASCH (SKUPINA 0)	56
4.2. MECHANICKÉ A MORFOLOGICKÉ VLASTNOSTI KRYOPREZEROVANÝCH ASCH SKLADOVANÝCH DO 5 LET (SKUPINA I)	61
4.3. MECHANICKÉ A MORFOLOGICKÉ VLASTNOSTI KRYOPREZEROVANÝCH ASCH SKLADOVANÝCH 5-9,9 LET (SKUPINA II)	67
4.4. MECHANICKÉ A MORFOLOGICKÉ VLASTNOSTI KRYOPREZEROVANÝCH ASCH SKLADOVANÝCH 10 A VÍCE LET (SKUPINA III) ..	73
4.5. SROVNÁNÍ MECHANICKÝCH A MORFOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ ASCH V ZÁVISLOSTI NA DÉLCE KRYOPREZERVACE	79
4.5.1. <i>Aortální ASCH</i>	79
4.5.2. <i>Pulmonální ASCH</i>	87
4.6. VZTAH MEZI MECHANICKÝMI A STRUKTURÁLNÍMI VLASTNOSTMI ASCH, DÉLKOU KRYOPREZERVACE A VĚKEM A POHLAVÍM DÁRCŮ	95
4.6.1. <i>Délka kryoprezervace a mechanické a strukturální vlastnosti aortálních ASCH</i>	95
4.6.2. <i>Délka kryoprezervace a mechanické a strukturální vlastnosti pulmonálních ASCH</i>	95
4.6.3. <i>Vztah mezi strukturálními a mechanickými vlastnostmi ASCH</i>	96
4.6.4. <i>Vztahy mezi mechanickými a strukturálními vlastnostmi ASCH a charakteristikami dárců</i>	96
5. DISKUZE	98
6. ZÁVĚR	106
7. SOUHRN	108
8. ABSTRACT	109
9. POUŽITÁ LITERATURA.....	110
SEZNAM PŘÍLOH.....	118

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

σ	napětí
ε	poměrná deformace
A_A	plošný podíl v referenční ploše (area fraction)
AASCH	aortální alograft srdeční chlopně
ANOVA	analýza rozptylu (analysis of variance)
ASCH	alograft srdeční chlopně
DMSO	dimethylsulfoxid
E	Youngův modul pružnosti
E_0	Youngův modul pružnosti pro malé deformace
E_1	Youngův modul pružnosti pro velké deformace
E199	médium pro antibiotický roztok k dekontaminaci chlopenních štěpů
EACTS	European Association for Cardio-Thoracic Surgery
EATCB	European Association of Tissue and Cell Banks
ECM	extracelulární hmota (matrix)
EOA	efektivní plocha ústí chlopně (effective orifice area)
ESC	European Society of Cardiology
F	síla
FN	fakultní nemocnice
GAG	glykosaminoglykany
IQR	mezikvartilové rozpětí
MT	tloušťka stěny
n.s.	není signifikantní
NTIS	Nové technologie pro informační společnost
NZIS	Národní zdravotnický informační systém
PASCH	pulmonální alograft srdeční chlopně
r_s	Spearmanův korelační koeficient
S	plocha
STB85	Specializovaná tkáňová banka 85
TAVI	transcatheter aortic valve implantation
TPV	transcatheter pulmonary valve
ÚHKT	Ústav hematologie a krevní transfúze
V-A	ventrikulo-arteriální
VATS	video asistovaná thorakoskopie (video-assisted thoracic surgery)

1. ÚVOD

Disertační práce „Mechanické a morfologické vlastnosti lidských chlopenních štěpů v závislosti na délce kryoprezervace“ se věnuje problematice přípravy, kryoprezervace a uchovávání lidských aortálních a pulmonálních chlopenních štěpů a řeší otázku, jak významně se mění mechanické a morfologické vlastnosti tkání štěpu po expiraci, v časovém horizontu 5 až 10 let. Je rozdělena do několika oddílů. První část přináší literární přehled a základní úvod do problematiky. Úvod je koncipován tak, aby usnadnil orientaci čtenáři bez vzdělání v kardiologii/kardiochirurgii, v tkáňovém bankovníctví, v problematice testování biomateriálů i v histologii. Seznamuje s historií chlopenních náhrad a jejich nejčastěji používanými typy. Od samého počátku chlopenní chirurgie se hledá optimální způsob náhrady postižené chlopně. Vedle vývoje různých podob mechanických a biologických chlopenních protéz se rozvíjela i myšlenka na využití evolucí ověřeného přírodního designu lidských chlopní – alograftů.

Ve své další části se práce snaží čtenáři představit jednotlivé typy alograftů srdečních chlopní, indikace pro jejich použití, výhody, ale i úskalí s nimi spojená. Popisuje způsob přípravy chlopenních štěpů a přibližuje principy jejich uchovávání. Důležitým milníkem je zřízení kryoskladu, resp. kryobanky, která v našich podmínkách funguje již více než 25 let.

V dalším textu jsou připomenuty základní aspekty anatomie, fyziologie a patologie semilunárních chlopní. Na principu srdečního cyklu je blíže popsána dynamika aortální a pulmonální chlopně. Pro pochopení všech aspektů praktické části projektu představuje úvod základy testování mechanických vlastností biomateriálů a histologického hodnocení morfologie tkání.

Po shrnutí cílů disertační práce následuje vlastní praktická část s podrobným popisem experimentální složky projektu hodnotící vlastnosti lidských chlopenních alograftů. Studijní materiál pro experiment byl poskytnut Národní bankou alogenních chlopenních štěpů, která je součástí Tkáňového zařízení Oddělení transplantací a tkáňové banky Fakultní nemocnice v Motole. K realizaci projektu mohlo dojít díky úzké spolupráci s výzkumným centrem NTIS

(Nové technologie pro informační společnost) na Západočeské univerzitě v Plzni a Ústavem embryologie a histologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni.

Závěrečný oddíl práce tvoří seznam použité literatury a přílohy prací publikovaných v rámci prezentace výzkumného projektu v odborných periodících.

1.1. Historie chlopenních náhrad

První zdokumentované pokusy o chirurgickou léčbu chlopenních vad se datují do počátku 20. století. Přes pokrok, kterého kardiologie již tehdy dosáhla, šlo díky technickým omezením v případě zákroků na chlopenních spíše o kazuistické případy s očekávaně vysokou morbiditou a mortalitou. Pionýrským počinem byla práce amerického chirurga Charlese Hufnagela (1916–1989), který při léčbě aortální regurgitace v roce 1952 v Georgetownu (USA) implantoval do descendentní hrudní aorty pomocný ventil v podobě plastové (metakrylátové) kuličky v plastovém pouzdře. Výkon na otevřeném srdci bylo tehdy možné provést prakticky pouze v cirkulační zástavě při celkové hypotermii, tedy v podmínkách, které jsou i v dnešní době považovány za vysoce rizikové a spojené s množstvím komplikací. Hufnagelova operace se proto zaměřila na descendentní aortu, kterou bylo možné svorkou krátkodobě uzavřít. Nešlo tedy ještě o přímou náhradu srdeční chlopně. Přesto konstrukce jeho chlopně ukázala další směr ve vývoji náhrad (Butany et al. 2002; Hufnagel a Harvey 1953). Princip kuličky, která je uzavřená v pouzdře nebo kleci a obtékána krví při systole a brání zpětnému toku v diastole byl východiskem pro konstrukce dalších protéz (*obr. 1*).

Obr. 1: Hufnagelova chlopeň – metakrylátová kulička v plastovém pouzdře – implantovatelná do descendentní aorty při léčbě aortální regurgitace. Princip byl později přejat při výrobě dalších typů umělých chlopenních náhrad.



Zdroj: Alan Hawk, *Historical Collections, National Museum of Health and Medicine* (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hufnagel_heart_Valve1511214-photos_309.jpg), „Hufnagel heart Valve1511214-photos 309“, oříznutí obrázku upraveno autorem textu, <https://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/legalcode>

Moderní chirurgická léčba srdečních vad se rozvíjí až s objevem mimotělního oběhu. Přístroj představený v roce 1953 Američanem Johnem Gibbonem (1903-1973) umožnil operace na otevřeném srdci a odstartoval tak éru chlopenní chirurgie. První úspěšnou náhradu aortální chlopně mechanickou kuličkovou protézou provedl americký chirurg Dwight Harken (1910-1993) v Bostonu roce 1960 (Stephenson 2000). Chlopenní chirurgie se od počátku potýká s otázkou vhodné náhrady postižené nativní chlopně. Průkopníky v této oblasti byli Albert Starr (narozen 1926) a Miles Lowell Edwards (1898-1982). Ze spolupráce mladého chirurga a zkušeného konstruktéra vzešel design kuličkové protézy Starr-Edwards, která svými vlastnostmi a výsledky implantace do mitrální, ale i aortální a trikuspidální pozice suverénně překonala původní pokusy o napodobení nativní chlopně pomocí lístkové náhrady (Matthews 1998). Na dlouhá léta se stala zlatým standardem umělých chlopenních náhrad (*obr. 2*). Použití mechanické protézy sebou však stále přinášelo vysoké riziko, převážně trombotických komplikací. Proto byly dále vyvíjeny další typy, tzv. biologických náhrad.

Obr. 2: Chlopeň Starr-Edwards se silikonovou kuličkou v kovové kleci. Základní design této chlopně byl s různými úpravami vyráběn firmou Edwards Lifesciences až do roku 2007



Zdroj: Dr. Mirko Junge (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Prosthetic_Cardiac_Ball_Valves.jpg), „Prosthetic Cardiac Ball Valves“, výřez z obrázku upraven autorem textu, <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/legalcode>

Logickou myšlenkou bylo využití lidských kadaverózních chlopní (allograftů) a náhrad vyrobených z tkání jiného živočišného druhu (xenograftů). Techniku přenosu nativní chlopně z jednoho jedince (dárce) na druhého (příjemce) na zvířecím modelu popsali v Oxfordu Carlos Duran (1932-2017) a Alfred Gunning (1918-2011) (Duran a Gunning 1962). Krátce nato provedli implantaci kadaverózního lidského chlopenního allograftu (homograftu) lidskému příjemci téměř současně Donald Ross (1922-2014) v Londýně (Ross 1962), Sir Bryan Barrat-

Boyes (1924-2006) v Aucklandu (Barrat-Boyes 1964) a Raymond Heimbecker (1922-2014) v Torontu (Heimbecker et al. 1962). Ke všem zákrokům došlo v průběhu roku 1962 nezávisle na sobě na třech různých kontinentech. První dva jmenovaní využili aortální chlopeň dárce k náhradě aortální chlopně příjemce. Heimbecker v březnu 1962 implantoval aortální alograft do mitrální pozice. Jeho pacient zemřel měsíc po výkonu z důvodu těžké infekce a rozvratu vnitřního prostředí. Pitevní nález na srdci byl ale zcela příznivý. Ross použil aortální homograft (alograft) k náhradě aortální chlopně v červnu 1962. V příštích 6 letech vytvořil soubor 250 pacientů, kteří tento zákrok podstoupili (Davies et al. 1968). Sir Barrat-Boyes provedl svůj první zákrok v srpnu 1962, do listopadu roku 1963 nabídl náhradu postižené aortální chlopně 44 pacientům. Své poznatky publikoval o rok později (Barrat-Boyes 1964). První pacientkou byla 14letá dívka se srdečním selháním při insuficienci aortální chlopně. Získala chlopeň 23letého kadaverózního dárce. Po 13 letech od výkonu byla zcela bez obtíží, bez potřeby antikoagulační terapie a absolvovala 3 normální těhotenství (Barratt-Boyes et al. 1977).

Použití chlopenních alograftů do ortotopické pozice předcházely kromě zvířecích modelů prováděných převážně na psech (Lam et al. 1952) i první implantace do descendentní aorty u lidských pacientů (Murray 1956; Beall et al. 1961).

Paralelně s alografty vznikaly i první biologické xenogenní chlopně. Stimulem k jejich vývoji byly v některých případech místně specifické legislativní překážky neumožňující využití lidských tkání k přenosu do jiného jedince. Zákaz použití alograftů byl zpočátku uplatňován i ve Francii. Bylo proto nutné hledat jiné cesty. Alan Carpentier (narozen 1933) v Paříži vyvinul první úspěšné biologické chlopenní protézy z prasečích chlopní fixovaných glutaraldehydem (Carpentier et al. 1974). Jím navržené Carpentier-Edwards prasečí biologické chlopně patřily dlouhá léta k nejpoužívanějším typům biologických náhrad (Fann et al. 1996). Od 80. let 20. století k nim přibýly biologické chlopenní náhrady vyráběné z hovězího, výjimečně z koňského perikardu.

Vývoj dále pokračuje, hitem posledních 20 let jsou bezstentové chlopně imitující právě alograft a posledního desetiletí chlopenní náhrady zaváděné katetrizačně (TAVI – transcatheter aortic valve implantation, perkutánní implantace plicnicové chlopně).

1.2. Typy chlopenních náhrad

Výměnu postižené chlopně lze provést mechanickou protézou nebo biologickou náhradou. Původní plexisklové nebo silikonové kuličkové mechanické protézy byly nahrazeny modernějšími diskovými a aktuálně nejpoužívanějšími dvoulístkovými z titanu a karbonu (*obr. 3*). Na trhu existuje množství různých druhů mechanických chlopenních náhrad lišících se profilem, ukotvením a expozicí cípů nebo tlakovým gradientem.

Obr. 3: Příklady běžně používaných chlopenních náhrad. **a** – biologická chlopenní náhrada z prasečí chlopně St. Jude Medical Epic Supra; **b** – biologická chlopenní náhrada z hovězího perikardu Carpentier-Edwards PERIMOUNT; **c** – mechanická chlopenní náhrada St. Jude Medical Regent. Základ protézy tvoří prstenec a disky z grafitu napuštěného wolframem a pokryté pyrolytickým karbonem. Našívací manžeta je vyrobena z pletených polyesterových vláken a opatřena značkami pro umístění stehů při implantaci.



Zdroj: www.cardion.cz a www.edwards.com

Obecně je možné rozlišit 3 základní druhy biologické náhrady chlopně:

- *autograft* = pacientova vlastní chlopeň
- *allograft* = lidská chlopeň získaná od kadaverózního dárce (homograft)
- *xenograft* = chlopenní náhrada vyrobená ze zvířecích chlopní nebo jiných tkání

Autograft je možné použít pro náhradu aortální chlopně vlastní plicnicovou chlopní při tzv. Rossově operaci, resp. Ross I anebo při náhradě mitrální chlopně pulmonálním autograftem, Ross II (podrobněji viz dále – 1.3.1. Indikace použití chlopenních allograftů). Alografty aortální, plicnicové, ale i mitrální chlopně lze využít k náhradě všech srdečních chlopní. Xenografty jsou kombinací biologického a umělého materiálu – jde tedy v pravém slova smyslu o bioprotézy (Dominik 2006). Zatímco v případě prasečích (porcinních) chlopní jde přímo o speciálně chemicky ošetřenou chlopeň konstruovanou z nekoronárních cípů kořene aorty prasete všitou do speciálního nosiče a našívacího prstence (stentu), hovězí (bovinní) chlopeň je konstruována

z hovězího perikardu, nosné kostry a prstence. Nejmodernější bezstentové (stentless) xenografty neobsahují kostru a našívací prstenec, imitují lidskou semilunární chlopeň, tedy alograft. Při náhradě aortální chlopně umožňují speciální subkoronární implantaci („freehand“) nebo náhradu celého kořene s reimplantací koronárních tepen (Dominik 2009) tak, jak jsou od 60. let minulého století transplantovány aortální alografty.

Volba biologické či mechanické náhrady je stále předmětem diskuze. Základní pravidla výběru jsou upravena doporučenými postupy (Baumgartner et al. 2018). Obecně platí, že biologické protézy k náhradě aortální chlopně jsou nabízeny pacientům s předpokládanou životní prognózou kratší než životnost chlopně, tj. starším 65 let bez potřeby antikoagulační léčby z jiných příčin (např. arytmie) nebo mladším pacientům s kontraindikací antikoagulační terapie (např. i ženy zvažující těhotenství). Volba aortální mechanické protézy je vhodná pro pacienty mladší 65 let, pokud není kontraindikace trvalé antikoagulační léčby nebo u starších nemocných, kteří antikoagulační terapii užívají z jiných příčin. Kromě věku a faktoru antikoagulační léčby hrají svoji roli i přidružená onemocnění a životní prognóza. Finální rozhodnutí je vždy individuální, kromě oficiálních doporučení hraje svoji roli preference chirurga a často i přání samotného informovaného pacienta. Doporučení i v současné době procházejí úpravami. V posledních letech je znatelný příklon k biologickým náhradám i u pacientů ve věku nižším než stanovené kritérium.

Ze studií porovnávajících dlouhodobé výsledky obou typů náhrad (Veterans trial, Edinburgh trial) vyplývá, že míra přežití je v obou skupinách podobná, srovnatelný je i výskyt trombotických či tromboembolických komplikací. Mechanická náhrada je spojena s vyšším výskytem krvácivých komplikací, biologická s vyšším výskytem reintervencí (Lung a Sjögren 2018).

Vedle klasických kardiochirurgických výkonů prováděných ze střední sternotomie se rozvíjí i metody minimálně invazivní, využívající „mini“ přístupy (sternotomie, thorakotomie), videoasistované výkony (VATS) a robotická chirurgie. Rychle se etablojícími technikami jsou katetrizační náhrady aortální a plicnicové chlopně (TAVI, TPV), při kterých je náhrada tvořená xenogenním perikardem a kovovým stentem implantována do příslušné pozice transfemorálně (tepnu nebo žilou), případě u aortální chlopně přes hrot levé komory.

Ideální chlopenní náhrada by měla mít hemodynamické vlastnosti blížíící se příslušné nativní chlopni (usměrnění toku krve, malý odpor, žádný nebo nízký tlakový gradient, šetrnost ke krevním elementům), měla by vykazovat dostatečnou trvanlivost (celoživotní), odolnost vůči infekci, pracovat tiše a nevyžadovat žádnou další medikamentózní léčbu. Cílem výrobců je také snadná implantace, tedy maximální uživatelská přívětivost pro chirurga.

Navzdory pokroku, který na poli designu a vývoje chlopenních náhrad od poloviny 20. století nesporně nastal, nemá kardiologie ani dnes k dispozici chlopenní protézu, kterou by bylo možné označit za ideální. Vždy jde o kompromis zvolený s ohledem na individuální potřeby konkrétního pacienta (*tab. 1*).

Obecně lze říct, že hlavní nevýhodou mechanických protéz je nutnost celoživotní antikoagulační terapie přímými antikoagulancii, antagonisty vitamínu K (např. warfarin), případně novými orálními antikoagulancii (NOAC). S touto léčbou jsou však spojena rizika závažného krvácení v případě úrazu či předávkování, nebo naopak trombotických komplikací v případě neúčinné léčby.

Příčinou selhání biologických náhrad je jejich postupná degradace a kalcifikace cípů, jejichž důsledkem je omezení funkce protézy vyžadující v krajním případě reintervenci.

Tab. 1: Porovnání vlastností jednotlivých typů chlopenních náhrad.

	VÝHODY	NEVÝHODY
mechanická protéza	neomezená životnost snadná implantace	riziko infekce poškození krevních elementů riziko trombózy = potřeba trvalé antikoagulace zvukový efekt (tikot, klapání)
biologická protéza	neslyšný chod bez nutnosti trvalé antikoagulace předpokládána vyšší odolnost vůči infekci	omezená životnost, nutnost reoperace obtížnější implantace stentless chlopni

autograft	vlastní tkáň odolnost vůči infekci fyziologická hemodynamika	nutnost náhrady plicnice alografem technická složitost možnost degenerace plicnicového alografu možnost dilatace autografu
homograft (alograft)	fyziologická chlopeň odolnost vůči infekci bez nutnosti antikoagulace	technická náročnost transplantace degenerace alograftu dostupnost alograftu
TAVI	minimální invazivita	riziko přístupové cesty riziko paravalvulárního leaku riziko poruchy převodního systému srdečního (nutnost implantace kardiostimulátoru) riziko cévní mozkové příhody nedostatek dlouhodobých dat

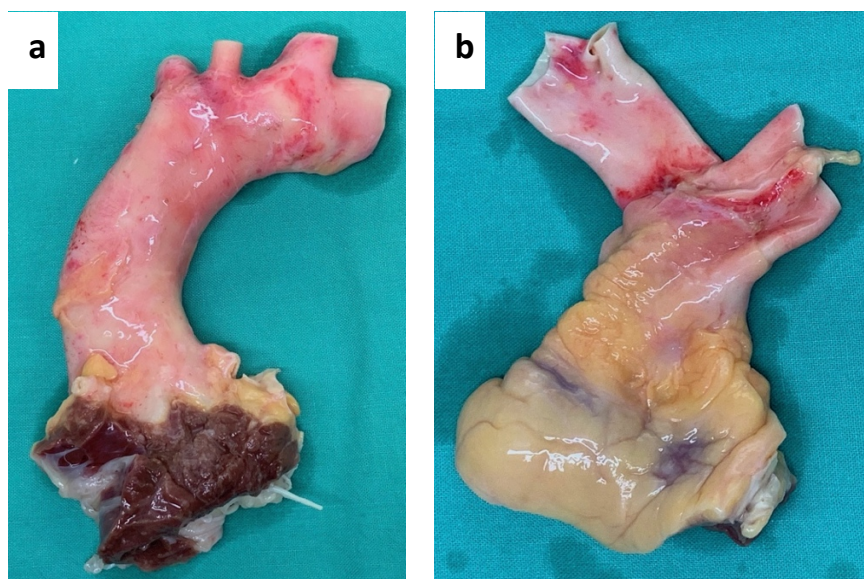
1.3. Chlopenní alografty

V oblasti alogenních chlopenních štěpů panuje určitá nomenklaturní promiskuita. Od počátku se vžilo označení homograft (*homo* lat. = člověk), jako štěp získaný od člověka. Tento termín je i dnes široce používán kardiocirurgy, kardiology i tkáňovými bankéři. Terminologicky přesnější je však označení chlopenní alograft (*allos* lat. = jiný) jako štěp získaný od jiného jedince stejného živočišného druhu (Špatenka 2018). Termín, který se snaží ve všech svých výstupech prosazovat naše tkáňová banka je alotransplantát srdeční chlopně (ASCH). V práci si dovoluji využít všechny tyto ustálené termíny.

1.3.1. Indikace použití chlopenních alograftů

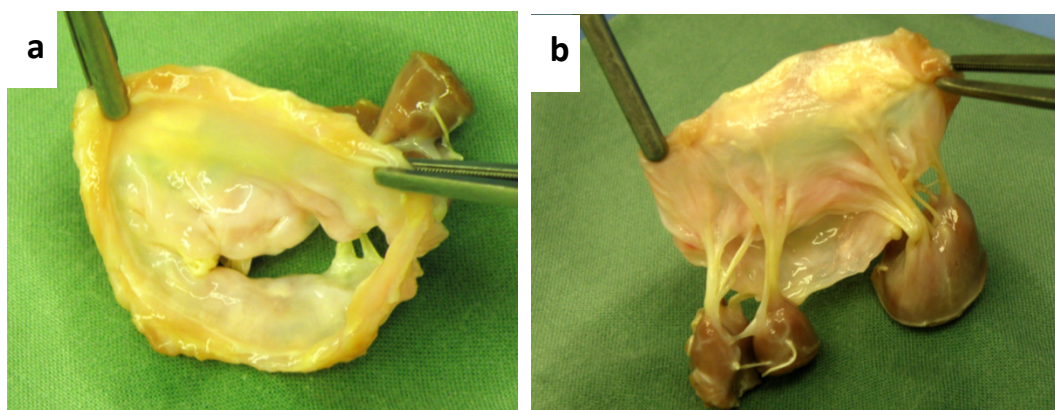
Standardně užívanými alografty srdečních chlopní jsou aortální a pulmonální (*obr. 4*). Kromě nich lze ze srdce dárce získat a použít i štěp mitrální chlopně (*obr. 5*). Jeho využití se však nikdy nedočkal širšího rozšíření. Původní myšlenka implantace do mitrální pozice byla prakticky zcela opuštěna. Diskutovaná zůstává indikace jeho implantace do trikuspidální pozice v případě infekční endokarditidy. Jeho výhody podporují experimentální práce na zvířecím modelu (Vojáček et al. 2006; Mokravec et al. 2015)

Obr. 4: Běžně užívané alografty srdečních chlopní po vypreparování ze srdce dárce. **a** – aortální, **b** – pulmonální



Zdroj: vlastní fotografie

Obr. 5: Alograft mitrální chlopně po vypreparování ze srdce dárce. **a** – pohled na cípy z levé síně, **b** – pohled z levé komory, cípy s papilárními svaly.



Zdroj: archiv Oddělení transplantací a tkáňové banky FN Motol, s laskavým svolením

Zásadní výhodou aortálního a pulmonálního alograftu jsou jejich hemodynamické a reologické vlastnosti dané zachováním nativní anatomie a vztahů mezi cípy, Valsalvovými sinami (a tedy odstupem koronárních tepen) a sinotubulární junkcí. Chlopní alograft po transplantaci proto naprosto věrně imituje reologii kořene aorty, či plicnice dárce a vykazuje prakticky stejné hemodynamické parametry. Této situaci se nedokáže přiblížit žádná ze současně dostupných mechanických ani biologických náhrad, kromě bezstentových chlopní implantovaných jako kořen. Důvodem náhrady celého aortálního kořene místo prosté implantace protézy na místo

postižené chlopně je mimo výše uvedeného i možnost „oversizingu“, tedy vytvoření většího efektivního ústí náhrady a dosažení nižších tlakových gradientů. To může mít příznivý vliv na dynamiku levé komory, dlouhodobou funkci náhrady a přežívání pacientů (El-Hamamsy et al. 2010). Chlopenní alografty vykazují minimální výskyt infekčních a trombotických komplikací, a přitom nevyžadují antikoagulační terapii (Takkenberg et al. 2003).

Výhody chlopenních alograftů:

- maximální možná (téměř fyziologická) efektivní plocha ústí (EOA) srovnatelná s nativní chlopní
- potenciál „dilatace anulu“ a zvětšení EOA v případě zvýšených nároků na srdeční výdej (např. při zátěži)
- minimální trombogenicita, bez nutnosti antikoagulační či antiagregační terapie
- naprostá nehlučnost
- relativní odolnost vůči infekci

Oceňovaná odolnost vůči infekci souvisí s optimálními reologickými vlastnostmi a absencí syntetického materiálu v kontaktu s krví nemocného. Nespornou výhodou je flexibilita použití – např. aortální štěpy jsou připravovány s nadbytkem materiálu, vč. aortálního oblouku a předního cípu mitrální chlopně. Nabízejí tak chirurgovi možnost volby při rekonstrukcích kořene aorty a výtokového traktu levé komory (Mokráček et al. 2007), případně komplexní rekonstrukce v aortomitrální oblasti – tzv. „UFO operace“ (Misfeld et al. 2012; Špatenka a Burkert 2018).

Protiváhou neoddiskutovatelně výborných hemodynamických vlastností je strukturální degradace a kalcifikace stěny i cípů chlopenního alograftu, ke kterým dochází rychleji u mladších pacientů (Barron et al. 2010; Da Costa et al. 2006; Stoliński et al. 2006). Bylo ověřeno, že ke kalcifikaci dochází rychleji než u náhrad aortálního kořene stentless protézou. Příčinou je pravděpodobně imunitní reakce zaměřená proti buňkám a cípům alograftu (El-Hamamsy et al. 2009). Přesto ale žádné pracoviště na světě nežívá v této indikaci imunosupresi.

K hlavním limitům použití chlopenních alograftů patří:

- vyšší technická náročnost transplantace
- obtížnější reintervence
- ve většině zemí nedostupnost nebo omezená dostupnost

Přes počáteční boom je použití chlopenních alograftů v současnosti omezeno jen na nízké procento celkového počtu chlopenních náhrad (1-5 %). Aortální alograft může být alternativou k nejčastěji používaným mechanickým a biologickým chlopenním protézám. Jeho využití závisí na preferencích a zkušenosti pracoviště. Hlavní indikací k využití chlopenních alograftů v dospělé kardiologii zůstává infekční endokarditida, zejména v případech nutnosti rekonstrukce infekcí destruovaného výtokového traktu komor, anulu a dalších struktur.

Specifickým typem výkonu je Rossova operace, při které je pacientova vlastní plicnicová chlopeň autotransplantována do aortální pozice (tedy jako autograft), aby pak její místo nahradil pulmonální alograft. Technika byla vyvinuta a popularizována britským chirurgem Donaldem Rossem (1922-2014) (Ross 1967). Původně byla popsána autotransplantace pulmonálního autograftu do aortální pozice – Ross I i do mitrální pozice – Ross II. Zatímco první alternativa je dodnes pokládána za kontroverzní, bohatě v odborné literatuře diskutovaný výkon, druhá alternativa je dodnes zcela výjimečně užívána v méně vyvinutých zemích, když nemocný není schopen uhradit cenu komerční mitrální protézy, ale sežene krytí na levný, v nemocnici „of the shell“ připravovaný pulmonální alograft. Když se diskutuje Rossova operace, je tím automaticky dnes myšlena první alternativa (Ross I). Tento výkon je dnes na specializovaných pracovištích indikován zejména pro ženy plánující těhotenství, aktivní sportovce nebo obecně osoby, jejichž aktivní životní styl je spojen s vysokým rizikem poranění a krvácení („risktakers“). Výkon provedený u pacientů v dětském věku má obrovskou výhodu v tom, že plicnicová chlopeň v aortální pozici má potenciál růstu. Druhou stranou mince je fakt, že z relativně jednoduchého výkonu na jedné chlopni se rázem stává komplexní výkon na dvou chlopních, s nutností náhrady plicnicové chlopně alograftem a reimplantací koronárních tepen.

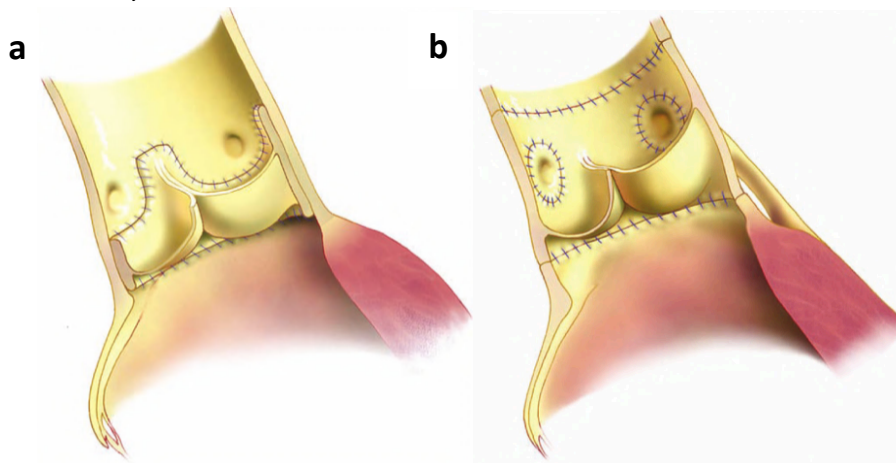
Hlavní uplatnění nacházejí chlopní alografty v dětské kardiologii. Hrají nezastupitelnou roli při řešení vrozených vad srdečních s nutností rekonstrukce výtokového traktu pravé i levé komory nebo jako náhrady aortální a plicnicové chlopně. K hlavním takovým diagnózám patří Fallotova tetralogie s atrézií plicnice, arteriální trunkus, dvojitá pravá komora se stenózou plicnice, společná komora apod. (Špatenka et al. 1997).

Obecně lze historicky užívané způsoby transplantace aortálního alograftu rozdělit do 3 základních skupin:

1. **subkoronární technika** („freehand“) – tvar alograftu je upraven tak aby korespondoval s anatomíí kořene aorty příjemce, komisury chlopně tvoří vrcholy koruny, která je dvouvrstevně všita do aorty příjemce se zachováním původních ústí koronárních tepen a úpravou kořene příjemce tak, aby odpovídal geometrii kořene aorty dárce.
2. **inkluzní technika** („cylindr“) – do nativní aorty příjemce je implantována aorta s chlopní dárce, homograft je upraven tak, aby o cca 3-4 mm přečníval pod cípy a cca 5 mm nad komisurami, v „cylindru“ jsou vytvořeny otvory pro koronární tepny.
3. **náhrada kořene** („root replacement“) – technicky nejnáročnější způsob spočívající v náhradě celého kořene aorty homograftem a reimplantaci koronárních tepen.

První a zejména poslední varianta (*obr. 6*) jsou v současnosti nejčastěji používané techniky (Dominik 2009; Špatenka a Burkert 2018).

Obr. 6: Technika transplantace aortálního alograftu do aortální pozice. **a** – subkoronární „freehand“ technika, **b** – náhrada kořene aorty



Zdroj: autor Prof. MUDr. Pavel Žáček, Ph.D., použito v Dominik 2009, s laskavým svolením autora

1.3.2. Typy chlopenních alograftů

Chlopenní alografty jsou připravovány z lidských srdcí získaných při multiorgánovém odběru nebo při sekci. Vzhledem k vysokým nárokům na kvalitu štěpů a očekávané degeneraci chlopní a velkých tepen v závislosti na věku byl věkový limit dárce stanoven na 65 let (Jashari et al. 2004). V případě pulmonálních alograftů zvýšila některá světová pracoviště limit na 70 let (Grosse et al. 2008). V našich podmínkách jsou dnes chlopenní alografty získávány výhradně v rámci multiorgánového odběru, pokud je srdce shledáno jako z jakéhokoliv důvodu nevhodné k transplantaci jako orgánu.

Chlopenní alografty rozlišují podle způsobu ošetření a uchování a časového faktoru, ve kterém dochází k jejich využití:

- *homovitální*
- *čerstvé ("fresh")*
- *kryoprezervované*

Způsob sterilizace a prezervace má zásadní vliv na krátkodobé i dlouhodobé výsledky chlopenních alograftů (Yacoub et al. 1995).

V případě prvních chlopenních alograftů šlo o štěpy tzv. homovitální, transplantované příjemci záhy po odběru, většinou do 24 hodin, tedy v režimu odběru a transplantace orgánu. Tento způsob použití přinášel řadu omezení. V případě získání štěpu za sterilních podmínek multiorgánového odběru byly chlopenní alografty použity bez dalšího ošetření. Rutinní použití vyžadovalo perfektní organizační zajištění, včetně čekací listiny. Odběr z kadaverů v rámci sekce sebou nesl potřebu zvláštní přípravy a dekontaminace. Při hledání optimálního způsobu sterilizace byly zkoušeny různé metody ošetření – 10 % formalinem, chlorhexidinem, ethylenoxidem, glutaraldehydem, glycerolem nebo gama zářením (Gunning a Meade 1971). Většina těchto metod vedla k denaturaci proteinů extracelulární hmoty (elastinu) a ošetřené chlopenní alografty vykazovaly nadměrný výskyt ruptury cípů. Zásadní zlepšení přinesl protokol sterilizace antibiotickým roztokem a uložení alograftu při teplotě 4 °C používaný od

roku 1968 (Barratt-Boyes et al. 1977). Transplantace probíhala do 48 hodin po odběru. Velmi krátký časový interval neumožňoval detailnější vyšetření štěpů. Tento způsob přípravy a použití je dnes legislativně vyloučen.

Dalším možným režimem zpracování chlopenních alograftů jsou tzv. čerstvé (fresh) alografty. Příprava probíhá ze srdcí odebraných v rámci multiorgánového odběru nebo od nežijícího dárce do 6 hodin od úmrtí. Dekontaminaci zajišťuje inkubace v antibiotickém roztoku při teplotě 37 °C a následně 4 °C po dobu 24 hodin až 6 dnů. V průběhu tohoto času jsou provedena mikrobiologická, histologická a serologická vyšetření k posouzení kvality a bezpečnosti štěpu. Složení antibiotického roztoku musí zajistit důkladnou sterilizaci při minimálním možném poškození tkáně. Účinnost je kontrolována opakovaným mikrobiologickým vyšetřením. Pozitivní kultivace po proběhlé dekontaminaci je důvodem k vyřazení štěpu. Po schválení a uvolnění štěpu k transplantaci je nutné zákrok provést do 4, maximálně 6 týdnů (Anastasiadis et al. 2004; Špatenka a Burkert 2018). Nemožnost delšího skladování je hlavním limitem širšího rozšíření „fresh“ alograftů.

Snaha odstranit tento limit vedla k vyvinutí techniky kryoprezervace a dlouhodobého hypotermického skladování. Odběr srdce probíhá v rámci multiorgánového odběru, získané chlopenní štěpy jsou dekontaminovány a vyšetřeny stejně jako u předchozího typu. Po inkubaci v antibiotickém roztoku však následuje další zpracování v podobě mražení. První pokusy o delší uchování alograftů používaly proces lyofilizace (freeze-drying) při teplotách kolem -40 °C. Tento způsob uchování byl spojen s vysokým výskytem ruptury cípů a záhy opuštěn (Barratt-Boyes et al. 1977). Nicméně takto byl ošetřen první transplantovaný aortální alograft v roce 1962. V roce 1975 byla Australanem Markem O'Brienem představena metoda kryoprezervace (O'Brien et al. 1987). Programové mražení v tekutém dusíku na teplotu -196 °C a uložení v kryokontejneru při teplotě nižší než -140 °C je i současným standardem.

Existence tkáňové banky s chlopenními štěpy umožňuje jejich využití kdykoliv je třeba. Nabídka je dostupná všem kardiologickým centřům, které o štěp projeví zájem. I tento způsob uchování chlopenních štěpů má své slabé stránky. K hlavním patří nerovnováha mezi nabídkou a poptávkou, zásoba některých štěpů, zvláště pulmonálních ve specifických velikostech se velmi rychle vyčerpává, protože dětské dárce orgánů tvoří celosvětově méně než

5 % poolu kadaverózních dárců. Kromě odběru a využití je nabídka banky průběžně upravována z důvodu uplynutí expirační doby chlopenních alograftů. Délka expirace kryoprezervovaných chlopenních štěpů byla arbitrárně stanovena na 5 let. Tuto hranici používá naprostá většina světových tkáňových zařízení. Po uplynutí expirační doby jsou již štěpy nepoužitelné k transplantaci a bývají vyřazeny.

1.3.3. Odběr, příprava a uchování chlopenního alograftu

Alografty srdečních chlopní jsou připravovány ze srdcí, která byla z jakéhokoliv důvodu shledána jako nevhodná k transplantaci jako orgán. Může se jednat jak o překážky na straně dárce (např. oběhová nestabilita, ischemická choroba srdeční), nebo i situaci kdy nelze nalézt vhodného příjemce pro jinak bezchybné srdce. Limitní věk dárce byl arbitrárně stanoven na 60 let pro dárce muže a 65 let pro dárkyně ženy.

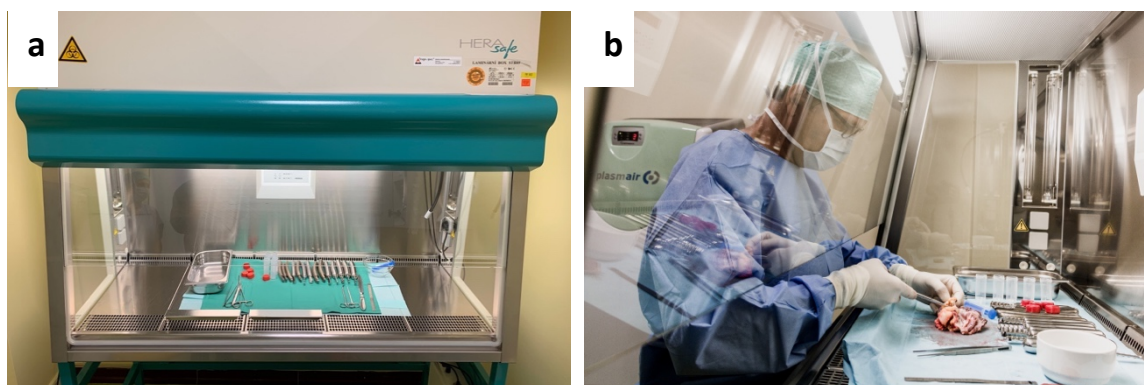
Zpracování chlopenního alograftu probíhá typicky v několika navazujících krocích:

- odběr srdce v rámci multiorgánového odběru
- uložení do transportního živného roztoku a ledu
- přeprava z místa odběru do tkáňového zařízení
- příprava alograftu ve sterilním laminárním boxu
- uložení do antibiotického roztoku
- přenesení do kryoprotektivního roztoku
- programové zmrazení

Odběr srdce v rámci multiorgánového odběru probíhá standardní technikou po naložení svorky a promytí perfúzním roztokem. Umožňuje-li to situace, zejména s ohledem na současně probíhající odběr plic k transplantaci, je preferováno odstřížení aorty za obloukem (odstupem levé arteria subclavia) a plicnice s oběma hlavními větvemi v co nejdelším možném úseku. Způsob odstřížení vena cava superior a inferior a plicních žil nemá na další zpracování vliv. Srdce je po uvolnění vyjmuto z hrudníku a ihned uloženo do sterilních transportních obalů s živným roztokem (Celsior roztok na konzervování orgánů, Genzyme Polyclonals S.A.S, Francie) a ledovou tříští. V termoizolačním boxu je poté zdravotní přepravní službou

transportováno do Fakultní nemocnice (FN) Motol. Zde je srdce formálně přijato do Tkáňového zařízení a probíhá primární zpracování v laboratoři vybavené speciálním boxem s laminárním prouděním, který zajišťuje superseptické podmínky (obr. 7).

Obr. 7: Laboratoř pro primární zpracování tkání Oddělení transplantací a tkáňové banky FN Motol. **a** – laminární box zajišťující superseptické podmínky pro přípravu chlopenních alograftů; **b** – práce v laminárním boxu

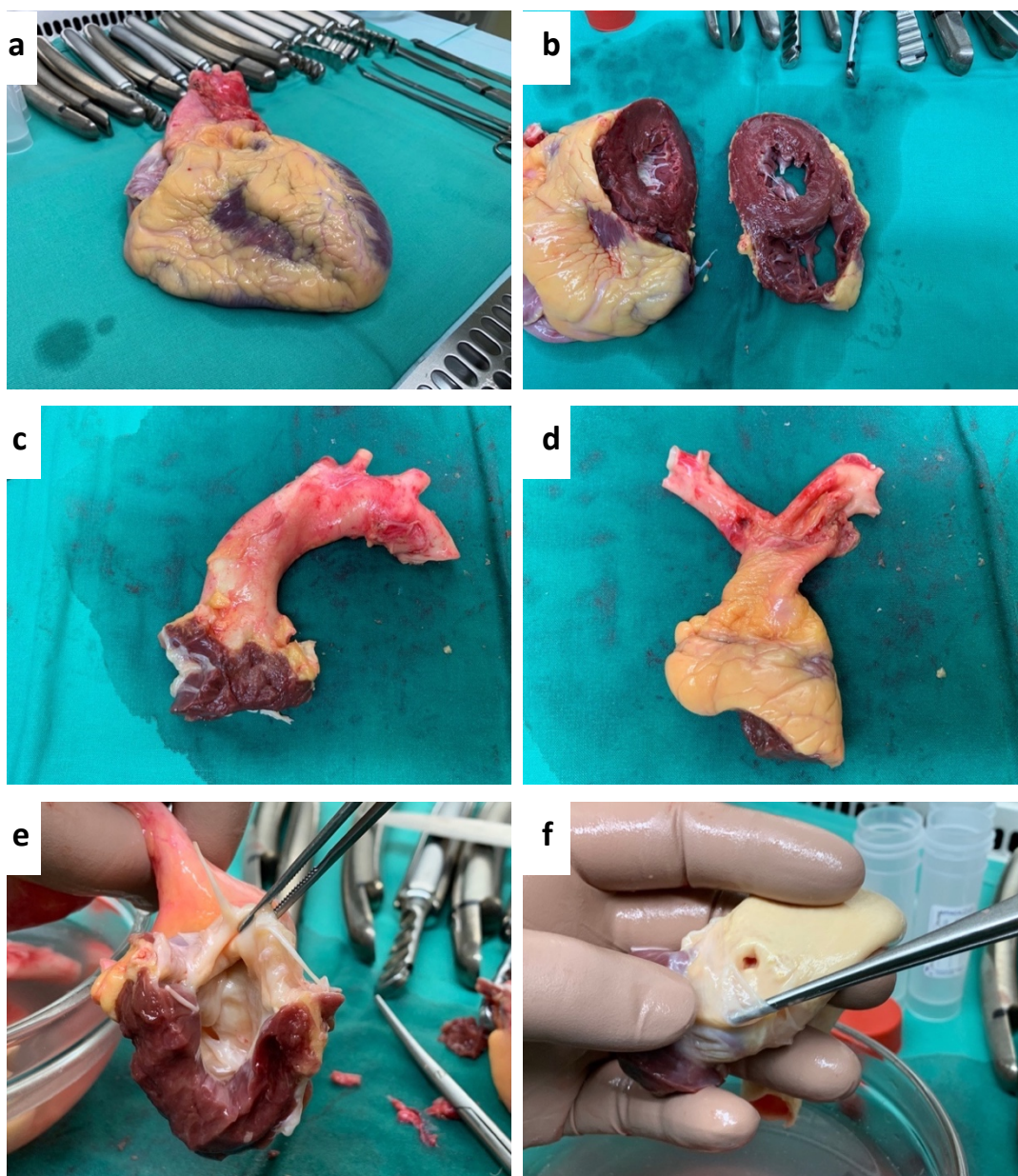


Zdroj: vlastní fotografie autora a archiv Oddělení transplantací a tkáňové banky FN Motol, s laskavým svolením

V tomto prostředí provádí chirurg tzv. parciální pitvu srdce, při které po ohledání a odběru vzorků pro další histologické zpracování (tzv. Šiklových řezů a částí aorty a plicnice) a mikrobiologické vyšetření dle předepsaného protokolu (vzorek vena cava, trikuspidální chlopně a svaloviny výtokového traktu levé komory) připraví vlastní aortální a pulmonální alograft. Děje se tak pečlivou preparací a oddělením obou hlavních arteriálních kmenů, vystřížením kořene aorty s přilehlou svalovinou výtokového traktu levé komory a předním cípem mitrální chlopně a kořene plicnice s přilehlou svalovinou výtokového traktu pravé komory.

Následuje vizuální kontrola a posouzení kvality obou alograftů. Jednoduchá zkouška naplněním arteriálních kmenů fyziologickým roztokem poskytne představu o kompetenci a koaptaci chlopní. Podrobnější stav chlopenních cípů event. přítomnost a velikost fenestrací a kvalita stěny aorty, resp. plicnice jsou hodnoceny v everzi k dosažení lepší vizualizace (obr. 8).

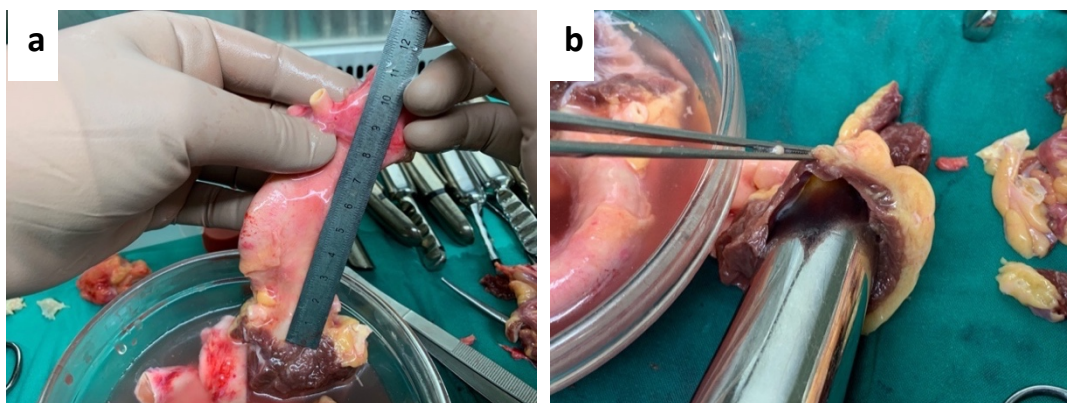
Obr. 8: Parciální pitva srdce a odběr alograftů srdečních chlopní. **a** – srdce po vyjmutí z transportního termoizolačního boxu a sterilních obalů; **b** – Šiklův řez přes svalovinu obou komor; **c** – aortální alograft; **d** – pulmonální alograft; **e** – kontrola koaptace cípů aortální chlopně, pinzeta odklání přední cíp mitrální chlopně; **f** – everze štěpu a kontrola cípů (pravý koronární cíp aortální chlopně)



Zdroj: vlastní fotografie autora

Po schválení štěpu pro další použití následuje změření délky a průměru anulů zpracovaných alograftů pomocí měrky a Hegarových dilatátorů. Pečlivé změření je zásadní pro další kategorizaci chlopnenních alograftů a alokaci vhodnému příjemci dle požadovaných kritérií (obr.9)

Obr. 9: Kategorizace alograftů srdečních chlopní. **a** – kontrola délky štěpu kovovým měřítkem; **b** – určení průměru anulu pomocí Hegarova dilatátoru zasunutého do ústí chlopně.



Zdroj: vlastní fotografie autora

Získané chlopní alografty jsou dekontaminovány uložením do antibiotického koktejlu v médiu E199 na 24 hodin při pokojové teplotě (obr. 10).

Obr. 10: Aortální a pulmonální chlopní alograft po uložení do antibiotického roztoku v médiu E199 – vlevo aortální, vpravo pulmonální štěp ve sterilní, závitěm uzavřené certifikované nádobě.



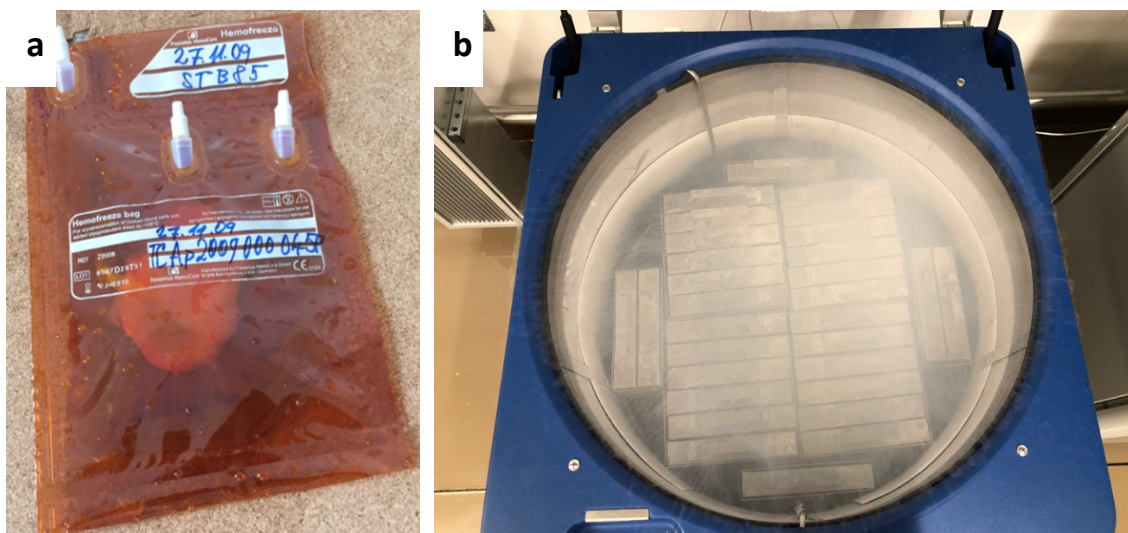
Zdroj: vlastní fotografie autora

Následuje uložení při teplotě 4 °C a vlastní kryoprezervace. Povinnou součástí kontroly kvality chlopních alograftů je serologický screening dárce a mikrobiologické vyšetření vzorků tkáně srdce a štěpů. Po inkubaci následuje definitivní zpracování chlopních alograftů, opět v superseptickém laminárním boxu. Před dalším zpracováním jsou opět odebrány vzorky k mikrobiologickému vyšetření. Štěpy jsou přemístěny z antibiotického koktejlu do média E199 s kryoprotektivem (10% roztok dimethylsulfoxidu – DMSO) ve speciálním obalu – kryovaku (Gambro Hemofreeze bags, NPBI BV, Gambro, Nizozemí). Chlopní alografty jsou

v kryovaku zabaleny a následně dvojrstevně zataveny tak, aby vnitřní vak zůstal kompletně sterilní. Vlastní programované mražení probíhá v počítačem řízeném chladicím zařízení IceCube (Sy-Lab, A-3002, Pintersdorf, Rakousko). Teplota alograftu stejnoměrně klesá přibližně o 1 °C za minutu. Chlazení končí při teplotě -180°C. Kryoprezervační protokol byl stanoven empiricky na základě vlastního validačního experimentu tkáňové banky.

Balení s chlopenními alografty jsou dále skladována v kryokontejnerech (Taylor Wharton Cryostorage Container 1008 K s kovovým ukládacím systémem ICS – 8K – BM, Sy-Lab, A-3002, Pintersdorf, Rakousko) v tekuté fázi tekutého dusíku při teplotě -196 °C (Špatenka et al. 1997) (obr.11).

Obr. 11: Uchování alograftu srdeční chlopně. **a** – balení ve dvojrstevném mrazicím vaku Gambro Hemofreeze bag (NPBI BV, Gambro, Nizozemí) s kryoprotekčním dimethylsulfoxidem (DMSO) v 10 % koncentraci; **b** – kazety s chlopenními alografty uložené v kryokontejneru.



Zdroj: vlastní fotografie autora a archiv Oddělení transplantací a tkáňové banky FN Motol, s laskavým svolením

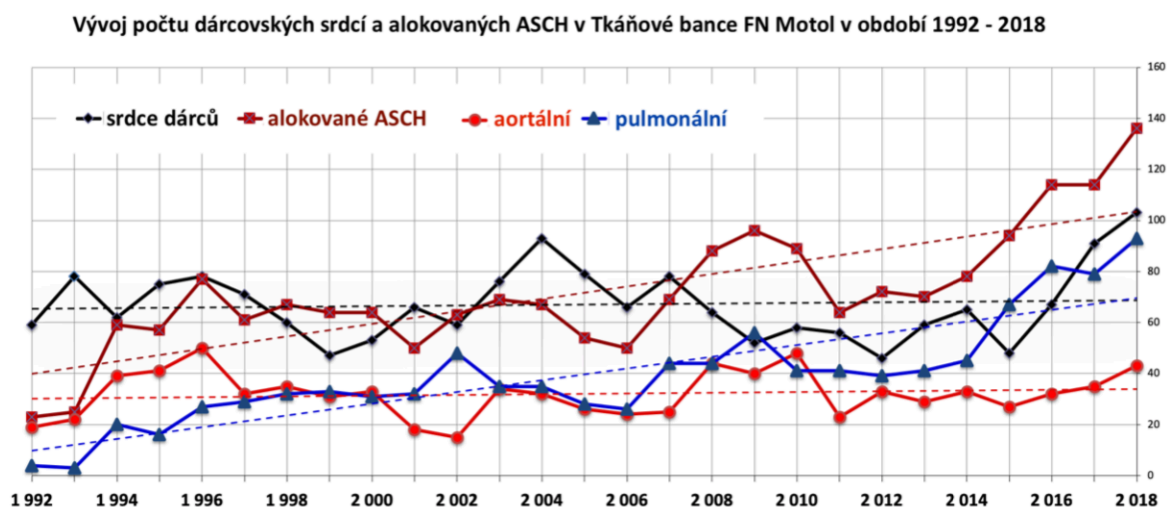
Příprava a mražení odpovídá právní úpravě Zákona č.296/2008 Sb., o zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání a buněk určených k použití u člověka a o změně souvisejících zákonů (zákon o lidských tkáních a buňkách) v současném znění.

1.4. Kryobanka

Jako kryobanka se označuje zařízení umožňující bezpečné uložení biologického materiálu v podmínkách hlubokého zmrazení. Její vznik ve FN Motol úzce souvisí s historií Dětského

kardiocentra. Dětské kardiocentrum v Motole existuje od roku 1977. První operace s použitím chlopenních alograftů v něm začaly být prováděny v roce 1983. Před vznikem banky šlo o „fresh“ chlopenní alografty získávané odběrem při sekcích ve spolupráci s pracovišti soudního lékařství a patologie. Takto získané chlopně byly použitelné jen do hranice 6 týdnů po odběru. Jejich velké množství tak nebylo použito, a naopak v urgentních situacích nebyly vhodné štěpy dostupné (Špatenka et al. 1997). Kryobanka alotransplantátů srdečních chlopní ve FN Motol vznikla v roce 1992 za účelem přípravy a uchovávání chlopenních štěpů pro potřeby Dětského kardiocentra. Chlopenní štěpy z nově zřízeného kryoskladu zpočátku využívali jen dětské kardiochirurgové z Prahy a Bratislavy. Postupně se podařilo získat (zaškolit) kardiochirurgy z dalších center, kteří začali chlopenní alografty implantovat adolescentním a dospělým pacientům (*obr. 12*).

Obr. 12: Vývoj počtu zpracovaných srdcí a alokovaných alograftů srdečních chlopní ve Tkáňové bance Fakultní nemocnice Motol v posledních 26 letech. Z grafu je patrný dlouhodobě stacionární počet dárců a zvyšující se počty použitých chlopenních štěpů. ASCH = alotransplantát srdeční chlopně, osa X reprezentuje roky, osa Y počty štěpů, přerušované čáry sledují vývoj trendů.



Poutavá historie použití chlopenních alograftů, vzniku tkáňové banky v Motole a rozvoje kardiochirurgie v České republice je neodmyslitelně spojena s doktorem Jaroslavem Špatenkou (Šamánek 2015). Program přípravy, zpracování a uchovávání chlopenních alograftů mohl v podmínkách České republiky vzniknout jen díky jeho entusiasmu a blízké spolupráci a osobnímu přátelství s Donaldem Rossem (Mokráček et al. 2007; Špatenka a Burkert 2018; Kováč 2019). Kompletní protokol přípravy antibiotiky sterilizovaných chlopenních alotransplantátů daroval Donald Ross (*obr. 13*) Dr. Špatenkovi již v roce 1980 (Špatenka et al. 2014).

Obr. 13: Donald Ross (1913–2014) britský kardiochirurg, absolvent University of Cape Town, Jižní Afrika, inovátor kardiochirurgie, pionýr a propagátor transplantace chlopenních alograftů v kardiochirurgii, autor konceptu autotransplantace pulmonálního alograftu do aortální, či mitrální pozice a nezapomenutelný učitel



Zdroj: archiv Jaroslava Špatenky

Blízké přátelství jej pojí i s dalším velikánem kardiochirurgie, transplantačním chirurgem a průkopníkem použití chlopenních alograftů a pulmonálních autograftů, britským kardiochirurgem Sirem Magdi Yacoubem. K rozšíření povědomí o použití chlopenních alograftů a technice jejich implantace v řadách domácích, ale i evropské odborné veřejnosti přispěly Jaroslavem Špatenkou organizované mezinárodní postgraduální kurzy chirurgie aortálního kořene konané v České republice pod záštitou Evropské asociace tkáňových bank (EATB), za přímé účasti Magdi Yacoub a jím pozvaných předních světových odborníků (obr. 14). Oba kurzy a osobní kontakt se Sirem Magdim Yacoubem vzbudily v autorovi dizertace zájem o tuto fascinující oblast kardiochirurgie.

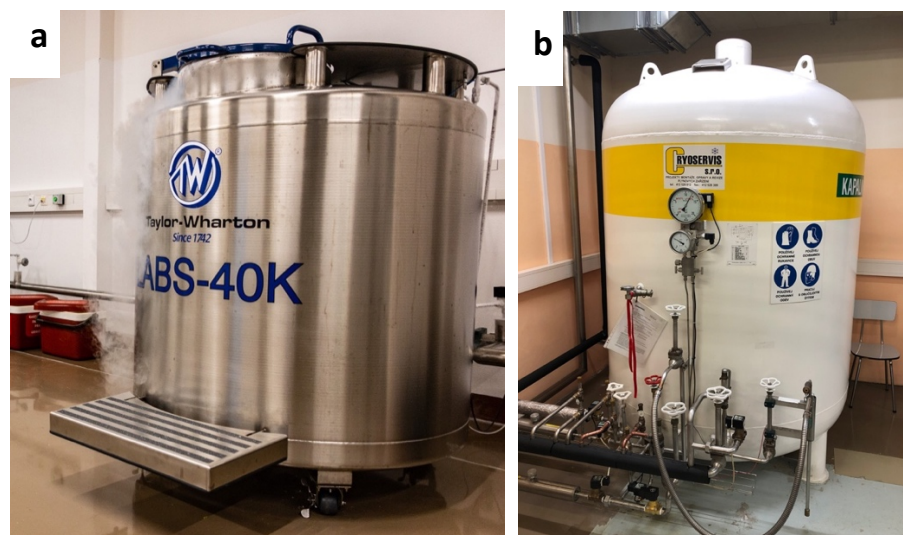
Obr. 14: Britský kardiochirurg Sir Magdi Yacoub (vpravo) a MUDr. Jaroslav Špatenka, CSc. (uprostřed) v průběhu postgraduálního kurzu chirurgie aortálního kořene konaného v roce 2007 v Českých Budějovicích. Vlevo autor práce.



Zdroj: archiv autora

Při programovém mražení spolupracuje tkáňová banka s Ústavem hematologie a krevní transfuze (ÚHKT). Vlastní kryosklad s dusíkovým hospodářstvím se nachází v technických prostorách Fakultní nemocnice Motol. V roce 2003 byly vybudovány nové moderní prostory odpovídající akreditačním požadavkům Evropské unie (obr. 15). Specializovaná tkáňová banka STB85 zajišťuje v současnosti kromě odběrů, zpracování, dlouhodobého skladování a distribuce kardiovaskulární tkáně od zemřelých dárců i zpracování muskuloskeletální tkáně od zemřelých i žijících dárců a amniové membrány z placent.

Obr. 15: Kryosklad Specializované tkáňové banky STB85 v technických prostorách Fakultní nemocnice Motol. **a** – kryokontejner Taylor Wharton; **b** – zásobník kapalného dusíku



Zdroj: archiv Oddělení transplantací a tkáňové banky FN Motol, s laskavým svolením

1.5. Anatomie alograftů semilunárních chlopní

Chlopněmi jsou ohraničeny vstupy a výstupy z levé i pravé srdeční komory. Mezi levou síní a levou komorou je umístěna mitrální, mezi pravou síní a komorou trikuspidální chlopeň. Obě jsou díky své morfologii souhrnně označovány jako cípaté. Levou komoru ve výtoku uzavírá aortální, pravou komoru pulmonální chlopeň. Podle tvaru svých tří cípů se někdy označují jako poloměsíčitě (semilunární).

Aortální a pulmonální srdeční chlopeň jsou jednocestné ventily oddělující levou a pravou srdeční komoru od aorty, respektive plicnice. Obě pracují v odlišných hemodynamických

podmínkách. Přes svoji podobnou funkci se anatomicky, histologicky a funkčně liší. Alograft semilunární srdeční chlopně je tvořen arteriálním kořenem, cípy a příslušnou tepnou.

Kořen aorty je v porovnání s plicnicí silnější, tužší a obsahuje více fibroelastické tkáně (Muresian 2018). Základem kořene aorty tvořícím oporu pro cípy je tzv. anulus – prstenec mezi levou komorou a z ní odstupující aortou. Jde o vazivovou tkáň, část tzv. srdečního skeletu. Podle Muresiana se složení kořene plicnice liší. Nemá vazivový anulus, ale její cípy vystupují přímo ze svalové části výtokového traktu (infundibula) pravé komory (Muresian 2016).

Aortální i pulmonální chlopeň mají tři cípy. Každý cíp je funkčním komplexem tvořeným třemi vrstvami – *fibróza* (směřující do tepny), *spongióza* (střed) a *ventricularis* (směřující do komory). Histologicky jde o endotel, pojivovou tkáň (fibroblasty a fibrocyty) a extracelulární matrix. Hlavními komponenty jsou kolagenní a elastická vlákna a proteoglykany (Bashey et al. 1967; Hopkins 2005; Kubíková et al. 2017). Fibróza pokrývá celou kraniální plochu cípu. Je tvořena z 50 % kolagenními vlákny (převážně typu I) a z 10 % elastinem. Ventricularis tvoří většinu plochy cípu směřující do komory kromě místa styku cípů při zavřené chlopni (koaptační linie). Obsahuje větší zastoupení elastinu než fibróza (20 %). Fibróza je považována za nosnou vrstvu cípu. Kolagenní vlákna jsou v ní uspořádána do svazků orientovaných podél obvodu cípu od komisury ke komisurě (Mohammadi a Mequanint 2011). Cípy aortální chlopně se obvykle pojmenovávají podle svého vztahu k odstupům koronárních tepen – levý koronární, pravý koronární a nekoronární cíp. Cípy pulmonální chlopně jsou popisovány jako levý, pravý a přední. Jejich skutečnému umístění v pracujícím srdci však spíše odpovídá označení zadní, levý přední a pravý přední (Muresian 2016). Cípy lidských chlopní jsou za normálních okolností velmi poddajné a jemné. Díky svému umístění ve vysokotlakém systému jsou aortální cípy mírně silnější než pulmonální. Ani jejich tloušťka však nepřesahuje 1 milimetr (Hinton a Yutzey 2011).

Aorta i plicnice jsou tepny elastického typu tvořené třemi vrstvami:

- *tunica intima* – endotel a subendotelová vrstva formovaná řídkým kolagenním vazivem a hladkými svalovými buňkami
- *tunica media* – nejsilnější vrstva tepny obsahující fenestrované elastické membrány a buňky hladké svaloviny uspořádané do koncentrických vrstev

- *tunica adventitia* – vnější vrstva tvořená elastickými a kolagenními vlákny, buňkami pojivové tkáně, krevními kapilárami, nervovými vlákny

Tepny elastického typu mají vysoký obsah elastinu, což jednak podmiňuje jejich makroskopický vzhled (nažloutlou barvu), ale hlavně určuje mechanické vlastnosti. Aorta i plicnice zastávají funkci pružníku – svojí elasticitou jsou schopny náraz proudu krve vypuzené při systole měnit na kontinuální proudění (Hudák et al. 2016; Kubíková et al. 2016). Tloušťka stěny aorty je větší než stěny plicnice (přibližně 2,1 versus 1,5 mm) (Azadani et al. 2012).

1.6. Mechanika srdečních chlopní

Funkcí srdečních chlopní je zachování jednosměrného toku krve v průběhu srdečního cyklu. Krevní proud vypuzený ze srdce do aorty a plicnice v systole má dopředný směr, při diastole se naopak vrací zpět. Aortální a pulmonální chlopeň umístěné ve výtokovém traktu levé a pravé komory představují překážku zpětnému proudění a tím zabraňují přetížení srdce. Aortální chlopeň v diastole ovlivňuje distribuci krve do věnčitých tepen.

1.6.1. Srdeční cyklus

Jako srdeční cyklus nebo srdeční revoluce se označuje pravidelně se opakující činnost srdce zajišťující proudění krve systémovým a plicním řečištěm. Srdce pracuje jako dvě sériově zapojené pumpy pohánějící krev ze systémového oběhu do plicního a opačně. Mechanická práce srdečních síní a komor je vzájemně oddělena. Oba cykly srdeční revoluce (systola a diastola) v síních i komorách probíhají stejně, jsou však mírně posunuty v čase. Stah síní probíhá při uvolnění komor, při stahu komor jsou naopak síně uvolněné (Rokyta 2015). V průběhu systoly (stahu myokardu) a diastoly (uvolnění myokardu) se odehrávají čtyři na sebe navazující fáze odlišující se tlakovými a objemovými parametry v srdečních komorách:

- plnicí fáze
- izovolumická kontrakce
- ejekční fáze
- izovolumická relaxace

V plnicí fázi je tlak v komorách téměř neměnný, roste však jejich objem. Krev proudí otevřenými cípatými chlopněmi (mitrální a trikuspidální) do relaxovaných srdečních komor. Aortální a pulmonální chlopeň ve výtokovém traktu obou komor jsou v ten okamžik uzavřeny. V pozdní diastole komor dochází k systole síní ukončené uzavřením mitrální a trikuspidální chlopně. Izovolumická kontrakce je první fází systoly komor. Všechny chlopně jsou uzavřeny, dochází ke kontrakci myokardu kolem nestlačitelné tekutiny, tlak v komorách tedy narůstá. V okamžiku, kdy nitrokomorový tlak překročí tlak v aortě (80 mmHg) a plicnici (10 mmHg) dojde k otevření obou poloměsíčitých chlopní a vypuzení krve. Po systole komor tlak v jejich vnitřku opět klesá a semilunární chlopně se uzavírají. Nitrokomorový tlak dále klesá při zachování stejně malého objemu, všechny chlopně jsou opět uzavřeny až do okamžiku, kdy klesne komorový tlak pod hodnoty tlaku v síních, cípaté chlopně se otevrou a fáze srdečního cyklu se opakují (Trojan 2003).

1.6.2. Dynamika semilunárních chlopní

Aortální chlopeň v průběhu průměrného lidského života projde přibližně 3 až 4 miliardami cyklů otevření a zavření. Zjednodušené vysvětlení otevírání a uzavírání cípů díky pohybu proudu krve a tlakovému gradientu mezi komorou a tepnou je ve skutečnosti mnohem složitější. Funkční anatomie aortální chlopně a dynamika aortálního kořene je velmi komplexní. Svoji úlohu hraje schopnost dilatace aortálního kořene i jeho anatomické uspořádání (Valsalvovy síně, sinotubulární junkce). V průběhu srdečního cyklu dochází k dilataci a kontrakci aortálního anulu, což má přímý vliv na pohyb (otevírání) cípů aortální chlopně (Sacks a Yoganathan 2007). Samotný proces oddělení cípů a otevření chlopně je umožněn negativním tlakovým gradientem mezi levou komorou a aortou. V průběhu otevírání mění aortální ústí dynamicky svůj tvar od hvězdice přes trojúhelník a kruh až po trojlístek v okamžiku maximálního otevření (Lansac a Di Centa 2018). Na uzavírání chlopních cípů se zase podílí mimo jiné i Bernoulliho efekt způsobený víry ve Valsalvových sinech, které vznikají na konci systoly v okamžiku zpomalování dopředného toku krve a jejímu částečnému návratu zpět (Eckert et al. 2013).

Chlopenní cípy musí být dostatečně ohebné, ale přitom také pevné v tahu. Za jejich biomechanické vlastnosti zodpovídá především kolagen a elastin. V obou případech jde o vláknité proteiny, které mění svůj tvar podle zatížení při pohybu chlopně. V klidovém stavu jsou kolagenní vlákna zřasená, při napětí se vyrovnávají. Střední vrstva chlopenního cípu (spongióza) je bohatá na glykosaminoglykany (GAG) – hydrofilní polysacharidy navázané na proteinové jádro. Kolagen propůjčuje cípům pevnost, úlohou elastinu je pravděpodobně udržování specifické konfigurace kolagenních vláken a jejich návrat do „klidové“ pozice mezi cykly zatížení (Vesely 1998). V diastole jsou cípy semilunárních chlopní uzavřené a maximálně napjaté, v systole se naopak otevírají a uvolňují. Význam spongiózy a jejích GAG býval vysvětlován především redukcí střížného napětí mezi oběma zevními vrstvami cípu (fibrózou a ventricularis). Interakce GAG a kolagenních vláken jsou však pravděpodobně mnohem složitější. Některé práce jejich roli spatřují spíše v omezení vibrací cípů ve fázi otevření a maximálního uvolnění (Eckert 2013). Bylo prokázáno, že všechny vrstvy chlopenního cípu jsou vzájemně provázány transversálně uspořádanými kolagenními vlákny a fungují jako jeden celek. Spongióza tak může tvořit jakousi tlumící vrstvu při deformaci cípu (Buchanan a Sacks 2014). Význam nervových zakončení v cípech semilunárních chlopní je zatím nejasný, stejně jako kontraktilita mezenchymálních buněk cípu. Je ale jasné, že cípy reagují na zvýšenou koncentraci vazoaktivních substancí (Chester et al. 2000).

1.7. Patologie semilunárních chlopní

Kardiovaskulární onemocnění, včetně patologií chlopní, jsou celosvětově nejčastější příčinou úmrtí. Prevalence vrozených i získaných chlopenních vad dosahuje v dospělé populaci až 2,5 % (Nkomo et al. 2006). Výskyt získaných vad stoupá s věkem. Ve skupině nad 80 let dosahuje 17 % (Gregor a Línková 2017; Rezzoug et al. 2016). Častěji jsou postiženi muži. Díky ústupu porevmatických vad v rozvinutých zemích jde v současné době etiologicky převážně o vady degenerativní (Stollerman 2001). Narůstající výskyt kalcifikovaných chlopenních vad je přirovnáván k epidemii (d'Arcy et al. 2011). K méně častým příčinám patří ischemické vady, následek infekční endokarditidy nebo traumata. Zvláštní skupinu tvoří vrozené srdeční vady diagnostikované již v dětském věku nebo v dospělosti. Postihují přibližně 1 % živě narozených dětí. S postižením chlopní je spojena přibližně polovina těchto vrozených srdečních vad.

Porucha funkce chlopně se obecně projevuje dvěma základními mechanismy snižujícími účinnost srdeční práce:

- *stenóza* – zúžení chlopně zvyšující odpor krevnímu proudu a generující tlakový gradient na chlopni
- *regurgitace* – nedomykavost cípů způsobující retrográdní tok krve

Aortální chlopeň patří k nejčastěji postiženým chlopním. Jednoznačně převládá stenóza aorty, která v celkovém počtu chirurgicky léčených získaných chlopenních vad tvoří více než polovinu případů. Aortální regurgitace je třetí nejčastěji operovanou vadou (po zmíněné aortální stenóze a mitrální regurgitaci) (Čerbák 2007). Etiologicky se uplatňují degenerativní procesy oscilující od ztluštění cípů až po těžké kalcifikace omezující jejich pohyb. Podstatou regurgitační vady je opět primární postižení cípů nebo dilatace kořene, případně i anulu aorty. Při vysvětlení procesů vedoucích k nadměrnému ukládání vápníku do chlopenních cípů převládá podobně jako u jiných kalcifikujících makroangiopatií zánětlivá teorie. Ke správnému fungování a udržení biomechanických vlastností chlopní je nutná souhra mezi vrstvou endoteliálních buněk, komponenty extracelulární matrix (kolagen, elastinem a proteoglykany) a intersticiálními buňkami. Na jejích poruchách se kromě obecně známých rizikových faktorů (věk, pohlaví, nikotinismus, hypercholesterolémie, arteriální hypertenze, diabetes mellitus) podílí mechanismy na úrovni buněčné komunikace a genetické exprese. Přes výrazný pokrok v popisu a chápání molekulární podstaty buněčných signálních drah a jejich poruch stále neexistuje specifická farmakologická léčba schopná pozitivně ovlivnit degenerativní onemocnění chlopní. Nejčastější léčebnou metodou zůstává chirurgická náhrada (Zeng et al. 2016).

Patologie pulmonální chlopně se týkají v naprosté většině vrozených srdečních vad. Může jít o izolovanou stenózu plicnice, atrézii nebo součást komplexních srdečních vad, např. Fallotovy tetralogie (defekt komorového septa, dextropozice aorty, stenóza plicnice, hypertrofie pravé komory), společného arteriálního trunku či transpozice velkých tepen. K vzácným získaným příčinám patří revmatické onemocnění, karcinoid, infekční endokarditida nebo trauma (Ruckdeschel a Kim 2018).

Z údajů Národního zdravotnického informačního systému (NZIS) a Národního kardiologického registru vyplývá, že České republice jsou ročně provedeny více než 4 tisíce kardiologických operací na srdečních chlopních, ať už v rámci samostatného nebo kombinovaného výkonu (Šetina 2014).

1.8. Testování mechanických vlastností biomateriálů

Studiem mechanické struktury, mechanického chování a mechanických vlastností živých organismů a jejich částí, obecně biologických objektů a materiálů se zabývá vědní obor biomechanika. Tkáně mají vlastnosti poddajného (pružného) tělesa. Jejich tvar a objem se vlivem působících sil mění, přičemž vzniká deformace a napětí.

Deformace je definována jako změna tvaru tělesa vlivem působení síly. Může jít o prodloužení nebo zkrácení. V případě, že se těleso po odstranění působící síly vrací do svého původního stavu, jde o deformaci elastickou (pružnou). Trvalé změny vzniklé působením síly se označují jako deformace plastická. Deformace je bezrozměrná veličina udávající poměr mezi novým a původním rozměrem.

Napětí (σ) je stav, který vznikne v tělese při působení vnějších sil. Jde o vztah mezi silou (F) a plochou (S), na které síla působí:

$$\sigma = \frac{F}{S}$$

Fyzikální jednotkou napětí je pascal (newton na metr čtvereční).

Vztah mezi napětím a deformací vyjadřuje Hookeův zákon. Ze vztahu odvozeného již v 17. století britským fyzikem Robertem Hookem (1635-1703) vyplývá, že deformace je přímo úměrná napětí v tělese. V případě tahu (i tlaku) lze k jeho zápisu použít vzorec:

$$\sigma = E \times \varepsilon$$

Veličina E je Youngův modul pružnosti (modul pružnosti v tahu) definovaný jako poměr napětí a jím vyvolané deformace:

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon}$$

Jako ε se označuje poměrná deformace, tedy poměr mezi prodloužením tělesa a jeho původní délkou.

$$\varepsilon = \frac{\text{délka} - \text{původní délka}}{\text{původní délka}}$$

Youngův modul pružnosti v tahu (E) určuje odolnost materiálu proti deformaci. Jde o elastickou konstantu nejčastěji užívanou pro charakteristiku materiálu. Čím vyšší hodnoty pro konkrétní materiál dosahuje, tím je tento materiál v tahu méně pružný (k jeho deformaci je potřeba vyššího napětí). Pro názornost lze uvést, že Youngův modul pro měkký cín je 53 GPa, pevnější hliník 70 GPa a železo 210 GPa (Wikipedia 2019). Stejný ukazatel se v případě různých biologických materiálů pohybuje od 0,1 do 1,5 GPa (Meyers et al. 2008).

Každá elastická deformace se po překročení určité síly mění v plastickou. Hranice, za kterou přestává být materiál pružný, se označuje jako mez pružnosti. Po jejím překročení se již ani při odeznění účinku vnějších sil materiál nevrací do svého původního tvaru a velikosti. Dalším působení síly dochází k narušení vnitřní struktury objektu. Nejvyšší dosažitelné mechanické napětí v materiálu před jeho přetržením se označuje jako mez pevnosti. Závislost mezi napětím a deformací lze zobrazit graficky a označuje se jako křivka napětí-deformace. Hookeův zákon platí pouze v lineárních oblastech křivky napětí-deformace, kde je velikost deformace přímo úměrná působícímu napětí (Wertheim 1999). Pružnost naprosté většiny biologických materiálů není lineární. Jejich deformace se s nárůstem napětí zvětšuje a zrychluje. Jde o komplexní kompozitní materiály, jejichž mechanické vlastnosti jsou naprosto výjimečné (Meyers et al. 2008).

Nejpoužívanější mechanickou zkouškou ke zjištění vlastností materiálu je zkouška tahem. Provádí se na trhacím zařízení (*obr. 16*), do kterého jsou upnuty předem definované vzorky materiálu a vystaveny definovaným silám až do mezního stavu – roztržení. Výstupem zkoušky je deformační nebo tahová křivka (stress-strain curve) vyjadřující vztah mezi napětím a deformací. Křivka je u biologických materiálů nelineární. Její tvar bývá označován jako „J-shape“, typicky má několik různých oblastí. Díky podobnosti s tvarem nohy je počáteční část nazývána *prstová* (toe region, oblast malých deformací), následovaná *patní* (heel region, oblast zpevnění) a *lineární* (linear region, oblast velkých deformací). Poté křivka pokračuje až

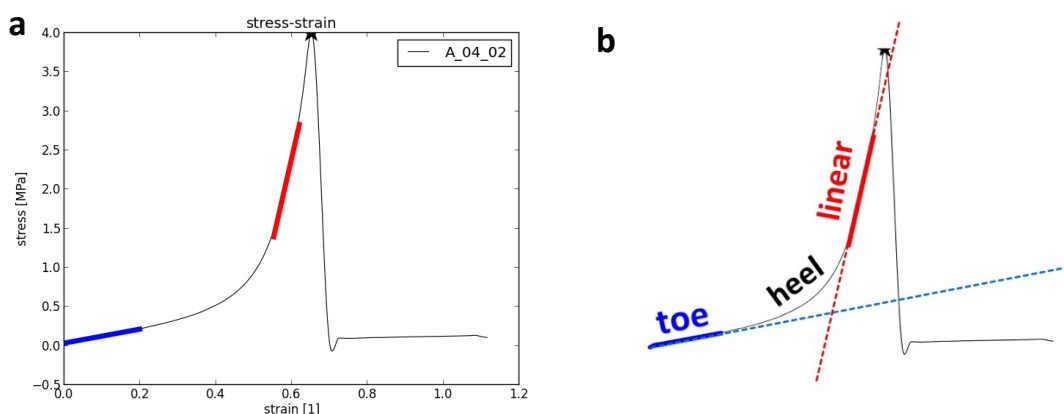
do okamžiku vzniku trhliny (obr. 17a). Další průběh křivky již závisí na pevnosti jednotlivých složek tkáně (Kochová 2013). Prstová a lineární oblast mají tvar přímek, ze kterých lze stanovit Youngovy moduly elasticity (E). Jde o směrnici (tangentu) úsečky mezi dvěma body v lineární oblasti (v oblasti rovnoměrného nárůstu) (obr. 17b).

Obr. 16: Trhací zařízení Zwick/Roel Z50 (Zwick GmbH & Co, Německo) ve výzkumném centru NTIS (Nové technologie pro informační společnost) v Plzni, které bylo použito pro všechna měření experimentu.



Zdroj: vlastní foto autora

Obr. 17: Ukázka nelineární („J-shape“) deformační křivky (stress-strain curve). **a** – stress-strain křivka vzorku aorty, oblast malých deformací označena modře, oblast velkých deformací červeně **b** – stejná křivka, lineární oblasti malých a velkých deformací proloženy pro názornost přímkami (přerušovaně), vyznačena prstová (toe), patní (heel) a lineární (linear) oblast.



Zdroj: materiál z experimentu a vlastní schéma autora

V úvodní fázi dochází působením malého napětí k jejich relativně velké deformaci (oploštěný průběh křivky). Průběh křivky je spíše lineární, Youngův modul elasticity je nízký, bývá

označován jako Youngův modul pro malé deformace (E_0). Dalším působením tahu dochází ke zpevnění tkáně a průběh křivky ztrácí lineární průběh (patní část). Poté nabývá křivka opět lineárního tvaru až do dosažení mezní pevnosti. K deformaci tkáně je zapotřebí vyššího napětí, modul pružnosti v tahu získaný z lineárního úseku křivky je vysoký, označuje se jako Youngův modul elasticity pro velké deformace (E_1) (Łagan a Liber-Kneć 2017).

Důležitými charakteristikami materiálu je mezní napětí (ultimate stress) a mezní deformace (ultimate strain) v okamžiku porušení materiálu. Z výše uvedeného vyplývá, že napětí je definováno jako poměr mezi silou a plochou, na kterou působí. Deformace jako poměr aktuální délky vzorku materiálu a jeho původní délky. Mezní hodnoty tedy určují, jak moc lze vzorek zkoumaného materiálu natáhnout a pod jakým napětím, než dojde ke vzniku trhliny.

Chlopeň musí mít vysokou pevnost v tahu a odolávat vysokému směrově orientovanému napětí v okamžiku zavírání (Sacks a Yoganathan 2007). Tomu odpovídal i zvolený design vlastního experimentu.

1.9. Morfologické hodnocení

Morfologie semilunárních chlopní zajímala samozřejmě již Carlose Durana, Alfreda Gunninga, Donalda Rosse, Sira Briana Barrat-Boyese i Raymonda Heinbeckera. Opírali se o v té době standardní histologická vyšetření, která nejsou diskutována v publikacích, ale byla předmětem rozhovorů při setkání na odborných akcích. Morfologii chlopních alograftů se podrobněji věnovali Fischlein (1994) a Goffin (1997), zakladatel European Homograft Bank v Bruselu, Belgie. Základní morfologické vyšetření stěny velké cévy aortálních a pulmonálních alograftů dnes provádí naprostá většina světových bank alogenních srdečních chlopní, včetně naší. Nám se velmi osvědčilo recentní doporučení dvou mezinárodních společností kardiiovaskulárních patologů k interpretaci chirurgické patologie nezápětlivých degenerativních onemocnění aorty z roku 2016 (Halushka 2016). Pro tento projekt jsme využili zkušeností a vybavení Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty UK v Plzni (Kubíková et al. 2016, 2017).

1.9.1. Základní struktura pojivové tkáně

Mezenchymální tkáň tvoří buňky a mezibuněčná hmota – extracelulární matrix (ECM). ECM se skládá z vláknité složky a tzv. základní hmoty. Stavebními kameny všech měkkých tkání jsou aminokyseliny tvořící polypeptidy, polysacharidy a jejich komplexy. Základní hmotu tvoří glykosaminoglykany, proteoglykany a glykoproteiny. Z obrovského množství proteinů ECM vyčnívají svým zastoupením především dva polypeptidy – kolagen a elastin.

Kolagen je hlavní komponentou kostí, šlach, svalů i krevních cév. Jde o pevnou, ve vodě nerozpustnou vláknitou bílkovinu (skleroprotein), která zodpovídá za odolnost tkání. Z celkového množství bílkovin v lidském organismu připadá přibližně pětina až třetina právě na kolagen. Existuje množství typů kolagenu lišících se složením aminokyselin. Naprostou většinu tvoří typ I. Kolagen se seskupuje do vláken vysoce odolných v tahu. Kolagenní vlákna jsou rovná nebo zvlněná, často tvoří svazky nebo sítě (Meyers et al. 2008).

Elastin je čteně zastoupen v kůži, plicích a stěnách tepen a žil. Jde rovněž o skleroprotein, podmiňující však především pružnost tkání. Podobně jako kolagen také tvoří vlákna organizovaná do sítí. Elastická vlákna mají schopnost natáhnutí do délky a opětovného zkrácení.

1.9.2. Příprava histologického preparátu

Standardní způsob přípravy histologického preparátu zahrnuje:

- fixaci
- zalití vzorku
- krájení řezů
- barvení
- montování

K fixaci preparátu se používá řada metod, jejichž podstatou je zamezení autolýzy tkání denaturací při zachování jejich přirozeného tvaru a uspořádání. Nejčastějším způsobem ošetření je chemická fixace ponořením do roztoku formaldehydu na dobu 12 až 24 hodin.

Fixované vzorky tkáně se před dalším zpracováním zalévají speciálními látkami s vyšší konzistencí tak aby došlo k jejich zpevnění. Klasickou metodou je použití parafinu. Vzhledem k jeho nerozpustnosti ve vodě se vzorky nejdříve odvodní etanolem o různé koncentraci (vzestupnou etanolovou řadou). Následuje tzv. projasnění, při kterém jsou syceny látkou rozpouštějící parafin (např. xylen, toluen). Po tomto ošetření se vzorky již sytí zahřátým čistým parafinem a zalévají do parafinových bločků.

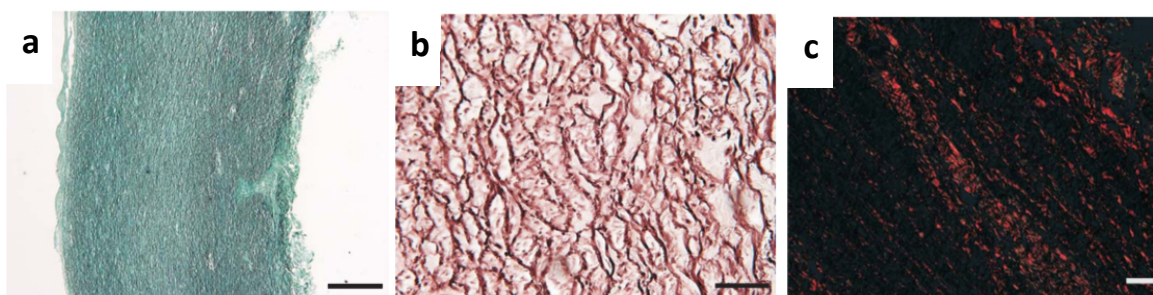
Ke krájení histologických řezů z parafinových bločků slouží mikrotom schopný odkrajoovat několik mikrometrů tenké plátky. Řezy se následně přenášejí na podložní skla ošetřená lepivou směsí, vyrovnají na kapce vody a odparafinují (xylen, alkohol, voda).

Základním, tzv. přehledným barvením je použití zásaditého hematoxylinu a kyselého eozinu. V tomto zbarvení se zobrazují jádra buněk modře, cytoplasma slabě růžově, svalová tkáň červeně a vazivo růžově. Barvení speciálními histologickými barvivami umožňuje zobrazení vybraných složek tkáně (*tab. 2, obr. 18*).

Tab. 2: Vybraná speciální barviva ke zobrazení kolagenu a elastinu v tkáni a jejich barevné odlišení.

	kolagen	elastin
zelený trichrom a Verhoeffův hematoxylin	zelená	černá
orcein	N/A	červenohnědá
picrosirius red	červená	N/A

Obr. 18: Příklady barvení vzorku aortální stěny ke zobrazení kolagenních a elastických vláken: **a** – zelený trichrom a Verhoeffův hematoxylin, zeleně kolagen, černě elastin, měřítko 500 μm . **b** – orcein, červenohnědá vlákna elastinu, měřítko 50 μm . **c** – picrosirius red v polarizovaném světle, kolagen červeně, měřítko 50 μm .



Zdroj: materiál z průběhu experimentu

Posledním krokem je montování preparátu. Obarvený řez na krycím sklíčku je ošetřen inertním tuhoucím médiem (pryskyřicí) a překryt krycím sklíčkem. Tím je zajištěna ochrana před vyschnutím a poškozením.

Ke zobrazení základní morfologie vzorků chlopních cípů a arteriální stěny slouží barvení zeleným trichromem a Verhoeffovým hematoxylinem. Síť elastických vláken zobrazí fialové přírodní barvivo orcein. K obarvení kolagenních vláken se obvykle používá siriová červeň (picrosirius red).

1.9.3. Hodnocení preparátů a analýza obrazu

Základním způsobem hodnocení histologických preparátů a studia vnitřní struktury tkání je použití světelného mikroskopu. Běžné typy mikroskopů využívají zdroj světla umístěný pod preparátem. Paprsky, které zkoumaným vzorkem pronikají dopadají na optickou soustavu mikroskopu (čočky) a výsledný zvětšený obraz je přímo pozorovatelný okuláry. Optický mikroskop nabízí 50 až 1000násobné zvětšení podle typu použitého objektivu. Ke zkoumání některých vzorků se používá polarizační mikroskopie, která je kombinací světelné s použitím kmitajícího polarizovaného světla a filtrů. Filtry umístěné za zdrojem světla pod a nad preparátem umožní průchod pouze té části světla, která kmitá v jednom směru. Polarizace umožňuje kontrastnější zobrazení dvojlomných materiálů. Výsledným obrazem jsou barevné struktury na tmavém pozadí. Další modifikací je fluorescenční mikroskopie využívající vlastnosti některých složek tkáně po obarvení a osvětlení emitovat záření (fluorescence).

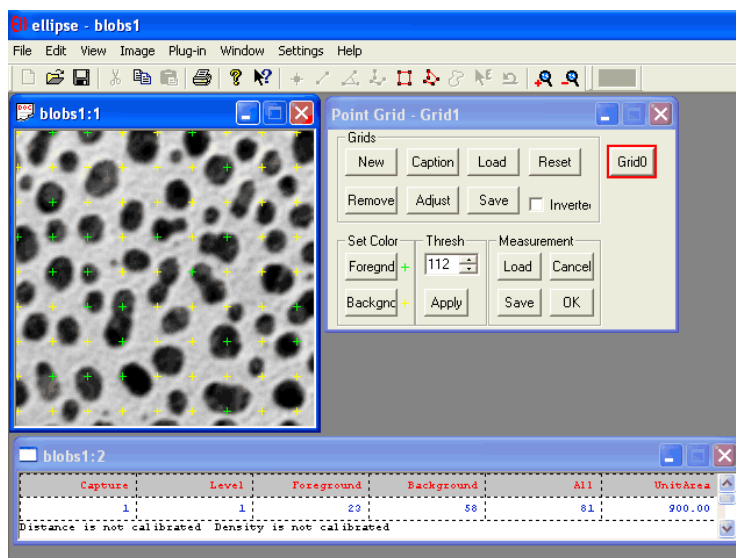
Polarizační mikroskopie se často využívá ke kontrastnějšímu zobrazení kolagenních vláken ve zkoumaném vzorku. Molekuly kolagenu jsou anizotropní, způsobují tedy dvojlom světla, které na ně dopadá. Ostatní složky vzorku, které jsou izotropní, poté vytvářejí pouze tmavé pozadí (Whittaker et al. 1989). Kolagen lze studovat i pomocí fluorescenční mikroskopie (Vogel et al. 2015).

Výstupem pozorování histologických řezů v mikroskopu je dvojrozměrný obraz zkoumaných tkání. K mikroskopu je možné připojit digitální záznamové zařízení k pořízení mikrofotografií. Získaná obrazová dokumentace slouží k dalšímu podrobnějšímu hodnocení. K objektivizaci nálezů jsou využívány metodologické postupy morfometrie a stereologie. Morfometrie je měření a kvantifikace morfologických parametrů zkoumaného vzorku (např. množství buněk). Stereologie se používá k získání trojrozměrných dat z dvojrozměrných řezů (Altunkaynak et al. 2012). Obecně ji tedy lze definovat jako proces odvození prostorové (3D) představy o objektu na základě měření parametrů ve dvojrozměrném (2D) obrazu. Pomáhá určit kvantitativní data zkoumaných objektů a kvalitativně interpretovat mikroskopické nálezy. Stereologie je velmi blízká statistice. Na základě analýzy vybraných řezů vzorkem určuje vlastnosti celku, podobně jako náhodně vybraný vzorek obyvatel reprezentuje celou populaci. Zastoupení zkoumané složky v ploše se označuje velkým písmenem A (area). To je doplněno dolním indexem A určujícím, že jde o průměrnou hodnotu – průměrné zastoupení složky v materiálu v libovolné dvourozměrné oblasti v jakékoli rovině. Průkopníkem stereologie byl francouzský geolog Achille Ernest Delesse (1817–1881). Zkoumáním hornin dospěl k závěru, že řez horninou může být za určitých okolností reprezentativním vzorkem celé masy (Howard 1998; Baddeley a Vedel Jensen 2004).

Stereologie vychází také z Cavalieriho principu (italský matematik Bonaventura Francesco Cavalieri, 1598–1647) užívaného k výpočtu obsahu a objemu. Z uvedeného principu mimo jiné vyplývá, že pokud jsou si rovny velikosti řezů jednotlivých útvarů vedených v libovolné ploše, pak jsou si rovny i objemy těchto útvarů. To znamená, že objem solidních útvarů lze odvozovat od velikosti jejich plochy v řezech provedených v náhodných rovinách.

Základní hodnotící metodou je použití stereologické mřížky. Po aplikaci (promítnutí) pravidelné bodové mřížky na obraz nebo mikrofotografii preparátu jsou sečteny výskyty bodů (průsečíků přímek mřížky) ve zkoumaných objektech. Výsledek součtu bodů k jejich celkovému počtu určí objemovou hustotu částic (*obr. 19*). Ke zpracování vzorků dnes slouží speciální počítačový software (např. Ellipse, ViDiTo, Slovenská republika).

Obr. 19: Příklad použití jednoho z modulů analytického programu Ellipse (ViDiTo, Slovenská republika) ke stereologické analýze. Program počítá výskyt průsečíků (bodů mřížky) kryjících se se zkoumanými objekty (zelenou barvou) a pozadí (žlutá barva). Automatickou detekci je možné korigovat uživatelskými zásahy.



Zdroj: <http://www.ellipse.sk/examples.htm>

2. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

Podstatou projektu bylo určení mechanických a strukturálních vlastností funkčně nejdůležitějších částí lidských aortálních a pulmonálních alograftů o různé délce kryoprezervace a jejich vzájemné srovnání. Cílem práce bylo ověření domněnky, že v průběhu vlastní kryoprezervace ani dalšího skladování alograftů srdečních chlopní v tekutém dusíku dle standardizovaných protokolů užívaných tkáňovými bankami nedochází k podstatným změnám ovlivňujících mechanickou odolnost a strukturu štěpů.

Hypotézu jsme formulovali následovně: **„Kryoprezervované alografty srdečních chlopní neztrácejí ani po 5 letech skladování v tekutém dusíku své zásadní mechanické a strukturální vlastnosti.“**

Ověření této hypotézy mělo potenciál přímo zasáhnout do provozu tkáňové banky FN Motol a do národního programu transplantací alogenních chlopenních štěpů. Prodloužení arbitrárně stanovené a obecně přijímané expirační doby 5 let může výrazně rozšířit nabídku chlopenních štěpů, především méně obvyklých velikostí aortálních alograftů, které na své využití často čekají déle a po uplynutí expirace musí být vyřazeny. Širší nabídka otevře prostor pro spolupráci Národní banky alogenních chlopenních štěpů s větším množstvím kardiologických pracovišť v České republice i zahraničí.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Charakteristika souboru

Zpracovali jsme celkem 64 lidských alogenních srdečních chlopní (31 aortálních, 33 pulmonálních) připravených Tkáňovým zařízením FN Motol (kód ministerstva zdravotnictví ČR STB 85), Národní bankou alogenních chlopních štěpů. Šlo o štěpy čerstvé, které dosud neprošly procesem kryoprezervace, kryoprezervované ve standardní expirační době 5 let a štěpy „prošlé“, exspirované, tzn. po uplynutí arbitrárně stanovené doby expirace.

Podle délky kryoprezervace byly alogenní srdeční chlopně (ASCH) rozděleny do 4 skupin:

- skupina 0 – čerstvé
- skupina I – délka kryoprezervace 0,1 – 4,9 let
- skupina II – délka kryoprezervace 5 – 9,9 let
- skupina III – kryoprezervace 10 let a delší

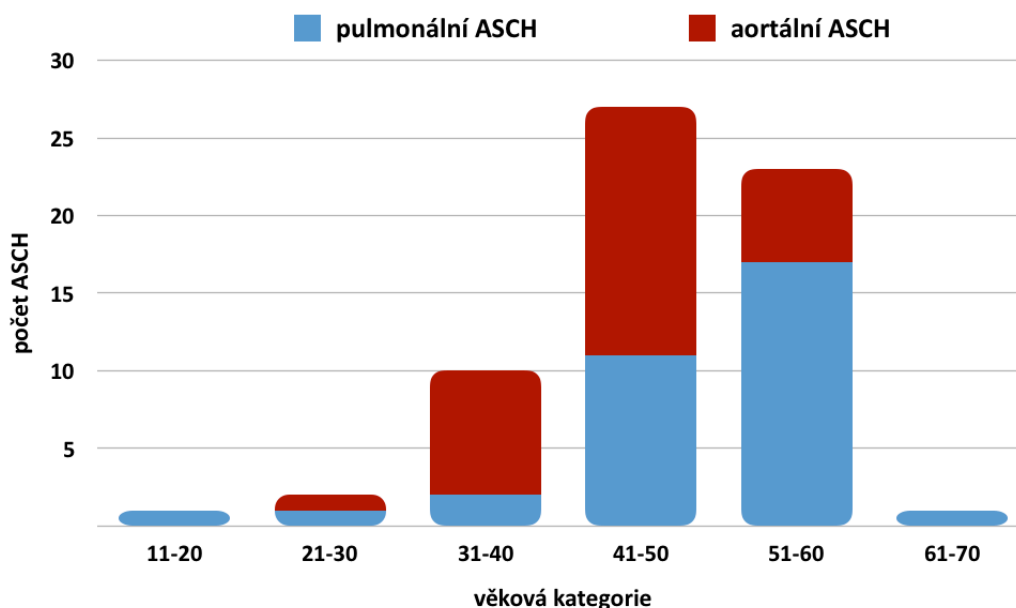
Demografické charakteristiky jednotlivých skupin a délku kryoprezervace shrnuje *tabulka 3 a graf 1*.

Tab. 3: Demografické a kryoprezervační charakteristiky souboru zpracovaných alograftů srdečních chlopní (ASCH).

	skupina 0 (čerstvé)	skupina I (0,1 – 4,9 let)	skupina II (5 – 9,9 let)	skupina III (10 let a více)
aortální ASCH				
n	3	9	11	8
pohlaví				
muži	2	4	2	3
ženy	1	5	9	5
věk dárce (roky) (medián, mezikvartilová šíře)	51,35 (33,07-58,14)	49,08 (40,73-51,91)	45,64 (40,59-50,33)	44,36 (35,43-47,37)
kryoprezervace (roky) (medián, mezikvartilová šíře)	N/A	3,89 (0,94-4,48)	5,26 (5,10-5,32)	12,74 (10,51-14,45)
pulmonální ASCH				
n	4	12	8	9
pohlaví				

muži	3	5	3	5
ženy	1	7	5	4
věk dárce (roky) (medián, mezikvartilová šíře)	54,74 (37,64-62,93)	49,99 (45,23-54,96)	53,36 (51,28-56,69)	46,66 (38,91-53,79)
kryoprezervace (roky) (medián, mezikvartilová šíře)	N/A	2,98 (1,11-4,54)	7,48 (6,80-8,85)	15,21 (11,81-17,28)

Graf 1: Věkové rozložení dárců a zastoupení typů alogenních srdečních chlopní (ASCH) v jednotlivých věkových kategoriích.



3.2. Zpracování a výběr štěpů

Všechny štěpy byly získány ze srdcí kadaverózních dárců, která nebyla z jakýchkoliv důvodů shledána vhodná k transplantaci jako orgán. Odběr srdce i další zpracování proběhly standardně dle protokolu stanoveného tkáňovou bankou (Špatenka et al. 1997). Všechny chlopní štěpy prošly obvyklým procesem přípravy a kontroly kvality a byly shledány vhodnými ke klinickému použití (viz kapitola 1.3.3. teoretické části práce). Odběr srdce (opatřování podle znění zákona) probíhalo nejčastěji v rámci multiorgánového odběru, na aseptickém operačním sále. Primární zpracování prováděl kardiochirurg již v laminárním boxu, tedy supersepticky. Nejdříve standardně provedl parciální pitvu srdce, jejíž protokol byl odeslán na pracoviště patologické anatomie, či soudního lékařství, které provedlo ze zákona povinnou pitvu dárce orgánů. Protokol z parciální pitvy dárce se potom stal součástí pitevního protokolu dárce orgánů. Poté kardiochirurg vypreparoval aortální a pulmonální chlopní štěpy a odebral protokolem pracoviště předepsané vzorky tkáně na mikrobiologické a

morfologické vyšetření. Na závěr primárního zpracování ASCH byla zahájena dekontaminace štěpů naložením do antibiotického koktejlu v roztoku E199 (Sigma Aldrich, Německo). V antibiotickém koktejlů byly ASCH naloženy při pokojové teplotě minimálně do obdržení výsledků mikrobiologického vyšetření vzorků srdce dárce a štěpů během primárního zpracování. Koncentrace používaných antibiotik v *tabulce 4*.

Tab. 4: Složení antibiotického koktejlu v 500 ml roztoku E 199 (Sigma Aldrich, Německo) používaného k dekontaminaci alograftů srdečních chlopní ve Tkáňovém zařízení FN Motol (v roce 2019, složení se může měnit dle mikrobiologie každoročně prováděné validace).

antibiotikum	koncentrace (mg/ml)
gentamicin (Gentamicin, Lek Pharmaceuticals d.d., Ljubljana, Slovinsko)	0,32
vankomycin (Vankomycin Actavis, Actavis Group PTC, Island)	0,5
piperacilin/tazobactam (Piperacilin/Tazobactam Kabi, Fresenius Kabi s.r.o., Praha, ČR)	0,5
amfotericin B (Fungizone, E. R. Squibb & Sons Limited, UK)	0,1

Všechny použité štěpy vykazovaly negativní bakteriální nález. Následovalo definitivní zpracování ASCH, tedy kryoprezervace. Antibiotiky ošetřené ASCH byly v laminárním boxu přeneseny do kryoprotekčního roztoku DMSO v 10 % koncentraci a dvojvrstevně zabaleny do speciálních obalů (Gambro Hemofreeze bag, NPBI BV, Gambro, Nizozemí). Zabalené štěpy prošly procesem programovaného mražení s poklesem teploty o 1 °C za minutu a uloženy v kryokontejneru v tekuté fázi tekutého dusíku při teplotě -196 °C. Popsaný odběr (opatřování), primární i definitivní zpracování, mražení a skladování v kryoskladu odpovídaly právní úpravě Zákona č. 286/2002 Sb., Zákona o darování, odběrech a transplantacích tkání a orgánů a o změně některých zákonů (tzv. Transplantační zákon) a Zákona č.296/2008 Sb., Zákona o zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání a buněk určených k použití u člověka a o změně souvisejících zákonů (tzv. Zákon o lidských tkáních a buňkách). Legislativa byla respektována ve znění pozdějších úprav a byly respektovány i prováděcí vyhlášky k oběma zákonům.

Pro potřeby experimentu byly náhodě vybrány štěpy odpovídajících typů (aortální nebo pulmonální) a délky kryoprezervace. Po uvolnění z kryoskladu následovalo přeložení do

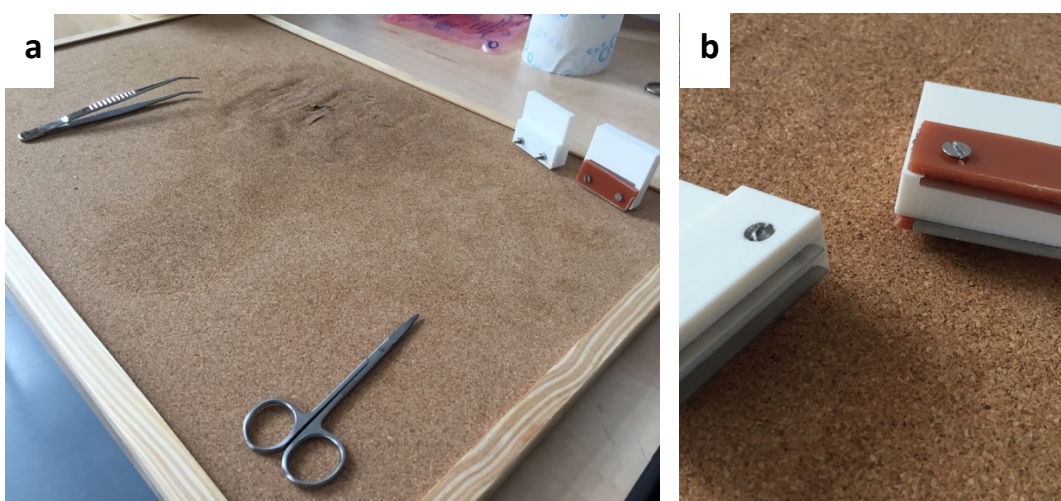
transportního kryokontejneru opatřeného digitálním teploměrem se záznamem (CXR 500, Wharton-Taylor International LLC, USA) a převoz do výzkumného zařízení v Plzni ve stejném režimu, v jakém jsou přepravovány ASCH k transplantaci při použití u člověka.

3.3. Příprava vzorků

Po vyjmutí z transportního kryokontejneru byly štěpy v obalech ponechány po dobu minimálně 15 minut při pokojové teplotě k ekvilibraci. Následně byly (stále v obalu) na dalších 15 minut ponořeny do vodní lázně o teplotě 37 °C. Popsaný postup rozmražení vychází z poznatků experimentálně provedené validace protokolu tkáňové banky a je standardně užívaným i v případě klinického použití ASCH, tedy při rozmražení ASCH na operačním sále, před transplantací.

Poté již bylo přistoupeno k vlastnímu odběru vzorků pro měření mechanických vlastností tkáně a morfologická vyšetření. Po otevření a vyjmutí štěpu z obalu následovalo promytí ve fyziologickém roztoku k odstranění zbytku DMSO. Pracovní plochu a vybavení k odběru vzorků tvořila korková podložka, chirurgické nůžky, pinzeta a speciálně vyrobené nosiče žiletkových břitů o definované vzdálenosti (*obr. 20*).

Obr. 20: Odběr vzorků alograftů srdečních chlopní při experimentu. **a** – pracovní plocha a nástroje, **b** – detail speciálně vyrobených vykrajovacích zařízení s žiletkami rovnoběžně uloženými ve vzdálenosti 5 a 10 mm k zajištění homogenity vzorků.



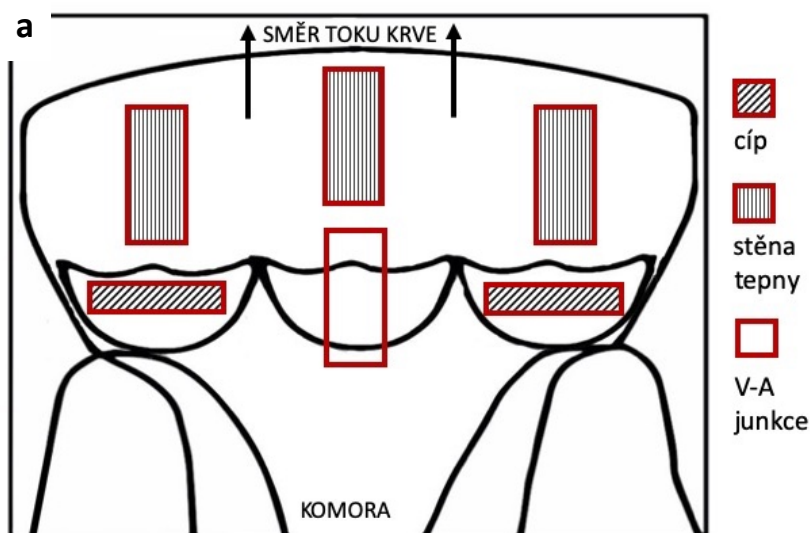
Zdroj: materiál z průběhu experimentu

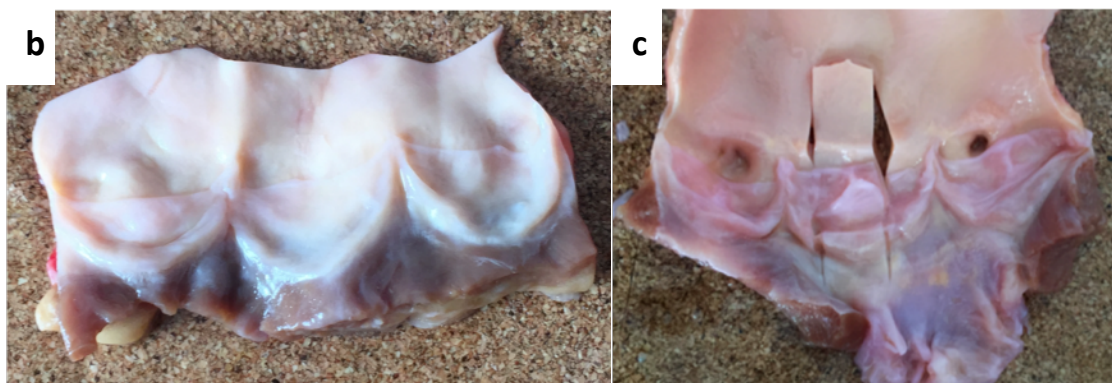
Z okraje velké cévy každého alograftu byl nejdříve oddělen kruhový vzorek tepny (ring) o šířce 5 mm. Následovalo podélné rozstřížení štěpu mezi chloppenními cípy a rozložení na podložku. Poté byl vyříznut 10 mm podélný vzorek arteriální stěny s ukotvením cípu označený jako ventrikulo-arteriální junkce. Tento vzorek byl zvolen jako kompozitní, obsahující obě složky – cíp i arteriální stěnu a jejich spojení.

Z obou zbývajících intaktních cípů (koronárních v případě aortálních ASCH) byly odebrány 5 mm široké vzorky. Dále byly odebrány 1 až 3 10 mm široké vzorky tepenné stěny (množství dle velikosti alograftu, resp. délky jeho tepny) (obr. 21).

Ze sousedních oblastí všech vzorků byly odebrány tkáně k histologickému hodnocení. Velikost vzorků byla změřena digitálním posuvným měřítkem. Tkáně určené k mechanickému testování byly uloženy do fyziologického roztoku (0,9 % vodný roztok NaCl), pro histologické zpracování fixovány 4 % pufrovaným formalínem.

Obr. 21: Odběr vzorků pro experiment. **a** – schéma odběru: 2 vzorky o šířce 5 mm transversálně z cípů, 1 vzorek o šířce 10 mm podélně napříč ventrikulo-arteriální (V-A) junkcí s cípem a stěnou tepny, 10 mm široké vzorky arteriální stěny; **b** – pulmonární alograft otevřený podélnou incizí mezi cípy; **c** – aortální alograft s vyříznutým vzorkem V-A junkce napříč nekoronárním cípem. Ve schématu není znázorněn odběr arteriálního ringu z okraje alograftu, který proběhl před rozstřížením alograftu.





Zdroj: vlastní schéma a foto, publikováno v časopisu *Cell and Tissue Banking* (Fiala 2019)

Počty odebraných vzorků jsou přehledně uvedeny v *tabulce 4*. V některých případech nebylo možné vzorky odebrat (kvůli nedostatečné délce alograftu), v jiných zase nebylo možné odebrané vzorky dále zpracovat (kvůli poškození) a proto byly vyřazeny.

Tab. 4: Počty vzorků odebraných z jednotlivých skupin podle délky kryoprezervace. (ASCH = alograft srdeční chlopně)

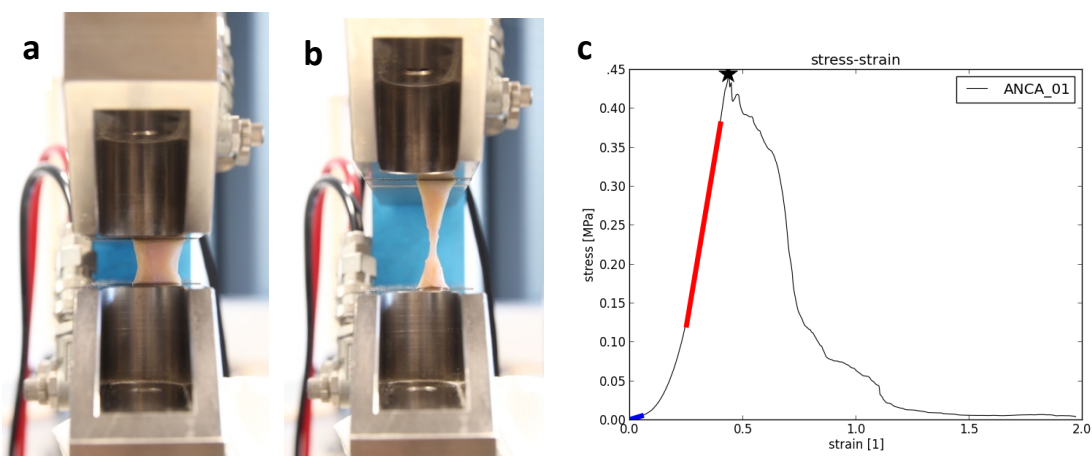
	skupina 0 (čerstvé)	skupina I (0,1 – 4,9 let)	skupina II (5 – 9,9 let)	skupina III (10 let a více)
aortální ASCH	3	9	11	8
tepna	6	11	26	6
cíp	6	18	21	16
junkce	3	9	11	8
ring	3	9	11	8
pulmonální ASCH	4	12	8	9
tepna	9	21	10	11
cíp	7	21	16	14
junkce	4	12	8	9
ring	4	12	8	8

3.4. Mechanické testování

Všechny odebrané vzorky byly v krátkém odstupu po odběru (10–60 minut) podrobeny zkoušce tahem na trakčním stroji (trhacím zařízení) Zwick/Roel Z50 (Zwick GmbH & Co, Německo). Stroj byl osazen 1 kN snímačem zatížení (tenzometrickým snímačem) schopným převést vynaloženou tahovou sílu na elektrický signál. Ten byl zesílen a zpracován snímačem napojeným na výpočetní techniku vybavenou speciálním software. Ke zpracování dat byl využit program na poloautomatické vyhodnocení naměřených mechanických hodnot vyvinutý pracovníky NTIS (Elfpy2018, <http://docs.sfepy.org/elfpy/doc-devel/index.html#>).

Vzorky byly upevněny do čelistí měřicího zařízení s počáteční nastavenou délkou 10 mm. Samotné testování probíhalo podle nastaveného programu. Po spuštění stroje proběhlo 20 stabilizačních cyklů s natažením vzorků o 10 % původní délky rychlostí 10 mm/min (tzv. preconditioning). Následovalo zatížení rychlostí 10 mm/min do okamžiku přetržení. Výstupem každé zkoušky byla deformační křivka (stress-strain curve) vyjadřující vztah mezi napětím a deformací (obr. 22).

Obr. 22: Mechanické testování vzorku aortální stěny trakčním strojem Zwick/Roell Z50. **a** – uchycení vzorku do čelistí stroje; **b** – okamžik ruptury vzorku; **c** – ukázka nelineární deformační křivky, oblast malých deformací označena modře, lineární oblast velkých deformací červeně, hvězdička označuje okamžik ruptury vzorku, ve kterém byly určovány mezní napětí a mezní deformace.



Zdroj: materiál z průběhu experimentu

Z křivky byl z oblastí malých a velkých deformací automaticky (použitím lineární regrese) vypočten Youngův modul elasticity (E) pro malé (E_0) a velké deformace (E_1). Rozpětí malých a velkých deformací pro jednotlivé druhy vzorků získané z tvaru deformační křivky shrnuje tabulka 5.

Tab. 5: Rozpětí malých a velkých deformací pro různé vzorky tkáně

	malé deformace	velké deformace
tepna	0-4 %	20-40 %
cíp	0-2 %	10-20 %
junkce	0-2 %	10-20 %
ring	0-20 %	40-60 %

V okamžiku ruptury vzorku bylo určeno mezní napětí (ultimate stress) a mezní deformace (ultimate strain), tedy maximální síla vedoucí k ruptuře a rozdíl mezi délkou vzorku při ruptuře a jeho původní délkou vydělený původní délkou.

Pro testování arteriálních ringů byly vzorky ukotveny pomocí zvlášť vyrobených držáků s háky (*obrázek 23*). Po upevnění do pneumatických čelistí trakčního stroje byl vzorek ringu zatížen tahem 0,1 N, tedy silou potřebnou k vypnutí ringu. Úvodní obvod ringu (C_0) byl vypočten podle vzorce:

$$C_0 = 2(l_0 + d_h) + \pi(d_h + t_a)$$

l_0 = vzdálenost háků

d_h = průměr háku (2,6 mm)

t_a = tloušťka ringu

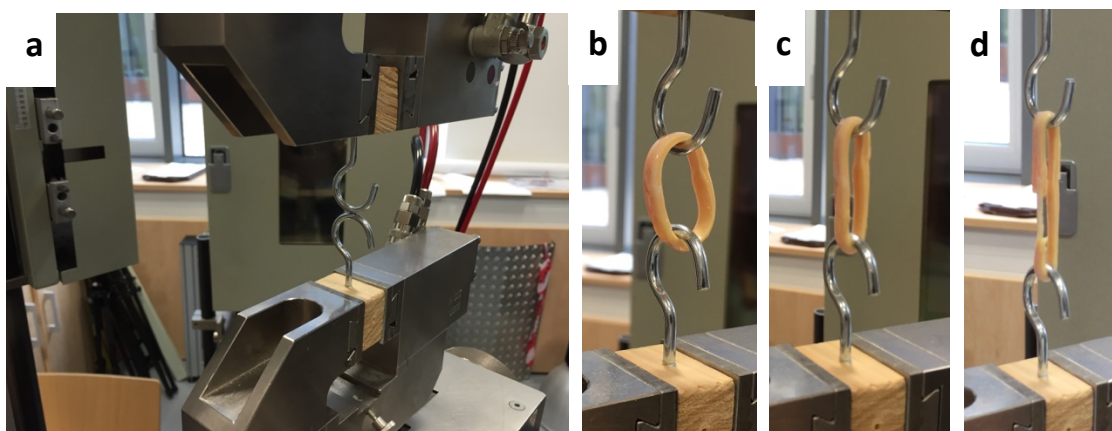
V úvodu testu proběhl preconditioning 20 cykly natažení a povelání o 10 % úvodního obvodu ringu (poměrná deformace $\varepsilon_0 = 0,1 C_0$). Rychlost natažení v mm/min byla vypočtena zvlášť pro každý vzorek podle vzorce:

$$v = 160\varepsilon_0$$

Vypočtená rychlost odpovídala modelové situaci, kdy by k deformaci o 10 % a návratu zpět do úvodního stavu došlo v průběhu jednoho srdečního stahu. Standardizovaná srdeční frekvence 80/min a preconditioning o 10 % byly převzaty z publikovaných experimentálních prací (Greenfield a Patel 1962; Hamdan et al. 2012; Imura et al. 1990).

Následovalo vlastní testování, při kterém byl ring zatěžován stejnou rychlostí jako při preconditioningu až do přetržení. Ze získané deformační křivky byly stejně jako u ostatních vzorků výše popsaným způsobem vypočteny moduly pružnosti E_0 a E_1 , mezní napětí a mezní deformace.

Obr. 23: Mechanické testování vzoru arteriálního ringu trakčním strojem Zwick/Roell Z50. **a** – háčky k uchycení vzorku mezi čelistmi trakčního stroje; **b** – vzorek aortálního ringu v klidovém stavu před začátkem testu; **c** – vzorek pod napětím; **d** – vzorek v okamžiku ruptury



Zdroj: materiál z průběhu experimentu

Zkoušky probíhaly při pokojové teplotě, vzorky byly průběžně zvlhčovány fyziologickým roztokem. Způsob testování vycházel z protokolu, jíž dříve publikovaného studijním týmem (Kubíková et al. 2016, 2017).

3.5. Histologické hodnocení

Části tkání odebrané z oblastí sousedících se vzorky pro mechanické hodnocení byly fixovány 4 % pufovaným formalínem a odeslány k dalšímu histologickému zpracování do Ústavu embryologie a histologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni. Příprava preparátů proběhla standardní technikou popsanou v úvodní části práce. Z parafinových bločků byly nakrájeny 5 μm řezy. Dva preparáty z každého vzorku prošly standardně barvením hematoxylinem a eosinem, dva Verhoeffovým hematoxylinem a zeleným trichromem k vizualizaci pojivové tkáně, dva orceinem k vizualizaci elastických vláken a dva siriovou červení (picosirius red) k vizualizaci kolagenu typu I. K hodnocení všech preparátů posloužil světelný mikroskop s objektivy umožňujícími 4 až 40násobné zvětšení. Vzorky obarvené siriovou červení byly prohlédnuty v mikroskopu s použitím zdroje s cirkulárně polarizovaným světlem a příslušnými filtry. K dalšímu hodnocení bylo pořízeno 6228 mikrofotografií (tab. 6).

Tab. 6: Barvení preparátů použité v experimentu ke stanovení strukturálních vlastností jednotlivých vzorků allograftů srdečních chlopní, A_A = area fraction

hodnocený parametr	barvení	zvětšení	počet mikrofotografií na vzorek
tloušťka celé stěny (MT)	Verhoeffův hematoxylin a zelený trichróm	4x	2
zastoupení elastinu (A_A (elastin))	orcein	40x	8
zastoupení kolagenu (A_A (kolagen))	siriová červeň	20x	8

Ke stanovení plošného podílu kolagenu typu I a elastinu v referenční ploše vzorku (area fraction A_A) byly aplikovány morfometrické stereologické metody vycházející z principů popsaných v úvodní části práce, konkrétně Cavallieriho principu (viz kapitola 1.8.3.). Hodnocení náhodně zhotovených mikrofotografií každého vzorku pomocí bodové stereologické mřížky probíhalo v programu Ellipse (ViDiTo, Slovenská republika). Plošný podíl byl vypočten jako počet průsečíků (bodů) mřížky kryjících se se zkoumaným parametrem (kolagenem I nebo elastinem) dělený celkovým počtem průsečíků mřížky. Výsledná hodnota byla průměrem hodnot získaných z 8 mikrofotografií.

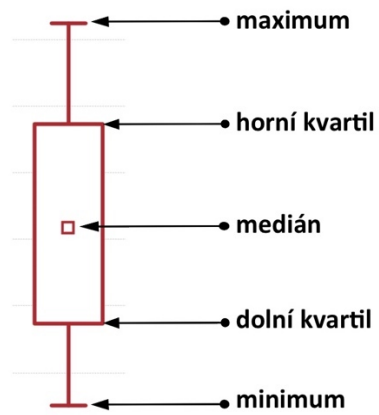
3.6. Statistické zpracování dat

Získaná data byla zpracována programem Statistica Base 10 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Normalita rozložení mechanických a strukturálních parametrů byla testována Shapiro-Wilkovým testem. Rozdíl hodnoty parametrů mezi jednotlivými skupinami byl analyzován Kruskal-Wallisovým ANOVA a Man-Whitneyho U testem. K určení korelace mezi délkou kryoprezervace a mechanickými a strukturálními vlastnostmi byl použit test nelineárního Spearmanova korelačního koeficientu. Hladina významnosti byla zvolena 5 % ($p=0,05$).

Výsledky všech měření jsou uvedeny jako mediány s mezikvartilovým rozpětím (IQR). IQR je rozpětí mezi 25. a 75. percentilem, tedy oblast, ve které se nachází středních 50 % hodnot proměnné. K vizualizaci dat byl použit krabicový graf (box plot). Obdélník grafu určuje polohu

dolního a horního kvartilu, uvnitř je označena pozice mediánu. Výběžky označují maximum a minimum pozorovaných hodnot (obr. 24).

Obr. 24: Krabicový graf (box plot) použitý k vizualizaci naměřených dat s legendou k jeho jednotlivým částem.



Zdroj: vlastní schéma

4. VÝSLEDKY

Celkem bylo vyšetřeno 64 chlopenních alograftů, ze kterých bylo odebráno 346 vzorků pro měření mechanických vlastností. Ze získané tkáně bylo připraveno stejné množství histologických preparátů, ze kterých bylo pořízeno a hodnoceno 6228 mikrofotografií.

4.1. Mechanické a morfologické vlastnosti čerstvých ASCH (skupina 0)

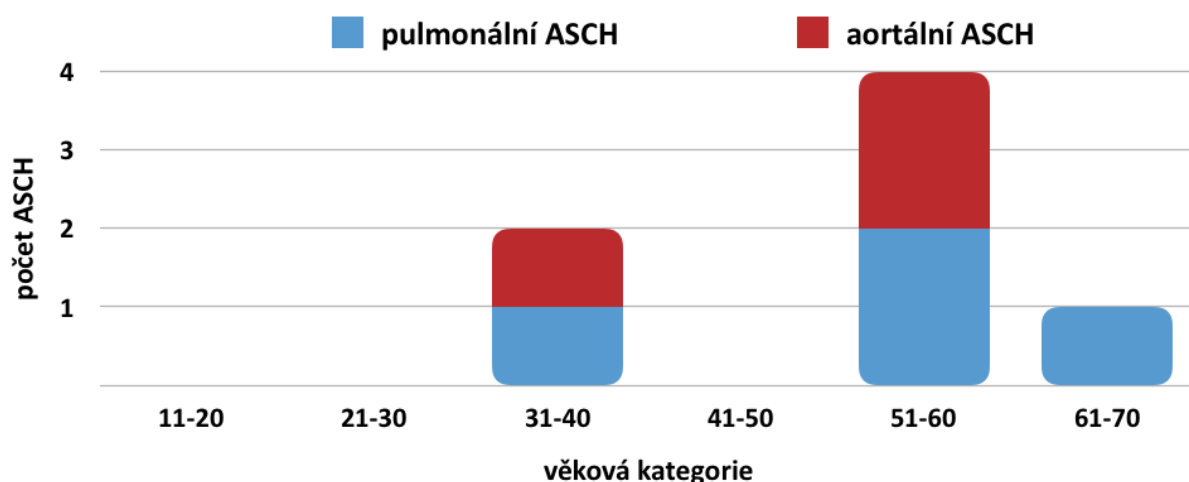
Ve skupině 0 bylo zpracováno 7 „čerstvých“ alograftů srdečních chlopní, tedy těch, které byly získány standardním způsobem a technikou popsanou v metodické části, dekontaminovány antibiotickým roztokem v mediu E199, ale neprošly metodou kryoprezervace. Charakteristiky skupiny v *tabulce 7 a grafu 2*.

Tab. 7: Charakteristiky skupiny čerstvých alograftů srdečních chlopní (skupina 0).

n = počet, *M* = muži, *Ž* = ženy, *IQR* = mezikvartilová šíře, *kryo* = kryoprezervace, *N/A* = není aplikovatelné

skupina 0	n	pohlaví (M/Ž)	věk (roky) (medián, IQR)	kryo (roky) (medián, IQR)
aortální	3	2/1	51,35 (33,07-58,14)	N/A
pulmonální	4	3/1	54,74 (37,64-62,93)	N/A

Graf 2: Věkové rozložení dárců a zastoupení typů allogenních srdečních chlopní (ASCH) ve skupině čerstvých štěpů (skupina 0).

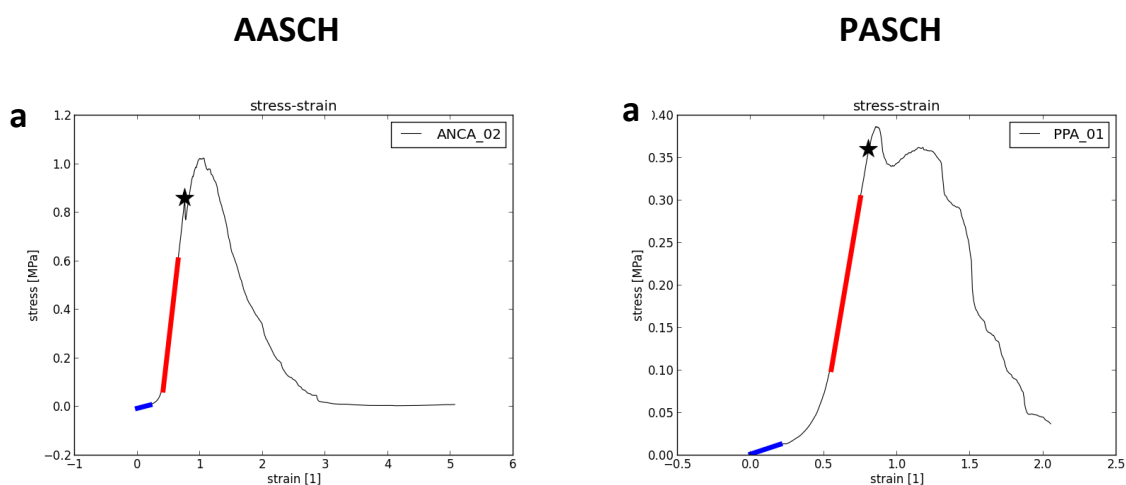


Ze všech ASCH byly odebrány vzorky cípů, aortální stěny, ventrikulo-arteriální junkce a arteriálního ringu a podrobeny mechanické zkoušce na trakčním stroji při uniaxiálních zatížení. Výsledky měření mechanických parametrů jednotlivých vzorků ASCH získané trhací zkouškou shrnuje *tabulka 8*. Ukázky deformačních křivek *obrázek 25*.

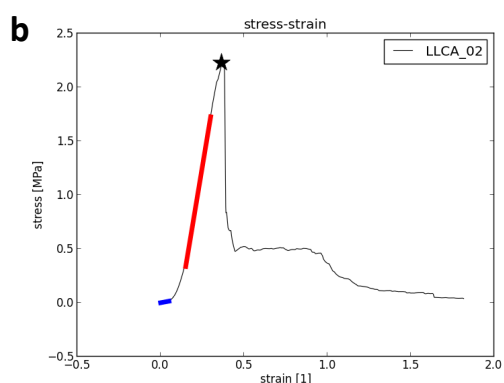
Tab. 8: Mechanické vlastnosti čerstvých (skupina 0) aortálních a pulmonálních alograftů (ASCH), mediány hodnot s mezikvartilovým rozpětím. n = počet testovaných vzorků; E_0 a E_1 = Youngův modul elasticity v malých, resp. velkých deformacích.

skupina 0	E_0 (MPa)	E_1 (MPa)	mezní deformace	mezní napětí (MPa)
aortální ASCH				
tepna (n=6)	0,24 (0,08-0,34)	2,31 (1,01-3,97)	0,36 (0,21-0,45)	0,49 (0,30-0,60)
cíp (n=6)	0,87 (0,46-2,56)	20,53 (15,77-47,35)	0,19 (0,17-0,29)	3,38 (2,22-4,14)
junkce (n=3)	0,29 (0,07-0,38)	0,84 (0,58-1,80)	0,25 (0,13-0,56)	0,18 (0,16-0,22)
ring (n=3)	0,23 (0,22-0,26)	16,85 (9,48-20,84)	0,57 (0,43-0,77)	2,03 (1,71-2,20)
pulmonální ASCH				
tepna (n=9)	0,09 (0,06-0,12)	0,97 (0,91-1,17)	0,45 (0,34-0,81)	0,33 (0,27-0,36)
cíp (n=7)	1,17 (0,40-6,32)	15,51 (11,13-30,02)	0,14 (0,11-0,23)	2,23 (1,01-2,95)
junkce (n=4)	0,36 (0,19-0,54)	2,10 (1,21-2,83)	0,21 (0,15-0,34)	0,26 (0,22-0,33)
ring (n=4)	0,17 (0,13-0,32)	9,6 (8,19-10,33)	0,53 (0,41-0,55)	1,21 (1,08-1,55)

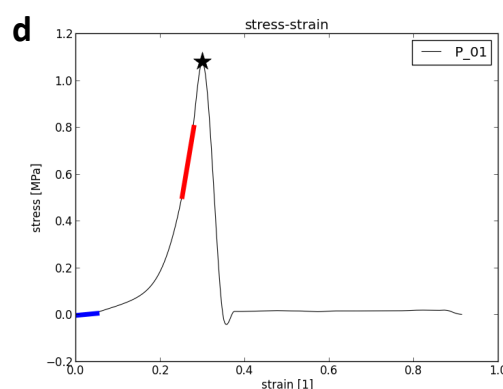
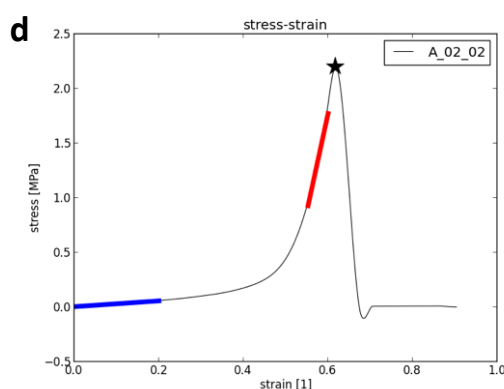
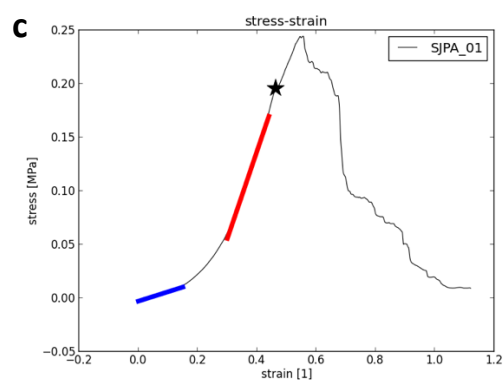
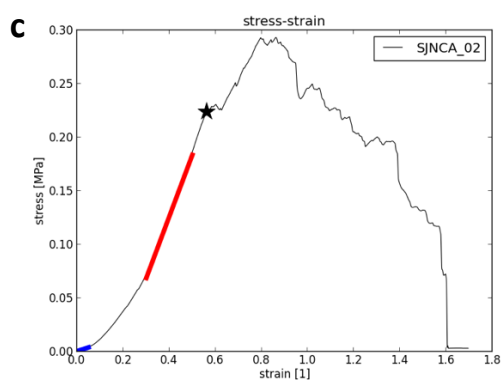
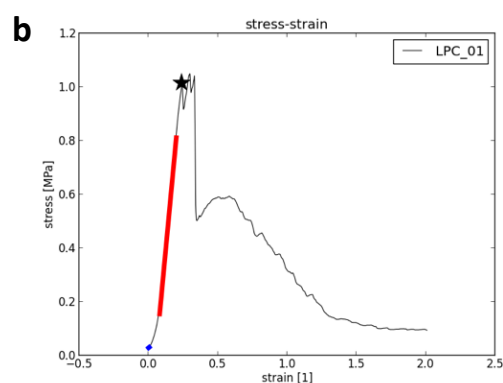
Obr. 25: Vybrané ukázky nelineárních deformačních křivek pro různé typy vzorků čerstvých aortálních a pulmonálních alograftů (AASCH, PASCH, skupina 0), **a** – stěna tepny, **b** – cíp, **c** – ventrikulo-arteriální junkce, **d** – ring. Oblast malých deformací označena modře, lineární oblast velkých deformací červeně, hvězdička označuje okamžik ruptury vzorku, ve kterém byly určovány mezní napětí a mezní deformace.



AASCH



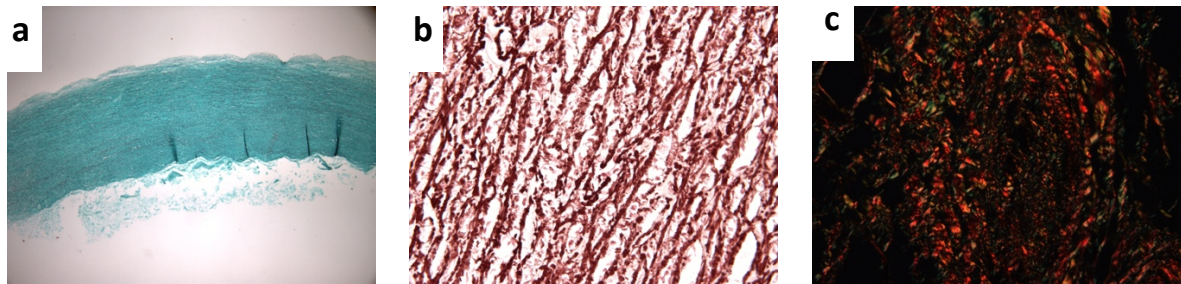
PASCH



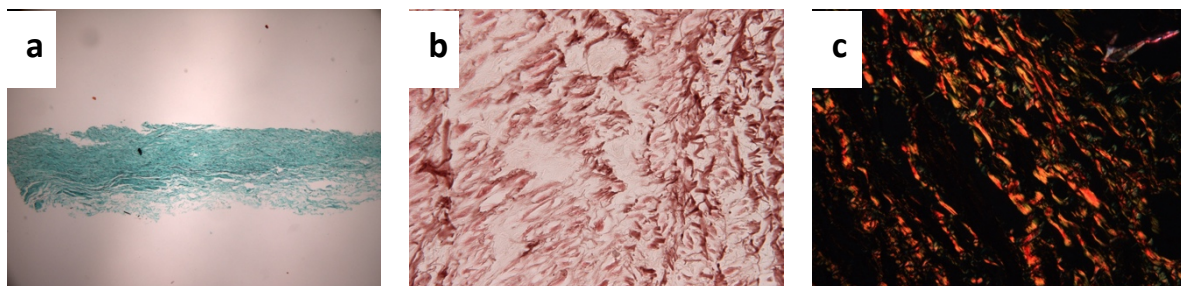
Tkáň bezprostředně sousedící se vzorky odebranými pro mechanické testování byla odstřižena, fixována 4 % pufrovaným formalíнем a odeslána k morfologickému hodnocení. Měření strukturálních vlastností předcházelo standardní histologické zpracování popsané v metodické části práce. K obarvení pojivové tkáně byl použit Verhoefův hematoxylin a zelený trichrom, ke zobrazení elastinu orcein a kolagenních vláken siriová červeň (picrosirius red) v polarizovaném světle (*obr. 26*).

Obr. 26: Vybrané ukázky mikrofotografií histologických preparátů ze vzorků arteriální stěny, cípu, ventrikuloarteriální junkce a ringu čerstvých aortálních a pulmonálních alograftů (AASCH, PASCH, skupina 0), **a** – Verhoeffův hematoxylin a zelený trichrom, zelená = kolagen I, černá = elastin, **b** – orcein, červenohnědá vlákna = elastin, **c** – picosirius red v polarizovaném světle, červená vlákna = kolagen.

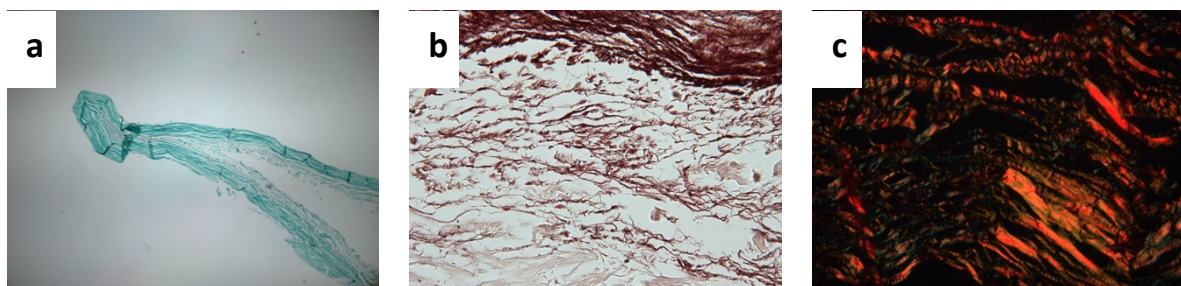
AASCH stěna



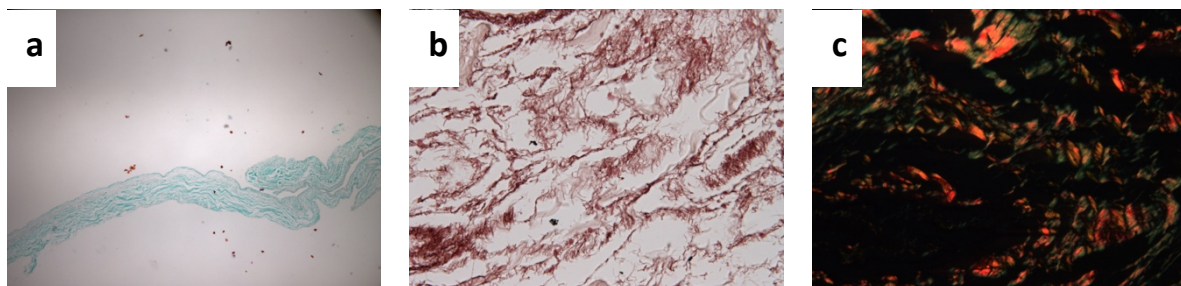
PASCH stěna



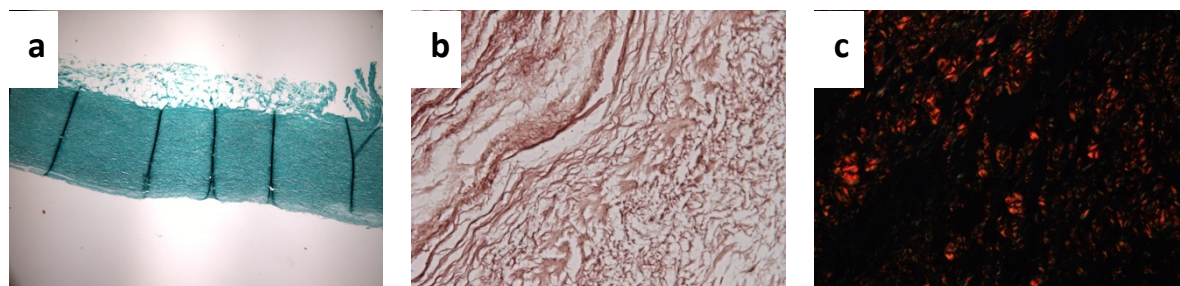
AASCH cíp



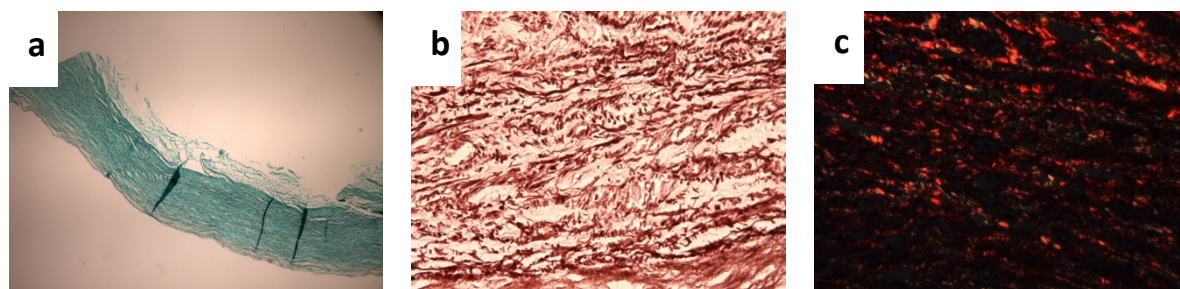
PASCH cíp



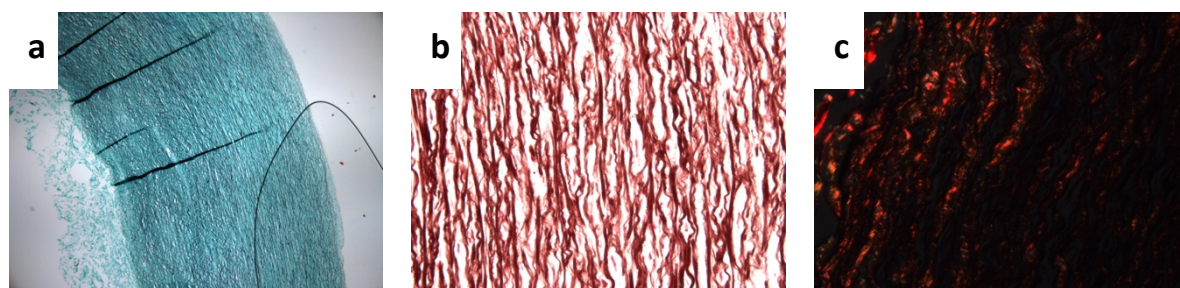
AASCH junkce



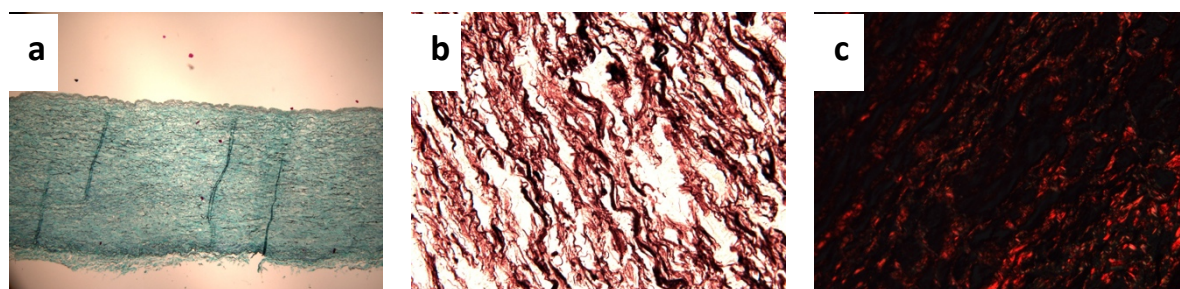
PASCH junkce



AASCH ring



PASCH ring



Mikrofotografie preparátů obarvených orceinem a picosirius red (v polarizovaném světle) (*obr. 26 b, c*) byly hodnoceny morfometricky pomocí bodové stereologické mřížky v počítačovém programu Ellipse (ViDiTo, Slovenská republika). Tloušťka stěny byla měřena z preparátů barvených Verhoeffovým hematoxylinem a zeleným trichromem (*obr. 26 a*). Počet mikrofotografií pořízených na každý vzorek viz *tabulka 6* v metodické části. Získané hodnoty shrnuje *tabulka 9*.

Tab. 9: Morfologické vlastnosti čerstvých (skupina 0) aortálních a pulmonálních alograftů (ASCH), mediány hodnot s mezikvartilovým rozpětím. n = počet hodnocených mikrofotografií; A_A = plošný podíl v referenční ploše vzorku (area fraction); MT = tloušťka stěny

skupina 0 (čerstvé)	A _A (elastin)	A _A (kolagen I)	MT (μm)
aortální ASCH			
tepna (n=108)	0,47 (0,46-0,60)	0,07 (0,02-0,18)	1941,14 (1681,14-2137,03)
cíp (n=108)	0,15 (0,11-0,16)	0,21 (0,13-0,33)	479,33 (417,00-540,00)
junkce (n=54)	0,23 (0,20-0,30)	0,12 (0,11-0,29)	911,18 (702,89-1458,44)
ring (n=54)	0,33 (0,29-0,37)	0,16 (0,042-0,21)	2477,20 (2296,62-2507,08)
pulmonální ASCH			
tepna (n=162)	0,37 (0,32-0,39)	0,08 (0,05-0,19)	1316,86 (1017,65-1368,02)
cíp (n=126)	0,08 (0,05-0,13)	0,21 (0,18-0,25)	317,00 (283,00-375,00)
junkce (n=72)	0,22 (0,19-0,25)	0,13 (0,08-0,21)	709,33 (662,18-808,45)
ring (n=72)	0,30 (0,28-0,32)	0,13 (0,11-0,22)	1673,04 (1534,35-1871,78)

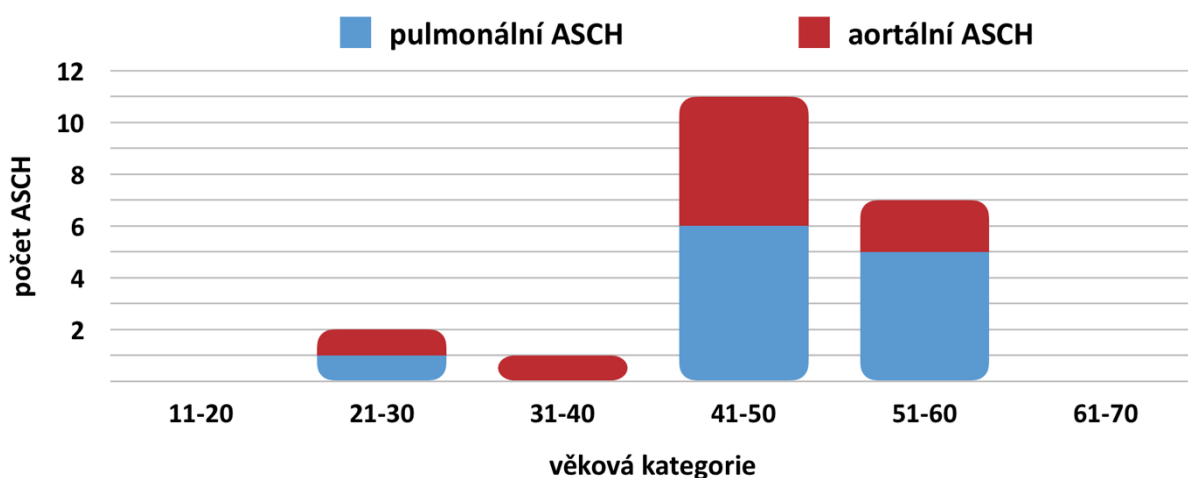
4.2. Mechanické a morfologické vlastnosti kryoprezervovaných ASCH skladovaných do 5 let (skupina I)

Ve skupině I bylo zpracováno 21 alograftů srdečních chlopní, které byly získány standardním způsobem a technikou popsanou v metodické části, dekontaminovány antibiotickým roztokem v médiu E199, prošly procesem kryoprezervace a byly skladovány v kryoskladu při teplotě tekutého dusíku do arbitrárně stanovené hranice 5 let. Charakteristiky skupiny v tabulce 10 a grafech 3 a 4.

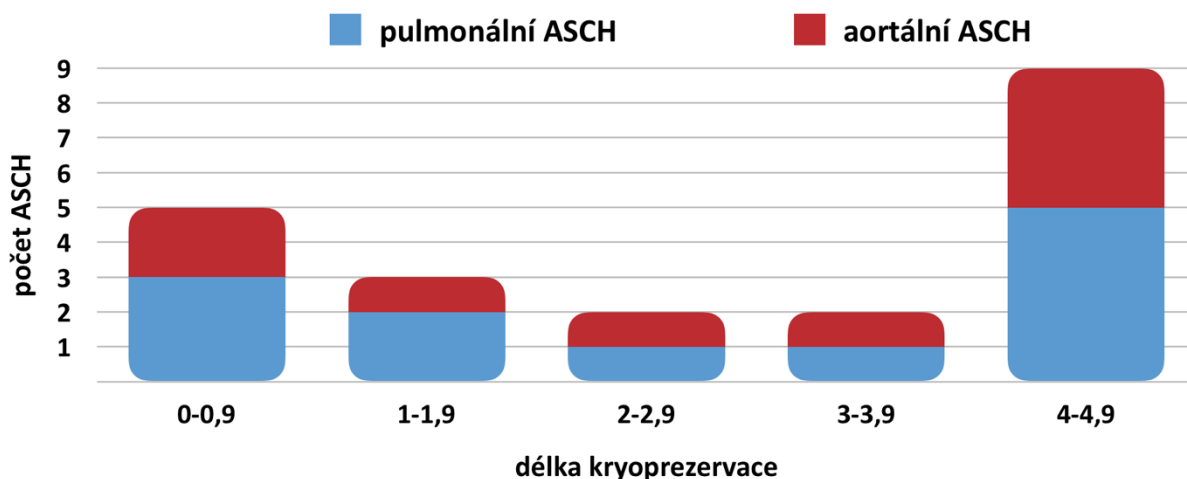
Tab. 10: Charakteristiky skupiny alograftů srdečních chlopní s délkou kryoprezervace do 5 let (skupina I). n = počet, M = muži, Ž = ženy, IQR = mezikvartilová šíře, kryo = kryoprezervace

skupina I (kryo 0,1 - 4,9 let)	n	pohlaví (M/Ž)	věk (roky) (medián, IQR)	kryo (roky) (medián, IQR)
aortální	9	4/5	49,08 (40,73-51,91)	3,89 (0,94-4,48)
pulmonální	12	5/7	49,99 (45,23-54,96)	2,98 (1,11-4,54)

Graf 3: Věkové rozložení dárců a zastoupení typů allogenních srdečních chlopní (ASCH) kryoprezervovaných do 5 let (skupina I).



Graf 4: Charakteristika allogenních srdečních chlopní (ASCH) kryoprezervovaných do 5 let (skupina I) podle délky kryoprezervace.

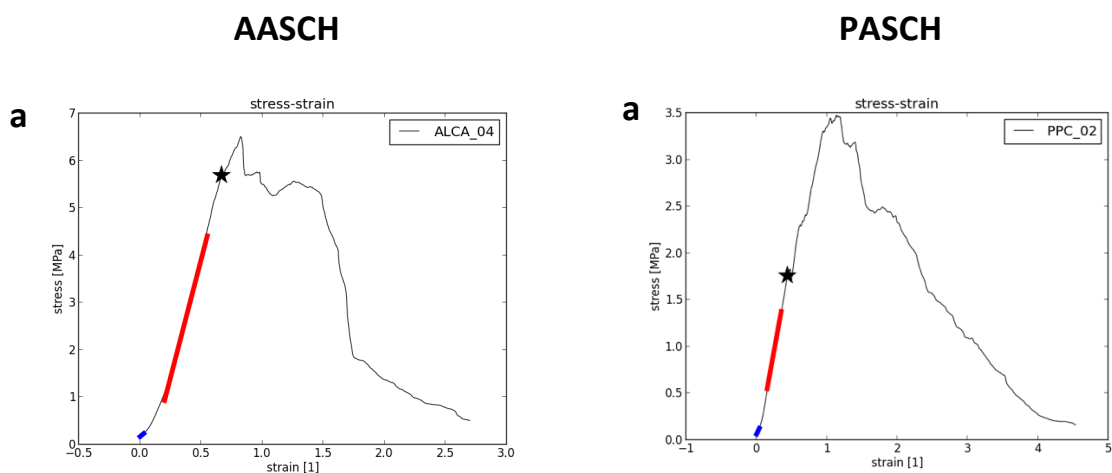


Ze všech ASCH skupiny I byly odebrány vzorky cípů, aortální stěny, ventrikulo-arteriální junkce a arteriálního ringu a podrobeny mechanické zkoušce na trakčním stroji při uniaxiálním zatížení. Výsledky měření mechanických parametrů jednotlivých vzorků ASCH získané trhačí zkouškou shrnuje *tabulka 11*. Ukázky deformačních křivek *obrázek 27*.

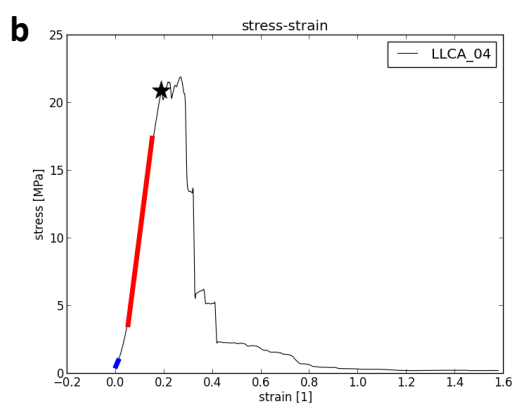
Tab. 11: Mechanické vlastnosti aortálních a pulmonálních alograftů (ASCH) do 5 let kryoprezervace (skupina I), mediány hodnot s mezikvartilovým rozpětím. n = počet testovaných vzorků; E_0 a E_1 = Youngův model elasticity v malých, resp. velkých deformacích.

skupina I (kryo 0,1 - 4,9 let)	E_0 (MPa)	E_1 (MPa)	mezní deformace	mezní napětí (MPa)
aortální ASCH				
stěna (n=11)	0,34 (0,16-1,54)	3,94 (1,28-9,95)	0,45 (0,35-0,67)	0,83 (0,37-5,69)
cíp (n=18)	2,33 (0,69-4,99)	19,55 (12,61-29,01)	0,33 (0,20-0,37)	4,76 (2,34-8,13)
junkce (n=9)	0,23 (0,22-0,85)	2,21 (0,86-2,85)	0,43 (0,23-0,51)	0,34 (0,31-0,48)
ring (n=9)	0,18 (0,14-0,23)	13,84 (11,64-14,50)	0,55 (0,50-0,68)	1,62 (1,39-2,07)
pulmonální ASCH				
stěna (n=21)	0,13 (0,09-0,21)	0,99 (0,58-1,95)	0,46 (0,31-0,67)	0,31 (0,20-0,45)
cíp (n=21)	2,33 (0,90-4,98)	15,48 (10,77-24,49)	0,25 (0,17-0,39)	3,07 (2,04-3,84)
junkce (n=12)	0,21 (0,14-0,33)	1,54 (0,67-2,09)	0,18 (0,16-0,21)	0,16 (0,09-0,25)
ring (n=12)	0,12 (0,03-0,24)	6,44 (5,47-8,42)	0,39 (0,33-0,55)	1,04 (0,80-1,37)

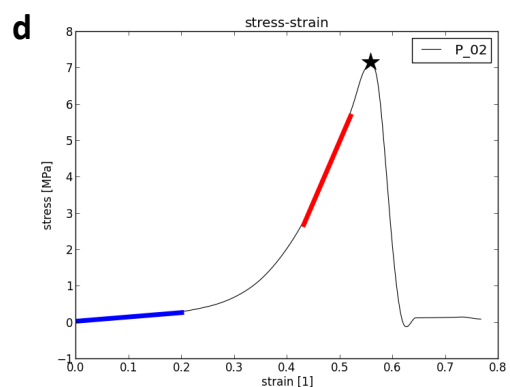
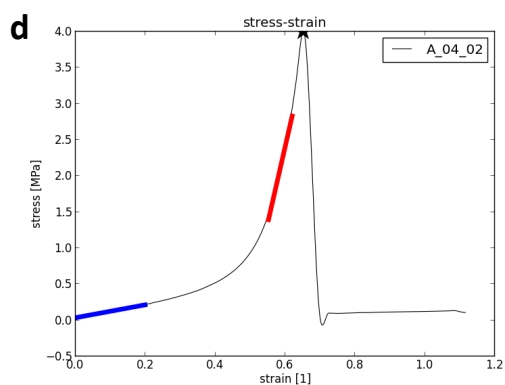
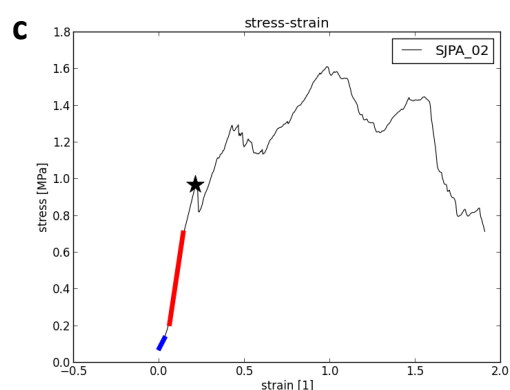
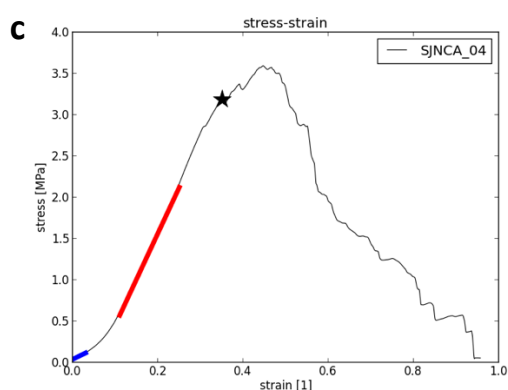
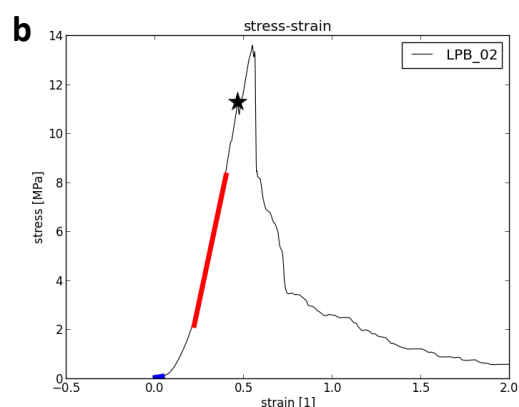
Obr. 27: Vybrané ukázky nelineárních deformačních křivek pro různé typy vzorků aortálních a pulmonálních alograftů (AASCH, PASCH) do 5 let kryoprezervace (skupina I), **a** – stěna tepny, **b** – cíp, **c** – ventrikulo-arteriální junkce, **d** – ring. Oblast malých deformací označena modře, lineární oblast velkých deformací červeně, hvězdička označuje okamžik ruptury vzorku, ve kterém byly určovány mezní napětí a mezní deformace.



AASCH



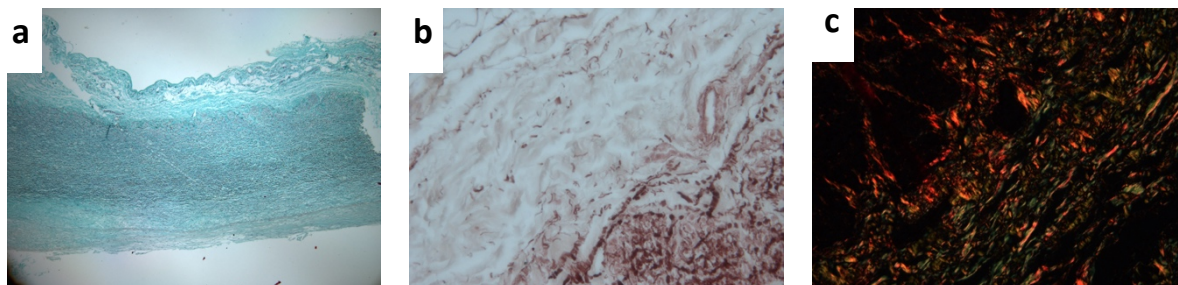
PASCH



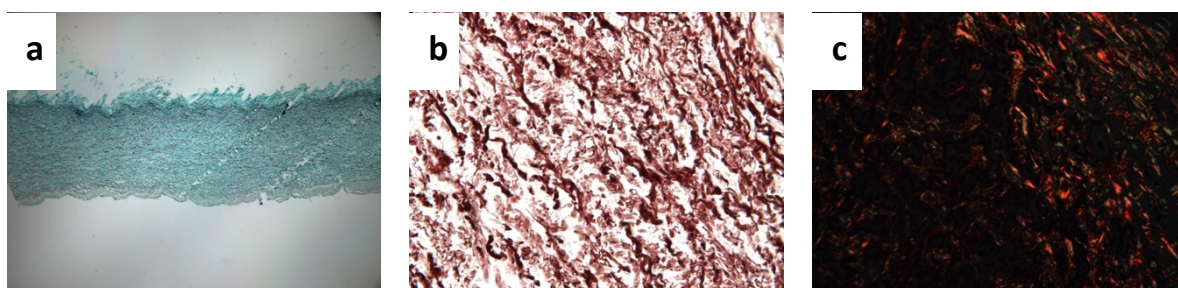
Tkáň bezprostředně sousedící se vzorky odebranými pro mechanické testování byla odstřižena, fixována 4 % puřrovaným formalínem a odeslána k morfologickému hodnocení. Měření strukturálních vlastností předcházelo standardní histologické zpracování popsané v metodické části práce. K obarvení pojivové tkáně byl použit Verhoefův hematoxylin a zelený trichrom, ke zobrazení elastinu orcein a kolagenních vláken siriová červeň (picrosirius red) v polarizovaném světle (*obr. 28*).

Obr. 28: Vybrané ukázky mikrofotografií histologických preparátů ze vzorků arteriální stěny, cípu, ventrikuloarteriální junkce a ringu aortálních a pulmonálních alograftů (AASCH, PASCH) do 5 let kryoprezervace (skupina I), **a** – Verhoeffův hematoxylin a zelený trichrom, zelená = kolagen I, černá = elastin; **b** – orcein, červenohnědá vlákna = elastin; **c** – picosirius red v polarizovaném světle, červená vlákna = kolagen.

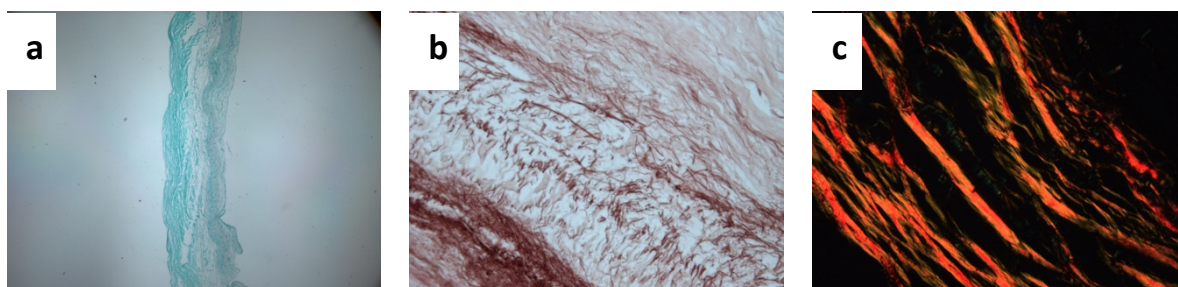
AASCH stěna



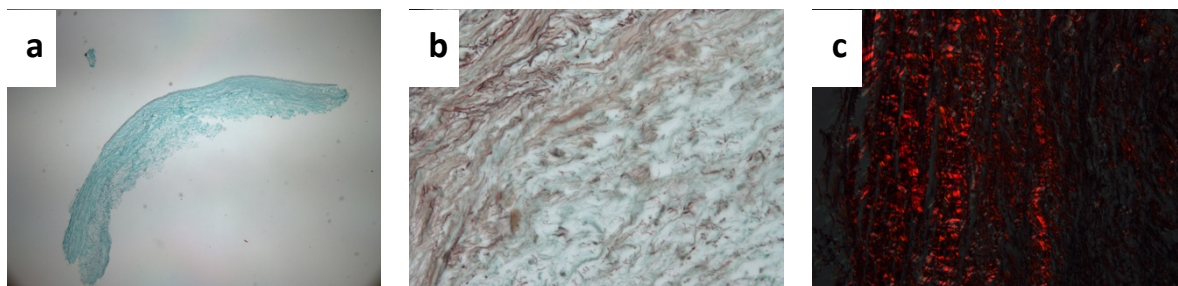
PASCH stěna



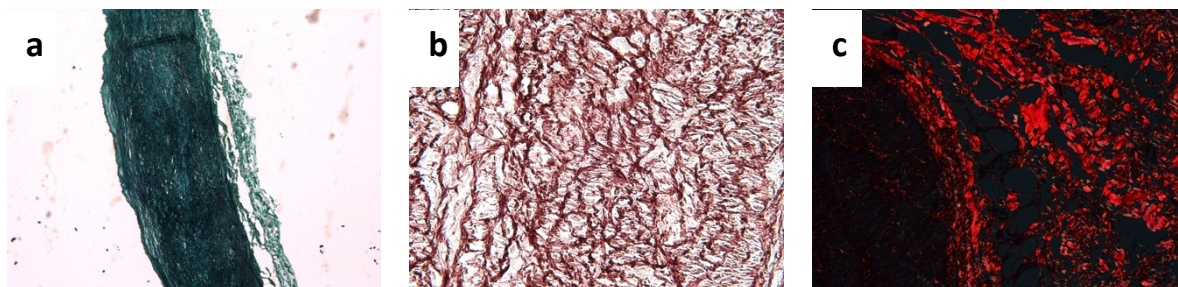
AASCH cíp



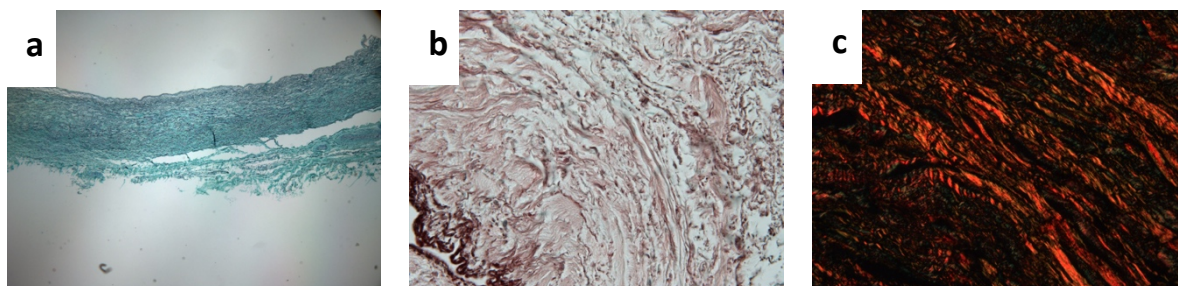
PASCH cíp



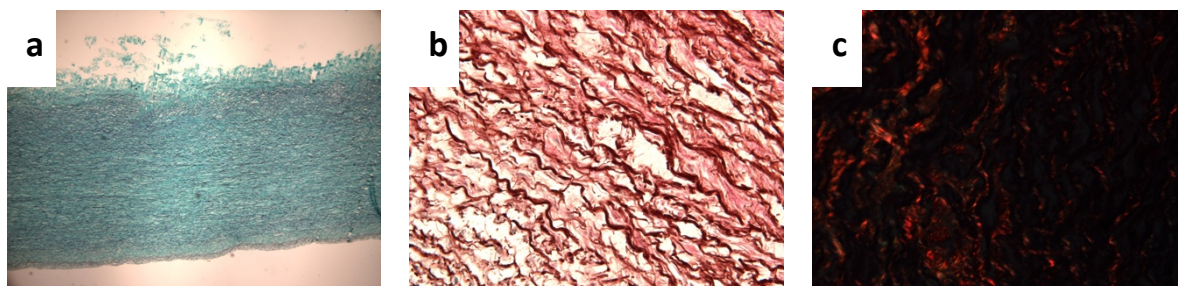
AASCH junkce



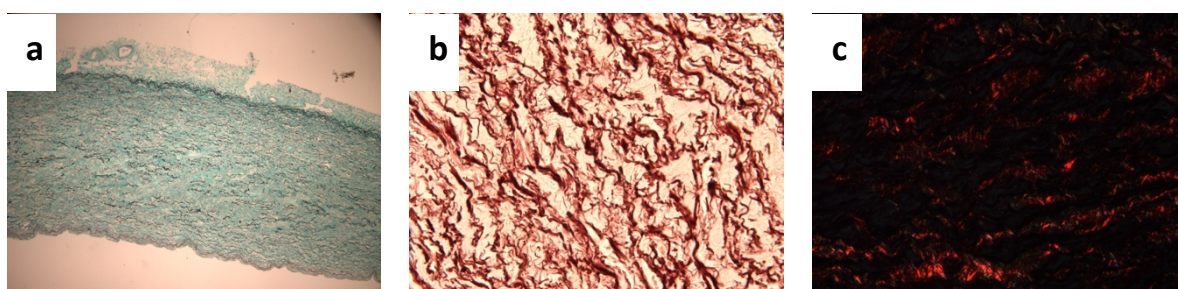
PASCH junkce



AASCH ring



PASCH ring



Mikrofotografie preparátů obarvených orceinem a picosirius red (v polarizovaném světle) (obr. 28 b, c) byly hodnoceny morfometricky pomocí bodové stereologické mřížky v počítačovém programu Ellipse (ViDiTo, Slovenská republika). Tloušťka stěny byla měřena z preparátů barvených Verhoeffovým hematoxylinem a zeleným trichromem (obr. 28 a). Počet

mikrofotografií pořízených na každý vzorek viz *tabulka 6* v metodické části. Získané hodnoty shrnuje *tabulka 12*.

Tab. 12: Morfologické vlastnosti aortálních a pulmonálních alograftů (ASCH) do 5 let kryoprezervace (skupina I), mediány hodnot s mezikvartilovým rozpětím. *n* = počet hodnocených mikrofotografií; *A_A* = plošný podíl v referenční ploše vzorku (area fraction); *MT* = tloušťka stěny

skupina I (kryo 0,1 - 4,9 let)	<i>A_A</i> (elastin)	<i>A_A</i> (kolagen I)	<i>MT</i> (μm)
aortální ASCH			
stěna (n=198)	0,43 (0,38-0,44)	0,18 (0,10-0,25)	1763,41 (1682,01-2116,60)
cíp (n=324)	0,14 (0,08-0,18)	0,38 (0,31-0,48)	540,52 (431,42-637,44)
junkce (n=162)	0,29 (0,22-0,35)	0,27 (0,17-0,32)	1209,07 (997,10-1395,08)
ring (n=162)	0,29 (0,28-0,32)	0,18 (0,09-0,30)	2392,56 (2130,70-2715,99)
pulmonální ASCH			
stěna (n=378)	0,36 (0,27-0,40)	0,18 (0,03-0,28)	1239,21 (1150,27-1701,19)
cíp (n=378)	0,12 (0,10-0,18)	0,32 (0,26-0,43)	427,91 (329,78-505,36)
junkce (n=216)	0,21 (0,14-0,29)	0,36 (0,06-0,43)	823,56 (687,78-888,51)
ring (n=216)	0,25 (0,23-0,30)	0,10 (0,06-0,12)	2001,53 (1875,50-2372,45)

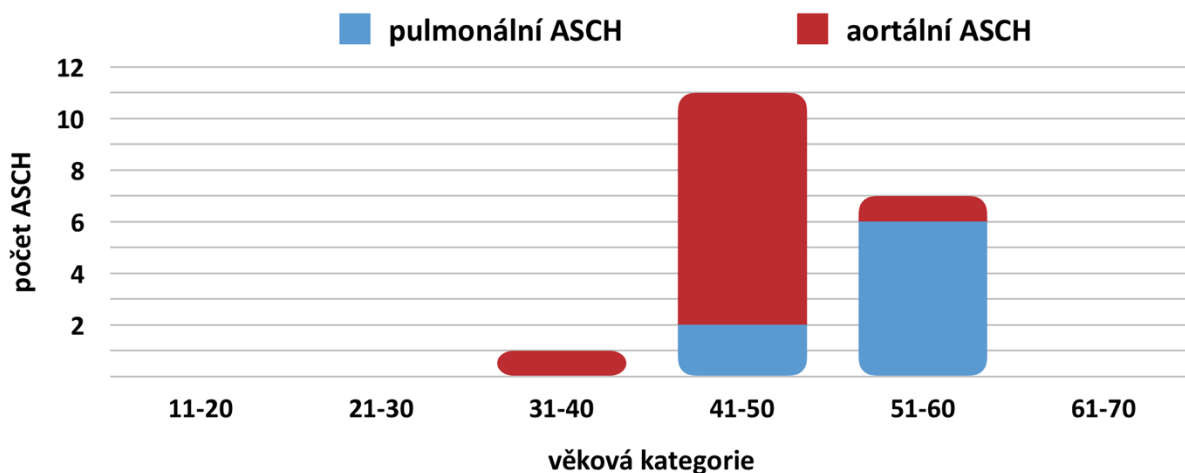
4.3. Mechanické a morfologické vlastnosti kryoprezervovaných ASCH skladovaných 5-9,9 let (skupina II)

Ve skupině II bylo zpracováno 19 alograftů srdečních chlopní, které byly získány standardním způsobem a technikou popsanou v metodické části, dekontaminovány antibiotickým roztokem v mediu E199, prošly procesem kryoprezervace, překročily arbitrárně stanovenou hranici 5 let skladování v tekuté fázi tekutého dusíku, ale nebyly uchovávány více než 9,9 let. Charakteristiky skupiny v *tabulce 13* a *grafech 5 a 6*.

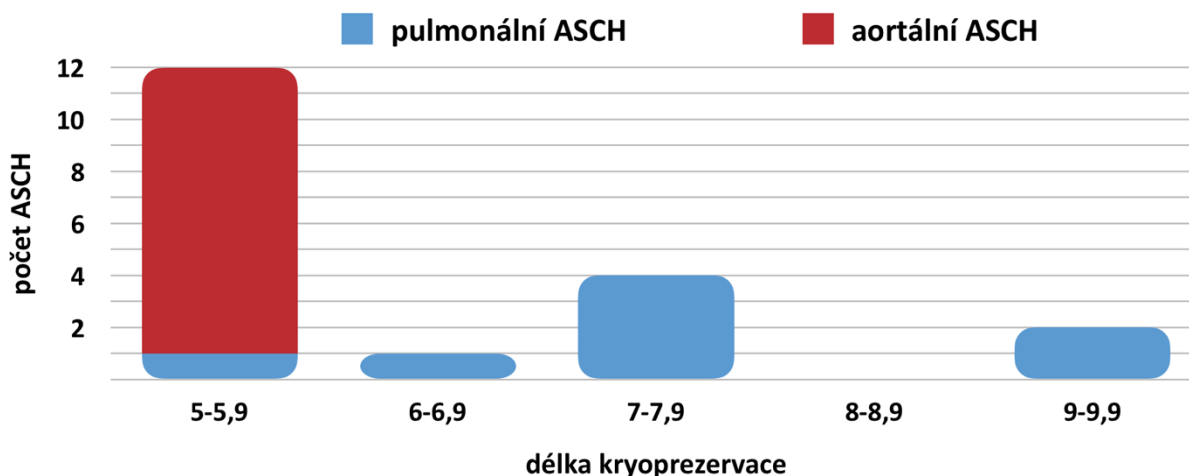
Tab.13: Charakteristiky skupiny alograftů srdečních chlopní s délkou kryoprezervace 5-9,9 let (skupina II). *n* = počet, *M* = muži, *Ž* = ženy, *IQR* = mezikvartilová šíře, *kryo* = kryoprezervace

skupina II (kryo 5 - 9,9 let)	<i>n</i>	pohlaví (M/Ž)	věk (roky) (medián, IQR)	kryo (roky) (medián, IQR)
aortální	11	2/9	45,64 (40,59-50,33)	5,26 (5,10-5,32)
pulmonální	8	3/5	53,36 (51,28-56,69)	7,48 (6,80-8,85)

Graf 5: Věkové rozložení dárců a zastoupení typů allogenních srdečních chlopní (ASCH) kryoprezervovaných 5-9,9 let (skupina II).



Graf 6: Charakteristika allogenních srdečních chlopní (ASCH) kryoprezervovaných 5-9,9 let (skupina II) podle délky kryoprezervace.



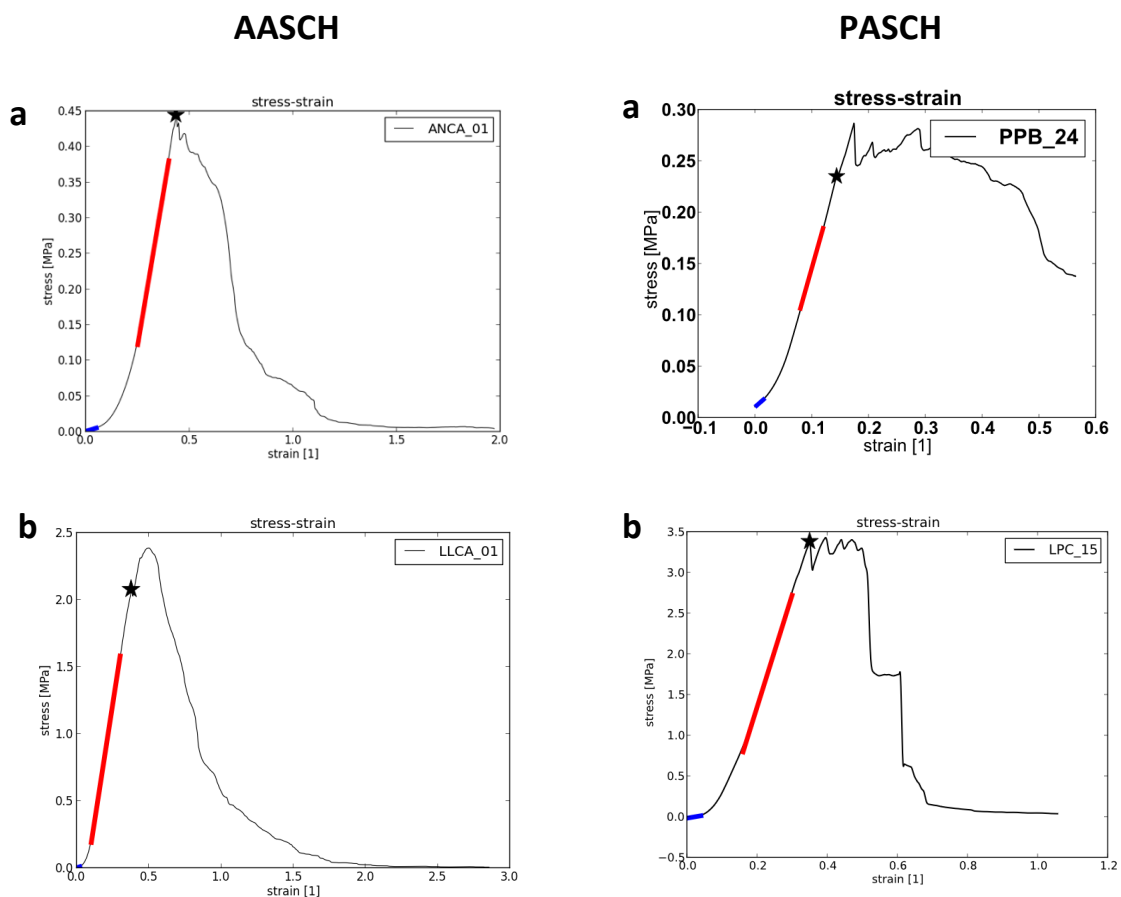
Ze všech ASCH skupiny II byly odebrány vzorky cípů, aortální stěny, ventrikulo-arteriální junkce a arteriálního ringu a podrobeny mechanické zkoušce na trakčním stroji při uniaxiálním zatížení. Výsledky měření mechanických parametrů jednotlivých vzorků ASCH získané trhačí zkouškou shrnuje *tabulka 14*. Ukázky deformačních křivek *obrázek 29*.

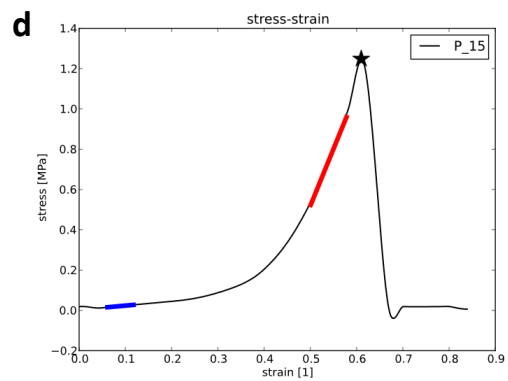
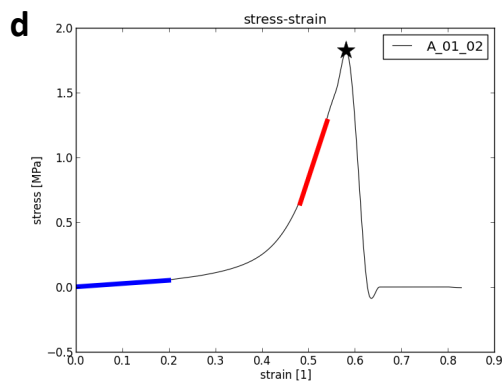
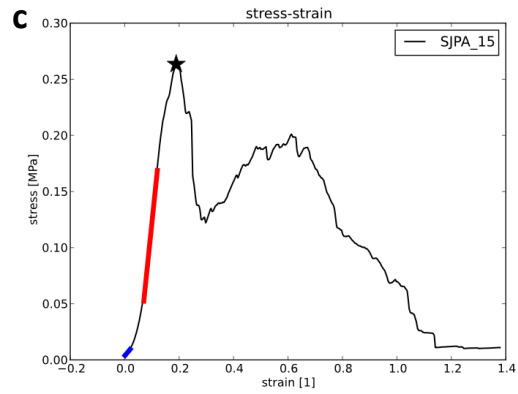
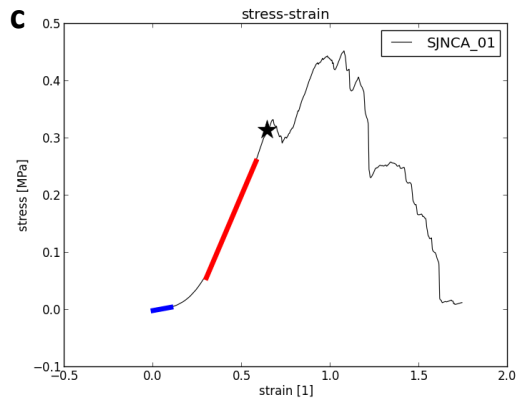
Tab. 14: Mechanické vlastnosti aortálních a pulmonálních alograftů (ASCH) kryoprezervovaných 5-9,9 let (skupina II), mediány hodnot s mezikvartilovým rozpětím. n = počet testovaných vzorků; E_0 a E_1 = Youngův model elasticity v malých, resp. velkých deformacích.

skupina II (kryo 5 - 9,9 let)	E_0 (MPa)	E_1 (MPa)	mezní deformace	mezní napětí (MPa)

aortální ASCH					
stěna	(n=26)	0,18 (0,13-0,25)	1,82 (1,19-4,34)	0,50 (0,47-0,59)	0,54 (0,36-1,03)
cíp	(n=21)	1,59 (0,80-4,04)	24,17 (16,63-34,72)	0,22 (0,16-0,31)	3,98 (3,04-4,24)
junkce	(n=11)	0,16 (0,09-0,24)	1,17 (1,00-1,27)	0,32 (0,26-0,43)	0,25 (0,18-0,31)
ring	(n=11)	0,17 (0,06-0,28)	10,48 (7,98-14,56)	0,65 (0,46-0,90)	1,66 (1,36-1,86)
pulmonální ASCH					
stěna	(n=10)	0,32 (0,20-0,49)	2,03 (1,18-3,04)	0,20 (0,15-0,25)	0,31 (0,19-0,46)
cíp	(n=16)	1,61 (0,71-6,77)	18,49 (8,59-34,02)	0,15 (0,12-0,31)	2,34 (1,08-4,38)
junkce	(n=8)	0,43 (0,18-0,83)	2,47 (1,47-4,08)	0,13 (0,12-0,18)	0,23 (0,17-0,38)
ring	(n=8)	0,22 (0,13-0,25)	5,32 (4,55-5,76)	0,36 (0,29-0,49)	0,70 (0,61-1,17)

Obr. 29: Vybrané ukázky nelineárních deformačních křivek pro různé typy vzorků aortálních a pulmonálních alograftů (AASCH, PASCH) kryoprezervovaných 5-9,9 let (skupina II), **a** – stěna tepny, **b** – cíp, **c** – ventrikuloarteriální junkce, **d** – ring. Oblast malých deformací označena modře, lineární oblast velkých deformací červeně, hvězdička označuje okamžik ruptury vzorku, ve kterém byly určovány mezní napětí a mezní deformace.

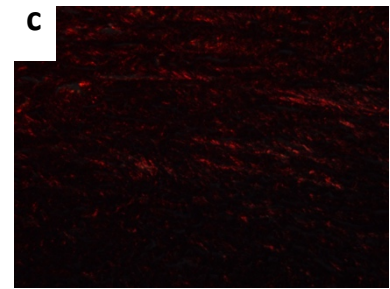
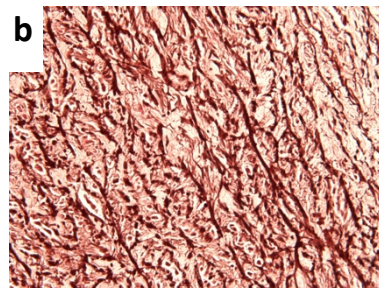
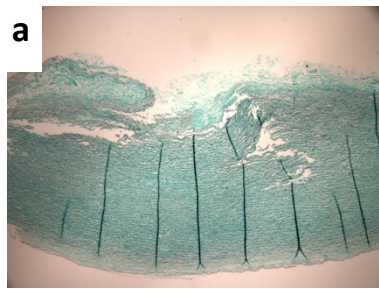




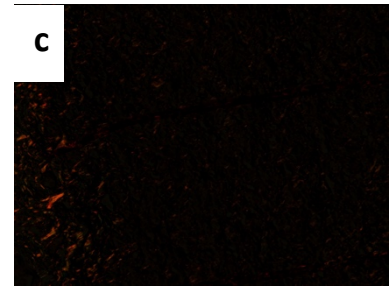
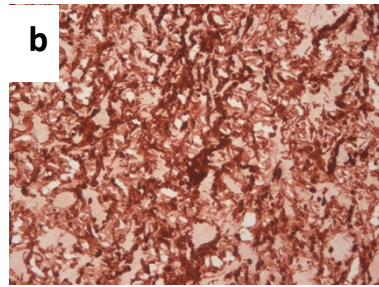
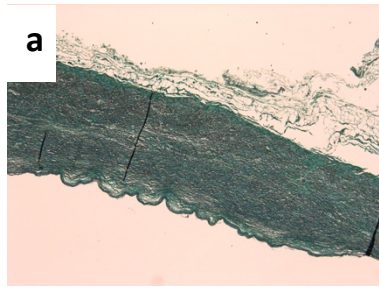
Tkáň bezprostředně sousedící se vzorky odebranými pro mechanické testování byla odstřižena, fixována 4 % pufovaným formalínem a odeslána k morfologickému hodnocení. Měření strukturálních vlastností předcházelo standardní histologické zpracování popsané v metodické části práce. K obarvení pojivové tkáně byl použit Verhoefův hematoxylin a zelený trichrom, ke zobrazení elastinu orcein a kolagenních vláken siriová červeň (picrosirius red) v polarizovaném světle (*obr. 30*).

Obr. 30: Vybrané ukázky mikrofotografií histologických preparátů ze vzorků arteriální stěny, cípu, ventrikuloarteriální junkce a ringu aortálních a pulmonálních alograftů (AASCH, PASCH) kryoprezervovaných 5-9,9 let (skupina II), **a** – Verhoeffův hematoxylin a zelený trichrom, zelená = kolagen I, černá = elastin; **b** – orcein, červenohnědá vlákna = elastin; **c** – picrosirius red v polarizovaném světle, červená vlákna = kolagen.

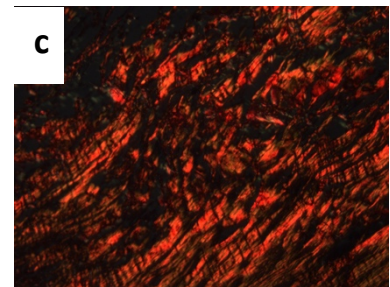
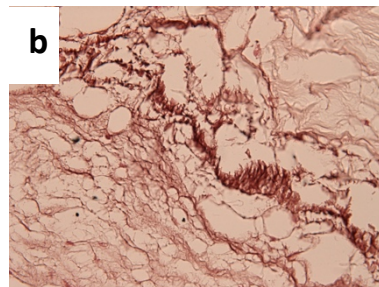
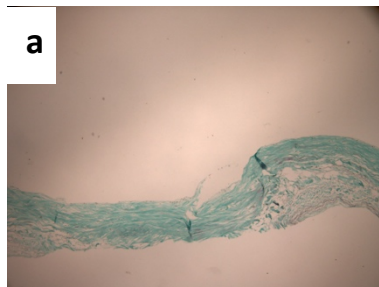
AASCH stěna



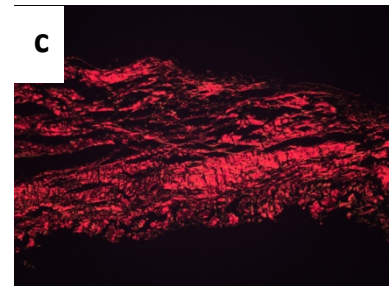
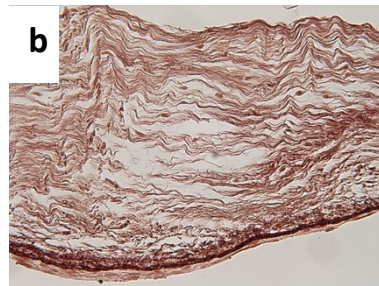
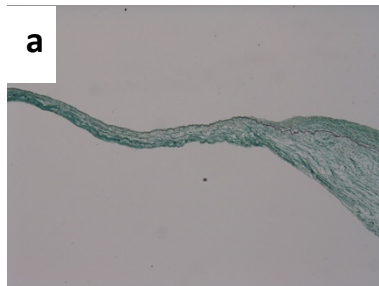
PASCH stěna



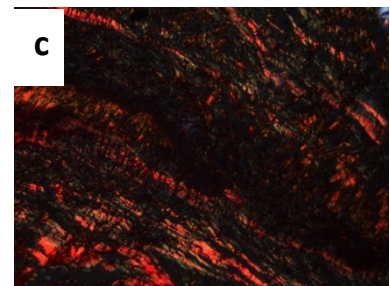
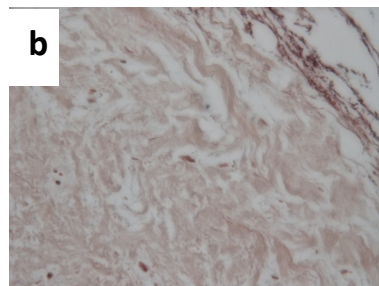
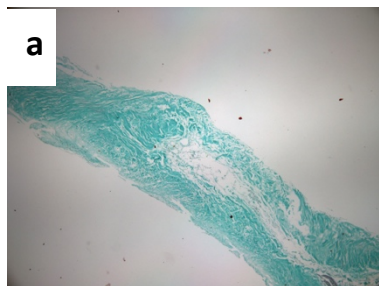
AASCH cíp



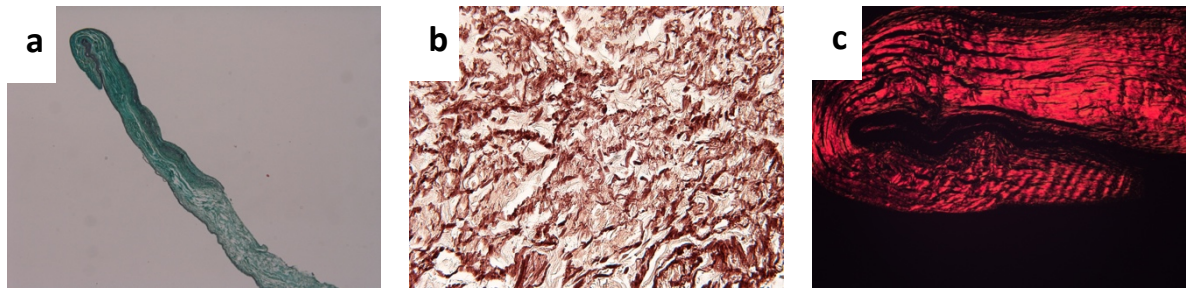
PASCH cíp



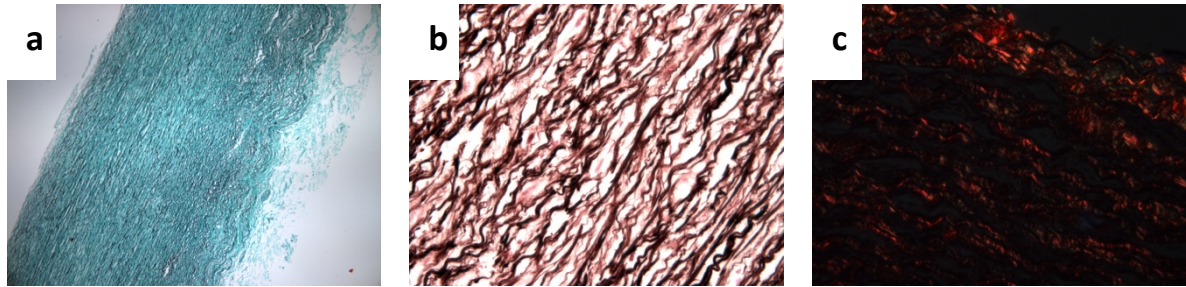
AASCH junkce



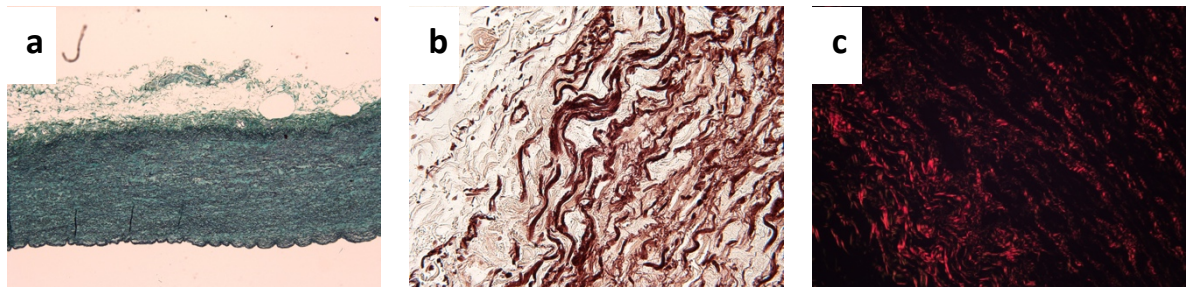
PASCH junkce



AASCH ring



PASCH ring



Mikrofotografie preparátů obarvených orceinem a picrosirius red (v polarizovaném světle) (obr. 30 b, c) byly hodnoceny morfometricky pomocí bodové stereologické mřížky v počítačovém programu Ellipse (ViDiTo, Slovenská republika). Tloušťka stěny byla měřena z preparátů barvených Verhoeffovým hematoxylinem a zeleným trichromem (obr. 30 a). Počet mikrofotografií pořízených na každý vzorek viz *tabulka 6* v metodické části. Získané hodnoty shrnuje *tabulka 15*.

Tab. 15: Morfologické vlastnosti aortálních a pulmonálních alograftů (ASCH) kryoprezervovaných 5-9,9 let (skupina II), mediány hodnot s mezikvartilovým rozpětím. n = počet hodnocených mikrofotografií; A_A = plošný podíl v referenční ploše vzorku (area fraction); MT = tloušťka stěny

skupina II (kryo 5 - 9,9 let)	A _A (elastin)	A _A (kolagen I)	MT (μm)
aortální ASCH			
stěna (n=468)	0,45 (0,40-0,49)	0,03 (0,01-0,11)	1914,17 (1638,27-2207,02)
cíp (n=378)	0,11 (0,08-0,16)	0,27 (0,12-0,41)	501,00 (365,00-668,00)
junkce (n=198)	0,29 (0,25-0,34)	0,13 (0,06-0,40)	1052,06 (897,63-1370,51)
ring (n=198)	0,31 (0,28-0,38)	0,09 (0,02-0,16)	2506,09 (2373,90-2809,87)
pulmonální ASCH			
stěna (n=180)	0,40 (0,37-0,43)	0,03 (0,02-0,07)	1370,92 (1160,06-1606,94)
cíp (n=288)	0,13 (0,09-0,16)	0,36 (0,17-0,43)	325,72 (248,00-416,00)
junkce (n=144)	0,24 (0,22-0,25)	0,08 (0,07-0,27)	819,95 (657,74-892,81)
ring (n=144)	0,26 (0,24-0,32)	0,03 (0,02-0,12)	1789,18 (1695,91-2055,53)

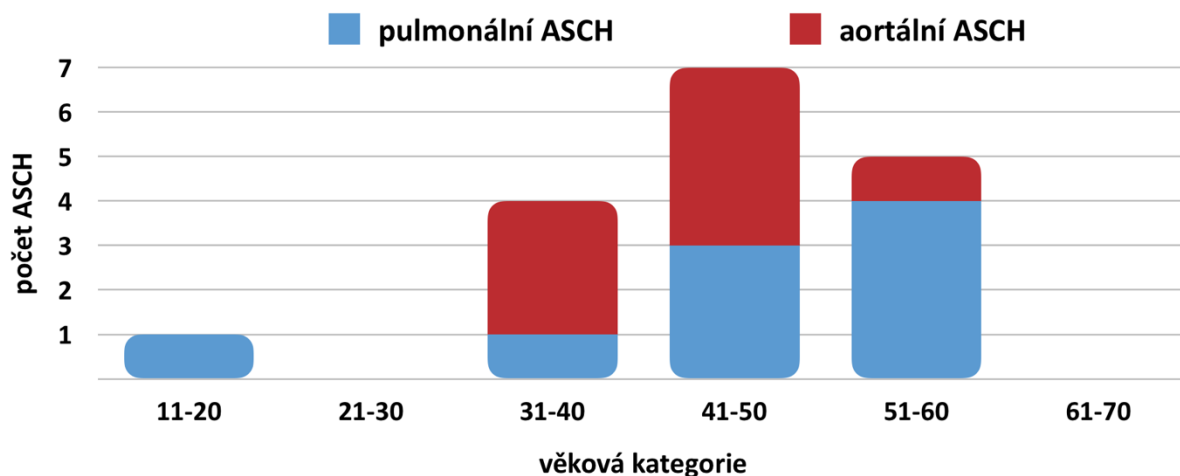
4.4. Mechanické a morfologické vlastnosti kryoprezervovaných ASCH skladovaných 10 a více let (skupina III)

Ve skupině III bylo zpracováno 17 alograftů srdečních chlopní, které byly získány standardním způsobem a technikou popsanou v metodické části, dekontaminovány antibiotickým roztokem v mediu E199, prošly procesem kryoprezervace a byly skladovány v tekuté fázi tekutého dusíku po dobu 10 let a déle. Charakteristiky skupiny v *tabulce 16* a *grafech 7 a 8*.

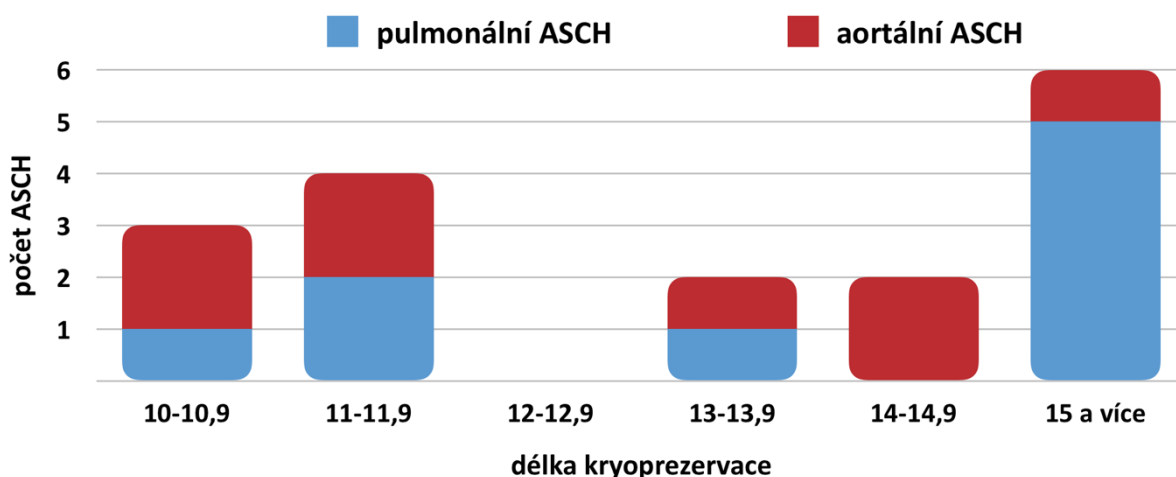
Tab. 16: Charakteristiky skupiny alograftů srdečních chlopní s délkou kryoprezervace 10 a více let (skupina III). n = počet, M = muži, Ž = ženy, IQR = mezikvartilová šíře, kryo = kryoprezervace

skupina III (kryo 10 a více let)	n	pohlaví (M/Ž)	věk (roky) (medián, IQR)	kryo (roky) (medián, IQR)
aortální	8	3/5	44,36 (35,43-47,37)	12,74 (10,51-14,45)
pulmonální	9	5/4	46,66 (38,91-53,79)	15,21 (11,81-17,28)

Graf 7: Věkové rozložení dárců a zastoupení typů allogenních srdečních chlopní (ASCH) kryoprezervovaných 10 a více let (skupina III).



Graf 8: Charakteristika allogenních srdečních chlopní (ASCH) kryoprezervovaných 10 a více let (skupina III) podle délky kryoprezervace.

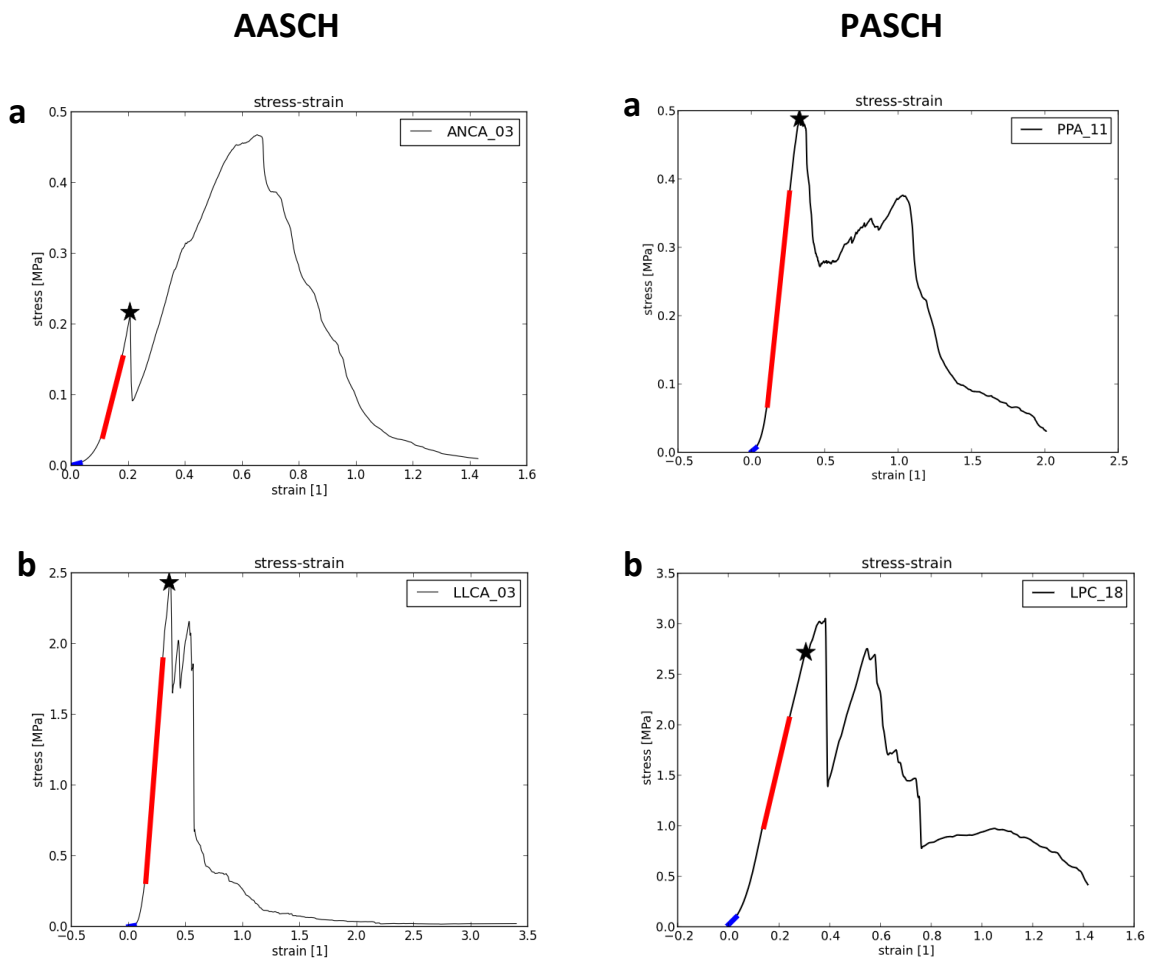


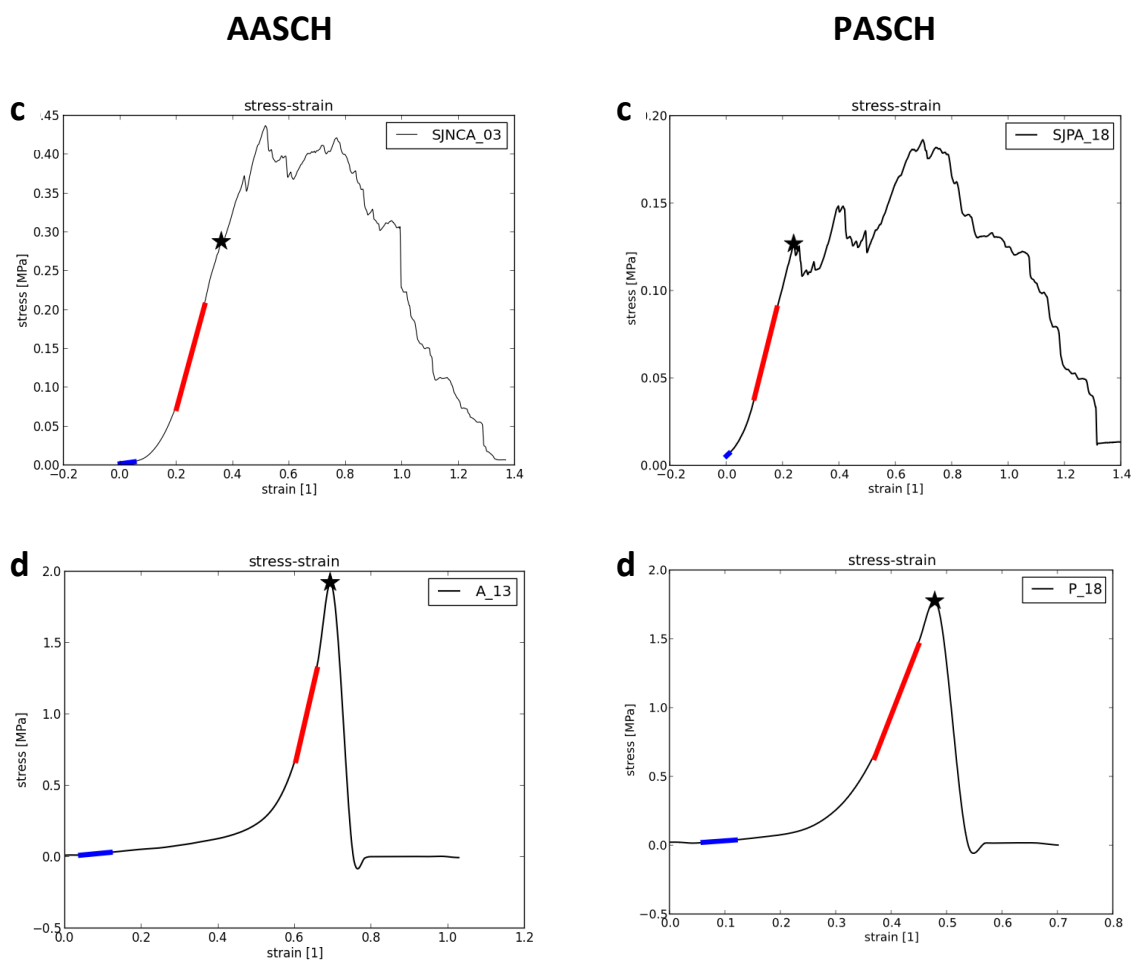
Ze všech ASCH skupiny III byly odebrány vzorky cípů, aortální stěny, ventrikulo-arteriální junkce a arteriálního ringu a podrobeny mechanické zkoušce na trakčním stroji při uniaxiálním zatížení. Výsledky měření mechanických parametrů jednotlivých vzorků ASCH získané trhací zkouškou shrnuje *tabulka 17*. Ukázky deformačních křivek *obrázek 31*.

Tab. 17: Mechanické vlastnosti aortálních a pulmonálních alograftů (ASCH) kryoprezervovaných 10 a více let (skupina III), mediány hodnot s mezikvartilovým rozpětím. n = počet testovaných vzorků; E_0 a E_1 = Youngův model elasticity v malých, resp. velkých deformacích.

skupina III (kryo 10 a více let)	E_0 (MPa)	E_1 (MPa)	mezní deformace	mezní napětí (MPa)
aortální ASCH				
stěna (n=6)	0,10 (0,06-0,12)	1,26 (0,44-1,59)	0,38 (0,31-0,72)	0,16 (0,05-0,50)
cíp (n=16)	1,16 (0,20-2,15)	13,02 (10,16-22,38)	0,34 (0,27-0,40)	3,32 (2,33-4,75)
junkce (n=8)	0,10 (0,07-0,18)	0,93 (0,80-1,32)	0,45 (0,38-0,56)	0,28 (0,25-0,41)
ring (n=8)	0,24 (0,20-0,27)	11,67 (10,90-12,18)	0,72 (0,56-0,88)	2,04 (1,74-2,29)
pulmonální ASCH				
stěna (n=11)	0,14 (0,05-0,22)	1,23 (1,10-2,07)	0,41 (0,33-0,48)	0,39 (0,34-0,42)
cíp (n=14)	2,12 (0,59-7,32)	22,66 (12,32-43,74)	0,29 (0,17-0,37)	4,69 (3,00-5,50)
junkce (n=9)	0,22 (0,15-0,31)	1,30 (0,64-1,53)	0,25 (0,22-0,33)	0,20 (0,13-0,29)
ring (n=8)	0,20 (0,13-0,30)	5,43 (3,92-7,61)	0,51 (0,50-0,58)	0,97 (0,74-1,46)

Obr. 31: Vybrané ukázky nelineárních deformačních křivek pro různé typy vzorků aortálních a pulmonálních alograftů (AASCH, PASCH) kryoprezervovaných 10 a více let (skupina III), **a** – stěna tepny, **b** – cíp, **c** – ventrikuloarteriální junkce, **d** – ring. Oblast malých deformací označena modře, lineární oblast velkých deformací červeně, hvězdička označuje okamžik ruptury vzorku, ve kterém byly určovány mezní napětí a mezní deformace.

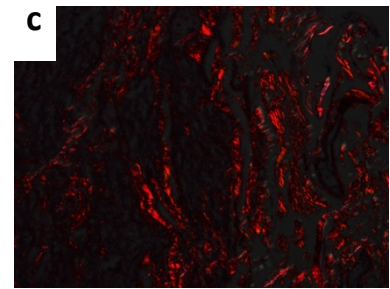
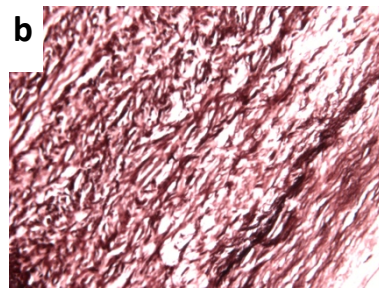
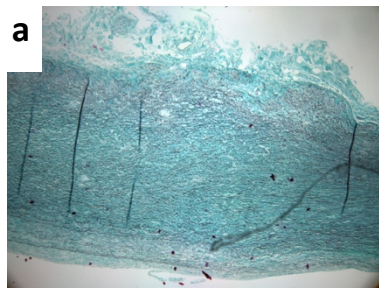




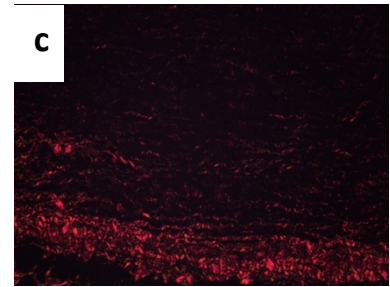
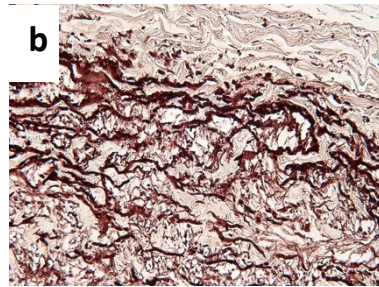
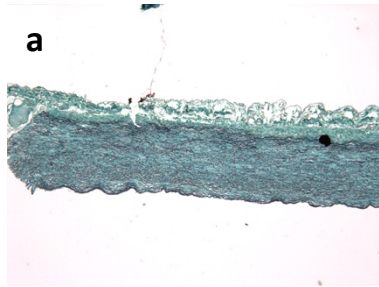
Tkáň bezprostředně sousedící se vzorky odebranými pro mechanické testování byla odstřižena, fixována 4 % pufovaným formalinem a odeslána k morfologickému hodnocení. Měření strukturálních vlastností předcházelo standardní histologické zpracování popsané v metodické části práce. K obarvení pojivové tkáně byl použit Verhoefův hematoxylin a zelený trichrom, ke zobrazení elastinu orcein a kolagenních vláken siriová červeň (picrosirius red) v polarizovaném světle (*obr. 32*).

Obr. 32: Vybrané ukázky mikrofotografií histologických preparátů ze vzorků arteriální stěny, cípu, ventrikuloarteriální junkce a ringu aortálních a pulmonálních alograftů (AASCH, PASCH) kryoprezervovaných 10 a více let (skupina III), **a** – Verhoeffův hematoxylin a zelený trichrom, zelená = kolagen I, černá = elastin; **b** – orcein, červenohnědá vlákna = elastin; **c** – picrosirius red v polarizovaném světle, červená vlákna = kolagen.

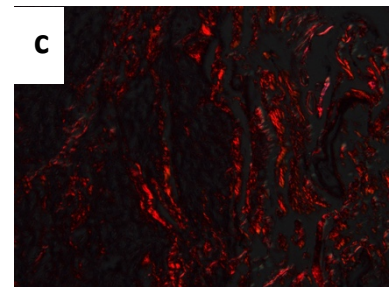
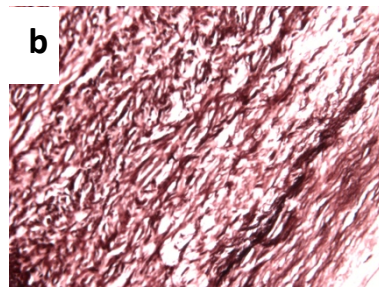
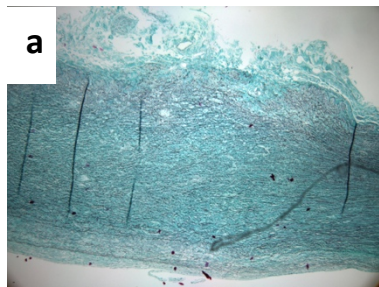
AASCH stěna



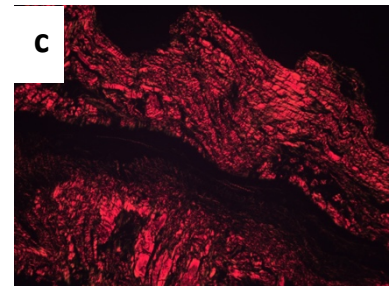
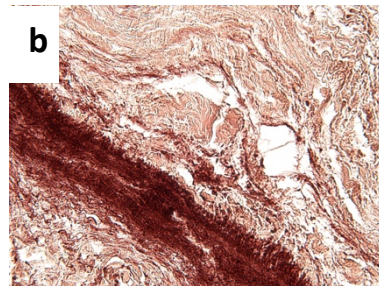
PASCH stěna



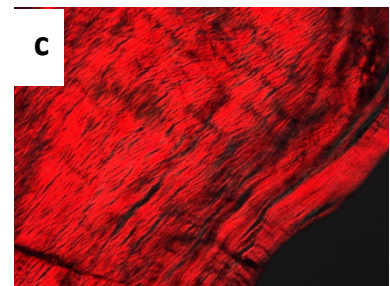
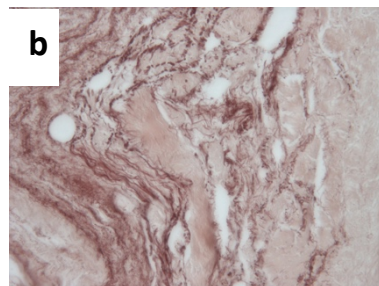
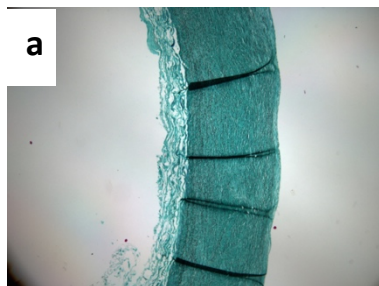
AASCH cíp



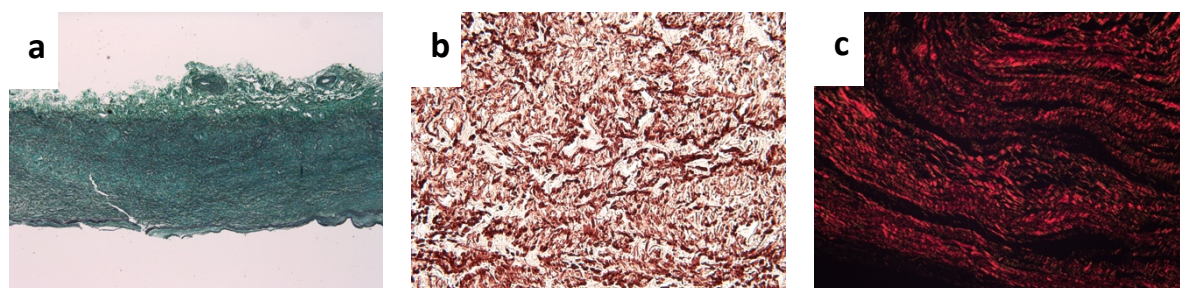
PASCH cíp



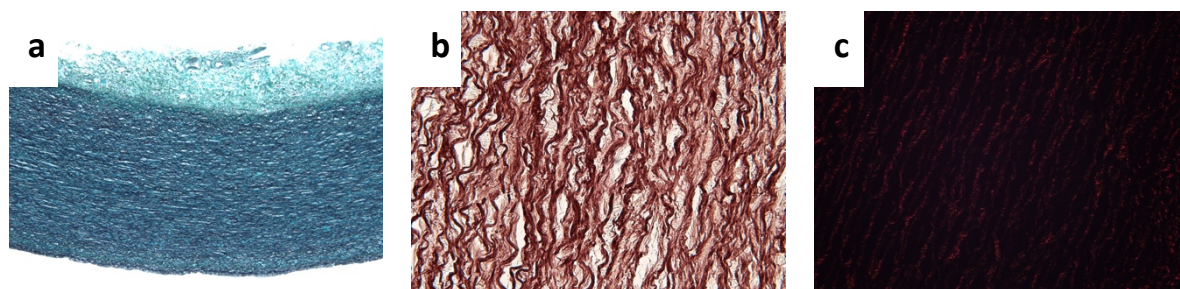
AASCH junkce



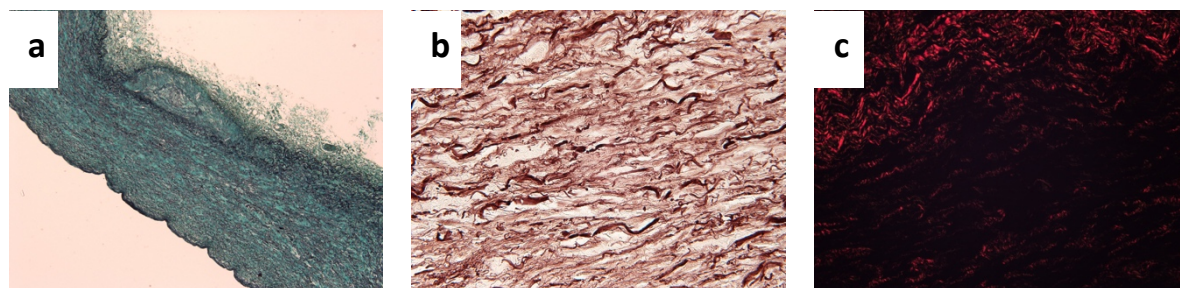
PASCH junkce



AASCH ring



PASCH ring



Mikrofotografie preparátů obarvených orceinem a picrosirius red (v polarizovaném světle) (obr. 32 b, c) byly hodnoceny morfometricky pomocí bodové stereologické mřížky v počítačovém programu Ellipse (ViDiTo, Slovenská republika). Tloušťka stěny byla měřena z preparátů barvených Verhoeffovým hematoxylinem a zeleným trichromem (obr. 32 a). Počet mikrofotografií pořízených na každý vzorek viz *tabulka 6* v metodické části. Získané hodnoty shrnuje *tabulka 18*.

Tab. 18: Morfologické vlastnosti aortálních a pulmonálních alograftů (ASCH) kryoprezervovaných 10 a více let (skupina III), mediány hodnot s mezikvartilovým rozpětím. n = počet hodnocených mikrofotografií; A_A = plošný podíl v referenční ploše vzorku (area fraction); MT = tloušťka stěny

skupina III (kryo 10 a více let)	A_A (elastin)	A_A (kolagen I)	MT (μm)
aortální ASCH			
stěna (n=108)	0,44 (0,41-0,50)	0,12 (0,08-0,33)	2230,03 (1717,23-2803,79)
cíp (n=288)	0,18 (0,13-0,22)	0,48 (0,41-0,58)	506,69 (470,34-602,42)
junkce (n=144)	0,33 (0,25-0,40)	0,32 (0,25-0,37)	1081,31 (896,78-1191,41)
ring (n=144)	0,38 (0,34-0,41)	0,26 (0,21-0,29)	2446,10 (2263,35-2684,25)
pulmonální ASCH			
stěna (n=198)	0,41 (0,34-0,42)	0,14 (0,07-0,17)	1005,53 (852,56-1395,19)
cíp (n=252)	0,10 (0,08-0,27)	0,31 (0,18-0,39)	382,50 (287,00-454,51)
junkce (n=162)	0,25 (0,25-0,29)	0,24 (0,10-0,33)	868,60 (822,42-1098,59)
ring (n=144)	0,28 (0,26-0,30)	0,13 (0,09-0,18)	1801,81 (1522,19-2255,53)

4.5. Srovnání mechanických a morfologických vlastností ASCH v závislosti na délce kryoprezervace

4.5.1. Aortální ASCH

Mechanické a strukturální parametry vzorků aortálních ASCH uvedené a podrobněji dokumentované v předchozích kapitolách jsou přehledně shrnuty v *tabulce 19*.

Tab. 19: Mechanické a strukturální vlastnosti aortálních alograftů srdečních chlopní (ASCH) v různých skupinách dle délky kryoprezervace. Mediány hodnot (mezikvartilové rozpětí). E_0 a E_1 – Youngův modul elasticity pro malé, resp. velké deformace; A_A – area fraction; MT – medium thickness; skupina 0 = čerstvé, skupina I = kryoprezervované do 4,9 let, skupina II = kryoprezervované 5 až 9,9 let, skupina III = kryoprezervované 10 a více let.

aortální ASCH	skupina 0	skupina I	skupina II	skupina III
E_0 (MPa)				
stěna	0,24 (0,08-0,34)	0,34 (0,16-1,54)	0,18 (0,13-0,25)	0,10 (0,06-0,12)
cíp	0,87 (0,46-2,56)	2,33 (0,69-4,99)	1,59 (0,80-4,04)	1,16 (0,20-2,15)
junkce	0,29 (0,07-0,38)	0,23 (0,22-0,85)	0,16 (0,09-0,24)	0,10 (0,07-0,18)
ring	0,23 (0,22-0,26)	0,18 (0,14-0,23)	0,17 (0,06-0,28)	0,24 (0,20-0,27)
E_1 (MPa)				
stěna	2,31 (1,01-3,97)	3,94 (1,28-9,95)	1,82 (1,19-4,34)	1,26 (0,44-1,59)
cíp	20,53 (15,77-47,35)	19,55 (12,61-29,01)	24,17 (16,63-34,72)	13,02 (10,16-22,38)
junkce	0,84 (0,58-1,80)	2,21 (0,86-2,85)	1,17 (1,00-1,27)	0,93 (0,80-1,32)
ring	16,85 (9,48-20,84)	13,84 (11,64-14,50)	10,48 (7,98-14,56)	11,67 (10,90-12,18)
mezní deformace				
stěna	0,36 (0,21-0,45)	0,45 (0,35-0,67)	0,50 (0,47-0,59)	0,38 (0,31-0,72)
cíp	0,19 (0,17-0,29)	0,33 (0,20-0,37)	0,22 (0,16-0,31)	0,34 (0,27-0,40)
junkce	0,25 (0,13-0,56)	0,43 (0,23-0,51)	0,32 (0,26-0,43)	0,45 (0,38-0,56)
ring	0,57 (0,43-0,77)	0,55 (0,50-0,68)	0,65 (0,46-0,90)	0,72 (0,56-0,88)

mezní napětí (MPa)				
stěna	0,49 (0,30-0,60)	0,83 (0,37-5,69)	0,54 (0,36-1,03)	0,16 (0,05-0,50)
cíp	3,38 (2,22-4,14)	4,76 (2,34-8,13)	3,98 (3,04-4,24)	3,32 (2,33-4,75)
junkce	0,18 (0,16-0,22)	0,34 (0,31-0,48)	0,25 (0,18-0,31)	0,28 (0,25-0,41)
ring	1,21 (1,08-1,55)	1,62 (1,39-2,07)	1,66 (1,36-1,86)	2,04 (1,74-2,29)
A _A (elastin)				
stěna	0,47 (0,46-0,60)	0,43 (0,38-0,44)	0,45 (0,40-0,49)	0,44 (0,41-0,50)
cíp	0,15 (0,11-0,16)	0,14 (0,08-0,18)	0,11 (0,08-0,16)	0,18 (0,13-0,22)
junkce	0,23 (0,20-0,30)	0,29 (0,22-0,35)	0,29 (0,25-0,34)	0,33 (0,25-0,40)
ring	0,33 (0,29-0,37)	0,29 (0,28-0,32)	0,31 (0,28-0,38)	0,38 (0,34-0,41)
A _A (kolagen)				
stěna	0,07 (0,02-0,18)	0,18 (0,10-0,25)	0,03 (0,01-0,11)	0,12 (0,08-0,33)
cíp	0,21 (0,13-0,33)	0,38 (0,31-0,48)	0,27 (0,12-0,41)	0,48 (0,41-0,58)
junkce	0,12 (0,11-0,29)	0,27 (0,17-0,32)	0,13 (0,06-0,40)	0,32 (0,25-0,37)
ring	0,16 (0,042-0,21)	0,18 (0,09-0,30)	0,09 (0,02-0,16)	0,26 (0,21-0,29)
MT (μm)				
stěna	1941,14 (1681,14-2137,03)	1763,41 (1682,01-2116,60)	1914,17 (1638,27-2207,02)	2230,03 (1717,23-2803,79)
cíp	479,33 (417,00-540,00)	540,52 (431,42-637,44)	501,00 (365,00-668,00)	506,69 (470,34-602,42)
junkce	911,18 (702,89-1458,44)	1209,07 (997,10-1395,08)	1052,06 (897,63-1370,51)	1081,31 (896,78-1191,41)
ring	2477,20 (2296,62-2507,08)	2001,53 (1875,50-2372,45)	2506,09 (2373,90-2809,87)	2446,10 (2263,35-2684,25)

Rozdílnost zkoumaných parametrů mezi skupinami dle délky kryoprezervace (0-III) byla analyzována Kruskal-Wallisovým ANOVA testem s hladinou významnosti $p=0,05$.

Mezi vzorky odebranými z aortálních ASCH byly nalezeny statisticky významné rozdíly v Youngově modulu elasticity pro malé deformace (E_0), mezního napětí a zastoupení kolagenu u aortálních stěn. U vzorků aortálních cípů byly významné rozdíly zjištěny v mezní deformaci a zastoupení kolagenu. Ventrikulo-arteriální junkce se významně lišily pouze v mezním napětí. U vzorků aortálních ringů nebyly zachyceny žádné rozdíly. Výsledky statistického zpracování jsou shrnuty v *tabulce 20*.

Tab. 20: Analýza rozdílů ve sledovaných parametrech aortálních alograftů srdečních chlopní ve skupinách dle délky kryoprezervace (skupina 0-III) Kruskal-Wallisovým ANOVA testem. E_0 a E_1 – Youngův modul elasticity pro malé, resp. velké deformace; A_A plošný podíl v referenční ploše vzorku (area fraction); MT – tloušťka stěny; n.s. = není signifikantní.

	E_0	E_1	mezní deformace	mezní napětí	A_A (elastin)	A_A (kolagen I)	MT
stěna	$p < 0,01$	n.s.	n.s.	$p = 0,020$	n.s.	$p = 0,046$	n.s.
cíp	n.s.	n.s.	$p < 0,01$	n.s.	n.s.	$p < 0,01$	n.s.

junkce	n.s.	n.s.	n.s.	p = 0,018	n.s.	n.s.	n.s.
ring	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Rozdíly mezi jednotlivými skupinami (0-I, 0-II, 0-III, I-II, I-III, II-III) byly testovány Mann-Whitneyho U testem. Výsledky v tabulce 21.

Tab. 21: Analýza rozdílů ve sledovaných parametrech mezi jednotlivými skupinami aortálních alograftů srdečních chlopní (ASCH) dle délky kryoprezervace (0-I, 0-II, 0-III, I-II, I-III, II-III) pomocí Mann-Whitneyho U testu. 0 = čerstvé ASCH; I = ASCH kryoprezervované do 5 let; II = ASCH kryoprezervované 5-9,9 let; III = ASCH kryoprezervované 10 a více let; E_0 a E_1 = Youngův modul elasticity pro malé, resp. velké deformace; A_A = plošný podíl v referenční ploše vzorku (area fraction); MT = tloušťka stěny; n.s. = není signifikantní.

aortální ASCH	0-I	0-II	0-III	I-II	I-III	II-III
stěna						
E_0	n.s.	n.s.	n.s.	p = 0,030	p < 0,01	p < 0,01
E_1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
mezní deformace	n.s.	p = 0,031	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
mezní napětí	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p < 0,01	p = 0,015
A_A (elastin)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
A_A (kolagen I)	n.s.	n.s.	n.s.	p = 0,030	n.s.	p = 0,023
MT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
cíp						
E_0	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p = 0,044	n.s.
E_1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
mezní deformace	n.s.	n.s.	p = 0,025	p = 0,041	n.s.	p < 0,01
mezní napětí	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
A_A (elastin)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p = 0,014
A_A (kolagen I)	n.s.	n.s.	p = 0,020	n.s.	p = 0,031	p < 0,01
MT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
junkce						
E_0	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p < 0,01	n.s.
E_1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
mezní deformace	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
mezní napětí	p = 0,016	n.s.	n.s.	p = 0,019	n.s.	n.s.
A_A (elastin)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
A_A (kolagen I)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
MT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
ring						
E_0	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
E_1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
mezní deformace	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
mezní napětí	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
A_A (elastin)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p = 0,018	n.s.
A_A (kolagen I)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p = 0,015
MT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Žádný ze vzorků čerstvých (skupina 0) a kryoprezervovaných (skupiny I, II a III) aortálních ASCH se při srovnání jednotlivých skupin nelišil v Youngově modulu pro malé (E_0) ani velké (E_1)

deformace. Proces kryoprezervace ani jeho délka tedy významně neovlivnily tuhost ASCH. Změny v E_0 ukázaly, že ASCH jsou v prvních 5 letech kryoprezervace tužší než ASCH skladované delší dobu.

Mezní deformace (deformace v okamžiku vzniku trhliny vzorku) se lišila pouze mezi skupinami 0-II pro aortální stěny a 0-III pro aortální cípy. Medián hodnot mezní deformace cípů ASCH skladovaných déle než 5 let (skupina II) byl nižší, ale neklesl pod výchozí hodnoty naměřené u cípů čerstvých ASCH (skupina 0). Cípy aortálních ASCH skladovaných 10 a více let (skupina III) vykazovaly vyšší hodnoty mezní deformace než cípy ASCH skladovaných 5-9,9 let (skupina II).

Pevnost vzorků aortálních ASCH odvozená od jejich schopnosti odolávat vyššímu napětí před tím, než dojde k jejich prasknutí (mezní napětí) byla vyšší u všech kryoprezervovaných vzorků.

U žádného vzorku skladovaného méně než 10 let (skupiny 0, I a II) nebyl zachycen rozdíl v zastoupení elastinu.

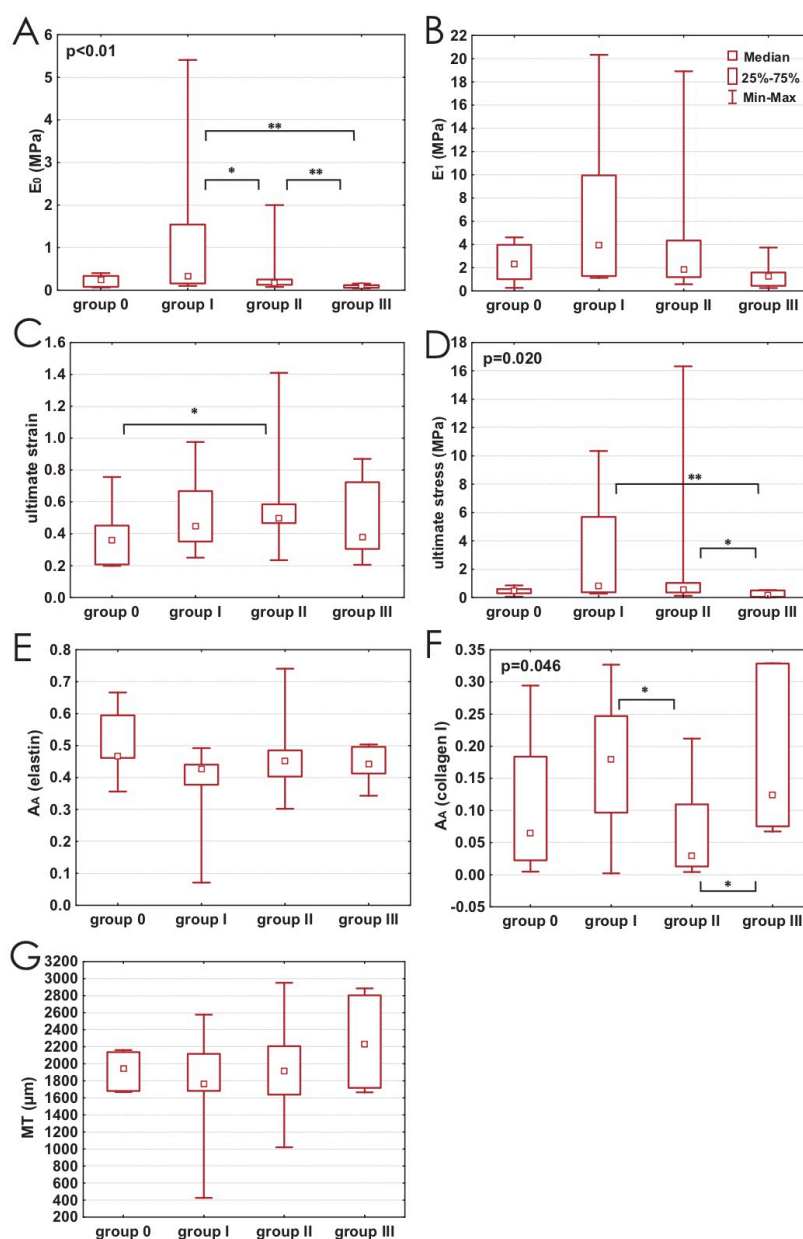
Množství vláken kolagenu typu I se nelišilo mezi čerstvými a kryoprezervovanými ASCH do 10 let skladování (skupiny 0, I a II), s výjimkou rozdílu pozorovaného mezi skupinami I a II u vzorků aortálních stěn, kdy stěny ASCH kryoprezervovaných 5-9,9 let (skupina II) vykazovaly větší podíl kolagenu typu I než ASCH do 5 let kryoprezervace (skupina I).

V tloušťce stěny (MT) nebyly nalezeny žádné rozdíly mezi skupinami.

Srovnání všech parametrů jednotlivých vzorků rozdělených do skupin podle délky kryoprezervace (0-III) přehledně v *grafech 9-12*.

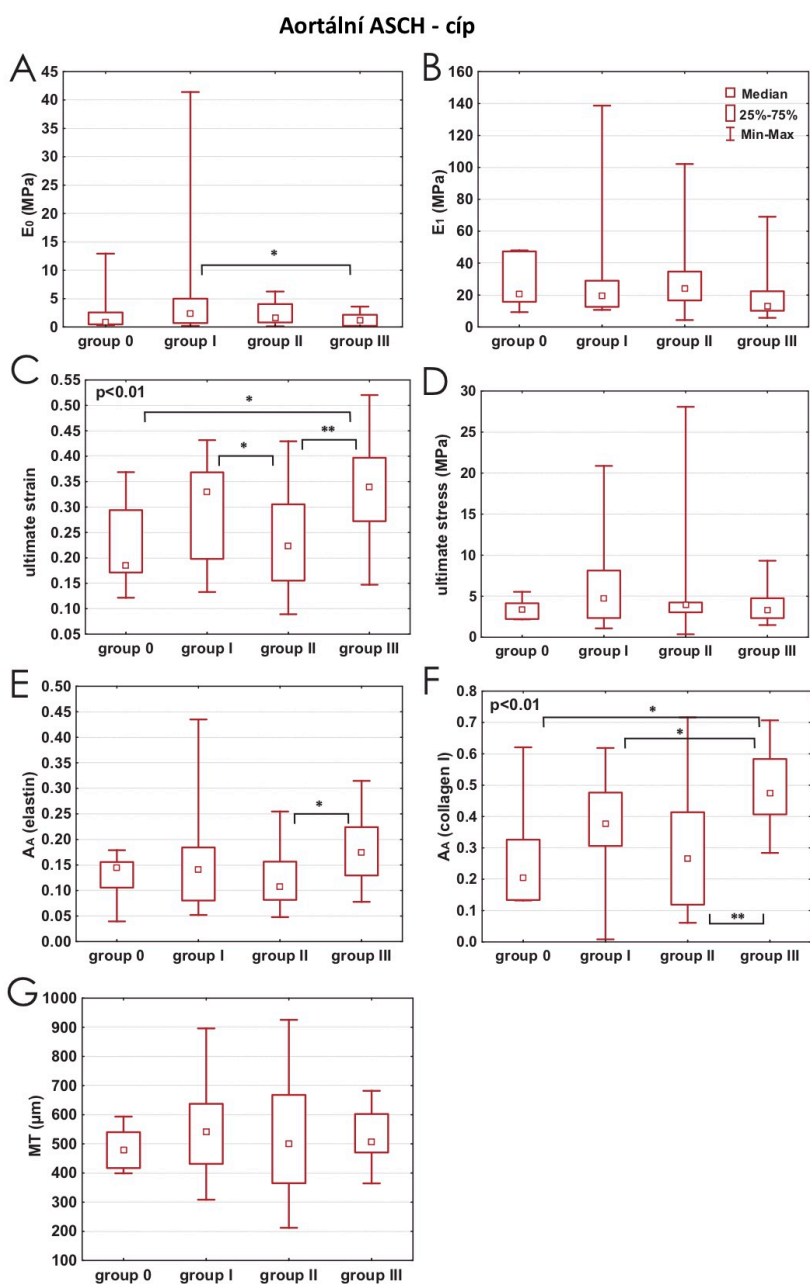
Graf 9: Srovnání mechanických a strukturálních parametrů vzorků tepenné stěny aortálních alograftů srdečních chlopní (ASCH) ve skupinách dle délky kryoprezervace (group 0-III): **A** – Youngův modul pro malé deformace (E_0); **B** – Youngův modul pro velké deformace (E_1); **C** – mezní deformace (ultimate strain); **D** – mezní napětí (ultimate stress); **E** – plošný podíl elastinu v referenční ploše vzorku (A_A (elastin)); **F** – plošný podíl kolagenu I v referenční ploše vzorku (A_A (collagen I)); **G** – tloušťka stěny (MT). Krabicové grafy s čtverečkem uvnitř označujícím polohu mediánu, obdélník grafu určuje polohu dolního a horního kvartilu, výběžky vymezují minimum a maximum naměřených hodnot. Hodnoty p označují významné rozdíly v Kruskal-Wallisově ANOVA testu a svorky spojují skupiny významně se lišící dle Mann-Whitneyho U testu * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Z grafu je patrný signifikantní rozdíl mezi skupinami I-II, I-III a II-III v E_0 a naopak žádný rozdíl v E_1 . Mezní deformace se liší mezi skupinami 0-II, mezní napětí mezi skupinami I-III a II-III. A_A (kolagen I) se liší mezi skupinami I-II a II-III. V A_A (elastin) a MT nejsou mezi skupinami významné rozdíly.

Aortální ASCH - stěna



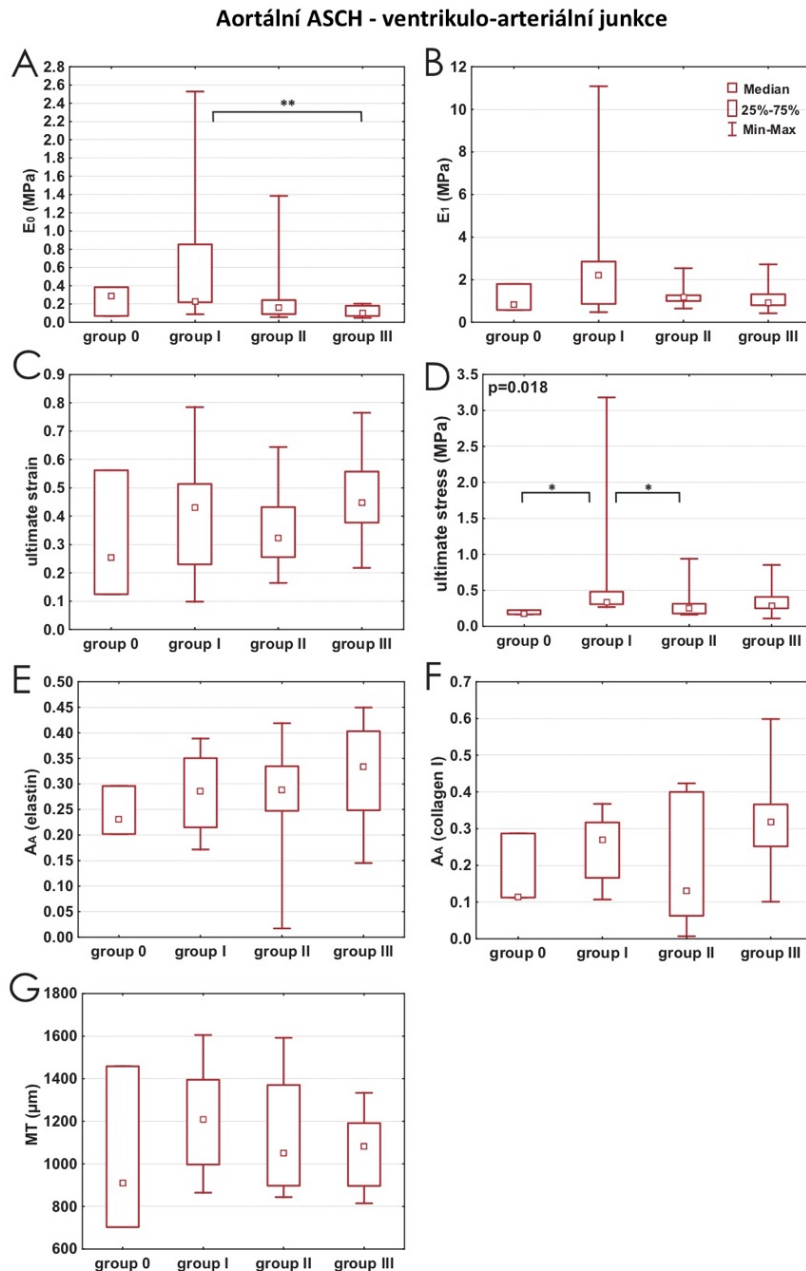
Zdroj: hodnoty získané v průběhu experimentu, publikováno v časopisu Cell and Tissue Banking (Fiala et al. 2019)

Graf 10: Srovnání mechanických a strukturálních parametrů vzorků cípů aortálních alograftů srdečních chlopní (ASCH) ve skupinách dle délky kryoprezervace (group 0-III): **A** – Youngův modul pro malé deformace (E_0); **B** – Youngův modul pro velké deformace (E_1); **C** – mezní deformace (ultimate strain); **D** – mezní napětí (ultimate stress); **E** - plošný podíl elastinu v referenční ploše vzorku ($A_A(\text{elastin})$); **F** - plošný podíl kolagenu I v referenční ploše vzorku ($A_A(\text{collagen I})$); **G** – tloušťka stěny (MT). Krabicové grafy s čtverečkem uvnitř označujícím polohu mediánu, obdélník grafu určuje polohu dolního a horního kvartilu, výběžky vymezují minimum a maximum naměřených hodnot. Hodnoty p označují významné rozdíly v Kruskal-Wallisově ANOVA testu a svorky spojují skupiny významně se lišící dle Mann-Whitneyho U testu * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Z grafu je patrný signifikantní rozdíl mezi skupinami I-III v E_0 a žádný rozdíl v E_1 . Mezní deformace se liší mezi skupinami 0-III, I-II a II-III. Nebyly nalezeny žádné rozdíly v mezním napětí. $A_A(\text{elastin})$ se liší mezi skupinami II a III, $A_A(\text{kolagen I})$ mezi skupinami 0-III, I-III a II-III. V MT nejsou mezi skupinami významné rozdíly.



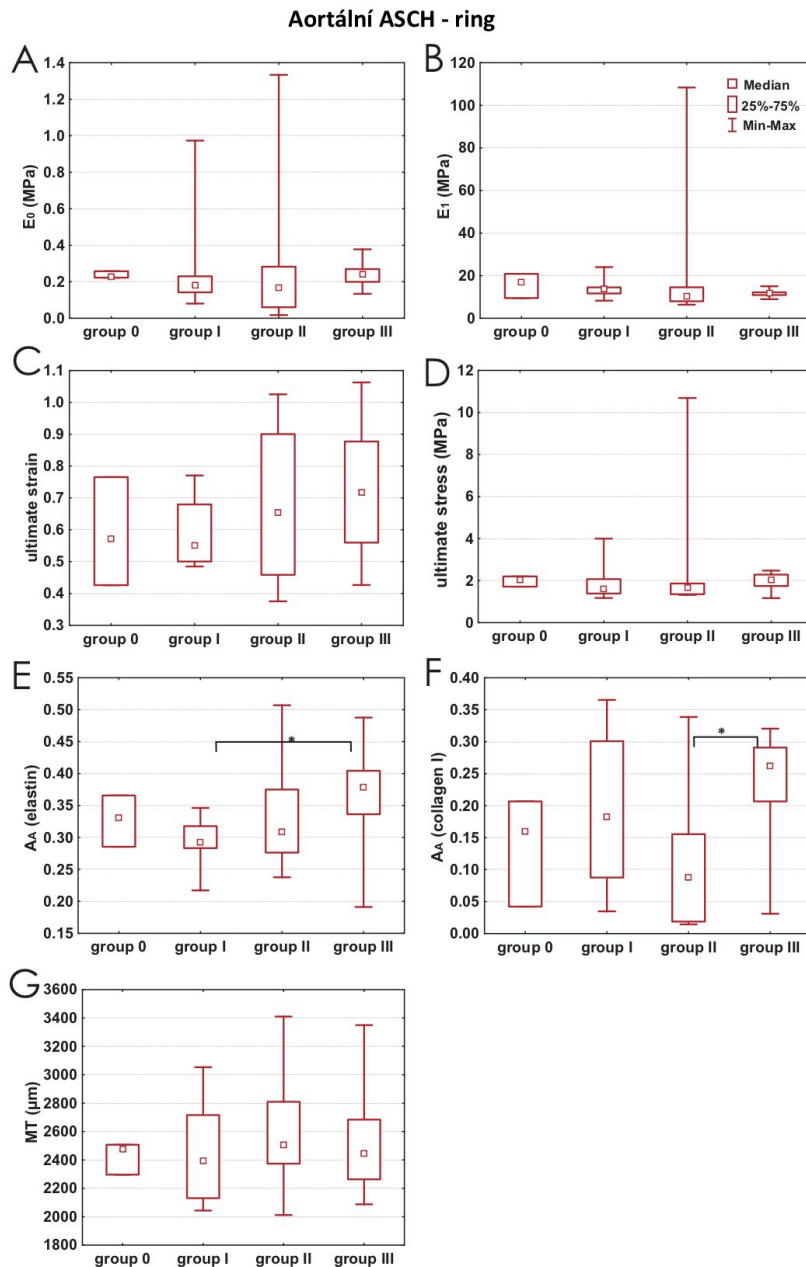
Zdroj: hodnoty získané v průběhu experimentu, publikováno v časopisu *Cell and Tissue Banking* (Fiala et al. 2019)

Graf 11: Srovnání mechanických a strukturálních parametrů vzorků ventrikulo-arteriálních junkcí aortálních alograftů srdečních chlopní (ASCH) ve skupinách dle délky kryoprezervace (group 0-III): **A** – Youngův modul pro malé deformace (E_0); **B** – Youngův modul pro velké deformace (E_1); **C** – mezní deformace (ultimate strain); **D** – mezní napětí (ultimate stress); **E** – plošný podíl elastinu v referenční ploše vzorku ($A_A(\text{elastin})$); **F** – plošný podíl kolagenu I v referenční ploše vzorku ($A_A(\text{collagen I})$); **G** – tloušťka stěny (MT). Krabicové grafy s čtverečkem uvnitř označujícím polohu mediánu, obdélník grafu určuje polohu dolního a horního kvartilu, výběžky vymezují minimum a maximum naměřených hodnot. Hodnoty p označují významné rozdíly v Kruskal-Wallisově ANOVA testu a svorky spojují skupiny významně se lišící dle Mann-Whitneyho U testu * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Z grafu je patrný signifikantní rozdíl mezi skupinami I-III v E_0 a žádný rozdíl v E_1 . Mezní deformace se neliší. Mezní napětí je rozdílné mezi skupinami 0-I a I-II. V $A_A(\text{elastin})$, $A_A(\text{kolagen I})$ ani MT nejsou mezi skupinami významné rozdíly.



Zdroj: hodnoty získané v průběhu experimentu, publikováno v časopisu *Cell and Tissue Banking* (Fiala et al. 2019)

Graf 12: Srovnání mechanických a strukturálních parametrů vzorků ringů aortálních alograftů srdečních chlopní (ASCH) ve skupinách dle délky kryoprezervace (group 0-III): **A** – Youngův modul pro malé deformace (E_0); **B** – Youngův modul pro velké deformace (E_1); **C** – mezní deformace (ultimate strain); **D** – mezní napětí (ultimate stress); **E** – plošný podíl elastinu v referenční ploše vzorku ($A_A(\text{elastin})$); **F** – plošný podíl kolagenu I v referenční ploše vzorku ($A_A(\text{kolagen I})$); **G** – tloušťka stěny (MT). Krabicové grafy s čtverečkem uvnitř označujícím polohu mediánu, obdélník grafu určuje polohu dolního a horního kvartilu, výběžky vymezují minimum a maximum naměřených hodnot. Hodnoty p označují významné rozdíly v Kruskal-Wallisově ANOVA testu a svorky spojují skupiny významně se lišící dle Mann-Whitneyho U testu * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Z grafu jsou patrné signifikantní rozdíly pouze v $A_A(\text{elastin})$ a $A_A(\text{kolagen I})$ mezi skupinami I a III resp. II a III. Ostatní parametry se mezi skupinami výrazně neliší.



Zdroj: hodnoty získané v průběhu experimentu

4.5.2. Pulmonální ASCH

Mechanické a strukturální parametry vzorků pulmonálních ASCH uvedené a podrobněji dokumentované v předchozích kapitolách jsou přehledně shrnuty v *tabulce 22*.

Tab. 22: Mechanické a strukturální vlastnosti pulmonálních alograftů srdečních chlopní (ASCH) v různých skupinách dle délky kryoprezervace. Mediány hodnot (mezikvartilové rozpětí). E_0 a E_1 – Youngův modul elasticity pro malé, resp. velké deformace; A_A – area fraction; MT – medium thickness; skupina 0 = čerstvé, skupina I = kryoprezervované do 4,9 let, skupina II = kryoprezervované 5 až 9,9 let, skupina III = kryoprezervované > 10 let.

pulmonální ASCH	skupina 0	skupina I	skupina II	skupina III
E_0 (MPa)				
stěna	0,09 (0,06-0,12)	0,13 (0,09-0,21)	0,32 (0,20-0,49)	0,14 (0,05-0,22)
cíp	1,17 (0,40-6,32)	2,33 (0,90-4,98)	1,61 (0,71-6,77)	2,12 (0,59-7,32)
junkce	0,36 (0,19-0,54)	0,21 (0,14-0,33)	0,43 (0,18-0,83)	0,22 (0,15-0,31)
ring	0,17 (0,13-0,32)	0,12 (0,03-0,24)	0,22 (0,13-0,25)	0,20 (0,13-0,30)
E_1 (MPa)				
stěna	0,97 (0,91-1,17)	0,99 (0,58-1,95)	2,03 (1,18-3,04)	1,23 (1,10-2,07)
cíp	15,51 (11,13-30,02)	15,48 (10,77-24,49)	18,49 (8,59-34,02)	22,66 (12,32-43,74)
junkce	2,10 (1,21-2,83)	1,54 (0,67-2,09)	2,47 (1,47-4,08)	1,30 (0,64-1,53)
ring	9,6 (8,19-10,33)	6,44 (5,47-8,42)	5,32 (4,55-5,76)	5,43 (3,92-7,61)
mezní deformace				
stěna	0,45 (0,34-0,81)	0,46 (0,31-0,67)	0,20 (0,15-0,25)	0,41 (0,33-0,48)
cíp	0,14 (0,11-0,23)	0,25 (0,17-0,39)	0,15 (0,12-0,31)	0,29 (0,17-0,37)
junkce	0,21 (0,15-0,34)	0,18 (0,16-0,21)	0,13 (0,12-0,18)	0,25 (0,22-0,33)
ring	0,53 (0,41-0,55)	0,39 (0,33-0,55)	0,36 (0,29-0,49)	0,51 (0,50-0,58)
mezní napětí (MPa)				
stěna	0,33 (0,27-0,36)	0,31 (0,20-0,45)	0,31 (0,19-0,46)	0,39 (0,34-0,42)
cíp	2,23 (1,01-2,95)	3,07 (2,04-3,84)	2,34 (1,08-4,38)	4,69 (3,00-5,50)
junkce	0,26 (0,22-0,33)	0,16 (0,09-0,25)	0,23 (0,17-0,38)	0,20 (0,13-0,29)
ring	1,21 (1,08-1,55)	1,04 (0,80-1,37)	0,70 (0,61-1,17)	0,97 (0,74-1,46)
A_A(elastin)				
stěna	0,37 (0,32-0,39)	0,36 (0,27-0,40)	0,40 (0,37-0,43)	0,41 (0,34-0,42)
cíp	0,08 (0,05-0,13)	0,12 (0,10-0,18)	0,13 (0,09-0,16)	0,10 (0,08-0,27)
junkce	0,22 (0,19-0,25)	0,21 (0,14-0,29)	0,24 (0,22-0,25)	0,25 (0,25-0,29)
ring	0,30 (0,28-0,32)	0,25 (0,23-0,30)	0,26 (0,24-0,32)	0,28 (0,26-0,30)
A_A(collagen)				
stěna	0,08 (0,05-0,19)	0,18 (0,03-0,28)	0,03 (0,02-0,07)	0,14 (0,07-0,17)
cíp	0,21 (0,18-0,25)	0,32 (0,26-0,43)	0,36 (0,17-0,43)	0,31 (0,18-0,39)
junkce	0,13 (0,08-0,21)	0,36 (0,06-0,43)	0,08 (0,07-0,27)	0,24 (0,10-0,33)
ring	0,13 (0,11-0,22)	0,10 (0,06-0,12)	0,03 (0,02-0,12)	0,13 (0,09-0,18)
MT (μm)				
stěna	1316,86 (1017,65-1368,02)	1239,31 (1150,27-1701,19)	1370,92 (1160,06-1606,94)	1005,53 (852,56-1395,19)
cíp	317,00 (283,00-375,00)	427,91 (329,78-505,36)	325,72 (248,00-416,00)	382,50 (287,00-454,51)
junkce	709,33 (662,18-808,45)	823,56 (687,78-888,51)	819,95 (657,74-892,81)	868,60 (822,42-1098,59)
ring	1673,04 (1534,35-1871,78)	2001,53 (1875,50-2372,45)	1789,18 (1695,91-2055,53)	1801,81 (1522,19-2255,53)

Rozdílnost zkoumaných parametrů mezi skupinami dle délky kryoprezervace (0-III) byla stejně jako v případě aortálních i u pulmonálních ASCH analyzována Kruskal-Wallisovým ANOVA testem s hladinou významnosti $p=0,05$.

Mezi vzorky odebranými z pulmonálních ASCH byly nalezeny statisticky významné rozdíly v Youngově modulu elasticity pro malé deformace (E_0), mezní deformace a zastoupení kolagenu u stěn pulmonálních tepen. U vzorků pulmonálních cípů byly významné rozdíly zjištěny v mezním napětí. Ventrikulo-arteriální junkce se významně nelišily. Pulmonální ringy se významně lišily v Youngově modulu pro velké deformace. Výsledky statistického zpracování jsou shrnuty v *tabulce 23*.

Tab. 23: Analýza rozdílů ve sledovaných parametrech pulmonálních alograftů srdečních chlopní ve skupinách dle délky kryoprezervace (skupina 0-III) Kruskal-Wallisovým ANOVA testem. E_0 a E_1 – Youngův modul elasticity pro malé, resp. velké deformace; A_A plošný podíl v referenční ploše vzorku (area fraction); MT – tloušťka stěny; n.s. = není signifikantní.

	E_0	E_1	mezní deformace	mezní napětí	A_A (elastin)	A_A (kolagen I)	MT
stěna	$p<0,01$	n.s.	$p<0,001$	n.s.	n.s.	$p=0,014$	n.s.
cíp	n.s.	n.s.	n.s.	$p=0,015$	n.s.	n.s.	n.s.
junkce	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
ring	n.s.	$p = 0,043$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Rozdíly mezi jednotlivými skupinami (0-I, 0-II, 0-III, I-II, I-III, II-III) byly testovány Mann-Whitneyho U testem. Výsledky v *tabulce 24*.

Tab. 24: Analýza rozdílů ve sledovaných parametrech mezi jednotlivými skupinami pulmonálních alograftů srdečních chlopní (ASCH) dle délky kryoprezervace (0-I, 0-II, 0-III, I-II, I-III, II-III) pomocí Mann-Whitneyho U testu. 0 = čerstvé ASCH; I = ASCH kryoprezervované do 5 let; II = ASCH kryoprezervované 5-9,9 let; III = ASCH kryoprezervované 10 a více let; E_0 a E_1 = Youngův modul elasticity pro malé, resp. velké deformace; A_A = plošný podíl v referenční ploše vzorku (area fraction); MT = tloušťka stěny; n.s. = není signifikantní.

pulmonální ASCH	0-I	0-II	0-III	I-II	I-III	II-III
stěna						
E_0	n.s.	$p<0,01$	n.s.	$p<0,01$	n.s.	$p<0,01$
E_1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
mezní deformace	n.s.	$p<0,01$	n.s.	$p<0,001$	n.s.	$p<0,001$

mezní napětí	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
A_A(elastin)	n.s.	n.s.	n.s.	p=0,039	p=0,033	n.s.
A_A(kolagen I)	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,01	n.s.	p<0,01
MT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p=0,039	n.s.
cíp						
E₀	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
E₁	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
mezní deformace	p=0,49	n.s.	p=0,040	n.s.	n.s.	n.s.
mezní napětí	n.s.	n.s.	p=0,012	n.s.	p=0,023	p=0,015
A_A(elastin)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
A_A(kolagen I)	p<0,01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
MT	n.s.	n.s.	n.s.	p=0,022	n.s.	n.s.
junkce						
E₀	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
E₁	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
mezní deformace	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p=0,042	n.s.
mezní napětí	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
A_A(elastin)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
A_A(kolagen I)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
MT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
ring						
E₀	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
E₁	n.s.	p = 0,014	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
mezní deformace	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p = 0,31
mezní napětí	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
A_A(elastin)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
A_A(kolagen I)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
MT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Analýza odhalila významné rozdíly v Youngově modulu pro malé deformace mezi vzorky arteriální stěny čerstvých ASCH a ASCH s délkou kryoprezervace 5-9,9 let (skupiny 0-II), ASCH kryoprezervovanými do 5 let a 5 až 10 let (skupiny I-II) a ASCH s délkou kryoprezervace 5-9,9 let a 10 a více let (skupiny II-III). Tuhost stěny pulmonálních alograftů (v malých deformacích) byla ve skupině s délkou kryoprezervace 5-9,9 let (skupina II) vyšší než v ostatních skupinách. U ostatních zkoumaných vzorků pulmonálních ASCH nebyly zachyceny žádné rozdíly. Youngův modul pro velké deformace se lišil pouze mezi čerstvými ASCH a ASCH s délkou kryoprezervace 5-9,9 let (0-II).

Mezní deformace vzorků arteriální stěny pulmonálních ASCH s délkou kryoprezervace 5-9,9 let (skupina II) se lišila od čerstvých (skupina 0) i ASCH kryoprezervovaných do 5 let (skupina I). Pokles hodnot tohoto parametru lze chápat tak, že u stěny plicnice v průběhu kryoprezervace narostla tuhost – v okamžiku vzniku trhliny nebyl vzorek tolik deformován jako vzorky ostatních skupin. Mezní deformace vzorků pulmonálních cípů se lišila mezi skupinami

0-I a 0-III. Vzorky arterio-ventrikulární junkce se ve sledovaném parametru lišily pouze mezi skupinami I-III.

V mezním napětí nebyly u vzorků stěny pulmonální tepny a vzorků arterio-ventrikulárních junkcí zachyceny žádné významné rozdíly mezi skupinami. Pevnost vzorků cípů byla u ASCH kryoprezervovaných 10 a více let (skupina III) výrazně vyšší než v jiných skupinách.

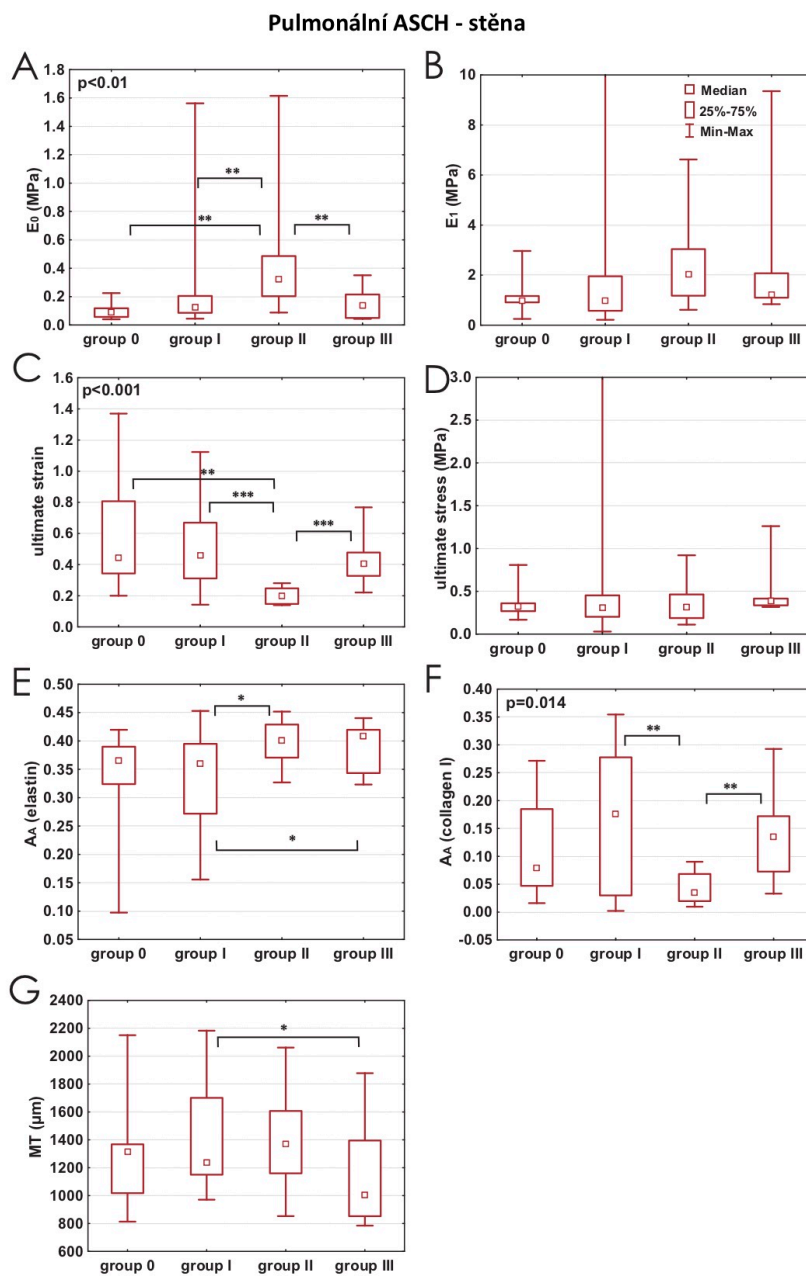
Vzorky arteriálních stěn pulmonálních ASCH s délkou kryoprezervace 5-9,9 let (skupina II) a delší než 10 let (skupina III) vykazovaly vyšší zastoupení elastinu než vzorky do 5 let kryoprezervace (skupina I). U dalších vzorků tkání (cíp, junkce, ring) nebyly podobné rozdíly zachyceny.

Zastoupení kolagenu typu I bylo ve vzorcích arteriální stěny pulmonálních ASCH s délkou kryoprezervace 5-9,9 let (skupina II) nižší a ve vzorcích s délkou kryoprezervace nad 10 let (skupina III) naopak vyšší než ve vzorcích stěny čerstvých ASCH (skupina 0) a ASCH kryoprezervovaných do 5 let (skupina I). Množství kolagenních vláken typu I bylo také vyšší u vzorků cípů kryoprezervovaných do 5 let (skupina I) než u vzorků čerstvých (skupina 0). Vzorky ventrikulo-arteriálních junkcí ani ringů se v množství kolagenu I nelišily.

Tloušťka stěny (MT) se lišila (byla menší) u cípů pulmonálních ASCH kryoprezervovaných 5-9,9 let (skupina II) ve srovnání s cípy do 5 let kryoprezervace (skupina I). Obdobně poklesla i u vzorků arteriálních stěn pulmonálních ASCH mezi skupinami I a III. U ostatních vzorků nebyly nalezeny žádné rozdíly mezi skupinami.

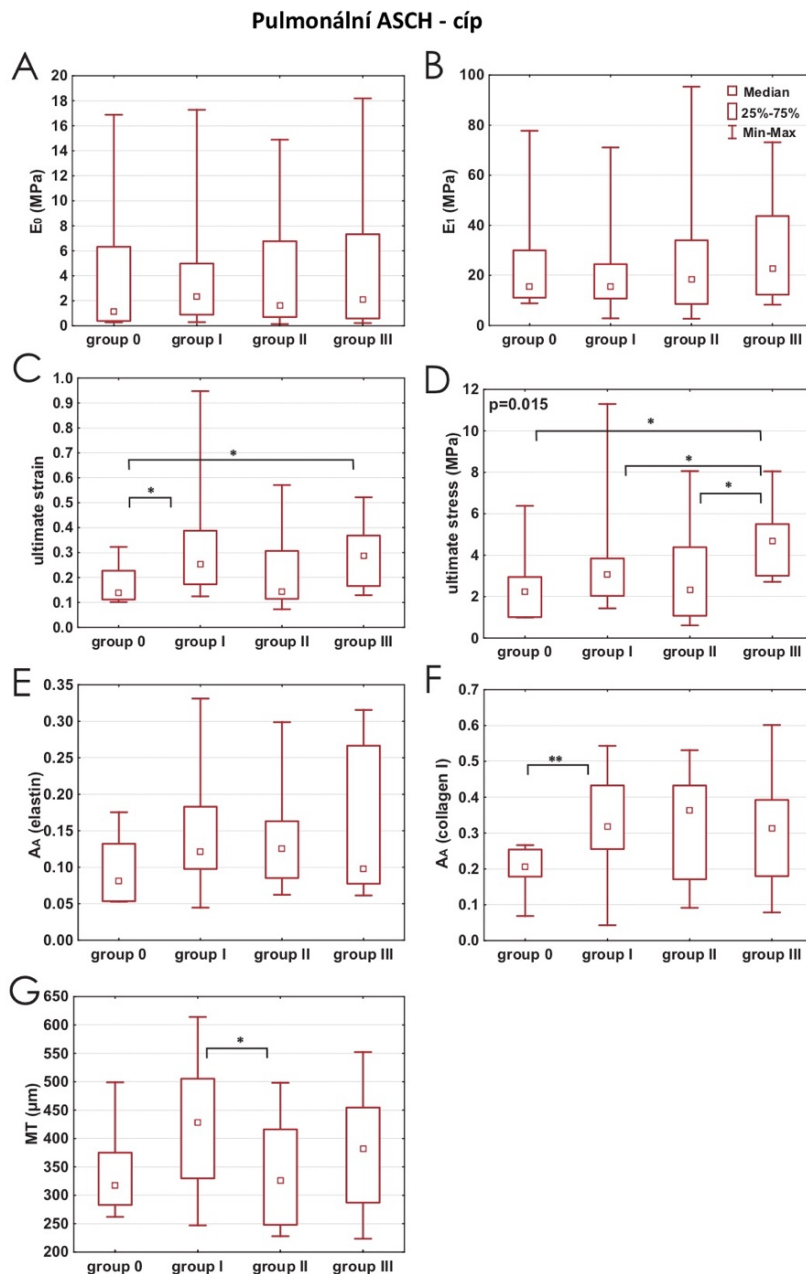
Srovnání všech parametrů jednotlivých vzorků pulmonálních ASCH rozdělených do skupin podle délky kryoprezervace (0-III) přehledně v *grafech 13-16*.

Graf 13: Srovnání mechanických a strukturálních parametrů vzorků tepenné stěny pulmonálních alograftů srdečních chlopní (ASCH) ve skupinách dle délky kryoprezervace (group 0-III): **A** – Youngův modul pro malé deformace (E_0); **B** – Youngův modul pro velké deformace (E_1); **C** – mezní deformace (ultimate strain); **D** – mezní napětí (ultimate stress); **E** - plošný podíl elastinu v referenční ploše vzorku ($A_A(\text{elastin})$); **F** - plošný podíl kolagenu I v referenční ploše vzorku ($A_A(\text{collagen I})$); **G** – tloušťka stěny (MT). Krabicové grafy s čtverečkem uvnitř označujícím polohu mediánu, obdélník grafu určuje polohu dolního a horního kvartilu, výběžky vymezují minimum a maximum naměřených hodnot. Hodnoty p označují významné rozdíly v Kruskal-Wallisově ANOVA testu a svorky spojují skupiny významně se lišící dle Mann-Whitneyho U testu * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Z grafu je patrný signifikantní rozdíl mezi skupinami 0-II, I-II a II-III v E_0 a naopak žádný rozdíl v E_1 . Mezní deformace se liší mezi skupinami 0-II, I-II a II-III, mezní napětí se neliší. $A_A(\text{elastin})$ se liší mezi skupinami I-II a I-III, $A_A(\text{kolagen})$ mezi skupinami I-II a II-III. V MT je rozdíl pouze mezi skupinami I-III.



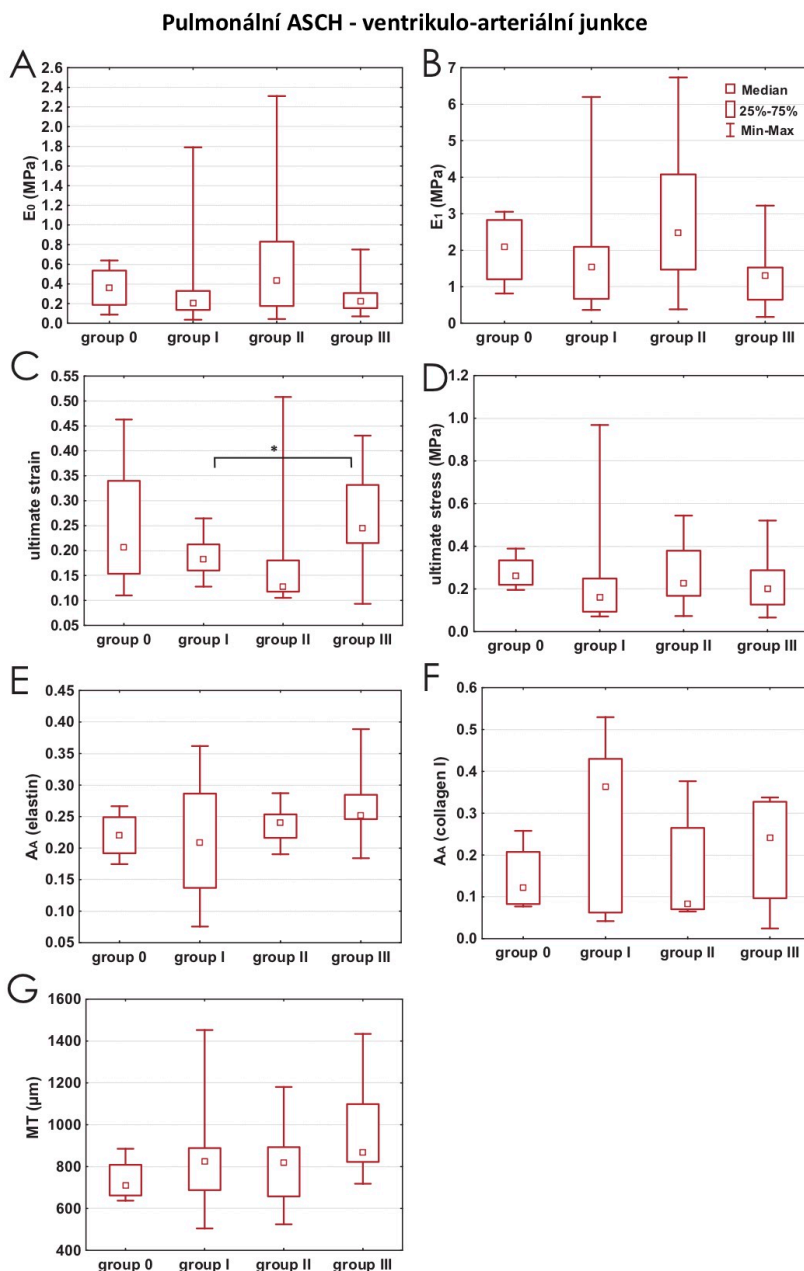
Zdroj: hodnoty získané v průběhu experimentu, publikováno v časopisu *Cell and Tissue Banking* (Fiala et al. 2019)

Graf 14: Srovnání mechanických a strukturálních parametrů vzorků cípů pulmonálních alografitů srdečních chlopní (ASCH) ve skupinách dle délky kryoprezervace (group 0-III): **A** – Youngův modul pro malé deformace (E_0); **B** – Youngův modul pro velké deformace (E_1); **C** – mezní deformace (ultimate strain); **D** – mezní napětí (ultimate stress); **E** – plošný podíl elastinu v referenční ploše vzorku ($A_A(\text{elastin})$); **F** – plošný podíl kolagenu I v referenční ploše vzorku ($A_A(\text{collagen I})$); **G** – tloušťka stěny (MT). Krabicové grafy s čtverečkem uvnitř označujícím polohu mediánu, obdélník grafu určuje polohu dolního a horního kvartilu, výběžky vymezují minimum a maximum naměřených hodnot. Hodnoty p označují významné rozdíly v Kruskal-Wallisově ANOVA testu a svorky spojují skupiny významně se lišící dle Mann-Whitneyho U testu * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. V E_0 ani E_1 nejsou signifikantní rozdíly. Mezní deformace se liší mezi skupinami 0-I a 0-III. Mezní napětí mezi skupinami 0-III, I-III a II-III. $A_A(\text{elastin})$ se neliší, odlišnost v $A_A(\text{kolagen I})$ je mezi skupinami 0-I. MT se liší mezi skupinami I-II.



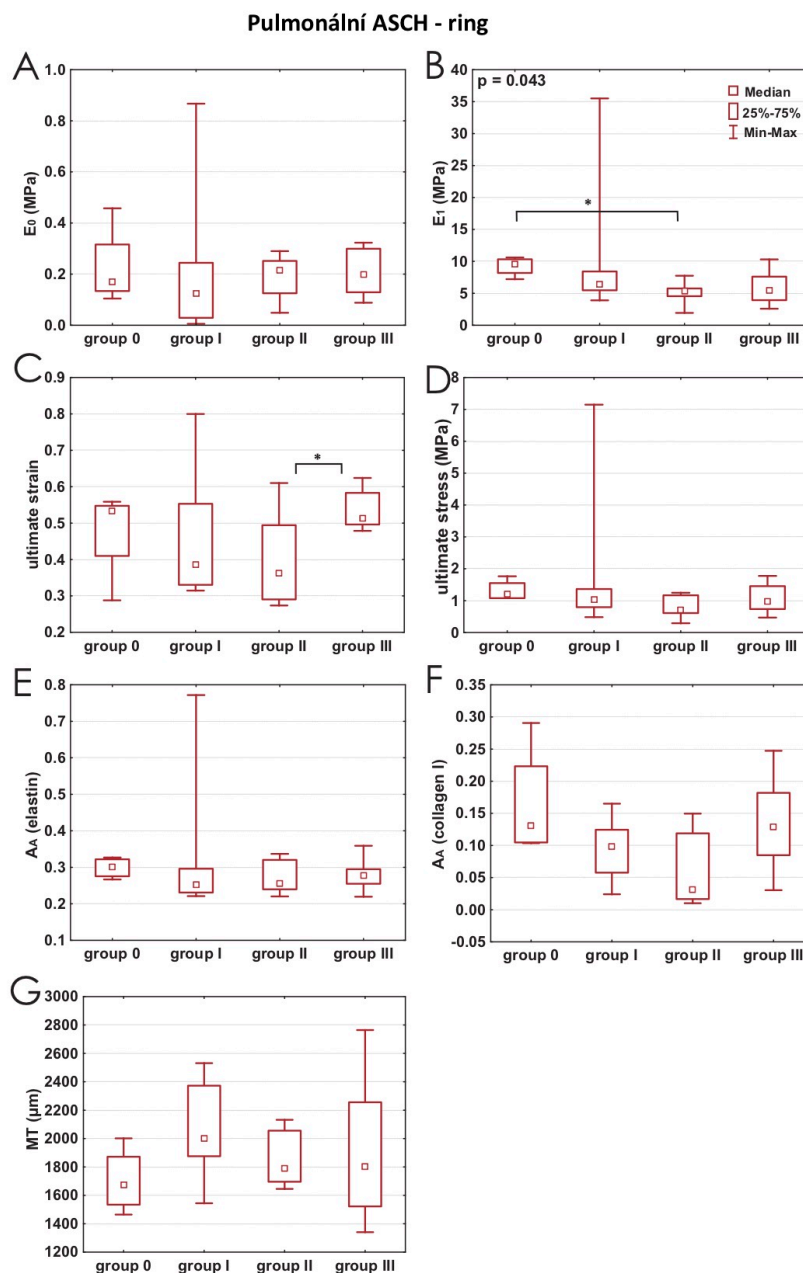
Zdroj: hodnoty získané v průběhu experimentu, publikováno v časopisu *Cell and Tissue Banking* (Fiala et al. 2019)

Graf 15: Srovnání mechanických a strukturálních parametrů vzorků ventrikulo-arteriálních junkcí pulmonálních alograftů srdečních chlopní (ASCH) ve skupinách dle délky kryoprezervace (group 0-III): **A** – Youngův modul pro malé deformace (E_0); **B** – Youngův modul pro velké deformace (E_1); **C** – mezní deformace (ultimate strain); **D** – mezní napětí (ultimate stress); **E** – plošný podíl elastinu v referenční ploše vzorku (A_A (elastin)); **F** – plošný podíl kolagenu I v referenční ploše vzorku (A_A (collagen I)); **G** – tloušťka stěny (MT). Krabicové grafy s čtverečkem uvnitř označujícím polohu mediánu, obdélník grafu určuje polohu dolního a horního kvartilu, výběžky vymezují minimum a maximum naměřených hodnot. Hodnoty p označují významné rozdíly v Kruskal-Wallisově ANOVA testu a svorky spojují skupiny významně se lišící dle Mann-Whitneyho U testu * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Z grafu je patrný signifikantní rozdíl pouze v mezní deformaci mezi skupinami I-III. Ostatní parametry se mezi skupinami neliší.



Zdroj: hodnoty získané v průběhu experimentu, publikováno v časopisu *Cell and Tissue Banking* (Fiala et al. 2019)

Graf 16: Srovnání mechanických a strukturálních parametrů vzorků ringů pulmonálních alograftů srdečních chlopní (ASCH) ve skupinách dle délky kryoprezervace (group 0-III): **A** – Youngův modul pro malé deformace (E_0); **B** – Youngův modul pro velké deformace (E_1); **C** – mezní deformace (ultimate strain); **D** – mezní napětí (ultimate stress); **E** - plošný podíl elastinu v referenční ploše vzorku ($A_A(\text{elastin})$); **F** - plošný podíl kolagenu I v referenční ploše vzorku ($A_A(\text{collagen I})$); **G** – tloušťka stěny (MT). Krabicové grafy s čtverečkem uvnitř označujícím polohu mediánu, obdélník grafu určuje polohu dolního a horního kvartilu, výběžky vymezují minimum a maximum naměřených hodnot. Hodnoty p označují významné rozdíly v Kruskal-Wallisově ANOVA testu a svorky spojují skupiny významně se lišící dle Mann-Whitneyho U testu * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Z grafu jsou patrné signifikantní rozdíly v E_1 mezi skupinami 0-II a mezní deformaci mezi skupinami II a III. Ostatní parametry se neliší.



Zdroj: hodnoty získané v průběhu experimentu

4.6. Vztah mezi mechanickými a strukturálními vlastnostmi ASCH, délkou kryoprezervace a věkem a pohlavím dárce

K určení korelace mezi mechanickými a strukturálními vlastnostmi ASCH, délkou kryoprezervace a charakteristikami vzorků (věk a pohlaví dárce) byl použit test nelineárního Spearmanova korelačního koeficientu (r_s). Hladina významnosti byla zvolena $p < 0,05$. Hodnota r_s nabývá hodnot v rozmezí -1 až 1. Záporné hodnoty reprezentují nepřímou závislost, kladné hodnoty závislost přímou. Čím více se hodnota korelačního koeficientu blíží k mezní hodnotě (-1 nebo 1), tím lze předpokládat těsnější vztah mezi porovnávanými parametry. Průkaz korelace potvrzuje závislost dvou sledovaných parametrů (změnou jednoho dochází ke změně druhého), avšak nemusí být automaticky potvrzením kauzality. Kompletní výsledky jsou uvedeny v příloze 1.

4.6.1. Délka kryoprezervace a mechanické a strukturální vlastnosti aortálních ASCH

Vzorky stěny i cípů aortálních ASCH vykazovaly signifikantní nepřímou závislost mezi délkou kryoprezervace a hodnotami Youngova modulu pružnosti pro malé (E_0) i velké (E_1) deformace (stěna $r_s E_0 -0,48$ a $r_s E_1 -0,30$; cíp $r_s E_0 -0,30$ a $r_s E_1 -0,27$). Nepřímá závislost na délce kryoprezervace byla prokázána i v E_0 vzorků ventrikulo-arteriální junkce aortálních ASCH ($r_s -0,53$). Další nepřímou závislost na délce kryoprezervace vykazovaly hodnoty mezního napětí ($r_s -0,31$) vzorků aortálních stěn.

Ve strukturálních parametrech byla zachycena naopak korelace pozitivní. Vzorky aortálních stěn vykazovaly přímou závislost délky kryoprezervace na zastoupení kolagenu I ($r_s 0,28$). Vzorky ringů měly pozitivní korelaci v množství elastinu ($r_s 0,36$).

4.6.2. Délka kryoprezervace a mechanické a strukturální vlastnosti pulmonálních ASCH

U pulmonálních ASCH byla nepřímá závislost na délce kryoprezervace prokázána pouze u arteriálních ringů v Youngově modulu pružnosti ve velkých deformacích ($r_s E_1 -0,41$). U ostatních mechanických ukazatelů žádná významná korelace s délkou kryoprezervace zachycena nebyla.

Délka kryoprezervace pozitivně korelovala se zastoupením elastinu ve stěně pulmonálních ASCH (r_s 0,31). V ostatních vzorcích se vztah mezi délkou kryoprezervace a strukturálními vlastnostmi prokázat nepodařilo.

4.6.3. Vztah mezi strukturálními a mechanickými vlastnosti ASCH

Pozitivní korelaci se podařilo prokázat mezi mezní deformací a množstvím kolagenu I a elastinu ve vzorcích aortálních cípů (r_s 0,48 resp. 0,29). Množství kolagenu I u stejných vzorků také přímo úměrně ovlivnilo mezní napětí (r_s 0,27). Vzorky aortálních ringů vykazovaly přímou závislost Youngových modulů pružnosti na množství kolagenu I ($r_s E_0$ 0,48; $r_s E_1$ 0,46) i elastinu ($r_s E_0$ 0,52). V případě mezní deformace byla však u ringů naopak prokázána negativní závislost na množství kolagenu I (r_s -0,42). U aortálních ringů byla také nepřímá závislost E_0 na tloušťce stěny (r_s -0,43). Tloušťka stěny aortálních ringů nepřímo korelovala s množstvím elastinu (r_s -0,41).

Výraznější pozitivní korelace mezi množstvím kolagenu a mezní deformací byla zachycena i u vzorků stěny, cípu a ventrikulo-arteriální junkce pulmonálních ASCH (r_s 0,44; r_s 0,60; r_s 0,44). Další přímou závislost mezi množstvím kolagenu a mezním napětím vykazovaly vzorky stěn pulmonálních ASCH (r_s 0,39). Stejně vzorky měly naopak nepřímou závislost množství elastinu na mezní deformaci (r_s -0,34). Množství elastinu v cípech pulmonálních ASCH pozitivně korelovalo s mezní deformací (r_s 0,46), naopak negativně s modulem pružnosti pro velké deformace (r_s -0,29).

4.6.4. Vztahy mezi mechanickými a strukturálními vlastnosti ASCH a charakteristikami dárců

Vyšší věk dárců negativně ovlivnil mezní deformace (r_s -0,42) a množství elastinu (r_s -0,32) ve vzorcích aortálních stěn. U aortálních cípů negativně koreloval s E_1 (r_s -0,33), mezním napětím (r_s -0,43) a množstvím kolagenu I (r_s -0,26). Nepřímou závislost mezi věkem dárce a množstvím elastinu vykazovaly i ventrikulo-arteriální junkce aortálních ASCH (r_s -0,45). V případě aortálních ringů byla negativní korelace s věkem prokázána u mezní deformace (r_s -0,60). U stejných vzorků byla naopak přímá závislost na věku zachycena u elastického modulu pro velké deformace (r_s 0,45).

U vzorků stěn pulmonálních ASCH věk dárce negativně koreloval s mezní deformací ($r_s -0,38$) a množstvím kolagenu I ($r_s -0,28$) a naopak pozitivně s množstvím elastinu ($r_s 0,34$). Mezní deformace byla nepřímo úměrná věku i u vzorků pulmonálních cípů ($r_s -0,32$).

Korelaci mezi pohlavím dárce se podařilo ze všech aortálních vzorků prokázat jen u E0 aortálních cípů ($r_s 0,26$). U jiných parametrů aortálních ASCH korelace s pohlavím prokázána nebyla.

Výraznější přímé závislosti mezi pohlavím dárce a mechanickými a strukturálními vlastnostmi vykazovaly vzorky pulmonálních stěn ($r_s E_0 0,53$; $r_s E_1 0,29$; r_s mezní napětí $0,28$). V pulmonálních cípech pohlaví pozitivně korelovalo s množstvím kolagenu I ($r_s 0,40$).

5. DISKUZE

Předkládaná práce se zabývá problematikou společnou pro tkáňové bankovnictví a kardiochirurgii. Proto pokládám za důležité zdůraznit impresivní historii tkáňového bankovnictví. Málo se ví, že hradecký soudní lékař prof. Rudolf Klen (1915–2006) založil v Hradci Králové první Tkáňovou banku (on jí nazýval „Tkáňovou ústřednu“) již v roce 1952. Banka byla v pravém slova smyslu světově proslulá, distribuovala tkáňové štěpy na 4 kontinentech. Vzhledem k jeho původní profesi nepřekvapuje, že si plně uvědomoval nutnost vzniku zákonné normy. Prof. Klen patřil k těm, kteří od 50. let budovali obor na vědeckých základech. Byl aktivní publikačně – již v roce 1957 vyšla v Avicenu jeho první monografie o tkáňovém bankovnictví v češtině, která se ale rychle dočkala překladu do řady jazyků. V roce 1982 potom vyšla jeho anglická monografie „Biologické principy tkáňového bankovnictví“, dodnes citovaná „bible“ tkáňových bankéřů (Špatenka et al. 2006). Prof. Klen se bankingem kardiovaskulární tkáně sám nezabýval, ale v počátcích Tkáňového zařízení FN Motol zásadním způsobem přispěl svými zkušenostmi a radami v době, kdy transplantační legislativa neexistovala. Hradecká Tkáňová banka úspěšně pokračuje pod vedením prim. Pavla Měřičky ve šlépějích svého zakladatele a mimo jiné se velmi úspěšně věnuje zpracování alogenní cévní tkáně ke kryoprezervaci (Špaček et al. 2019).

Biomechanické vlastnosti chlopenních štěpů samozřejmě orientačně vyšetřovali již všichni průkopníci tzv. „allograft/autograft cardiac surgery“. Jako zkušený kardiochirurgové prováděli s tkání alograftů prostou „trhací zkoušku“. Založili stehy do anulu a do periferního okraje stěny velké tepny materiálem, který hodlali při operaci použít a zkoušeli stehy narůstajícím tahem rukou vytrhnout. Na základě výsledků těchto primitivních trhacích zkoušek se rozhodovali o použití či nepoužití konkrétního štěpu, případně určité metody zpracování štěpů. Později všichni spolupracovali s techniky, zabývajících se měřením pevnosti materiálů (osobní sdělení Carlose Durana, Donalda Rosse a Magdi Yacouba).

Většina studií biomechanických vlastností vychází ze zvířecího modelu na vepřových, hovězích nebo ovčích srdcích (Hlubocky et al. 2011; Chow a Zhang 2011; Vesely 1998). Bylo prokázáno, že zvířecí srdce jsou mechanicky méně odolnější (Hasan et al. 2014). Použití lidských chlopní

pro experiment je díky omezené dostupnosti materiálu poměrně raritní (ale pro validaci prodloužení expirační doby ASCH zásadní). Ve většině případů se jedná o materiál získaný sekci. Unikátnost naší studie spočívá především v tom, že byl zkoumán materiál, který prošel standardní, protokolárně stanovenou technikou opatřování (odběru), ošetření, zpracování a skladování alotransplantátů srdečních chlopní, které jsou určeny pro klinické využití. Zahrnutí štěpů do 5 let kryoprezervace, ale především čerstvých štěpů tedy naráží nejen na ekonomické, ale i etické aspekty. Tím vysvětlujeme i omezený počet vzorků ve skupině 0.

K provedení experimentu byly alokovány štěpy v plném rozsahu splňující kritéria pro použití u člověka. Byly vybrány alografty běžných rozměrů, tedy takových, kterých mělo Tkáňové zařízení v době experimentu v zásobě dostatek. Nikdy proto nedošlo k situaci, kdy by Národní banka chlopních alotransplantátů neměla pro dospělého nemocného vhodný štep, požadovaný pro konkrétní transplantaci. Problematika byla s Etickou komisí FN Motol diskutována, ale nebyl shledán důvod, aby bylo požadováno písemné schválení projektu.

Jednou z hlavních nevýhod použití alograftů srdečních chlopní zmíněných i v teoretické části práce je jejich omezená dostupnost, která v zahraničí přetrvává i přes nesporně pozitivní vliv zřízení tkáňových bank. Výrazným faktorem ovlivňujícím dostupnost alotransplantátů srdečních chlopní je časový limit pro jejich klinické použití (expirační doba). Možnost prodloužení expirace je bezesporu jednou z hlavních priorit většiny tkáňových zařízení. Konkrétně v podmínkách České republiky, tedy Tkáňového zařízení FN Motol a Národní banky alogenních chlopních štěpů je situace velmi příznivá. Aktuální nabídka chlopních alograftů běžných rozměrů je schopna uspokojit potřeby domácích kardiologických pracovišť. Je tomu tak především díky unikátní organizační struktuře Oddělení transplantací a tkáňové banky (OTTB) FN Motol. Toto na národní i mezinárodní úrovni výjimečné pracoviště sdružuje pod jednotným vedením Transplantační centrum pro odběry a transplantace orgánů a Tkáňové zařízení pro opatřování (odběry), zpracování, skladování a transplantace tkání. Transplantační centrum je součástí národního programu odběru a transplantace tkání a má tak přímý přístup do národního poolu dárců orgánů. To od roku 1991 umožňuje, aby byla všechna srdce kadaverózních dárců, která nemohou být z jakéhokoliv důvodu transplantována jako orgán, byla odebrána pro přípravu chlopních štěpů a odeslána do Tkáňového zařízení FN Motol (Špatenka a Burkert 2018). Tento systém nám závidí celý svět. Opatřování tkání

dárců v rámci multiorgánových odběrů je obecně na národní úrovni velmi dobře organizováno (Měřička et al. 2011a).

Česká legislativa je velmi komplexní (Měřička et al. 2011b). V principu pověřuje Ministerstvo zdravotnictví vykonáváním státní správy v oblasti tkání a buněk a kontrolou dodržování legislativy a kontrolou v oblasti jakosti a bezpečnosti tkání a buněk pověřuje SÚKL – Státní ústav pro kontrolu léčiv. SÚKL vydává rozhodnutí podle zákona, provádí kontrolu dodržování zákona a rozhoduje v případě pochybností. Ústav také zajišťuje spolupráci s příslušnými orgány členských států Společenství, propojuje informační systémy a provádí kontroly tkáňových zařízení, poskytuje informace o výsledcích kontrol. Veškeré postupy uvedené v práci proběhly v souladu s českou legislativou a byly kontrolovány inspektorkami SÚKL, o čemž svědčí zápisy z pravidelných inspekcí, které jsou dostupné na sekretariátu OTTB FN Motol.

K rozmražení kryoprezervovaných ASCH před vlastní přípravou vzorků jsme použili protokol shodný se standardně užívaným postupem při klinickém použití, tedy rozmražení na operačním sále před transplantací.

Při volbě metodiky měření mechanických vlastností alogenních chlopenních štěpů jsme vycházeli ze zkušeností, které získali Hlubocký a spol. při měření ovčích mitrálních štěpů (Hlubocký et al. 2011) a z rozsáhlých zkušeností kolegů ze Západočeské univerzity v Plzni při měření a hodnocení mechanických vlastností biologických materiálů (Kochová 2008, 2012, 2013). Uspořádání mechanické části experimentu se snažilo přiblížit situaci, která běžně nastává při fyziologickém zatížení kořene aorty, kmene plicnice a jejich chlopní při systole a diastole. Jsme si však vědomi, že problematika je mnohem komplexnější. Běžné zatížení není uniaxiální. Na tkáň působí síly ve všech směrech, kromě tahu a tlaku se navíc uplatňuje i střížné napětí vyvolané tokem krve. Na uniaxiálním designu tahové zkoušky je založena většina publikovaných biomechanických studií. Je však známým faktem, že se tkáň srdečních chlopní chovají anizotropně. Z prací, které použily biaxiální tahovou zkoušku, vyplývá, že moduly pružnosti a mezní napětí chlopenních cípů jsou větší v podélném směru než radiálním (Chow a Zhang 2011; Hasan et al. 2014). Přesto se domníváme, že základní charakteristiky – Youngův modul pružnosti, mezní deformace a mezní napětí – získané uniaxiálním testováním

představují důležité parametry určující odolnost biologických tkání a mohou poskytnout reprezentativní představu o jejich vývoji v průběhu dlouhodobé kryoprezervace.

Naprostá většina biologických materiálů a zejména těch s vysokým podílem kolagenních a elastických vláken se při zatížení tahem chová nelineárně (Meyers et al. 2008; Łagan a Liber-Kneć 2017; Hasan et al. 2014). Jejich deformační křivka se skládá z několika částí, jak bylo podrobně popsáno v teoretické části práce. V úvodní elastické fázi, kdy dochází působením malého napětí k relativně velké deformaci se uplatňuje především natahování elastických vláken, zatímco různě uspořádaná kolagenní vlákna jsou iniciálně zvlňená a postupně se narovnávají. Youngův modul elasticity je nízký (E_0 0,24 MPa a 0,09 MPa v případě aorty, resp. plicnice, jak bylo prokázáno u čerstvých vzorků). Další působení tahu již přenáší síly přímo na kolagen, který se vyrovná a natahuje. K deformaci je zapotřebí vyššího napětí, modul elasticity narůstá (E_1 2,31 MPa a 0,97 MPa v případě aorty, resp. plicnice). Odolnost trvá až do dosažení mezních vlastností (pevnosti) materiálu kdy už dochází k ruptuře vláken a postupně i úplnému přerušení kontinuity tkáně.

Pevnost tkání tedy přímo závisí na množství kolagenu v nich obsažených. To se potvrdilo i v případě chlopenních cípů, které vykazovaly vyšší hodnoty Youngova modulu elasticity a mezního napětí než vzorky arteriální stěny, právě pro vyšší zastoupení kolagenu I (A_A 0,21 pro aortální i pulmonální cípy versus 0,15 a 0,08 pro aortální, resp. pulmonální stěny). Elastin slouží jako napínač kolagenních vláken (Vesely 1998). U žádného ze vzorků nedošlo v průběhu kryoprezervace nebo skladování v tekutém dusíku k jeho úbytku.

Pulmonální a aortální chlopeň pracují v jiných tlakových podmínkách. Tomu odpovídá i jejich rozdílná morfologie (např. tloušťka stěny 479 μm a 317 μm u aortálních, resp. pulmonálních cípů). Náš experiment se nezaměřoval na přímé srovnání obou druhů alograftů srdečních chlopní. Z jiných prací však vyplývá, že přes určité rozdíly jsou mechanické i strukturální vlastnosti aortální a pulmonální chlopně srovnatelné, což podporuje původní primitivní měření mechanických vlastností a originální koncept Donalda Rosse na náhradu aortální chlopně plicním autograftem (Stradins et al. 2004).

Za nejdůležitější mechanické parametry alograftů srdečních chlopní, ke kterým je vhodné přihlížet při hodnocení vlivu délky kryoprezervace, proto považujeme mezní deformaci, mezní napětí a Youngův modul elasticity pro velké deformace (E_1).

U aortálních ASCH nedošlo k významným změnám schopnosti deformovat se při působení tahu ani při kryoprezervaci ani v průběhu 10letého skladování v tekutém dusíku. Pokles v mezní deformaci zaznamenaný ve skupině II u aortálních cípů nedosáhl úrovně hodnot pro cípy čerstvých štěpů. Mezní napětí, tedy síla nutná k natržení aortální stěny nebo cípu, byla ve všech skupinách kryoprezervovaných vzorků do 10 let skladování podobná. Rozdílné hodnoty pozorované u ventrikulo-arteriálních junkcí skupiny II rovněž neklesly pod úroveň hodnot pro čerstvé štěpy. Youngův modul elasticity pro velké deformace se mezi vzorky jednotlivých skupin nelišil, což lze vyložit tak, že gradient deformační křivky nebo jinými slovy tuhost aortálních alograftů srdečních chlopní nebyla zásadně ovlivněna procesem kryoprezervace ani délkou skladování v tekutém dusíku. Pokles zastoupení kolagenu ve skupině II aortálních stěn není zcela vysvětlitelný, protože ve skupině III následuje opět významný nárůst hodnot. Pokles pravděpodobně nesouvisí s délkou skladování, testovaná korelace byla pozitivní. Vysvětlení je možné hledat v charakteristikách skupiny II, kde existuje výraznější disproporce mezi pohlavím dárců (2 muži, 9 žen). Pro podrobnější studium závislosti parametru na pohlaví by však bylo zapotřebí většího množství vzorků. Zastoupení elastinu se v aortálních vzorcích jednotlivých skupin nelišilo.

V případě pulmonálních ASCH došlo k poklesu hodnot mezní deformace pro vzorky stěn ve skupině s délkou kryoprezervace 5-9,9 let (skupina II), což znamená, že plicnice jsou po 5 letech kryoprezervace méně deformovatelné. Ve skupině nad 10 let (skupina III) je však ve stejném parametru opět nárůst k původním hodnotám (hodnotám skupin 0 a I). Mezní napětí se však pro všechny vzorky pulmonálních ASCH (včetně stěn) mezi jednotlivými skupinami do 10 let kryoprezervace neliší. Hodnoty E_1 se mezi skupinami I a II nijak neliší, pouze mezi čerstvými vzorky ringů plicnice a vzorky kryoprezervovanými 5 let a déle je patrný pokles. Zastoupení kolagenu I ve stěně plicnice po 5 letech kryoprezervace klesá, ve skupině III opět stoupá a neliší se od hodnot skupin 0 a I. Množství elastinu ve stěně mezi skupinami I a II naopak narostlo. Mezi vzorky cípů byl po kryoprezervaci patrný nárůst množství kolagenu. Síla

stěny cípů mezi skupinami II a III poklesla, ale ne pod hodnoty skupiny I. Změny ve strukturálních charakteristikách lze částečně vysvětlit možnou dehydratací vzorků.

ASCH s délkou kryoprezervace vyšší než 10 let (skupina III) vykazovaly různé trendy v několika parametrech. Jejich interpretace není vzhledem k nízké homogenitě skupiny jednoznačná, ale zdá se, že dlouhodobá kryoprezervace mění vlastnosti chlopenních štěpů výrazněji.

Studie zkoumající různé způsoby uchování cévních štěpů prokázaly, že prosté chlazení prasečí aorty není dostatečným způsobem prezervace, štěpy vykazují horší mechanické vlastnosti. Vhodnější je uchovávání při teplotách -20 až -80 °C, které již mezní napětí a Youngův modul elasticity výrazněji nesnižuje (Stemper et al. 2007). Kryoprezervace lidských ASCH použitých v našem experimentu se však od této metodiky výrazně liší, výsledky nejsou srovnatelné.

Novotný a kol. zkoumali různé režimy rozmrazovaných lidských alograftů. Zjistili, že rychlost rozmražení nemá vliv na strukturální vlastnosti cípů kryoprezervovaných ASCH (Novotný et al. 2018). Bohužel však nebylo zkoumáno rozmrazování chlopenních alograftů v režimu, který je u nás používán od roku 1992 a výsledky proto nemůžeme vztahovat na protokol Národní banky chlopenních alograftů.

Mechanickými charakteristikami mražené lidské aorty se zabýval Adham (Adham et al. 1996). Došel k závěru, že kryoprezervace neovlivňuje deformační charakteristiky vzorků. Kryoprezervovaná aorta měla Youngův modul elasticity stejný jako čerstvá. K závěru, že kryoprezervace neovlivňuje mechanické a strukturální vlastnosti tepen dospěl i Fonck na modelu decelularizovaných krčních tepen králíků (Fonck et al. 2008). Experimentální práce Hlubockého na ovčích mitrálních chlopních použila kurčení mechanických vlastností chlopenních štěpů jinou metodiku, ale také ověřila, že kryoprezervace nepoškozuje strukturální vlastnosti a elasticitu mitrálního štěpu (Hlubocký et al. 2011).

Histologické vyšetření ASCH je od samého začátku tkáňového bankovníctví chlopenních štěpů rutinní součástí standardní kontroly kvality tkáně v naprosté většině světových tkáňových zařízení. Vychází se se zkušeností Fischleina (1994) a Goffina (1997). Naše banka od počátku vycházela ze zkušeností prof. Goffina, podle kterých pracovali naši kardiopatologové při

posuzování morfologie stěny velkých cév srdce dárce. Od roku 2017 úspěšně využíváme doporučení společností kardiovaskulárních patologů k interpretaci chirurgické patologie nezánettivých degenerativních onemocnění aorty (Halushka et al. 2016). Samozřejmě si my i ostatní tkáňová zařízení uvědomujeme limitaci vyšetření, při kterém je zpracováván pouze periferní okraj velké cévy, a tak při posuzování vhodnosti použitelnosti konkrétního štěpu vycházíme především z pozorování kardiochirurga při primárním zpracování štěpu, tedy při parciální pitvě srdce. V předkládaném výzkumném projektu jsme se proto zaměřili na morfologická vyšetření, standardně při kontrole kvality alogenních chlopenních štěpů nepoužívaná. Kromě množství elastinu a kolagenu I je možné k určení strukturálních vlastností tkáně zkoumat ještě celou řadu dalších složek. Na mechanice pojiva se významnou měrou podílejí například glykosaminoglykany (Eckert et al. 2013; Hopkins 2005). I v případě samotného kolagenu a elastinu je spíše než samotné množství vláken významnější jejich prostorové uspořádání (Vesely 1998). Vlastní histologické zpracování a barvení preparátů tkáň ovlivní, zkoumání mikrofotografií poskytuje informaci o zastoupení vláknitých bílkovin v poměru k ostatním složkám. Na výsledek mechanického testování má vliv i dehydratace tkáně, která způsobuje tuhnutí vzorků (Viidik 1979). V případě našeho experimentu jsme se snažili tuto chybu minimalizovat rychlým zpracováním, krátkou expozicí vzorků a jejich průběžným zvlhčováním fyziologickým roztokem.

Odpovídající mechanické a strukturální vlastnosti chlopenních alotransplantátů jsou základní, ne však jedinou podmínkou správné dlouhodobé funkce po implantaci. Zásadní podíl na mechanickém chování, a tedy i schopnosti dlouhodobého fungování nativních chlopní má endotel (Simmons 2009). Úlohu endotelu jsme v našem experimentu nezkoumali, protože již dřívější práce vedené Národní bankou alogenních chlopenních štěpů FN Motol prokázaly, že již v úvodních fázích odběru, zpracování a dekontaminace dle používaného protokolu dochází k jeho těžkým změnám a destrukci (Burkert et al. 2008). Práce se rovněž nevěnuje strukturálním změnám, ke kterým dochází u ASCH po implantaci a které jsou odpovědné za degeneraci, kalcifikaci a postupnou ztrátu funkce chlopenního štěpu. Jejich příčinou je pravděpodobně imunitní reakce. Jedním z hlavních aktuálních výzkumných témat věnujících se této problematice je decelularizace ASCH. Štěpy obsahující pouze pojivovou tkáň dárce a schopné osídlení vlastními buňkami příjemce mohou výrazně snížit imunitní odpověď (Bibeovski et al. 2017; Hasan et al. 2014; Da Costa et al. 2006).

Představený experiment má několik omezení. Nejvýraznějším je nízký počet vzorků čerstvých ASCH způsobený faktory popsány již v úvodu diskuze. Hlavním omezením použitého protokolu a výpovědní hodnoty statistiky je nedostatečná rovnováha v zastoupení pohlaví dárců. Současně s věkovou distribucí může jít o důležitý faktor určující mechanické chování chlopenních štěpů. Obecná naše i zahraniční nepublikovaná zkušenost je taková, že kardiovaskulární tkáň ženských dárců bývá „zachovalejší“ než tkáň mužských dárců stejné věkové kategorie. Nicméně mechanické parametry mužské aortální chlopně bývají příznivější než aorty ženského dárce. Proto většina kardiochirurgů požaduje pro mužského příjemce aortálního štepů mužského dárce. Takto postupujeme i my. Rovnoměrné rozložení obou pohlaví ve všech skupinách by mohlo snížit riziko možné nesprávné interpretace výsledků. Přestože se naše studie počtem zkoumaných ASCH výrazně vymyká, množství studijního materiálu je omezeno. K získání ještě rozsáhlejšího studijního vzorku s rovnoměrným rozložením všech demografických parametrů může v budoucnu přispět multicentrické uspořádání experimentu se zapojením většího množství evropských tkáňových zařízení.

6. ZÁVĚR

Experimentální projekt představený v disertační práci potvrdil naši hypotézu: Prokázal, že kryoprezervované alografty srdečních chlopní neztrácejí ani po 5 letech skladování v tekutém dusíku své zásadní mechanické a strukturální vlastnosti.

Projekt je součástí dlouhodobého výzkumného plánu Tkáňového zařízení FN Motol, Národní banky alogenních chlopenních štěpů. Výsledky předchozích úspěšných postgraduálních projektů (2006 Vojáček, 2008 Burkert, 2011 Hlubocký) i dílčí publikované práce (Mokráček et al. 2007, 2015) v kombinaci s dlouhodobou systematickou podporou experimentální činnosti na zvířecích modelech přispěly ke stanovení nových směrů rozvoje zařízení. Současný experiment, jehož dílčí výstupy již byly publikovány v recenzovaných periodících (Kubíková et al. 2016, 2017; Fiala et al. 2019), si kladl za cíl prověřit dlouhodobě používaný protokol expirace a přinést argumenty pro jeho změnu.

Výsledky poskytují informace o mechanických a strukturálních vlastnostech nativních i kryokonzervovaných lidských semilunárních chlopní. Experimentálně jsme ověřili domněnku, že arbitrárně stanovená 5letá doba expirace, kterou se v současnosti řídí naprostá většina tkáňových zařízení ve světě, je neúměrně krátká a je možné ji prodloužit. Prokázali jsme, že ani po uplynutí této lhůty nedochází při skladování v tekutém dusíku k degradaci chlopenních štěpů, narušení základních složek jejich struktury (elastinu a kolagenu I) a zhoršení mechanické odolnosti.

Závěry výzkumu budou aplikovány do provozu Tkáňového zařízení FN Motol, Národní banky alogenních chlopenních štěpů. Výzkumný projekt pokládáme za validaci mechanických a morfologických vlastností funkčně nejvýznamnějších struktur alogenních aortálních a pulmonálních štěpů v závislosti na době uložení v tekuté fázi tekutého dusíku. Výsledky hodnotíme jako dostatečné k tomu, abychom v Národní bance alogenních chlopenních štěpů prodloužili expiraci kryoprezervovaných chlopenních štěpů. S ohledem na demografické uspořádání skupiny II (medián kryoprezervace 5,26 a 7,48 pro aortální, resp. pulmonální

chlopně) navrhujeme, aby se expirace prodloužila na 6 let pro aortální a 8 let pro pulmonální alografty srdečních chlopní.

Věříme, že získaná a publikovaná data povedou i k otevření mezinárodní diskuze vedoucích tkáňových zařízení zpracovávajících chlopenní alografty a kardiochirurgů, kteří je využívají. Navrhované změny mohou přispět ke zvýšení nabídky a tím i zlepšení dostupnosti alogenních chlopenních štěpů pro pacienty všech věkových kategorií.

7. SOUHRN

Cíle: Jedním ze způsobů náhrady semilunárních chlopní je transplantace lidských alograftů srdečních chlopní (ASCH). Aortální a pulmonální ASCH jsou skladovány v kryobance chlopenních štěpů. Expirační doba kryoprezervovaných chlopenních štěpů byla arbitrárně stanovena na 5 let. Cílem dizertační práce bylo ověření hypotézy, že ASCH ani po 5 letech skladování v tekutém dusíku neztrácejí své příznivé mechanické a strukturální vlastnosti.

Materiál a metody: Z celkového počtu 64 lidských ASCH (31 aortálních a 33 pulmonálních) různé délky kryoprezervace (čerstvých, do 5 let, 5-10 let a více než 10 let) byly odebrány vzorky tepenné stěny, cípů, ventrikulo-arteriální junkce a arteriálních ringů. Všechny vzorky byly podrobeny mechanickému testování na trakčním stroji, dokud nedošlo k narušení jejich integrity. Histologické zpracování hodnotilo podíl kolagenu a elastinu ve vzorcích přilehlé tkáně. Získané hodnoty prošly statistickým zpracováním.

Výsledky: U aortálních ASCH nedošlo k významným změnám schopnosti deformovat se při působení tahu ani při kryoprezervaci ani v průběhu 10letého skladování v tekutém dusíku. Síla nutná k natržení aortální stěny nebo cípu, byla ve všech skupinách kryoprezervovaných vzorků do 10 let skladování podobná. V případě pulmonálních ASCH byla u vzorků stěn ve skupině s délkou kryoprezervace 5-10 let zachycena nižší schopnost deformace. Mezní napětí se však pro všechny vzorky pulmonálních ASCH (včetně stěn) mezi jednotlivými skupinami do 10 let kryoprezervace nelišilo. Změny v zastoupení kolagenu I a elastinu ve vzorcích o různé délce kryoprezervace nekorelovaly s jejich mechanickými vlastnostmi.

Závěr: Potvrdili jsme hypotézu, že kryoprezervované ASCH neztrácejí ani po 5 letech skladování v tekutém dusíku své zásadní mechanické a strukturální vlastnosti. Závěr výzkumu bude aplikován do provozu tkáňové banky, umožní prodloužení doby expirace ASCH.

Klíčová slova: alograft srdeční chlopně, homograft, kryoprezervace, tkáňová banka, mechanické vlastnosti, strukturální změny

8. ABSTRACT

Background: The aortic and pulmonary allograft heart valves (AHV) are used in the cardiac surgery for replacing the impaired semilunar valves. They are harvested from donor hearts and cryostored in tissue banks. The expiration period was set to 5 years arbitrarily. We hypothesized that their mechanical and structural properties do not reasonably deteriorate after this period.

Methods: A total of 64 human AHV (31 aortic and 33 pulmonary) of different length of cryopreservation (fresh, 0-5, 5-10, over 10 years) were sampled to different tissue strips (artery, leaflet, ventriculo-arterial junction, arterial ring) and tested by tensile test with loading velocity 10 mm/min until tissue rupture. Neighbouring regions of tissue were processed histologically and evaluated for elastin and collagen area fraction. The results were evaluated statistically.

Results: In aortic AHV, the physical deformation response of wall samples to stress did not change significantly neither during the process of cryopreservation nor during the first 10 years of storage. In pulmonary AHV, the ultimate strain dropped after 5 years of cryopreservation indicating that pulmonary artery was significantly less deformable at the time of rupture. On the other hand, the ultimate stress was equal during the first 10 years of cryostorage. The changes in collagen and elastin amount in the tissue samples were not associated with mechanical impairment.

Conclusion: Neither elasticity, stiffness and solidity nor morphology of aortic and pulmonary AHV did not change reasonably by cryopreservation and during the first 10 years of cryostorage. This evidence suggests that the expiration period can be extended.

Keywords: heart valve allograft, homograft, cryopreservation, tissue banking, mechanical characteristics, structural changes

9. POUŽITÁ LITERATURA

1. Adham M., Gournier J. P., Favre J. P., De La Roche E., Ducerf C., Baulieux J., Barral X., Pouyet M. (1996) Mechanical characteristics of fresh and frozen human descending thoracic aorta. *J Surg Res*, 64, 32-4.
2. Altunkaynak B. Z., Onger M. E., Altunkaynak M. E., Ayrancı E., Canan S. (2012) A Brief Introduction to Stereology and Sampling Strategies: Basic Concepts of Stereology. *NeuroQuantology; Vol 10, No 1 (2012): Open Access: Unbiased Stereological Techniques*.
3. Anastasiadis K., Kambouroglou D., Spanos P. (2004). The use of Valve Homografts and Autografts in Adult Cardiac Surgery. *Hellenic Journal of Cardiology* 45(1):36-41.
4. Azadani A. N., Chitsaz S., Matthews P. B., Jaussaud N., Leung J., Wisneski A., Ge L., Tseng E. E. (2012) Biomechanical comparison of human pulmonary and aortic roots. *Eur J Cardiothorac Surg*, 41, 1111-6.
5. Baddeley A., Vedel Jensen E. B. (2004) Classical stereology in *Stereology for Statisticians*. Chapman and Hall/CRC. 9-42
6. Barrat-Boyes B. G. (1964) Homograft aortic valve replacement in aortic incompetence and stenosis. *Thorax*, 19, 131-50.
7. Barratt-Boyes B. G., Roche A.H., Whitlock R.M. (1977) Six year review of the results of freehand aortic valve replacement using an antibiotic sterilized homograft valve. *Circulation*, 55, 353-61.
8. Barron D. J., Khan N. E., Jones T. J., Willets R. G., Brawn W. J. (2010) What tissue bankers should know about the use of allograft heart valves. *Cell Tissue Bank*, 11, 47-55.
9. Bashey R. I., Torii S., Angrist A. (1967) Age-related collagen and elastin content of human heart valves. *J Gerontol*, 22, 203-8.
10. Baumgartner H., Falk V., Bax J. J., De Bonis M., Hamm C., Holm P. J., Iung B., Lancellotti P., Lansac E., Muñoz D. R., Rosenhek R., Sjögren J., Mas P. T., Vahanian A., Walther T., Wendler O., Windecker S., Zamorano J. L. (2018) 2017 ESC/EACTS Guidelines for the Management of Valvular Heart Disease. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 71, 110.
11. Beall A. C., Morris G. C., Cooley D. A., De Bakey E. (1961) Homotransplantation of the aortic valve. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 42, 497-506.
12. Bibeovski S., Ruzmetov M., Fortuna R. S., Turrentine M. W., Brown J. W., Ohye R. G. (2017) Performance of SynerGraft Decellularized Pulmonary Allografts Compared With Standard Cryopreserved Allografts: Results From Multiinstitutional Data. *Ann Thorac Surg*, 103, 869-874.

13. Buchanan R. M., Sacks M. S. (2014) Interlayer micromechanics of the aortic heart valve leaflet. *Biomech Model Mechanobiol*, 13, 813-26.
14. Burkert J., Krs O., Vojáček J., Mokráček A., Slížová D., Hlubočský J., Kobylka P., Špatenka J. (2008) Cryopreserved semilunar heart valve allografts: leaflet surface damage in scanning electron microscopy. *Zentralbl Chir*, 133, 367-73.
15. Butany J., Ahluwalia M. S., Fayet C., Munroe C., Blit P., Ahn C. (2002) Hufnagel valve: the first prosthetic mechanical valve. *Cardiovasc Pathol*, 11, 351-3.
16. Carpentier A., Deloche A., Relland J., Fabiani J. N., Forman J., Camilleri J. P., Soyfer R., Dubost C. (1974) Six-year follow-up of glutaraldehyde-preserved heterografts. With particular reference to the treatment of congenital valve malformations. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 68, 771-82.
17. Chester, A.H., Misfeld M., Yacoub M.H. (2000) Receptor-mediated contraction of aortic valve leaflets. *J Heart Valve Dis*, 9(2): 250-4
18. Chow M. J., Zhang Y. (2011) Changes in the mechanical and biochemical properties of aortic tissue due to cold storage. *J Surg Res*, 171, 434-42.
19. Čerbák, R. (2007). *Nejčastější chlopenní vady: aortální stenóza a mitrální insuficience*. Galén.
20. d'Arcy J. L., Prendergast B. D., Chambers J. B., Ray S. G., Bridgewater B. (2011) Valvular heart disease: the next cardiac epidemic. *Heart*, 97, 91-3.
21. Da Costa M. L., Ghofaili F. A., Oakley R. M. (2006) Allograft tissue for use in valve replacement. *Cell Tissue Bank*, 7, 337-48.
22. Davies H., Missen G. A., Blandford G., Roberts C. I., Lessof M. H., Ross D. N. (1968) Homograft replacement of the aortic valve. A clinical and pathologic study. *Am J Cardiol*, 22, 195-217.
23. Dominik J. (2006) Mechanické srdeční chlopně versus bioprotézy. *Interní Med*, 12, 531-533.
24. Dominik J. (2009) Chirurgie srdečních chlopní (... nejen pro kardiochirurgy) ve 200 vyobrazeních. Grada. 42-79
25. Duran C. G., Gunning A. J. (1962) A method for placing a total homologous aortic valve in the subcoronary position. *Lancet*, 2, 488-9.
26. Eckert C. E., Fan R., Mikulis B., Barron M., Carruthers C. A., Friebe V. M., Vyavahare N. R., Sacks M. S. (2013) On the biomechanical role of glycosaminoglycans in the aortic heart valve leaflet. *Acta Biomater*, 9, 4653-60.
27. El-Hamamsy I., Eryigit Z., Stevens L. M., Sarang Z., George R., Clark L., Melina G., Takkenberg J. J., Yacoub M. H. (2010) Long-term outcomes after autograft versus homograft aortic root replacement in adults with aortic valve disease: a randomised controlled trial. *Lancet*, 376, 524-31.

28. El-Hamamsy I., Zaki M., Stevens L. M., Clark L. A., Rubens M., Melina G., Yacoub M. H. (2009) Rate of progression and functional significance of aortic root calcification after homograft versus freestyle aortic root replacement. *Circulation*, 120, S269-75.
29. Fann J. I., Miller D. C., Moore K. A., Mitchell R. S., Oyer P. E., Stinson E. B., Robbins R. C., Reitz B. A., Shumway N. E. (1996) Twenty-year clinical experience with porcine bioprostheses. *Ann Thorac Surg*, 62, 1301-11; discussion 1311-2.
30. Fiala R., Kochová P., Kubíková T., Cimrman R., Tonar Z., Špatenka J., Fabián O., Burkert J. (2019) Mechanical and structural properties of human aortic and pulmonary allografts do not deteriorate in the first 10 years of cryopreservation and storage in nitrogen, *Cell Tissue Bank*. 2019 Mar 22. doi: 10.1007/s10561-019-09762-x. [Epub ahead of print]
31. Fischlein T., Shütz A., Uhlig A., Frey R., Krupa W., Babic R., Thiery J., Reichart B. (1994) Integrity and viability of homograft valves, *Eur J Cardio-thorac Surg*. 8: 425-430
32. Fonck E., Roy S., Rüfenacht D., Stergiopoulos N. (2008) Effect of cryopreservation on the mechanical properties of decellularized arteries, *Journal of Biomechanics*. 41(1)
33. Goffin Y.A.H, Henriques de Gouveia R., Szombathelyi T., Toussaint M.J.M., Gruys E. (1997) Morphologic study of homograft valves before and after cryopreservation and after short-term implantation in patients, *Cardiovascular Pathology*. 6(1): 35-42
34. Greenfield J. C., Patel D. J. (1962) Relation between pressure and diameter in the ascending aorta of man. *Circ Res*. 10, 778-81.
35. Gregor P., Línková H. (2017) Zamyšlení nad chlopenními vadami včera a dnes. *Časopis vnitřního lékařství*, 5.
36. Grosse K., Meyer R., Schmitzer E., Hetzer R., Wesslau C. (2008) Are heart valves from donors over 65 years of age morphologically suitable for transplantation? *Cell Tissue Bank*. 9, 31-6.
37. Gunning A. J., Meade J. B. (1971) Preservation and function of heterologous aortic valves. An experimental study. *Thorax*, 26, 179-83.
38. Halushka M. K., Angelini A., Bartoloni G., Basso C., Batoroeva L., Bruneval P., Buja L.M., Butany J., d'Amati G., Fallon J. T., Gallagher P.J., Gittenberger-de Groot A. C., Gouveia R. H., Kholova I., Kelly K. L., Leone O., Litovsky S. H., Maleszewski J. J., Miller D.V., Mitchell R. N., Preston S. D., Pucci A., Radio S. J., Rodriguez E. R., Sheppard, M. N., Stone J. R., Suvarna S. K., Tan C. D., Thiene G., Veinot J. P., van der Wal A. C. (2016) Consensus statement on surgical pathology of the aorta from the Society for Cardiovascular Pathology and the Association For European Cardio-vascular Pathology: II. Noninflammatory degenerative diseases — nomenclature and diagnostic criteria, *Cardiovascular Pathology* 25 (2016) 247–257
39. Hamdan A., Guetta V., Konen E., Goitein O., Segev A., Raanani E., Spiegelstein D., Hay I., Di Segni E., Eldar M., Schwammenthal E. (2012) Deformation dynamics and mechanical properties of the aortic annulus by 4-dimensional computed tomography:

- insights into the functional anatomy of the aortic valve complex and implications for transcatheter aortic valve therapy. *J Am Coll Cardiol*, 59, 119-27.
40. Hasan A., Ragaert K., Swieszkowski W., Selimović S., Paul A., Camci-Unal G., Mofrad M. R., Khademhosseini A. (2014) Biomechanical properties of native and tissue engineered heart valve constructs. *J Biomech*, 47, 1949-63.
 41. Heimbecker R. O., Baird R. J., Lajos T. Z., Varga A. T., Greenwood W. F. (1962) Homograft replacement of the human mitral valve. A preliminary report. *Can Med Assoc J*, 86, 805-9.
 42. Hinton R. B., Yutzey K. E. (2011) Heart valve structure and function in development and disease. *Annu Rev Physiol*, 73, 29-46.
 43. Hlubocký J., Mokráček A., Nováček V., Vojáček J., Burkert J., Kochová P., Klepáček J., Pepper J., Špatenka, J. (2011) Mechanical properties of mitral allografts are not reasonably influenced by cryopreservation in sheep model. *Physiol Res*. 60(3):475-82.
 44. Hopkins, R. A. (2005). *Cardiac Reconstructions with Allograft Tissues*. Springer-Verlag New York. 107-119
 45. Howard, V., M. (1998). *Unbiased Stereology. Three-Dimensional Measurement In Microscopy*. Springer. 1-16
 46. Hudák R., Balko J., Tonar Z., Varga I. (2016). *Memorix histologie*. Triton.
 47. Hufnagel C. A., Harvey W. P. (1953) The surgical correction of aortic regurgitation preliminary report. *Bull Georgetown Univ Med Cent*, 6, 60-1.
 48. Imura T., Yamamoto K., Satoh T., Kanamori K., Mikami T., Yasuda H. (1990) In vivo viscoelastic behavior in the human aorta. *Circ Res*, 66, 1413-9.
 49. Iung B., Sjögren J. (2018) Prosthetic valves, in ESC CardioMed (3 edn), ed. Camm, A.J., Lüscher, F., Maurer, G., Serruys P.W., Oxford, UK.
 50. Jashari R., Van Hoeck B., Tabaku M., Vanderkelen A. (2004) Banking of the human heart valves and the arteries at the European homograft bank (EHB)--overview of a 14-year activity in this International Association in Brussels. *Cell Tissue Bank*, 5, 239-51.
 51. Kochová P., Tonar Z., Matějka V.M., Švíglerová J., Štengl M., Kuncová J. (2008) Morphology and mechanical properties of the subrenal aorta in normotensive and hypertensive rats, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2008 Dec;152(2):239-45.
 52. Kochová P., Kuncová J., Švíglerová J., Cimrman R., Miklíková M., Liška V., Tonar Z. (2012) The contribution of vascular smooth muscle, elastin and collagen on the passive mechanics of porcine carotid arteries, *Physiol. Meas.* 33, 1335
 53. Kochová P., Witter K., Cimrman R., Mezerová J., Tonar Z. (2013) A preliminary study into the correlation of stiffness of the laminar junction of the equine hoof with the length density of its secondary lamellae, *Equine Veterinary Journal*. 45, 170-175

54. Kováč J., Marek J., Špatenka J. (2019) Vzájemná inspirace české a britské kardiologie. In: Tábořský, M. et al. 90 let české kardiologie. Praha. Mladá fronta, 2019, s. 488-500.
55. Kubíková T., Kochová P., Brázdil J., Špatenka J., Burkert J., Králíčková M., Tonar Z. (2017) The composition and biomechanical properties of human cryopreserved aortas, pulmonary trunks, and aortic and pulmonary cusps. *Ann Anat*, 212, 17-26.
56. Kubíková T., Kochová P., Fiala R., Špatenka J., Burkert J., Králíčková M., Tonar Z. (2016) Histological Composition and Mechanical Properties of Cryopreserved Samples of Aortic and Pulmonary Valves. *Solid State Phenomena*, 258, 341-344.
57. Łagan S. D., Liber-Kneć A. (2017) Experimental testing and constitutive modeling of the mechanical properties of the swine skin tissue. *Acta Bioeng Biomech*, 19, 93-102.
58. Lam C. R., Aram H. H., Munnell E. R. (1952) An experimental study of aortic valve homografts. *Surg Gynecol Obstet*, 94, 129-35.
59. Lansac E., Di Centa I. (2018). Functional Anatomy of the Aortic Valve and Dynamics of Aortic Root. In *Aortic regurgitation*, eds. Vojáček J., Žáček P., Dominik J., Springer, 33-37
60. Matthews A. M. (1998) The development of the Starr-Edwards heart valve. *Tex Heart Inst J*, 25, 282-93.
61. Meyers M. A., Chen P.Y., Lin A. Y.M., Seki Y. (2008) Biological materials: Structure and mechanical properties. *Progress in Materials Science*, 53, 1-206.
62. Měřička P., Špatenka J., Navrátil P. (2011a) Organizace a chirurgická technika odběrů tkání v rámci multiorgánového odběru. In *Odběry orgánů k transplantaci*, ed. Baláž P., Janek J., Adamec M., Karolinum, 240-251.
63. Měřička P., Navrátil P., Špatenka J. (2011b) Legislativa dárcovství a odběru tkání v České republice. In *Odběry orgánů k transplantaci*, ed. Baláž P., Janek J., Adamec M., Karolinum, 223-239.
64. Misfeld M., Subramanian S., Davierwala P., Leontyev S., Borger M. A., Binner C., Mohr F. W. (2012) The unidentified flying object (UFO) operation. Double valve replacement and intervalvular fibrous body reconstruction. *Thorac cardiovasc Surg* 60:V222
65. Mohammadi H., Mequanint K. (2011) Prosthetic aortic heart valves: modeling and design. *Med Eng Phys*, 33, 131-47.
66. Mokráček A., Čanádyová J., Šimůnková Z., Fiala R., Hmirák M., Šulda M., Burkert J., Tintěra J., Kobyłka P., Špatenka, J. (2015) One-year results from cryopreserved mitral allograft transplantation into the tricuspid position in a sheep experimental model. *Physiol Res*, 64, 831-9.
67. Mokráček A., Špatenka J., Šulda M., Toušek F., Pospíšilová H., Vamberra M., Šetina M., Pešl L. (2007) Aortální alograft (homograft) v léčbě chlopenních srdečních vad

- dospělých s důrazem na léčbu infekční endokarditidy aortální chlopně. *Vnitř Lék*, 53 (1), 54-62.
68. Muresian H. (2016) The clinical anatomy of the right ventricle. *Clin Anat*, 29, 380-98.
 69. Muresian H. (2018). Clinical and surgical anatomy of the aortic root. In *Aortic Regurgitation*, eds. Vojáček J., Žáček P., Dominik J., Springer, 7-19.
 70. Murray G. (1956) Homologous aortic-valve-segment transplants as surgical treatment for aortic and mitral insufficiency. *Angiology*, 7, 466-71.
 71. Nkomo V. T., Gardin J. M., Skelton T. N., Gottdiener J. S., Scott C. G., Enriquez-Sarano M. (2006) Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *Lancet*, 368, 1005-11.
 72. Novotný R., Slížová D., Hlubocký J., Krs O., Špatenka J., Burkert J., Fiala R., Mitáš P., Měříčka P., Špaček M., Hlubocká Z., Lindner J. (2018) Structural changes arising from different thawing protocols on cryopreserved human allograft's aortic valve leaflets, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 2018, vol. 27(8), s. 1033-1036.
 73. O'Brien M. F., Stafford E. G., Gardner M. A., Pohlner P. G., McGiffin D. C. (1987) A comparison of aortic valve replacement with viable cryopreserved and fresh allograft valves, with a note on chromosomal studies. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 94, 812-23.
 74. Rezzoug N., Vaes B., de Meester C., Degryse J., Van Pottelbergh G., Mathei C., Adriaensen W., Pasquet A., Vanoverschelde J. L. (2016) The clinical impact of valvular heart disease in a population-based cohort of subjects aged 80 and older. *BMC Cardiovasc Disord*, 16, 7.
 75. Rokyta R. et. al. (2015). *Fyziologie a patologická fyziologie pro klinickou praxi*. Grada, 123-183.
 76. Ross D. N. (1962) Homograft replacement of the aortic valve. *Lancet*, 2, 487.
 77. Ross D.N. (1967) Replacement of aortic and mitral valves with a pulmonary autograft. *Lancet* 1967; 2: 956 - 8.
 78. Ruckdeschel E., Kim Y. Y. (2018) Pulmonary valve stenosis in the adult patient: pathophysiology, diagnosis and management. *Heart*, 105:414-422..
 79. Sacks M. S., Yoganathan A. P. (2007) Heart valve function: a biomechanical perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 362, 1369-91.
 80. Simmons C. A. (2009) Aortic valve mechanics: an emerging role for the endothelium. *J Am Coll Cardiol*, 53, 1456-8.
 81. Stemper B. D., Yoganandan N., Stineman M. R., Gennarelli T. A., Baisden J. L., Pintar F. A. (2007) Mechanics of fresh, refrigerated, and frozen arterial tissue. *J Surg Res*, 139, 236-42.
 82. Stephenson L. W. (2000). *State of the Heart: The Practical Guide to Your Heart and Heart Surgery*. Write Stuff Enterprises, Incorporated, 149-167.

83. Stoliński J., Marek G., Marcinkowska Z., Jaskier M., Barecka D., Bartuś K., Kapelak B., Sadowski J., Dziatkowiak A. (2006) Allogenic heart valve bank in the Department of Cardiovascular Surgery and Transplantology of Jagiellonian University in Cracow - 23 years experience in the treatment of aortic valve or aortic root diseases. *Cell Tissue Bank*, 7, 175-82.
84. Stollerman G. H. (2001) Rheumatic fever in the 21st century. *Clin Infect Dis*, 33, 806-14.
85. Stradins P., Lacis R., Ozolanta I., Purina B., Ose V., Feldmane L., Kasyanov V. (2004) Comparison of biomechanical and structural properties between human aortic and pulmonary valve. *Eur J Cardiothorac Surg*, 26, 634-9.
86. Šetina M. (2014) Přehled vybraných kardiochirurgických operací v České republice 2012. ÚZIS ČR
87. Špaček M., Měřička P., Janoušek L., Štádler P., Adamec M., Vlachovský R., Guňka I., Navrátil P., Thieme F., Špunda R., Burkert J., Staffa R., Němec P., Lindner J. (2019) Current vascular allograft procurement, cryopreservation and transplantation techniques in the Czech Republic, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 28(4)
88. Špatenka J., Kostelka M., Kobyłka P., Hučín B., Honěk T., Lochmann O., Hájek T., Tláskal T., Povýšilová V., Fišer B. (1997) [Preparation, storage, transportation and use of heart valves for allotransplantation]. *Rozhl Chir*, 76, 118-25.
89. Špatenka J., Navrátil P., Adler J., Kobyłka P. (2006) Profesor MUDr. Rudolf Klen, DrSc. nás opustil, *Časopis lékařů českých*, 145, 12, 975
90. Špatenka J., Davies J., Jashari R. (2014) Donald Nixon Ross - Pioneer in Open Heart Surgery and Cardiovascular Tissue Banking died, *Cell Tissue Bank*, 15:501-504
91. Špatenka J., Burkert J. (2018) Allograft Heart Valve in Aortic Valve Surgery. In *Aortic Regurgitation*, ed. Vojáček J., Žáček P., Dominik J., Springer, 155 - 168.
92. Takkenberg J. J., Eijkemans M. J., van Herwerden L. A., Steyerberg E. W., Lane M. M., Elkins R. C., Habbema J. D., Bogers A. J. (2003) Prognosis after aortic root replacement with cryopreserved allografts in adults. *Ann Thorac Surg*, 75, 1482-9.
93. Trojan S. (2003). *Lékařská fyziologie, 4. vydání*. Grada, 179-252
94. Vesely I. (1998) The role of elastin in aortic valve mechanics. *J Biomech*, 31, 115-23.
95. Viidik A. (1979) Biomechanical Behavior of Soft Connective Tissues. *Progress in Biomechanics*, 75-113.
96. Vojáček J., Mokráček A., Špatenka J., Vambera M., Šulda M., Šetina M., Burkert J., Pavel P., Pepper J. (2006) 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*, 131 (6): 511-6

97. Vogel B., Siebert H., Hofmann U., Frantz S. (2015) Determination of collagen content within picosirius red stained paraffin-embedded tissue sections using fluorescence microscopy. *MethodsX*, 2, 124-34.
98. Wertheim J. (1999). *Ilustrovaná encyklopedie Fyzika*. Fragment. 24-25.
99. Whittaker P., Boughner D. R., Kloner R. A. (1989) Analysis of healing after myocardial infarction using polarized light microscopy. *Am J Pathol*, 134, 879-93.
100. Wikipedie: Otevřená encyklopedie: Modul pružnosti v tahu [online]. c2018 [citováno 10. 04. 2019].
https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Modul_pru%C5%BEnosti_v_tahu&oldid=16739641>
101. Yacoub M., Rasmi N. R., Sundt T. M., Lund O., Boyland E., Radley-Smith R., Khaghani A., Mitchell A. (1995) Fourteen-year experience with homovital homografts for aortic valve replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 110, 186-93; discussion 193-4.
102. Zeng Y. I., Sun R., Li X., Liu M., Chen S., Zhang P. (2016) Pathophysiology of valvular heart disease. *Exp Ther Med*, 11, 1184-1188.

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA 1 a-h

Přehled hodnot Spearmanova korelačního koeficientu určujícího vztah mezi délkou kryoprezervace a mechanickými a strukturálními vlastnostmi pro jednotlivé vzorky aortálních a pulmonálních alograftů srdečních chlopní (AASCH).

PŘÍLOHA 2

Fulltext článku:

Fiala R., Kochová P., Kubíková T., Cimrman R., Tonar Z., Špatenka J., Fabián O., Burkert J. (2019) **Mechanical and structural properties of human aortic and pulmonary allografts do not deteriorate in the first 10 years of cryopreservation and storage in nitrogen**, *Cell Tissue Bank*. 2019 Mar 22. doi: 10.1007/s10561-019-09762-x. [Epub ahead of print]

IF 1,527 / 2019

PŘÍLOHA 3

Fulltext článku:

Novotný R., Slížová D., Hlubocký J., Krs O., Špatenka J., Burkert J., Fiala R., Mitáš P., Měřička P., Špaček M., Hlubocká Z., Lindner J. (2018) **Structural changes arising from different thawing protocols on cryopreserved human allograft's aortic valve leaflets**, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 2018, vol. 27(8), s. 1033-1036.

IF 1,262 / 2018

PŘÍLOHA 4

Fulltext článku:

Kubíková T., Kochová P., Fiala R., Špatenka J., Burkert J., Králíčková M., Tonar Z. (2016) **Histological Composition and Mechanical Properties of Cryopreserved Samples of Aortic and Pulmonary Valves**. *Solid State Phenomena*, 2016, 258, 341-344.