

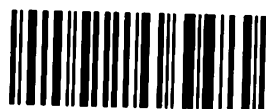
Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Grzegorz J. Lis

**MORFOLOGIA I WŁAŚCIWOŚCI FIZYCZNE
PŁATEKÓW ALLOGENICZNYCH AORTALNYCH
ZASTAWEK SERCA**

Rozprawa doktorska

Bibl. Medyczna CM UJ



1816004693

Katedra Histologii CM UJ

Promotor: Prof. dr hab. med. Tadeusz Cichocki

Kraków 2000

Składam najserdeczniejsze podziękowanie

*Panu Prof. dr hab. Tadeuszowi Cichockiemu
za inspirację tematem, krytyczne uwagi
i życzliwą pomoc w trakcie realizacji pracy,*

*Panu Prof. dr hab. Eugeniuszowi Rokicie
za umożliwienie wykonania badań
fizyko-chemicznych,*

*Panu Prof. dr hab. Romanowi Pawlickiemu
za cenne uwagi dotyczące badań
na poziomie mikroskopii elektronowej,*

*Panu Dr hab. med. Piotrowi Podolcowi
za pomoc w zgromadzeniu danych klinicznych.*

SPIS TREŚCI

STOSOWANE SKRÓTY I OZNACZENIA.....	4
WSTĘP	5
CEL PRACY.....	10
MATERIAŁ I METODY	13
WYNIKI	18
DYSKUSJA.....	38
WNIOSKI	55
STRESZCZENIE.....	56
PIŚMIENNICTWO.....	59
DOKUMENTACJA FOTOGRAFICZNA	67

Stosowane skróty i oznaczenia

AAS	- spektrometria metodą absorpcji atomowej
(B-D)	- bezwzględna różnica wieku między biorcą i dawcą zastawki
el. elast.	- elementy elastyczne
H-E	- hematoksylina i eozyna
IA	- niedomykalność zastawki aortalnej
IZW	- infekcyjne zapalenie wsierdza
MED	- mediana
n	- liczebność próby
NS	- różnice nieznamiennie statystycznie
R	- współczynnik korelacji
R-F	- rezorcyno-fuksyna
SA	- zwężenie zastawki aortalnej
SD	- odchylenie standardowe w próbie
SEM	- skaningowy mikroskop elektronowy
s.m.	- sucha masa
\bar{x}	- średnia arytmetyczna

Wstęp

Przeszczepianie allogenny (homogeny) zastawek serca jest metodą o udowodnionej przydatności w leczeniu wad zastawkowych. Naturalne, ludzkie zastawki cechują się dobrymi właściwościami hemodynamicznymi i niewielkim zagrożeniem powstawania zmian zakrzepowo-zatorowych. Szczególnie u chorych z przeciwwskazaniami do stosowania środków przeciwzakrzepowych lub czynnym procesem zapalnym wykazują przewagę nad zastawkami sztucznymi. Istotną wadą homograftów jest natomiast ich stopniowa degeneracja w organizmie biorcy. Również konieczność odpowiedniego przygotowania i przechowywania materiału do przeszczepu stanowi pewne ograniczenie tej metody leczenia.

Upłynęło już ponad trzydzieści pięć lat od pierwszego wszczepienia allogennej aortalnej zastawki serca w ujście aortalne [11,73]. Od tego czasu udoskonalono zarówno samą technikę operacyjną jak i sposób przygotowania samej zastawki przed zabiegiem. Wiele prac poświęcono próbom wyjaśnienia przyczyn dysfunkcji i ograniczenia zmian degeneracyjnych płatków przeszczepionych zastawek.

Płatek zastawki aortalnej jest fałdem włóknistej tkanki łącznej o grubości poniżej 1 mm pokrytej śródbłonkiem. Chemicznie głównym składnikiem płatka jest kolagen (ok. 55% suchej masy) i elastyna (ok. 13% suchej masy), tworzące włókna kolagenowe i sprężyste. Dominuje kolagen typu I [14,36]. Pozostałą przestrzeń wypełniają elementy istoty podstawowej (glikoproteiny i proteoglikany) oraz komórki fibroblastyczne luźno rozlokowane pomiędzy składnikami substancji międzykomórkowej. Płatki nie posiadają unaczynienia, a odżywanie komórek zrębu odbywa się drogą dyfuzji z obmywającej płatki krwi.

Na przekroju (idąc od góry) daje się wyróżnić w płatku trzy warstwy, z których obie zewnętrzne są warstwami strukturalnymi:

- *fibrosa* – warstwa włóknista; najgrubsza warstwa (0,3 - 0,4 mm) zbudowana głównie z wielu pokładów faliście przebiegających włókien kolagenowych biegnących okrężnie (w kierunku spoidła) i promieniście (od podstawy do szczytu płatka) oraz niewielkiej ilości włókien elastycznych łączących się z nimi i wymuszających falisty przebieg włókien kolagenowych,

- *spongiosa* – rodzaj wiotkiej tkanki łącznej, której głównym składnikiem są glikozaminoglikany istoty podstawowej wiążące cząsteczki wody,
- *ventricularis* – warstwa sprężysta; o połowę cieńsza niż *fibrosa* (ok. 0,2 mm); zawiera głównie włókna sprężyste i amorficzną elastynę łączącą przebiegające tu głównie promieniście włókna kolagenowe.

Ciekawym szczegółem architektoniki płotka zastawki aortalnej jest efekt pofałdowania całej górnej warstwy (*fibrosa*), które jest wymuszone jak się wydaje przez połączenie z elementami sprężystymi *ventricularis*. Rozdzielenie obu warstw strukturalnych powoduje wygładzenie powierzchni *fibrosa* i jednocześnie ograniczenie do 20% eksperymentalnej rozciągliwości tej warstwy. Rozciągliwość całego płotka w kierunku promienistym wynosi u młodych ludzi ok. 60% jego początkowej długości. Z wiekiem zastawka traci właściwości elastyczne do ok. 20% w wieku 60 lat, przy czym najszybciej proces ten przebiega między 15 a 25 rokiem życia [20,23,42,56,79,83,97].

Głównym czynnikiem decydującym o długości prawidłowego funkcjonowania przeszczepu jest tempo w jakim powstają zmiany degeneracyjne w płatkach zastawki [3]. Istotne znaczenie mają tu warunki przechowywania oraz sposób konserwacji i wyjaławiania zastawek. Początkowo stosowane metody między innymi z zastosowaniem aldehydu glutarowego, tlenu etylenu czy glicerolu z powodu niekorzystnych efektów wywieranych na tkanki zastąpiono stosowaniem tak zwanych świeżych zastawek przechowywanych w płynach odżywczych i antybiotykach w temperaturze 4°C lub też zastawek mrożonych, powoli schładzanych do temperatury ciekłego azotu [2,89]. Metody te mają zapewnić zachowanie żywych komórek w tkance łącznej płatków, co sprzyja zachowaniu prawidłowej struktury substancji międzykomórkowej, jej właściwości mechanicznych i według niektórych autorów w konsekwencji decyduje o długości prawidłowego funkcjonowania przeszczepu [18,28,62].

Badania eksperymentalne wykazują, że zastawki zamrożone do 24 godzin od chwili śmierci dawcy, zachowują więcej żywych komórek w momencie implantacji niż zastawki trzymane w płynach odżywczych w 4°C [2]. Nawet jednak zamrażanie nie zapewnia dużej przeżywalności fibroblastów nie mówiąc już o komórkach endotelialnych, które tylko fragmentarycznie pokrywają powierzchnię wszczepianych

zastawek. W uznawanych za „żywe” mrożonych zastawkach aortalnych jedynie w około 20% przypadków udało się potwierdzić żywotność komórek metodą hodowli lub autoradiograficznie [5]. Uwagę badaczy zwróciło przy tym nierównomierne rozmieszczenie żywych komórek w płatkach oraz obecność miejsc całkowicie pozbawiona komórek. W badaniach tych warstwą prawie całkowicie pozbawioną żywych fibroblastów była *ventricularis*, wykazująca początkowo największą gęstość znacznika w autoradiografii. Wydaje się, że największy ubytek żywych komórek dokonuje się w pierwszych 24 godzinach od momentu pobrania zastawek ze zwłok.

Argumentami przemawiającymi za zachowaniem jak największej liczby żywych komórek jest aktywność fibroblastów prowadząca do ciągłej odbudowy białek substancji międzykomórkowej, co sprzyja utrzymaniu integralności strukturalnej i umożliwia naprawę mikrouszkodzeń tkanek zastawki. Istnieją też poglądy wykazujące ujemne skutki obecności żywych komórek dawcy w grafacie. Ich działalność przyczynia się do włóknienia i pogrubienia płatków, ich deformacji i ograniczenia ruchomości.

Należy również pamiętać, że przeszczepienie allogennej zastawki indukuje odpowiedź immunologiczną biorcy. Z tego powodu obecność żywych komórek obdarzonych silną antygenowością (zwłaszcza endotelium, w mniejszym stopniu fibroblasty), może nasilać reakcje immunologiczne przyczyniając się do skrócenia funkcjonowania przeszczepu [68].

Znaczenie wpływu odrzucania przeszczepionej zastawki na długość jej funkcjonowania nie jest jasne. Porównawcze badanie trzech użytych do przeszczepu grup zastawek o odmiennym pochodzeniu (homograftów, zastawek pochodzących z przeszczepionego pacjentowi serca i autograftu zastawkowego), wykazało obecność nacieków limfocytów T tylko w niektórych zastawkach pierwszej grupy. Zmiany destrukcyjne natomiast występowały we wszystkich zastawkach tej grupy. W zastawkach z przeszczepionego serca i w przypadku autograftu brak było widocznych oznak destrukcji aparatu zastawkowego [59]. W świetle obecnych badań wydaje się, że zastawki mrożone jak i świeże w podobnym stopniu indukują odpowiedź immunologiczną. Nie wpływa ona jednak w istotny sposób na szybkość niszczenia zastawek allogennych i długość trwania przeszczepu [50,51,57,63,98].

Ostateczną ocenę wpływu obecności żywych komórek na długość funkcjonowania przeszczepu komplikuje fakt niejednoznacznych wyników badań tego zagadnienia. Badania przeprowadzane metodycznie podobnie, przez różne zespoły badawcze, często przynoszą odmienne wyniki. Istnieją doniesienia wykazujące większą przeżywalność zastawek „żywych” (mrożonych), jak też prace wykazujące brak dłuższego przeżycia tak przechowywanych zastawek w porównaniu ze świeżymi [3,62].

Czynnikiem który również może wpływać na długość trwania przeszczepu jest zachowanie prawidłowego składu istoty podstawowej. Zmiana struktury bądź wypłukanie glikoproteidów może być decydujące dla zachowania integralności tkanki łącznej i trwałości zastawki [13,40]. Brak w macierzy substancji maskujących miejsca w cząsteczkach kolagenu istotne dla tworzenia wiązań z grupami fosforanowymi, może przyczyniać się do przyspieszenia mineralizacji płatków [55].

O charakterze powstających zmian w płatkach nie decyduje jak się wydaje sposób przygotowania zastawki [77]. Ma on natomiast znaczenie w tempie progresji tych zmian [37,38]. Wyniki prac różnych ośrodków nie pozwalają jednak dowieść wyższości jednej z dwu obecnie stosowanych metod przygotowania zastawek (mrożenie, płyn odżywczy + antybiotyki). Chociaż zamrażanie wydaje się w mniejszym stopniu wpływać na zmiany w strukturze płatków, to jednak nie daje to zdecydowanej przewagi wyrażającej się zdecydowanie dłuższym funkcjonowaniem zastawki [7]. Po 10-ciu latach funkcjonowania wolne od defektów jest ok. 80% zastawek aortalnych mrożonych i ok. 70% świeżych. Po 15 latach nie wymagało reoperacji 69% zastawek mrożonych i 58% świeżych [47,54,61,63]. W niektórych pracach, zauważono większą tendencję do degeneracji i uszkodzenia zastawek mrożonych niż trzymany w płynach w pierwszych 5-ciu latach po implantacji [16].

Zmiany histologiczne obserwowane w eksplantowanych zastawkach nie są jednorodne choć wszystkie prowadzą do ich dysfunkcji. W niektórych przypadkach mamy do czynienia ze zmniejszeniem grubości i niedomykalnością płatków, czasem natomiast pojawia się zwłóknienie, utrata sprężystości i mineralizacja [24,74].

W opublikowanych do tej pory pracach opisywano występowanie w homograftach usuniętych po różnym okresie funkcjonowania (dni, miesiące, lata), w różnym stopniu nasilonych następujących zmian:

- włóknienie, nierównomierne pogrubienie lub zmniejszenie grubości płatków, występujące zwłaszcza w zastawkach przechowywanych w płynie odżywczym z antybiotykami w 4°C,
- w większości przypadków całkowity brak śródbłonka
- znaczną redukcję liczby lub całkowity brak komórek fibroblastycznych
- częściowe lub całkowite zatarcie struktury trójwarstwowej
- brak naturalnego pofałdowania powierzchni płatka
- zmienną ilość nacieków komórkowych - głównie jednojądrzastych lub mieszanych
- obecne wylewy krwawe, zakrzepy przyścienne, zwapnienia częściej występujące u młodych biorców [37,38,57,69].

Cel pracy

Pomimo ponad trzydziestoletnich doświadczeń z zastosowaniem allograftów zastawek aortalnych, wciąż dyskutowany i nie do końca jasny jest mechanizm oraz przyczyny ich destrukcji w organizmie biorcy. Również nie ma jasności co do funkcjonalnego znaczenia zmian patologicznych powstających z upływem czasu w zastawkach.

Celem przeprowadzonych badań była:

- ocena histologiczna zmian powstających w płatkach allogenicznych, ludzkich zastawek aortalnych, wszczepionych ortotopowo i usuniętych z powodu dysfunkcji w różnym czasie po implantacji,
- analiza mineralogiczna usuniętych płatków,
- ocena ich wytrzymałości i elastyczności,
- porównanie struktury mikroskopowej, mineralizacji i właściwości mechanicznych płatków usuniętych zastawek z płatkami zastawek przeznaczonych do wszczepienia (pochodzących z Banku Zastawek)
- próba oceny przyczyn powstawania obserwowanych zmian prowadzących do konieczności usunięcia zastawki.

Material i metody

1. Material

Badany materiał w całości pochodził z Kliniki Chirurgii Serca i Naczyń Instytutu Kardiologii Collegium Medicum UJ. Przedmiotem analizy były płatki 32 allogeniczných ludzkich zastawek aortalnych, wszczepione w Klinice w latach 1980 – 1993 (w czterech przypadkach w Klinice Kardiochirurgii łódzkiej AM w latach 1977 i 78), a usunięte w latach 1996 – 1998 z powodu dysfunkcji. W reoperowanej grupie było 28 mężczyzn (87,5%) i 4 kobiety (12,5%) w wieku od 20 do 69 lat (średnio 49 ± 12 lat). W chwili wszczepienia homografitów wiek pacjentów wynosił od 13 do 61 lat (średnio $37,4 \pm 11,47$ lat). Powstała u nich wada serca miała głównie podłoże reumatyczne (63%). Stwierdzono po jednym przypadku tętniaka rozwarstwiającego aorty i tętniaka zatoki Valsalvy, a także w jednym przypadku wrodzoną anomalię zastawki (zastawka dwupłatkowa). W przypadku jednego pacjenta przyjęto etiologię miażdżycową wady. W 12 przypadkach (37,5%) u chorych stwierdzono bakteryjne zapalenie wsierdza. Proces chorobowy w 14 przypadkach (44%) doprowadził do złożonej wady zastawki aortalnej (IA+SA), w 10 (31%) do jej niedomykalności (IA), a w 8 przypadkach (25%) dominowała stenoza aortalna (SA).

Dysfunkcja badanych zastawek homogenných wystąpiła w czasie od 28 do 244 miesięcy (średnio $139,2 \pm 52,14$ m-ca; 11,6 lat) po wszczepieniu. Przed reoperacją stwierdzono w 23 przypadkach (72%) niedomykalność homografitu, w 7 (22%) wadę złożoną, a w 2 przypadkach (6%) zwężenie lewego ujścia tętniczego. Rzeczywisty wiek ocenianých w badaniu zastawek (wiek dawcy + czas funkcjonowania przeszczepu) wynosił od 20 do 61 lat (średnio $42,7 \pm 9,13$ lat).

Grupę porównawczą stanowiły płatki 20 nieprzeszczepioných zastawek aortalnych (w 17 przypadkach (85%) pochodzące od mężczyzn, a w 3 (15%) od kobiet), otrzymane z Banku Allogenných Zastawek Serca działającego przy Klinice Kardiochirurgii CM UJ. Tam również były przygotowywane niemal wszystkie (28) badane homografty.

Dawcami obu analizowaných grup zastawek były osoby zmarłe z przyczyn losowych głównie w wyniku wypadków, zabójstw lub samobójstw. Zastawki pobierane były w

Zakładzie Medycyny Sądowej CM UJ w czasie rutynowych sekcji zwłok, przeprowadzanych do 18 godzin po zgonie. Zasady postępowania i prawne aspekty zagadnienia zostały opisane przez Marka i wsp. [53]. Średni wiek dawców zastawek badanej grupy wynosił $33 \pm 8,2$ lat (max./min. 49/18 lat). W grupie porównawczej wynosił on $37,2 \pm 13,75$ lat (max./min. 57/14 lat) i nie różnił się istotnie od wieku rzeczywistego badanych homografitów ($p > 0,05$). Był natomiast istotnie niższy niż średni wiek biorców w chwili reoperacji ($p < 0,01$).

Przed przyjęciem do Banku wszystkie zastawki poddawane były analizie morfologicznej, ocenie szczelności i badaniu mikrobiologicznemu. Zastawki pochodzące ze zwłok podlegały procesowi wyjąłowania (24 – 48 godzin; 4°C) w płynie sterylizującym, zawierającym zestaw antybiotyków (Claforan /*cefotaksym*/, Carbenicillin, Neomycinum, Polimyxin B, Fungizone /*amphotericin*/) i podłoże RPMI 1640 z L-Glutaminą i NaHCO_3 (BIOMED – Lublin). Następnie umieszczane były w płynie konserwującym (płyn Parkera (BIOMED – Lublin), Natrium Bicarbonicum 8,4%, Penicillinum, Streptomycinum, Diflukan /*fluconazole*/) i przechowywane do 28 dni w temperaturze 4°C . Dokładny sposób przygotowania i skład płynów był zgodny z podanym przez Yacouba [89] z późniejszymi modyfikacjami i został przedstawiony w pracy Działkowiaka i wsp. [32].

Przy doborze zastawki do przeszczepu kierowano się głównie jej rozmiarem, który musiał być zgodny ze średnicą ujścia tętniczego biorcy. Nie przeprowadzano natomiast typowania pod kątem zgodności układu HLA ani zgodności grupowej krwi biorcy i dawcy. Powyższy sposób postępowania jest przyjęty w większości ośrodków kardiochirurgicznych na świecie. Zastawki były wszczepiane metodą Rossa [75], zmodyfikowaną następnie przez Barratt-Boyesa [12], a od 1986 roku według zmodyfikowanej metody Działkowiaka [31,33].

Tab. 1 Grupa badana (usunięte homografty) i grupa porównawcza (zastawki nieprzeszczepione) pod względem płci i wieku.

		Grupa badana (n = 32)	Grupa porównawcza (n = 20)
Płeć	Mężczyźni	28 (87,5%)	17 (85%)
	Kobiety	4 (12,5%)	3 (15%)
Wiek rzeczywisty zastawek (lat)	max./min.	61 / 20	57 / 14
	\bar{x}	42,7	37,2
	SD	9,13	13,75
Różnice statystyczne płci i wieku rzeczywistego zastawek pomiędzy obu grupami		NS p > 0,05	

Tab. 2 Pacjenci grupy badanej - wiek i typ wady serca w czasie operacji (wszczepienie homograftu) i reoperacji (wymiana homograftu lub zastąpienie go zastawką sztuczną).

Operacja			Wiek (lat)	Reoperacja			Wiek (lat)	Czas funkcjonowania homograftu (m-ce)
Typ wady Liczba przypadków (%)				Typ wady Liczba przypadków (%)				
IA+SA	IA	SA		IA+SA	IA	SA		
14 44%	10 31%	8 25%		7 22%	23 72%	2 6%		
max./min.			61 / 13	max./min.			69 / 20	244 / 28
\bar{x}			37,4	\bar{x}			48,9	139,2
SD			11,47	SD			12,03	52,14

2. Metodyka badań

W pracy zastosowano badania morfologiczne, fizykochemiczne i wytrzymałościowe płatków zastawek. Metody morfologiczne obejmowały ocenę makroskopową, a następnie mikroskopową z zastosowaniem mikroskopu optycznego, mikroskopu elektronowego skaningowego (SEM) i komputerowego analizatora obrazu. Wyniki analizowano z uwzględnieniem wybranych danych klinicznych dotyczących reoperowanych pacjentów w tym przebycie IZW, inne choroby i stany infekcyjne, nadciśnienie tętnicze, zaburzenia lipidowe.

Wstępne przygotowanie materiału.

Usunięty w trakcie reoperacji materiał dzielony był na trzy grupy, w miarę możliwości technicznych według następującego schematu:

- do badań wytrzymałościowych – najlepiej zachowany płatek (bez utrwalania),
- do mikroskopii optycznej – połowy z dwu pozostałych płatków (przeciętych promieniście od pierścienia do środka wolnego brzegu), utrwalane w formaldehydzie 4% przez okres 5 dni w temperaturze pokojowej (jedna połowa płatka) lub alkoholu etylowym 99,6% przez okres 2 dni w 4°C (druga połowa płatka),
- do mikroskopii elektronowej - wąskie paski biegnące wzdłuż linii rozcięcia płatków utrwalane przez okres 5 godz. w 2,5% aldehydzie glutarowym buforowanym buforem kakodylowym o pH = 7,3 w temp. 4°C,
- do badań fizykochemicznych – pozostałe połowy płatków (w alkoholu etylowym 99,6%).

Podobny schemat postępowania stosowano w przypadku płatków zastawek grupy porównawczej.

Mikroskopia świetlna.

Dla celów mikroskopii optycznej utrwalony materiał zatapiano w parafinie i krojono przy użyciu mikrotomu na skrawki o grubości 7 μm , wzdłuż płaszczyzny poprzecznego przekroju biegnącego promieniście od pierścienia do wolnego brzegu płątka. Po odparafinowaniu skrawki materiału utwalonego 4 % formaldehydem barwiono przeglądowo hematoksyliną i eozyną oraz metodą azan-Mallory, a także rezorcyno-fuksyną (wg Weigerta) w celu wykazania elementów elastycznych [8] i metodą von Kossa w celu oceny mineralizacji [67]. Na skrawkach utwalanych w alkoholu etylowym przeprowadzano reakcję PAS oraz barwienie błękitem alcjanowym w celu wykazania obecności obojętnych i kwaśnych glikozaminoglikanów [67]. Po zabarwieniu skrawki zamykano w balsamie kanadyjskim. Zastosowane metody barwienia pozwalały na uwidocznienie komórek jak i poszczególnych pozakomórkowych elementów składowych płątka.

Analiza morfometryczna.

Oceny niektórych parametrów (liczebność komórek, pola powierzchni i grubość płątka, ilość elementów elastycznych) dokonano półautomatycznie przy pomocy komputerowego analizatora obrazów mikroskopowych, składającego się z kamery czarno-białej CCD K 17 (WZT - Warszawa) zamontowanej na mikroskopie optycznym JENAMED (Carl Zeiss Jena) i współpracującej z komputerem klasy IBM PC z zainstalowaną kartą analizy obrazu IMAGER-512 (IMAL – Łódź) wraz z oprogramowaniem, pozwalającym na uzyskiwanie obrazów o rozdzielczości 512 x 512 pikseli i 256 odcieniach szarości. Podane w pracy wyniki stanowią średnią otrzymaną w wyniku pomiarów dokonanych na skrawkach pochodzących w miarę możliwości z trzech różnych rejonów płątka (przyspoidłowego, centralnego i pośredniego).

Pomiarów elementów elastycznych dokonywano na skrawkach barwionych rezorcyno-fuksyną wzdłuż trzech linii dzielących płatek (od pierścienia do wolnego brzegu) na równe odcinki i przebiegających poprzecznie do przekroju płątka. Ilość i rozmieszczenie elementów elastycznych przedstawiano w formie wykresu jasności punktów położonych wzdłuż powyższych linii, po zakontrastowaniu, inwersji i

wyprogowaniu obrazu komputerowego płątka. Każdy pik na wykresie odpowiadał obecności włókna elastycznego w badanym płątku.

Na komputerowych obrazach skrawków barwionych metodą von Kossa oceniano rozległość procesu mineralizacji drobinowej przejawiającej się rozsianą drobnoziarnistą reakcją w zrębie płątka. Obszary te zaznaczano kursorem i wyliczano ich powierzchnię jak również powierzchnię całego skrawka. Stopień mineralizacji drobinowej odzwierciedlał procentowy stosunek wyliczonych powierzchni.

Osobno oceniano w skrawkach obecność dużych, wyraźnie odgraniczonych zwapniałych tworów. Za wynik dodatni przyjmowano stwierdzenie przynajmniej dwóch zwapnień o średnicy nie większej niż 100 μm , lub przynajmniej jednego o większej średnicy.

Skaningowa mikroskopia elektronowa.

Do celów mikroskopii elektronowej skaningowej utrwalony materiał płukano buforem kakodylowym z sacharozą i wodą destylowaną. Następnie poddawano osmowaniu 1% czterotlenkiem osmu w czasie 6 godzin w temp. 4°C, odwadniano w acetonie (50%, 100%) i suszono. Powierzchnie górne, dolne i powierzchnię przekroju płątka pokrywano w napyłarce próżniowej złotem i poddawano analizie mikroskopowej.

Badania fizykochemiczne i wytrzymałościowe.

Spektrometria metodą absorpcji atomowej (AAS) posłużyła do określenia koncentracji wapnia i fosforu w badanych płątkach jako wskaźnika stopnia ich mineralizacji. Dla wykonania pomiarów płątki odtłuszczano w mieszaninie chloroformu i metanolu (3:1), po czym suszono w komorze próżniowej przez 48 godzin. Suchy materiał proszkowano w moździerzu agatowym, a następnie odważano 2 mg które rozpuszczano w mieszaninie kwasu nadchlorowego (8 ml) i azotowego (2 ml). Otrzymany roztwór podgrzewano przez 5 godzin do temperatury 180°C i po uzupełnieniu wodą destylowaną do objętości 25 ml badano w spektrometrze AAS.

Badania wytrzymałościowe przeprowadzono jedynie dla części płatków, których stan fizyczny umożliwił zastosowanie przyjętej metody. Bezpośrednio po pobraniu materiału (do 4 godzin) płatki odcinano od pierścienia włóknistego i w najszerszym miejscu wycinano pasek o szerokości nie mniejszej niż 5 mm. Pomiarów dokonywano przy pomocy aparatu Instron do badań wytrzymałościowych. Wycinki umieszczano na wydrążonym walcu o średnicy 4 mm i poddawano działaniu siły przy pomocy trzpienia o średnicy 3,1 mm, przesuwanego się ze stałą prędkością 5 mm/min. Rejestrowano wartość siły przesuwanego trzpienia w zależności od jego wysunięcia i określano wartość siły zrywającej oraz wysunięcie trzpienia przy którym następuje rozerwanie próbki.

3. Analiza statystyczna

Analizy statystycznej otrzymanych wyników dokonano przy użyciu pakietu oprogramowania statystycznego Statgraphics Plus 2.1 zainstalowanego na komputerze klasy IBM PC.

Przy porównywaniu parametrów zebranych w skali interwałowej w dwu badanych grupach stosowano test t-Studenta dla zmiennych nie powiązanych, lub w przypadku braku normalności rozkładu lub dużej skośności rozkładu zastępowano go testem Manna-Whitneya.

W przypadku porównywania średnich większej liczby grup stosowano analizę wariancji (*one-way ANOVA*).

Dla porównania danych zebranych w skali nominalnej stosowano test chi-kwadrat lub dokładny test Fishera-Snedecora.

W celu stwierdzenia związku oraz oszacowania jego siły i istotności statystycznej stosowano metody korelacyjne (wyznaczając współczynnik korelacji (R) lub ryzyko względne), jak również przeprowadzano analizę regresji badając kształt stwierdzonego związku między zmiennymi.

Różnice uznawano za znamienne przy poziomie istotności $p < 0,05$.

Wyniki

Obserwacje makroskopowe.

Wszystkie zastawki usunięte w trakcie reoperacji (n = 32) cechował znaczny stopień uszkodzenia struktury polegający na skróceniu płatków i deformacji ich pozostałych, przylegających do pierścienia fragmentów. Dominującym obrazem w 22 przypadkach (69%) była destrukcja i nierównomierna redukcja powierzchni oraz grubości płatków bez zrostów między spoidłami. W 10 z nich (31%) nastąpiło niemal zupełne zniszczenie płatków, a ich pozostałość stanowił jedynie wąski fałd tkanki bezpośrednio przy pierścieniu. Zmniejszenie powierzchni płatków było przyczyną niedomykalności zastawki klinicznie stwierdzanej w 30 przypadkach (94%). W 10 zastawkach (31%) dominowało stwardnienie, deformacja, nierównomierne pogrubienie i skrócenie płatków. Ogniska stwardnień wskazujące na obecność zwapnień, koncentrowały się u podstawy, a także w rejonach spoidel i zdeformowanego wolnego brzegu płatków. W 14 przypadkach (44%) widoczne były dość luźno związane z podłożem skrzepliny i przekrwiona ziarnina, natomiast w trzech płatkach (9%) przy podstawie obecne były ogniska kaszowatej ziarniny. W pięciu przypadkach (16%) widoczna była perforacja płatków, a w trzech (9%) krwawe wybroczyny pod powierzchnią. Stopień uszkodzenia poszczególnych płatków w obrębie jednej zastawki, był w większości przypadków nierównomierny. Obraz zmian makroskopowych przedstawiono w tabeli (Tab. 3).

Ocena makroskopowa zastawek grupy porównawczej (n = 20) wykazała w pięciu przypadkach (25%) niewielkiego stopnia pogrubienie i utratę przejrzystości zwłaszcza bliżej podstawy płatka. W dwóch przypadkach (10%) zgrubienia występowały ogniskowo. W jednej zastawce przy wolnym brzegu płatka widoczna była drobna (1–2mm), polipowata narośl mocno zespolona z podłożem. Szczelinowate fenestracje znaleziono w trzech przypadkach (15%). Dwukrotnie w rejonie wolnego brzegu płatka i raz w okolicy spoidła. W 6 przypadkach (30%) u podstawy płatków obecne były drobne (ok. 1mm) biało-żółtawe blaszki miażdżycowe. Makroskopową ocenę grupy porównawczej zebrano w tabeli (Tab. 4).

Tab. 3 Zmiany makroskopowe usuniętych homografów aortalnych.

Dominujący typ zmian makroskopowych		Liczba przypadków n = 32 (100%)
Płatki atroficzne o zredukowanej powierzchni i miejscami zmniejszonej grubości z niewielkimi obszarami nieprzejrystych zgrubień wskazujących na zwłóknienie.		22 (69%)
skrzepliny i przekrwiona ziarnina	9	
wybroczyny podpowierzchniowe	2	
perforacje i rozerwania płatka	8	
Płatki stwardniałe, zdeformowane, miejscowo pogrubiłe z ogniskami zwłóknień i zwapnieniami.		10 (31%)
skrzepliny i przekrwiona ziarnina	5	
biaława kaszowata ziarnina	3	
podpowierzchniowe wybroczyny	5	
perforacje płatka	2	

Tab. 4 Makroskopowa ocena płatków zastawek grupy porównawczej.

Rodzaj zmiany	Liczba przypadków n = 20 (100%)
Płatki o prawidłowej budowie i elastyczności, przejrzyste, bez widocznych zmian.	10 (50%)
Odcinkowe pogrubienie i zmniejszenie przejrzystości.	7 (35%)
Polipowata pojedyncza narośl przy wolnym brzegu płatka.	1 (5%)
Pojedyncze blaszki miażdżycowe u podstawy płatka.	6 (30%)
Szczelinowate fenestracje.	3 (15%)

Ocena mikroskopowa zastawek porównawczych.

Wszystkie badane zastawki grupy porównawczej posiadały płatki o wyraźnej trójwarstwowej strukturze i falistym przebiegu włókien kolagenowych (Fot. 1,2). W mikroskopie elektronowym (SEM) pomiędzy poszczególnymi poziomami grubych, faliście przebiegających włókien w *fibrosa* widoczne były mostki utworzone przez cienkie, poprzecznie biegnące włókna. Tworzyły one również układy sieciowe towarzyszące włóknom kolagenowym (Fot. 26). W *ventricularis* dominowały włókna o średnicy 1 - 2 μ m przebiegające faliście i grupujące się w szersze pasma o równoległym przebiegu. W mikroskopie elektronowym przybierały one raczej formę równoległych blaszek połączonych drobnymi włókienkami (Fot. 27)

Fałdowanie powierzchni warstwy włóknistej było zachowane w 4 przypadkach (20%), a w 3 dalszych (15%) jedynie miejscami zredukowane. W pozostałych płatkach powierzchnia *fibrosa* była na znacznych obszarach wygładzona (Fot. 4,5A). We wszystkich przypadkach występowały ubytki śródbłonka pokrywającego płatki; w siedmiu – niewielkiego stopnia, w jedenastu – znaczne, a w dwóch śródbłonek był całkowicie zniszczony. W tych przypadkach w mikroskopie elektronowym na powierzchni płatków widać było bezpostaciową substancję i odsłonięte włókna zrębu (Fot. 28). W wielu płatkach zaobserwowano odwarstwienie śródbłonka, nieraz na znacznych odcinkach (Fot. 3).

Średnia liczba komórek fibroblastycznych zrębu płatka wynosiła $393,4 \pm 180,4/\text{mm}^2$. Ich rozmieszczenie było w 8 przypadkach (40%) równomierne w poszczególnych warstwach płatka, w 8 innych (40%) przeważały w *spongiosa* i *ventricularis*, a w 4 (20%) bogatsza w komórki była *fibrosa*. W 12 płatkach (60%) widoczne były duże bezkomórkowe obszary. Całkowity brak fałdowania powierzchni *fibrosa* występował w płatkach ubogich w komórki zrębu w tej warstwie, z licznymi obszarami bezkomórkowymi i w całości lub znacznym stopniu uszkodzonym śródbłonkiem (Fot. 4).

W żadnym płatku nie zaobserwowano nacieków zapalnych, a w trzech przypadkach (15%) obecne były ogniskowe zwłóknienia zrębu (przejawiające się pogrubieniem włókien i ich bardziej zbitym ułożeniem), pojedyncze komórki limfocytarne (Fot. 29)

lub niewielkie blaszki zlokalizowane od strony *ventricularis*, złożone głównie z komórek piankowatych.

W dwu przypadkach (10%) pogrubiała była bogata w glikozaminoglikany *spongiosa*, natomiast w 3 płatkach (15%) barwienie histochemiczne niemal zupełnie nie wykazało tych związków w warstwie włóknistej.

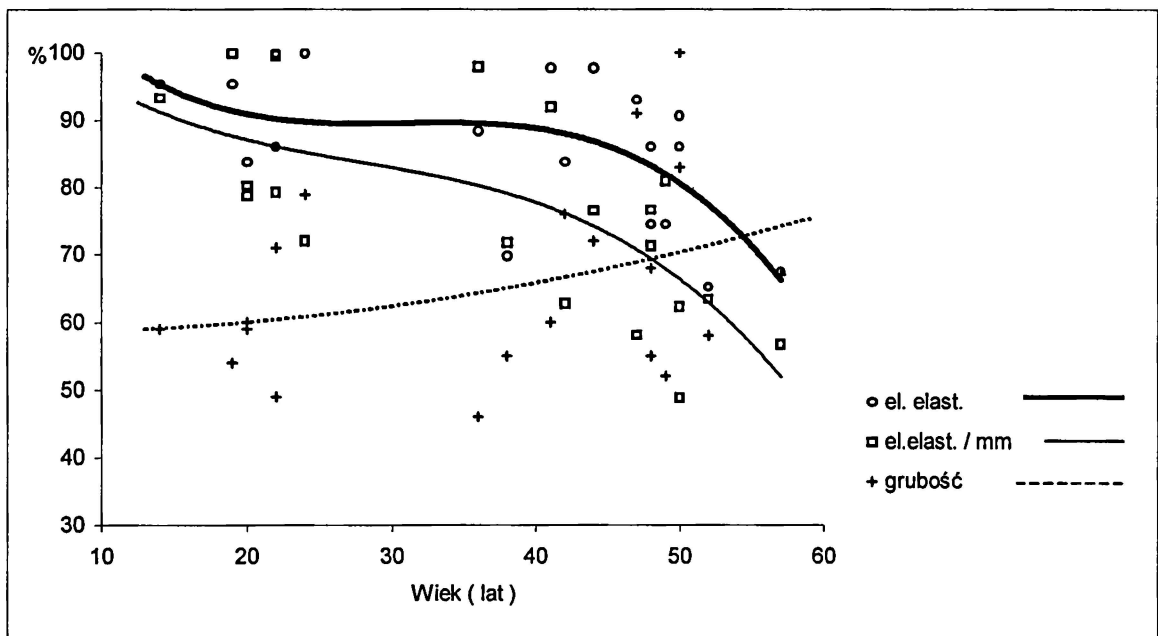
Grubość płatków wynosiła średnio $0,65 \pm 0,14$ mm, a stwierdzony wzrost grubości z wiekiem zastawki nie był istotny statystycznie. Rozmieszczenie elementów elastycznych było prawidłowe we wszystkich zastawkach, wyraźnie dzieląc płatek barwiony metodą Weigerta na ciemną sprężystą warstwę skierowaną do komory serca i jasną, sąsiadującą ze światłem aorty warstwę włóknistą (Fot. 5A,6A). Grube przebiegające wzdłużnie włókna w *ventricularis*, łączyły się między sobą za pomocą drobnych, poprzecznych włókienek. W *fibrosa* włókna były zdecydowanie drobniejsze i przebiegały wzdłuż włókien kolagenowych o falistym przebiegu, oddając w ich kierunku odgałęzienia (Fot. 6B). W jednym przypadku widoczne były w płatku miejsca z wyraźną fragmentacją włókien elastycznych (Fot. 5B). Ich liczba oraz gęstość mierzone w poprzek płatka były zmienne. W linii pomiaru stwierdzono średnio $36,95 \pm 4,67$ elementów elastycznych, a ich zagęszczenie wynosiło $58,42 \pm 11,17$ /mm. Wraz z wiekiem zastawki ilość elementów sprężystych istotnie zmniejszała się ($p < 0,05$), a ich gęstość korelowała z wiekiem i wzrostem grubości płatka ($p < 0,01$) (Wyk.1). Przykłady rozmieszczenia elementów elastycznych w zastawkach pochodzących od dawców w różnym wieku przedstawiono na rycinie (Ryc. 1).

We wszystkich płatkach obecne były drobne ogniska mineralizacji złożone z ziaren o średnicy poniżej $1 \mu\text{m}$, których łączna powierzchnia nie przekraczała 10% powierzchni badanego płatka i wynosiła średnio $4,45 \pm 1,92\%$. Stwierdzono wzrost mineralizacji wraz z wiekiem zastawki ($p < 0,05$).

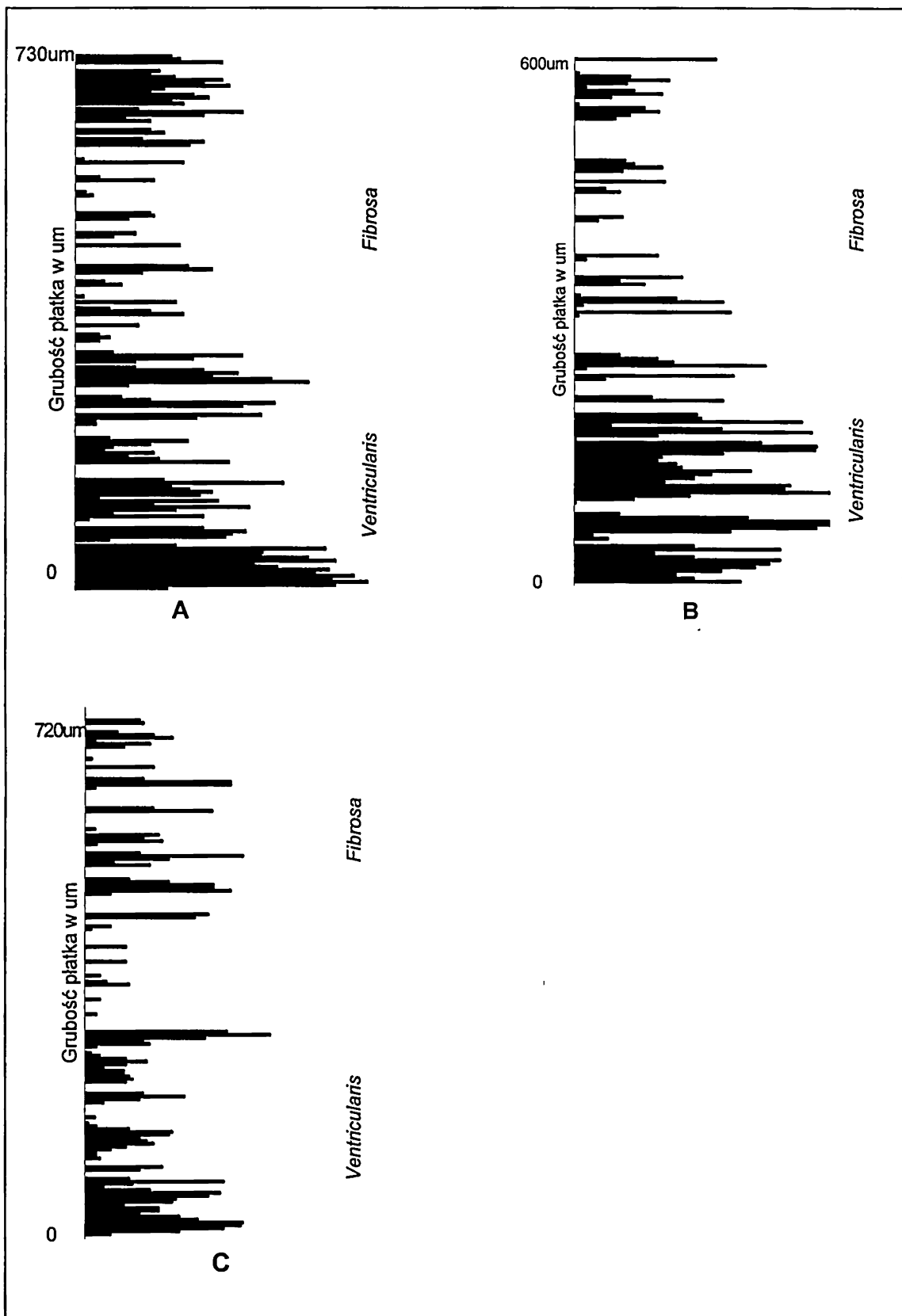
Wyniki pomiarów niektórych parametrów morfologicznych płatków zastawek grupy porównawczej i badanej zebrano w tabeli (Tab. 5).

Tab. 5 Porównanie wybranych cech mikroskopowych homografitów i płatków zastawek porównawczych.

Badana cecha		Usunięte homografty n = 32	Zastawki porównawcze n = 20	Analiza statystyczna (poziom istotności)
Liczba komórek zrębu	MED max / min	25 236 / 0	332,5 821 / 77	p < 0,0001
Grubość płatków mm	\bar{x} SD	0,41 0,12	0,65 0,14	p < 0,001
Liczba elementów elastycznych (w linii pomiaru)	\bar{x} SD	31 9,25	36,95 4,67	p < 0,05
Zagęszczenie elementów elast. (liczba na mm przekroju)	\bar{x} SD	76,1 / mm 16,29	58,42 / mm 11,17	p < 0,01
Zachowana struktura warstwowa Liczba przypadków (%)		13 (40,6)	20 (100)	
Duże zwapnienia Liczba przypadków (%)		22 (68,75)	0 (0)	
Mineralizacja drobinowa (procent zajętej powierzchni) max / min		58 / 2,8	8,1 / 1,1	
Naciek zapalny Liczba przypadków (%)		26 (81,25)	0 (0)	



Wyk. 1 Zmiany ilości i gęstości rozmieszczenia elementów elastycznych oraz grubości płatków grupy porównawczej w zależności od wieku. Wyniki przedstawiono jako % najwyższej wartości.



Ryc. 1 Przykład rozmieszczenia elementów sprężystych w płatkach zastawek grupy porównawczej. A – wiek dawcy 24 lata; B – wiek dawcy 38 lat; C – wiek dawcy 57 lat. Wykresy na podstawie danych uzyskanych z komputerowego analizatora obrazu.

Ocena mikroskopowa usuniętych homografów.

Obserwowanej makroskopowo deformacji i destrukcji płatków, towarzyszyło znaczne uszkodzenie ich mikrostruktury. W 19 przypadkach (59,4%) nastąpiło niemal zupełne zatarcie budowy warstwowej płatka. W pozostałych 13 zastawkach (40,6%) struktura warstwowa była zachowana jakkolwiek w różnym stopniu (Fot. 7,8A). Wszystkie zastawki niemal całkowicie pozbawione były śródbłonka, a powierzchnia płatków była nierówna, postrzępiona, pokryta nitkami włókniaka i mikrozakrzepami (Fot. 9). W obrazach z mikroskopu elektronowego (SEM), uwidoczniono na powierzchni bezstrukturalne masy, a miejscami odsłonięte pęczki włókien zrębu. Widoczne były liczne szczeliny i podłużne rozpadliny w których niezłym powbijane tkwiły zdeformowane erytrocyty oraz inne krwinki. Obecne były również pojedyncze drobne kryształki (Fot. 30). W 10 przypadkach (31%) odcinkowo (zwłaszcza w początkowym odcinku warstwy włóknistej) powierzchnia była gładka, pokryta fragmentarycznie komórkami o charakterze śródbłonka (Fot. 8B,31). W wielu miejscach otoczka ta uległa odwarstwieniu, a wolna przestrzeń pod nią wypełniona była krwinkami. Rozwarstwienia spotkać można było także w zewnętrznych warstwach *fibrosa* i *ventricularis* jak również pomiędzy poszczególnymi warstwami. Tutaj również puste przestrzenie wypełniały często masy krwinkowe lub złogi włókniaka (Fot. 8A,11,12,13,36).

Jedynie w 8 przypadkach (25%) było fragmentarycznie zachowane naturalne pofałdowanie warstwy włóknistej. W 7 przypadkach (21,9%) obecny był charakterystyczny dla prawidłowej zastawki falisty przebieg włókien kolagenowych (Fot. 14). W mikroskopie elektronowym widoczne były znaczne różnice gęstości włókien. W niektórych przypadkach ich pęczki były grube, jednorodne, zbite w rodzaj pilśni inkrustowanej miejscami drobnymi kryształami. W innych przypadkach były drobniejsze, luźniej rozmieszczone, oplecione cienkimi włóknkami. W przestrzeniach pomiędzy włóknkami obecne były pojedyncze krwinki, bogatowypustkowe komórki żerne i kryształki (Fot. 32,33,34).

Tylko w 6 przypadkach (18,8%) nie stwierdzono w zrębie płatków osłabienia reakcji na elementy macierzy. W 15 dalszych (46,9%) zaobserwowano jej równomierne zmniejszenie. W pozostałych 11 przypadkach (34,4%) widoczne było znaczne

osłabienie lub brak reakcji histochemicznej na niemal całej powierzchni płątka (Fot. 15,16).

Liczba komórek zrębu była bardzo niejednorodna lecz istotnie mniejsza w stosunku do grupy porównawczej (MED.=25, $p < 0,0001$). Znamienne również było nierównomierne rozmieszczenie komórek. W 22 przypadkach (68,8%) ich liczba nie przekraczała $50/\text{mm}^2$. W pozostałych 10 przypadkach (31,2%) była dwa do pięć razy większa (od 95 do $236/\text{mm}^2$), przy czym znaczna część komórek lokalizowała się w pasmach wzdłuż powierzchni lub w głębszych warstwach u podstawy płątka, bądź w rejonie nacieków zapalnych. We wszystkich przypadkach występowały obszary płątka pozbawione całkowicie komórek, natomiast jedynie w trzech płatkach (9,4%) znaleziono rejony zbliżone rozmieszczeniem komórek do zastawek z grupy porównawczej. W miejscach *fibrosa* o zbitej, zwłókniałej budowie komórki posiadały ciemne, wydłużone jądra, kwasochłonną cytoplazmę i były wciśnięte pomiędzy pęczki kolagenu wzdłuż ich przebiegu, co przypominało obraz ścięgna lub też spoczywały w wydłużonych, owalnych jamkach powstałych w miejscach rozwarstwienia podścieliska (Fot. 10). W miejscach płątka o luźniejszej strukturze i w rejonach zmian zapalnych fibroblasty przybierały bardziej owalne kształty, ich jądra były luźniejsze, euchromatynowe, a cytoplazma bardziej zasadochłonna.

Jedynie w 6 przypadkach (18,75%) nie stwierdzono w płatkach nacieku zapalnego. W czterech dalszych przypadkach (12,5%) był on bardzo ograniczony. W pozostałych 22 badanych płatkach (68,75%) mieszane nacieki komórkowe o różnym stopniu nasilenia stanowiły istotny element obrazu. Dominowały w nich komórki jednojądrzaste (limfocyty, histiocyty, komórki plazmatyczne), w 4 przypadkach (12,5%) z dużym udziałem komórek wielojądrzastych. W trzech przypadkach (9,4%) obecne były również komórki olbrzymie i ciała Russella. W 18 płatkach (56,3%) naciekiem komórkowym towarzyszyły ogniska tkanki martwiczej i złogi włókniaka z koloniami bakterii, miejscami dość luźno związane z podłożem (Fot. 17,18,19). W rejonach tych obecne były grupy makrofagów o silnie zwakuolizowanej, piankowatej cytoplazmie. W mikroskopie elektronowym na powierzchni płatków jak również w zrębie widoczne były bogatowypustkowe komórki występujące pojedynczo lub w niewielkich skupiskach, fragmenty rozpadłych komórek i bakterie, a włókna zrębu miejscami

tworzyły układ nieuporządkowanej sieci zamiast regularnych, równoległych pasm (Fot. 35,36).

Grubość płatków cechująca się dużą zmiennością wzdłuż ich przebiegu wynosiła średnio $0,41 \pm 0,12$ mm i była istotnie mniejsza niż w grupie porównawczej ($p < 0,001$). Lokalizacja elementów sprężystych była analogiczna jak w grupie porównawczej (Fot. 20,21). Widoczny był ich stopniowy zanik wraz z długością trwania przeszczepu (Ryc. 2). W zastawkach z zachowaną strukturą warstwową dotyczył on najpierw warstwy włóknistej w której już w zastawkach usuniętych do 10 lat po wszczepieniu włókna elastyczne były drobniejsze i stopniowo zmniejszała się ich liczebność. Podobne zmiany występowały w *ventricularis* dopiero w zastawkach usuniętych po dłuższym niż 10 lat okresie. Bezwzględna ilość elementów elastycznych w linii pomiaru była niższa niż w grupie porównawczej ($p < 0,05$) i wynosiła średnio $31,0 \pm 9,25$, a ich średnie zagęszczenie wyniosło $76,1 \pm 16,29$ /mm. W zestawieniu z grupą porównawczą jest to wartość istotnie wyższa ($p < 0,01$).

W badanych płatkach obserwowano dwa rodzaje mineralizacji. Pierwszy to dobrze ograniczone, lokalne zwapnienia różnej wielkości występujące w różnym nasileniu w 22 przypadkach (68,75%). Podłożem dla tych zmian mogą być skrzepliny, ogniska martwicy, szklwienia czy blaszki miażdżycowe. Część tych zwapnień była zlokalizowana wewnątrz płatka (zwłaszcza w warstwie włóknistej) i nie deformowała powierzchni płatka. Częściej jednak zmineralizowane struktury związane były z powierzchnią płatka (Fot. 22,23,30C,37). Drugi rodzaj mineralizacji (drobinowy) stanowiły ziarna o średnicy poniżej 1 μ m rozsiane lokalnie z różną gęstością. Występowały one we wszystkich zastawkach obejmując od 2,8% do 58% powierzchni płatka. Głównym miejscem występowania tego typu mineralizacji była warstwa włóknista szczególnie dystalnej części płatka (Fot. 24,25). Zwracał uwagę także fakt nasilonej mineralizacji drobinowej wzdłuż powierzchni płatka, obecny we wszystkich przypadkach zastawek usuniętych do 7 lat po implantacji i w 60% przypadków starszych zastawek.

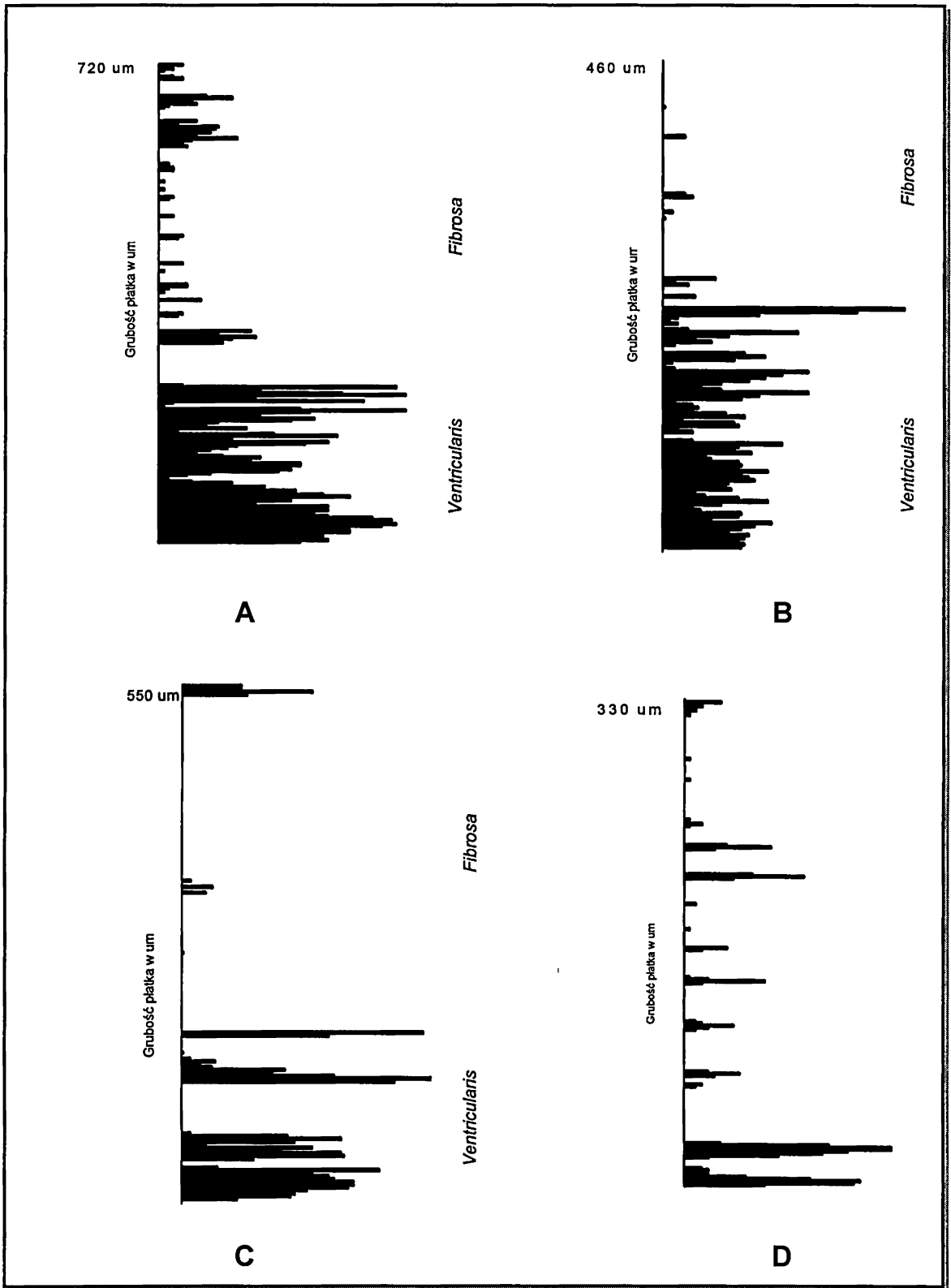
W badanej grupie dało się wyróżnić 11 zastawek (34%) o dużym stopniu mineralizacji drobinowej płatków – gr. I ($> 30\%$ powierzchni, śr. $46,05 \pm 8,16\%$), 14 zastawek (44%) o średnim stopniu mineralizacji drobinowej – gr. II (śr. $17,94 \pm 4,48\%$) i 7 zastawek

(22%) w którym była ona podobna jak w grupie porównawczej – gr. III (śr. $6,61 \pm 2\%$). Silnej mineralizacji drobinowej towarzyszyła z reguły obecność znacznej ilości dużych zwapnień (73%). Były one natomiast sporadyczne w grupie zastawek o średnim stopniu mineralizacji drobinowej (7%) (Tab. 7). Analiza wariancji wykazała różnice trwałości homograftów z poszczególnych grup ($p < 0,001$). Jedynie różnice w długości funkcjonowania zastawek z grupy I i III okazała się nieistotna statystycznie.

Metody histochemiczne wykazały najlepszy stopień zachowania składników istoty podstawowej w zastawkach o małym stopniu mineralizacji drobinowej (gr. III). Znaczne ubytki lub niemal zupełne wypłukanie elementów macierzy widoczne było zwłaszcza wśród zastawek najsilniej zmineralizowanych (gr. I). Stanowiło to jednak jedynie 50% wszystkich zastawek należących do tej grupy mineralizacyjnej.

Podobnie jak w zastawkach porównawczych, stwierdzono stopniowy wzrost poziomu mineralizacji drobinowej wraz z wiekiem chorego ($p < 0,01$; $R=0,7$), jak również czasem funkcjonowania homograftu ($p < 0,001$; $R=0,71$). Zależności te nie występowały w przypadku zastawek z grupy I (o największym stopniu mineralizacji).

Analiza niektórych parametrów zastawek z poszczególnych grup mineralizacyjnych została przedstawiona w tabelach (Tab. 6 i 7).



Ryc. 2 Przykład rozmieszczenia elementów sprężystych w płatkach po: A – 7 latach; B – 13 latach; C – 15 latach; D – 20 latach funkcjonowania homograftu.

Wykresy na podstawie danych uzyskanych z komputerowego analizatora obrazu.

Tab. 6 Analiza homografów z uwzględnieniem poziomu mineralizacji drobinowej.

	Grupa I Zastawki silnie zmineralizowane n = 11 (34%)	Grupa II Zastawki umiarkowanie zmineralizowane n = 14 (44%)	Grupa III Zastawki słabo zmineralizowane n = 7 (22%)	Analiza statystyczna
	Powierzchnia zwapniała (%)			p < 0,00001
\bar{x} SD min / max	46,05 8,159 35,5 / 58,0	17,94 4,481 11,0 / 24,2	6,61 1,996 2,8 / 8,7	I / II → p < 0,00001 I / III → p < 0,0001 II / III → p < 0,00001
	Okres funkcjonowania homografu [miesiące / (lat)]			p < 0,001
\bar{x} SD min / max	111 (9,3) 33,05 62 / 166	179,1 (14,8) 34,677 119 / 244	103,3 (8,7) 54,543 28 / 177	I / II → p < 0,001 I / III → NS II / III → p < 0,0001
	Liczba komórek zrębu (kom./mm²)			NS
MED.	35	20,5	25	
	Wiek biorcy (lat)			p < 0,05
\bar{x} SD	35,0 3,13	34,2 2,78	47,7 3,93	I / II → NS I / III → p < 0,05 II / III → p < 0,01
	Wiek dawcy (lat)			NS
\bar{x} SD	31,2 2,38	35,1 2,50	31,3 2,99	
	Różnica wieku biorcy i dawcy [wartość bezwzględna] (lat)			NS
\bar{x} SD	13,8 10,48	8,0 6,45	16,4 8,40	
	Rzeczywisty wiek usuniętego homografu (lat)			NS
\bar{x} SD	40,5 9,85	48,7 6,83	38,8 10,19	
	Wiek biorcy przy reoperacji (lat)			p < 0,05
\bar{x} SD	56,3 11,0	48,9 8,3	44,3 15,0	I / II → p < 0,05 I / III → p < 0,05 II / III → NS
	Czas konserwacji zastawki (dni)			NS
\bar{x} SD	11,2 5,43	17,0 9,41	11,7 6,92	

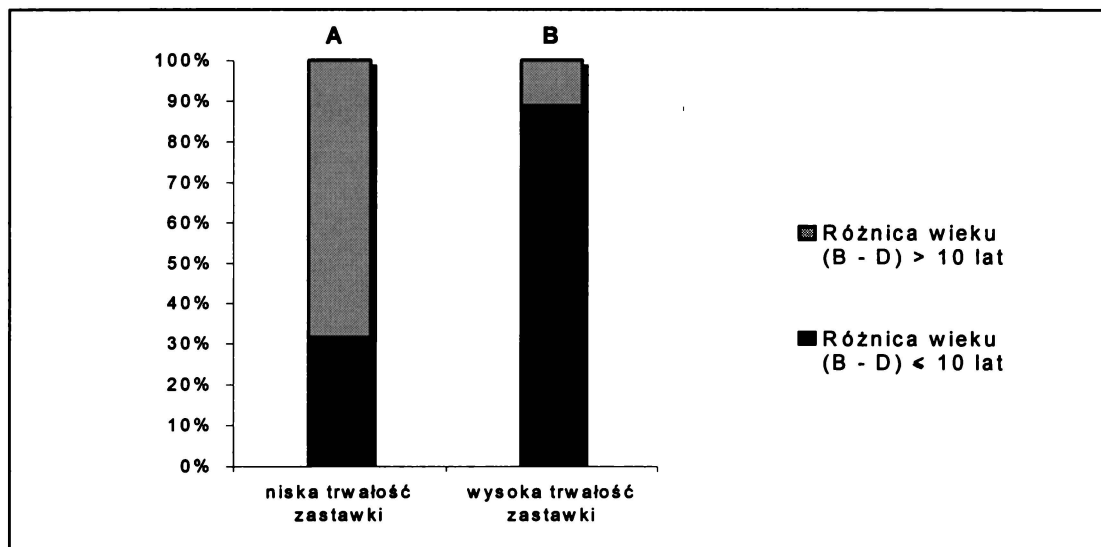
Tab. 7 Analiza homografów z uwzględnieniem poziomu mineralizacji drobinowej.

Grupa I Zastawki silnie zmineralizowane n = 11 (34%)	Grupa II Zastawki umiarkowanie zmineralizowane n = 14 (44%)	Grupa III Zastawki słabo zmineralizowane n = 7 (22%)	Analiza statystyczna (Gr. II / Gr. I + Gr. III)
Liczba zastawek z obecnością zmian infekcyjnych (%)			p < 0,001 R=-0,62
9 (81,8)	3 (21,4)	6 (85,7)	
Liczba zastawek z obecnością dużych zwapnień (%)			p < 0,001 R=-0,6
8 (73)	1 (7)	4 (57)	
Liczba zastawek z zachowaną strukturą warstwową (%)			NS
2 (18)	8 (57)	2 (29)	
Liczba przypadków zwapnień własnej (usuniętej) zastawki chorego (%)			NS
7 (64)	4 (29)	3 (43)	

Jak wynika z przedstawionych danych dużą trwałością cechuje się grupa II zastawek. W pozostałych grupach, pomimo przeciwstawnych stopni zmineralizowania trwałość była niska. Sugeruje to, że poziom mineralizacji jest tylko jednym z wielu czynników decydujących o sprawnym funkcjonowaniu zastawki. Istotny wydaje się fakt, że w grupie tej (gr. II) ponad dwa razy rzadziej niż w pozostałych stwierdzano zmiany infekcyjne homograftu (Tab. 7).

W ponad 64% przypadków w których wykryto liczne, duże ogniska zwapnień i w podobnym procencie zastawek z intensywną mineralizacją drobinową (gr. I), opisywano kalcyfikację własnej zastawki aortalnej pacjenta przy wszczepianiu homograftu, natomiast w pozostałych przypadkach było to rozpoznane jedynie w 33% zastawek ($p < 0,05$). Może to wskazywać na zmienną osobniczo skłonność do inkrustacji solami wapnia płatków zastawek.

W analizowanych przypadkach występowały znaczne różnice pomiędzy bezwzględną wartością różnicy wieku biorcy i dawcy (min./max.= 1/31 lat, MED.= 10,5). Pomędzy powyższym parametrem, a długością funkcjonowania zastawki stwierdzono zależność ($p < 0,05$), mocniejszą w grupie zastawek które nie uległy silnemu zwapnieniu ($p < 0,01$; $R = 0,61$). W 89% zastawek, które funkcjonowały 14 i więcej lat, różnica wieku między biorcą i dawcą nie przekraczała 10 lat (Wyk.2) i są to głównie zastawki z II grupy (Tab. 6). W stosunku do niej około 2 razy większa różnica występuje w pozostałych grupach.



Wyk. 2 Udział procentowy przypadków z małą i dużą bezwzględną różnicą wieku biorcy i dawcy (B-D), wśród zastawek o: A - niskiej (< 14 lat) i B - wysokiej trwałości.

Zmiany zaobserwowane w większości przebadanych zastawek (81%) można określić jako zapalno-zwyrodnieniowe ($n = 26$). Jedynie w sześciu przypadkach (19%) nie stwierdzono czynnego procesu zapalnego i dominowało zwyrodnienie płatków z włóknieniem, hialinizacją, częściowym zatarciem struktury warstwowej i prawie całkowitym brakiem komórek zrębu. Zastawki te cechował średni stopień mineralizacji (gr. II), znikoma ilość większych zwapnień i duża trwałość ($\text{śr.} = 17,2 \pm 2,3$ lat). W 8 przypadkach (25%) obecność komórek zapalnych była ograniczona i przeważały w obrazie wyżej opisane zmiany zwyrodnieniowe z ogniskami wykrzepiania przy powierzchni, i złogami włókniaka. Pięć zastawek z tej grupy wykazało średni stopień mineralizacji (gr.II). W pozostałych 18 przypadkach (56%) dominował obraz zapalenia z mieszanymi naciekami komórkowymi, zakrzepami, ogniskami martwicy wśród których obecne były kolonie bakterii. U większości pacjentów tej grupy (73%) klinicznie stwierdzano objawy infekcyjnego zapalenia wsierdzia. Dane dotyczące powyższych grup zebrano w tabeli (Tab. 8).

Analiza wariancji wykazała różnice trwałości zastawek w poszczególnych grupach ($p < 0,001$). Jedynie różnice pomiędzy grupami z obecnością zmian zapalnych (A i B) nie były statystycznie znamienne.

Na uwagę zasługuje związek obecności zmian infekcyjnych w zastawce z przebytymi przez pacjenta do 3 miesięcy przed reoperacją infekcjami (dróg oddechowych, rodnych, moczowych, żółciowych i ropnych zmian skórnych) ($p < 0,001$; $R = 0,67$). Stwierdzono również znaczenie liczby epizodów infekcyjnych przebytych w ostatnich 12 miesiącach przed reoperacją ($p < 0,001$; $R = 0,74$).

Infekcja zastawek okazała się istotnym czynnikiem powodującym zatarcie ich prawidłowej, warstwowej struktury ($p < 0,001$) oraz występowanie dużych zwapnień ($p < 0,05$). Nie stwierdzono natomiast istotnej zależności między poziomem mineralizacji drobinowej, a infekcją zastawek. W prawie wszystkich przypadkach w których reoperacja była konieczna do 7 lat po wszczepieniu, stwierdzono zmiany infekcyjne zastawki, zatarcie struktury warstwowej i brak na powierzchni otoczki komórkowej. Jej obecność częściej wiązała się z zachowaną strukturą warstwową płatka ($p < 0,05$). Redukcję elementów elastycznych postępującą z czasem trwania przeszczepu stwierdzono jedynie w grupie zastawek bez procesu infekcyjnego ($p < 0,05$, $R = 0,65$). Analiza przebytych przez pacjentów infekcyjnych zapaleń wsierdzia przed

wszczepieniem homograftu wykazała częstszą obecność w nim infekcji w momencie reoperacji ($p < 0,05$).

W przypadku pacjentów z chorobą nadciśnieniową czas funkcjonowania zastawki był istotnie krótszy ($p < 0,05$) i wynosił średnio $118,6 \pm 38,1$ miesiąca. Dla pacjentów bez nadciśnienia czas ten wynosił średnio $151,5 \pm 56,3$ miesiąca. Średnia trwałość zastawki u pacjentów z zaburzeniami lipidowymi ($n = 6$) wynosiła $107,7 \pm 38,5$ miesiąca i była niższa niż u pozostałych gdzie wynosiła $146,4 \pm 52,7$ miesiąca. Powyższe różnice nie były istotne statystycznie.

Tab. 8 Analiza homograftów z uwzględnieniem zmian zapalnych.

	Grupa A Proces infekcyjny n = 18 (56%)	Grupa B Przewlekły proces zapalny n = 8 (25%)	Grupa C Zwyrodnienie i destrukcja n = 6 (19%)	Analiza statystyczna * Gr. A / Gr. B + Gr. C
\bar{X} SD min / max	Okres funkcjonowania homograftu (miesiące / (lat))			p < 0,001
	114,9 (9,6) 44,88 28 / 185	150,9 (12,4) 33,72 87 / 177	207,0 (17,2) 27,45 178 / 244	A / B → NS A / C → p < 0,001 B / C → p < 0,01
MED	Liczba komórek zrębu (kom./mm²)			NS
	30	36	3,5	(A + B) / C → p < 0,05
MED	Powierzchnia zmineralizowana (%)			NS
	26,95	15,8	21,75	
n (%)	Liczba zastawek z zachowaną strukturą warstwową			* p < 0,001 R=0,68
	2 (11)	7 (88)	4 (67)	
n (%)	Liczba zastawek z obecnością dużych zwapnień			* p < 0,05 R=0,47
	11 (61)	2 (25)	0 (0)	
n (%)	Liczba pacjentów z epizodami infekcyjnymi (0 – 3 mies. przed reoperacją)			* p < 0,001 R=0,62
	16 (89)	3 (38)	1 (17)	
n (%)	Liczba pacjentów z więcej niż jednym epizodem infekcyjnym (0 – 12 mies. przed reoperacją)			* p < 0,001 R=0,63
	14 (78)	1 (12,5)	1 (17)	
n SD	Czas konserwacji zastawki (dni)			NS
	11,3 5,67	16,4 3,21	20,3 17,21	A / B+C → p < 0,05

Ocena stopnia mineralizacji płatków metodą absorpcji atomowej.

Wyniki badań koncentracji pierwiastków w eksplantowanych homograftach wykazały niejednorodność badanej grupy pod względem zawartości wapnia, fosforu i stosunku Ca/P (Tab. 9). Pozwoliło to na wyróżnienie trzech grup, których skład odpowiadał podziałowi dokonany na podstawie analizy histochemicznej płatków, a koncentracja wapnia korelowała ze stwierdzoną histochemicznie mineralizacją drobinową ($p < 0,001$; $R = 0,9$).

Stosunek Ca/P w grupie I i III był podobny i wynosił odpowiednio 2,0 i 2,56, co wskazuje, że głównym minerałem odkładającym się w tych zastawkach jest hydroksyapatyt. Wyższy niż 2,15 stosunek Ca/P w grupie III wskazuje na niewielką domieszkę innych niż fosforany soli wapnia. Jego zawartość w zastawkach grupy III ($1,23 \pm 0,45$) jest nieporównywalnie niższa niż w grupie I ($11,92 \pm 3,51$) i zbliżona raczej do poziomu obserwowanego w zastawkach porównawczych ($0,31 \pm 0,08$), jednak i w tym przypadku obserwowane różnice są istotne statystycznie ($p < 0,05$). Grupę II cechuje nieznacznie większa niż grupę III koncentracja wapnia ($1,82 \pm 0,76$) oraz podwyższony do 6,62 stosunek Ca/P, który częściowo można tłumaczyć niskim poziomem fosforu w tej grupie ($0,25 \pm 0,1$) oraz obecnością innych soli wapnia.

Wyniki pomiaru koncentracji pierwiastków w płatkach grupy porównawczej przedstawiono w tabeli (Tab. 10). W porównaniu z zastawkami z reoperacji są one istotnie niższe za wyjątkiem zawartości fosforu w grupie II gdzie różnica nie była statystycznie znamienne. Również podobny jak w zastawkach porównawczych okazał się stosunek Ca/P w grupie III.

Koncentracja wapnia w grupie porównawczej wykazywała zależność od wieku zastawki ($p < 0,05$; $R = 0,63$).

Podobnie jak dla eksplantowanych homografitów stwierdzono korelację zawartości wapnia i badanej histochemicznie mineralizacji drobinowej ($p < 0,01$; $R = 0,7$).

Tab. 9 Koncentracja wapnia i fosforu w eksplantowanych zastawkach (% suchej masy) i wyliczony stosunek Ca / P.

	Grupa I Zastawki silnie zmineralizowane	Grupa II Zastawki umiarkowanie zmineralizowane	Grupa III Zastawki słabo zmineralizowane	Analiza statystyczna
	Ca (% s.m.)			$p < 0,00001$
\bar{x} SD	11,92 3,508	1,82 0,759	1,23 0,453	I / II → $p < 0,0001$ I / III → $p < 0,00001$ II / III → $p < 0,01$
	P (% s.m.)			$p < 0,00001$
\bar{x} SD	5,95 1,842	0,25 0,098	0,68 0,217	I / II → $p < 0,00001$ I / III → $p < 0,00001$ II / III → NS
	Ca / P			$p < 0,01$
MED min / max	2,00 1,87 / 2,15	6,62 5,85 / 9,58	2,56 0,56 / 2,60	I / II → $p < 0,01$ I / III → NS II / III → $p < 0,05$

Tab. 10 Wartości koncentracji wapnia i fosforu w zastawkach porównawczych (% suchej masy) oraz ich porównanie z usuniętymi homografami (dane z tab. 9).

Zastawki grupy porównawczej	Zastawki z reoperacji			
	Grupa I	Grupa II	Grupa III	
	Analiza statystyczna (poziom istotności)			
	Ca (% s.m.)			
\bar{x} SD min / max	0,31 0,083 0,19 / 0,45	$p < 0,001$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
	P (% s.m.)			
\bar{x} SD min / max	0,19 0,039 0,11 / 0,26	$p < 0,0001$	NS	$p < 0,01$
	Ca / P			
\bar{x} SD min / max	1,63 0,310 1,06 / 2,05	$p < 0,01$	$p < 0,01$	NS

Ocena wytrzymałości płatków.

Z powodu złego stanu fizycznego płatków udało się dokonać badania jedynie w przypadku 8 reoperowanych zastawek. Wyniki pomiarów porównano z 8 zastawkami grupy kontrolnej, dobranymi tak, aby różnice wieku w obu grupach nie były istotne.

Siła potrzebna do zerwania płatka była w grupie porównawczej wyższa niż w zastawkach reoperowanych. Wraz z wytrzymałością ograniczeniu uległa elastyczność płatków badanej grupy na co wskazują zwłaszcza duże różnice w module Younga porównywanych grup. Nie wykazano natomiast korelacji wytrzymałości i zawartości elementów elastycznych w płatkach. Może to wynikać ze zbyt małej liczby przypadków.

Otrzymane średnie wartości przedstawiono w tabeli (Tab. 11).

Tab. 11 Porównanie średnich wytrzymałości i elastyczności badanych grup zastawek.

	Zastawki z reoperacji	Zastawki grupy porównawczej
Siła zrywająca płatek (N)	9,72 ± 2,14	15,83 ± 2,63
Rozciągliwość płatka Mierzona stopniem wysunięcia trzpienia (mm)	1,51 ± 0,36	2,23 ± 0,29
Moduł Younga Elastyczność płatka (N/mm ²)	0,40 ± 0,14	1,89 ± 0,80

Dyskusja

W ciągu ostatnich trzydziestu lat nastąpił znaczny postęp w dziedzinie wymiany niewydolnych zastawek aortalnych serca. Udoskonaleniu uległy sztuczne zastawki jak i niezbędne przy ich stosowaniu leki przeciwzakrzepowe. Z drugiej strony opracowano doskonalsze metody przechowywania, przygotowania do wszczepienia oraz samej techniki operacyjnej zastawek biologicznych. Długofalowe badania zachowania tego typu zastawek dowodzą, że najkorzystniejsze wyniki leczenia uzyskuje się stosując ludzką zastawkę aortalną wszczepioną ortotopowo. Stosowane alternatywnie ludzkie zastawki płucne lub zastawki zwierzęce wykazują mniejszą wytrzymałość i krótszą trwałość, co prowadzi do konieczności wcześniejszej reoperacji [4,22,39,95]. Stosowanie homograftów aortalnych w leczeniu wad lewego ujścia tętniczego z technicznego i organizacyjnego punktu widzenia jest trudniejsze niż wszczepianie zastawek sztucznych, jednak istniejące w niektórych przypadkach przeciwwskazania dla sztucznych protez zastawkowych, czy lepszy komfort życia chorego po operacji uzasadnia stosowanie homograftów [48,71,87]. Głównym problemem w przypadku zastawek biologicznych jest proces ich stosunkowo szybkiego „zużywania się” w organizmie biorcy. Po pewnym czasie doprowadza do dysfunkcji zastawki i konieczności jej usunięcia.

Można przyjąć, że na los zastawek przeszczepionych wpływają dwie grupy czynników: występujące przed wszczepieniem zastawki oraz działające w czasie funkcjonowania przeszczepu. Do pierwszej grupy należą: czynniki związane z dawcą i stanem wszczepianej zastawki. Drugą grupę stanowią zmiany zachodzące po wszczepieniu, będące wynikiem reakcji biorcy na przeszczep jak i związane ze stanem zdrowia biorcy i występowaniem dodatkowych procesów patologicznych.

W pracy zaobserwowano zmiany makroskopowe w połowie przypadków zastawek przygotowanych do wszczepienia. Większość musiała powstać w organizmie dawcy, a nie w czasie konserwacji czy przechowywania (zgrubienia, blaszki miażdżycowe, twory polipowate). Odpowiadają one zmianom obserwowanym często we wsierdziu i wykazują związek z wiekiem i procesami patologicznymi. Zmiany struktury mikroskopowej obecne były we wszystkich zastawkach grupy porównawczej. Najistotniejsze znaczenie wydaje się mieć uszkodzenie śródbłonna widoczne we

wszystkich zastawkach, obecność w ponad połowie przypadków dużych obszarów płątka pozbawione komórek zrębu, wygładzenie powierzchni fibrosa świadczące o uszkodzeniu powiązania tej warstwy z warstwą sprężystą oraz zubożenie tkanki łącznej w glikozaminoglikanowe i glikoproteidowe elementy macierzy. Ten typ zmian niedostrzegalnych makroskopowo można wykryć już w okresie pomiędzy śmiercią dawcy, a pobraniem i właściwym zakonserwowaniem zastawek przeznaczonych do implantacji [5,27,60]. Szczególnie wrażliwe są w tym wypadku komórki śródbłonna i fibroblasty zrębu płątka. Według danych z piśmiennictwa, nawet stosowane obecnie metody konserwacji zastawek nie zabezpieczają komórek zrębu, a zwłaszcza endotelium przed obumarciem [3,5,26,34,37,38,51]. W obrazie mikroskopowym obserwowano w obecnej pracy duże acelularne obszary zrębu płątka i nieraz znacznego stopnia ubytki śródbłonna. Badania żywotności komórek prowadzone przez innych autorów dowodzą, że wiele z nich nie podejmuje aktywności po wszczepieniu, co znacznie obniża możliwości regeneracyjne płątka, natomiast zwiększa jego immunogenność [35,60]. Wydaje się, że zmiany te niezależnie od tego w jakim stopniu powstały w organizmie dawcy po jego śmierci, a w jakim w czasie późniejszego przechowywania mają istotne znaczenie dla tempa procesu stopniowej destrukcji płatków po przeszczepieniu.

Kolejnym czynnikiem mogącym wpływać na właściwości przeszczepionych zastawek jest sposób ich konserwacji i przechowywania do czasu zabiegu. W obecnej pracy badano materiał pochodzący z Banku Zastawek Kliniki Chirurgii Serca i Naczyń CM UJ. Przed wszczepieniem był on opracowywany zgodnie z przyjętym protokołem postępowania i przechowywany w płynie konserwującym w temp. 4°C (patrz „Materiał i metody”). Wobec jednolitego sposobu postępowania nie jest możliwa ocena wpływu różnych sposobów konserwacji na stan zastawek i ich trwałość po przeszczepieniu. Można natomiast ocenić wpływ czasu bankowania homograftu. Zaobserwowano (choć wyniki nie były statystycznie znamienne), że zastawki o zwiększonym stopniu mineralizacji drobinowej i cechujące się najdłuższym średnim przeżyciem (gr. II) były przechowywane w płynach odżywczych przez czas dłuższy o ponad 1/3 w stosunku do tych, których mineralizacja była zbliżona do zastawek porównawczych (gr. III). Istotne znaczenie może odgrywać tu proces wypłukiwania z tkanki łącznej płątka elementów istoty podstawowej, w tym zwłaszcza tych które blokują możliwość wiązania wapnia.

W badanym materiale stwierdzono brak reakcji na glikozaminoglikany w *fibrosa* niektórych płatków z grupy kontrolnej. W eksplantowanych płatkach mineralizacja była częściej stwierdzana w tej właśnie warstwie. Z drugiej jednak strony, zastawki przechowywane w banku przez istotnie krótszy czas, w przypadku reoperacji wykazywały częściej cechy procesu infekcyjnego, co może wskazywać na korzystny wpływ płynów odżywczych i antybiotykowych, na stan fizyczny płatków i związaną z nim odporność na zakażenia [19,49].

Stosowane obecnie alternatywne metody przechowywania ludzkich zastawek – w ciekłym azocie lub płynie konserwującym w 4°C – spowodowały wydłużenie trwałości przeszczepu lecz nie zmieniły w sposób zasadniczy procesów stopniowej destrukcji w nich zachodzących [3,37,63]. Zmiany fizyko-chemiczne zachodzą również podczas przechowywania zastawki – jak to miało miejsce w obecnej pracy - w płynie odżywczym i antybiotykowym [6,13,40]. Jak podkreśla Maxwell [55], wypłukanie z istoty podstawowej tkanki łącznej niektórych glikozaminoglikanów blokujących mineralizację, wpływa na tworzenie ognisk mineralizacji na włóknach poprzez ułatwienie wiązania grup fosforanowych przez cząsteczki np. kolagenu.

O ile zmiany wsteczne powstające w zastawkach w pierwszym okresie (po śmierci dawcy), są trudne do wyeliminowania, istotny wydaje się problem optymalizacji doboru dawcy i biorcy przeszczepu. Wyniki obecnej pracy wskazują, że duża (ponad 10 lat) różnica wieku między dawcą i biorcą niekorzystnie wpływa na trwałość zastawki. Dzieje się tak nie tylko wtedy gdy wszczepiana zastawka pochodzi od starszej niż biorca osoby, ale również wówczas gdy dawcą jest osoba dużo młodsza. Wydaje się, że przyczyn tego faktu należy szukać w naturalnych zmianach morfologiczno-czynnościowych zachodzących w zastawkach wraz z wiekiem, jak również związanych z wiekiem zmianach ogólnoustrojowych (układ krążenia, system dokrewny, immunologiczny) [30,46,58,64]. Potwierdza to krótsza trwałość homografitów u dzieci, wynikająca jak sugerują niektórzy z zachodzących w okresie rozwojowym zmian w układzie dokrewnym [10,63]. Yankah przypisuje u dzieci duży udział procesom immunologicznym i proponuje stosowanie immunosupresji w początkowym okresie po wszczepieniu zastawki [92].

Z pozoru prosta budowa płatka zastawki aortalnej wymaga dla sprawnego funkcjonowania odpowiednich powiązań i współpracy wielu elementów zarówno

komórkowych jak i pozakomórkowych. Zastawki serca (szczególnie lewej jego połowy) są poddawane w ciągu całego życia dużym obciążeniom mechanicznym. Praca w tak ekstremalnych warunkach i związane z wiekiem zmiany w organizmie powodują powstawanie zmian w delikatnej strukturze płatków. Następuje stopniowa utrata przejrzystości, włóknienie i pogrubienie płatków, utrata właściwości sprężystych i wytrzymałości oraz mineralizacja. W obecnej pracy stwierdzono stopniowy wzrost wraz z wiekiem mineralizacji drobinowej i zależne od wieku zmiany w strukturze elementów elastycznych płatków zastawek porównawczych. Zachodzące z wiekiem zmiany normalnie do późnej starości nie upośledzają istotnie wydolności aparatu zastawkowego i nie niosą groźnych następstw klinicznych. Jednak obecność wrodzonych czy nabytych nieprawidłowości budowy zastawki – a przeszczepiane allografty w wielu wypadkach można zaliczyć do zastawek o nieprawidłowej strukturze - wpływa na przyspieszenie zmian i w konsekwencji prowadzi do wcześniejszej dysfunkcji i konieczności interwencji chirurgicznej [41]. Nabyta stenoza aortalna związana z kalcyfikacją prawidłowo zbudowanej zastawki występuje przeważnie powyżej 70-tego roku życia. W przypadku zastawki ukształtowanej patologicznie (np. zastawka dwupłatkowa) z reguły około 20 lat wcześniej [25].

Wyniki tej pracy nie wykazały istotnego związku różnicy wieku biorcy i dawcy ze stopniem mineralizacji płatków. Większe znaczenie może mieć zachodząca z wiekiem zmiana właściwości sprężystych i ograniczenie rozciągliwości płatków zastawki aortalnej. Znajduje to również potwierdzenie w badaniach innych autorów [20,21]. Według nich proces ten najszybciej przebiega w młodym wieku (do 25 r.ż.) i powyżej 45 roku życia. W obecnej pracy wykazano, że w tych okresach życia następuje szybszy ubytek elementów sprężystych płatka oraz zmniejszenie gęstości ich rozmieszczenia (Wyk. 1). Zmniejsza to elastyczność płatka i możliwości adaptacyjne całej zastawki w organizmie biorcy. W badanym przeze mnie materiale średnia trwałość zastawek pochodzących od dawców poniżej 25 lat (a więc przed okresem pewnej stabilizacji struktury elementów elastycznych i właściwości sprężystych całego płatka) wynosiła jedynie ok. 7 lat. Stosunkowo niewielka grupa ocenianych homograftów uniemożliwia jednak dokonanie dokładnych analiz statystycznych. Można wszakże przyjąć, że jeżeli istnieje możliwość dokonania wyboru zastawki przeznaczonej do przeszczepu, nie jest celowe preferowanie tej która pochodzi od najmłodszego dawcy.

Jak wynika z przeprowadzonych obserwacji i dotychczasowego omówienia już w chwili wszczepienia zastawki allogeniczne różnią się dość istotnie od zastawek które można uznać za prawidłowe. Wydaje się, że stanowi to najistotniejszy i nadrzędny czynnik wpływający na przyspieszenie zmian, które w przypadku zastawek własnych zachodzą wolniej i mogą się ujawnić dopiero w okresie starości.

Dodatkowym czynnikiem obciążającym jest fakt umieszczenia zastawki pracującej do tej pory w sercu bez zmian chorobowych i w warunkach w pełni wydolnego krążenia, w sercu przerośniętym, niewydolnym krążeniu (III, IV wg NYHA), często z towarzyszącymi zaburzeniami rytmu. W analizowanych przypadkach współlistnienie u pacjenta z przeszczepionym allograftem nadciśnienia tętniczego stanowiło dodatkowy czynnik obciążający i wiązało się z istotnie krótszą trwałością przeszczepu.

Wpływ odpowiedzi immunologicznej na trwałość allograftów nie jest jasny. Nie ulega wątpliwości, że wszczepione allografty indukują powstanie odpowiedzi immunologicznej humoralnej jak i komórkowej [35,43,63]. Jest ona wynikiem obecności antygenów (m. in. MHC kl. I i II). Szczególnie silne właściwości antygenowe przypisuje się komórkom endotelialnym [68,93]. W determinanty antygenowe są również wyposażone kolagen oraz glikoproteiny i proteoglikany istoty podstawowej tkanki łącznej [45,72,91]. W przeciwieństwie do przeszczepów narządowych, w przypadku zastawek serca nie przeprowadza się doboru dawcy pod względem zgodności antygenów HLA, ani nawet w zakresie głównych antygenów grupowych krwi (AB0, Rh). Stwierdzono bowiem, że prowadzenie doboru nie przynosi wyraźnych korzyści w postaci dłuższego funkcjonowania graftu [9,35,88]. W praktyce w wielu przypadkach nie ma nawet możliwości dokonania wyboru, w sytuacji gdy dysponuje się jedną zastawką o odpowiednim wymiarze. Problem ten dotyczy zwłaszcza ośrodków w których są wszczepiane zastawki przechowywane w płynach odżywczych w temp. 4°C. Ich czas magazynowania (max. 1 – 2 mies), jest nieporównywalnie krótszy niż w przypadku zastawek przechowywanych w temp. ok. -170°C.

Opisane na wstępie zmiany wprowadzane kolejno w sposobie konserwowania i przechowywania zastawek, miały na celu jak najlepsze zachowanie struktury i żywotności jej elementów komórkowych. Smith zwraca uwagę na zwiększona immunogenność „żywego” allograftu [81]. W przeprowadzonych badaniach stwierdził on wyższy poziom i dłuższe występowanie (ponad 15 lat) przeciwciał głównie IgG,

przeciwno antygenom zastawkowym (zwłaszcza MHC kl.I) w grupie pacjentów, którym wszczepiono „żywe” zastawki pochodzące od biorców serca, w stosunku do tych u których zastosowano sterylizowane antybiotykami zastawki ze zwłok. Pomimo silniejszej odpowiedzi immunologicznej istnieją doniesienia o większej trwałości „żywych” zastawek [90,94].

W przypadku stosowanych obecnie alternatywnych metod (płynny odżywcze 4°C lub zamrażanie), zaobserwowano pewne różnice w stopniu wzbudzonej odpowiedzi immunologicznej. Są one tłumaczone różnym poziomem zachowania żywotności komórek w obu typach graftów [43,63]. Słabsza odpowiedź humoralna indukowana przez zastawki zamrażane ma być spowodowana całkowitym brakiem na nich komórek śródbłonna, z którymi są związane najsilniejsze determinanty antygenowe [43,51,52,68,82]. Doniesienia innych autorów zdają się przeczyć tej teorii, gdyż wykazują lepszy stan zachowanego śródbłonna w zastawkach przechowywanych w temperaturze ciekłego azotu [35].

W badanym w niniejszej pracy materiale (przechowywanym w płynach odżywczych i antybiotykowych w 4°C), śródbłonek okazał się bardzo wrażliwym elementem struktury zastawki i pokrywał jedynie niewielkie obszary powierzchni płatków zastawek przeznaczonych do przeszczepu. Nawet biorąc pod uwagę fakt, że zastawki te były badane dopiero po upływie terminu przydatności do przeszczepu, można założyć, że stan endotelium we wszczepianych zastawkach jest tylko nieznacznie lepszy. Crescenzo podkreśla [28], że czas jaki upływa od śmierci dawcy do zabezpieczenia zastawek wynoszący ok. 24 godzin wystarcza do obumarcia znacznej części komórek. Fakt ten w połączeniu z obserwowanym w niektórych przypadkach zubożeniem istoty podstawowej zrębu płatka, może wpływać na ograniczony udział procesów immunologicznych w degeneracji zastawek. Nie da się jednak ocenić na podstawie przeprowadzonych badań, na ile obserwowane w niektórych płatkach nacieki komórkowe są wywołane odpowiedzią na antygeny dawcy, a w jakim stopniu są wyrazem procesu zapalnego o innym podłożu.

Brak jednoznacznych ocen znaczenia procesów immunologicznych dla trwałości homograftu nie daje wyraźnych wskazówek, co do sposobu postępowania z chorymi po wszczepieniu homograftu [57,59,63]. Wspominano już wcześniej o próbach stosowania krótkiej immunosupresji u dzieci. Stosowanie leków immunosupresyjnych (imuran,

cyklosporyna) z reguły nie wiązało się z dłuższym przeżyciem allograftów [44]. Niektórzy upatrują jednak w tej terapii szansy na opóźnienie zmian destrukcyjnych płatków [94]. Zamiast typowej immunosupresji proponuje się również stosowanie leków przeciwzapalnych, wychodząc z założenia, że niezależnie od przyczyny proces zapalny zawsze niekorzystnie wpływa na stan zastawek.

W obecnej pracy nacieki zapalne stwierdzono w zastawkach o istotnie krótszym czasie funkcjonowania. Szczególnie niekorzystny wydaje się być obserwowany w ponad połowie analizowanych przypadków, proces zapalny powiązany z infekcją przeszczepionej zastawki. O połowę krótszy w stosunku do pozostałych, okres funkcjonowania zastawek z widocznym odczynem zapalnym może być związany ze zniszczeniem struktury warstwowej płatków w wyniku działalności wytwórczo-destrukcyjnej komórek naciekowych jak i obecnością wapniejących zwłóknień czy zainfekowanych zakrzepów, które znacznie zniekształcają płatki w krótkim czasie wywołując istotne objawy kliniczne i konieczność reoperacji.

Z uwagi na stwierdzony niekorzystny wpływ obecności procesu zapalnego (zwłaszcza powiązanego z infekcją) na trwałość zastawki, istotna wydaje się analiza przyczyn i możliwości zapobiegania IZW w grupie pacjentów z wszczepionym homograftem. Obecność protez zastawkowych (w tym homogennych) jest uważana za istotny czynnik zagrażający rozwojem zapalenia wsierdza, a zgodnie z zaleceniami American Heart Association, pacjenci u których wszczepiono zastawkę zaliczani są do grupy dużego ryzyka rozwoju IZW [29]. W obecnych badaniach potwierdzenie znalazły obserwacje Podolca i wsp. [70] dotyczące związku przebytych przez pacjenta epizodów infekcyjnych w okresie poprzedzającym reoperację i stwierdzonym klinicznie i/lub histologicznie IZW. Chociaż przeprowadzone badania nie dowodzą wprost obecności ścisłego związku przyczynowo-skutkowego między przebytymi infekcjami a wystąpieniem IZW, wyraźnie zaznacza się ich częste współwystępowanie.

W badanych przypadkach, wśród pacjentów u których stwierdzono IZW przed pierwszą operacją, obserwowano w blisko 85% przypadków zmiany infekcyjne usuniętych homograftów. Może to nasuwać przypuszczenie, że są one kontynuacją pierwotnego, nie w pełni opanowanego procesu infekcyjnego. W większości wypadków jednak, stosunkowo długi (kilkuletni) niepowikłany przebieg pooperacyjny wskazuje na rozwój nowej infekcji. Większa skłonność do rozwoju IZW u tych pacjentów może wiązać się

z osłabioną obroną immunologiczną. Przyczyną może być też brak w tej grupie chorych odpowiednich zachowań higienicznych i profilaktyki ograniczającej możliwość wystąpienia bakteriemii. Szczególnie często bakteriemia następuje w trakcie wykonywania niektórych zabiegów stomatologicznych. Również obecność przewlekłych, nieleczonych stanów zapalnych przyzębia, zmian okołowierzchołkowych, może stanowić wrota zakażenia [1,29]. Choć nie ma pewnych dowodów na istnienie bezpośredniego związku bakteriemii wywołanej zmianami zapalnymi w jamie ustnej i IZW, wydaje się, że brak prowadzenia prawidłowej profilaktyki zapalenia wsierdza może być przyczyną skrócenia czasu funkcjonowania homografu w niektórych przypadkach [70].

Jak już wcześniej wspomniano, płatki zastawek w trakcie każdej ewolucji serca przeciwstawiają się uderzeniu fali krwi. Jest ona szczególnie silna w przypadku lewego ujścia tętniczego. Trójwarstwowy model budowy płatka zapewnia sprawne funkcjonowanie zastawki aortalnej. Czynniki powodujące zatarcie warstwowej struktury (np. proces zapalny), mogą powodować przedwczesną dysfunkcję płatka.

Wpływ na zachowanie struktury warstwowej może mieć stwierdzona w badanym materiale w 10-ciu przypadkach obecność na powierzchni płatka, zwłaszcza u jego podstawy, nabłonkowato ułożonych spłaszczonych komórek. Ich obecność zaobserwowano jedynie w 3 zastawkach o krótszym niż 10 lat okresie przetrwania, przy czym tylko w 2 z nich struktura warstwowa płatka była zachowana.

Zastosowane metody nie pozwalają na dokładną analizę pochodzenia i charakteru tych komórek. Jednak na podstawie uzyskanych wyników jak i badań innych autorów wydaje się, że pochodzą one od biorcy przeszczepu. Gavin opisał nasuwanie się po powierzchni *fibrosa* włóknistej otoczki (*intimal fibrous sheaths*), pokrytej częściowo śródbłonkiem i bogatej w kwaśne mukopolisacharydy, która powodowała wyraźne pogrubienie płatka [37,38]. Stwierdzony w obecnej pracy charakter otoczki nie odpowiada temu opisowi gdyż jak się wydaje tworzy ją jedynie warstwa komórek śródbłonkowych. Wymienianej w pracach Gavina struktury nie opisują również prace innych autorów, choć podkreślają występowanie penetracji komórek biorcy w obręb płatka [3,17].

Dyskutując czynniki wpływające na zmniejszenie wytrzymałości zastawek, należy wziąć pod uwagę zmianę grubości, utkania włókien kolagenowych, sprężystych i integralność warstw oraz stopień mineralizacji.

Przyspieszona mineralizacja biologicznych protez zastawkowych jest powszechnie znanym zjawiskiem [4,15,85]. Zachodzi również w przypadku zastawek alloogenicznych, choć w mniejszym stopniu niż w ksenograftach [49,55,96]. W obecnej pracy w grupie porównawczej stwierdzono występowanie składników nieorganicznych w których stosunek Ca/P wynosił poniżej 2,15 (we wszystkich badanych płatkach), co wskazuje na dominację minerału o charakterze hydroksyapatytu, w którym według wzorca wynosi on 2,157.

Eksplantowane homografty wykazywały wybitnie nasilony stopień mineralizacji. Metodą absorpcji atomowej (AAS) stwierdzono, że najmniej zmineralizowana grupa zastawek (przy przyjętym podziale grup na niski, średni i wysoki stopień zwapnienia) wykazywała czterokrotnie wyższą mineralizację od średniej w grupie porównawczej, a najsilniej zmineralizowana około 40-sto krotnie wyższą. Zmiany w mineralizacji dotyczyły w większym stopniu przedstawionego nasilenia procesu niż samego składu zdeponowanych związków nieorganicznych, choć i tutaj występowały różnice. Podwyższony procent wapnia i stosunek Ca/P wynoszący ok. 2, wskazuje, że głównym tworzącym się tu minerałem był hydroksyapatyt z domieszką innych form fosforanów wapnia (w tych przypadkach w których stosunek Ca/P był wyższy od 2,15). Dla części płatków stwierdzono jednak dużo wyższą proporcję wapnia do fosforu (ok. 6,6). Wskazuje to, iż w tych przypadkach dominowały inne niż hydroksyapatyt sole wapnia (np. węglany). Charakter związków nie wpływał na rozmieszczenie depozytów wapniowych w strukturze zastawki. Z drugiej jednak strony, obserwowane mikroskopowo duże ogniskowe zwapnienia, które Liao i wsp. [49] opisuje jako guzkowate (*nodular*), obecne są prawie wyłącznie w grupach zastawek w których stosunek Ca/P wynosi ok. 2. Może to wskazywać, że tego typu duże ogniska są głównie zbudowane z hydroksyapatytów, natomiast elementy rozproszonej mineralizacji drobinowej zawierają dodatkowo sole wapnia o innym charakterze.

Badania innych autorów wykazują, że skład i struktura depozytów nieorganicznych gromadzonych w przeszczepionych zastawkach jest podobna, niezależnie od rodzaju zastosowanego graftu [86]. Są to głównie fosforany wapnia w postaci

hydroksyapatytów z domieszkami innych form (fosforan ośmiowapniowy, fosforany bezpostaciowe), czy innych soli wapnia (węglany, mleczany). Związki te stanowią również podstawę złogów nieorganicznych powstających w naturalnych zastawkach serca [65,66,69,86].

Zarówno przyczyny jak i konsekwencje mineralizacji nie są jednoznaczne. Tworzenie się dużych ogniskowych zwapnień w płatku zastawki jest z punktu widzenia jej trwałości niewątpliwie procesem niekorzystnym. Znalazło to odzwierciedlenie w krótszym czasie funkcjonowania zastawek z tego typu zwapnieniami. Natomiast wpływ mineralizacji drobinowej na długość funkcjonowania homograftu nie jest tak oczywisty. W badanym materiale szczególną trwałością cechowały się zastawki ze średnim stopniem mineralizacji drobinowej (gr.II), a nie te w których była ona na niskim (gr.III), porównywalnym z grupą kontrolną poziomie. Biorąc pod uwagę fakt, że płatki homograftu ulegają stopniowemu „ścieraniu” - co skutkuje zmniejszeniem ich grubości i czynnej powierzchni prowadząc do niedomykalności - można przypuszczać, że obecność związanych z kolagenem soli wapnia, zwłaszcza w powierzchniowych rejonach płatka do pewnego stopnia hamuje ten proces. Z drugiej strony nadmierny stopień mineralizacji drobinowej prowadzi do zbytniego usztywnienia płatka czego efektem jest zmniejszenie jego czynnej powierzchni i zwężenie zastawki. Wydaje się, że duży stopień mineralizacji zastawek pierwszej grupy nie ma bezpośredniego związku z wiekiem samej zastawki, a jest spowodowany przede wszystkim współwystępowaniem w tych przypadkach procesów patologicznych sprzyjających odkładaniu się soli wapnia. Z odmienną sytuacją mamy do czynienia w dwóch pozostałych grupach. Stwierdzono w nich podobnie jak w grupie porównawczej stopniowy wzrost poziomu mineralizacji drobinowej wraz z wiekiem chorego, jak również czasem funkcjonowania homograftu. W związku z powyższym niski stopień mineralizacji w gr. III, podobny jak w grupie porównawczej, może mieć związek z wiekiem zastawek w tych grupach (odpowiednio 38,8 i 37,2 lat), który jest istotnie niższy niż w gr. II (48,9 lat) o wyższym stopniu mineralizacji drobinowej.

Na podstawie badań własnych i danych z piśmiennictwa wydaje się, że przyczyn różnego nasilenia wapnienia przeszczepionych zastawek można upatrywać w dwu źródłach. Stanowią one również istotę kalcyfikacji dystroficznej zachodzącej w innych tkankach i narządach. Z jednej strony mineralizacja zależy od osobniczych właściwości

organizmu biorcy. Wskazuje na to silne wapnienie, a zwłaszcza tworzenie dużych zwapnień zastawek allogenicznych ($p < 0,05$), zaobserwowane w grupie pacjentów u których wystąpiła kalcyfikacja własnej, usuniętej zastawki. Jest to zgodne z silną mineralizacją wszczepionych zastawek zachodzącą u dzieci i młodzieży u których następuje intensywny wzrost i żywy metabolizm tkanki kostnej [10,19,63]. Z drugiej strony o stopniu mineralizacji decyduje stan morfologiczny wszczepianej zastawki związany zarówno z samym dawcą jak i sposobem jej konserwacji i przygotowania do przeszczepu.

Mechanizm mineralizacji dystroficznej tkanek miękkich nie jest do końca poznany. Mogą w nim uczestniczyć następujące elementy: kolagen, białka niekolagenowe macierzy, kompleksy fosfolipid-Pi, niektóre glikozaminoglikany oraz komórki. Proces można podzielić na dwa okresy: zainicjowanie tworzenia kryształu (nukleacja) i wzrost kryształów. Jako nukleatory występują głównie: kolagen, niektóre białka niekolagenowe i grupy glikozaminoglikanów wiążących wapń w uporządkowany sposób, przestrzennie przypominający układ krystaliczny. Rola komórek to tworzenie lokalnych zbiorników wapnia, a w przypadku rozpadu uwalnianie fosfolipidów (zwłaszcza w przypadku kalcyfikacji dystroficznej). Z reguły nukleacja jest procesem wieloczynnikowym. Dlatego tkanki bogate w kolagen mineralizują w warunkach prawidłowych tylko w obrębie tkanek twardych. Może to być również związane z odmiennym składem istoty podstawowej w nieminerlizujących typach tkanki łącznej. Czynnikiem niezbędnym do zaistnienia mineralizacji w tego typu tkankach mogą być wolne, obdarzone ładunkiem ugrupowania chemiczne w fibrylach kolagenowych [66]. Ich powstawanie może być wynikiem uszkodzenia mechanicznego tkanki w tym również struktury samych włókien kolagenowych. Do grup tych przyłączają się cząsteczki obdarzone ładunkiem w tym np. PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , czy jony Ca^{2+} .

Mechanizm mineralizacji przeszczepionej zastawki nie jest w pełni wyjaśniony. Znaczenie może mieć tu kilka czynników. U podstaw mineralizacji ogniskowej mogą leżeć zmiany patologiczne takie jak: zwłóknienia pozapalne, skrzepliny, ogniska infekcji, martwicy, akumulacja lipidów, a także uszkodzenia mechaniczne miejsc w których dochodzi do najsilniejszego zgięcia pracującego płotka (u jego podstawy) i które są poddawane stale dużym obciążeniom [76,96]. Rola mechanicznego stresu w procesie inicjacji wapnienia tkanek jest znana [18,19,34]. W badanym materiale duże

zwapnienia lokalizowały się najczęściej u podstawy płatka przechodząc w okolice spoidel i brzegu wolnego. W grupie zastawek porównawczych nie stwierdzono obecności dużych zmineralizowanych tworów, ani też zmian patologicznych które mogłyby stanowić podstawę ich tworzenia. Można więc sądzić, że powstawanie tych zmian jest związane z funkcjonowaniem zastawki jako przeszczepu i nie stanowi przyspieszonej kontynuacji procesu obecnego przed implantacją. Obserwowany w badanym materiale związek występowania ognisk zwapnień ze stwierdzonymi śródoperacyjnie i mikroskopowo zmianami infekcyjnymi wsierdzia wskazuje, że proces zapalny stanowi istotny czynnik wywołujący mineralizację. Z drugiej strony zwapniałe ogniskowe zmiany patologiczne stanowić mogą dobre miejsce dla osadzania się drobnoustrojów w przypadku ich przedostania się do krwi.

Mineralizację drobinową w przeciwieństwie do ogniskowych zwapnień wykryto mikroskopowo już w zastawkach grupy porównawczej, chociaż jej zakres był tu bardzo ograniczony. We wszczepionych zastawkach proces ten ulega różnego stopnia przyspieszeniu. Obraz mikroskopowy z często pasmowatym przebiegiem zwapnień wzdłuż włókien kolagenowych, widoczny zwłaszcza w rejonach powierzchniowych warstwy włóknistej wskazuje, że cząsteczki kolagenu są istotnym elementem wiążącym związki wapnia. Ekspozycję kolagenu może ułatwiać opisywane wcześniej wypłukiwanie elementów istoty podstawowej, obserwowane również przez innych autorów [58]. Jest to tym bardziej prawdopodobne, że pokrywa śródbłonkowa płatków, a często również blaszka podstawna – co wykazują obrazy z SEM – jest uszkodzona, co ułatwia wybitnie penetrację płynów do wnętrza płatka, a po przeszczepieniu nawet całych elementów morfotycznych krwi o czym świadczą obserwowane w mikroskopie elektronowym poodkształcane krwinki wciśnięte w szczeliny na powierzchni płatka oraz liczne ich skupiska zlokalizowane w szczelinach tkanki łącznej widoczne w mikroskopie optycznym. Możliwości regeneracji kolagenu i syntezy składników istoty podstawowej są znacznie ograniczone przez zmniejszoną liczbę i żywotność komórek fibroblastycznych [5,60,63]. Stwierdzono ponadto, że znaczne ubytki jej składników obserwowane były jedynie w zastawkach o wysokim bądź podwyższonym stopniu mineralizacji (gr. I i II). Należy również zaznaczyć, że wypłukanie niektórych glikoprotein czy proteoglikanów usuwa jednocześnie zawarte w nich antygeny przez

niektórych uważane za istotne w indukcji odpowiedzi immunologicznej przeciwko allograftowi, co zmniejsza jego antygenowość [44,45].

Niektórzy autorzy podkreślają, że istotniejsze w procesie inicjacji wapnienia są obumarłe komórki i fragmenty komórek pozostałe w tkance po ich rozpadzie [55]. W badanych zastawkach nie zaobserwowano szczególnego nagromadzenia związków wapnia w okolicach większych skupisk komórek zrębu płatków. Przyczyną nasilonej mineralizacji zewnętrznej warstwy *fibrosa* mogą być jednak komórki krwi osadzone w szczelinach przy powierzchni i rozwarstwieniach pomiędzy włóknami zrębu.

Przyczyn biomineralizacji protez zastawkowych upatruje się również w indukowanej przez nie odpowiedzi immunologicznej [19]. Może na to wskazywać znacznie silniejsza mineralizacja zastawek obcogatunkowych, czy też szybkie wapnienie zastawek allogenicznych u dzieci w przypadku których rozwija się żywsza reakcja immunologiczna [10,92]. W tym ostatnim przypadku doniesienia nie zostały dobrze udokumentowane i wielu badaczy ustosunkowuje się do nich krytycznie [57]. Nie potwierdza również immunologicznego tła mineralizacji fakt występowania epizodów ostrego odrzucania przeszczepionego serca z obecnością nacieków limfatycznych w płatkach zastawek, przy zupełnym braku ich wzmożonej mineralizacji [94].

Duża wytrzymałość mechaniczna płatków jest głównie związana z obecnością kolagenowej warstwy włóknistej. Natomiast obecność warstwy sprężystej i połączenia włókien elastycznych i kolagenowych w *fibrosa* gwarantują sprawne otwieranie zastawki i swobodny przepływ w czasie skurczu komory oraz szczelność w czasie zwrotnego uderzenia fali krwi. W *fibrosa* elementy elastyczne łączą sąsiednie włókna kolagenowe lub też spinają dwa miejsca w obrębie tego samego włókna, utrzymując jego falisty przebieg i działając jak swoiste amortyzatory w momencie naporu fali krwi [79]. Przyczynia się to do zwiększenia trwałości wszystkich elementów aparatu zastawkowego. Wraz z wiekiem jednak właściwości elastyczne płatków ulegają znacznemu ograniczeniu i w wieku 60 lat są około 4 razy mniejsze niż w wieku 15 lat [20]. Podobne zmiany następują również w zastawkach przeszczepianych. Następuje ograniczenie fałdowania powierzchni *fibrosa* i zanik falistego przebiegu włókien kolagenowych, co według Christie [21] stanowi podstawową przyczynę obniżania wraz z wiekiem elastyczności płatków. Według Vesely`ego zanik fałdowania *fibrosa* jest efektem uszkodzenia połączeń obu warstw strukturalnych [97]. Badania

przeprowadzone w niniejszej pracy wskazują, że w tych przypadkach obserwuje się zmniejszenie w *fibrosa* ilości włókien elastycznych powiązanych z kolagenem, odcinkową separację warstw strukturalnych, jak i ogólną redukcję ilości elementów elastycznych w płatku. Jednak wpływ długości trwania przeszczepu na redukcję ilości włókien elastycznych był wyraźny tylko w grupie zastawek bez infekcji, gdyż jej obecność zaburza zmiany wynikające z naturalnie przebiegającego procesu starzenia się.

Badania innych autorów wskazują, że w przypadku allograftów występuje z wiekiem większy spadek elastyczności płatków niż w normalnych, naturalnych zastawkach. Christie uważa, że nasilenie tego procesu następuje w organizmie biorcy, po przeszczepieniu zastawki [20,21].

W ponad połowie badanych w tej pracy płatków z grupy porównawczej stwierdzono brak fałdowania powierzchni na znacznym obszarze *fibrosa* (niezależnie od wieku i widoczny nawet w przypadku młodych dawców). Może to wskazywać, że w pewnym stopniu zmniejszenie właściwości elastycznych następuje w czasie jaki upłynął od śmierci dawcy do momentu wszczepienia zastawki.

Tak więc również pod względem elastyczności zastawki przeszczepiane różnią się w stosunku do zastawek o strukturze uznawanej za prawidłową z uwzględnieniem przedziałów wiekowych, a ich zmiany są dalej posunięte niż wynikałoby to z rzeczywistego wieku. Stanowi to kolejny argument przemawiający za stosowaniem zastawek od dawców w wieku zbliżonym do wieku biorcy. Zbyt duża różnica może utrudniać dopasowanie się zastawki do nowych warunków i w stosunkowo krótkim czasie prowadzić do jej niedomykalności.

Wykazana w pracy mniejsza bezwzględna ilość elementów elastycznych w eksplantowanych zastawkach może mieć związek z wyższym średnim wiekiem reoperowanych chorych w stosunku do wieku dawców zastawek grupy porównawczej. Jeżeli grupę porównawczą dobierzemy tak, aby nie różniła się istotnie od grupy badanej pod względem wieku, wówczas nie obserwuje się różnicy w bezwzględnej ilości elementów elastycznych. Z drugiej jednak strony należy zauważyć, że nie ma istotnych różnic gdy wiek zastawek z grupy porównawczej zestawimy z rzeczywistym wiekiem zastawek reoperowanych (Tab. 1).

W stosunku jednak do innych elementów struktury płatków (kolagen, macierz, komórki), w przypadku elementów elastycznych nie następuje znaczne przyspieszenie destrukcji po przeszczepieniu. Wskazuje to na stosunkowo dużą trwałość elementów elastycznych w homograftach.

Obserwowane w mikroskopie elektronowym powiązanie pęczków kolagenowych siecią delikatnych włókien elastycznych, nasuwa przypuszczenie o ich działaniu w sposób zintegrowany i tworzeniu pewnych czynnościowych jednostek elastyczno-mechanicznych. Zmiany w strukturze jednego lub drugiego elementu układu mogą powodować (pomimo fizycznej obecności tworzących go składników) zaburzenia funkcji mechanicznych, prowadząc do upośledzenia wytrzymałości i elastyczności całego płatka. Znaczną integrację elementów elastycznych i kolagenowych (zwłaszcza w warstwie włóknistej) potwierdzają również prace Scott'a [80]. Świadczą o tym również wyniki badań wytrzymałościowych płatków eksplantowanych i grupy porównawczej. Wykazano w nich spadek siły zrywającej w przypadku usuniętych homograftów (co świadczy o znacznym uszkodzeniu funkcjonalnym włókien kolagenowych), jak i wyraźne zmniejszenie elastyczności widoczne zwłaszcza przy porównaniu modułu Younga obu grup zastawek. Ponieważ z przedstawionych wcześniej wyników badań mikroskopowych i morfometrycznych wynika stosunkowo dobre zachowanie elementów elastycznych usuniętych płatków, których ilość nie odbiega istotnie (w przypadku porównywalnego średniego wieku zastawek) od płatków porównawczych, obserwowane różnice elastyczności dowodzą uszkodzenia powiązań elementów kolagenowych i sprężystych i integralności jednostek elastyczno-mechanicznych.

Na podstawie przeprowadzonych badań i przedstawionej powyżej analizy wyników można stwierdzić, że elementem ograniczającym trwałość tych układów są zmiany zachodzące przede wszystkim w kolagenie prowadzące do dezintegracji włókien, przemian szklistych i mineralizacji. Zmiany te mogą być konsekwencją braku żywych komórek zrębu. Szkodliwa wydaje się również nadmierna aktywność fibroblastów niezależnie od tego, czy pochodzą od dawcy czy biorcy przeszczepu. Nie prowadzi ona do odtworzenia prawidłowej przestrzennej i czynnościowej struktury płatka, a jedynie powoduje powstawanie bezładnej sieci włókien i pęczków kolagenowych przejawiających się zgrubieniami i widoczną makroskopowo utratą przejrzystości

płatków. Z tego powodu zachowanie większej ilości żywych komórek zrębu we wszczepianym homografcie nie musi wiązać się z jego większą trwałością. Może natomiast rzutować na stan morfologiczny usuniętego płatka i obserwowane makroskopowo dwa przeciwstawne obrazy: destrukcja i redukcja, a z drugiej strony zwłóknienie i pogrubienie. W przypadku braku aktywności fibroblastycznej dominować może znaczna redukcja płatków w skrajnych wypadkach prowadząca do pozostania jedynie wąskiego strzępu tkanki przy samym pierścieniu włóknistym. Spowolnienie procesu destrukcji w tym przypadku może być efektem przyspieszonej mineralizacji drobinowej (zwłaszcza powierzchniowych rejonów) czy obecności komórkowej otoczki na powierzchni, co utrudnia wnikanie do wnętrza płatka aktywnych komórek z krwi jak i samego osocza i zwiększa mechaniczną i chemiczną odporność płatka. W przypadku dużej aktywności fibroblastów (np. w ogniskach zapalnych, zmianach zakrzepowych) morfologicznie dominuje pogrubienie, zniekształcenie i utrata przejrzystości płatka, czynnościowo natomiast brak prawidłowej ruchomości uniemożliwiający zarówno pełne otwarcie jak i zamknięcie zastawki.

W badanym materiale często obserwowano współwystępowanie obu wyżej opisanych procesów w obrębie jednej zastawki, a nawet w obrębie pojedynczego płatka (zwłóknienie i pogrubienie przy samym pierścieniu i znaczna redukcja dalszej części). Świadczy to o znacznej aktywności fibroblastów przynajmniej w początkowym okresie po przeszczepieniu. Potwierdza to spostrzeżenia Angell'a [3], który opisał występowanie silnych zbliznowaceń przy całkowitej acelularności płatków homografu, co ma dowodzić przynajmniej częściowej żywotności wszczepianych zastawek.

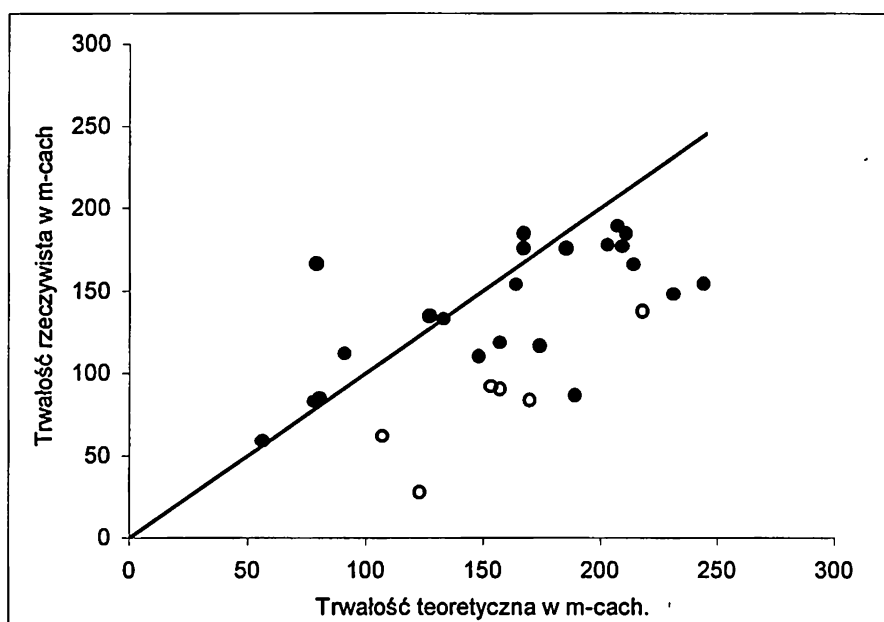
Na podstawie analizy wyników przeprowadzonych badań i danych z piśmiennictwa wydaje się nie jest możliwe radykalne wydłużenie maksymalnego czasu funkcjonowania homografu. Możliwe natomiast jest przesunięcie momentu reoperacji dla większej grupy zastawek do około 20 - 25 lat po wszczepieniu.

Niektóre opisane w obecnej pracy czynniki wpływające na trwałość homografu są znane już w momencie wszczepiania zastawki. Badany materiał przeanalizowano pod kątem występowania tych czynników. Za istotne uznano: (1) różnicę wieku między biorcą i dawcą (B-D), (2) wiek biorcy i dawcy, (3) czas przechowywania zastawki w banku, (4) kalcyfikacja własnej zastawki aortalnej biorcy, (5) nadciśnienie tętnicze i hipercholesterolemia biorcy, (6) IZW przed wszczepieniem homografu.

Zakładając teoretyczną trwałość graftu na 25 lat przyjęto kolejno:

- (1) obniżenie tego okresu o 25% z bezwzględnej różnicy wieku (B-D),
- (2) -35% gdy wiek biorcy i/lub dawcy < 25 lat,
- (3) -25% gdy czas przechowywania w banku < 5 dni lub > 20 dni,
- (4) -25% stwierdzona kalcyfikacja własnej zastawki biorcy,
- (5) -25% nadciśnienie tętnicze, lub -40% nadciśnienie + hipercholesterolemia,
- (6) -25% IZW przed wszczepieniem homograftu.

Wyliczona na podstawie powyższych czynników teoretyczna trwałość 28 zastawek, dla których dysponowano pełnymi danymi korelowała z ich rzeczywistym przeżyciem ($p < 0,01$; $R = -0,59$).



Wyk. 3 Związek wyliczonej trwałości zastawek z rzeczywistym czasem ich funkcjonowania. Linia ciągła wyznacza pełną zgodność prognozy. Puste znaczniki oznaczają przypadki w których przyczyną krótszej trwałości była infekcja zastawki.

Powyższe obserwacje stwierdzone dla stosunkowo niewielkiej grupy badanych zastawek potwierdzają wpływ użytych do obliczeń parametrów na trwałość homograftu. Ich procentowy udział jest tu z konieczności dość umowny. Może natomiast stanowić wyjście do analizy dużej grupy przypadków i próby stworzenia modelu matematycznego, który określałby oczekiwaną trwałość homograftu przed jego wszczepieniem.

Wnioski

1. Stopniowa destrukcja płatków homografitów aortalnych przejawia się: zmniejszeniem liczby komórek, utratą integralności warstw i połączeń między nimi, zanikiem falistego przebiegu włókien kolagenowych w *fibrosa*, redukcją elementów elastycznych i składników macierzy, zatarciem warstwowej budowy oraz mineralizacją zrębu płatków. Prowadzi to do zmniejszenia ich czynnej powierzchni oraz ogranicza właściwości elastyczne i wytrzymałościowe.
2. Zwapnienia występują w dwóch formach. Pierwsza - o jednoznacznie niekorzystnym wpływie na trwałość homografitu - to duże, dobrze ograniczone struktury często związane z powierzchnią prowadzące do znacznych deformacji płatka. Druga forma - drobinowa - to rozsiane ziarna występujące zwłaszcza przy powierzchni *fibrosa*. W pewnych granicach może ona korzystnie wpływać na trwałość zastawki.
3. Czynniki niekorzystnie oddziałującymi na trwałość homografitu jest naciek zapalny i infekcja wsierdza.
4. Duża różnica wieku między biorcą i dawcą istotnie skraca czas funkcjonowania homografitu.
5. Trwałość homografitu jest uzależniona od trzech grup czynników: stopnia zmian występujących w zastawkach przed wszczepieniem, obecności czynników obciążających zależnych od biorcy i korzystnego doboru zastawki. Możliwe wydaje się opracowanie modelu matematycznego prognozującego czas funkcjonowania homografitu na podstawie analizy tych czynników, które można określić przed jego wszczepieniem.



Streszczenie

W pracy przedstawiono opis zmian powstałych w płatkach allogenicznych ludzkich zastawek aortalnych usuniętych z powodu dysfunkcji oraz próbę oceny przyczyn stopniowej ich destrukcji na podstawie analizy porównawczej morfologii, mineralizacji i wytrzymałości z płatkami zastawek aortalnych przygotowanych do przeszczepienia. Wyniki analizowano w powiązaniu w wybranymi danymi klinicznymi dotyczącymi reoperowanych pacjentów (infekcja wsierdza, inne stany infekcyjne, nadciśnienie tętnicze, zaburzenia lipidowe).

Badaną grupę stanowiły płatki 32 homograftów usuniętych w czasie reoperacji po 28 do 244 miesiącach funkcjonowania (średnio 139 m-cy). Grupę porównawczą stanowiły płatki 20 zastawek aortalnych przeznaczonych do wszczepienia i przechowywanych w Banku Zastawek. Dawcami obu grup zastawek były osoby zmarłe z przyczyn losowych. Obie grupy podlegały podobnej procedurze przygotowania do przeszczepienia i przechowywane były w płynie odżywczym i antybiotykowym do 28 dni w temperaturze 4° C. Wiek dawców zastawek grupy porównawczej wynosił od 14 do 57 lat (średnio 37,2 lat) i nie różnił się istotnie od wieku rzeczywistego badanych homograftów (od 20 do 61 lat; średnio 42,7 lat).

W badaniach zastosowano metody morfologiczne (mikroskopia optyczna, elektronowa mikroskopia skaningowa), morfometryczne (komputerowa analiza obrazu), fizykochemiczne (spektrometria metodą absorpcji atomowej /AAS/) i wytrzymałościowe (pomiar siły zrywającej i elastyczności płatka). Oceniane w mikroskopie optycznym skrawki parafinowe barwione były przeglądowo hematoksyliną i eozyną oraz metodami specjalnymi w celu uwidocznienia: włókien kolagenowych (azan-Mallory), elementów elastycznych (rezorcyno-fuksyna), istoty podstawowej (alcjan, PAS), ognisk mineralizacji (von Kossa).

W pracy stwierdzono znaczny stopień uszkodzenia płatków wszystkich usuniętych zastawek przejawiający się zmniejszeniem ich czynnej powierzchni w wyniku wyraźnej destrukcji płatków, powstania zniekształcających zwłóknień i zwapnień oraz osadzaniu materiału skrzeplinowego. Zmiany mikrostruktury charakteryzowały się głównie zatarciem warstwowej budowy, zanikiem falistego przebiegu włókien kolagenowych w

fibrosa, brakiem śródbłonka, znacznym zmniejszeniem liczby komórek zrębu i większym stopniem mineralizacji w stosunku do grupy porównawczej. Trwałe okazały się elementy elastyczne płatka, zwłaszcza w *ventricularis* gdzie nawet 10 lat po wszczepieniu ich obraz był analogiczny jak w grupie porównawczej. W płatkach obu grup stwierdzono zmniejszenie ilości elementów elastycznych zachodzące wraz z wiekiem w dwóch wyraźnych etapach: w młodym wieku (<25 lat) i w wieku strzszym (>45 lat). Pomiędzy 25 a 45 rokiem życia widoczna była pewna stabilizacja ich liczby. Ten stosunkowo dobry stan zachowania elementów elastycznych nie przekładał się na właściwości sprężyste płatków. Były one wyraźnie mniejsze we wszystkich badanych przypadkach w porównaniu z zastawkami nieprzeszczepionymi. Mniejsza również była wytrzymałość mechaniczna płatków grupy badanej.

Zwiększony stopień mineralizacji usuniętych homograftów wykazano zarówno histochemicznie jak i metodą AAS. Podstawową formą chemiczną złogów nieorganicznych był hydroksyapatyt. W mikroskopie optycznym uwidoczniono dwa odmienne rodzaje mineralizacji. Pierwszy to duże, dobrze ograniczone lokalne zwapnienia wewnątrz płatka lub występujące na powierzchni, dla których podłożem mogą być skrzepliny, ogniska martwicy, czy zwłóknień pozapalnych. Druga forma to mineralizacja drobinowa w postaci rozsianych ziaren obecna zwłaszcza przy powierzchni *fibrosa* we wszystkich usuniętych zastawkach jak również w znacznie mniejszym zakresie w grupie porównawczej. W grupie tej zaobserwowano wzrost poziomu mineralizacji drobinowej wraz z wiekiem dawcy. Usunięte homografty pod względem stopnia mineralizacji drobinowej nie były jednorodne i dzieliły się na trzy wyraźne grupy: o silnej mineralizacji (gr.I) - ok.10x wyższej niż w grupie porównawczej, umiarkowanej (gr.II) - ok. 4x wyższej niż w grupie porównawczej i słabej mineralizacji (gr.III) - jedynie nieznacznie wyższej niż w grupie porównawczej. Grupa II cechowała się wyższą o 40% trwałością w stosunku do dwu pozostałych grup. Innymi cechami wyróżniającymi tę grupę (gr.II) zastawek było dwukrotnie częstsza obecność zachowanej struktury warstwowej, czterokrotnie rzadziej występowały zmiany infekcyjne i niemal zupełnie brak było dużych zwapnień w płatkach. Bez względu na różnicę wieku biorcy i dawcy w tej grupie była prawie dwa razy mniejsza, a czas przechowywania w banku o 1/3 dłuższy niż w pozostałych grupach. Związek różnicy wieku biorcy i dawcy (B-D) z trwałością homograftu występował również w

całej badanej grupie. W niemal 90% procentach zastawek funkcjonujących 14 i więcej lat różnica (B-D) nie przekraczała 10 lat. Wśród zastawek o mniejszej trwałości (<14 lat) jedynie w 32% była nie większa niż 10 lat.

Stwierdzono związek obecności dużych zwapnień w płatkach i zatarcie warstwowej budowy z współistnieniem zmian infekcyjnych wsierdza zastawkowego. Trwałość zastawek objętych procesem infekcyjnym była przy tym znacznie krótsza niż pozostałych. Istotnie krótszy był również czas ich konserwacji.

Znamienny wpływ na obniżoną trwałość homografitu miało współistnienie nadciśnienia tętniczego, natomiast obecność zaburzeń lipidowych wiązała się z nieznamiennie krótszym czasem funkcjonowania.

W grupie porównawczej stwierdzono obecność istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi zastawkami. Dotyczyły one zwłaszcza stopnia zachowania śródbłonna, komórek zrębu, elementów macierzy czy też prawidłowego pofałdowania powierzchni warstwy włóknistej.

Uzyskane wyniki wskazują, że wpływ na trwałość homografitu mają trzy grupy czynników: 1. związane ze stanem wszczepianej zastawki (czas przechowywania zastawki w banku, wiek dawcy), 2. związane z biorcą (młody wiek, infekcja wsierdza, kalcyfikacja własnej zastawki, nadciśnienie tętnicze, zaburzenia lipidowe), 3. optymalizacja doboru zastawki (różnica wieku między biorcą i dawcą).

Piśmiennictwo.

- [1] ACC/AHA Guidelines for the management of patients with valvular heart disease. A report of the American College of Cardiology / American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32:1486-1588.
- [2] Angell JD, Christopher BS, Hawtrey CO, Angell WW.: A fresh viable human heart valve bank; sterilization, sterility testing and cryogenic preservation. *Transplant Proc* 1976; 8(suppl 1):139-47.
- [3] Angell W, Oury JH, Lamberti JJ, Koziol J.: Durability of the viable aortic allograft. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989; 98: 48-56.
- [4] Angell WW, Oury JH, Duran CG, Infantes Alcon C.: Twenty years comparison of the human homograft and porcine xenograft. *Ann Thorac Surg* 1989; 48:89-90.
- [5] Armiger LC.: Viability studies of human valves prepared for use as allografts. *Ann Thorac Surg* 1995; 60: S 118-21.
- [6] Armiger LC, Gavin JB, Barratt-Boyes BG.: Histological assessment of orthotopic aortic valve leaflet allografts: Its role in selecting graft pre-treatment. *Pathology* 1983; 15:67-73.
- [7] Armiger LC, Thomson RW, Strickett MG, Barratt-Boyes BG.: Morphology of heart valves preserved by liquid nitrogen freezing. *Thorax* 1985; 40:778-86.
- [8] Bagiński S.: Technika mikroskopowa. PWN Warszawa 1965.
- [9] Balch CM, Karp RB.: Blood group compatibility and aortic valve allotransplantation in man. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1975; 70:256-9.
- [10] Barnhart GR, Jones M, Ishihara T, Chavez AM, Rose DM, Ferrans VJ.: Bioprosthetic valve failure. Clinical and pathological observations in an experimental animal model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982; 83:618-31.
- [11] Barrat-Boyes B.: Homograft aortic valve replacement in aortic incompetence and stenosis. *Thorax* 1964; 19:131.
- [12] Barrat-Boyes BC, Roche AHG, Whitlock RML.: Six years review of the results of freehand aortic valve replacement using an antibiotic sterilised homograft valve. *Circulation* 1977; 55:353.
- [13] Barrat-Boyes BG, Roche AHG.: A review of aortic valve homografts over a six and one-half year period. *Ann Surg* 1969; 170:483-90.

- [14] Bashey RI, Torii T, Angrist A.: Age-related collagen and elastin content of human heart valves. *J Gerontol* 1967; 22:203-8.
- [15] Bernacca GM, Mackay TG, Wheatley DJ.: In vitro calcification of bioprosthetic heart valves: report of novel method and review of the biochemical factors involved. *J Heart Valve Dis* 1992; 1:115-130.
- [16] Bodnar E, Wain WH, Ross DN.: Homograft valves: is degeneration inevitable? *Acta Med Port* 1980; suppl: 147-53.
- [17] Braun J, Hazekamp MG, Koolbergen DR, Sugihara H, Goffin YA, Huysmans HA, Cornelisse CJ.: Identification of host and donor cells in porcine homograft heart valve explants by fluorescence in situ hybridization. *J Pathol* 1997; 183:99-104.
- [18] Buch WS, Kosek JC, Angell WW.: The role of rejection and mechanical trauma on valve graft viability. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1971; 62:696.
- [19] Chanda J.: Prevention of calcification of heart valve bioprostheses: An experimental study in rat. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:S339-42.
- [20] Christie GW, Barratt-Boyes BG.: Age-dependent changes in the radial stretch of human aortic valve leaflets determined by biaxial testing. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:S156-9.
- [21] Christie GW, Barratt-Boyes BG.: Biaxial mechanical properties of explanted aortic allograft leaflets. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:S160-4.
- [22] Christie GW, Barratt-Boyes MB.: Mechanical properties porcine pulmonary valve leaflets: How do they differ from aortic leaflets. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:S195-9.
- [23] Clark RE, Finke EH.: Scanning and light microscopy of human aortic leaflets in stressed and relaxed states. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1974; 67:792-804.
- [24] Clarke DR, Campbell DN, Hayward AR, Bishop DA.: Degeneration of aortic valve allografts in young recipients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 105:934-42.
- [25] Cotran RS, Kumar V, Collins T.: *Robbins Pathologic Basis of Disease*. [6-th ed.] Saunders Company. Philadelphia 1999.
- [26] Courtman DW, Pereira CA, Omar S, Langdon SE, Lee JM, Wilson GJ.: Biomechanical and ultrastructural comparison of cryopreservation and a novel cellular extraction of porcine aortic valve leaflets. *J Biomed Materials Research* 1995; 29:1507-16.

- [27] Crescenzo DG, Hilbert SL, Barrick MK, Corcoran PC, Louis JDS, Messier RH, Ferrans VJ, Wallace RB, Hopkins RA.: Donor heart valves: Electron microscopic and morphometric assessment of cellular injury induced by warm ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992; 103:253-8.
- [28] Crescenzo DG, Hilbert SL, Messier RH Jr, Domkowski PW, Barrick MK, Lange PL.: Human cryopreserved homografts: electron microscopic analysis of cellular injury. *Ann Thorac Surg* 1993; 55:25-31.
- [29] Dajani AS, Taubert KA, Wilson W, Bolger AF, Bayer A, Ferrieri P, Gewitz MH, Shulman ST, Nouri S, Newburger JW: Prevention of bacterial endocarditis. Recommendations by the American Heart Association. *Circulation* 1997; 96:358-66.
- [30] Duncan AK, Vittone J, Fleming KC, Smith HC.: Cardiovascular disease in elderly patients. *Mayo Clin Proc* 1996; 71:184-96.
- [31] Dziatkowiak A, Pfitzner R, Andres A, Podolec P, Marek Z, Zarska M.: Modified techniques for subcoronary insertion of allografts. W: *Cardiac Valve Allografts 1962-1987*. Yankah AC [Red.]. Steinkopft Verlag. Darmstadt 1988; 141-7.
- [32] Dziatkowiak A, Pfitzner R, Malinowski J, Marek Z, Marek G, Podolec P.: Bank homogennych zastawek serca dla kardiochirurgii. Doświadczenia własne na 1376 zastawkach. *Wybrane Zagadnienia z Chirurgii*. Wiechowski S. [Red.] Fundacja PPCh 1996; 391-3.
- [33] Dziatkowiak A, Pfitzner R, Sadowski J, Tracz W, Koziarowska B, Marek Z, Zacny E.: Aortic root replacement using antibiotic sterilized "fresh" unstented homografts - modification of annulus enforcement. W: *Biologic and Bioprosthetic Valves*. Bodnar E, Yacoub M. [Red.] Yorke Medical Books, 1986, 314-20.
- [34] Feng XJ, Van Hove CEJ, Walter PJ, Herman AG.: Effects of storage temperature and fetal calf serum on the endothelium of porcine aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;111:218-30.
- [35] Fischlein T, Schutz A, Haushofer M, Frey R, Uhlig A, Detter C, Reichart B.: Immunologic reaction and viability of cryopreserved homografts. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:S122-6.
- [36] Garcia-Martinez V, Sanchez-Quintana D, Hurlé JM.: Histogenesis of the semilunar valves: an immunohistochemical analysis of tenascin and type-I collagen distribution in developing chick heart valves. *Cell Tissue Res* 1990; 259:299-304.
- [37] Gavin JB, Barratt-Boyes BG, Hitchcock GC, Herdson PB.: Histopatology of „fresh” human aortic valve allografts. *Thorax* 1973; 28:482-7.

- [38] Gavin JB, Herdson PB, Monro JL, Barratt-Boyes BG.: Pathology of antibiotic-treated human heart valve allografts. *Thorax* 1973; 28:473-81.
- [39] Gerosa G, Ross DN, Brucke PE, Dziatkowiak A, Mohammad S, Norman D, Davies J, Sbarbati A, Casarotto D.: Aortic valve replacement with pulmonary homografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 107:424-37.
- [40] Girinath MR, Gavin JB, Strickett MG, Barratt-Boyes BG.: The effects of antibiotics and storage on the viability and ultrastructure of fibroblasts in canine heart valves prepared for grafting. *Aust N Z J Surg* 1974; 44:170-2.
- [41] Goffin YA, Leclerc JL, Primo GC.: Histopathology of the aortic valve in patients with a previous history of acute rheumatic fever. *Acta Cardiol* 1984; 39:329-39.
- [42] Gross L, Kugel MA.: Topographic anatomy and histology of the valves in the human heart. *Am J Path* 1931; 7:445-456.
- [43] Hoekstra F, Knoop C, Aghai Z, Jutte N, Mochtar B, Bos E, Weimar W.: Stimulation of immune-competent cells in vitro by human cardiac valve-derived endothelial cells. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:S131-4.
- [44] Ionescu MI [Red.]: Biological tissue in heart valve replacement. Butterworths. London 1972.
- [45] Ionescu MI.: Tissue heart valves. Butterworths. London 1979.
- [46] Kim KM, Valigorsky JM, Mergner WJ.: Ageing changes to dystrophic calcification. *Hum Pathol* 1976; 7:47-60.
- [47] Kirklin JK, Smith D, Novick W.: Long-term function of cryopreserved aortic homografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 106:154-66.
- [48] Lee RT, Karp RB.: Surgical management of aortic valve endocarditis. W: The aortic valve. Hanley M, Belfus P. Philadelphia 1991; 283-7.
- [49] Liao K, Frater RWM, LaPietra A, Ciuffo G, Ilardi C, Seifter E.: Time-dependent effect of glutaraldehyde on the tendency to calcify of both autografts and xenografts. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:S343-7.
- [50] Long S, Giordano M, Cardon-Cardo C, Summers B, Staiano-Coico L, Hajjar D.: Biochemical and cellular characterization of cardiac valve tissue after cryopreservation or antibiotic preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 108:63-7.
- [51] Lupinetti F, Cobb S, Kioschos H, Thompson S, Walters K, Moore K.: Effects of immunological differences on rat valve allograft calcification. *J Card Surg* 1992; 7:65-70.

- [52] Lupinetti FM, Tsai TT, Kneebone JM, Bove EL.: Effect of cryopreservation on the presence of endothelial cells on human valve allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 106:912-7.
- [53] Marek Z, Dziatkowiak A, Marek G, Podolec P., Próchnicka B.: Wszczepianie homogennych (allogennych) zastawek aorty w aspekcie klinicznym i rzepisów prawa. *Arch Med Sąd* 1987; 37:145-8.
- [54] Matsuki O, Robles A, Gibbs S, Bodnar E, Ross D.: Long-term performance of 555 aortic homografts in the aortic position. *Ann Thorac Surg* 1988; 46:187-91.
- [55] Maxwell L, Gavin JB, Barratt-Boyes BG.: Differences between heart valve allografts and xenografts in the incidence and initiation of dystrophic calcification. *Pathology* 1989; 21:5-10.
- [56] Mercer JJ, Benedicty M, Bahnson AT.: The geometry and construction of the aortic leaflet. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1973; 65:511-518.
- [57] Mitchell RN, Jonas RA, Schoen FJ.: Structure-Function correlations in cryopreserved allograft cardiac valves. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:S108-13.
- [58] Murata K.: Acidic glycosaminoglycans in human heart valves. *J Mol Cell Cardiol* 1981; 13:281-92.
- [59] Neves J, Monteiro C, Santos R, Martins A, Ramos S, Ramos T, Calta C, Rueff J, Melo JQ.: Histologic and genetic assessment of explanted allograft valves. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:S141-5.
- [60] Niwaya K, Sakaguchi H, Kawachi K, Kitamura S.: Effect of warm ischemia and cryopreservation on cell viability of human allograft valves. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:S114-7.
- [61] O'Brien MF, McGiffin DC, Stafford EG.: Allograft aortic valve replacement: long-term comparative clinical analysis of the viable cryopreserved and antibiotic 4°C stored valves. *J Cardiac Surg* 1991; 4:(Suppl)534-43.
- [62] O'Brien MF, Stanford EG, Gardner MAH, Pohler PG, McGriffin DC.: A comparison of aortic valve replacement with viable cryopreserved and fresh allograft valves with a note of chromosomal studies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987; 94:812-24.
- [63] O'Brien MF, Stafford EG, Gardner MAH, Pohlner PG, Tesar PJ, Cochrane AD, Mau TK, Gall KL, Smith SE.: Allograft aortic valve replacement: long-term follow-up. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:S65-70.
- [64] Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, Gown AM, O'Brien KD.: Characterization of the early lesion of "degenerative" valvular aortic stenosis: histological and immunohistochemical studies. *Circulation* 1994; 90:844-53.

- [65] Pawlikowski M, Pfitzner R.: Mineralizacja serca i dużych naczyń. Wydawnictwo IGSMiE PAN. Kraków 1999.
- [66] Pawlikowski M, Pfitzner R.: Zastosowanie metod mineralogicznych w badaniach tkanek człowieka. II. Mineralizacja struktur serca. *Przegląd Lek* 1995; 52:124-128.
- [67] Pearse AG.: *Histochemistry*. Churchill Livingstone. Edinburgh & London. [Vol.1] 1968, [Vol. 2] 1972.
- [68] Pober JS, Collins T, Gimbrone MA Jr, Libby P, Reiss CS.: Inducible expression of class II major histocompatibility complex antigens and the immunogenicity of vascular endothelium. *Transplantation* 1986; 41:141-6.
- [69] Podolec P, Rokita E, Cichocki T, Pfitzner R, Sadowski J, Tracz W, Malinowski J, Dziatkowiak A.: Mineralizacja allogennych zastawek aortalnych serca. *Przegląd Lek* 1998; 55:442-447.
- [70] Podolec P, Tracz W, Marek G, Pfitzner R, Sadowski J, Kapelak B, Malinowski J, Pasowicz M, Marek Z, Próchnicka B, Cichocki T, Rokita E, Dziatkowiak A.: Dysfunkcja allogennych aortalnych zastawek serca: ocena przyczyn na podstawie badań klinicznych, echokardiograficznych i histopatologicznych. *Kardiologia Pol* 1997; 47:475-81.
- [71] Podolec P, Wierzbicki K, Kostkiewicz M, Olszowska M, Wójcikiewicz T, Pfitzner R, Tracz W, Dziatkowiak A.: Czy na jakość życia, aktywność fizyczną, zawodową wpływa rodzaj wszczepionej zastawki serca? Ocena chorych z homogenną lub sztuczną zastawką aortalną. *Kardiologia Pol* 1997; 47:310-6.
- [72] Poole AR, Webber C, Pidoux I.: Localization of dermatan sulfate proteoglycan (DS-PG II) in cartilage and the presence of immunologically related species in other tissue. *J Histochem Cytochem* 1986; 34:619-25.
- [73] Ross D.: Homograft replacement of the aortic valve. *Lancet* 1962; 2:487.
- [74] Ross DN, Gonzales-Lavin L.: Homograft aortic valve replacement. W: *Biologic tissue in heart valve replacement*. Ionescu MI, Ross DN, Wooler GH. London. Butterworths. 1972; 287-312.
- [75] Ross DN, Martelli V, Wain WH.: Allograft and autograft valves used for aortic valve replacement. W: *Tissue heart valves*. Ionescu M. Butterworths. London 1979.
- [76] Schoen FJ.: *Interventional and cardiovascular pathology. Clinical correlations and basic principles*. Saunders. Philadelphia 1989; 42.
- [77] Schoen FJ.: *Pathology of bioprostheses and other tissue heart valve replacements*. W: *Cardiovascular pathology*. Silver MD [Red.]. Churchill Livingstone. New York 1991; 1547-605.

- [78] Scott JE.: Proteoglycan-collagen interactions. W: Function of proteoglycans. Everard D, Whelen J. [Red.] Ciba Foundation Symposium 124. Chichester: Wiley 1986; 104-24.
- [79] Scott M, Vesely I.: Aortic valve cusp microstructure: the role of elastin. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:S391-4.
- [80] Scott MJ, Vesely I.: Morphology of porcine aortic valve cusp elastin. *J Heart Valve Dis* 1996; 5:464-71.
- [81] Smith JD, Ogino H, Hunt D, Laylor RM, Rose ML, Yacoub MH.: Humoral immune response to human aortic valve homografts. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:S127-30.
- [82] Song YC, Yao LY, Kneebone JM, Lupinetti FM.: Effect of cryopreservation and histocompatibility on type I procollagen gene expression in aortic valve grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 114:421-7.
- [83] Swanson WM, Clark RE.: Dimensions and geometric relations of the human aortic valve as a function of pressure. *Circ Res* 1974; 35:871-882.
- [84] Thubrikar MJ, Deck JD, Aouad J, Nolan SP.: Role of mechanical stress in calcification of aortic bioprosthetic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983; 86:115-25.
- [85] Tomazic BB, Brown WE, Schoen FJ.: Physicochemical characterization of cardiovascular calcified deposits. *Atherosclerosis* 1988; 69:5-9.
- [86] Tomazic BB, Edwards WD, Schoen FJ.: Physicochemical characterization of natural and bioprosthetic heart valve calcific deposits: Implication for prevention. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:S322-7.
- [87] Tuna IC, Orszulak IA, Schaff HV, Danielson GK.: Results of homograft aortic valve replacement for active endocarditis. *Ann Thorac Surg* 1990; 49:619-26.
- [88] Turowska B, Plac-Bobula E, Próchnicka B, Działkowiak A, Tracz W, Podolec P.: Dynamika pojawiania się odpornościowych przeciwciał anty-A i anty-B w surowicy chorych po przeszczepieniu ludzkich aortalnych zastawek serca. *Kardiologia Pol* 1985; 28:303-11.
- [89] Yacoub M, Kittle G.: Sterilization of valve homografts by antibiotic solutions. *Circulation* 1970; 41:29-33.
- [90] Yacoub M., Rasmi NRH, Sundt TM, Lund O, Boyland E, Rodley-Smith R, Khaghani A, Mitchel A.: Fourteen year experience with homovital homografts for aortic valve replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 110:186-94.
- [91] Yacoub M, Suijters A, Khaghani A, Rose M.: Localisation of major histocompatibility complex (HLA, ABC + DR) antigens in aortic homografts. W:

Biologic bioprosthetic valves. Bodnar E, Yacoub M. [Red.] Yorke Medical Books. New York 1985; 65-72.

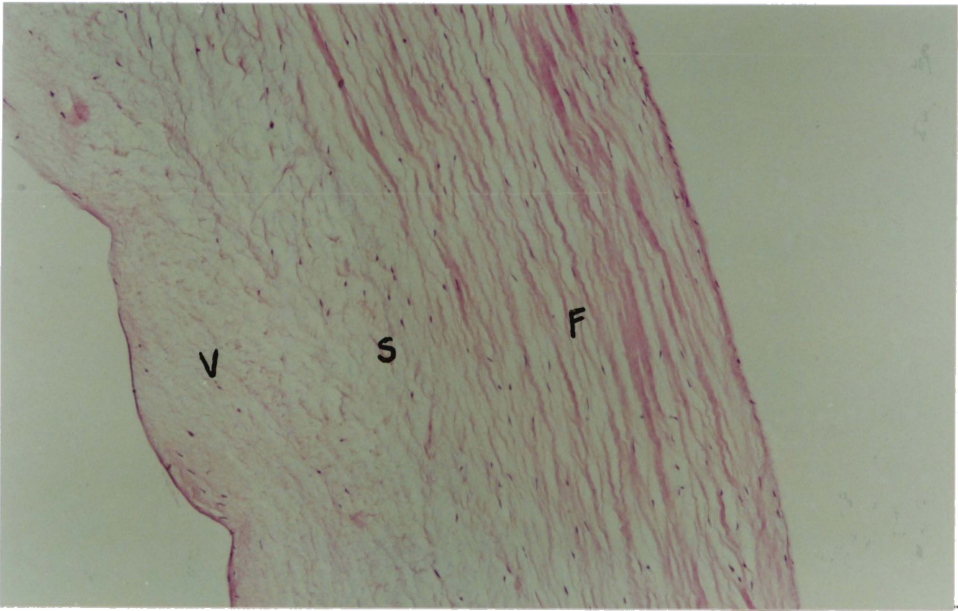
- [92] Yankah AC, Alexi-Meskhisvili V, Weng Y, Schorn K, Lange PE, Hetzer R.: Accelerated degeneration of allografts in the first two years of life. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:S71-7.
- [93] Yankah AC, Wottge HU, Muller-Ruchholtz W.: Antigenicity and fate of cellular components of heart valve allografts. W: *Cardiac valve allografts 1962-1987. Current concepts on the use of aortic and pulmonary allografts for heart valve substitutes*. Yankah AC, Hetzer R, Yacoub MH [Red.] Steinkopff Verlag, Darmstadt, 1988; 77-8.
- [94] Valente M, Faggian G, Billingham ME, Talenti E, Calabrese F, Casula R, Shumway NE, Thiene G.: The aortic valve after heart transplantation. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:S135-40.
- [95] Vesely I, Gonzales-Levin L, Graf D, Boughner D.: Mechanical testing of cryopreserved aortic homografts. Comparison with xenografts and fresh tissue. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990; 99:119-27.
- [96] Vesely I, Macris N, Dunmore PJ, Boughner D.: The distribution and morphology of aortic valve cusp lipids. *J Heart Valve Dis* 1994; 3:451-6.
- [97] Vesely I, Noseworthy R.: Micromechanics of the fibrosa and the ventricularis in aortic valve leaflets. *J Biomechanics* 1992; 25:101-13.
- [98] Waszyrowski T, Żebrowski A, Krzemińska-Pakuła M, Kaczmarek A, Działkowiak A, Sokół G.: Immunologiczne aspekty wszczepienia zastawki allogennej. *Kardiologia Polska* 1993; 38:15-19.

**DOKUMENTACJA
FOTOGRAFICZNA**

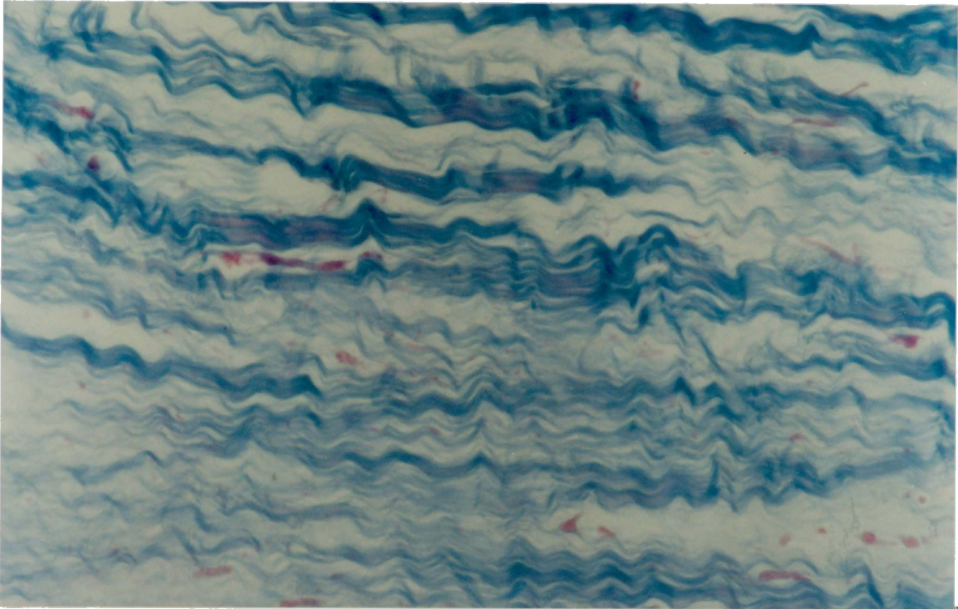
Fot. 1 Przekrój płatka zastawki grupy porównawczej. Widoczna warstwowa budowa płatka. F – *fibrosa*; S – *spongiosa*; V – *ventricularis*. Dawca lat 36. (Barwienie H-E) Pow. 100 x.

Fot. 2 Przekrój warstwy włóknistej (*fibrosa*) płatka zastawki grupy porównawczej. Widoczny równoległy układ i falisty przebieg włókien kolagenowych. Dawca lat 42. (Barwienie azan-Mallory) Pow. 400 x.

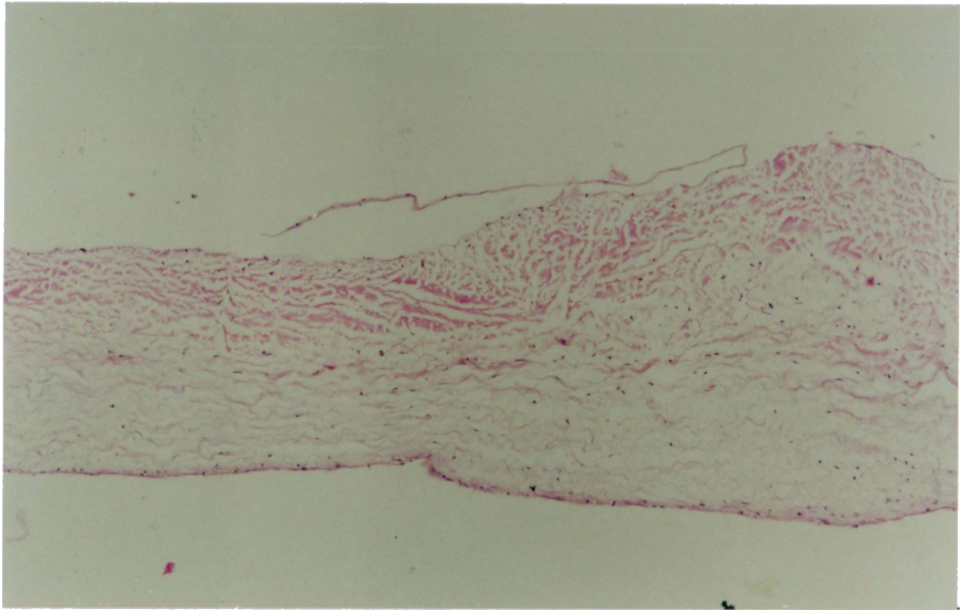
Fot. 3 Przekrój płatka zastawki grupy porównawczej. Widoczne odwarstwienie i utrata ciągłości śródbłonka. Powierzchnia *fibrosa* wygładzona, pozbawiona naturalnego pofałdowania. Dawca lat 52. (Barwienie H-E) Pow. 100 x.



Fot. 1



Fot. 2

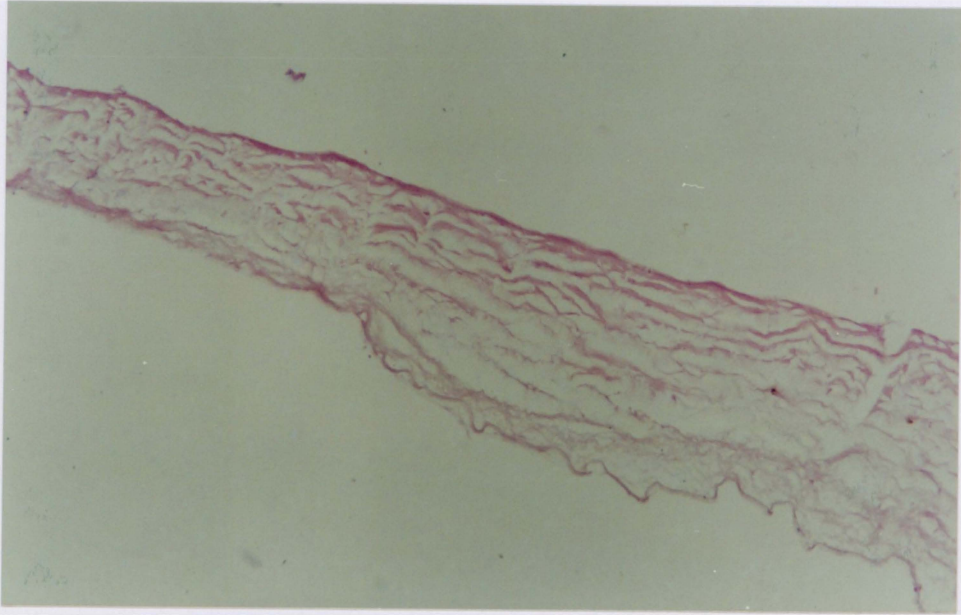


Fot. 3

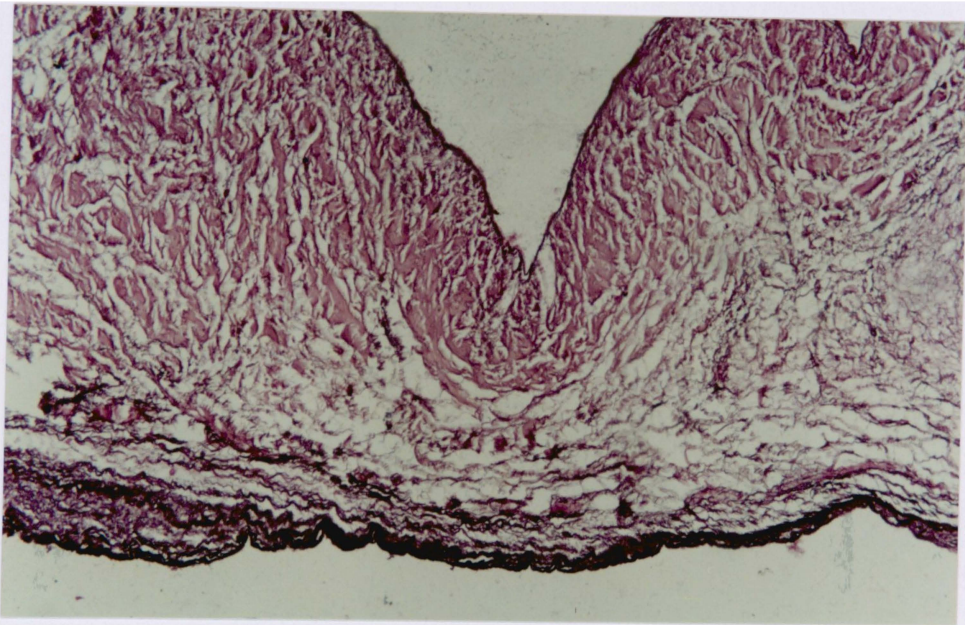
Fot. 4 Przekrój płatka zastawki grupy porównawczej. Wygładzona powierzchnia *fibrosa* i niemal zupełny brak komórek zrębu oraz śródbłonka. Dawca lat 38. (Barwienie H-E) Pow. 100 x.

Fot. 5A Przekrój płatka zastawki grupy porównawczej. Dawca lat 20. Widoczne rozmieszczenie elementów elastycznych wybarwionych na kolor brunatno-czarny oraz dobrze zachowane fałdowanie powierzchni warstwy włóknistej. (Barwienie R-F) Pow. 100 x.

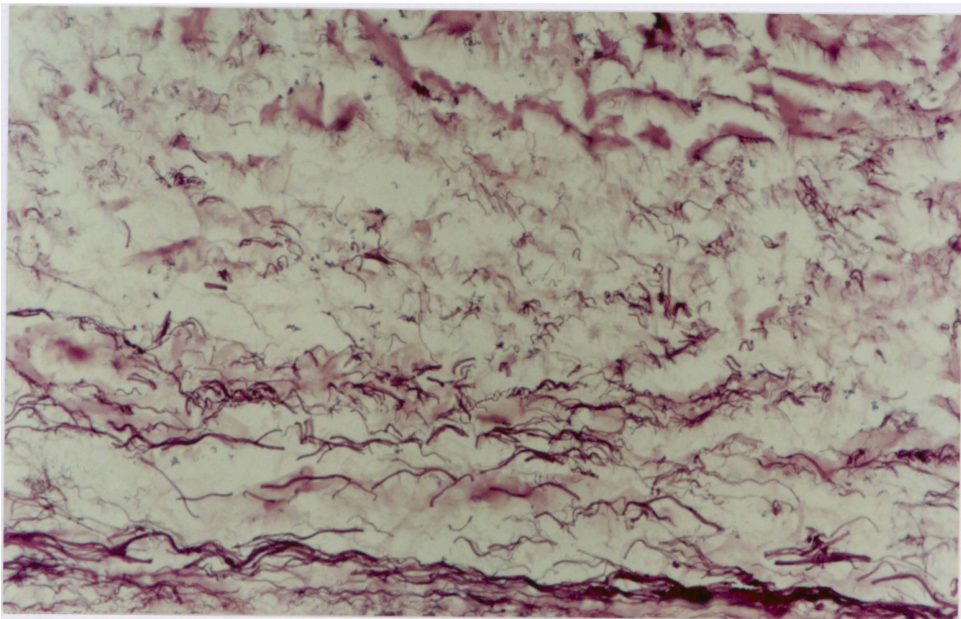
Fot. 5B Ten sam płatek. Widoczna częściowa fragmentacja włókien elastycznych *ventricularis*. (Barwienie R-F) Pow. 400 x.



Fot. 4



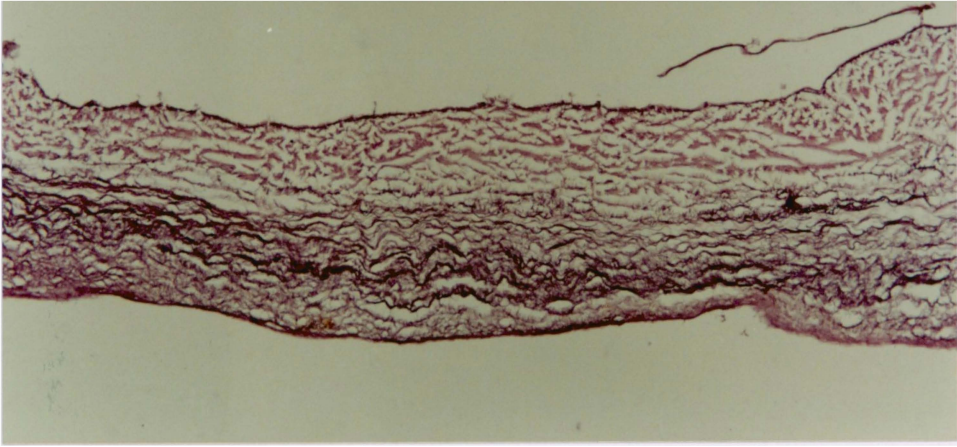
Fot. 5A



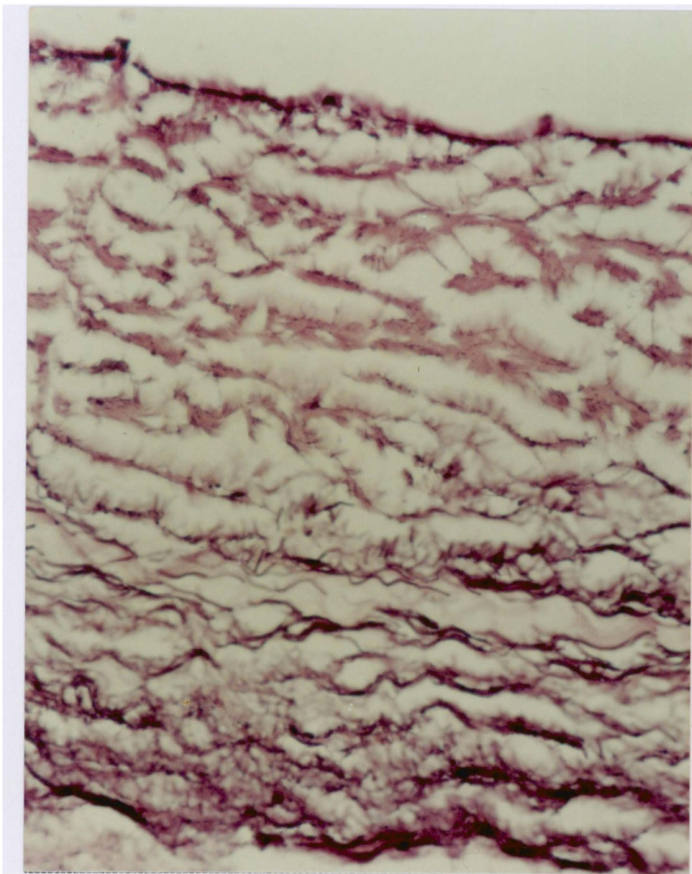
Fot. 5B

Fot. 6A Przekrój płatka zastawki grupy porównawczej. Dawca lat 52. Widoczna lokalizacja elementów sprężystych głównie w *ventricularis*. (Barwienie R-F) Pow. 100 x.

Fot. 6B Ten sam płatek. Widoczny równoległy przebieg grubych elementów elastycznych w *ventricularis*. W *fibrosa* włókna drobniejsze związane z pęczkami kolagenowymi i tworzące poprzeczne mostki między nimi. (Barwienie R-F) Pow. 400 x.



Fot. 6A

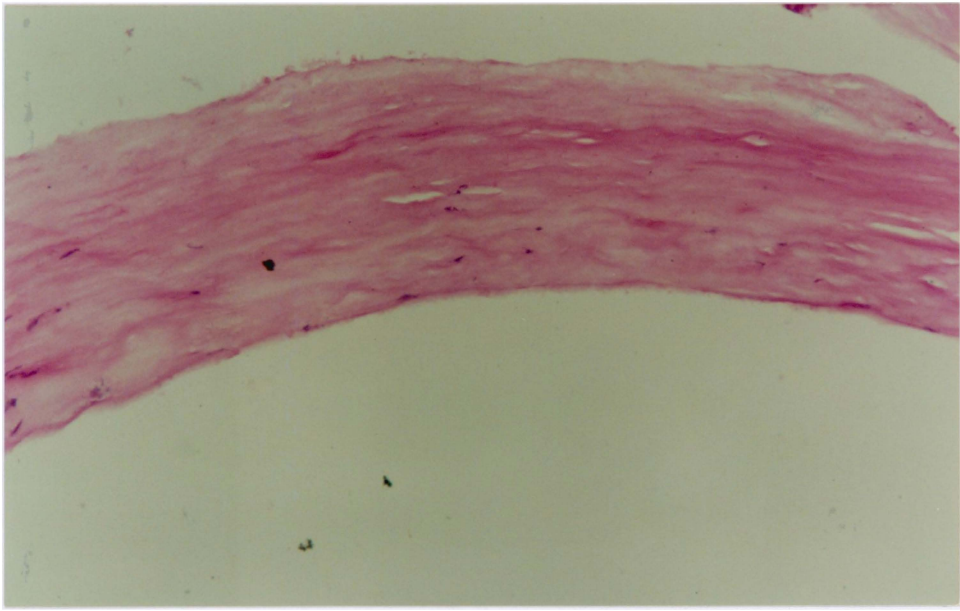


Fot. 6B

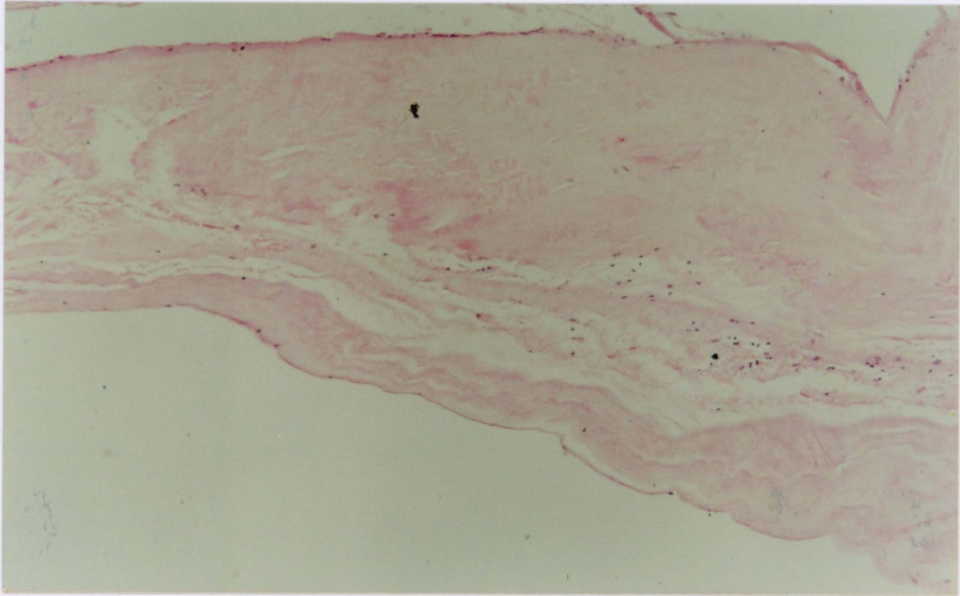
Fot. 7 Przekrój płatka homograftu. Zatarcie struktury warstwowej, brak śródbłonka i widoczne nieliczne komórki zrębu. Zastawka usunięta po 13 latach. (Barwienie H-E) Pow. 200 x.

Fot. 8A Przekrój płatka homograftu. Częściowo zachowana struktura warstwowa. W warstwie środkowej (*spongiosa*) widoczne komórki naciekowe. Zastawka usunięta po 14 latach. (Barwienie H-E) Pow. 100 x.

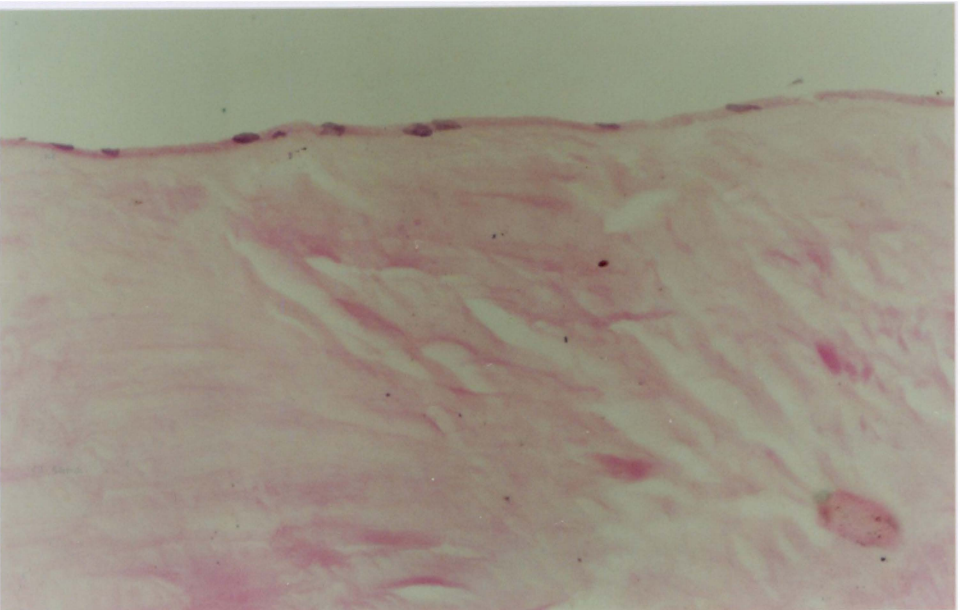
Fot. 8B Fragment powierzchni *fibrosa* tej samej zastawki z widoczną otoczką śródbłonkową. (Barwienie H-E) Pow. 400 x.



Fot. 7



Fot. 8A

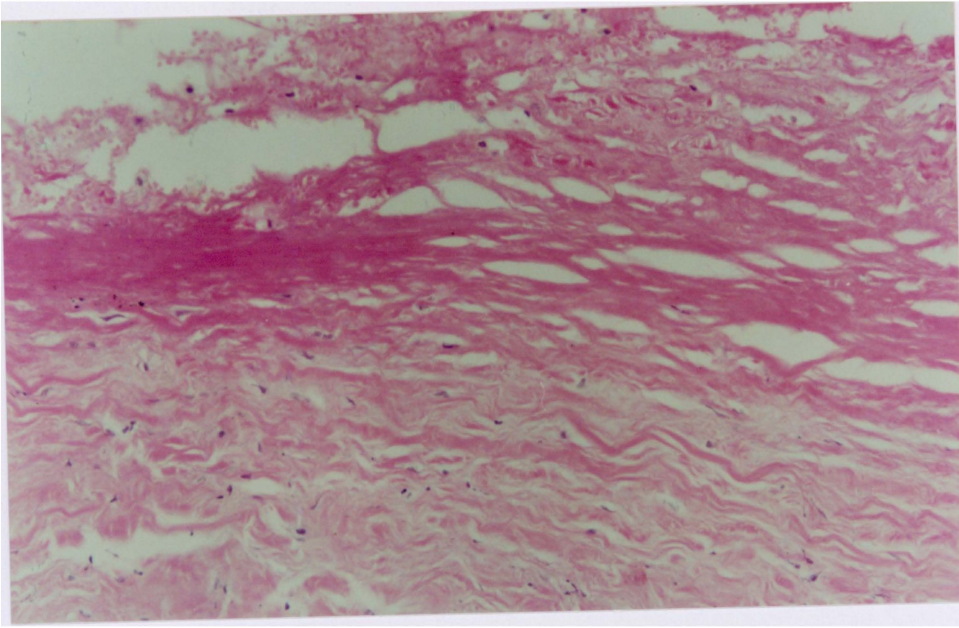


Fot. 8B

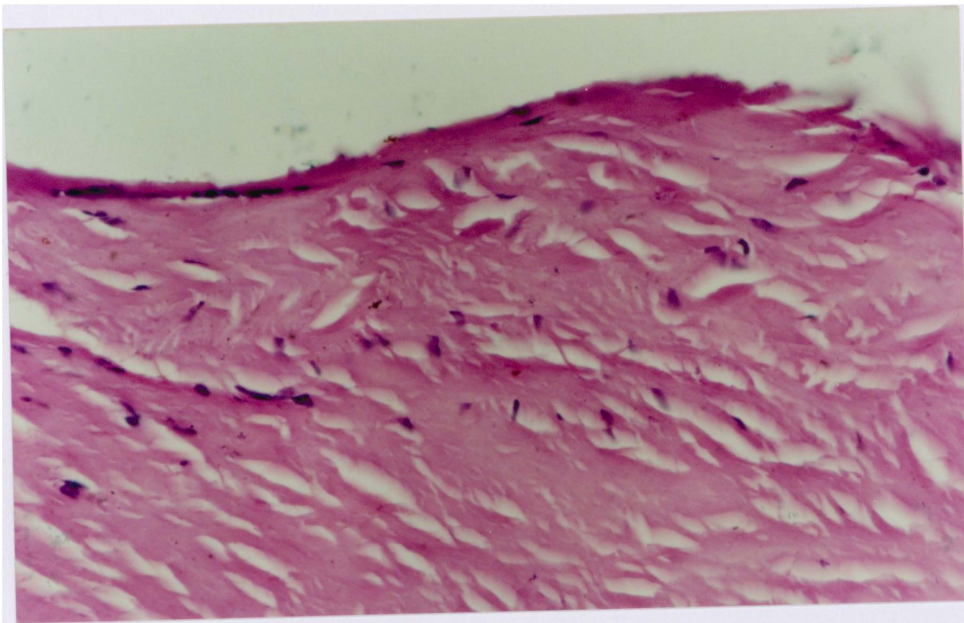
Fot. 9 Fragment powierzchni homografu usuniętego po 15 latach. Widoczne złogi włókniaka i krwinek dość luźno związane z powierzchnią. W zrębie płątka obecne pojedyncze komórki naciekowe. (Barwienie H-E) Pow. 200 x.

Fot. 10 Fragment homografu usuniętego po 10 latach. Na powierzchni obecny włókniak. Pojedyncze komórki naciekowe widoczne w zrębie i wzdłuż powierzchni. Wydłużone jądra fibrocytów w owalnych jamkach włóknistego zrębu. (Barwienie H-E) Pow. 400 x.

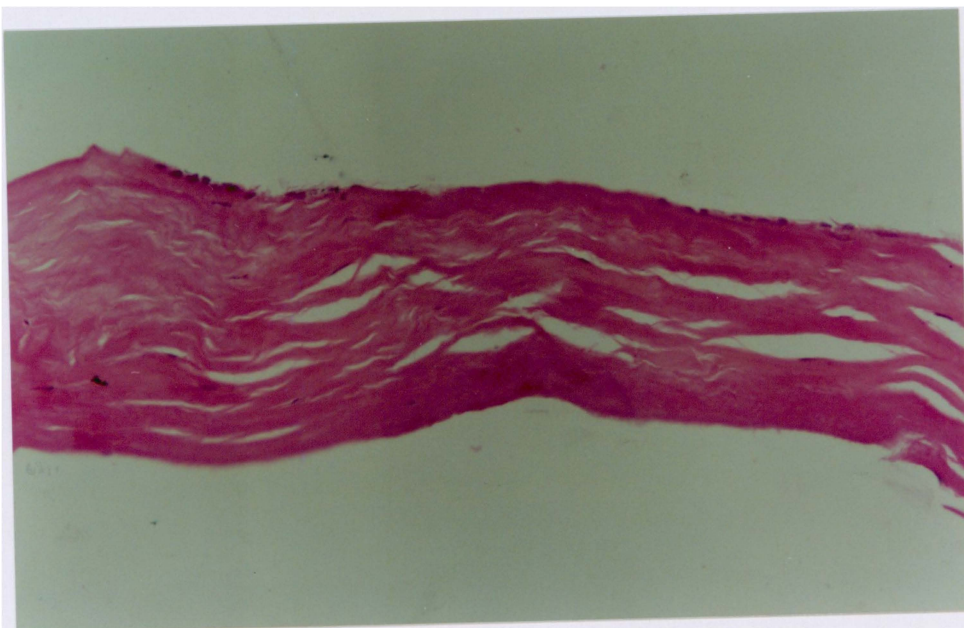
Fot. 11 Przekrój płątka homografu usuniętego po 9 latach. Widoczne rozwarstwienia silnie zwłókniałego zrębu płątka z pojedynczymi fibrocytami. Na powierzchni grupy komórek naciekowych. (Barwienie H-E) Pow. 200 x.



Fot. 9



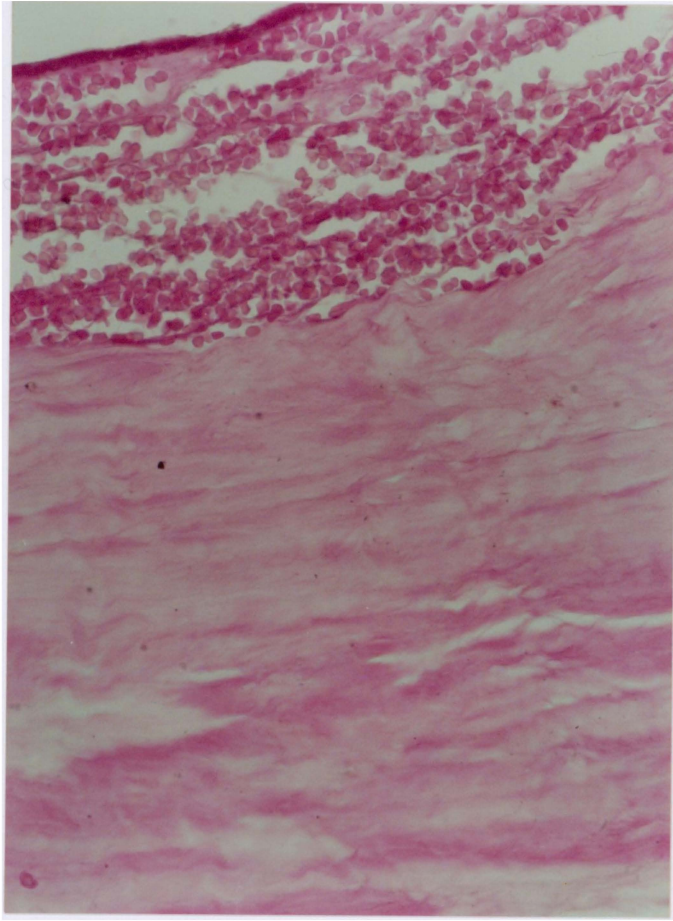
Fot. 10



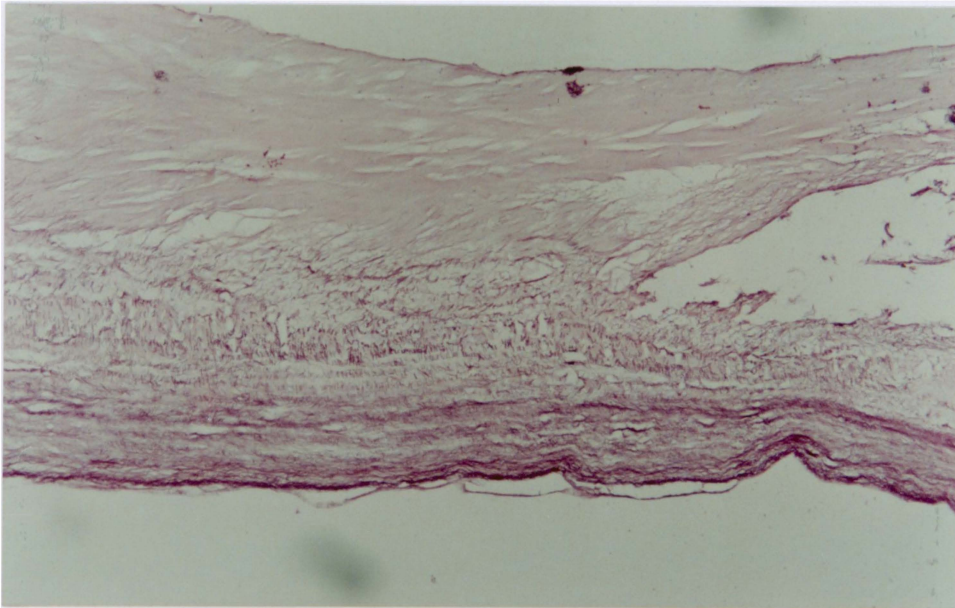
Fot. 11

Fot. 12 Przekrój płatka homografu usuniętego po 20 latach. Widoczne rozwarstwienie przy powierzchni pokryte włóknikiem i wypełnione krwinkami. (Barwienie H-E) Pow. 400 x.

Fot. 13 Przekrój płatka homografu usuniętego po 17 latach. Widoczna częściowa separacja warstwy włóknistej i sprężystej. (Barwienie R-F) Pow. 100 x.



Fot. 12

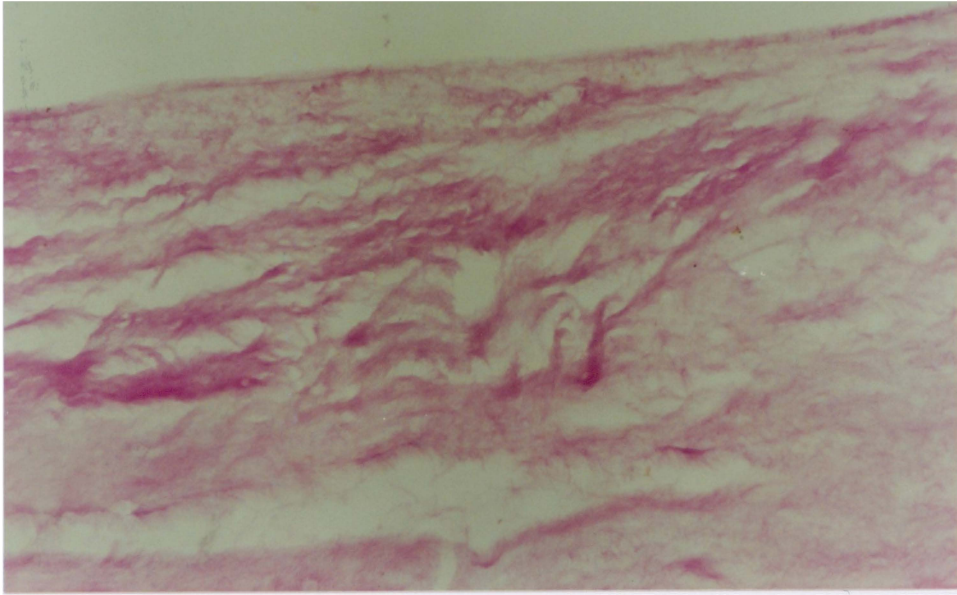


Fot. 13

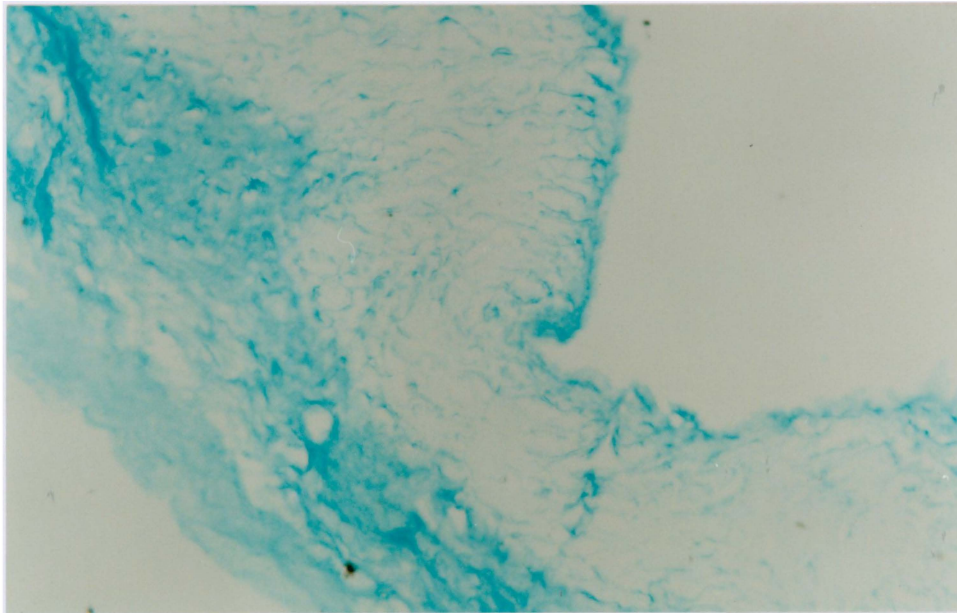
Fot. 14 Przekrój płatka homograftu usuniętego po 7 latach. Widoczny częściowo zachowany falisty przebieg włókien kolagenowych w warstwie włóknistej oraz zupełny brak komórek. (Barwienie H-E) Pow. 400 x.

Fot. 15 Obecność glikozaminoglikanowych elementów macierzy w płatku zastawki grupy porównawczej. Widoczna warstwowa budowa płatka z nagromadzeniem kwaśnych glikozaminoglikanów w warstwie środkowej (*spongiosa*). Dobrze zachowane fałdowanie powierzchni *fibrosa*. Dawca lat 19. (Barwienie: Alcjan) Pow. 200 x.

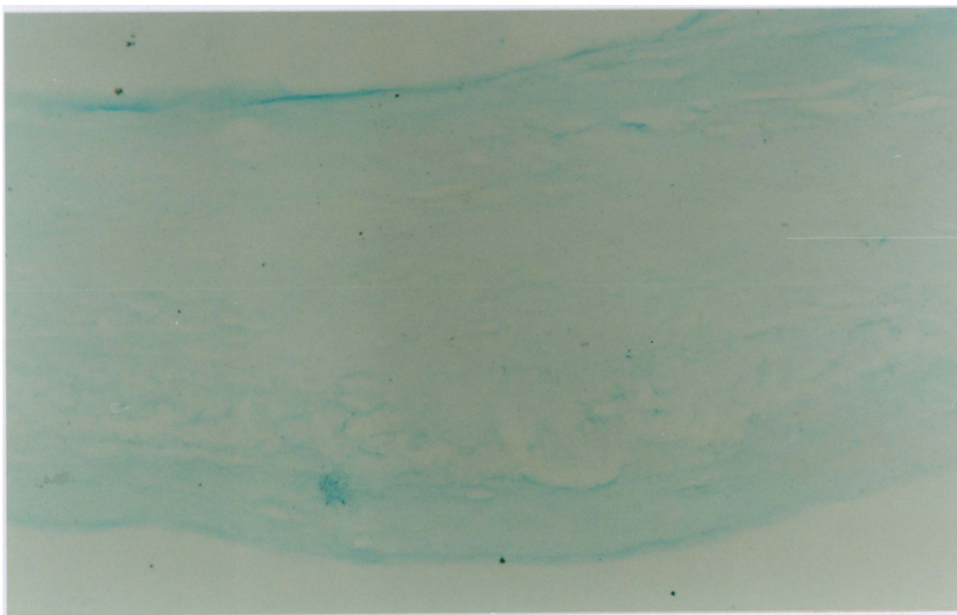
Fot. 16 Obecność glikozaminoglikanowych elementów macierzy w homografacie usuniętym po 14 latach. Niemal zupełny brak reakcji we wszystkich warstwach płatka. (Barwienie: Alcjan) Pow. 200 x.



Fot. 14



Fot. 15

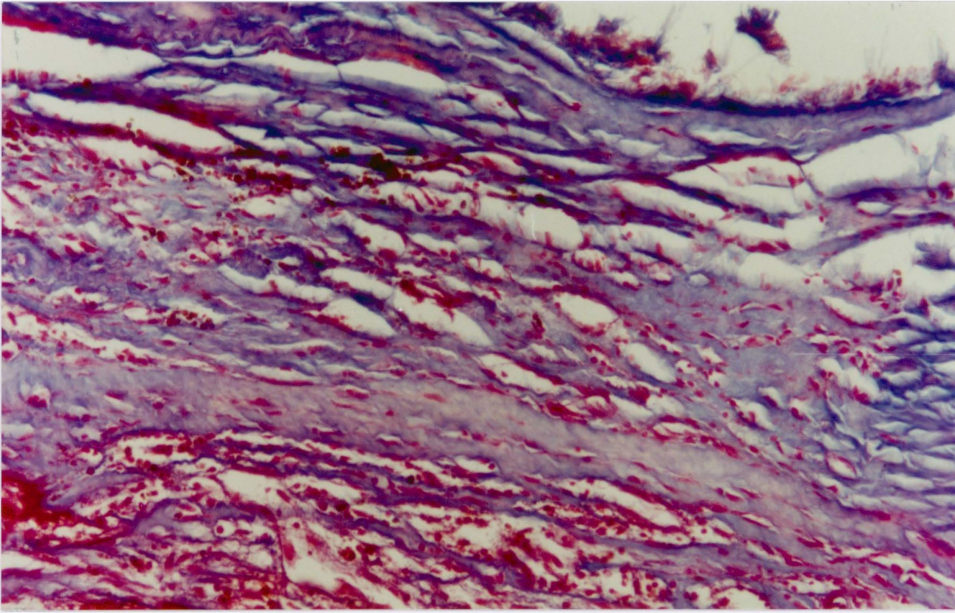


Fot. 16

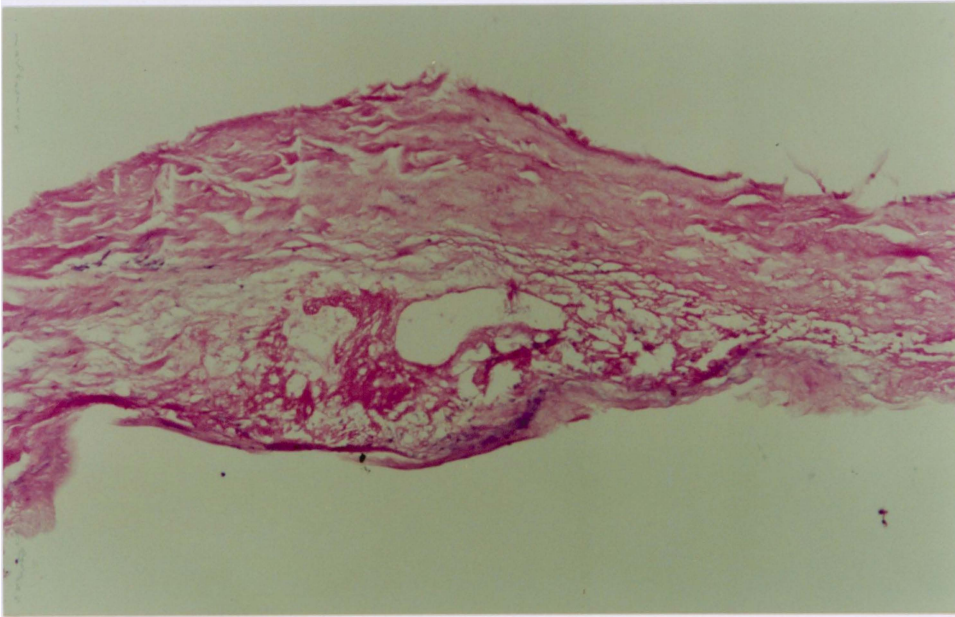
Fot. 17 Fragment homografu usuniętego po 5 latach u chorego z zapaleniem wsierdza. Mieszany naciek komórkowy, złogi włóknika i destrukcja kolagenu w obrębie zmienionej zapalnie tkanki. (Barwienie: azan-Mallory) Pow. 200 x.

Fot. 18 Fragment homografu usuniętego po 7 latach u chorego z zapaleniem wsierdza. Ogniska martwicze, złogi włóknika i niewielkie zakrzepy w *ventricularis*. (Barwienie H-E) Pow. 100 x.

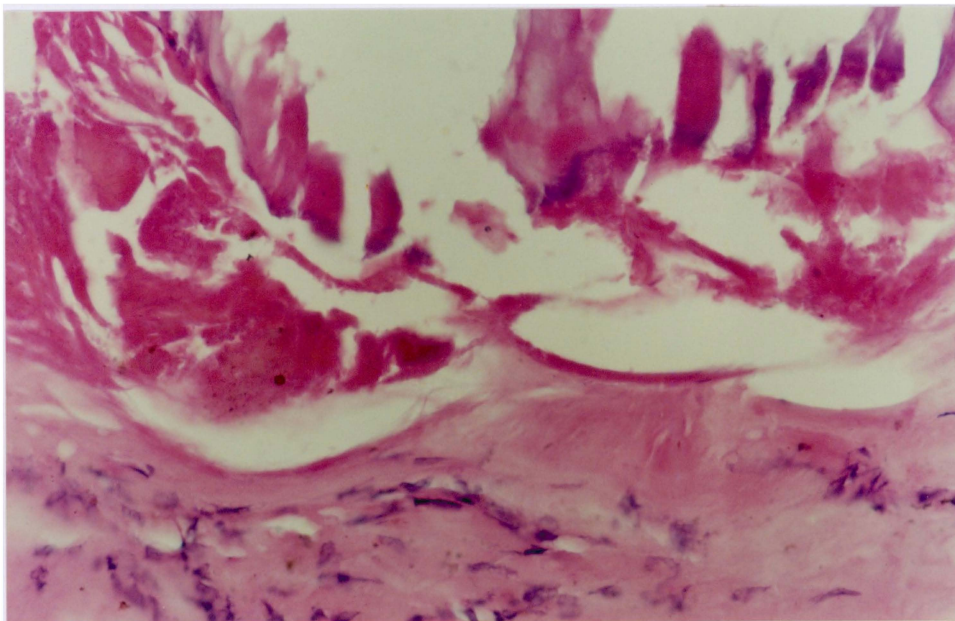
Fot. 19 Fragment homografu usuniętego po 8 latach u chorego z zapaleniem wsierdza. Wegetacja na powierzchni płątka i komórki naciekowe w zrębie. (Barwienie H-E) Pow. 400 x.



Fot. 17



Fot. 18

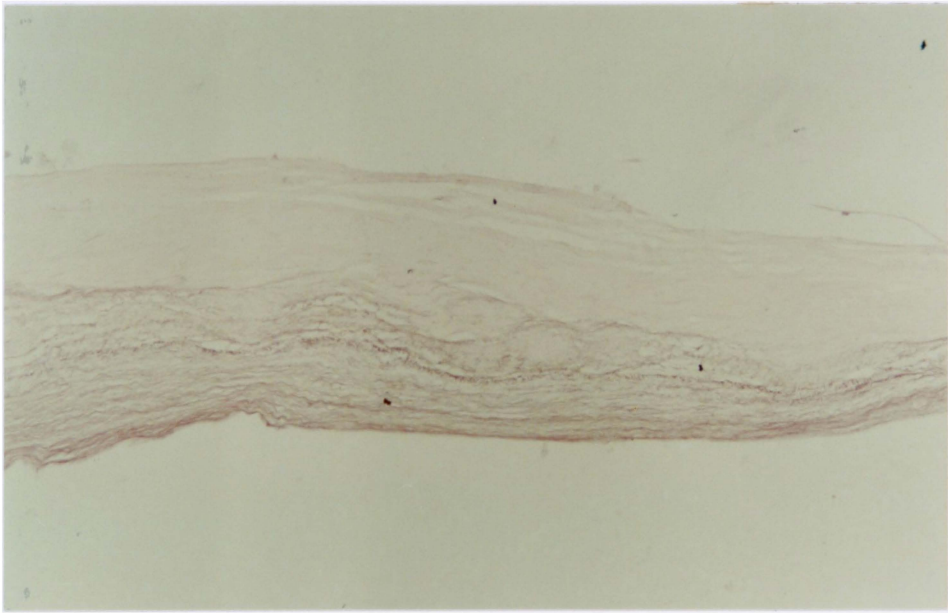


Fot. 19

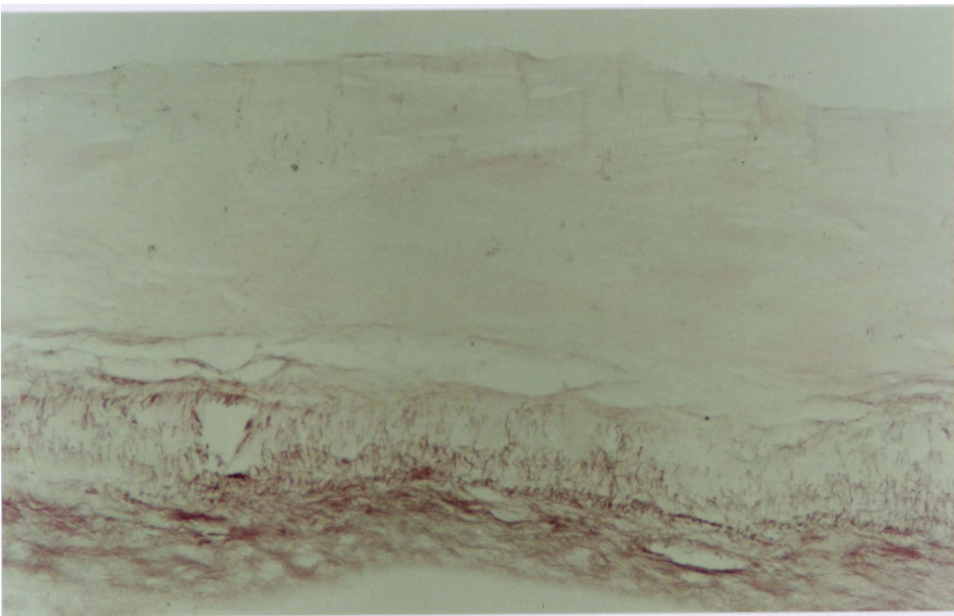
Fot. 20 Przekrój płatka homografitu usuniętego po 15 latach. Widoczna warstwowa budowa i dobrze zachowane elementy elastyczne w *ventricularis*.
(Barwienie R-F) Pow. 100 x.

Fot. 21 Przekrój płatka homografitu usuniętego po 14 latach. Widoczna warstwowa budowa. Brak elementów elastycznych w warstwie włóknistej.
(Barwienie R-F) Pow. 200 x.

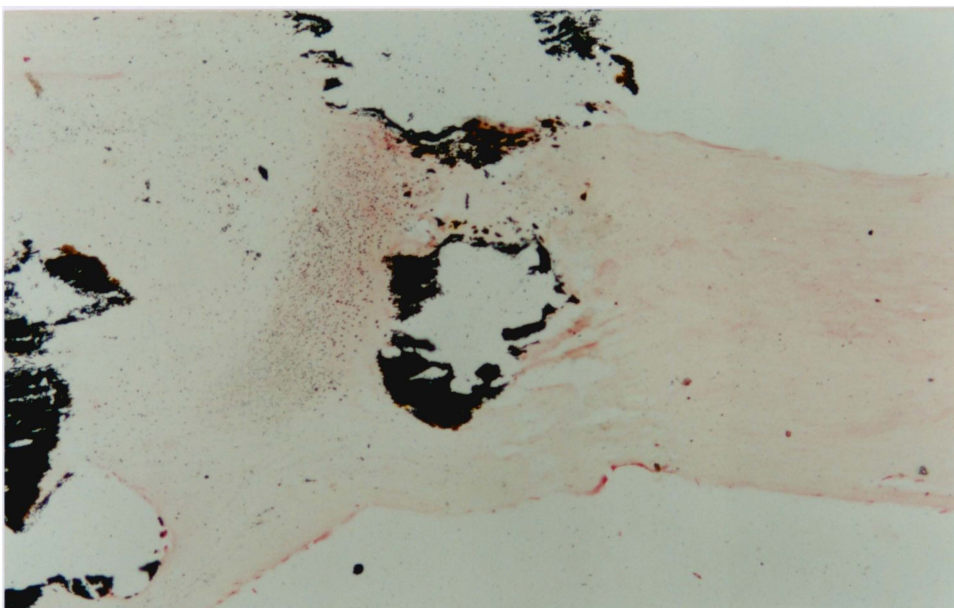
Fot. 22 Przekrój płatka homografitu usuniętego po 16 latach. Widoczne duże zwapnienia zlokalizowane wewnątrz płatka oraz związane z powierzchnią.
(Barwienie met. von Kossa) Pow. 100 x.



Fot. 20



Fot. 21



Fot. 22

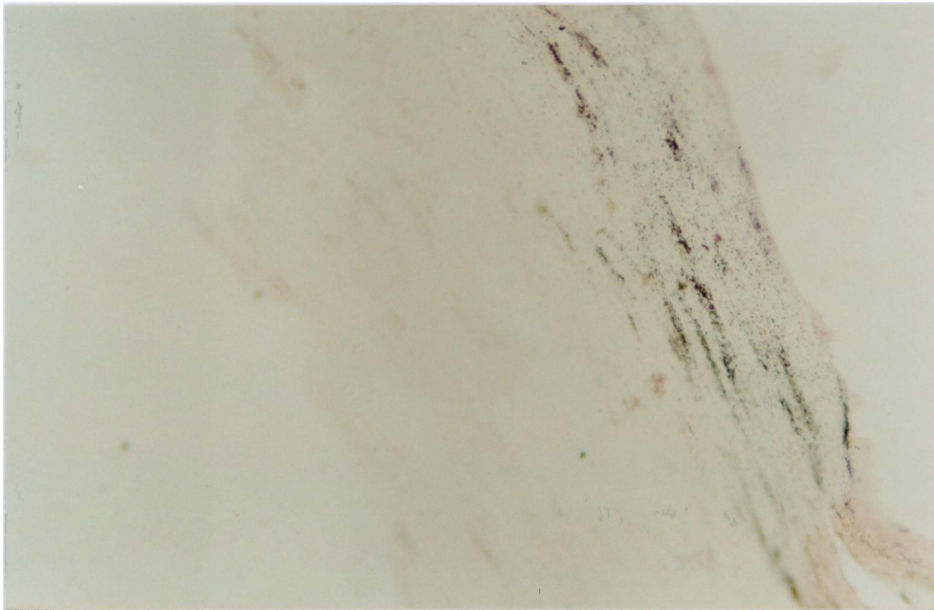
Fot. 23 Przekrój płatka homograftu usuniętego po 7 latach. Związana z powierzchnią dużych rozmiarów zmineralizowana zmiana. Główna masa uległa wykruszeniu w trakcie preparatyki. W skrawku pozostały jedynie przylegające do zrębu płatka zwapniałe brzegi. (Barwienie met. von Kossa) Pow. 40 x.

Fot. 24 Przekrój płatka homograftu usuniętego po 11 latach. Pasma mineralizacji drobinowej w powierzchniowych rejonach warstwy włóknistej. (Barwienie met. von Kossa) Pow. 200 x.

Fot. 25 Przekrój płatka homograftu usuniętego po 14 latach. Mineralizacja drobinowa w warstwie włóknistej. (Barwienie met. von Kossa) Pow. 100 x.



Fot. 23



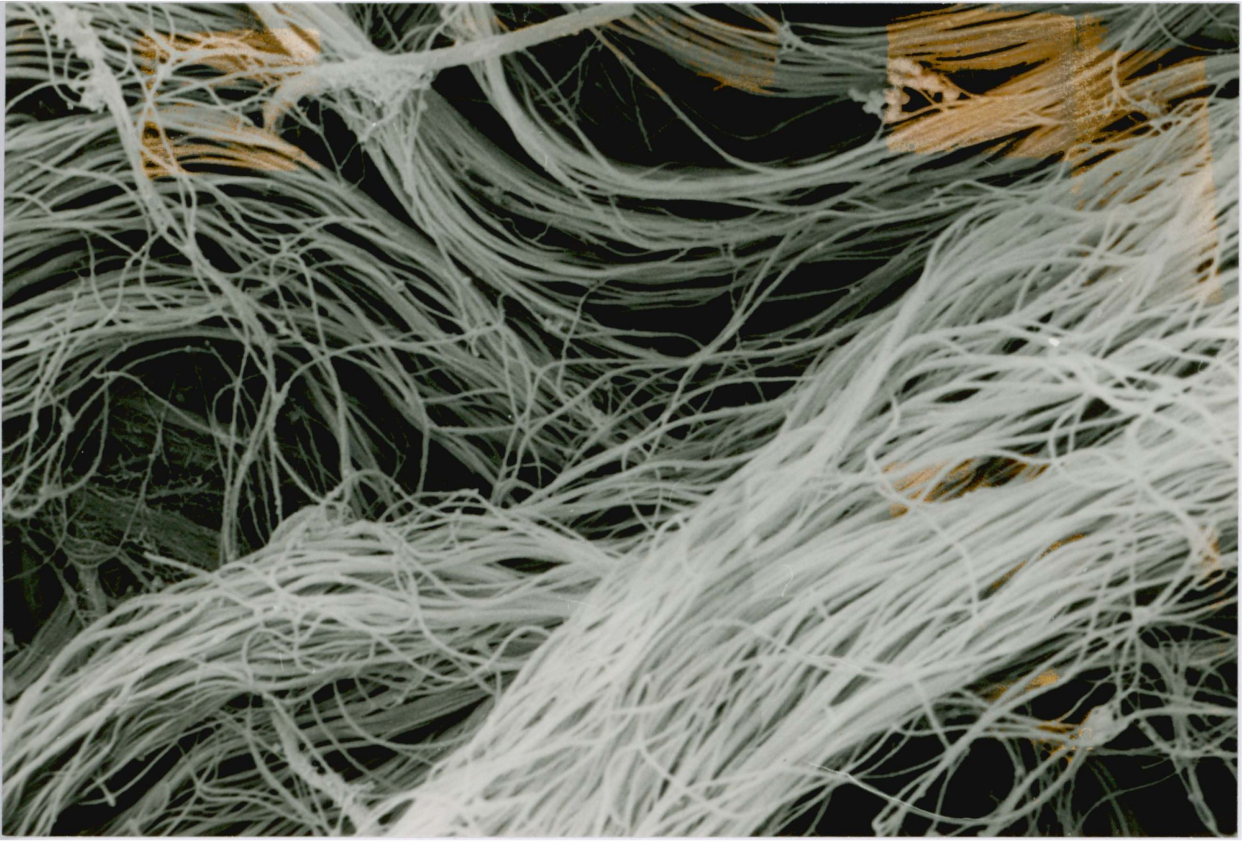
Fot. 24



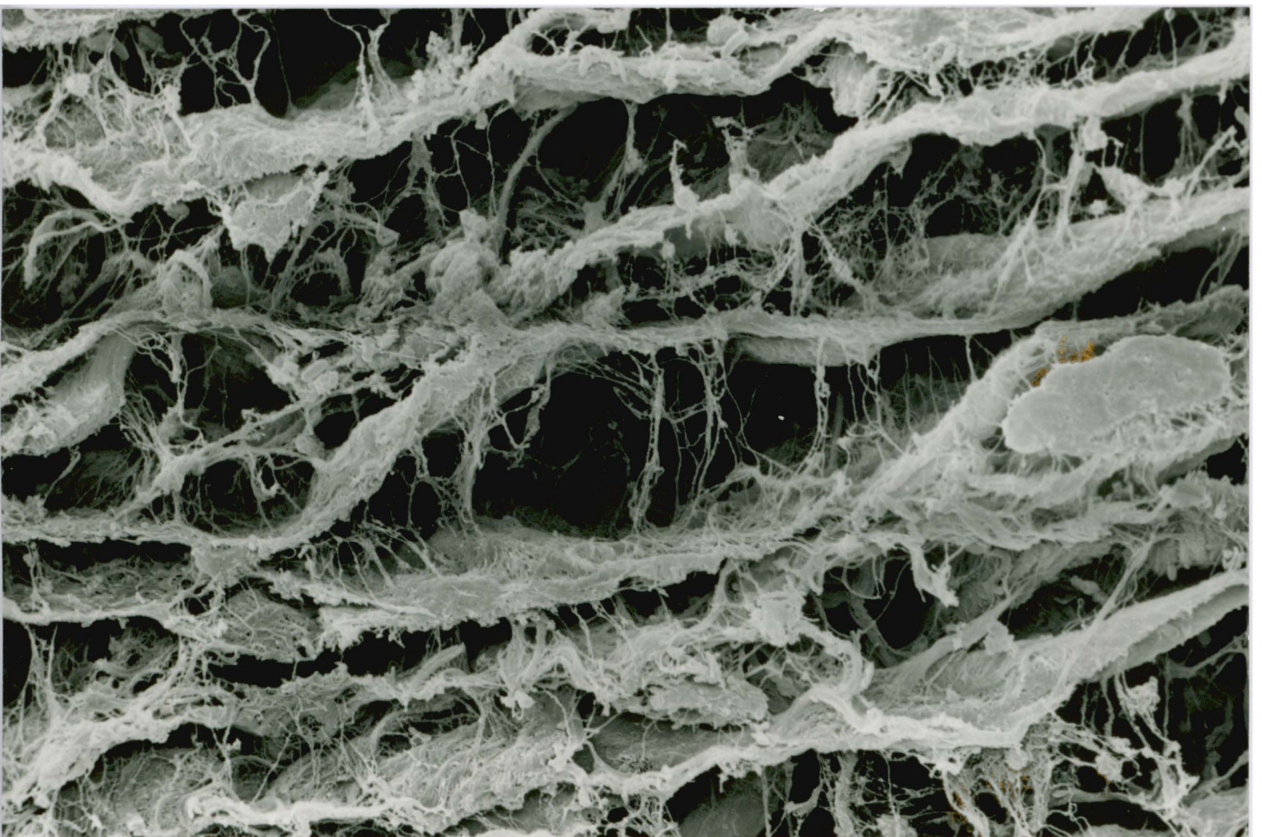
Fot. 25

Fot. 26 Przekrój przez warstwę włóknistą (*fibrosa*) płatka zastawki grupy porównawczej. Widoczne faliście przebiegające pęczki włókien kolagenowych oplecione delikatną siecią włókien elastycznych. SEM (Pow. 2000 x)

Fot. 27 Przekrój przez warstwę sprężystą (*ventricularis*) płatka grupy porównawczej. Elementy elastyczne grupują się w blaszki o równoległym przebiegu połączone poprzecznymi mostkami. SEM (Pow. 1500 x)



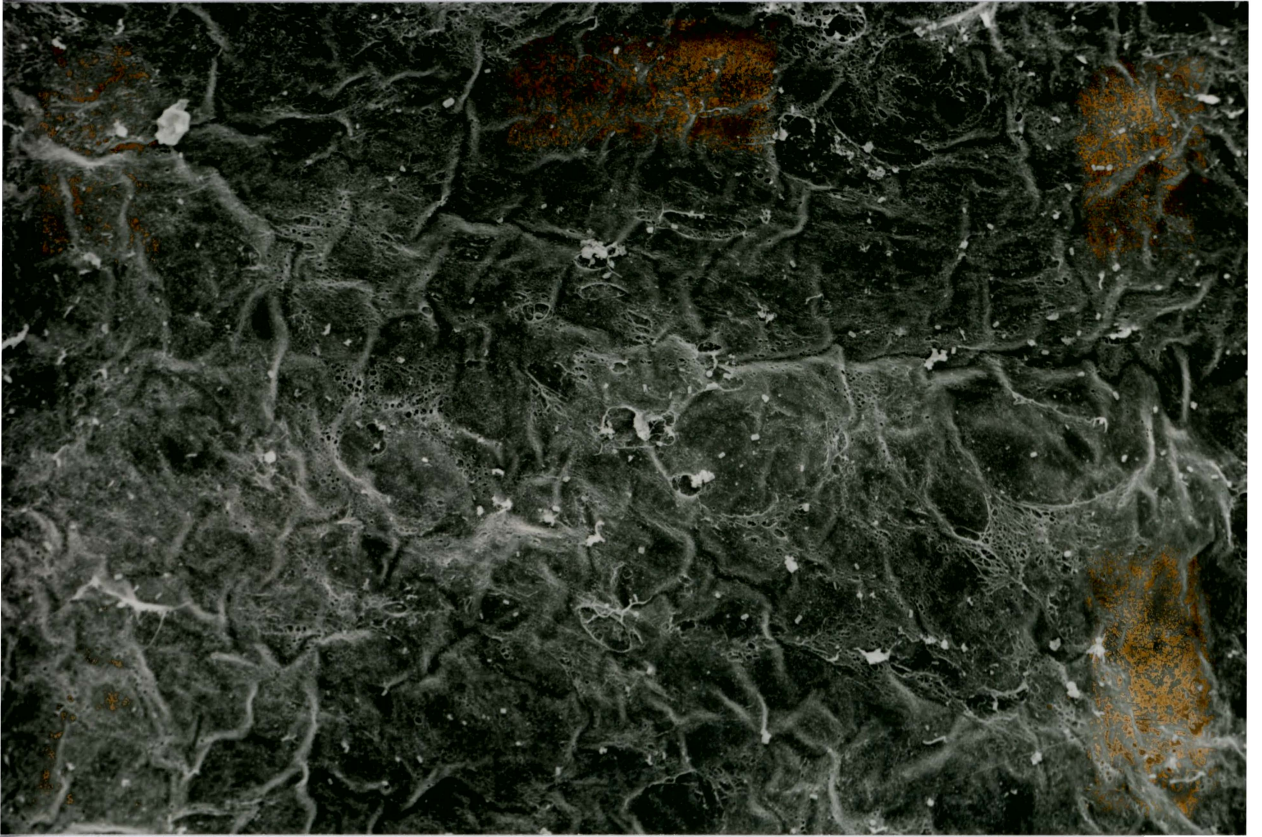
Fot. 26



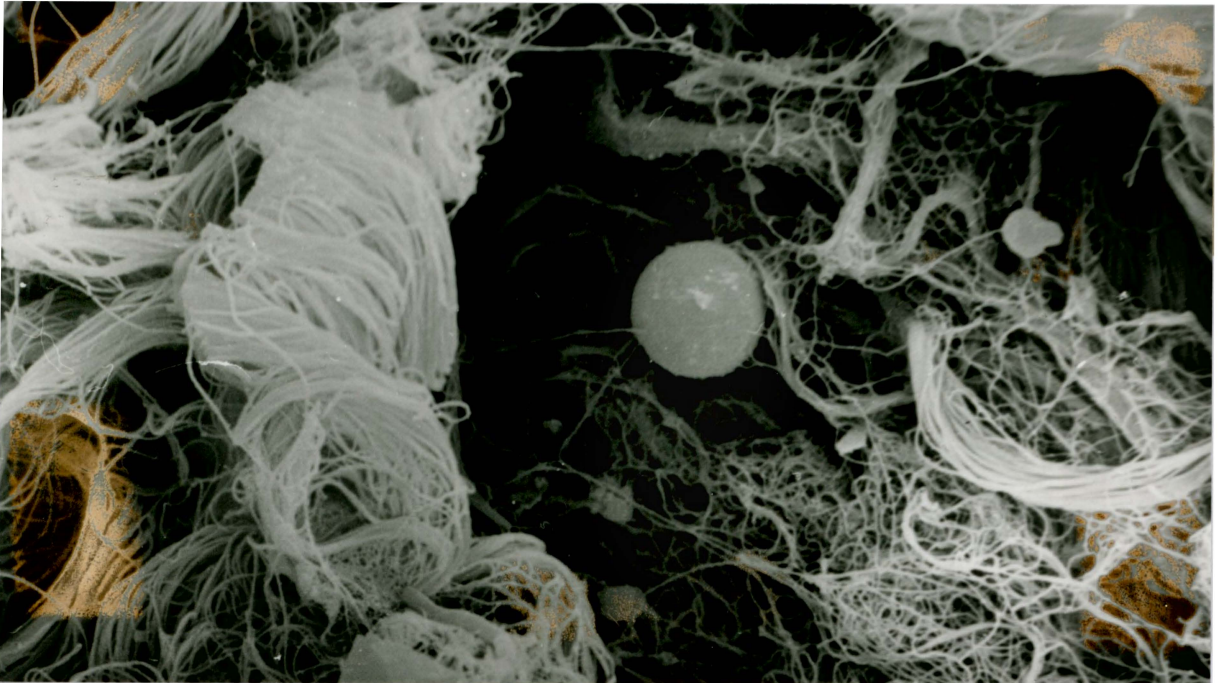
Fot. 27

Fot. 28 Powierzchnia płatka zastawki grupy porównawczej. Brak komórek śródbłonna i odsłonięte elementy blaszki podstawnej. SEM (Pow. 300 x)

Fot. 29 Limfocyt w zřębie płatka zastawki grupy porównawczej. SEM (Pow. 2000 x)



Fot. 28

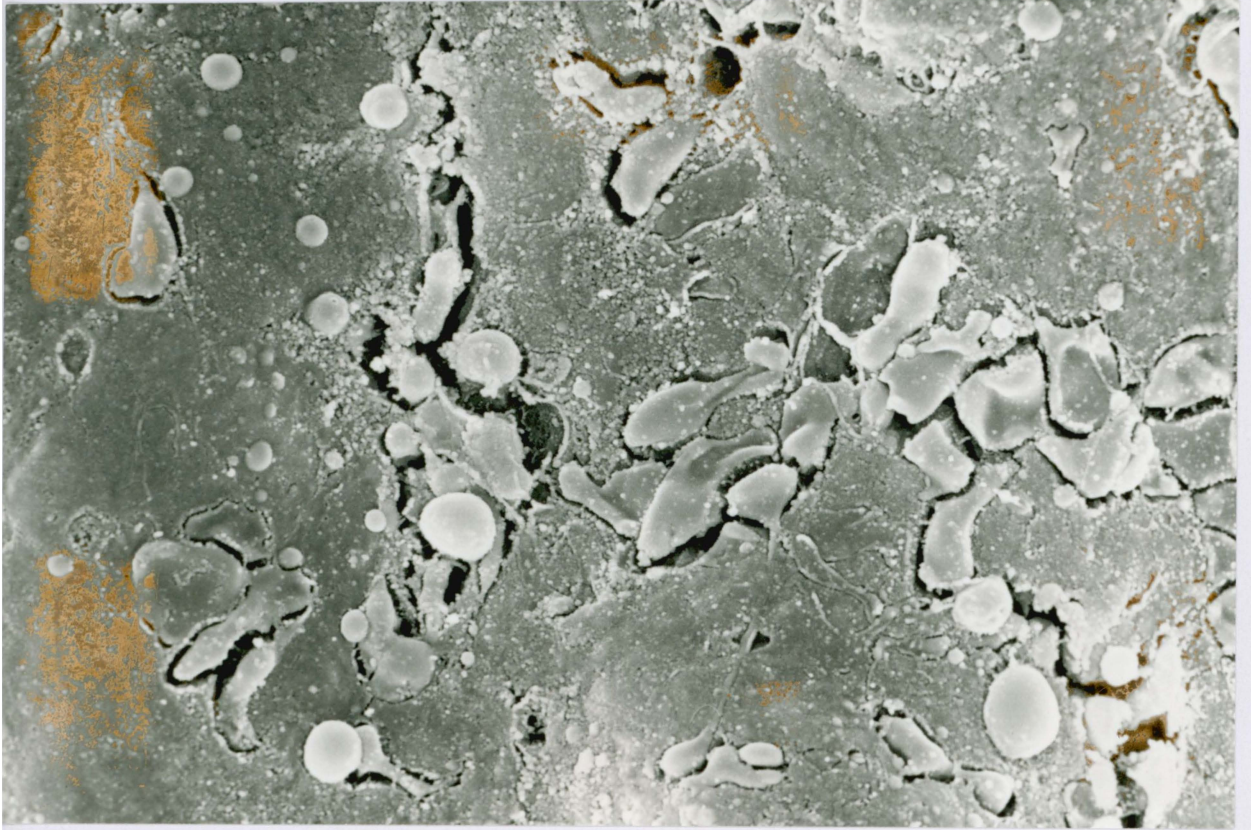


Fot. 29

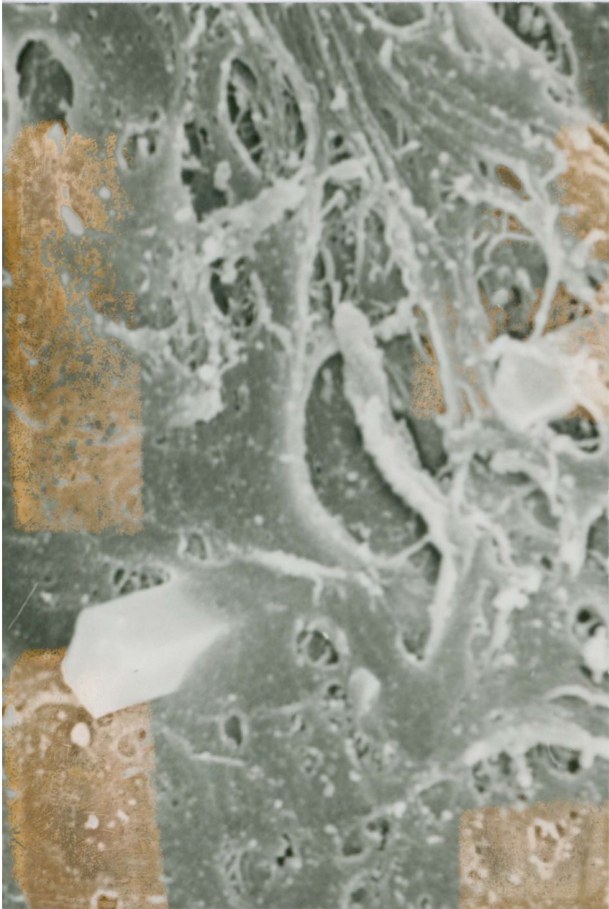
Fot. 30A Powierzchnia płatka homografu usuniętego po 13 latach. Widoczne szczeliny wypełnione odkształconymi komórkami krwi. SEM (Pow. 1500 x)

Fot. 30B Pojedyncze kryształy związane z powierzchnią płatka i miejscami odsłonięte włókna zrębu. SEM (Pow. 2200 x)

Fot. 30C Silnie zmineralizowana struktura związana z powierzchnią płatka. SEM (Pow. 500 x)

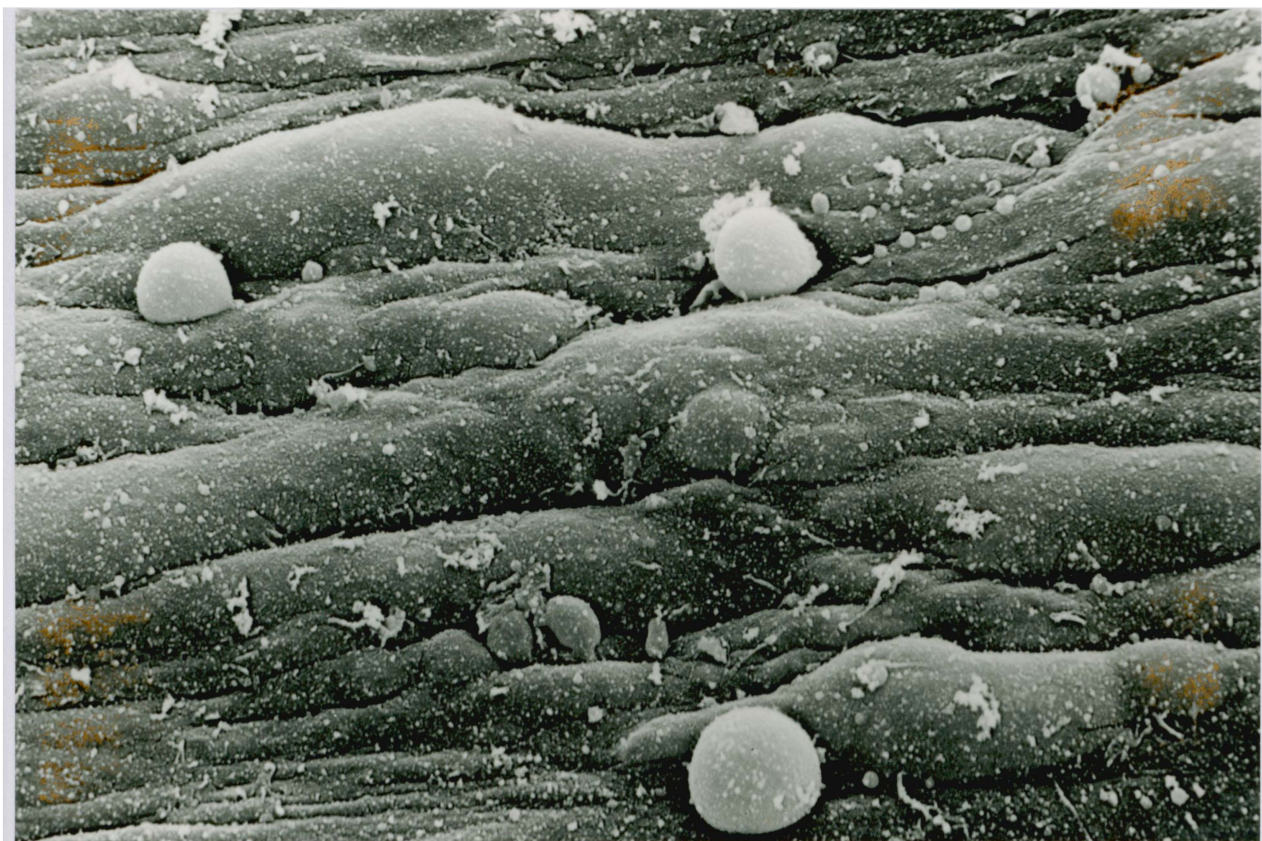


Fot. 30A



Fot. 31 Fragment powierzchni homografu usuniętego po 9 latach z widoczną pokrywą śródbłonkową i adhezją limfocytów. SEM (Pow. 2200 x)

Fot. 32 Przekrój przez warstwę włóknistą (*fibrosa*) homografu usuniętego po 14 latach. Widoczne duże rozwarstwienia pomiędzy pęczkami włókien i obecność komórek naciekowych. SEM (Pow. 120 x)



Fot. 31



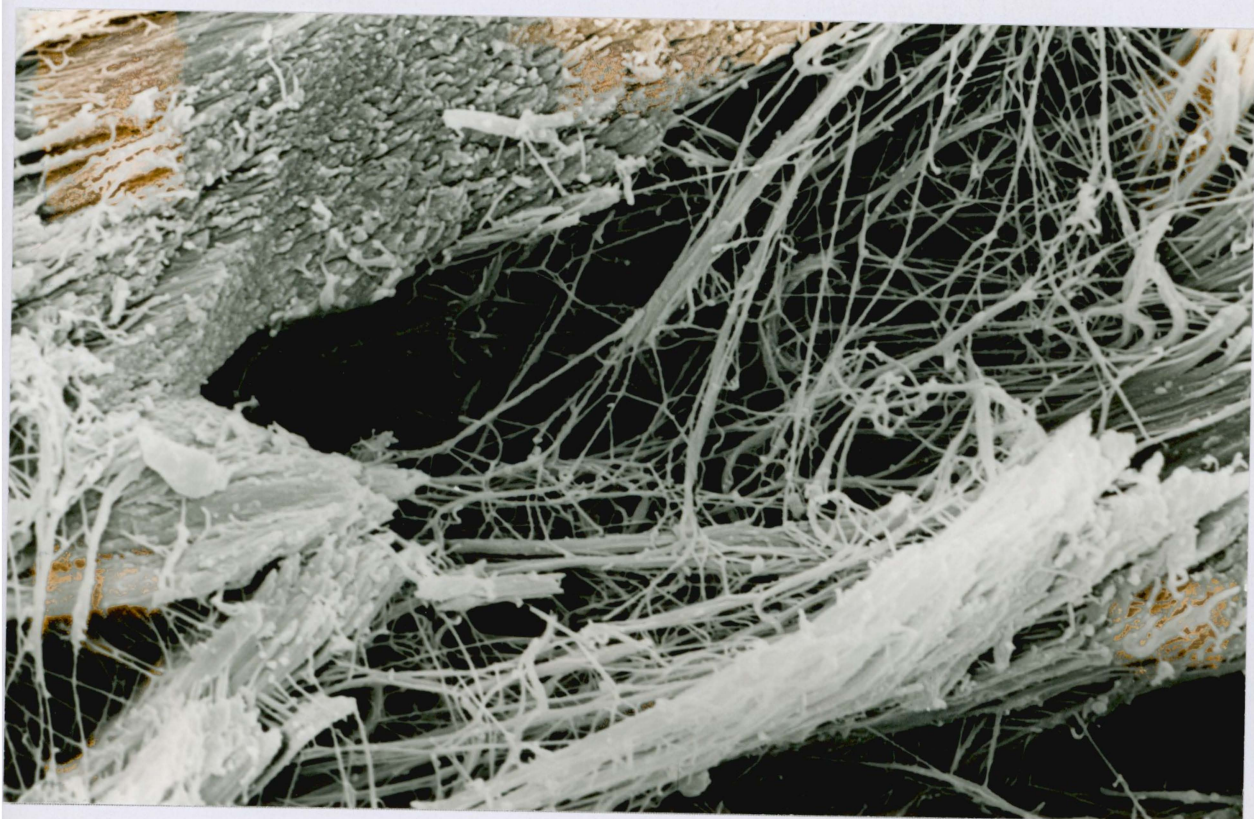
Fot. 32

Fot. 33A Przekrój przez warstwę włóknistą (*fibrosa*) homografu usuniętego po 14 latach. Widoczny równoległy układ pęczków włókien kolagenowych i miejscami dobrze zachowane poprzeczne włókna łączące. SEM (Pow. 2600 x)

Fot. 33B Przekrój homografu usuniętego po 14 latach. Widoczne dobrze zachowane włókna łączące *fibrosa* i *ventricularis*. SEM (Pow. 2600 x)



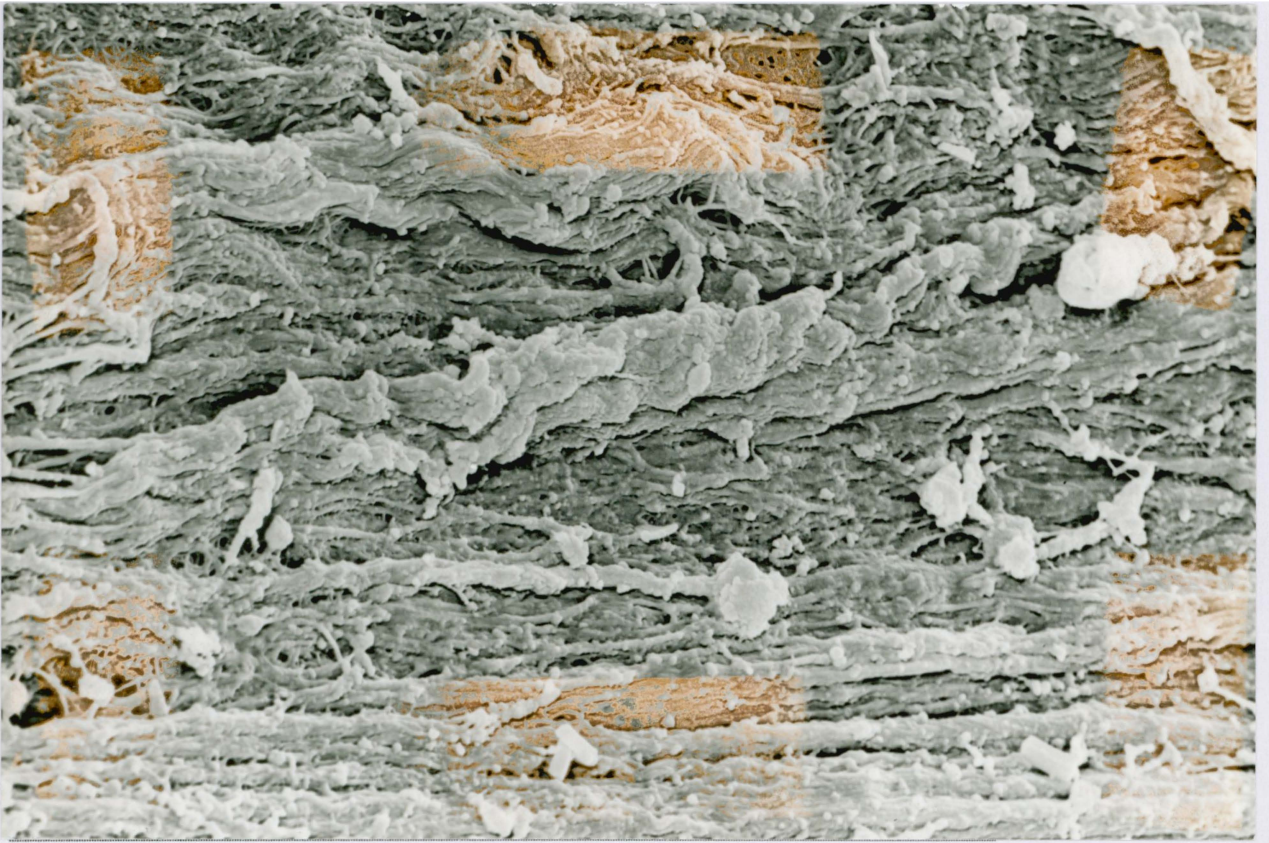
Fot. 33A



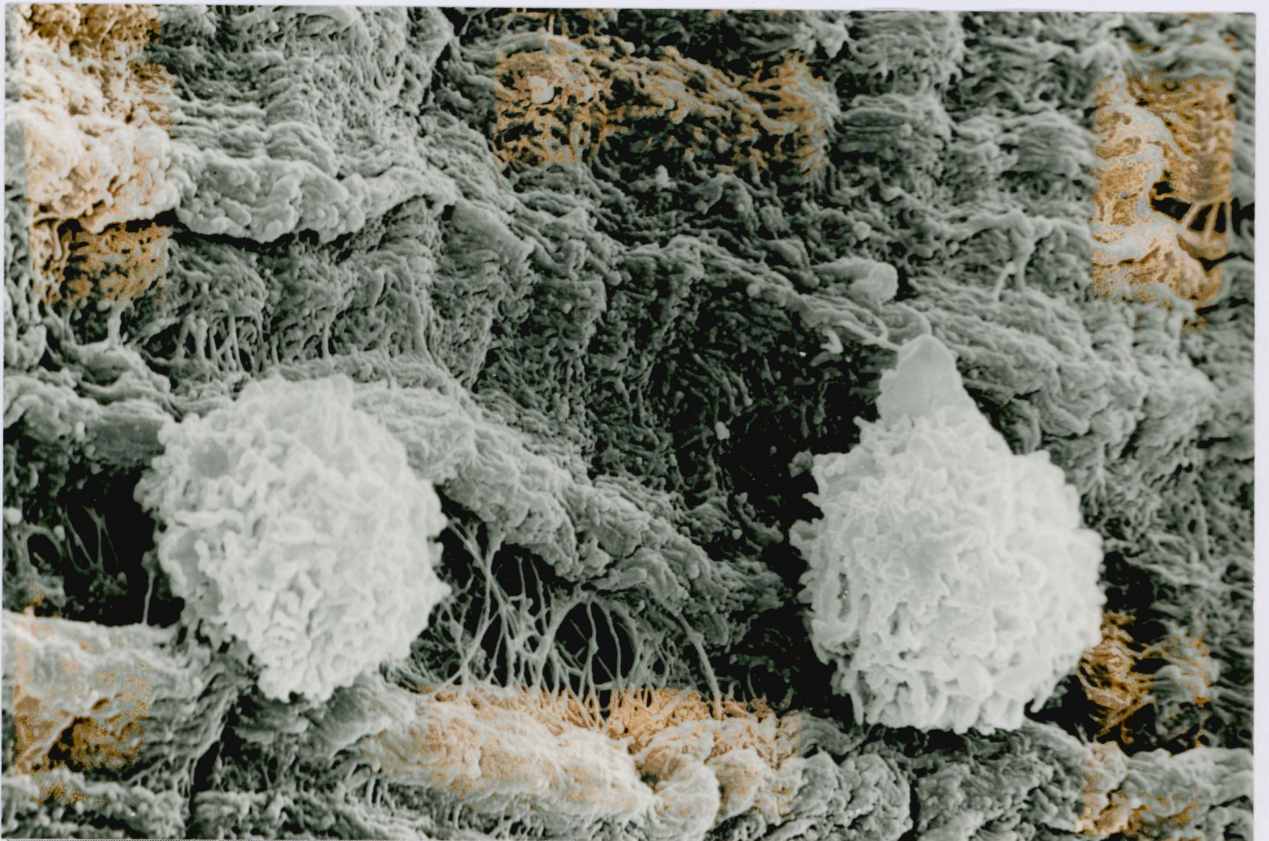
Fot. 33B

Fot. 34A Przekrój warstwy włóknistej homograftu po 14 latach funkcjonowania. Grube, zbite pęczki włókien kolagenowych miejscami o falistym przebiegu. Widoczne komórki naciekowe i pojedyncze kryształki. SEM (Pow. 2200 x)

Fot. 34B Makrofagi o aktywnej, bogatowypustkowej powierzchni w zrzebie płatka homograftu. SEM (Pow. 3200 x)



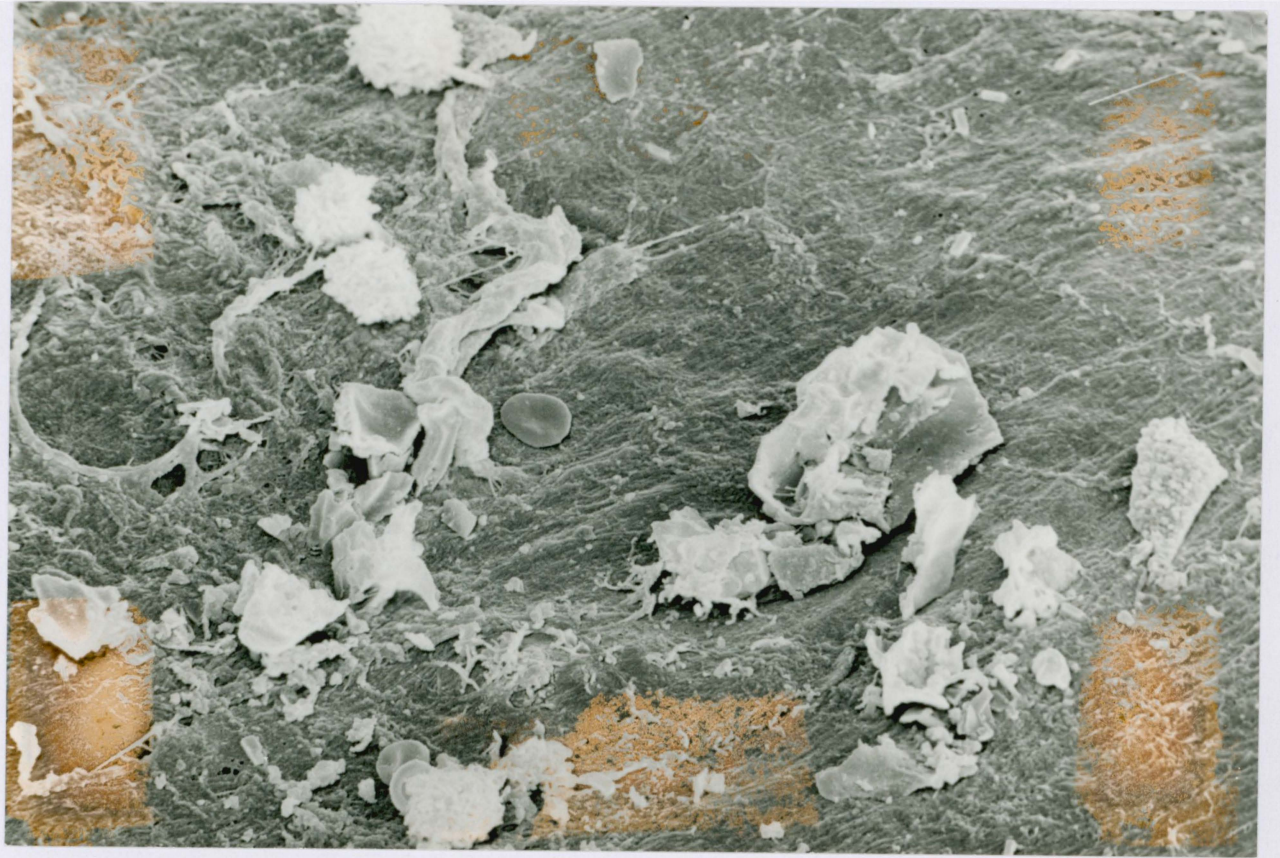
Fot. 34A



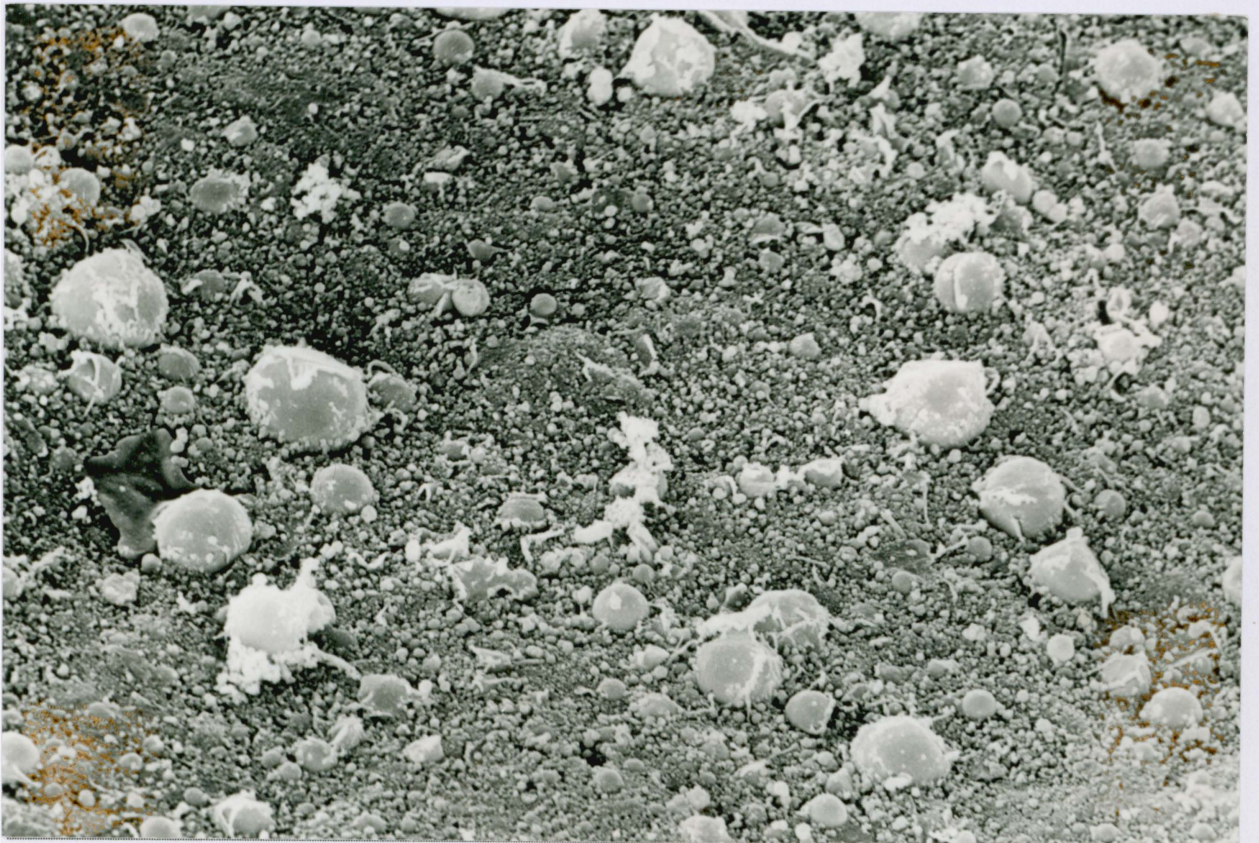
Fot. 34B

Fot. 34C Fragment powierzchni homograftu po 14 latach funkcjonowania z przylegającymi komórkami krwi (erytrocyty, białe ciała), nitkami włókniaka i fragmentami rozpadłych komórek. SEM (Pow. 720 x)

Fot. 35 Powierzchnia homograftu pokryta licznymi leukocytami, płytkami krwi, bakteriami i nitkami włókniaka . 15 lat po wszczepieniu. SEM (Pow. 2200 x)



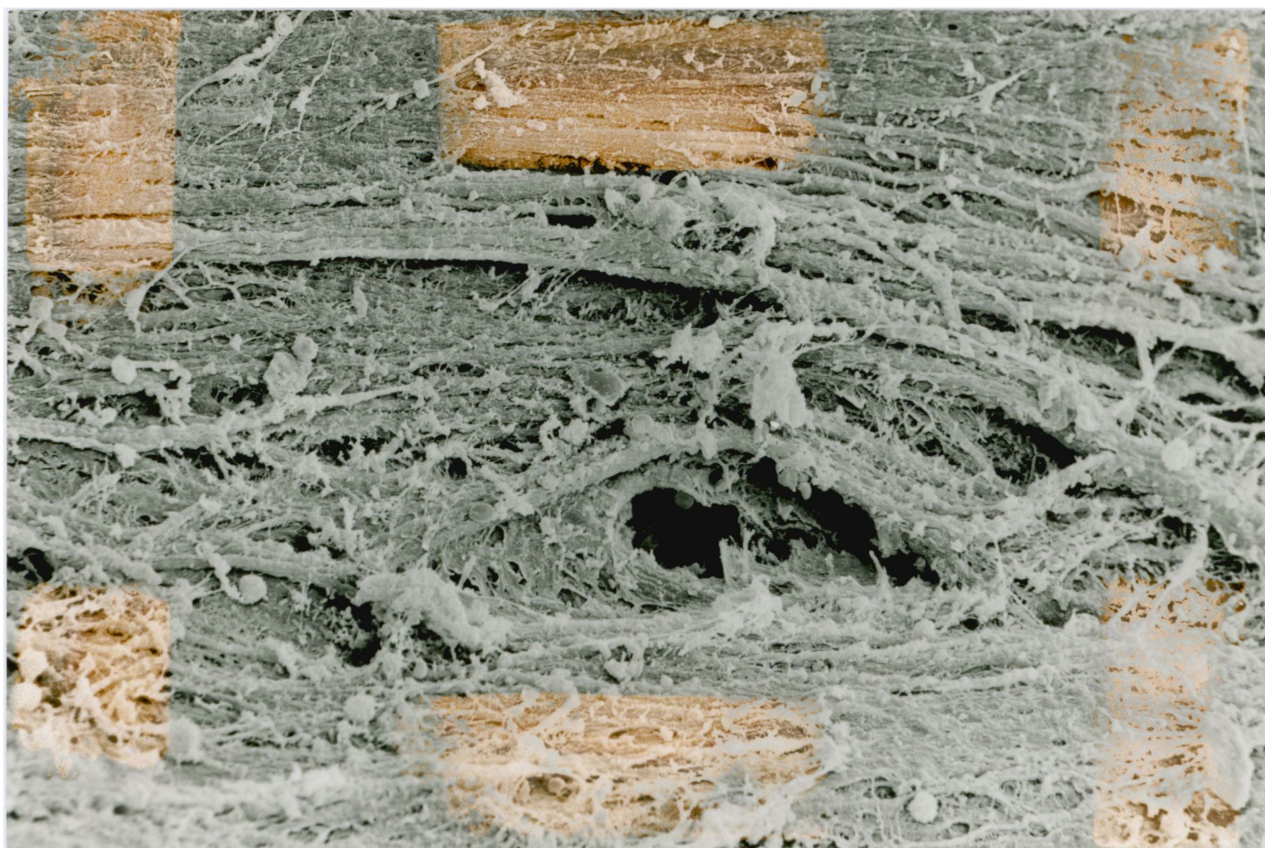
Fot. 34C



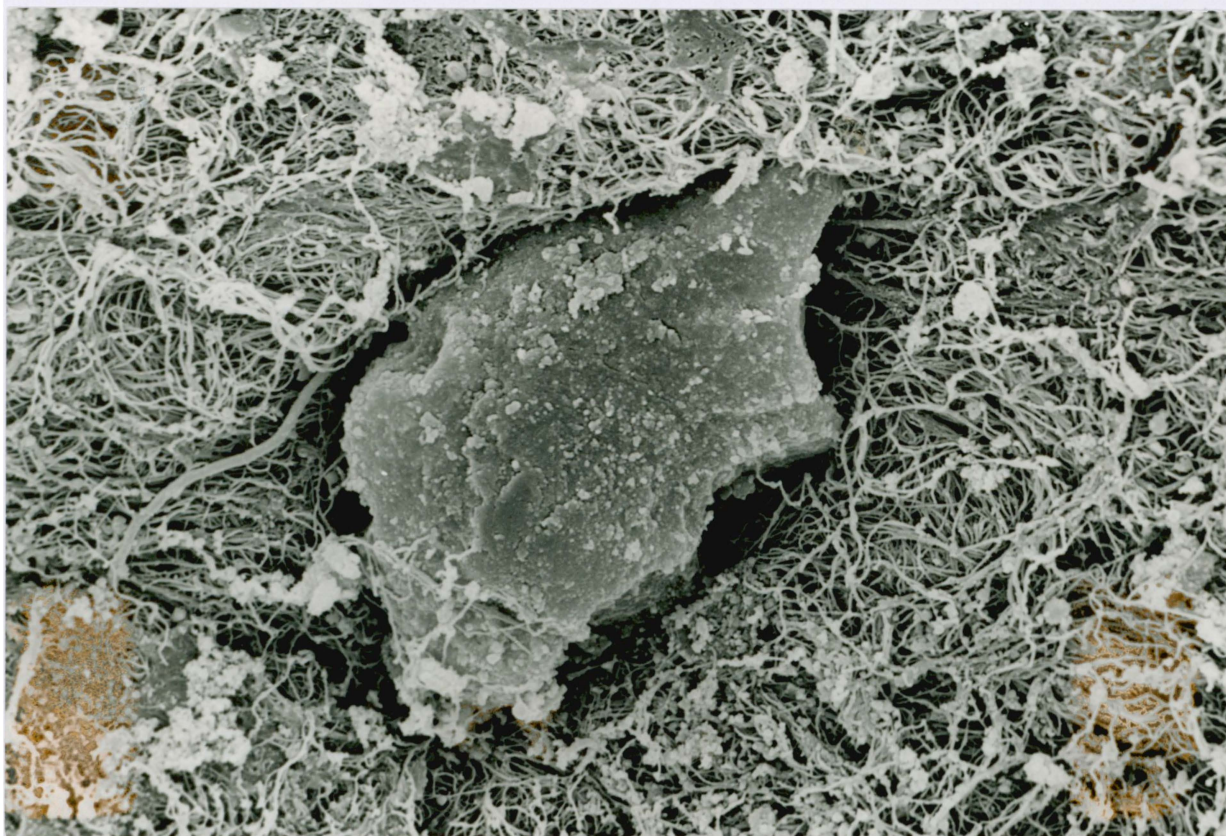
Fot. 35

Fot. 36 Przekrój homograftu z dużą ilością komórek naciekowych i erytrocytów pomiędzy włóknami. 14 lat po wszczepieniu. SEM (Pow. 260 x)

Fot. 37 Duży zwapniały depozyt wśród włókien o nieuporządkowanym przebiegu. Homograft po 14 latach funkcjonowania. SEM (Pow. 2200 x)



Fot. 36



Fot. 37

