

# Utjecaj različitih protokola mikrobiološke dekontaminacije na karakteristike alogenih presađaka srčanih zalistaka

---

Šafradin, Ivica

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:463721>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-03**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivica Šafradin**

**Utjecaj različitih protokola  
mikrobiološke dekontaminacije na  
karakteristike alogenih presadaka  
srčanih zalistaka**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2023.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivica Šafradin**

**Utjecaj različitih protokola  
mikrobiološke dekontaminacije na  
karakteristike alogenih presadaka  
srčanih zalistaka**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2023.

Disertacija je izrađena u suradnji Klinike za kardijalnu kirurgiju i Banke kardiovaskularnog tkiva, Hrvatske nacionalne banke tkiva i stanica Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Bojan Biočina

Zahvaljujem se mentoru, prof.dr.sc. Bojanu Biočini na podršci tijekom moga stručnog razvoja i izrade ovoga istraživanja.

Zahvaljujem se dr.sc. Mirni Golemović, dr.sc. Antoniji Jakovčević i doc.dr.sc. Mariju Šekeriji na stručnim savjetima i pomoći tijekom izrade disertacije.

Zahvaljujem se svim djelatnicima Klinike za kardijalnu kirurgiju, Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, Kliničkog zavoda za kliničku i molekularnu mikrobiologiju i Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb koji su doprinijeli provođenju ovoga istraživanja.

Posebno se zahvaljujem supruzi Dragani i sinu Nikoli te svojim roditeljima Anki i Nikici na podršci i odricanjima tijekom svih ovih godina. Njima posvećujem ovu disertaciju.

# Sadržaj

## Popis oznaka i kratica

|   |    |
|---|----|
| 1. Uvod i svrha rada .....  | 1  |
| 1.1. Srčani zalisci .....   | 1  |
| 1.1.1. Anatomija.....   | 1  |
| 1.1.2. Izvanstanični matriks srčanih zalistaka .....  | 3  |
| 1.1.3. Stanice srčanih zalistaka .....  | 4  |
| 1.2. Matriks metaloproteinaze .....   | 7  |
| 1.2.1. Matriks metaloproteinaza 2.....  | 9  |
| 1.3. Alogeni presaci srčanih zalistaka .....  | 10 |
| 1.3.1. Definicija .....   | 10 |
| 1.3.2. Primjena alogenih presadaka srčanih zalistaka u liječenju stečenih bolesti srčanih zalistaka .....   | 12 |
| 1.3.3. Primjena alogenih presadaka srčanih zalistaka u kardijalnoj kirurgiji prirođenih grešaka srca .....  | 17 |
| 1.4. Banka kardiovaskularnog tkiva.....   | 22 |
| 1.5. Mikrobiološka dekontaminacija .....  | 28 |
| 1.6. Svrha rada.....  | 30 |
| 2. Hipoteza .....   | 32 |
| 3. Ciljevi .....  | 33 |
| 4. Materijali i metode.....   | 34 |
| 4.1. Materijali.....  | 34 |
| 4.2. Obrada uzoraka .....   | 34 |
| 4.3. Kultura fibroblasta .....  | 37 |
| 4.4. Imunohistokemijska obrada uzoraka.....   | 38 |
| 4.4.1. Analiza imunohistokemijskih preparata.....   | 38 |
| 4.5. Mikrobiološki uzorci.....  | 39 |
| 4.6. Statistička obrada podataka .....  | 40 |
| 5. Rezultati.....   | 41 |
| 5.1. Uzorci.....  | 41 |
| 5.2. Analiza utjecaja ukupnog vremena ishemije na uspješnost rasta fibroblasta u kulturi stanica i imunohistokemijsku izraženost prokolagena tip I i MMP-2 u početnoj točki mjerenja..... | 45 |

|  |    |
|--|----|
| 5.3. Analiza uspješnosti rasta fibroblasta u kulturi stanica ..... | 47 |
| 5.4. Analiza imunohistokemijske izraženosti prokolagena tip I..... | 50 |
| 5.5. Analiza imunohistokemijske izraženosti MMP-2.....             | 54 |
| 5.6. Analiza mikrobioloških uzoraka .....                          | 58 |
| 6. Rasprava .....  | 59 |
| 7. Zaključak .....   | 65 |
| 8. Sažetak.....  | 66 |
| 9. Abstract .....  | 68 |
| 10. Literatura .....   | 70 |
| 11. Životopis .....  | 76 |

## Popis oznaka i kratica

|               |   |   |
|---------------|---|---|
| aVIC          | - | aktivirane valvularne intersticijske stanice, prema engl. <i>activated valvular interstitial cells</i>        |
| $\alpha$ -SMA | - | glatko-mišićni aktin alfa prema engl. <i>alfa smooth muscle actin</i>   |
| BMP-2         | - | koštani morfogenetski protein 2   |
| BKT           | - | banka kardiovaskularnog tkiva   |
| DC            | - | dendritičke stanice, prema engl. <i>dendritic cell</i>  |
| DMSO          | - | dimetil sulfoksid   |
| ECM           | - | izvanstanični matriks, prema engl. <i>extracellular matrix</i>  |
| EPC           | - | endotelne progenitorske stanice prema engl. <i>endothelial progenitor cell</i>                                |
| IL 1 $\beta$  | - | interleukin 1 $\beta$   |
| LDL           | - | lipoprotein niske gustoće, prema engl. <i>low density lipoprotein</i>   |
| MMP           | - | matriks metaloproteinaza  |
| NVE           | - | endokarditis nativnog zalistka, prema engl. <i>native valve endocarditis</i>                                  |
| obVIC         | - | osteoblastične valvularne intersticijske stanice, prema engl. <i>osteoblastic valvular interstitial cells</i> |
| PGE2          | - | prostaglandin E2  |
| PTFE          | - | politetrafluoretilen  |
| PVE           | - | endokarditis umjetnog zalistka, prema engl. <i>prosthetic valve endocarditis</i>                              |
| pVIC          | - | progenitorske valvularne intersticijske stanice, prema engl. <i>progenitor valvular interstitial cells</i>    |

- qVIC - mirne valvularne intersticijske stanice prema engl. *quiescent valvular interstitial cells*
- RHT - primatelj transplantata srca, prema engl. *recipient of heart transplant*
- TGF- $\beta$ 1 - transformirajući čimbenik rasta  $\beta$ 1
- TIMP - tkivni inhibitor matriks metaloproteinaza
- TNF  $\alpha$  - čimbenik nekroze tumora  $\alpha$
- VEC - valvularne endotelne stanice, prema engl. *valvular endothelial cells*
- VIC - valvularne intersticijske stanice, prema engl. *valvular interstitial cells*



# 1. Uvod i svrha rada

## 1.1. Srčani zalisci

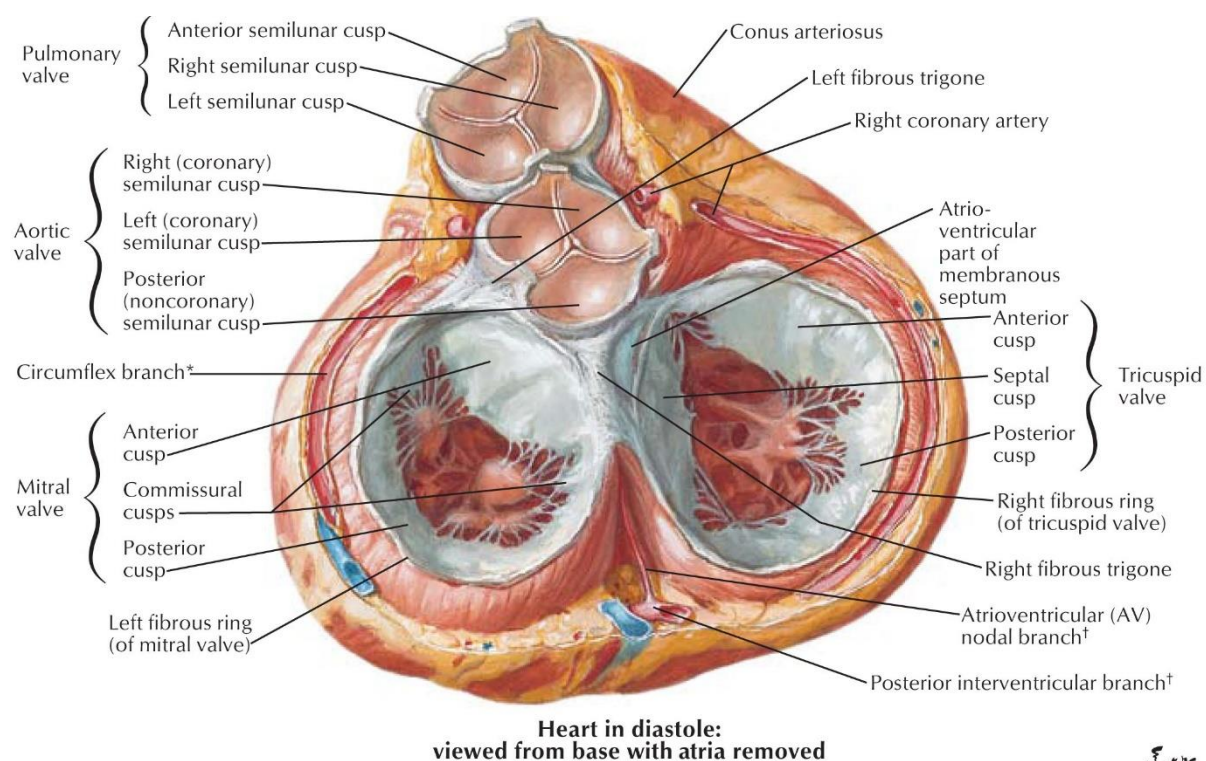
### 1.1.1. Anatomija

Srčani zalisci su anatomske strukture u srcu koje svojom funkcijom omogućavaju jednosmjerni protok krvi između srčanih šupljina ili između srca i velikih krvnih žila. Osim usmjeravanja protoka krvi, normalna funkcija zalistaka osigurava normalnu funkciju srčanog mišića pretkljetki i kljetki te osigurava adekvatan protok krvi u arterijama srca. Srčani zalisci se mogu podijeliti u dvije skupine, a to su atrioventrikularni i semilunarni zalisci.

Atrioventrikularni zalisci razdvajaju lijevu i desnu pretkljetku od pripadajućih kljetki. U tu skupinu spadaju mitralni i trikuspidni zalistak. Za funkciju atrioventrikularnih zalistaka osim kuspisa bitni su i funkcija pripadajućih pretkljetki i kljetki i subvalvularnog aparata. Subvalvularni aparat čine papilarni mišići i chordae tendineae. Papilarni mišići su izdanci srčanog mišića kljetki koji su preko tankih fibroznih tračaka koji se nazivaju *chordae tendineae* povezani s kuspisima zalistaka. Subvalvularni aparat sprječava prolaps atrioventrikularnih zalistaka tijekom srčanog ciklusa. Tijekom normalnog srčanog ciklusa ovi zalisci su otvoreni tijekom dijastole sve dok se pripadajuće kljetke ne ispune dovoljnom količinom krvi. Početkom kontrakcije srčanog mišića kljetki dolazi do daljnjeg porasta tlaka u kljetki što dovodi do zatvaranja atrioventrikularnih zalistaka.

Skupinu semilunarnih zalistaka čine aortalni i pulmonalni zalistak. Semilunarni zalisci razdvajaju aortu i glavnu plućnu arteriju od lijeve i desne kljetke. Na kruni srca pulmonalni zalistak je lokaliziran anterolateralno od aortalnog zalistka. Semilunarni zalisci obično imaju tri kuspisa. Kuspisi su u polumjesečastom obliku spojeni na fibrozni prsten koji se nalazi na spoju kljetki i velikih krvnih žila. Na mjestu gdje se spajaju kuspisi semilunarnih zalistaka nalaze se komisure. Kuspisi pulmonalnih zalistaka su obično tanji i nježnije strukture od kuspisa aortalnih zalistaka. Kuspisi semilunarnih zalistaka su sastavnice anatomske i funkcionalne cjeline korijena aorte i plućne arterije. Razlika tlakova između kljetki i velikih krvnih žila tijekom srčanog ciklusa uzrokuje otvaranje i zatvaranje semilunarnih zalistaka.

Na slici 1. prikazan je anatomski položaj srčanih zalistaka i njihov međusobni odnos.

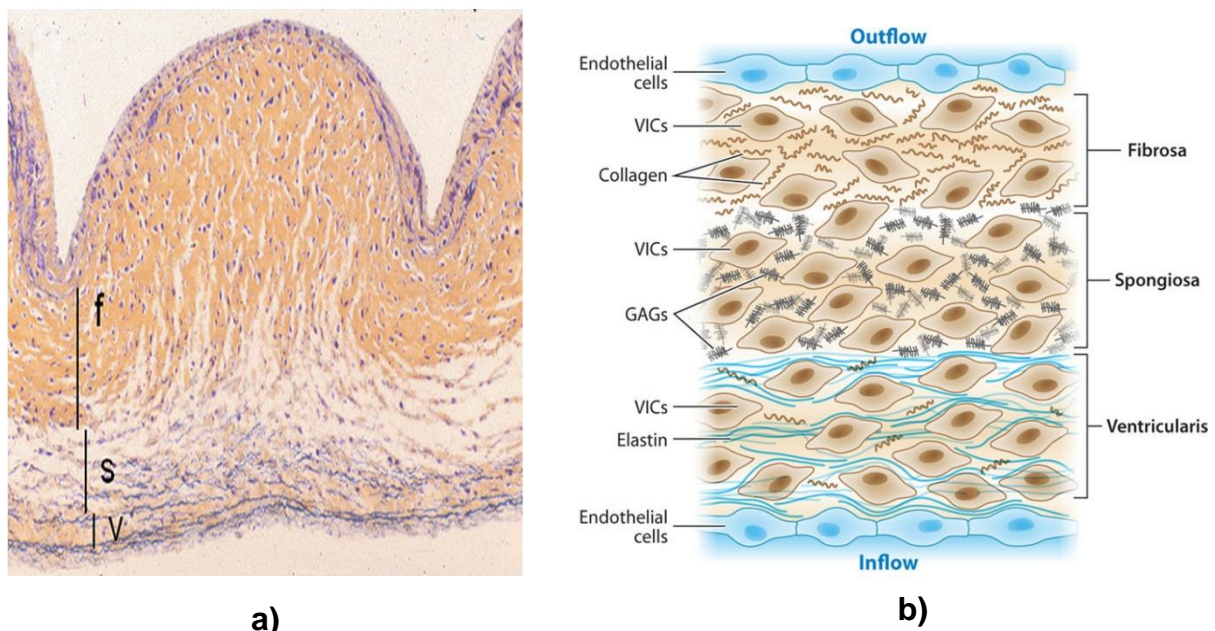


Slika 1. Srčani zalisci. Preuzeto iz reference Netter FH. Atlas of Human Anatomy. 5. izd. Philadelphia, Elsevier, 2010.

U prosječnom životnom vijeku srčani zalisci se otvore i zatvore oko tri milijarde puta. Tijekom toga perioda njihova kompleksna struktura im omogućava da podnesu široki spektar mehaničkih sila i različitih hemodinamskih uvjeta. Kako bi zalisci normalno funkcionirali neophodan je strukturalni integritet i koordinirana interakcija anatomskih struktura u samom zalistku i pripadajućih podržavajućih struktura (1).

### 1.1.2. Izvanstanični matriks srčanih zalistaka

Osnovne funkcionalne komponente strukture zalistka su izvanstanični matriks (engl. *extracellular matrix*, ECM) i stanice (2). Izvanstanični matriks je sredina bogata biokemijskim i i biofizičkim signalima koji mogu usmjeravati staničnu funkciju (3). Izvanstanični matriks srčanih zalistaka ima složenu trodimenzionalnu strukturu koja je organizirana u tri sloja: fibroza, spongioza i ventrikularni sloj (u slučaju atrioventrikularnih zalistaka naziva se još i atrijalnim slojem). Svaki od navedenih slojeva je obogaćen posebnom komponentom vezivnog tkiva koja mu daje i specifičnu funkciju. Fibroza je sloj koji je lokaliziran na ventrikularnoj strani atrioventrikularnih zalistaka, odnosno na arterijalnoj strani semilunarnih zalistaka. Građena je od gusto zbijenih vlakana kolagena. U ovome sloju vlakna kolagena su cirkumferentno orijentirana, a najzastupljeniji tipovi kolagena su tip I i III. Ovaj dio strukture daje zalistku čvrstoću. Ventrikularni, odnosno atrijalni sloj građen je predominantno od radialno orijentiranih elastičnih vlakana. Promjenom dužine elastičnih vlakana olakšavaju se pokreti zalistka tijekom srčanog ciklusa. Spongioza je središnji sloj i građena je predominantno od proteoglikana. Spongiozni sloj služi kao veza između dva prethodna sloja i osigurava tkivu zalistka kompresibilnost i integritet (4, 5).



Slika 2. Prikaz histološke strukture srčanih zalistaka: a) mikroskopska slika histološke strukture aortnog zalistka; b) shematski prikaz histološke strukture zalistka. Preuzeto iz reference Schoen FJ. Morphology, Clinicopathologic Correlations, and Mechanisms in Heart Valve Health and Disease. *Cardiovasc Eng Technol.* 2018;9(2):126–40.

Na slici 2. je prikazana histološka struktura srčanih zalistaka kao i shematski prikaz strukture u kojem je naznačena raspodjela vrsta vezivnog tkiva prema slojevima strukture zalistaka.

Kvaliteta, kvantiteta i arhitektura komponenti izvanstaničnog matriksa su čimbenici koji određuju funkcionalnu trajnost srčanih zalistaka. Zdravi srčani zalisci, preko kompleksnih interakcija stanica i izvanstaničnog matriksa, imaju mogućnost remodeliranja izvanstaničnog matriksa pomoću kojeg se mogu prilagoditi promijenjenim lokalnim uvjetima ili popraviti nastalu ozljedu (2, 6).

### **1.1.3. Stanice srčanih zalistaka**

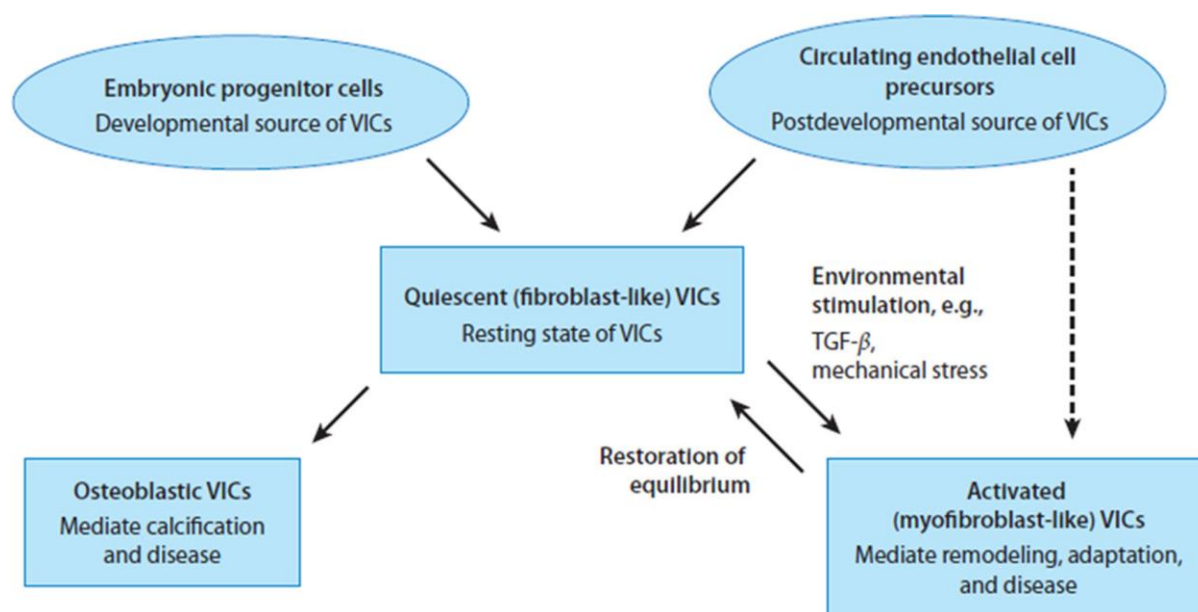
Stanične komponente strukture zalistka se mogu podijeliti u dvije skupine, a to su valvularne intersticijske stanice (VIC) i valvularne endotelne stanice (VEC). Obje stanične komponente su u konstantnoj interakciji s izvanstaničnim matriksom i na taj način sudjeluju u održavanju tkivne homeostaze srčanih zalistaka. U slučaju ozljede ili bolesti stanice se aktiviraju i nastoje popraviti ozlijeđeni zalistak. Također, u slučaju perzistentne ozljede, trajno aktivirane stanice srčanih zalistaka mogu sudjelovati u progresiji bolesti preko neadekvatnog remodeliranja okolnog izvanstaničnog matriksa (3).

Valvularne intersticijske stanice su najzastupljenija stanična komponenta. Ove stanice se mogu naći u sva tri sloja zalistka. Za njih se smatra da su odgovorne za održavanje strukturalnog integriteta zalistka. Obitelj valvularnih intersticijskih stanica se može podijeliti u pet različitih fenotipova, a to su:

1. embrioničke progenitorske endotelno/mezenhimalne stanice
2. mirne valvularne intersticijske stanice (*quiescent valvular interstitial cells*, qVIC)
3. aktivirane valvularne intersticijske stanice (*activated valvular interstitial cells*, aVIC)
4. progenitorske valvularne intersticijske stanice (*progenitor valvular interstitial cells*, pVIC)

5. osteoblastične valvularne intersticijske stanice (*osteoblastic valvular interstitial cells*, obVIC)

Na slici 3. je prikazan odnos različitih fenotipova stanica. Također, prikazani su međuodnosi različitih fenotipova stanica, kao i njihove uloge u remodeliranju i nastanku bolesti srčanih zalistaka.



Slika 3. Različnost fenotipova VIC stanica. Preuzeto iz reference Schoen FJ. Morphology, Clinicopathologic Correlations, and Mechanisms in Heart Valve Health and Disease. *Cardiovasc Eng Technol.* 2018;9(2):126–40.

Embrioničke progenitorske endotelno/mezenhimalne stanice su stanice koje prolaze proces endotelno-mezenhimalne tranzicije, postupak kojim se započinje formiranje srčanog zalistka. Smatra se da su ove stanice preteča qVIC i aVIC. qVIC su odgovorne za održavanje normalne fiziološke strukture i funkcije srčanih zalistaka. U slučaju štetnog utjecaja qVIC postaju aVIC koje svojom aktivnošću popravljaju i remodeliraju strukturu srčanog zalistka. Aktivacija VIC je povezana s povećanom sintezom i degradacijom izvanstaničnog matriksa, pojačanom ekspresijom matriks metaloproteinaza (MMP) i tkivnih inhibitora MMP-a (TIMPs), kao i s povećanom proliferacijom i migracijom stanica. aVIC izražavaju značajnu količinu glatko-mišićnog aktina alfa (*alfa smooth muscle actin*,  $\alpha$ -SMA) koji se smatra biljekom aktivacije VIC. Nakon završetka remodeliranja mnoge aVIC su eliminirane procesom apoptoze. Poremećaj u procesu apoptoze aVIC u kombinaciji s abnormalnim remodeliranjem

izvanstaničnog matriksa može rezultirati patološkom fibrozom, angiogenezom, kroničnom upalom i stvaranjem kalcifikacija, što može dovesti do klinički značajne bolesti srčanog zalistka. Povećani broj VIC u srčanom zalistku kao posljedica ozljede nastaje kao posljedica pojačane proliferacije stanica i smanjene apoptoze, ali su također utvrđeni i drugi izvori VIC. pVIC čine skupinu stanica iz drugih izvora. pVIC mogu biti podrijetlom iz koštane srži, iz stanica koje su već prisutne u cirkulaciji ili u samom srčanom zalistku. Dvije takve skupine stanica su endotelne progenitorske stanice (*endothelial progenitor cell*, EPC) i dendritičke stanice (*dendritic cell*, DC). Biljezi EPC stanica su CD 133 i CD 34. Ove stanice imaju visoki proliferativni kapacitet i sposobnost angiogeneze. Biljeg za DC je S100, unutarstanični protein koji veže kalcij. EPC i DC su izolirane iz degeneriranih nativnih zalistaka, ali i degeneriranih umjetnih bioloških proteza. Točni mehanizmi regrutiranja i aktivacije pVIC nisu u potpunosti razjašnjeni. U uvjetima koji podržavaju nastanak kalcifikacija qVIC mogu postati osteoblastične VIC. Mogući izvori ove vrste stanica su i valvularne endotelne stanice i pVIC. Povećana količina transformirajućeg faktora rasta  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) i koštanog morfogenetskog proteina 2 (BMP-2) u srčanom zalistku doprinosi osteoblastičnoj diferencijaciji stanica srčanog zalistka. obVIC aktivno sudjeluju u procesu nastanka kalcifikacija, hondrogeneze i osteogeneze u srčanom zalistku (7).

Površina srčanih zalistaka, kao i sve površine koje su u kontaktu s krvlju, obložena je endotelnim stanicama. Osim uloge u embriogenezi srčanih zalistaka, valvularne endotelne stanice (VEC) sudjeluju u regulaciji zgrušavanja krvi i omogućavanju nesmetanoga protoka krvi preko zalistka. Kao i druge endotelne stanice, VEC imaju sposobnost apsorpcije tvari iz krvne struje. Također, VEC imaju značajan utjecaj na funkciju VIC i na sastav izvanstaničnog matriksa, kao odgovor na promjene biomehaničkih uvjeta okoline. Ozljeda VEC je često inicijalni događaj u nastanku stečene bolesti srčanog zalistka (8).

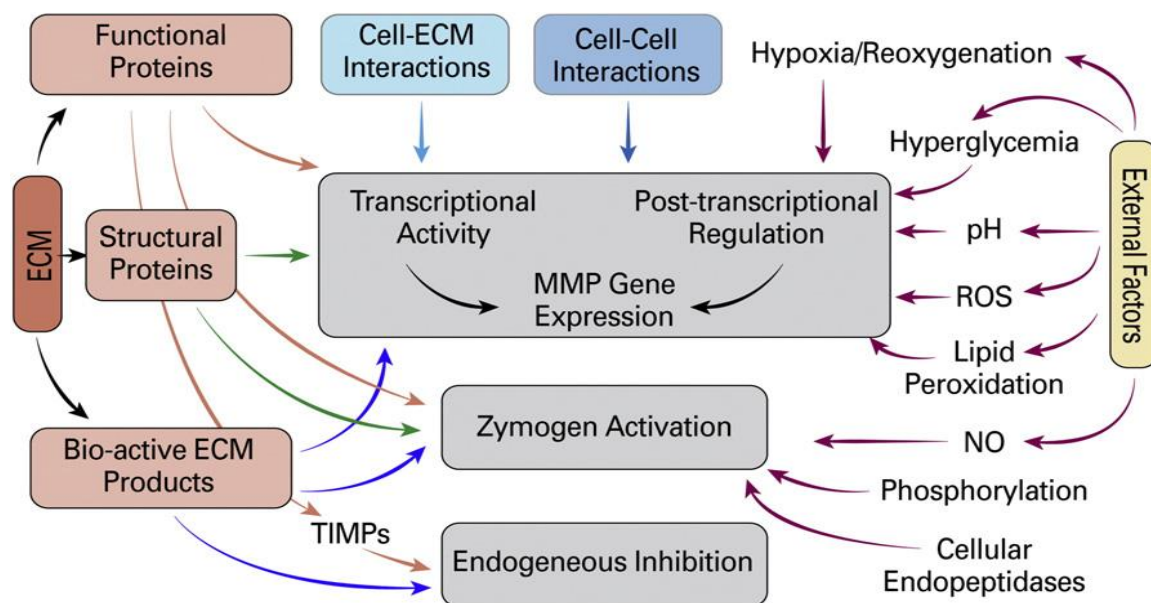
## 1.2. Matriks metaloproteinaze

Izvanstanični matriks srčanog zalistka sadrži niz manjih komponenti koje su značajne u postupku nastanka srčanog zalistka, njegovoj funkciji, a također i u nastanku bolesti. U tu skupinu spadaju i matriks metaloproteinaze (MMP) i njihovi tkivni inhibitori (TIMP). MMP su skupina  $Zn^{2+}$  ovisnih endopeptidaza koje imaju sposobnost degradacije komponenti izvanstaničnog matriksa. Kod ljudi je izolirano ukupno 23 MMP koje, prema supstratu na kojega djeluju i prema funkciji, mogu biti podijeljene u šest skupina, a to su:

1. kolagenaze (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18)
2. želatinaze (MMP-2, MMP-9)
3. stromelizini (MMP-3, MMP-10, MMP-11)
4. matrilizini (MMP-7, MMP 26)
5. membranski tip MMP - MT MMP(MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25)
6. ostali (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-22, MMP-23, MMP-28)

Aktivnost MMP je precizno regulirana na više razina. Može biti regulirana na razini transkripcije, aktivacije zimogena, interakcije s komponentama ECM-a, ali i na razini TIMP. Ekspresija većine MMP je regulirana na razini transkripcije. Za više čimbenika je dokazano da mogu utjecati na transkripciju, a u tu skupinu spadaju, citokini, kemokini i faktori rasta kao što su transformirajući faktor rasta  $\beta$  (TGF  $\beta$ ), čimbenik nekroze tumora  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), interleukin  $1\beta$  (IL  $1\beta$ ) i prostaglandin E2 (PGE2). Moguć je i utjecaj razine lipoproteina niske gustoće (LDL), hiperglikemije, slobodnih radikala kisika (tijekom ishemije/reperfuzije), razine pH i temperature. Sljedeća razina regulacije aktivnosti MMP je razina aktivacije zimogena. Aktivacija može biti unutarstanična, zatim može biti na razini membrane stanice i u izvanstaničnom prostoru. Unutarstanična aktivacija može biti preko procesa fosforilacije (MMP-2) ili pomoću endoproteaza. Na površini stanice aktivacija je najčešće posredovana pomoću membranskog tipa MMP. U izvanstaničnom prostoru više je čimbenika koji mogu uzrokovati aktivaciju, kao što plazmin, trombin, tripsin i ostali MMP. Nasuprot

aktivaciji su čimbenici koji mogu inhibirati aktivnost MMP. Najznačajniji su tkivni inhibitori MMP (TIMP). Kod ljudi su izolirana četiri tipa TIMP, koji se označavaju kao TIMP -1, -2, -3, -4. Od ostalih čimbenika koji inhibiraju MMP spominju se  $\alpha$ 2-makroglobulin, beta amiloid prekursori protein i RECK protein (9). Na slici 4. je prikazan složeni mehanizam regulacije aktivnosti MMP na različitim razinama.



Slika 4. Shematski prikaz regulacije akitvnosti MMP višestrukim čimbenicima. Preuzeto iz reference: Gaffney J, Solomonov I, Zehorai E, Sagi I. Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo. *Matrix Biol.* 2015;44–46(Ldl):191–9.

MMP imaju značajnu ulogu u mnogim fiziološkim procesima poput embriogeneze, tkivnog remodeliranja, cijeljenja rana i angiogeneze. Njihova poremećena aktivnost prisutna je u nizu patoloških stanja kao što su maligne bolesti, upalna stanja, degenerativne bolesti srčanih zalistaka, ulceracije aterosklerotskih plakova i aneurizmatiska proširenja krvnih žila (10).



### **1.2.1. Matriks metaloproteinaza 2**

Matriks metaloproteinaza 2 (MMP-2) i matriks metaloproteinaza 9 (MMP-9) čine skupinu želatinaza. MMP-2 se naziva se još i želatinaza A. Gen za MMP-2 je lociran na 16 kromosomu (16q13-q21). MMP-2 razgrađuje tipove kolagena I, IV, V, VII, X, XI i XIV. Kolagenolitička aktivnost MMP-2 je slabija nego drugih kolagenaza. Osim kolagena, razgrađuje i druge nekolagenske sastojke izvanstaničnog matriksa. MMP-2 je prisutna u mnogim tkivima i stanicama i uključena u niz fizioloških i patoloških procesa. Uključena je u procese angiogeneze, cijeljenja tkiva i upalnih stanja.

MMP-2 i regulatori njene funkcije TIMP-1 i TIMP-2 imaju značajnu ulogu u slučaju lokalne i udaljene progresije tumora. Uloga MMP-2 je proučavana i dokazana u nizu malignih oboljenja poput karcinoma jednjaka, karcinoma dojke, karcinoma pluća i tumora središnjeg živčanog sustava (10). Povišene vrijednosti MMP-2 su uočene kod bolesnika s akutnim infarktom miokarda i srčanim zatajenjem (11, 12). Postoje istraživanja u kojima je dokazan negativni prognostički značaj povišene cirkulirajuće razine MMP-2 u bolesnika s akutnim infarktom miokarda (13). U ovoj skupini bolesnika inhibicija aktivnosti MMP je istraživana kao potencijalni terapijski modalitet (14). Povećana ekspresija MMP-2 je također dokazana u tkivu aorti bolesnika s aneurizmatiskim proširenjima. Ekspresija je osobito bila izražena u bolesnika s aneurizmom aorte i bikuspidnim aortnim zalistkom (15). Također, postoje dokazi o sudjelovanju MMP-2 u patogenezi bolesti srčanih zalistaka poput Barlowljeve bolesti i degenerativnih bolesti aortnog zalistka (16-18).

Određeni stupanj aktivnosti MMP-2 je zapažen i u alogenim presacima srčanih zalistaka neposredno nakon krioprezervacije i odmrzavanja. Aktivacija MMP-2 može dovesti do pojačane degradacije izvanstaničnog matriksa i imati negativan utjecaj na funkcionalnu dugotrajnost presadaka (19).

## **1.3. Alogeni presaci srčanih zalistaka**

### **1.3.1. Definicija**

Alogeni presaci srčanih zalistaka su zalisci ljudskog podrijetla koji se koriste u liječenju prirođenih i stečenih bolesti srca. Razlozi zbog kojih se alogeni presaci srčanih zalistaka koriste u liječenju bolesti srca su dobra hemodinamska svojstva, činjenica da nakon njihove primjene nije potrebna antikoagulantna terapija te pojačana otpornost na infekciju. Sklonost strukturalnom propadanju, ograničena dostupnost i napredak u izradi umjetnih proteza doveli su do značajne evolucije u izboru indikacija za njihovu primjenu. Unatoč tim nedostacima alogeni presaci srčanih zalistaka predstavljaju neprocjenjivu opciju za liječenje specifičnih skupina kardiokirurških bolesnika.

U liječenju bolesti srca prvi put ih je primijenio Gordon Murray 1956. godine. On je, nakon uspješnih pokusa na životinjama, uspješno postavio alogeni presadak aortalnog zalistka u heterotopnu poziciju u silaznu torakalnu aortu sa svrhom liječenja teške aortalne insuficijencije (20). Donald Ross je 1962. godine izvijestio o prvoj uspješnoj ortotopnoj implantaciji alogenog presatka aortalnog zalistka (21). Gotovo istovremeno i potpuno neovisno uspješnu ortotopnu implantaciju je izveo i Brian Barrat-Boyes (22). Sljedeći povijesni trenutak koji je je važno istaknuti je 1967. godina kada je Donald Ross objavio studiju s 14 bolesnika kojima je uspješno izveo zahvat u kojem je bolesni aortalni zalistak zamijenio s autograftom plućnog zalistka, a na njegovo mjesto postavio alogeni presadak plućnog zalistka (23). Taj zahvat se i danas naziva Rossovom operacijom.

Od početaka primjene do danas metode pripreme i pohranjivanja alogenih presadaka srčanih zalistaka značajno su se promijenile. U početku su bili ugrađivani ubrzo nakon prikupljanja. Ovaj način je ubrzo napušten i zamijenjen postupcima sterilizacije i čuvanja presadaka za kasniju upotrebu. Presaci su bili prikupljeni u čistim ili sterilnim uvjetima, nakon čega su bili provođeni postupci kemijske sterilizacije i brzog smrzavanja, a u nekim centrima je korištena i iradijacija (24). Nakon što je uočena visoka stopa oštećenja presadaka zbog korištenja ovih metoda obrade uvedena je antibiotska sterilizacija. Uvođenje krioprezervacije kao metode pohranjivanja tkiva značajno je doprinijelo njihovoj široj dostupnosti.

U Republici Hrvatskoj prvi laboratorij za pohranu alogenih presadaka srčanih zalistaka je osnovan 1999. godine u Kliničkoj bolnici „Dubrava” u Zagrebu. Presaci su bili antibiotski sterilizirani i pohranjivani u tkivnom mediju kroz 6 tjedana.

Kako bi se zadovoljile potrebe za alogenim presacima srčanih zalistaka, 2011. godine u Kliničkom bolničkom centru Zagreb u Zagrebu osnovana je banka kardiovaskularnog tkiva, koja je danas dio Hrvatske nacionalne banke tkiva i stanica. Od 2012. godine krioprezervirani alogeni presaci srčanih zalistaka iz ove banke se uspješno primjenjuju u liječenju prirođenih i stečenih bolesti srca (25).

### **1.3.2. Primjena alogenih presadaka srčanih zalistaka u liječenju stečenih bolesti srčanih zalistaka**

Zamjena bolesnog zalistka protezom smatra se zlatnim standardom u liječenju stečenih bolesti srčanih zalistaka. Proteze koje se koriste za zamjenu se mogu podijeliti u dvije skupine: mehaničke i biološke zalistke. Izbor vrste proteze ovisi o procjeni rizika od krvarenja i tromboembolijskih komplikacija u mehaničkih zalistaka s jedne strane i o procjeni rizika od strukturalnog propadanja biološkog zalistka s druge strane. Prilikom odabira vrste proteze potrebno je uzeti u obzir životni stil i osobne preference informiranog bolesnika (26).

Postoji više vrsta bioloških zalistaka. Jedna vrsta bioloških zalistaka su i alogeni presaci srčanih zalistaka. Alogeni presaci srčanih zalistaka u liječenju stečenih bolesti srčanih zalistaka počinju se primjenjivati 1950-ih godina 20. stoljeća. U početku svoje primjene bili su jedina dostupna biološka proteza. Dobre hemodinamske karakteristike i činjenica da nakon njihove ugradnje nije bilo potrebe za primjenom antikoagulantne terapije, činila ih je gotovo idealnim izborom za zamjenu bolesnog zalistka. Međutim, tijekom vremena, dolaze do izražaja i njihovi nedostaci. Nedostaci primjene alogenih presadaka srčanih zalistaka su prvenstveno ograničena dostupnost, zatim zahtjevna kirurška tehnika ugradnje i rizik od strukturalnog propadanja. Razvoj novih, komercijalno dostupnih, bioloških proteza od materijala životinjskog podrijetla te njihovo unaprjeđenje, a u kombinaciji s ranije navedenim nedostacima, doveli su do značajne evolucije u odabiru indikacija za primjenu alogenih presadaka u bolesnika sa stečenim bolestima srčanih zalistaka.

Alogeni presaci srčanih zalistaka se mogu koristiti za liječenje stečenih bolesti aortalnog, mitralnog, pulmonalnog i trikuspidnog zalistka. Najveća iskustva su prikupljena u liječenju stečenih bolesti aortalnog zalistka. Fukushima i suradnici su u retrospektivnoj studiji prikazali rezultate primjene alogenog presatka aortalnog zalistka tijekom perioda od 35 godina u 840 bolesnika. Alogeni presaci su bili korišteni za liječenje prirođenih bolesti aortalnog zalistka, reumatskih promjena, degenerativnih bolesti aortalnog zalistka, a također i 101 bolesnika s endokarditisom nativnog ( $n = 67$ ) i umjetnog aortalnog zalistka ( $n = 34$ ). U 32 % slučajeva je došlo do strukturalnog propadanja aortalnog zalistka. Od strukturalno deterioriranih aortalnih alografta 89 % ih je eksplantirano. U većini slučajeva posljedica strukturalnog propadanja je bila

insuficijencija aortalnog zalistka. Najčešći uzrok eksplantacije su bile ruptura jednog ili više listića (71 %), a zatim slijede teške kalcifikacije (26 %) i malokaptacija (5 %). Ova studija je pokazala i povezanost određenih čimbenika s većom stopom strukturalne deterioracije. Strukturalna deterioracija je bila značajno povezana s dobi u trenutku operacije. Procijenjeno vrijeme od implantacije do strukturalnog propadanja je bilo najkraće u dobi bolesnika od 10 – 19 godina i iznosilo je 11 godina. Najduži vremenski period slobode od strukturalnog propadanja su imali bolesnici koji su u trenutku implantacije bili u dobnoj skupini od 60 – 81 godina, a iznosi 21 godinu. Utvrđena je i povezanost i tehnike implantacije sa stopom strukturalnog propadanja. Veća stopa deterioracija je zapažena u bolesnika kod kojih su korištene tehnike implantacije bile kirurška tehnika zamjena korijena aorte i tehnika inkluzijskog cilindra, u odnosu na subkoronarnu implantaciju. Također, utvrđeno je da čimbenici poput pretilosti ( $BMI > 35 \text{ kg/m}^2$ ), ranije transfuzije krvi u anamnezi i primjene alogenih presadaka od donora koji su stariji od 50 godina doprinose povećanoj stopi strukturalne deterioracije. Infekcija kod ugrađenog alogenog presatka je rijetka. Stopa rane reinfekcije (do 30 dana) je 0,2 %. Stopa kasne reinfekcije je 5,5 % (medijan 5 godina, raspon od 16 mjeseci do 16 godina). Sloboda od infekcije 10 godina nakon implantacije je 88 % za bolesnike kod kojih je alogeni presadak ugrađen radi endokarditisa, a 95 % kod onih kod kojih nije bilo endokarditisa (27). Witten i suradnici su predstavili svoje iskustvo s alogenim presacima srčanih zalistaka tijekom vremenskog razdoblja od 30 godina. Analiza je obuhvaćala ishode liječenja 2 042 bolesnika kod kojih je ugrađeno ukupno 2 110 alogenih presadaka. 47 % bolesnika je liječeno zbog infektivnog endokarditisa (68 % bolesnika je imalo endokarditis umjetnog zalistka). Prema ovoj studiji također je najčešća posljedica strukturalne deterioracije bila aortna insuficijencija. Broj bolesnika s teškom aortnom insuficijencijom se povećavao tijekom vremena. Iako nijedan bolesnik nije imao tešku aortnu insuficijenciju pri otpustu iz bolnice, nakon 5, 10 i 15 godina ona je bila prisutna u 14 %, 25 % i 35 % bolesnika. 405 alogenih presadaka je bilo eksplantirano radi strukturalnog propadanja. Procijenjena stopa strukturalnog propadanja je 2 %, 14 %, 34 % i 51 % na 5, 10, 15, i 20 godina nakon ugradnje. Također, utvrđeno je da u bolesnika koji su mlađi, koji imaju arterijsku hipertenziju, veću tjelesnu površinu i pridruženu bolest torakalne aorte postoji veća sklonost strukturalnom propadanju zalistka. Veća učestalost strukturalnog propadanja je uočena prilikom korištenja većih alogenih presadaka i onih kojih su dobiveni od starijih

donora. Nije dokazana povezanost infektivnoga endokarditisa s višom stopom propadanja presadaka (28).

Iako su danas indikacije za primjenu alogenih presadaka srčanih zalistaka značajno ograničene, ističe se njihov značaj u liječenju infektivnog endokarditisa srčanih zalistaka. Endokarditis je infekcija endotelne površine zalistka. Endokarditis predstavlja značajan zdravstveni problem, a unatoč napretku kirurške tehnike, antibiotskog i intenzivnog liječenja letalitet je i dalje visok i kreće se od 5-15 %. Oko 50 % bolesnika s infektivnim endokarditisom zahtijeva kirurško liječenje. Rana i adekvatna kirurška intervencija poboljšava ishode liječenja takvih bolesnika. Osnova kirurškog liječenja je agresivan *debridement* inficiranog tkiva, te drenaža svih apscesnih šupljina uz zamjenu bolesnog zalistka protezom (29). Izbor najbolje proteze za liječenje bolesnika s endokarditisom danas je predmet rasprave u kirurškim krugovima. Tijekom vremena razvijen je niz različitih proteza, mehaničkih i ksenografta, za koje postoje izvještaji o rezultatima koji su usporedivi s alogenim presacima srčanih zalistka. Iskustva velikih kardiokirurških centara ipak govore u prilog alogenih presadaka srčanih zalistaka, iako ne postoje randomizirana klinička ispitivanja koja govore u prilog njihove primjene. Ističe se njihov osobiti značaj u slučajevima u kojima postoji infekcija umjetnog zalistka sa značajnom destrukcijom okolnog tkiva uz prisutne značajne perivalvularne komplikacije. Alogeni presaci u tim slučajevima, osim njihovog intrinzičnog svojstva pojačane rezistencije na infekciju, omogućavaju svojim dijelovima izvođenje kompleksnih rekonstruktivnih zahvata. Musci i suradnici su u svojoj retrospektivnoj studiji prikazali iskustvo u primjeni alogenih presadaka srčanih zalistaka u liječenju endokarditisa nativnog (NVE) i umjetnog aortnog zalistka (PVE) s paravalvularnim apscesom tijekom razdoblja od 20 godina. Analiza je uključivala ishode liječenja 221 bolesnika (122 su bili bolesnici s endokarditisom umjetnog zalistka). Kirurška strategija je podrazumijevala ekstenzivni *debridement* tkiva zahvaćenog infektivnim procesom i rekonstrukciju nastalog defekta aortalnim alogenim presatkom tehnikom zamjene korijena aorte. Analizirali su preživljenje, stopu reinfekcije i strukturalnog propadanja primijenjenih alogenih presadaka. Preživljenje je bilo bolje u skupini bolesnika s NVE (30 dana, 1 godina, 5 godina, 10 godina; NVE 83,8±3,7, 76,6±4,3, 66,5±4,9, 47,3±5,6; PVE 74,6±3,9, 67,1±4,2, 48,1±4,9, 35,0±5,4). Reinfekcija je bila prisutna u 12 bolesnika (6 PVE bolesnika) i iznosila je 5,4 %. Strukturalno propadanje je bilo prisutno u 8,6 %

bolesnika. Stopa strukturalnog propadanja je bila analizirana u tri dobne skupine (< 40 godina, 40 - 60 godina, > 60 godina). Navedeni rezultati su pokazali dobre dugoročne rezultate, s nešto boljim preživljenjem u bolesnika s NVE i nisku stopu reinfekcije. Stopa strukturalnog propadanja je bila prisutna u obje skupine bolesnika i povećavala se s vremenom, a bila je veća u mlađih bolesnika (30). Sabik i suradnici su u retrospektivnoj studiji prikazali izvrsne rezultate u liječenju bolesnika s endokarditisom umjetnog aortnog zalistka. U studiji koja je analizirala ishode liječenja 103 bolesnika (78 % je imalo paravalvularni apsces) prikazali su 95 % slobode od rekurentnog endokarditisa nakon 5 i 10 godina. 3,8 % bolesnika je imalo ponovni endokarditis, s najvećom učestalosti u prvih 9 mjeseci nakon operacije (31). Solari i suradnici su također prikazali dobre dugoročne rezultate primjene alogenih presadaka u liječenju akutnog endokarditisa aortalnog zalistka tijekom razdoblja od 20 godina. Alogeni presaci aortalnog zalistka su korišteni za liječenje 112 bolesnika kod kojih je postojala perivalvularna ekstenzija infektivnog procesa. Endokarditis ranije ugrađene umjetne proteze je bio prisutan u 58,9 % bolesnika. Kombinirajući opsežan *debridement* inficiranog tkiva s primjenom alogenog presatka aortalnog zalistka postigli su rezultate koji su usporedivi s ranije navedenim studijama. Sloboda od potrebe za reoperacijom na 1, 5, 10 i 15 godina je bila 100, 96,9±2,1, 86,3± 5,5, 47,3±11,0 %. Najčešći uzrok potrebe za reoperacijom je bila strukturalna deterioracija zalistka (87,5 %). Nova epizoda endokarditisa je bila zapažena u 5,3 % bolesnika (n = 5, 4 bolesnika su bila reinfekcija i 1 je bio relaps). Ukupna sloboda od novih epizoda endokarditisa na 1, 10 i 20 godina je bila 97,8 ± 1,6, 96,3 ± 2,1, 85,2 ± 7,7 % (32).

Kao što je već ranije navedeno, niz je različitih izvještaja koji se suprotstavljaju kirurškoj dogmi prema kojoj se izbjegava primjena umjetnog materijala u inficiranom području i rezultati kojih su komparabilni s rezultatima primjene alogenih presadaka srčanih zalistaka. Kim i suradnici su u svojoj analizi obuhvatili 304 bolesnika s endokarditisom aortnog zalistka. U toj studiji uspoređivani su ishodi liječenja bolesnika s alograftom, mehaničkom protezom i ksenograftom. Prema toj studiji, izbor proteze nije statistički značajno utjecao na preživljenje i stopu reinfekcije (33). U skladu s ovim izvještajem je i analiza Jassar i suradnika koji su uspoređivali ishode liječenja infektivnog endokarditisa u 134 bolesnika tehnikom zamjene korijena aorte. Za zamjenu korijena aorte su bili korišteni mehanički konduit, ksenograft i alogeni

presadak. Prema ovoj studiji također, izbor proteze nije značajnije utjecao na letalitet, stopu reinfekcije i potrebe za reoperacijom (34).

Očito je da u literaturi danas postoji niz suprotstavljenih dokaza o koristi primjene alogenih presadaka aortalnih zalistaka u liječenju infektivnog endokarditisa. Postojanje dokaza o neinferiornosti konvencionalnih proteza u liječenju endokarditisa daje opciju kardijalnim kirurzima koji nemaju dostupne alogene presatke srčanih zalistaka da ne odgađaju neophodnu kirušku intervenciju. S druge strane, to će dovesti do značajnog ograničenja iskustva kardijalnih kirurga koji se bave problemima stečenih bolesti zalistaka u kirurškim tehnikama primjene alogenih presadaka. Bitno je napomenuti da većina dokaza koji u govore u prilog ili su protiv primjene alogenih presada srčanih zalistaka proizlaze iz retrospektivnih studija s malim brojem bolesnika. Za definitivni dokaz o koristi alogenih presadaka srčanih zalistaka neophodne su prospektivne randomizirane multicentrične studije sa značajno većim brojem bolesnika.

Alogeni presadak mitralnog zalistka danas se rijetko primjenjuje. Moguće ga je koristiti za liječenje bolesti mitralnog i trikuspidnog zalistka. Kao i sve druge biološke proteze, skloni su strukturalnom propadanju te je stopa slobode od strukturalnog propadanja na 5, 10 i 15 godina 90%, 76% i 65 % (35).



### **1.3.3.Primjena alogenih presadaka srčanih zalistaka u kardijalnoj kirurgiji prirođenih grešaka srca**

Prirođene srčane greške najčešća su skupina prirođenih grešaka i najčešći su uzrok novorođenačkog mortaliteta od prirođenih grešaka (36). Alogeni presaci srčanih zalistaka imaju dugu povijest u liječenju prirođenih grešaka srca (37). Unatoč razvoju niza drugih, komercijalno dostupnih alternativa, alogeni presaci srčanih zalistaka i danas su atraktivna opcija za kirurško liječenje bolesnika s prirođenim srčanim greškama.

Rekonstrukcija izlaznog trakta desne klijetke često je sastavni dio kirurškog liječenja bolesnika s prirođenim greškama srca, a izvodi se u situacijama kada ne postoji prikladan kontinuitet između desne klijetke i pulmonalne arterije. Jedna od opcija za rekonstrukciju su i alogeni presaci srčanih zalistaka. Alogeni presadak pulmonalnog zalistka se smatra referentnom točkom s kojom se uspoređuju sve druge proteze koje se mogu koristiti za rekonstrukciju izlaznog trakta desne klijetke (38). Iako imaju dobar hemodinamski profil te nisku trombogenost i nizak rizik od infekcije, alogeni presaci ipak ne rastu i sklone su strukturalnom propadanju pa je reoperacija i zamjena postojećeg provodnika očekivana u tih bolesnika. Najčešće se primjenjuju u bolesnika s tetralogijom Fallot, pulmonalnom atrezijom i zajedničkim arterijskim trunkusom. Primjena alogenih presadaka srčanih zalistaka u liječenju bolesnika kod kojih je potrebna rekonstrukcija izlaznog trakta desne klijetke može rezultirati dobrim rezultatima po pitanju dugoročnog preživljenja i učestalosti negativnih događaja vezanih uz zalistke. U skladu s ovom tvrdnjom je analiza koju su proveli Romeo i suradnici koji su prikazali dugoročne rezultate praćenja 603 bolesnika u kojih je ugrađen 701 alogeni presadak u periodu od 30 godina. Preživljenje na 10 i 20 godina je bilo 89 % i 84 %. Ukupna stopa slobode od potrebe za zamjenom zalistka na 10 i 20 godina je bila 76 % i 56 %, iako je različita u različitim dobnim skupinama. Tako je sloboda od potrebe za zamjenom zalistka na 20 godina najniža u bolesnika koji su mlađi od jedne godine i iznosi 16 %; u dobnoj skupini od 1-18 godina je  $48\pm 5$  %, a najviša je u dobnoj skupini iznad 18 godina i iznosi 76 %. Najčešći razlog za zamjenu zalistka je bila pulmonalna stenoza, koja je bila prisutna u 67,1 % slučajeva. Učestalost endokarditisa je bila 0,38 % na godišnjoj razini i nisu opisani slučajevi tromboze zalistka (39). Kalfa i suradnici analizirajući ishode liječenja 115 bolesnika s non-Ross

dijagnozom izvijestili su o preživljenju na 5 i 10 godina od 82 i 79 % te slobodi od potrebe za eksplantacijom alogenog presatka srčanog zalistka u 89 % odnosno 76 % bolesnika. Ukupna stopa slobode od potrebe za ponovnom intervencijom (perkutanom procedurom ili kirurškom intervencijom) na 5 i 10 godina je iznosila 80 % i 69 % (40).

Analizom ishoda studija utvrđen je niz čimbenika koji doprinose kraćoj trajnosti alogenih presadaka koji se koriste za rekonstrukciju izlaznog trakta desne klijetke. Čimbenici se mogu odnositi na alogeni presadak, samog bolesnika te interakciju samog presatka i bolesnika. U čimbenike koji doprinose lošijoj trajnosti spada dob pri implantaciji alografta. Trajnost je značajno smanjena u mlađih bolesnika, prvenstveno u dobi mlađoj od 1 godine. Muški spol se smatra čimbenikom rizika. Također, lokalni anatomske odnosi mogu utjecati na trajnost, odnosno non-Ross dijagnoza. Pri tome je trajnost kraća u bolesnika sa zajedničkim arterijskim trunkusom nego u bolesnika s drugim non-Ross dijagnozama. Od lokalnih anatomske čimbenika suženja plućnih arterija prepoznata su kao jedan od čimbenika rizika. Nerijetko su kirurzi u situaciji da moraju primijeniti alogene presatke malih veličina, odnosno presatke čija veličina nije podudarna s potrebnom procijenjenom veličinom. Veličina manja od 22 mm, odnosno potreba za ugradnjom manjeg alografta od procijenjenog, povezana je s kraćom trajnosti alogenih presadaka. Primjena alogenog presatka aortalnog zalistka u pulmonalnoj poziciji povezana je s većom stopom potrebe za reintervencijom. Točan mehanizam u ovom slučaju nije poznat; pretpostavlja se da je uzrok moguća reakcija imunološkog sustava na veću količinu antigenog materijala na aortalnom nego na alogenom presatku pulmonalnog zalistka. Pretpostavka je također da imunološki mehanizam ima određenu ulogu u kraćoj trajnosti alogenih presadaka koji su dobiveni od donora mlađih od 30 godina te u slučaju AB0 nepodudarnosti. Povišeni tlak u plućnoj cirkulaciji je također potvrđen kao čimbenik rizika za kraću trajnost alogenih presadaka (39–43).

Ograničena dostupnost alogenih presadaka srčanih zalistaka je jedan od glavnih nedostataka njihove primjene. To se prvenstveno odnosi na alogene presatke pulmonalnog zalistka malih veličina. Bikuspidalizacija većih pulmonalnih presadaka je jedna od opcija koja omogućuje da se dijelom kompenzira taj nedostatak. Rezultati primjene takvih presadaka su komparabilni s rezultatima alogenih presadaka pulmonalnih zalistaka. Također, razvijen je i niz drugih alternativnih opcija. Za rekonstrukciju izlaznog trakta je moguće koristiti krioprezervirani alogeni presadak

femoralne vene, PTFE provodnik, ali vjerojatno najčešće korištena alternativa je provodnik od goveđe jugularne vene (Contegra®, Medtronic). Razlozi zbog kojih ove proteze neki kirurzi preferiraju su dostupnost, lakoća ugradnje i prihvatljiva dužina trajanja (44–47).

Alogeni presaci srčanih zalistaka se koriste i u liječenju bolesnika s prirođenim bolestima aortnog zalistka kod kojih je neophodna zamjena aortnog zalistka. Alogeni presaci srčanih zalistaka se mogu koristiti samostalno ili u sklopu operativnog zahvata po Rossu. Također, u ovoj situaciji se mogu koristiti i mehaničke i biološke proteze. Operativni zahvat po Rossu smatra se preferiranom kirurškom opcijom u djece kod kojih je neophodna zamjena aortnog zalistka. Taj zahvat podrazumijeva postavljanje pulmonalnog autografta u aortalnu poziciju i alogenog presatka pulmonalnog zalistka u pulmonalnu poziciju. Pulmonalni autograft ima bolji hemodinamski profil od drugih dostupnih alternativa, povećanjem promjera prati rast tijela, ima nizak rizik od endokarditisa i tromboembolijskih komplikacija, a također ne zahtijeva primjenu antikoagulantne terapije. Glavna zamjerka je ta što se bolest jednog zalistka pretvara u potencijalni problem dva zalistka. Naime, osim što je novi aortalni korijen sklon proširenju, također je alogeni presadak pulmonalnog zalistka sklon strukturalnom propadanju (48).

Glavni zaključak meta-analize koju su objavili Etnel i suradnici, nakon analize ishoda u 34 studije u kojima su uspoređivali ishode različitih opcija za zamjenu aortnog zalistka u djece, je taj da nijedna od opcija koja se primjenjuje u ovoj skupini bolesnika nije idealna. Operativni zahvat po Rossu u djece nudi najpovoljnije ishode, što se odnosi na preživljenje, nizak rizik od tromboembolijskih komplikacija i krvarenja. Međutim stopa reoperacija u odnosu na mehaničke zalistke je veća u prvom desetljeću s tendencijom povećanja u drugom desetljeću nakon operacije. Ova tvrdnja uključuje kumulativni rizik od reoperacije zbog dilatacije novog aortalnog korijena i zbog strukturalnog propadanja alogenog presatka pulmonalnog zalistka. Također, utvrđeno je da je stopa reoperacija na izlaznom traktu desne klijetke, u djece koja su mlađa od 1 godine, dva puta veća nego u druge starije djece s ovom vrstom zahvata. Alogeni presaci aortalnog zalistka danas imaju ograničenu primjenu radi visoke stope strukturalne deterioracije u odnosu na mehaničke zalistke i operativni zahvat po Rossu. Prema ovoj meta-analizi godišnja stopa reoperacije na aortalnom zalistku je 1,6 % za operaciju po Rossu, 1,4 % za mehanički zalistak i 5,4 % za alogeni presadak

aortalnog zalistka. Godišnja stopa mortaliteta je bila 0,64 % za operaciju po Rossu, 2,6 % za mehanički zalistak i 1,99 % za alogeni presadak (49). Najpovoljnije rezultate operacije po Rossu u djece i mladih odraslih u svom istraživanju potvrdili su Sharabiani i suradnici. U tom istraživanju analizirani su ishodi 1501 bolesnika iz nacionalnog registra prirođenih grešaka srca. Analizirani su i uspoređivani ishodi u tri različite dobne skupine vezani uz različite proteze koje su korištene. U skupini djece mlađe od 1 godine (n = 61) najčešće je korištena operacija po Rossu (n = 55). Ukupna sloboda od aortalne reintervencije je 84,7 % u 12 godina, a kada se kombinira sa slobodom od potrebe za ponovnom intervencijom na pulmonalnom zalistku ili izlaznom traktu desne klijetke tada pada na 72,5 %. Također, u djece u dobi od 1 do 16 godina (n = 568) najčešće korištena opcija je bila operacija po Rossu (77,2 %), dok su mehaničke proteze korištene u 17,3 % bolesnika. Ukupna sloboda od negativnih događaja je bila 12,7 % veća nakon operacije po Ross-u nego nakon primjene mehaničke proteze. U dobnoj skupini od 17 do 40 godina (n = 872) najčešće su korištene mehaničke proteze (53,7%). Uspoređujući ishode najčešće korištenih proteza došlo je se do zaključka da su mortalitet i rizik od reintervencije najveći u skupini bolesnika s biološkom protezom, zatim s mehaničkom protezom, dok su najpovoljniji ishodi povezani s primjenom operacije po Rossu. Sloboda od pojavljivanja negativnih događaja u 10 godina je bila 78 % za biološke proteze, 86,3 % za mehaničke proteze i 89,6 % za operaciju po Rossu. Iako je nakon primjene mehaničke proteze prisutan veći rizik od smrti i ponovne intervencije u odnosu na operaciju po Rossu, ipak nije dosegnuta statistička značajnost (50).

Alogeni presaci srčanih zalistaka se također mogu primjenjivati u sklopu operacije po Rastelliju i Norwoodovoj proceduri. Operacija po Rastelliju se primjenjuje u bolesnika s transpozicijom velikih krvnih žila kod kojih je prisutna opstrukcija izlaznog trakta lijeve klijetke i ventrikularni septalni defekt. Alogeni presadak se može koristiti za povezivanje desne klijetke i glavne plućne arterije (51). Operacija po Norwoodu se primjenjuje u bolesnika s hipoplastičnom lijevom stranom srca, a ovaj postupak je prvi od tri stupnja popravka (52). Alogeni presaci se u ovoj proceduri mogu koristiti za povezivanje desne klijetke i plućne arterije, u situaciji kada se kao vrsta veze između systemske i plućne cirkulacije koristi takozvani Sano provodnik. Prednost provodnika sa zalistkom se očituje u smanjenju dodatnog volumnog opterećenja sistemskog ventrikula (53).

Ograničena trajnost alogenih presadaka srčanih zalistaka je jedan od glavnih negativnih čimbenika njihove primjene. S obzirom na povećanje broja osoba s prirođenim srčanim greškama, unapređenje postojećih ishoda je neophodno. Preostaje nada da će se metodama tkivnog inženjerstva moći odgovoriti na ovaj izazov.

## 1.4. Banka kardiovaskularnog tkiva

Banka kardiovaskularnog tkiva (BKT) je organizacija koja se bavi prikupljanjem, obradom i distribucijom kardiovaskularnog tkiva u skladu s validiranim protokolima i u suglasnosti s pravilima i zakonima koji se primjenjuju u institucijama za obradu i pohranu tkiva.

Spektar aktivnosti banke kardiovaskularnog tkiva obuhvaća:

1. odabir darivatelja
2. obradu kardiovaskularnog tkiva
3. pohranu
4. kontrolu kvalitete
5. distribuciju

Odabir darivatelja kardiovaskularnog tkiva je složeni proces tijekom kojega se nastoji prikupiti niz podataka o darivatelju na temelju dostupne medicinske dokumentacije. Kardiovaskularno tkivo se može dobiti od tri skupine darivatelja. Multiorganski darivatelji su najčešće korišteni izvori alogenih presadaka kardiovaskularnog tkiva. Kod primatelja transplantata srca, srčani zalisci često nisu patološki promijenjeni te ova skupina donora predstavlja vrijedan izvor alogenih presadaka srčanih zalistaka. Darivatelji s nekucajućim srcem su također izvor alogenih presadaka kardiovaskularnog tkiva, međutim organizacijski i logistički problemi često sprječavaju njihovo korištenje.

Tijekom postupka odabira darivatelji moraju zadovoljiti niz propisanih kriterija. Odabir prikladnog darivatelja je dosta strog postupak jer kardiovaskularno tkivo koje se prikuplja za liječenje bolesnika ne smije za bolesnika predstavljati rizik. Kriteriji odabira su stroži nego kriteriji za odabir organa za presađivanje organa. Jedan od propisanih kriterija je dob donora. Smatra se da dob darivatelja alogenih presadaka srčanih zalistaka može biti do 65 godina. Veliki značaj se pridaje podacima iz medicinske povijesti darivatelja. Postojanje, pa čak i sumnja na postojanje određenih zaraznih bolesti (HIV, hepatitis B i C, sifilis, tuberkuloza, HTLV infekcija, Q groznica, bruceloza, aktivna septikemija, Creutzfeld Jakobova bolest, žutica nepoznate

etiologije) smatra se apsolutnom kontraindikacijom za uzimanje tkiva od određenog darivatelja. Kontraindikacijom za uzimanje tkiva smatraju se i bolesti i stanja kao što su: zloćudna bolest (osim bazocelularnog karcinoma kože, in situ karcinoma vrata maternice i nekih tumora središnjeg živčanog sustava), bolesti vezivnog tkiva, nepoznati uzrok smrti, autoimune bolesti, dugotrajna primjena kortikosteroida. Jedan od bitnih dijelova probira darivatelja kardiovaskularnog tkiva je prikupljanje podataka i analiza postojanja rizičnih ponašanja koje potencijalnog darivatelja čine potencijalnim izvorom infekcije ili bolesti. Značajne makroskopske promjene poput proširenja korijena aorte i postojanje značajnih aterosklerotskih promjena smatraju se također kontraindikacijom za prikupljanje tkiva.

Obrada kardiovaskularnog tkiva obuhvaća aktivnosti od eksplantacije tkiva do njegove krioprezervacije. Nakon odabira prikladnog darivatelja pristupa se postupku eksplantacije kardiovaskularnog tkiva. Neposredno prije samog početka postupka eksplantacije od darivatelja se uzimaju uzorci krvi koji će biti korišteni za serološka ispitivanja. Eksplantacija tkiva se vrši u sterilnim uvjetima uz poštivanje svih pravila aseptičnog rada. Eksplantaciju tkiva obično provodi kirurg, ali ju može provoditi i posebno educirano medicinsko osoblje koje nema formalnu kiruršku izobrazbu. Neposredno nakon eksplantacije srce se stavlja u sterilnu vrećicu u kojoj se nalazi 500 mL izotonične otopine 0,9 % NaCl. Zatim se vrećica stavlja na led te se srce u sterilnim vrećicama i u posebnom spremniku na temperaturi od 2 - 8 °C transportira u banku kardiovaskularnog tkiva radi daljnje obrade. U slučaju istovremene eksplantacije arterija preporuka je da se, zbog veće stope kontaminacije vaskularnog tkiva, one zapakiraju na isti način, ali odvojeno od srca.

Tijekom sljedeća 24 sata tkivo mora biti transportirano u banku kardiovaskularnog tkiva, te unutar tog vremenskog perioda mora biti nastavljen daljnji postupak obrade. U banci kardiovaskularnog tkiva se vrši obrada u za to predviđenim prostorijama u kojima postoje određeni propisani uvjeti. Obrada tkiva se vrši u sobi s laminarnim strujanjem zraka klase zraka B, te u kabinetima za rad u čistom u kojima je klasa zraka A. Tijekom obrade tkiva poštuju se sva pravila aseptičnog rada.

Na početku obrade tkiva se uzimaju uzorci transportne otopine i dijelovi tkiva za obveznu mikrobiološku analizu. Tijekom daljnjeg postupka se vrši kirurška

preparacija, tkivo se pregleda i vrši se mjerenje, a u slučaju srčanih zalistaka provodi se i funkcionalni test kompetencije. Na slici 5. su prikazani alogeni presaci srčanih zalistaka neposredno nakon kirurške obrade. Sve mjere i uočene promjene se bilježe i one će postati dio završnog izvješća o alogenom presatku kardiovaskularnog tkiva.



**a)**



**b)**

Slika 5. Alogeni presaci srčanih zalistaka neposredno nakon kirurške preparacije. a) alogeni presadak aortalnog zalistka; b) alogeni presadak plućnog zalistka. Slike su prikazane uz dopuštenje Hrvatske banke tkiva i stanica, Banke kardiovaskularnog tkiva, Kliničkog bolničkog centra Zagreb

Nakon kirurške obrade slijedi postupak mikrobiološke dekontaminacije. Tkivo se uranja u antibiotsku otopinu određenog sastava i inkubira se na određenoj temperaturi kroz određeni vremenski period. Sastav antibiotske otopine kao i uvjeti čuvanja tkiva tijekom obrade nisu standardizirani i razlikuju se između različitih banaka. U banci kardiovaskularnog tkiva koja je sastavni dio Hrvatske nacionalne banke tkiva i stanica antibiotska otopina koja se koristi se sastoji od linkomicina, vankomicina i polimiksin B sulfata koji su otopljeni u HANK TCM 199. Koncentracije antibiotika su: linkomicin 120 µg/mL, vankomicin 50 µg/mL i polimiksin B sulfat 100 µg/mL. Postupak dekontaminacije traje od 24 do 48 sati. Temperatura na kojoj se provodi postupak mikrobiološke dekontaminacije je +4 °C. Nakon završetka



dekontaminacije ponovno se uzimaju uzorci tkiva za mikrobiološku analizu. Ponovno se provodi inspekcija tkiva i mjerenja. Ponovno se provodi i funkcionalni test kompetencije zalistaka. Na slici 6. je prikazan postupak uzorkovanja mikrobioloških kontrola nakon postupka mikrobiološke dekontaminacije.



a)



b)

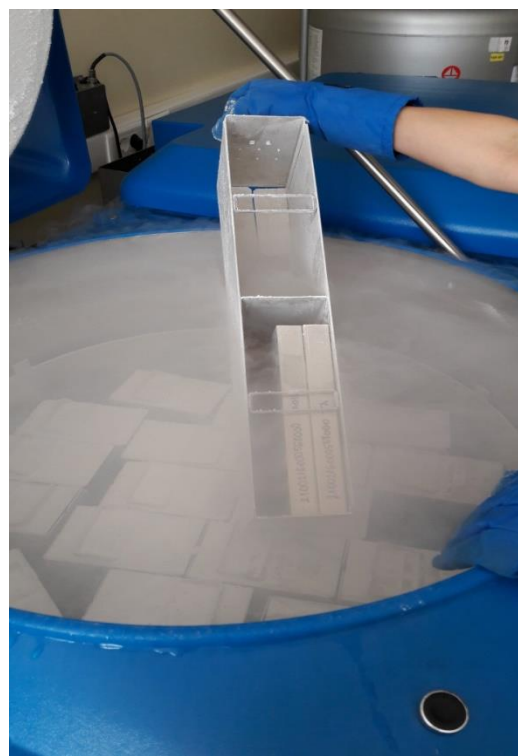
Slika 6. Obrada alogenih presađaka srčanih zalistaka nakon mikrobiološke dekontaminacije: a) filtriranje antibiotičke otopine; b) uzorkovanje tkiva za mikrobiološku dekontaminaciju. Slike su prikazane uz dopuštenje Hrvatske banke tkiva i stanica, Banke kardiovaskularnog tkiva, Kliničkog bolničkog centra Zagreb

Zatim slijedi uranjanje tkiva u krioprotektivnu otopinu. Krioprotektivna otopina koja se koristi u Hrvatskoj nacionalnoj banci tkiva i stanica za krioprezervaciju kardiovaskularnih alogenih presađaka je 10 % otopina dimetilsulfoksida (DMSO) u HANK TCM 199. Posljednje uzorke za mikrobiološku analizu predstavljaju uzorak krioprotektivne otopine nakon uranjanja tkiva i brisevi vrećice u kojoj se nalazi tkivo nakon što se ista hermetički zatvori.

Kardiovaskularno tkivo se mora kontrolirano zamrzavati prema validiranom protokolu. Tkivo se postupno zamrzava i to od + 2 °C brzinom od 1 °C/min do - 40 °C, zatim od - 40 °C brzinom 5 °C/min do - 100 °C. Nakon zamrzavanja do - 100 °C tkivo se prenese u plinovitu fazu tekućeg dušika na temperaturu manju od - 150 °C. Cijeli postupak zamrzavanja mora biti dokumentiran krivuljom zamrzavanja. Krivulja zamrzavanja također postaje dio završnog izvješća o alogenom presatku. Nakon krioprezervacije tkivo se čuva u plinovitoj fazi tekućeg dušika u posebnom spremniku. Na slici 7. je prikazana vrećica s alogenim presatkom srčanog zalistka neposredno prije krioprezervacije. Također, prikazan je i spremnik u kojem su pohranjeni krioprezervirani alogeni presaci u plinovitoj fazi tekućeg dušika.



a)



b)

Slika 7. Pohrana tkiva: a) hermetički zatvorena vrećica s krioprotektivnom otopinom (DMSO) i alogenim presatkom; b) kardiovaskularna tkiva pohranjena u plinovitoj fazi tekućeg dušika. Slike su prikazane uz dopuštenje Hrvatske banke tkiva i stanica, Banke kardiovaskularnog tkiva, Kliničkog bolničkog centra Zagreb

Krioprezervirani alogeni presadak kardiovaskularnog tkiva ne može biti izdan za kliničku primjenu sve dok se ne učini konačna analiza svih zapažanja i rezultata učinjenih pretraga. Alogeni presaci kardiovaskularnog tkiva prihvaćeni za kliničku primjenu se u

većini institucija čuvaju do 5 godina. Posljednjih godina su se pojavila istraživanja koja zagovaraju njihovu primjenu i nakon isteka tog vremenskog razdoblja (54).

Kako bi alogeni presaci kardiovaskularnog tkiva bili odobreni za kliničku primjenu moraju biti zadovoljeni sljedeći kriteriji:

1. Donor mora biti odabran u skladu s propisanim kriterijima za odabir donora
2. Provedeni serološki testovi na virusne infekcije moraju biti negativni
3. Na patohistološkom pregledu tkiva ne smije biti znakova infekcije ni maligne bolesti te struktura izvanstaničnog matriksa mora biti očuvana
4. Posljednji uzorci za mikrobiološku analizu moraju biti negativni
5. Krioprezervacija mora biti provedena prema propisanom protokolu
6. Uvjeti čuvanja krioprezerviranog tkiva, koji su kontinuirano monitorirani, moraju biti optimalni (55)

Ako alogeni presaci zadovoljavaju sve propisane kriterije mogu biti ponuđeni za kliničku primjenu. Odabir prikladnog presatka za pojedinog bolesnika vrši se u suradnji odgovornog osoblja banke kardiovaskularnog tkiva i nadležnog kirurga. Odabrano tkivo se u posebno dizajniranim spremnicima transportira u nadležnu ustanovu. Ponovno se potvrđuje prikladnost odabranog tkiva te se odabrani presadak odmrzava prema propisanom i validiranom protokolu.

Nakon transplantacije osoblje banke kardiovaskularnog tkiva, u suradnji s nadležnim liječnicima, nastoji prikupiti informacije o kratkoročnom i dugoročnom ishodu liječenja bolesnika s transplantiranim kardiovaskularnim tkivom.

## 1.5. Mikrobiološka dekontaminacija

Kardiovaskularna tkiva eksplantirana sa svrhom pripreme alogenih presadaka srčanih zalistaka su kontaminirana u oko 30 % slučajeva (56). Stupanj kontaminacije tkiva ovisi o tipu donora i lokalnim uvjetima u kojima se provodi eksplantacija. Najveći stupanj kontaminacije je prisutan u donora s nekucajućim srcem kod kojih postupak eksplantacije nije učinjen u klasičnoj operacijskoj dvorani. Ako eksplantaciju tkiva provodi iskusni tim s malim brojem članova i ako se eksplantacija provodi u operacijskoj dvorani poštujući pravila aseptičnog rada te ako je vrijeme od asistolije do eksplantacije što kraće, može se postići značajno smanjenje stope kontaminacije (57). Pozitivni rezultati mikrobioloških pretraga jedan su od najčešćih razloga zašto se tkivo odbacuje. Bakterije koje najčešće uzrokuju kontaminaciju alogenih presadaka kardiovaskularnog tkiva su *Staphylococcus spp.*, *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus spp.* i *Escherichia coli*. Iz uzoraka za mikološku analizu najčešće su izolirani sojevi *Candida spp.* (58) .

Uobičajeni postupak obrade alogenih presadaka srčanih zalistaka uključuje i izlaganje istih antibiotskoj otopini određenog sastava. Inkubacijom u antibiotskoj otopini stopa kontaminacije alogenih presadaka srčanih zalistaka može se smanjiti na 5-10 %. Postupak mikrobiološke dekontaminacije nije standardizirani postupak, te se u različitim bankama kardiovaskularnog tkiva koriste i različiti protokoli mikrobiološke dekontaminacije. Protokoli dekontaminacije se razlikuju u sastavu antibiotске otopine, dužini trajanja dekontaminacije kao i temperaturi na kojoj se postupak provodi (58–60). Antibiotске otopine koje se sastoje od antibiotika širokog spektra u kombinaciji s fungicidom imaju najveću učinkovitost (58). Najčešće upotrebljavani antibiotik je vankomicin (58, 59). Primjenom amfotericina B kao fungicida može se dodatno smanjiti stopa kontaminacije, međutim njegova primjena je ograničena radi potencijalnog negativnog učinka na tkivnu vijabilnost (61). U većini banaka tkiva su dekontaminirana na +4 °C u vremenskom periodu od 24 sata. Razlog za to je očuvanje tkivne vijabilnosti, odnosno sprečavanje potencijalnih štetnih učinaka produljenog razdoblja tople ishemije na kvalitetu tkiva. Postoje istraživanja koja su pokazala da se povišenjem temperature mikrobiološke dekontaminacije na +37 °C može značajno smanjiti stopa kontaminacije kardiovaskularnih tkiva koja je prisutna nakon inkubacije u antibiotskoj otopini. Razlog za to je činjenica da je većina antibiotika učinkovitija dok se bakterije aktivno repliciraju. Germain i suradnici su u svome istraživanju kontaminirali sterilne alogene presatke srčanih

zalistka s najčešćim uzročnicima koji se izoliraju u mikrobiološkim uzorcima u koncentraciji značajno većoj nego što su koncentracije mikroorganizama u kontaminiranim tkivima. Zatim su kontaminirane dijelove alogenih presađaka srčanih zalistaka inkubirali na +4 °C i +37 °C tijekom 24 sata. Nakon inkubacije pokazali su da su sve aerobne i anaerobne kulture kod zalistaka inkubiranih na +4 °C bile pozitivne. Kvantitativna analiza je pokazala da je broj CFU/ml za aerobe i anaerobe bio  $3,6 \pm 1,8$  i  $3,6 \pm 2,7$  CFU/mL. Kod inkubacije na +37 °C samo su u dva uzorka kulture bile pozitivne, međutim kvantitativnom analizom nije bilo moguće utvrditi broj bakterija, što je upućivalo da je njihov broj ispod razine detekcije od 0,5 CFU/mL (62). De By i suradnici su također u svome istraživanju istaknuli potrebu za dekontaminacijom tkiva na temperaturi na kojoj se mikroorganizmi aktivno repliciraju (63).

U većini studija koje su proučavale različite dekontaminacijske postupke primarno je proučavana njihova efikasnost. Nedostaju dodatna istraživanja u kojima su proučavani potencijalni štetni učinci promijenjenih uvjeta mikrobiološke dekontaminacije na strukturu tkiva alogenog presađaka. Iako je potreba za postojanjem vijabilnosti predmet rasprava, očuvana tkivna vijabilnost ipak se smatra pokazateljem uspješnosti metoda obrade i čuvanja tkiva.

## 1.6. Svrha rada

Pozitivni rezultati mikrobioloških pretraga jedan su od najčešćih razloga zbog kojih određeni alogeni presaci srčanih zalistaka ne mogu biti iskorišteni u liječenju bolesnika (55, 58). Postupak mikrobiološke dekontaminacije je dio uobičajene obrade alogenih presadaka. S obzirom na to da nije riječ o standardiziranom postupku različite banke tkiva koriste i različite protokole. Jedna od varijabli po kojoj se protokoli pojedinih institucija razlikuju je i temperatura mikrobiološke dekontaminacije. Iako većina banaka kardiovaskularnog tkiva provodi postupak dekontaminacije na +4 °C, rezultati određenih istraživanja ukazuju da bi se ista trebala provoditi na +37 °C (58, 59, 60, 62). Rezultati njihovih istraživanja ukazuju da se povišenjem temperature mikrobiološke dekontaminacije povećava efikasnost postupka, a također se smanjuje i mogućnost lažno negativnih rezultata zbog kojih bi primjena određenog presatka mogla ugroziti pacijenta (60, 62).

Razlog zbog kojeg neke institucije imaju određenu zadržku prema povišenju temperature mikrobiološke dekontaminacije je potencijalni negativni učinak produženog vremena tople ishemije na tkivne karakteristike. S ciljem pružanja dodatnih informacija ovoj raspravi je provedeno i ovo istraživanje. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi dolazi li u tkivima alogenih presadaka srčanih zalistaka do funkcionalnih promjena koje bi mogle imati negativan utjecaj na strukturu izvanstaničnog matriksa, a očuvanost strukture izvanstaničnog matriksa smatra se jednom od glavnih odrednica njihove trajnosti (64).

Strukturalni integritet izvanstaničnog matriksa ovisi o njegovoj sposobnosti da se sam remodelira. Sposobnost remodeliranja ovisi o biosintetskoj aktivnosti valvularnih intersticijskih stanica, a također ovisi i o stupnju razgradnje sastavnica izvanstaničnog matriksa koja je uglavnom posredovana metaloproteinazama matriksa (65).

U ovome istraživanju smo nastojali utvrditi postoji li, zbog povišenja temperature mikrobiološke dekontaminacije, u tkivima alogenih presadaka srčanih zalistaka utjecaj na sposobnost stanica da sintetiziraju izvanstanični matriks srčanih zalistaka. S tom svrhom u uzorcima tkiva smo određivali prokolagen tip I, prekursor kolagena tip I koji je najzastupljenija sastavnica izvanstaničnog matriksa srčanih zalistaka. Određivanje prokolagena tip I smatra se dobrim pokazateljem biosintetske aktivnosti stanica (66).

Kako bismo utvrdili potencijalni utjecaj produženog vremena ishemije na pojačanu proteolitičku aktivnost u zaliscima smo određivali prisutnost matriks metaloproteinaze 2

(MMP-2). MMP-2 smo određivali zbog činjenice da je dokazano njeno postojanje u srčanim zaliscima (18, 19, 67). Također, postoji i niz istraživanja o njenoj pojačanoj izraženosti u tkivima koja su izložena određenom periodu ishemije (68, 69). Htjeli smo istražiti dolazi li i u alogenim presacima srčanih zalistaka tijekom produženog vremena tople ishemije do pojačane izraženosti MMP-2. Njena pojačana aktivnost mogla bi dovesti do pojačane proteolitičke aktivnosti i posljedičnog razaranja izvanstaničnog matriksa.

## **2. Hipoteza**

Povišenje temperature mikrobiološke dekontaminacije nema utjecaja na strukturalna svojstva alogenih presadaka srčanih zalistaka.



### 3. Ciljevi

#### OPĆI CILJ:

Opći cilj ovog istraživanja je utvrditi utjecaj različitih protokola mikrobiološke dekontaminacije na vijabilnosti tkiva i strukturalni integritet izvanstaničnog matriksa alogenih presađaka srčanih zalistaka.

#### SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Odrediti biosintetski kapacitet fibroblasta srčanih zalistaka koji su inkubirani u antibiotskoj otopini na +4 °C i + 37 °C
2. Odrediti razinu izraženosti MMP-2 srčanih zalistaka koji su inkubirani u antibiotskoj otopini na +4 °C i + 37 °C
3. Usporediti mjerene parametre između uzoraka tkiva inkubiranih u antibiotskoj otopini na +4 °C i + 37 °C

## **4. Materijali i metode**

### **4.1. Materijali**

Istraživanje je provedeno na Kliničkom bolničkom centru Zagreb u suradnji Klinike za kardijalnu kirurgiju i banke kardiovaskularnog tkiva koja je sastavni dio Hrvatske nacionalne banke tkiva i stanica. Dijelovi istraživanja su provedeni u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju te u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju. Prije početka istraživanja dobivene su suglasnosti Etičkih povjerenstava Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Srčani zalisci koji su uključeni u ovo istraživanje prema morfološkim i funkcionalnim kriterijima Banke kardiovaskularnog tkiva KBC-a Zagreb nisu bili prikladni za pohranu i njihovu kasniju kliničku primjenu.

Za provođenje ovog istraživanja ukupno je prikupljeno 20 srčanih zalistaka. U istraživanje je uključeno 10 aortalnih zalistaka, 7 pulmonalnih zalistaka i 3 mitralna zalistka. U istraživanje nisu bili uključeni srčani zalisci koji su imali značajne degenerativne promjene. Korišteni uzorci tkiva su obrađeni prema postupniku banke kardiovaskularnog tkiva. Svi primatelji transplantata srca čiji su srčani zalisci bili korišteni u ovom istraživanju su prethodno potpisali pisanu suglasnost kojom su odobrili njihovo korištenje.

### **4.2. Obrada uzoraka**

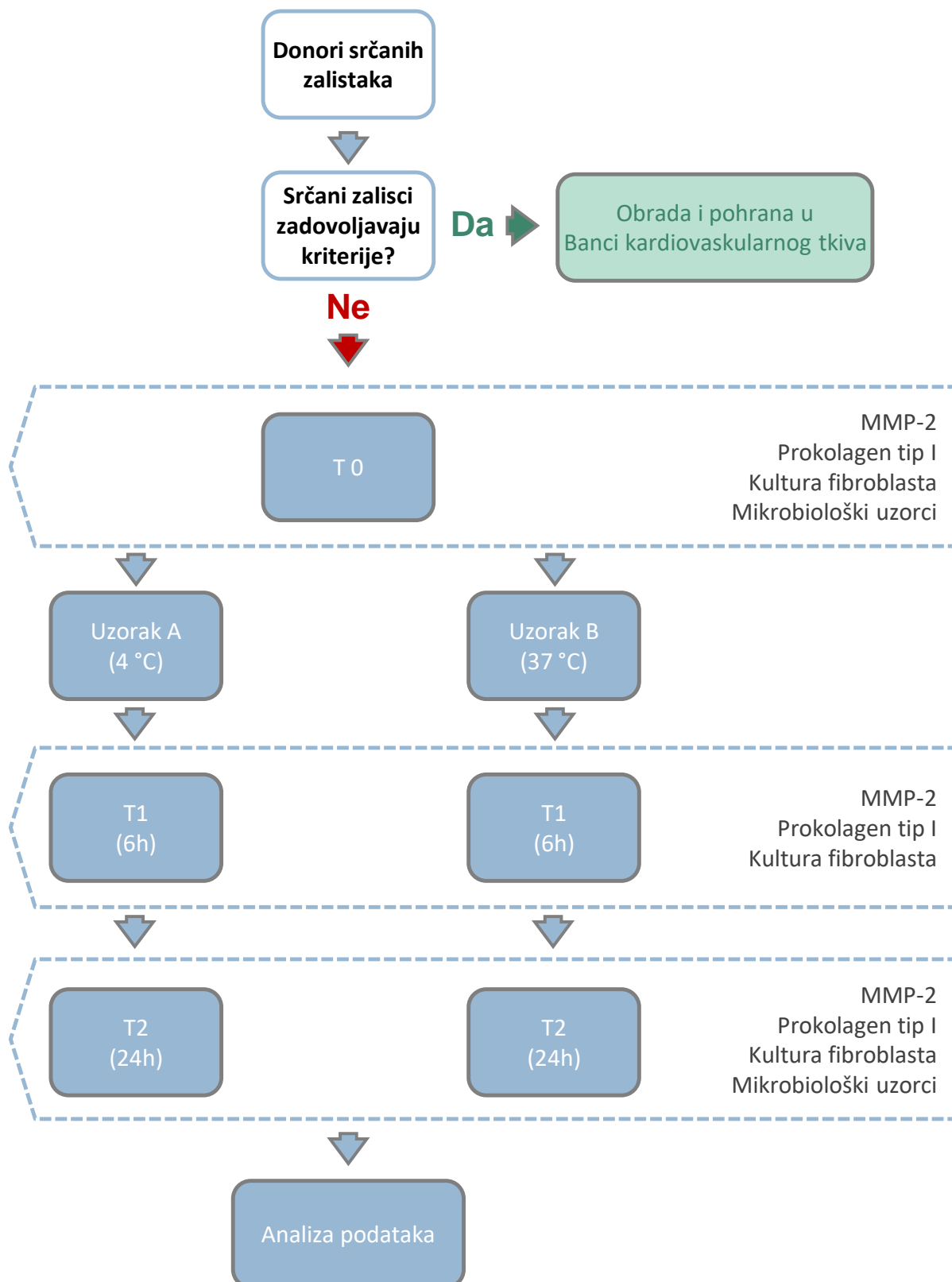
Eksplantacija srca je učinjena u operacijskoj dvorani poštujući sva pravila aseptičnog rada. Nakon eksplantacije, srce ili dio srca koji sadrži srčane zaliske su stavljeni u trostruku sterilnu vrećicu u otopinu 0,9 % NaCl. Zatim je u posebnom spremniku, na ledu, tkivo transportirano u banku kardiovaskularnog tkiva. Daljnja obrada tkiva je započeta unutar 24 sata od eksplantacije srca.

U banci kardiovaskularnog tkiva, u kabinetu za rad u čistom s laminarnim protokom zraka klase zraka A, nastavljena je daljnja obrada. Tijekom daljnjeg postupka učinjena je kirurška preparacija zalistaka. Zatim je svaki od zalistaka podijeljen u tri djela. Svi uzorci tkiva uzeti u ovom istraživanju su se sastojali od kuspisa i pripadajućeg dijela krvne žile i mišića.

Nakon kirurške preparacije uzorci tkiva su bili stavljeni u antibiotsku otopinu određenog sastava u sterilnu, hermetički zatvorenu posudu. Antibiotska otopina koja je korištena u ovom istraživanju se sastojala od: linkomicina, vankomicina i polimiksin B sulfata. Koncentracije antibiotika bile su: linkomicin 120 µg/mL, vankomicin 50 µg/mL i polimiksin B sulfat 100 µg/mL. Dijelovi srčanih zalistaka su bili podijeljeni u dvije skupine. Jedna skupina uzoraka je bila inkubirana na +4°C, a druga na +37 °C. Tkiva su bila inkubirana tijekom 24 sata.

Uzorci tkiva za uzgajanje fibroblasta *in vitro*, određivanje biosintetske aktivnosti određivanjem izraženosti prokolagena tip I i određivanje izraženosti MMP-2 u tkivu bili su uzeti neposredno prije uranjanja tkiva u antibiotsku otopinu. Uzorci su ponovno uzeti nakon 6 sati i nakon 24 sata. Također, na početku i na kraju pokusa su uzeti uzorci za mikrobiološku analizu.

Na slici 8. je prikazan postupnik provedenog istraživanja.



Slika 8. Postupnik istraživanja.

### 4.3. Kultura fibroblasta

Za potrebe testa vijabilnosti i rasta fibroblasta uzimali su se dijelovi kuspisa aortalnih i pulmonalnih zalistaka i dijelovi stražnjeg mitralnog kuspisa. Uzorci tkiva su prikupljeni prije uranjanja u antibiotsku otopinu te nakon 6 i 24 sata inkubacije u dekontaminacijskoj otopini na dvije različite temperature, na +37 °C i +4 °C.

Uzeti uzorci tkiva izrezani su na dva manja dijela koristeći jednokratni sterilni skalpel te su preneseni u dva bunarića na kultivacijskoj pločici i ostavljeni par minuta da se zalijepu na plastičnu podlogu pločice. Uzorci su razrezani na dva komadića i test fibroblasta je za svaki uvjet postavljen u duplikatu. Kada se tkivo zalijepilo, u svaki bunarić je dodano po 2 ml potpunog kultivacijskog medija. Kompletni kultivacijski medij za uzgoj fibroblasta sastojao se od RPMI medija u koji je dodano 10 % fetalnog goveđeg seruma, 1 mM L-glutamina i 1% antibiotske otopine (antibiotska otopina se sastojala od penicilina, streptomicina i neomicina). Tako pripremljeni medij se čuvao u kontroliranom hladnjaku na +4 °C tijekom izvođenja testa rasta fibroblasta. Pločica s uzorcima tkiva za test fibroblasta je potom pohranjena u CO<sub>2</sub> inkubator. Kultivacijski medij u bunarićima je mijenjan svaka tri dana. Nakon dva tjedna uzgoja analizom na invertnom mikroskopu se procijenila uspješnost rasta fibroblasta koji su tijekom razdoblja inkubacije migrirali iz tkiva.

Uspješnost rasta fibroblasta se opisuje kao:

- 0 - nije uočen rast stanica izvan tkiva,
- 1 - fibroblasti rastu izvan tkiva, ali raštrkano oko transplantata,
- 2 - dobar rast fibroblasta oko eksplantata i njihovo širenje,
- 3 - konfluentna kultura fibroblasta.

#### 4.4. Imunohistokemijska obrada uzoraka

Tkivo je fiksirano u 10 % puferiranom formalinu koji je napravljen od 37 %-tnog formaldehida. Formalin je fiksativ koji spada u aldehidnu skupinu fiksativa. Proces dehidracije tkiva napravljen je u *Tissue-Tek VIP* aparatu. Proces fiksacije i dehidracije u uzlaznom nizu alkohola trajao je 16 sati. Dehidrirano tkivo uklopljeno je u parafinske blokove i uz pomoć mikrotoma dobiveni su tkivni rezovi debljine 3 - 4 µm. Deparafiniranje i demaskiranje tkivnog antigena napravljeno je u potpuno automatiziranom sustavu *PT Linku* koristeći pufer *EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution High ph*. Ovaj proces trajao je 20 minuta na maksimalnoj temperaturi od 97 °C.

Tkivni rezovi isprani su *Wash Buffer-om*. Nakon ispiranja rezova inkubirano je primarno, monoklonalno protutijelo anti-MMP-2 (ABCAM, ab 86607) i primarno, poliklonalno anti-prokolagen tip I protutijelo (SIGMA ALDRICH, ABT257). Inkubacija je trajala 30 minuta na sobnoj temperaturi. Oba primarna protutijela razrijeđena su u omjeru (1:150) sa *Antibody Diluent-om*. Nakon inkubacije primarnog protutijela preparati su isprani *Wash Buffer-om*. Kako bi se blokirala tkivna peroksidaza, nakon ispiranja puferom dodana je *Peroksidase-Blocking Reagent (RTU)* kroz 10 minuta. Preparati su ponovo isprani *Wash Buffer-om* i dodano je sekundarno protutijelo *EnVision™ FLEX/HRP (RTU)* kroz 30 minuta.

Za vizualizaciju antigena koristen je *EnVision™ FLEX Substrate Working Solution* koji se priređuje dodavanjem 1 mL *EnVision™ FLEX Substrate Buffer* + 1 kap *EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen*. Obojani preparati isprani su destiliranom vodom, a zatim su se kontrastirali hematoksilinom 1 minutu, *Mayer's Lillie's Modification Histological Staining Reagent® Dako*. Nakon kontrastiranja stakalaca montirana su pokrovna stakalca.

##### 4.4.1. Analiza imunohistokemijskih preparata

Procjena izraženosti MMP-2 i prokolagena tip I je utvrđena svjetlosnim mikroskopom tehnikom semikvantitativne analize. Procjena MMP-2 i prokolagena tip I imunopozitiviteta u citoplazmama i/ili jezgrama stanica temeljila se po postotku pozitivnih stanica (0: 0%, +1: <25%, +2: 26-50%, +3: >51 %). Jačina intenziteta bojenja preparata podijeljena je na 0: bez imunoreakcije, +1: blaga imunoreakcija, +2: umjerena imunoreakcija, +3: snažna imunoreakcija.

#### **4.5. Mikrobiološki uzorci**

Dijelovi tkiva alogenih presadaka srčanih zalistaka su korišteni za mikrobiološku analizu. Prvi uzorci tkiva su uzeti neposredno prije uranjanja tkiva u antibiotsku otopinu. Drugi uzorak tkiva je uzet na kraju pokusa nakon što je tkivo bilo inkubirano tijekom 24 sata u antibiotskoj otopini na temperaturama +4 °C i +37 °C. Uzorci za mikrobiološku analizu su rutinski obrađeni u mikrobiološkom laboratoriju Kliničkog zavoda za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Za sve uzorke tkiva je učinjena analiza na potencijalnu bakteriološku (aerobnu ili anaerobnu) ili mikološku kontaminaciju.

#### **4.6. Statistička obrada podataka**

Podaci su prikazani metodama deskriptivne statistike (aritmetička sredina, medijan i mod, uz prikladne mjere raspršenja), tablično i grafički. Distribucija vrijednosti je testirana Shapiro-Wilkovim testom. Za usporedbu vrijednosti kroz vrijeme koristile su se neparametrijske metode: Friedmanova analiza varijance za ponovljena mjerenja uz Dunnov test za post-hoc usporedbe grupa i Bonferronijevu korekciju za multipla testiranja. Za usporedbe između grupa u istoj točki mjerenja korišten je neparametrijski Wilcoxonov signed-rank test, a za korelacije između ispitanih varijabli korištena je Spearmanova korelacija. U obradi podataka korišteni su Microsoft Excel i IBM SPSS Statistics, verzija 25, a potrebni broj uzoraka izračunat je korištenjem softvera G\*Power, verzija 3.1.9. Razina statističke značajnosti postavljena je na 0,05.



## 5. Rezultati

### 5.1. Uzorci

Ukupno je analizirano 20 zalistaka: 10 aortalnih (A), 7 pulmonalnih (P) i 3 mitralna (MZ). Uzorci su uzeti od 10 osoba (6 muškaraca i 4 žene): dvije osobe po tri zaliska (A, P, MZ), šest osoba po dva zaliska (5 osoba A+P i jedna A+MZ) te dvije osobe po jedan zalistak (A). Svi zalisci uzeti su od donora koji su bili primatelji transplantata srca, a prosječna dob bila je 54,3 godine (raspon od 35 do 64 godine). Dijagnoze koje su bile uzrocima predviđene transplantacije su neishemijska kardiomiopatija (N=14) i ishemijska kardiomiopatija (N=6). Prosječno ukupno vrijeme ishemije bilo je 8,4 sati (raspon od 3 do 17,5 sati). U Tablici 1. su prikazane karakteristike donora od kojih su prikupljeni analizirani alogeni presaci srčanih zalistaka.

Tablica 1. Značajke donora

| Uzorak      | Ukupno vrijeme ishemije | Vrsta donora | Spol | Dob | Dijagnoza                    |
|-------------|-------------------------|--------------|------|-----|------------------------------|
| A1, P1      | 4                       | RHT          | M    | 64  | Neishemijska kardiomiopatija |
| A2, MZ1     | 4                       | RHT          | Ž    | 56  | Neishemijska kardiomiopatija |
| A3, P2, MZ2 | 7                       | RHT          | M    | 52  | Ishemijska kardiomiopatija   |
| A4, P2, MZ3 | 14,5                    | RHT          | M    | 58  | Neishemijska kardiomiopatija |
| A5, P4      | 3,5                     | RHT          | M    | 59  | Ishemijska kardiomiopatija   |
| A6, P5      | 3                       | RHT          | Ž    | 44  | Neishemijska kardiomiopatija |
| A7          | 11,5                    | RHT          | M    | 58  | Ishemijska kardiomiopatija   |
| A8, P6      | 7,5                     | RHT          | Ž    | 35  | Neishemijska kardiomiopatija |
| A9          | 17,5                    | RHT          | M    | 61  | Neishemijska kardiomiopatija |
| A10, P7     | 11,5                    | RHT          | Ž    | 56  | Neishemijska kardiomiopatija |

A - aortalni zalistak; P – pulmonalni zalistak; MZ – mitralni zalistak; RHT – primatelj transplantata srca (*recipient of heart transplant*)

Tablica frekvencija i udjela za analizirane uzorke prikazana je u Tablici 2.

Tablica 2. Rezultati učinjenih mjerenja

| Temperatura (°C)              | Početna |     | 4  |     |    |     | 37 |     |    |     |
|-------------------------------|---------|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|
| Vrijeme (h)                   | 0       |     | 6  |     | 24 |     | 6  |     | 24 |     |
| Prokolagen tip I - %          | N       | (%) | N  | (%) | N  | (%) | N  | (%) | N  | (%) |
| 0                             | 0       | 0   | 0  | 0   | 1  | 5   | 0  | 0   | 2  | 10  |
| < 25                          | 6       | 30  | 5  | 25  | 4  | 20  | 3  | 15  | 6  | 30  |
| 26 - 50                       | 12      | 60  | 13 | 65  | 13 | 65  | 15 | 75  | 12 | 60  |
| > 50                          | 2       | 10  | 2  | 10  | 2  | 10  | 2  | 10  | 0  | 0   |
| Prokolagen tip I - intenzitet | N       | (%) | N  | (%) | N  | (%) | N  | (%) | N  | (%) |
| 0                             | 0       | 0   | 0  | 0   | 1  | 5   | 0  | 0   | 2  | 10  |
| 1                             | 14      | 70  | 14 | 70  | 15 | 75  | 12 | 60  | 16 | 80  |
| 2                             | 6       | 30  | 6  | 30  | 4  | 20  | 7  | 35  | 2  | 10  |
| 3                             | 0       | 0   | 0  | 0   | 0  | 0   | 1  | 5   | 0  | 0   |
| MMP-2 - %                     | N       | (%) | N  | (%) | N  | (%) | N  | (%) | N  | (%) |
| < 25                          | 9       | 45  | 8  | 40  | 11 | 55  | 13 | 65  | 11 | 55  |
| 26 - 50                       | 4       | 20  | 7  | 35  | 5  | 25  | 2  | 10  | 5  | 25  |
| > 50                          | 7       | 35  | 5  | 25  | 4  | 20  | 5  | 25  | 4  | 20  |
| MMP-2 - intenzitet            | N       | (%) | N  | (%) | N  | (%) | N  | (%) | N  | (%) |
| 1                             | 17      | 85  | 19 | 95  | 20 | 100 | 18 | 90  | 19 | 95  |
| 2                             | 3       | 15  | 1  | 5   | 0  | 0   | 2  | 10  | 1  | 5   |
| Kultura fibroblasta           | N       | (%) | N  | (%) | N  | (%) | N  | (%) | N  | (%) |
| 0                             | 0       | 0   | 2  | 10  | 0  | 0   | 0  | 0   | 2  | 10  |
| 1                             | 2       | 10  | 5  | 25  | 6  | 30  | 2  | 10  | 8  | 40  |
| 2                             | 7       | 35  | 10 | 50  | 5  | 25  | 10 | 50  | 1  | 5   |
| 3                             | 11      | 55  | 3  | 15  | 6  | 30  | 8  | 40  | 6  | 30  |
| Nepoznato                     | 0       | 0   | 0  | 0   | 3  | 15  | 0  | 0   | 3  | 15  |

Osnovni sumarni deskriptivni podaci za analizirane uzorke u početnom mjerenju prikazani su u Tablici 3., a s obzirom na to da se radi o malom uzorku koji odstupa od normalne distribucije prikazani su i u obliku raspona, medijana i distribucije frekvencija.

Tablica 3. Početne vrijednosti kulture fibroblasta i imunohistokemijske izraženosti prokolagena tip I i MMP-2

| Mjerenje                      | Aritmetička sredina ± standardna pogreška | Medijan (interkvartilni raspon) | Mod |
|-------------------------------|---|---------------------------------|-----|
| Prokolagen tip I - %          | 36,5 ± 15,65                              | 30 (20-50)                      | 50  |
| Prokolagen tip I - intenzitet | 1,3 ± 0,47                                | 1 (1-2)                         | 1   |
| MMP-2 - %                     | 36 ± 2,71                                 | 40 (10-60)                      | 10  |
| MMP-2 - intenzitet            | 1,15 ± 0,37                               | 1 (1-1)                         | 1   |
| Kultura fibroblasta           | 2,45 ± 0,69                               | 3 (2-3)                         | 3   |

Deskriptivne vrijednosti za ponavljana mjerenja prikazane su u Tablici 4.

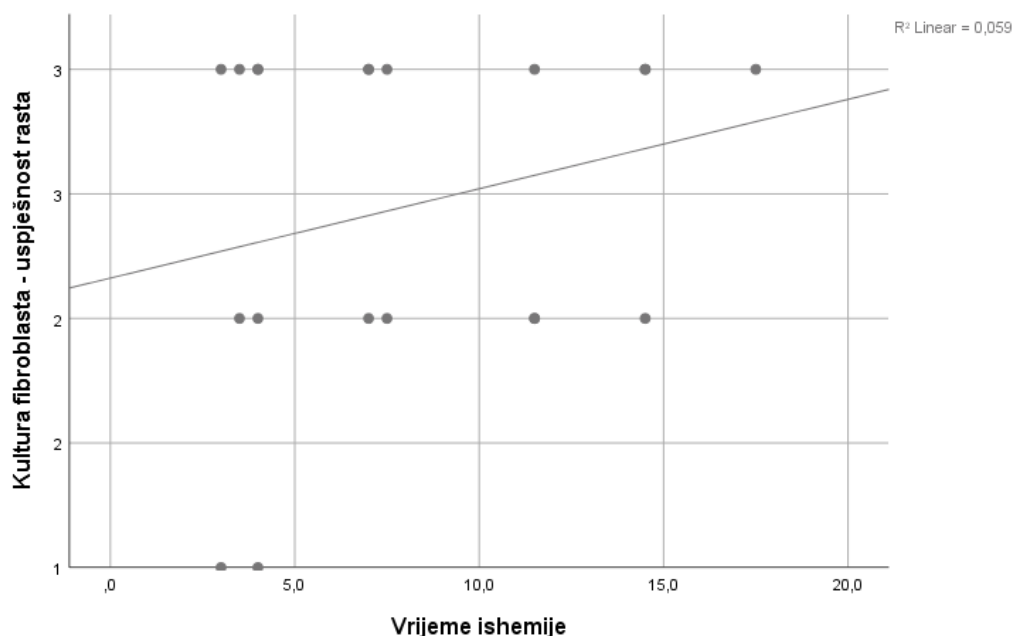
Tablica 4. Vrijednosti promatranih parametara nakon razdvajanja u skupine i ekspozicije različitim temperaturama

|                   | Mjerenje                      | Aritmetička sredina ± standardna pogreška | Medijan (interkvartilni raspon) | Mod |
|-------------------|-------------------------------|---|---------------------------------|-----|
| A- 1 (4 °C; 6h)   | Prokolagen tip I - %          | 37 ± 15,59                                | 40 (22,5-50)                    | 50  |
|                   | Prokolagen tip I – intenzitet | 1,3 ± 0,47                                | 1 (1-2)                         | 1   |
|                   | MMP-2 - %                     | 34 ± 20,11                                | 40 (10-57,5)                    | 10  |
|                   | MMP-2 – intenzitet            | 1,05 ± 0,22                               | 1 (1-1)                         | 1   |
|                   | Kultura fibroblasta           | 1,7 ± 0,87                                | 2 (1-2)                         | 2   |
| A- 2 (4 °C; 24h)  | Prokolagen tip I - %          | 31 ± 15,86                                | 30 (22,5-40)                    | 30  |
|                   | Prokolagen tip I – intenzitet | 1,15 ± 0,49                               | 1 (1-1)                         | 1   |
|                   | MMP-2 - %                     | 31 ± 22,22                                | 20 (10-50)                      | 10  |
|                   | MMP-2 – intenzitet            | 1 ± 0,00                                  | 1 (1-1)                         | 1   |
|                   | Kultura fibroblasta           | 2 ± 0,87                                  | 2 (1-3)                         | 1   |
| B- 1 (37 °C; 6h)  | Prokolagen tip I - %          | 40,5 ± 17,91                              | 40 (30-50)                      | 30  |
|                   | Prokolagen tip I – intenzitet | 1,45 ± 0,61                               | 1 (1-2)                         | 1   |
|                   | MMP-2 - %                     | 28,5 ± 21,83                              | 20 (10-55)                      | 10  |
|                   | MMP-2 – intenzitet            | 1,1 ± 0,31                                | 1 (1-1)                         | 1   |
|                   | Kultura fibroblasta           | 2,3 ± 0,66                                | 2 (2-3)                         | 2   |
| B- 2 (37 °C; 24h) | Prokolagen tip I - %          | 28 ± 15,76                                | 30 (20-40)                      | 30  |
|                   | Prokolagen tip I – intenzitet | 1 ± 0,46                                  | 1 (1-1)                         | 1   |
|                   | MMP-2 - %                     | 28,5 ± 20,59                              | 20 (10-47,5)                    | 10  |
|                   | MMP-2 – intenzitet            | 1,05 ± 0,22                               | 1 (1-1)                         | 1   |
|                   | Kultura fibroblasta           | 1,65 ± 1,12                               | 1 (1-3)                         | 1   |

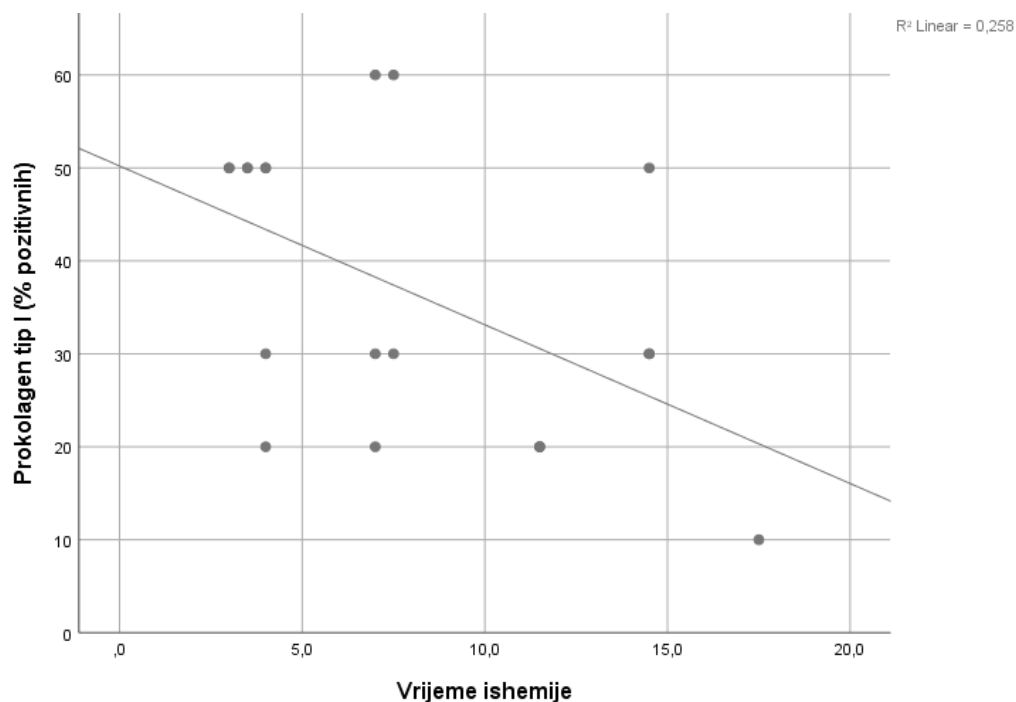
## 5.2. Analiza utjecaja ukupnog vremena ishemije na uspješnost rasta fibroblasta u kulturi stanica i imunohistokemijsku izraženost prokolagena tip I i MMP-2 u početnoj točki mjerenja

S obzirom na mogući utjecaj ukupnog vremena ishemije na početne vrijednosti mjerenja, izračunate su Spearmanove rho vrijednosti korelacije za praćene parametre i prikazane na slikama 9., 10. i 11.

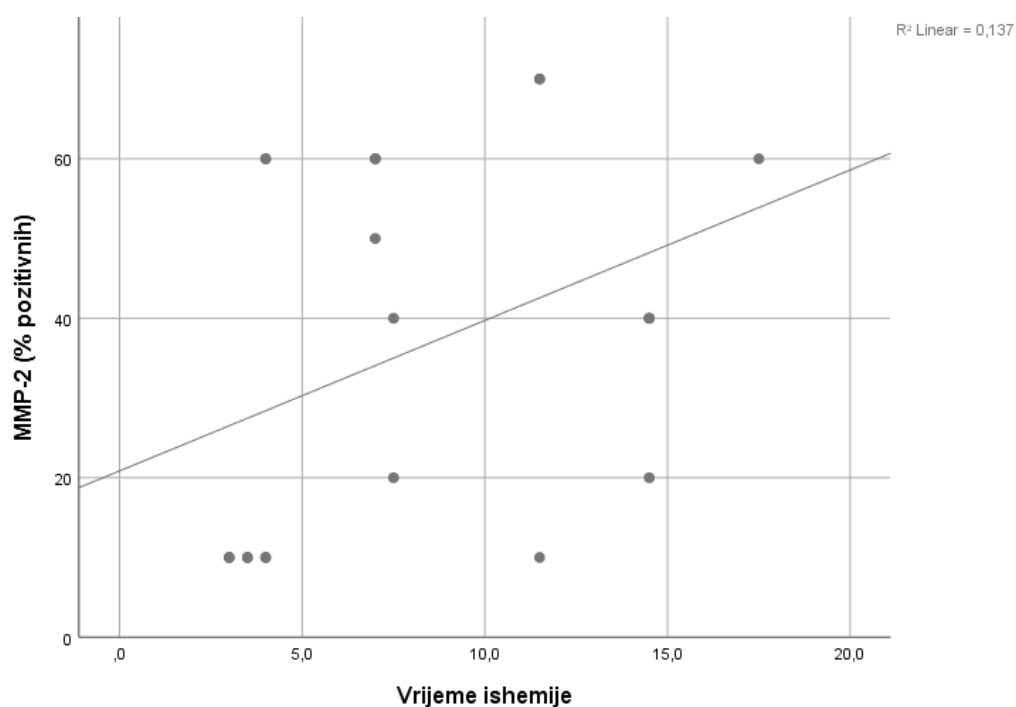
Povezanost između ukupnog vremena ishemije i početnih vrijednosti kulture fibroblasta nije bila statistički značajna ( $\rho=0,192$ ;  $p=0,418$ ). Povezanost između ukupnog vremena ishemije i vrijednosti prokolagena tip I (% pozitivnih stanica) je bila statistički značajna ( $\rho=-0,473$ ;  $p=0,035$ ). Povezanost između ukupnog vremena ishemije i vrijednosti prokolagena tip I (intenzitet signala) nije bila statistički značajna ( $\rho=0,010$ ;  $p=0,968$ ). Povezanost između ukupnog vremena ishemije i vrijednosti MMP-2 (% pozitivnih) je bila statistički značajna ( $\rho=0,474$ ;  $p=0,035$ ). Povezanost između vremena ishemije i vrijednosti MMP-2 (intenzitet signala) nije bila statistički značajna ( $\rho=0,221$ ;  $p=0,350$ ).



Slika 9. Povezanost ukupnog vremena ishemije i uspješnosti rasta fibroblasta u kulturi stanica u početnoj točki mjerenja



Slika 10. Povezanost između ukupnog vremena ishemije i imunohistokemijske izraženosti prokolagena tip I (postotak pozitivnih stanica) u početnoj točki mjerenja



Slika 11. Povezanost između ukupnog vremena ishemije i imunohistokemijske izraženosti MMP-2 (postotak pozitivnih stanica) u početnoj točki mjerenja

### 5.3. Analiza uspješnosti rasta fibroblasta u kulturi stanica

Usporedba vrijednosti kulture fibroblasta kroz vrijeme u skupini zalistaka koji su naknadno čuvani na +4 °C (skupina A) pokazala je da postoji statistički značajna razlika između skupina (Friedmanova ANOVA  $Q=9,962$ ,  $df=2$ ;  $p=0,007$ ). U post-hoc testiranjima statistički značajna razlika pronađena je između početne točke i točke A1 (na 6h), (Dunnov test nakon Bonferronijeve korekcije za multipla testiranja,  $p=0,018$ ). Između točaka 0-A2 (na 24 h) ( $p=0,310$ ) i A1-A2 ( $p=0,795$ ) nije bilo statistički značajne razlike.

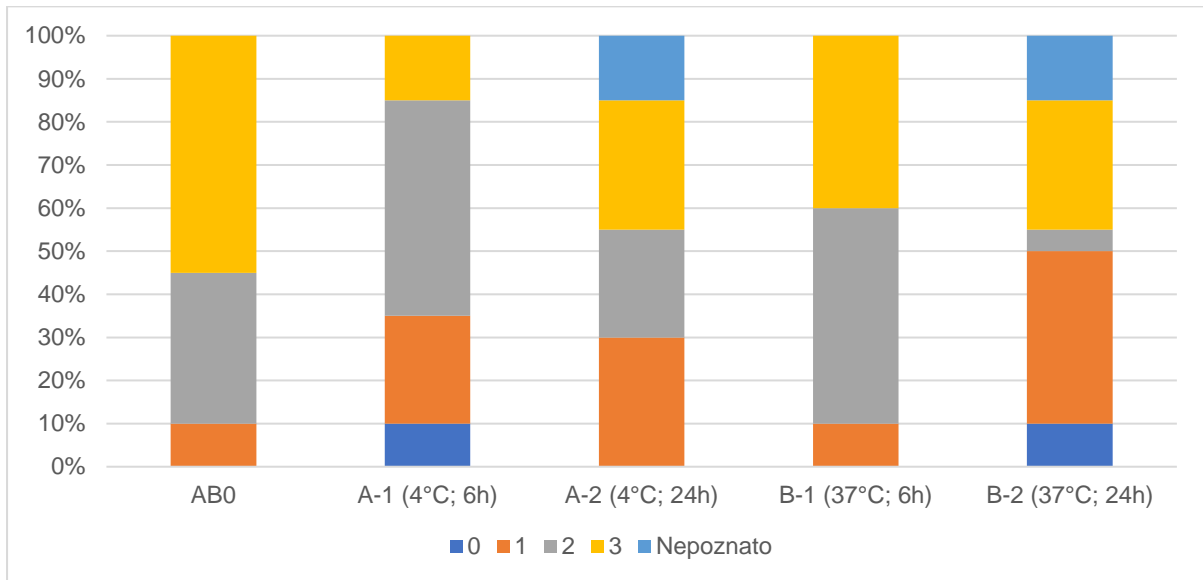
Usporedba vrijednosti kulture fibroblasta kroz vrijeme u skupini zalistaka koji su naknadno čuvani na +37 °C (skupina B) pokazala je da postoji statistički značajna razlika između skupina (Friedmanova ANOVA  $Q=9,882$ ,  $df=2$ ;  $p=0,007$ ). U post-hoc testiranjima statistički značajna razlika pronađena je između početne točke i točke B2 (na 24 h), (Dunnov test nakon Bonferronijeve korekcije za multipla testiranja  $p=0,03$ ). Između točaka 0-B1 (na 6h) ( $p=1,000$ ) i B1-B2 ( $p=0,119$ ) nije bilo statistički značajne razlike.

U prvoj točki mjerenja (nakon 6 h) postojala je statistički značajna razlika između skupine A (zalisci čuvani na +4 °C) i skupine B (zalisci čuvani na +37 °C) (Wilcoxonov signed-rank test  $T=61$ ,  $p=0,008$ ).

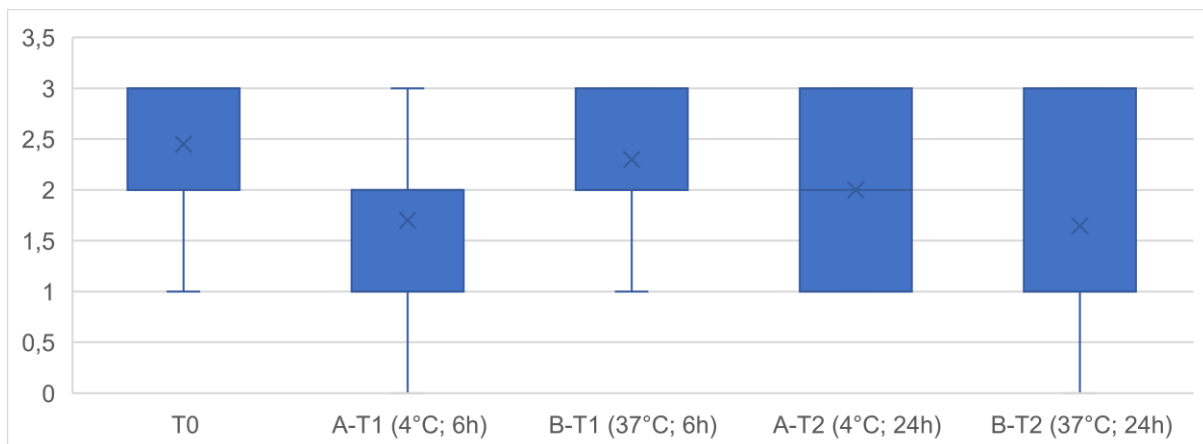
U drugoj točki mjerenja (nakon 24 h) nije postojala statistički značajna razlika između skupine A (zalisci čuvani na +4 °C) i skupine B (zalisci čuvani na +37 °C) (Wilcoxonov signed-rank test  $T=11,5$ ,  $p=0,177$ ).

Frekvencije vrijednosti uspješnosti rasta kultura fibroblasta prikazane su na slici 12.

Medijan i rasponi vrijednosti za kulturu fibroblasta tijekom trajanja istraživanja prikazani su na slici 13.



Slika 12: Frekvencije vrijednosti kulture fibroblasta kroz trajanje istraživanja (N=20)



Slika 13. Vrijednosti kulture fibroblasta kroz trajanje istraživanja

Na slici 14. su prikazani primjeri različitih uspješnosti rasta fibroblasta u kulturi stanica.



1



2



3



Slika 14. Kultura fibroblasta – uspješnost rasta

## 5.4. Analiza imunohistokemijske izraženosti prokolagena tip I

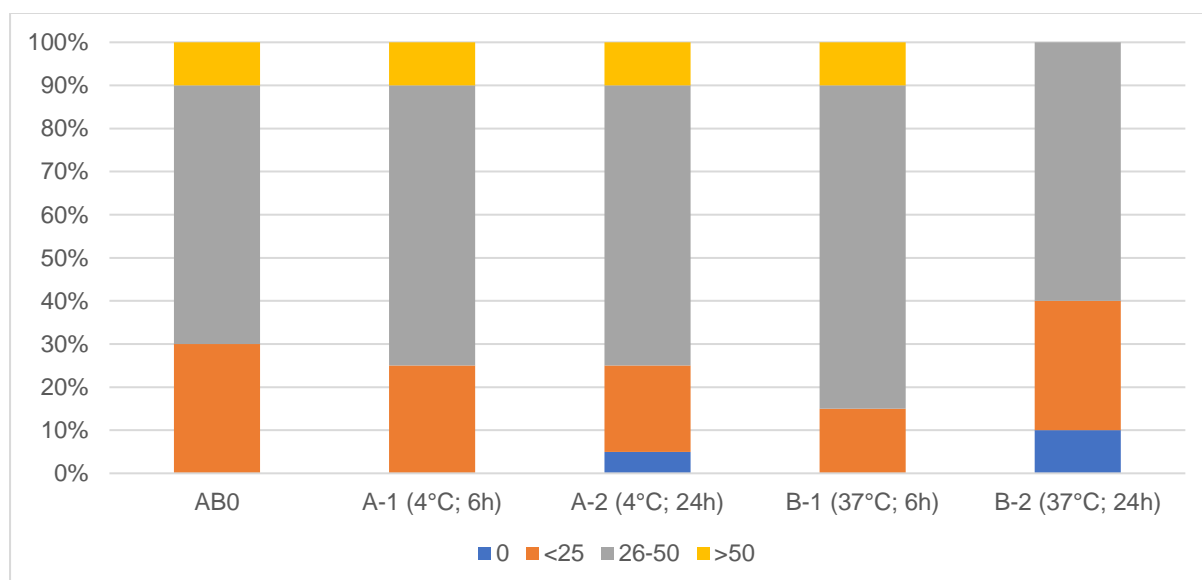
Usporedba vrijednosti prokolagena tip I (postotak pozitivnih stanica) kroz vrijeme u skupini zalistaka koji su naknadno čuvani na +4 °C (skupina A) pokazala je da ne postoji statistički značajna razlika između skupina (Friedmanova ANOVA  $Q=2,984$ ,  $df=2$ ;  $p=0,225$ ).

Usporedba vrijednosti prokolagena kroz vrijeme u skupini zalistaka koji su naknadno čuvani na +37 °C (skupina B) pokazala je da ne postoji statistički značajna razlika između skupina (Friedmanova ANOVA  $Q=4,222$ ,  $df=2$ ;  $p=0,121$ ).

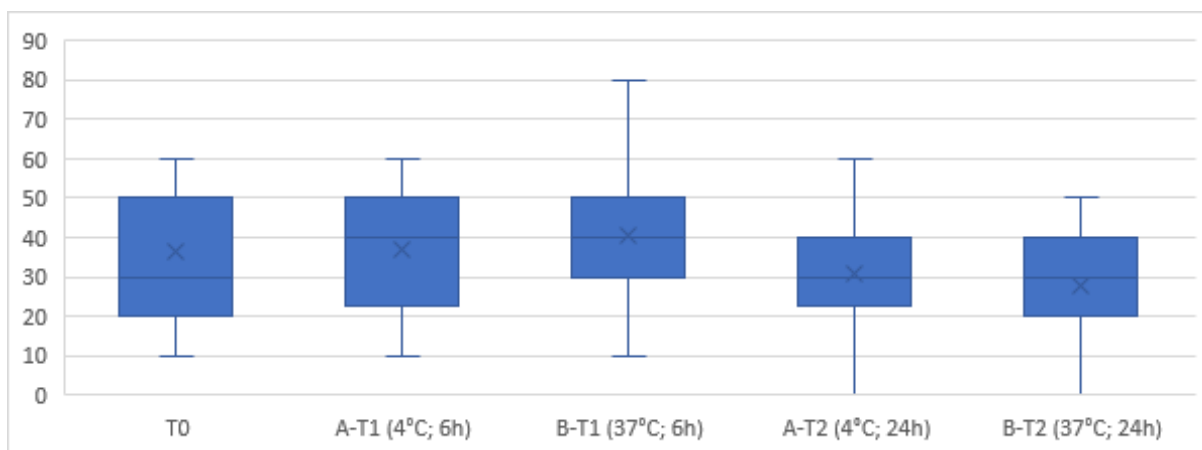
U prvoj točki mjerenja (nakon 6 h) nije postojala statistički značajna razlika između skupine A (zalisci čuvani na +4 °C) i skupine B (zalisci čuvani na +37 °C) (Wilcoxonov signed-rank test  $T=83$ ,  $p=0,427$ ). U drugoj točki mjerenja (nakon 24 h) također nije postojala statistički značajna razlika između skupine A (zalisci čuvani na +4 °C) i skupine B (zalisci čuvani na +37 °C) (Wilcoxonov signed-rank test  $T=42,5$ ,  $p=0,525$ ).

Frekvencije vrijednosti prokolagena tip I (postotak pozitivnih stanica) prikazane su na slici 15.

Medijan i rasponi vrijednosti za vrijednosti prokolagena tip I (postotak pozitivnih stanica) kroz trajanje istraživanja prikazani su na slici 16.



Slika 15: Frekvencije vrijednosti prokolagena tip I (postotak pozitivnih stanica) tijekom trajanja istraživanja (N=20)



Slika 16. Vrijednosti prokolagena tip I (postotak pozitivnih stanica) tijekom trajanja istraživanja

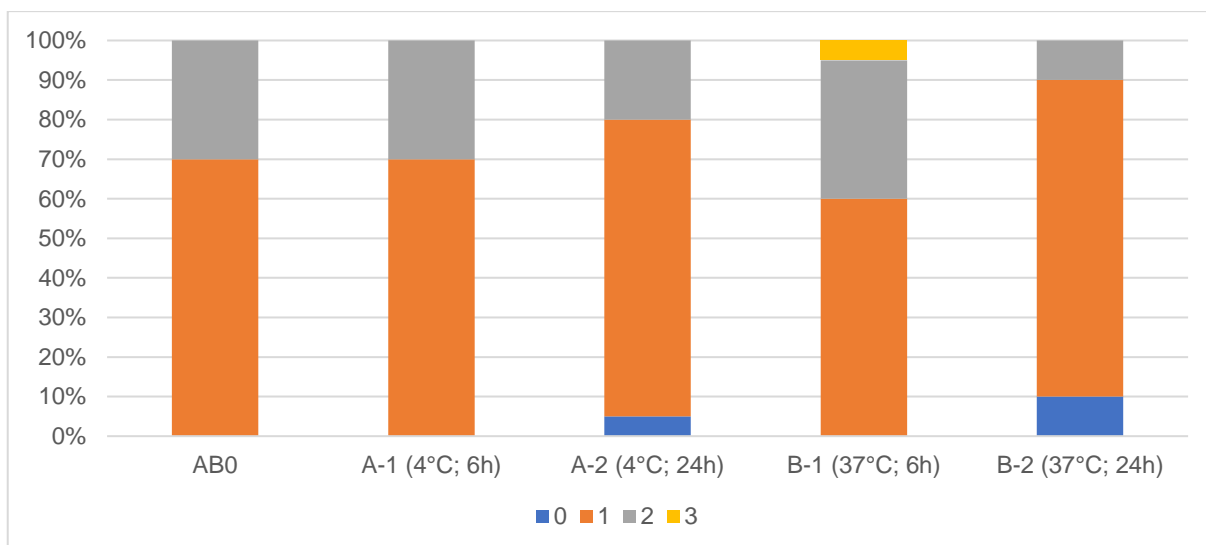
Usporedba vrijednosti intenziteta prokolagena tip I kroz vrijeme u skupini zalistaka koji su naknadno čuvani na +4 °C (skupina A) pokazala je da ne postoji statistički značajna razlika između skupina (Friedmanova ANOVA  $Q=1,385$ ,  $df=2$ ;  $p=0,500$ ).

Usporedba vrijednosti intenziteta prokolagena tip I kroz vrijeme u skupini zalistaka koji su naknadno čuvani na +37 °C (skupina B) pokazala je da postoji statistički značajna razlika između skupina (Friedmanova ANOVA  $Q=6,049$ ,  $df=2$ ;  $p=0,049$ ). U post-hoc testiranjima nije pronađena statistički značajna razlika niti u jednoj usporedbi; između točaka 0-B1 (na 6 h) (Dunnov test nakon Bonferronijeve korekcije za multipla testiranja,  $p=1,000$ ), B1-B2 (na 24 h) (Dunnov test nakon Bonferronijeve korekcije za multipla testiranja,  $p=0,246$ ) i početne točke i točke B2 (Dunnov test nakon Bonferronijeve korekcije za multipla testiranja,  $p=0,805$ ).

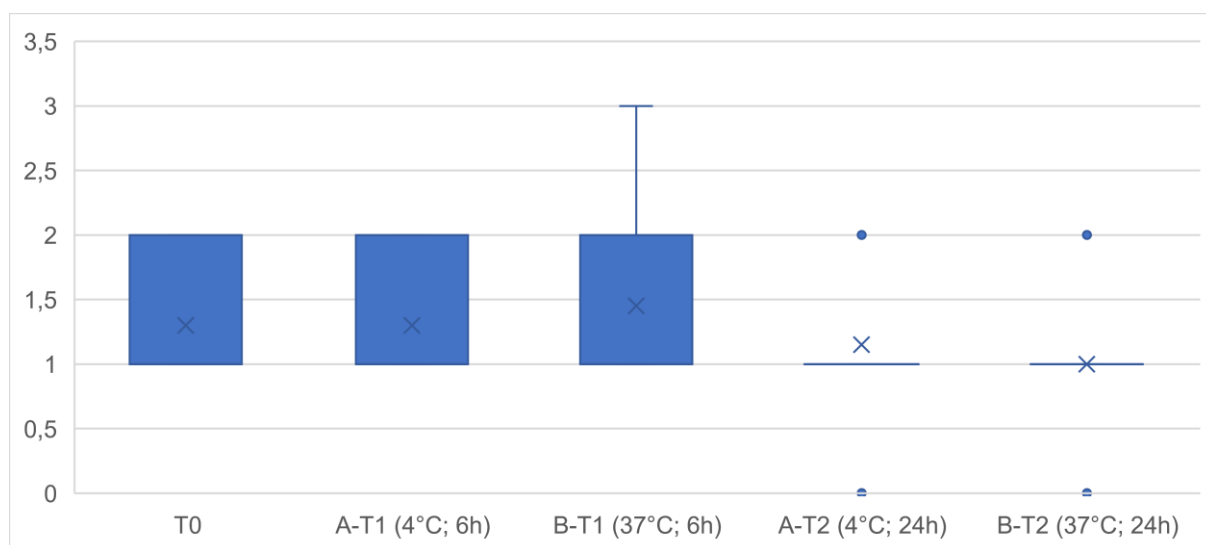
U prvoj točki mjerenja (nakon 6 h) nije postojala statistički značajna razlika između skupine A (zalisci čuvani na 4°C) i skupine B (zalisci čuvani na +37 °C) (Wilcoxonov signed-rank test  $T=24$ ,  $p=0,366$ ). U drugoj točki mjerenja (nakon 24 h) također nije postojala statistički značajna razlika između skupine A (zalisci čuvani na +4 °C) i skupine B (zalisci čuvani na +37 °C) (Wilcoxonov signed-rank test  $T=8$ ,  $p=0,257$ ).

Frekvencije vrijednosti intenziteta prokolagena tip tijekom trajanja istraživanja prikazane su na slici 17.

Medijan i rasponi vrijednosti za vrijednosti intenziteta prokolagena tip I tijekom trajanja istraživanja prikazani su na slici 18.



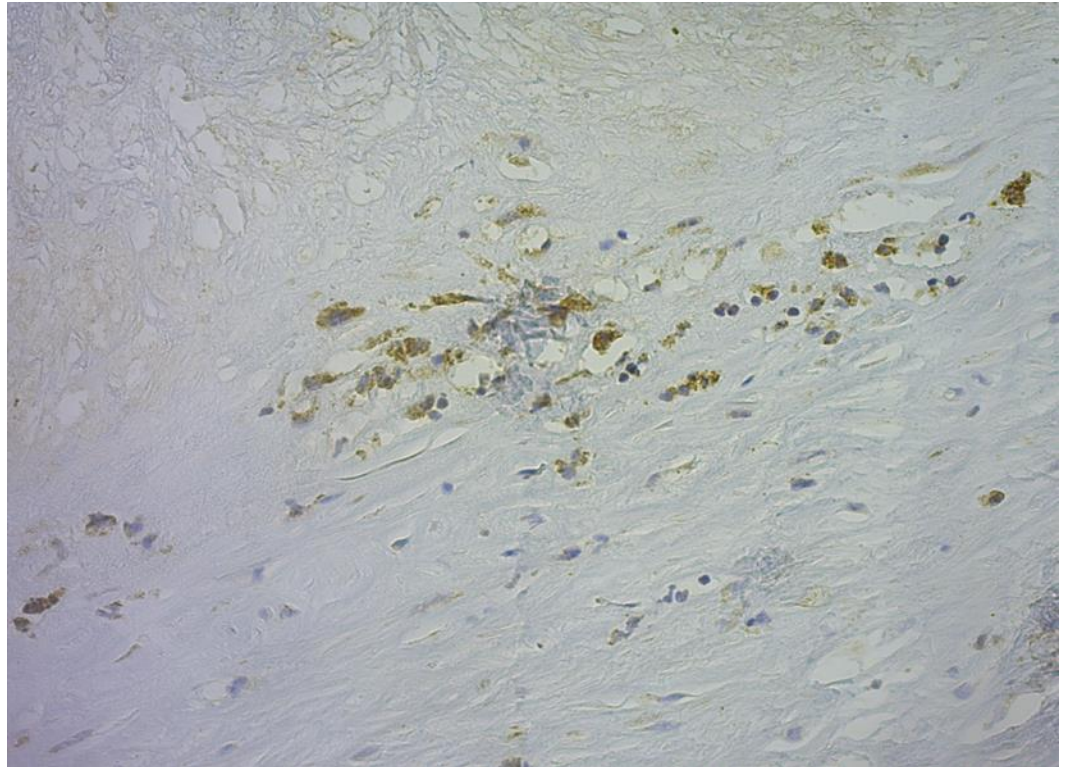
Slika 17: Frekvencije vrijednosti intenziteta prokolagena tip I tijekom trajanja istraživanja (N=20)



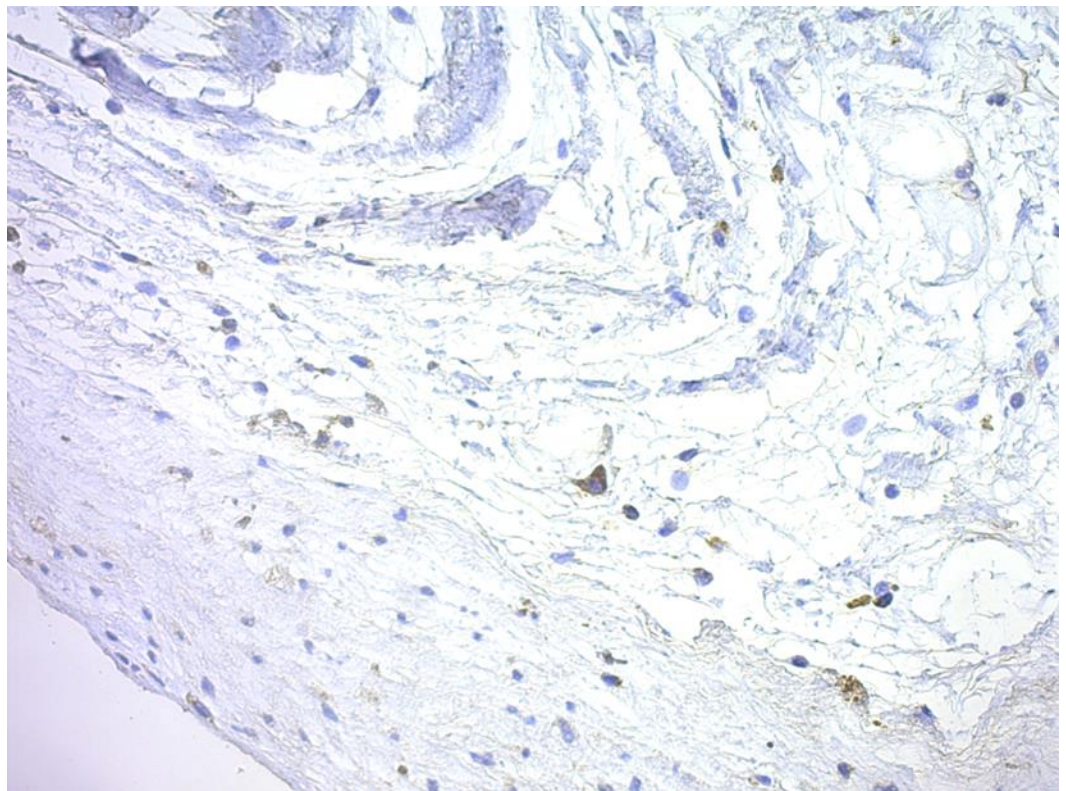
Slika 18. Vrijednosti intenziteta prokolagena tip I tijekom trajanja istraživanja

Na slici 19. su prikazani primjeri imunohistokemijskih preparata u kojima je prikazana imunohistokemijska izraženost prokolagena tip I. Na slici a) je prikazana imunoreakcija jakog intenziteta prisutna u više od 50 % stanica. Na slici b) je prikazana imunoreakcija slabog intenziteta prisutna u 20 % stanica.

a)



b)



Slika 19. Primjeri imunohistokemijskih preparata u kojima je prikazana izraženost prokolagena tip I.

## 5.5. Analiza imunohistokemijske izraženosti MMP-2

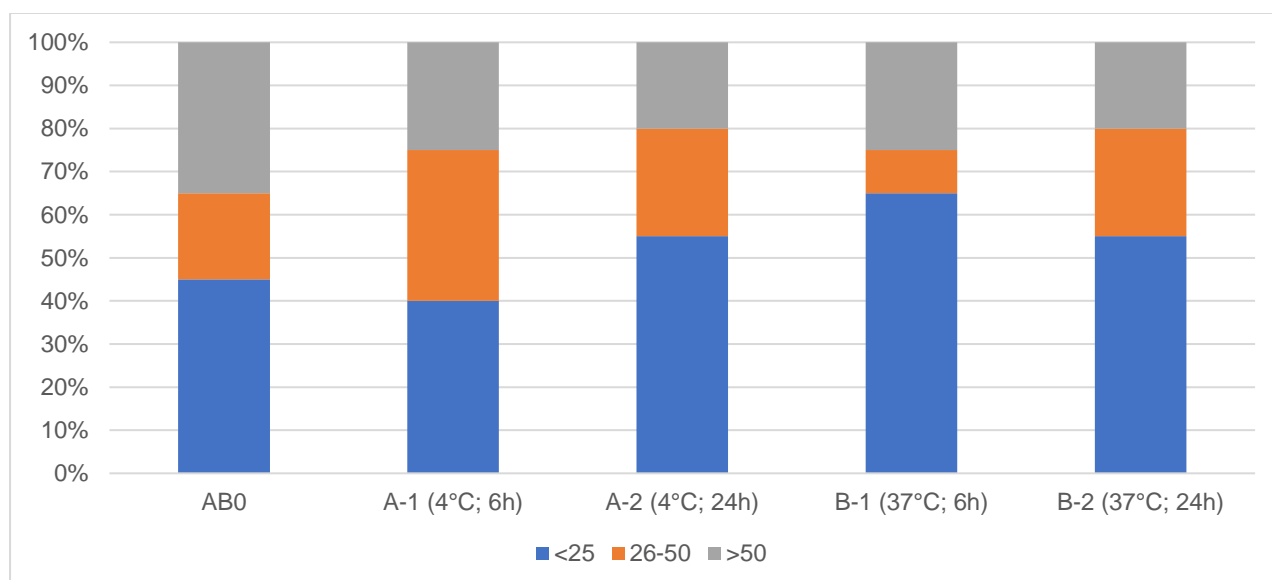
Usporedba vrijednosti MMP-2 (postotak pozitivnih stanica) kroz vrijeme u skupini zalistaka koji su naknadno čuvani na +4 °C (skupina A) pokazala je da ne postoji statistički značajna razlika između skupina (Friedmanova ANOVA  $Q=1,200$ ,  $df=2$ ;  $p=0,549$ ).

Usporedba vrijednosti MMP-2 (postotak pozitivnih stanica) kroz vrijeme u skupini zalistaka koji su naknadno čuvani na +37 °C (skupina B) pokazala je da ne postoji statistički značajna razlika između skupina (Friedmanova ANOVA  $Q=3,263$ ,  $df=2$ ;  $p=0,196$ ).

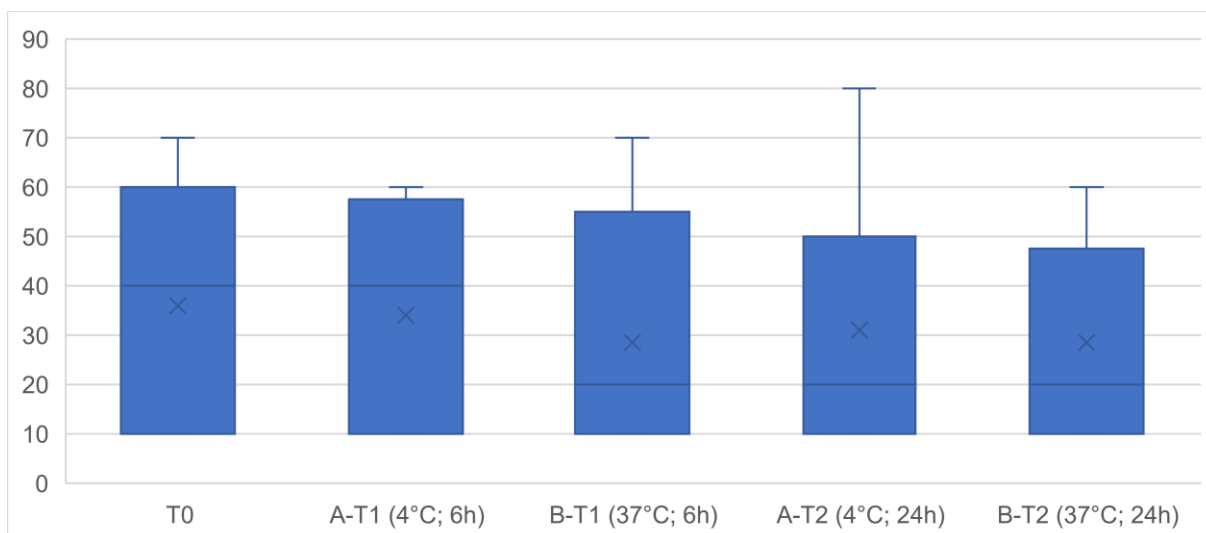
U prvoj točki mjerenja (nakon 6 h) nije postojala statistički značajna razlika između skupine A (zalisci čuvani na +4 °C) i skupine B (zalisci čuvani na +37 °C) (Wilcoxonov signed-rank test  $T=36$ ,  $p=0,298$ ). U drugoj točki mjerenja (nakon 24 h) također nije postojala statistički značajna razlika između skupine A (zalisci čuvani na +4 °C) i skupine B (zalisci čuvani na +37 °C) (Wilcoxonov signed-rank test  $T=55,5$ ,  $p=0,797$ ).

Frekvencije vrijednosti MMP-2 (postotak pozitivnih stanica) tijekom trajanja istraživanja su prikazane na slici 20.

Medijan i rasponi vrijednosti za MMP-2 (postotak pozitivnih stanica) tijekom trajanja istraživanja prikazani su na slici 21.



Slika 20: Frekvencije vrijednosti MMP-2 (postotak pozitivnih stanica) tijekom trajanja istraživanja (N=20)



Slika 21. Vrijednosti MMP-2 (postotak pozitivnih stanica) tijekom trajanja istraživanja

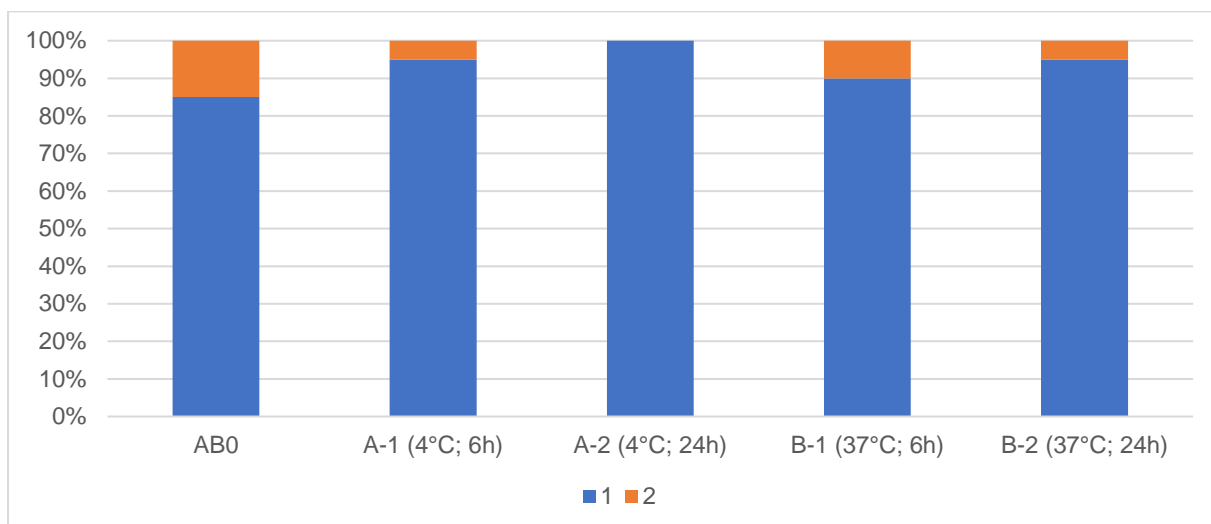
Usporedba vrijednosti intenziteta matriks-metaloproteinaze 2 (MMP-2) kroz vrijeme u skupini zalistaka koji su naknadno čuvani na +4 °C (skupina A) pokazala je da ne postoji statistički značajna razlika između skupina (Friedmanova ANOVA  $Q=3,500$ ,  $df=2$ ;  $p=0,174$ ).

Usporedba vrijednosti intenziteta MMP-2 kroz vrijeme u skupini zalistaka koji su naknadno čuvani na +37 °C (skupina B) pokazala je da ne postoji statistički značajna razlika između skupina (Friedmanova ANOVA  $Q=1,200$ ,  $df=2$ ;  $p=0,549$ ).

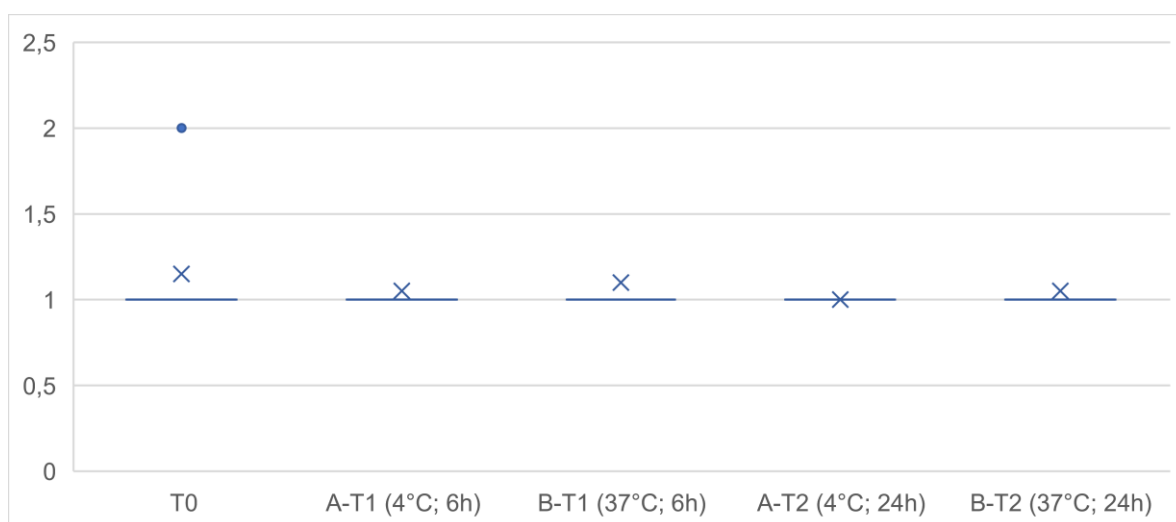
U prvoj točki mjerenja (nakon 6 h) nije postojala statistički značajna razlika između skupine A (zalisci čuvani na +4 °C) i skupine B (zalisci čuvani na +37 °C) (Wilcoxonov signed-rank test  $T=4$ ,  $p=0,564$ ). U drugoj točki mjerenja (nakon 24 h) također nije postojala statistički značajna razlika između skupine A (zalisci čuvani na +4 °C) i skupine B (zalisci čuvani na +37 °C) (Wilcoxonov signed-rank test  $T=1$ ,  $p=0,317$ ).

Frekvencije vrijednosti intenziteta MMP-2 tijekom trajanja istraživanja su prikazane na slici 22.

Medijan i rasponi vrijednosti za vrijednosti intenziteta MMP-2 kroz trajanje istraživanja prikazani su na slici 23.



Slika 22: Frekvencije vrijednosti intenziteta MMP-2 tijekom trajanja istraživanja (N=20)

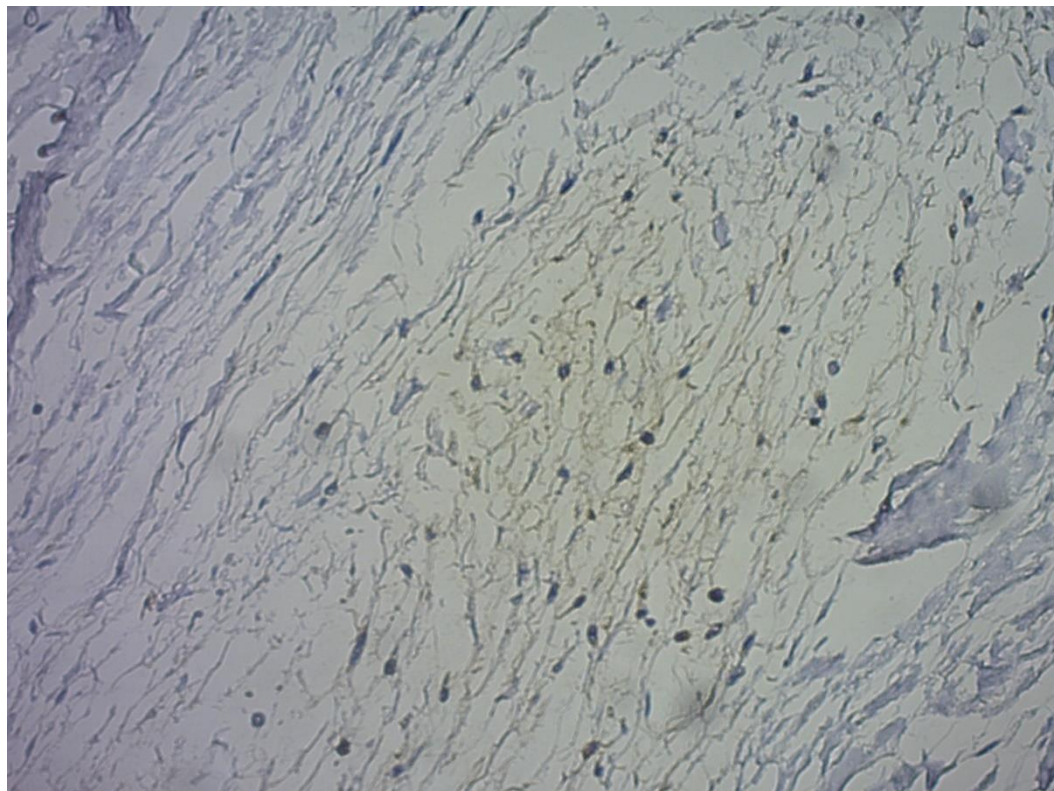


Slika 23. Vrijednosti intenziteta MMP-2 tijekom trajanja istraživanja

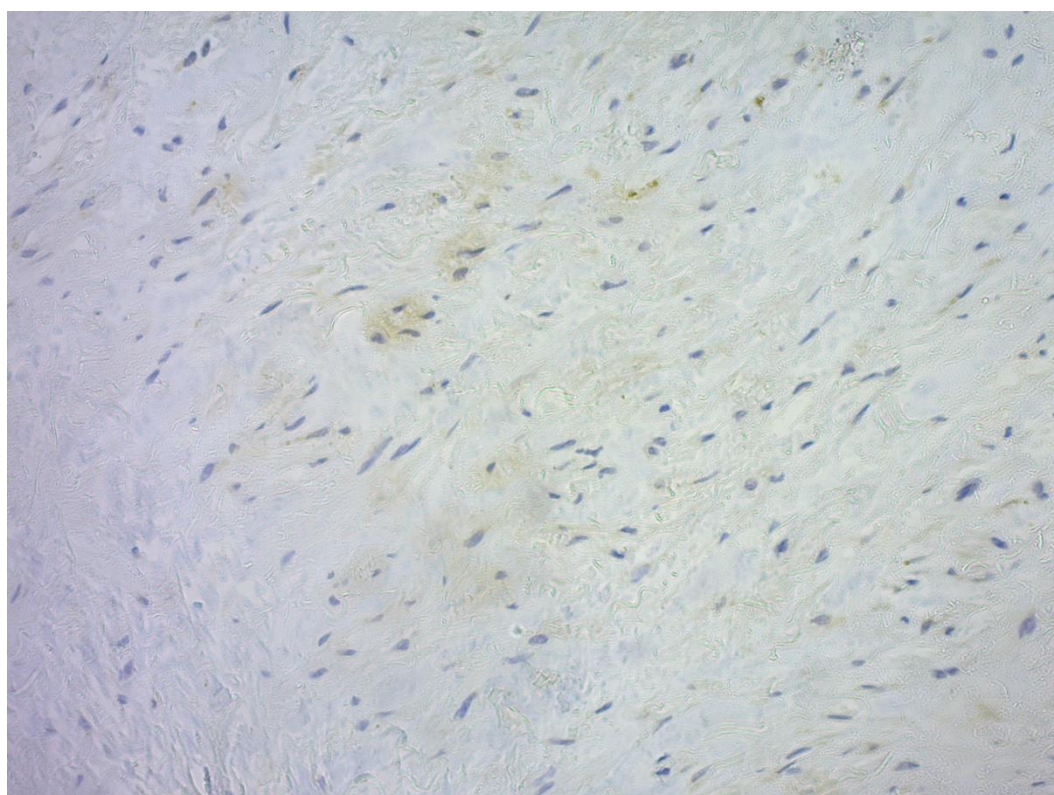
Na slici 24. su prikazani primjeri imunohistokemijskih preparata u kojima je prikazana izraženost MMP-2. Na slikama a) i b) je prikazana imunohistokemijska reakcija slabog intenziteta koja je prisutna u više od 50 % promatranih stanica.



a)



b)



Slika 24. Primjeri imunohistokemijskih preparata u kojima je prikazana izraženost MMP-2

## 5.6. Analiza mikrobioloških uzoraka

Rezultati mikrobioloških testiranja dostupni su za 18 (90 %) alogenih presadaka srčanih zalistaka. Za dva presatka, zbog tehničkih razloga, rezultati testiranja nisu dostupni.

U testiranim uzorcima 2 alogena presatka (1 aortalni i 1 pulmonalni) su imali pozitivan rezultat u prvom uzorku uzetom neposredno prije uranjanja tkiva u antibiotsku otopinu. Izolirana bakterija je bila *Methylobacterium radiotolerans*. Početna stopa kontaminacije iznosi 11,1 %.

Svi uzorci uzeti nakon postupka mikrobiološke dekontaminacije na +4 °C i +37 °C su bili sterilni.

## 6. Rasprava

Alogeni presaci srčanih zalistaka su srčani zalisci ljudskog podrijetla koji se koriste za liječenje prirodnih i stečenih bolesti srca. Unatoč značajnom napretku u tehnologiji izrade komercijalno dostupnih proteza, alogeni presaci su i dalje značajna opcija za liječenje bolesnika s infekcijom nativnih i umjetnih zalistaka sa značajnim perivalvularnim komplikacijama te također predstavljaju neprocjenjivu opciju za liječenje bolesnika s prirodnim greškama srca. Glavni nedostaci njihove primjene su ograničena dostupnost i sklonost strukturalnom propadanju. Različite strategije su razvijene kako bi se nadvladali postojeći nedostaci. S obzirom na to da je broj srca koja pristižu u banke kardiovaskularnog tkiva relativno konstantan, povećanje učinkovitosti postupaka obrade tkiva predstavlja atraktivnu opciju za poboljšanje dostupnosti alogenih presadaka (70). Naime, u većini banaka kardiovaskularnog tkiva pozitivni rezultati učinjenih mikrobioloških pretraga jedan su od najčešćih razloga zašto određena prikupljena tkiva ne mogu biti korištena za kliničku primjenu (55, 60, 70). Postoje istraživanja čiji rezultati ukazuju da bi se povišenjem temperature mikrobiološke dekontaminacije mogla postići značajno veća stopa dekontaminacije prikupljenih presadaka te bi se na taj način moglo doprinijeti njihovoj dostupnosti i sigurnosti nakon njihove primjene (62, 63).

U slučaju povišenja temperature postupka dekontaminacije zabrinjavajući je potencijalni negativni učinak produženog vremena tople ishemije na kvalitetu alogenih presadaka. Upravo iz tog razloga provedeno je ovo istraživanje čiji je osnovni cilj bio procjena potencijalnih funkcionalnih promjena u tkivu alogenih presadaka srčanih zalistaka koje bi mogle imati negativni utjecaj na strukturalni i funkcionalni integritet presatka, a koje bi mogle nastati kao posljedica povišenja temperature mikrobiološke dekontaminacije s +4 °C na +37 °C.

Jedan od promatranih parametara je bila i vijabilnost stanica. Vijabilnost stanica podrazumijeva kapacitet valvularnih intersticijskih stanica da svojom funkcijom održe strukturalni i funkcionalni integritet strukture srčanog zalistka (71, 72). Iako je znanstvena zajednica podijeljena po pitanju utjecaja vijabilnosti na funkcionalnu dugotrajnost alogenih presadaka srčanih zalistaka, ipak se njena očuvanost smatra pokazateljem uspješnosti metoda obrade tkiva u očuvanju originalnih tkivnih karakteristika. Postoji niz metoda koje se mogu koristiti za procjenu tkivne vijabilnosti (metode koje mjere metaboličku aktivnost

stanica, metode za procjenu proliferacije stanica, isključivanja bojom, protočna citometrija, morfološka analiza, visokorazdjelna tekućinska kromatografija, kultura stanica) (72). Metoda koja je korištena u ovom istraživanju je metoda kulture fibroblasta. Glavni nedostaci kulture fibroblasta kao metode za procjenu tkivne vijabilnosti su semikvantitativni način procjene rezultata i izostanak informacije o samoj metaboličkoj aktivnosti stanica. Također, vijabilne intersticijske stanice ne moraju nužno imati sposobnost proliferacije.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da se povišenjem temperature mikrobiološke dekontaminacije na +37 °C ne ostvaruje negativan utjecaj na tkivnu vijabilnost koja je procijenjena metodom kulture fibroblasta. U početnoj točki mjerenja zabilježen je dobar rast fibroblasta u kulturama stanica u 90 % uzoraka. Dobar rast je očekivan s obzirom na to da su uzorci prikupljeni od primatelja s kucajućim srcem. S obzirom na to da je riječ o primateljima transplantata srca utjecaj potencijalnog vremena tople ishemije je zanemariv, jer je srce primatelja neposredno nakon klemanja aorte stavljeno u hladnu transportnu otopinu, što obično nije slučaj prilikom eksplantacije srca u drugih vrsta donora. Kulture fibroblasta koje su nastale od uzoraka tkiva koji su inkubirani na +37 °C su pokazale bolji rast fibroblasta. U kulturama fibroblasta od uzoraka tkiva koji su uzeti nakon 6 sati inkubacije na +37 °C zabilježen je značajno veći rast nego u istoj točki mjerenja na +4 °C. Moguće objašnjenje je pozitivan utjecaj povišenja temperature na intenzitet proliferacije i metaboličke aktivnosti fibroblasta. Nakon 24 sata nije zabilježena razlika u intenzitetu rasta u kulturama fibroblasta od uzoraka inkubiranih na različitim temperaturama.

Ovi rezultati istraživanja su u skladu s rezultatima ranijih istraživanja. Baric i suradnici su u istraživanju, koje je imalo svrhu optimizacije uvjeta čuvanja alogenih presadaka srčanih zalistaka, proučavali utjecaj temperature čuvanja tkiva na +4 °C i +37 °C. Mjerenja su provedena 1., 3., 7., 10. i 14. dana. Mjeren je broj stanica u kulturi stanica, te metabolička aktivnost stanica u uzorcima tkiva. Uzorci tkiva inkubirani na +37 °C su pokazali značajno veći broj stanica u kulturi stanica. Rezultati ovoga istraživanja su pokazali značajno veću metaboličku aktivnost tkiva inkubiranih na +37 °C u svim točkama mjerenja osim u mjerenjima koja su učinjena nakon isteka 1. dana inkubacije (71). U toj točki mjerenja, kao i u našem istraživanju, nije bila prisutna značajna razlika u rezultatima učinjenih mjerenja. Također, Gall i suradnici su proučavali utjecaj različitih varijabli postupaka obrade tkiva i njihovog utjecaja na tkivnu vijabilnost. Jedna od stavki koju su proučavali je i utjecaj inkubacije tkiva u antibiotskoj otopini na +37 °C tijekom 6 i 24 sata.

Iako je nakon 6 sati postotak vijabilnih stanica bio veći nego nakon 24 sata, u oba slučaja nije zapažen značajniji pad postotka vijabilnih stanica tijekom period promatranja u odnosu na početnu vrijednost. Nakon krioprezervacije značajno veći pad u postotku metabolički aktivnih stanica je bio u skupini presadaka koji su bili inkubirani tijekom 24 sata. Važno je za napomenuti da uzorci tkiva nisu bili inkubirani u antibiotskim otopinama istog sastava, jer su tkiva koja su bila inkubirana tijekom 24 sata bila inkubirana u antibiotskoj otopini koja je sadržavala amfotericin B, za koji je utvrđen negativni utjecaj na tkivnu vijabilnost (61). U navedenim istraživanjima korištene su kvantitativne metode procjene tkivne vijabilnosti.

Kvaliteta, kvantiteta i arhitektura komponenti izvanstaničnog matriksa su čimbenici koji određuju funkcionalnu trajnost srčanih zalistaka. Zdravi srčani zalisci, preko kompleksnih interakcija stanica i izvanstaničnog matriksa, imaju mogućnost remodeliranja izvanstaničnog matriksa pomoću kojeg se mogu prilagoditi promijenjenim lokalnim uvjetima ili popraviti nastalu ozljedu. Jedna od osnovnih funkcija valvularnih intersticijskih stanica je sinteza komponenti izvanstaničnog matriksa. Kolagen je najzastupljeniji i predstavlja i do 60 % ukupne suhe težine zalistka, a od svih vrsta kolagen tip I je najzastupljeniji (1). Kolagen tip I se sintetizira u citoplazmi aktiviranih i funkcionalnih valvularnih intersticijskih stanica kao prokolagen tip I. Imunohistokemijski dokaz postojanja prokolagena tip I u uzorcima tkiva smatra se dobrim pokazateljem biosintetskog kapaciteta fibroblasta (66).

Imunohistokemijska analiza izraženosti prokolagena tip I korištena je u nizu istraživanja koja su proučavala karakteristike alogenih presadaka. Quintana i suradnici su istraživali potencijalni negativan utjecaj promjena temperature na svojstva alogenih presadaka tijekom razdoblja krioprezervacije. Rezultati provedenog istraživanja su ukazali na odsutnost prokolagena tip I u alogenim presacima koji su bili izloženi promjeni temperature tijekom razdoblja pohrane u plinovitoj fazi tekućeg dušika (66). Kneebone i suradnici su proveli istraživanje u kojem su na životinjskom modelu proučavali sintezu strukturalnih proteina u alogenim presacima pulmonalnih zalistaka koji su ugrađeni u heterotopnoj poziciji. Također, nastojali su utvrditi učinke krioprezervacije i imunoloških razlika između donora i primatelja na sintezu prokolagena tip I (73). Sarikouch i suradnici su proučavajući decelularizirane alogene presatke koristili ovu metodu za dokazivanje potencijalnog regenerativnog kapaciteta u stanicama koje su činile repopulaciju decelulariziranih alogenih presadaka (74).

Prema našem najboljem saznanju ovo je prvo istraživanje u kojem je korištena metoda procjene imunohistokemijske izraženosti prokolagena tip I za utvrđivanje potencijalnog negativnog utjecaja različitih protokola mikrobiološke dekontaminacije. Koristili smo ju kako bismo dobili informaciju o metaboličkoj aktivnosti stanica koje su bile prisutne u proučavanim alogenim presacima, te da bi utvrdili potencijalni negativan učinak produženog vremena tople ishemije na funkciju fibroblasta. U početnoj točki mjerenja zapažena je niža razina izražajnosti prokolagena tip I u uzorcima presadaka koji su imali duže ukupno vrijeme ishemije. Rezultati našeg istraživanja ukazuju da je u promatranim uzorcima tkiva inkubiranih u antibiotskoj otopini na temperaturi +4 °C i +37 °C prisutna sinteza prokolagena tip I. U većini uzoraka pozitivna imunoreakcija je zapažena u do 50 % stanica. Također, u većini uzoraka intenzitet imunoreakcije je bio blag što ukazuje na nisku koncentraciju antigena u promatranim uzorcima. Ovom metodom analize u svim promatranim točkama nije zapažen značajan negativan učinak povišenja temperature na +37 °C. Postojanje prokolagena tip I u obje skupine uzoraka ukazuje na očuvani potencijal reparacije tkiva u analiziranim uzorcima koji nije značajno narušen u slučaju povišenja temperature samog postupka mikrobiološke dekontaminacije.

Tijekom postupaka obrade i pohranjivanja u alogenim presacima dolazi do određenih strukturalnih promjena. Opisane promjene uključuju gubitak normalne arhitekture srčanog zalistka koji se očituje u prekidima vlakana kolagena i elastičnih vlakana te također i gubitku stanica (75). Osim što ovakve promjene mogu doprinijeti poremećenim fizikalnim svojstvima srčanih zalistaka, one mogu uzrokovati i osnovu za pojačani imunološki odgovor na alogeni presadak. Ove promjene doprinose kraćoj trajnosti alogenih presadaka nakon njihove kliničke primjene. Razumno je pretpostaviti da neke od ovih promjena nastaju kao posljedica funkcionalnih promjena u tkivu alogenog presatka.

Naime, valvularne intersticijske stanice osim proizvodnje vezivnog tkiva od kojega je izgrađen izvanstanični matriks proizvode i metaloproteinaze matriksa (MMP) (65). MMP su heterogena skupina enzima koja ima sposobnost razgradnje sastavnica izvanstaničnog matriksa. Povišene razine MMP su uočene u nizu fizioloških i patoloških procesa. Određeni stupanj izraženosti određenih MMP je zapažen i u srčanim zaliscima, te je također dokazana njihova uloga u nastanku degenerativnih bolesti srčanih zalistaka. Visoka aktivnost MMP dokazana je u nizu istraživanja koja su proučavala različita tkiva izložena određenom periodu ishemije. U skladu s tim jedan od ciljeva provedenog istraživanja je

bio utvrditi dolazi li u alogenim presacima srčanih zalistaka, tijekom produženog vremena tople ishemije zbog povišenja temperature mikrobiološke dekontaminacije, do pojačane izraženosti MMP koja bi mogla dovesti do pojačane proteolitičke aktivnosti. Pojačana proteolitička aktivnost bi uzrokovala razaranje strukture izvanstaničnog matriksa, a upravo očuvanost strukture pojedini autori smatraju glavnom odrednicom trajnosti alogenih presadaka (64). MMP koja je određivana u ovom istraživanju je MMP-2. Određeni stupanj aktivnosti MMP-2 koji je ukazivao na potencijalnu pojačanu kolagenolitičku aktivnost je zapažen i u alogenim presacima srčanih zalistaka neposredno nakon krioprezervacije i odmrzavanja (19).

U prezentiranom istraživanju prisutnost MMP-2 zabilježena je u svim analiziranim uzorcima. U većini uzoraka u početnoj točki mjerenja zabilježena je prisutnost MMP-2 u manje od 25 % stanica. Također, rezultati našeg istraživanja ukazuju da uzorci tkiva koji su imali duže ukupno vrijeme ishemije u početnoj točki mjerenja imaju jaču izraženost MMP-2. Tijekom perioda promatranja nije došlo do značajnog porasta ekspresije MMP-2 u svim točkama mjerenja. U većini uzoraka intenzitet imunoreakcije je bio blag što govori u prilog niskoj koncentraciji antigena u promatranim uzorcima. Rezultati našeg istraživanja ukazuju da u slučaju povišenja temperature mikrobiološke dekontaminacije na +37 °C ne bi došlo do pojačane proteolitičke aktivnosti uzrokovane s MMP-2 i posljedične pojačane degradacije komponenti izvanstaničnog matriksa.

Mikrobiološki uzorci su uzimani s ciljem kontroliranja sterilnosti cijeloga postupka. Niska stopa kontaminacije je u skladu s vrstom donora kao i uvjetima prikupljanja i obrade (56).

Skupni rezultati provedenog istraživanja potvrđuju našu hipotezu prema kojoj je moguće povišiti temperaturu postupka mikrobiološke dekontaminacije bez značajnijeg utjecaja na proučavane karakteristike alogenih presadaka srčanih zalistaka. Povišenjem temperature mikrobiološke dekontaminacije na +37 °C nije ostvaren negativni utjecaj na biosintetski kapacitet valvularnih intersticijskih stanica koji je procijenjen određivanjem prokolagena tip I. Također, u promatranim uzorcima nije uočena pojačana ekspresija MMP-2 kao pokazatelja pojačane proteolitičke aktivnosti. Osim što nije uočen negativni utjecaj povišenja temperature, rezultati također ukazuju da se, produženjem perioda

dekontaminacije na 24 sata, ne bi ostvario negativan utjecaj na promatrana svojstva alogenih presađaka.

Međutim, tijekom razmatranja rezultata potrebno je istaknuti nekoliko ograničenja studije i mogućih poboljšanja za buduća istraživanja.

Uzorci korišteni u ovome istraživanju prikupljeni su od primatelja transplantata srca gdje je učinak vremena tople ishemije zanemariv jer su srca neposredno nakon klemanja aorte bila eksplantirana i neposredno zatim uronjena u hladnu transportnu otopinu i odnesena u banku kardiovaskularnog tkiva. Značajno veći očekivani učinak vremena tople ishemije je moguće očekivati u multiorganskih donora i donora s nekucajućim srcem. Nažalost, tijekom perioda u kojem je izrađivana studija značajno je smanjen priljev presađaka iz ovih izvora u Banku kardiovaskularnog tkiva KBC Zagreb te ih nismo bili u mogućnosti koristiti kao izvor uzoraka.

Nadalje, korištena je semikvantitavna analiza rezultata zbog čega su rezultati podložni subjektivnoj procjeni promatrača. Postoji mogućnost da bi kvantitativne metode biokemijske analize uzoraka ili metode detekcije genske ekspresije mogle ukazati na suptilnije razlike među skupinama.

Nije provedena histološka analiza uzoraka s ciljem utvrđivanja područja s pojačanom degradacijom kolagena te njihova korelacija s područjima pojačane ekspresije MMP-2. Također, nije analizirana izraženost TIMP koji je bitna odrednica aktivnosti MMP-2.

Dodatna biomehanička ispitivanja bi mogla dati dodatne vrijedne informacije o potencijalnom negativnom učinku produženog vremena tople ishemije na kvalitetu tkiva alogenih presađaka. Negativni učinci prikazani Youngovim modelom elastičnosti, te dodatni negativni učinci pri utjecaju sila rastezanja na tkiva bi predstavljali značajnu informaciju za kirurge.

Također, tkiva nisu krioprezervirana, te izostaje informacija o promatranim varijablama nakon krioprezervacije i određenog perioda pohrane tkiva.



## 7. Zaključak

Na temelju provedenog istraživanja možemo donijeti sljedeće zaključke:

1. Alogeni presaci srčanih zalistaka koji imaju duže ukupno vrijeme ishemije pokazuju veću izraženost MMP-2 prije početka postupka mikrobiološke dekontaminacije.
2. Alogeni presaci srčanih zalistaka koji imaju duže ukupno vrijeme ishemije pokazuju niži biosintetski kapacitet procijenjen imunohistokemijskom metodom detekcije prokolagena tip I prije početka postupka mikrobiološke dekontaminacije.
3. Tijekom postupka mikrobiološke dekontaminacije na +4 °C tijekom 24 sata ne dolazi do daljnjeg pojačanja izraženosti MMP-2.
4. Tijekom postupka mikrobiološke dekontaminacije na +4 °C ne ostvaruje se negativan utjecaj na biosintetski kapacitet valvularnih intersticijskih stanica.
5. Tijekom postupka mikrobiološke dekontaminacije na +37 °C tijekom 24 sata ne dolazi do daljnjeg pojačanja izraženosti MMP-2 u alogenim presacima srčanih zalistaka.
6. Tijekom postupka mikrobiološke dekontaminacije na +37 °C ne ostvaruje se negativan utjecaj na biosintetski kapacitet valvularnih intersticijskih stanica.
7. Rezultati našeg istraživanja ukazuju da je moguće povisiti temperaturu mikrobiološke dekontaminacije s +4 °C na +37 °C bez značajnijeg utjecaja na biosintetski kapacitet valvularnih intersticijskih stanica određen detekcijom prokolagena tip I. Također, u slučaju povišenja temperature postupka ne bi došlo do pojačane izražajnosti MMP-2 u alogenim presacima srčanih zalistaka.

## 8. Sažetak

### UVOD

Mikrobiološka dekontaminacija je dio uobičajene obrade alogenih presađaka srčanih zalistaka. Istraživanja su pokazala da se povišenjem temperature mikrobiološke dekontaminacije može povećati učinkovitost postupka. Ovo istraživanje je provedeno s ciljem utvrđivanja mogućih funkcionalnih promjena u tkivu koje nastaju kao posljedica produženog vremena tople ishemije, a koje bi mogle negativno utjecati na strukturu izvanstaničnog matriksa srčanih zalistaka.

### METODE

Srčani zalisci koji su uključeni u ovo istraživanje prema morfološkim i funkcionalnim kriterijima nisu bili prikladni za pohranu u banci kardiovaskularnog tkiva. Nakon kirurške preparacije dijelovi srčanih zalistaka su uronjeni u antibiotsku otopinu koja je sadržavala vakomicin, linkomicin i polimiksin B sulfat. Jedna skupina uzoraka je inkubirana na +37 °C, a druga na +4 °C. Uzorci tkiva su inkubirani tijekom 24 sata. Neposredno prije uranjanja tkiva u antibiotsku otopinu te nakon 6 sati i 24 sata uzeti su uzorci za kulturu fibroblasta, imunohistokemijsku analizu izraženosti MMP-2 i prokolagena tip I. Na početku i kraju pokusa su uzeti uzorci za mikrobiološku analizu.

### REZULTATI

Ukupno je analizirano 20 zalistaka koji su imali prosječno ukupno vrijeme ishemije od 8,4 sata. Prosječne početne vrijednosti kulture fibroblasta bile su  $2,45 \pm 0,69$ , prokolagena tipa I (%)  $36,5 \pm 15,65$ , a MMP-2 (%)  $36 \pm 2,71$ . Postojala je statistički značajna pozitivna povezanost između vremena ishemije i početnih vrijednosti prokolagena tipa I i MMP-2, dok nije pronađena statistički značajna povezanost s vrijednostima kulture fibroblasta. U skupini koja je čuvana na +4 °C, postojala je statistički značajna razlika u vrijednostima kulture fibroblasta između početne i sljedeće točke mjerenja na 6 sati ( $p=0,018$ ). U skupini koja je čuvana na +37 °C, postojala je statistički značajna razlika u vrijednostima kulture fibroblasta između početne i završne točke mjerenja na 24 sata ( $p=0,03$ ). U točki mjerenja na 6 sati postojala je razlika između skupina čuvanih na +4 i +37 stupnjeva ( $p=0,008$ ), nije bilo razlike nakon 24 sata. Nisu postojale statistički značajne promjene kroz vrijeme u vrijednostima prokolagena tipa I i MMP-2.

## ZAKLJUČAK

Rezultati našeg istraživanja ukazuju da povišenje temperature mikrobiološke dekontaminacije s +4 °C na +37 °C ne dovodi do pojačane izraženosti MMP-2. Tijekom ovog istraživanja nije zapažen dodatni negativni utjecaj povišenja temperature na vijabilnost tkiva koja je bila procijenjena metodom kulture fibroblasta. Također, nije zapažen negativni utjecaj na biosintetsku sposobnost stanica srčanih zalistaka za sintezu prokolagena tip I.

## 9. Abstract

**Title of thesis:** The influence of different decontamination protocols on structural characteristics of heart valve allografts

### INTRODUCTION

The aim of this research was to investigate whether prolonged warm ischemic time could cause functional tissue changes with negative influence on extracellular matrix structure of heart valve allografts.

### METHODS

After surgical dissection tissue samples of heart valve allografts were submerged in the antibiotic solution containing vancomycin, lincomycin and polymyxin B sulphate and incubated at +4 and +37 °C for 24 hours. Fibroblast culture, immunohistochemical analysis of MMP-2, procollagen type I expression and microbiological analysis were performed.

### RESULTS

A total of 20 heart valve allografts were analysed. There was a significant positive correlation between ischemia time and initial values of procollagen type I and MMP-2. At the measurement point at 6 hours there was a difference in fibroblast culture values between the groups kept at +4 and +37 °C, no difference was observed at 24 hours. There were no significant changes over time in the values of procollagen type I and MMP-2.

### CONCLUSION

The increase of temperature of microbiological decontamination from +4 to +37 °C does not cause an increase of MMP-2 expression. Negative influence on tissue viability

assessed by the method of fibroblast culture and capacity of valvular interstitial cells to synthesize procollagen type I was not observed.

**Name of the author:** Ivica Šafradin

**Year:** 2023

## 10. Literatura

1. Rabkin-Aikawa E, Mayer JE, Schoen FJ. Heart valve regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2005;94:141–79.
2. Schoen FJ. Evolving concepts of cardiac valve dynamics: The continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering. *Circulation.* 2008;118(18):1864–80.
3. Wang H, Leinwand LA, Anseth KS. Cardiac valve cells and their microenvironment - insights from in vitro studies. *Nat Rev Cardiol.* 2014;11(12):715–27.
4. Hinton RB, Yutzey KE. Heart valve structure and function in development and disease. *Annu Rev Physiol.* 2011;73:29–46.
5. Schoen FJ. Cardiac valves and valvular pathology: Update on function, disease, repair, and replacement. *Cardiovasc Pathol.* 2005;14(4):189–94.
6. Schoen FJ. Morphology, Clinicopathologic Correlations, and Mechanisms in Heart Valve Health and Disease. *Cardiovasc Eng Technol.* 2018;9(2):126–40.
7. Liu AC, Joag VR, Gottlieb AI. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am J Pathol.* 2007;171(5):1407–18.
8. Butcher JT, Nerem RM. Valvular endothelial cells and the mechanoregulation of valvular pathology. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2007;362(1484):1445–57.
9. Gaffney J, Solomonov I, Zehorai E, Sagi I. Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo. *Matrix Biol.* 2015;44–46(Ldl):191–9.
10. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases [Internet]. 1st ed. Vol. 147, Matrix Metalloproteinases and Tissue Remodeling in Health and Disease Cardiovascular Remodeling. Elsevier Inc.; 2017. 1–73 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.02.005>
11. Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, i sur. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32(2):368–72.
12. Kanagala P, Arnold JR, Singh A, Chan DCS, Cheng ASH, Khan JN, i sur. Characterizing heart failure with preserved and reduced ejection fraction: An imaging and plasma biomarker approach. *PLoS One [Internet].* 2020;15(4):1–22.
13. Dhillon OS, Khan SQ, Narayan HK, Ng KH, Mohammed N, Quinn PA, i sur. Matrix metalloproteinase-2 predicts mortality in patients with acute coronary syndrome. *Clin Sci.* 2010;118(4):249–57.
14. Hughes BG, Schulz R. Targeting MMP-2 to treat ischemic heart injury. *Basic Res Cardiol.* 2014;109(4).

15. Ikonomidis JS, Jones JA, Barbour JR, Stroud RE, Clark LL, Kaplan BS, i sur. Expression of matrix metalloproteinases and endogenous inhibitors within ascending aortic aneurysms of patients with bicuspid or tricuspid aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007;133(4):1028–36.
16. Hjortnaes J, Keegan J, Bruneval P, Levine RA, Hagège A, Aikawa E. Comparative Histopathological Analysis of Mitral Valves in Barlow Disease and Fibroelastic Deficiency. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2016;28(4):757–67.
17. Jian B, Jones PL, Li Q, Iii ERM, Schoen FJ, Levy RJ. Matrix Metalloproteinase-2 Is Associated with Tenascin-C in Calcific Aortic Stenosis. *Am J Pathol.* 2001;159(1):321–7.
18. Fondard O, Detaint D, Iung B, Choqueux C, Adle-Biassette H, Jarraya M, i sur. Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: The role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Eur Heart J.* 2005;26(13):1333–41.
19. Kano M, Masuda Y, Tominaga T, Hori T, Kitaichi T, Yoshizumi M, i sur. Collagen synthesis and collagenase activity of cryopreserved heart valves. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001; 122(4):706-11
20. Murray G, Roschlau W, Loughheed W. Homologous aortic-valve-segment transplants as surgical treatment for aortic and mitral insufficiency. *Angiology.* 1956;7(5):466–71.
21. Ross DN. Homograft replacement of the aortic valve. *Lancet.* 1962;(7254):487.
22. Barratt-Boyes BG. Homograft Aortic Valve Replacement in Aortic Incompetence and Stenosis. *Thorax.* 1964;19:131–50.
23. Ross DN. Replacement of aortic and mitral valves with a pulmonary autograft. *Lancet.* 1967;2(7523):956–8.
24. Hopkins RA. Cardiac Reconstructions with Allograft Valves. *Cardiac Reconstructions with Allograft Valves.* 1989.
25. Skific M, Golemovic M, Safradin I, Duric Z, Biocina B, Golubic Cepulic B. Cryopreserved human heart valve allografts: a ten-year single centre experience. *Cell Tissue Bank.* 2022 Oct 12:1–16. doi: 10.1007/s10561-022-10043-3. [Epub ahead of print]
26. Baumgartner H, Falk V, Bax JJ, De Bonis M, Hamm C, Holm PJ, i sur. 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. Vol. 38, *European Heart Journal.* 2017. 2739–2786 p.
27. Fukushima S, Tesar PJ, Pearse B, Jalali H, Sparks L, Fraser JF, i sur. Long-term clinical outcomes after aortic valve replacement using cryopreserved aortic allograft. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2014;148(1).
28. Witten JC, Durbak E, Houghtaling PL, Unai S, Roselli EE, Bakaeen FG, i sur. Performance and Durability of Cryopreserved Allograft Aortic Valve Replacements. *Ann Thorac Surg.* 2021; 111(6):1893-1900.

29. Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, Bongiorno MG, Casalta JP, Del Zotti F, i sur. 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis. Vol. 36, European Heart Journal. 2015. 3075–3123 p.
30. Musci M, Weng Y, Hübner M, Amiri A, Pasic M, Kosky S, i sur. Homograft aortic root replacement in native or prosthetic active infective endocarditis: Twenty-year single-center experience. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010;139(3):665–73.
31. Sabik JF, Lytle BW, Blackstone EH, Marullo AGM, Pettersson GB, Cosgrove DM. Aortic root replacement with cryopreserved allograft for prosthetic valve endocarditis. *Ann Thorac Surg.* 2002;74(3):650–9.
32. Solari S, Mastrobuoni S, De Kerchove L, Navarra E, Astarci P, Noirhomme P, i sur. Over 20 years experience with aortic homograft in aortic valve replacement during acute infective endocarditis. *Eur J Cardio-thoracic Surg.* 2016;50(6):1158–64.
33. Kim JB, Ejiofor JI, Yammine M, Camuso JM, Walsh CW, Ando M, i sur. Are homografts superior to conventional prosthetic valves in the setting of infective endocarditis involving the aortic valve? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2016;151(5):1239-1248.e2
34. Jassar AS, Bavaria JE, Szeto WY, Moeller PJ, Maniaci J, Milewski RK, i sur. Graft selection for aortic root replacement in complex active endocarditis: Does it matter? *Ann Thorac Surg.* 2012;93(2):480–7.
35. Olivito S, Lalande S, Nappi F, Hammoudi N, D'Alessandro C, Fouret P, i sur. Structural deterioration of the cryopreserved mitral homograft valve. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012;144(2):313-320.e1.
36. Liu Y, Chen S, Zühlke L, Black GC, Choy MK, Li N, i sur. Global birth prevalence of congenital heart defects 1970-2017: Updated systematic review and meta-analysis of 260 studies. *Int J Epidemiol.* 2019;48(2):455–63.
37. Ross DN, Somerville J. Correction of pulmonary atresia with a homograft aortic valve. *Lancet.* 1966;288(7479):1446–7.
38. Boethig D, Goerler H, Westhoff-Bleck M, Ono M, Daiber A, Haverich A, i sur. Evaluation of 188 consecutive homografts implanted in pulmonary position after 20 years. *Eur J Cardio-thoracic Surg.* 2007;32(1):133–42.
39. Romeo JLR, Mokhles MM, Van De Woestijne P, De Jong P, Van Den Bosch A, Van Beynum IM, i sur. Long-term clinical outcome and echocardiographic function of homografts in the right ventricular outflow tract. *Eur J Cardio-thoracic Surg.* 2019;55(3):518–26.
40. Kalfa DM, Loundou A, de Gorce YN, Fraise A, Metras DR, Macé L, i sur. Pulmonary position cryopreserved homograft in non-Ross patients: How to improve the results? *Eur J Cardio-thoracic Surg.* 2012;42(6):981–7.
41. Mokhles MM, van de Woestijne PC, de Jong PL, Witsenburg M, Roos-Hesselink JW, Takkenberg JJM, i sur. Clinical outcome and health-related quality of life after right-



- ventricular-outflow-tract reconstruction with an allograft conduit. *Eur J Cardio-thoracic Surg.* 2011;40(3):571–8.
42. Batlivala SP, Emani S, Mayer JE, McElhinney DB. Pulmonary valve replacement function in adolescents: A comparison of bioprosthetic valves and homograft conduits. *Ann Thorac Surg.* 2012;93(6):2007–16.
  43. Brown JW, Ruzmetov M, Rodefeld MD, Vijay P, Turrentine MW. Right ventricular outflow tract reconstruction with an allograft conduit in non-Ross patients: Risk factors for allograft dysfunction and failure. *Ann Thorac Surg.* 2005;80(2):655–64.
  44. Schiller O, Sinha P, Zurakowski D, Jonas RA. Reconstruction of right ventricular outflow tract in neonates and infants using valved cryopreserved femoral vein homografts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2014;147(3):874–9.
  45. François K, De Groote K, Vandekerckhove K, De Wilde H, De Wolf D, Bové T. Small-sized conduits in the right ventricular outflow tract in young children: Bicuspidalized homografts are a good alternative to standard conduits. *Eur J Cardio-thoracic Surg.* 2018;53(2):409–15.
  46. Kumar M, Turrentine MW, Rodefeld MD, Bell T, Brown JW. Right Ventricular Outflow Tract Reconstruction With a Polytetrafluoroethylene Monocusp Valve: A 20-Year Experience. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2016;28(2):463–70.
  47. Holmes A, Co S, Human D, LeBlanc J, Campbell A. The Contegra conduit: Late outcomes in right ventricular outflow tract reconstruction. *Ann Pediatr Cardiol.* 2012;5(1):27–33.
  48. Takkenberg JJM, Klieverik LMA, Schoof PH, Van Suylen RJ, Van Herwerden LA, Zondervan PE, i sur. The Ross procedure: A systematic review and meta-analysis. *Circulation.* 2009;119(2):222–8.
  49. Etnel JRG, Elmont LC, Ertekin E, Mokhles MM, Heuvelman HJ, Roos-Hesselink JW, i sur. Outcome after aortic valve replacement in children: A systematic review and meta-analysis. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2016;151(1):143-152.e3.
  50. Sharabiani MTA, Dorobantu DM, Mahani AS, Turner M, Peter Tometzki AJ, Angelini GD, i sur. Aortic Valve Replacement and the Ross Operation in Children and Young Adults. *J Am Coll Cardiol.* 2016;67(24):2858–70.
  51. Warnes CA. Transposition of the great arteries. *Circulation.* 2006;114(24):2699–709.
  52. Ohye RG, Schranz D, D'Udekem Y. Current therapy for hypoplastic left heart syndrome and related single ventricle lesions. *Circulation.* 2016;134(17):1265–79.
  53. Sandeep N, Punn R, Balasubramanian S, Smith SN, Reinhartz O, Zhang Y, i sur. Interstage evaluation of homograft-valved right ventricle to pulmonary artery conduits for palliation of hypoplastic left heart syndrome. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2018;155(4):1747-1755.e1.

54. Fiala R, Kochová P, Kubíková T, Cimrman R, Tonar Z, Špatenka J, i sur. Mechanical and structural properties of human aortic and pulmonary allografts do not deteriorate in the first 10 years of cryopreservation and storage in nitrogen. *Cell Tissue Bank* 2019;20(2):221-241.
55. Jashari R. Transplantation of cryopreserved human heart valves in Europe: 30 years of banking in Brussels and future perspectives. *Cell Tissue Bank. Cell Tissue Bank*. 2021;22(4): 519–537.
56. Fan YD, Van Hoeck B, Holovska V, Jashari R. Evaluation of decontamination process of heart valve and artery tissues in European Homograft Bank (EHB): A retrospective study of 1,055 cases. *Cell Tissue Bank*. 2012;13(2):297–304.
57. Brubaker S, Lotherington K, Zhao J, Hamilton B, Rockl G, Duong A, i sur. Tissue recovery practices and bioburden: a systematic review. *Cell Tissue Bank*. 2016;17(4):561–71.
58. Germain M, Strong DM, Dowling G, Mohr J, Duong A, Garibaldi A, i sur. Disinfection of human cardiac valve allografts in tissue banking: systematic review report. *Cell Tissue Bank*. 2016;17(4):593–601.
59. Heng WL, Albrecht H, Chiappini P, Lim YP, Manning L. International Heart Valve Bank Survey: A Review of Processing Practices and Activity Outcomes. *J Transplant*. 2013;2013:1–11.
60. Zahra S, Galea G, Jashari R, Petit P, de By TMMH. Significant variation in heart valve banking practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019;38(8):1491–8.
61. Gall KL, Smith SE, Willmette CA, O'Brien MF. Allograft heart valve viability and valve-processing variables. *Ann Thorac Surg*. 1998;65(4 SUPPL.):1032–8.
62. Germain M, Thibault L, Jacques A, Tremblay J, Bourgeois R. Heart valve allograft decontamination with antibiotics: Impact of the temperature of incubation on efficacy. *Cell Tissue Bank*. 2010;11(2):197–204.
63. de By TMMH, McDonald C, Süßner S, Davies J, Heng WL, Jashari R, i sur. Validation of microbiological testing in cardiovascular tissue banks: Results of a quality round trial. *Eur J Cardio-thoracic Surg*. 2017;52(5):895–900.
64. Koolbergen DR, Hazekamp MG, De Heer E, Bruggemans EF, Huysmans HA, Dion RAE, i sur. The pathology of fresh and cryopreserved homograft heart valves: An analysis of forty explanted homograft valves. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002;124(4):689–97.
65. Kodigepalli KM, Thatcher K, West T, Howsmon DP, Schoen FJ, Sacks MS, i sur. Biology and biomechanics of the heart valve extracellular matrix. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2020;7(4):1–22.
66. Quintana AB, Coda Zabetta CD, Baumgartner NO, Biancardi ME, Bessone V, Rodriguez J V., i sur. Morphological and biochemical analysis of human cardiac valve

- allografts after an increment of the cryostorage temperature. *Cryobiology*. 2009;59(1):96–101.
67. Togashi M, Tamura K, Nitta T, Ishizaki M, Sugisaki Y, Fukuda Y. Role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor of metalloproteinases in myxomatous change of cardiac floppy valves. *Pathol Int*. 2007;57(5):251–9.
  68. Cheung PY, Sawicki G, Wozniak M, Wang W, Radomski MW, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. *Circulation*. 2000;101(15):1833–9.
  69. Kurzepa J, Kurzepa J, Golab P, Czarska S, Bielewicz J. The significance of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in the ischemic stroke. *Int J Neurosci*. 2014;124(10):707–16.
  70. de By TMMH, Parker R, Delmo Walter EM, Hetzer R. Cardiovascular tissue banking in Europe. *HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth*. 2012;4(4):251–60.
  71. Baric D, Cebotari S, Mertsching H, Leyh R, Haverich A. Could 37°C storage temperature extend homovital valve allograft viability? *J Heart Valve Dis*. 2004;13(3):494–500.
  72. Parker R, Yacoub MH, Yankah C, Hetzer R. *Cardiac valve allografts*. Heidelberg. Steinkopff-Verlag, 1997.
  73. Kneebone JM, Lupinetti FM. Procollagen synthesis by fresh and cryopreserved rat pulmonary valve grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000;120(3):596–603.
  74. Sarikouch S, Theodoridis K, Hilfiker A, Boethig D, Laufer G, Andreas M, i sur. Early Insight Into In Vivo Recellularization of Cell-Free Allogenic Heart Valves. *Ann Thorac Surg*. 2019;108(2):581–9.
  75. Schenke-Layland K, Madershahian N, Riemann I, Starcher B, Halbhuber KJ, König K, i sur. Impact of cryopreservation on extracellular matrix structures of heart valve leaflets. *Ann Thorac Surg*. 2006;81(3):918–26.
  76. Netter FH. *Atlas of Human Anatomy*. 5. izd. Philadelphia, Elsevier, 2010.

## 11. Životopis

Ivica Šafradin, dr.med. je rođen 16.08.1981. godine u Zenici, Bosna i Hercegovina. 2000. godine je upisao Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu na kojem je diplomirao 2006. godine. Nakon obveznog pripravničkog staža kojega je odradio u KB „Dubrava“ u Zagrebu i položenog državnog ispita, u siječnju 2008. godine je započeo specijalizaciju iz opće kirurgije za Kliniku za kardijalnu kirurgiju KBC-a Zagreb. U rujnu 2012. godine polaže specijalistički ispit. Od tada je zaposlen na Odjelu za liječenje bolesnika u ranom poslijeoperativnom razdoblju Klinike za kardijalnu kirurgiju KBC-a Zagreb. 2018. godine uspješno polaže subspecijalistički ispit iz kardijalne kirurgije. Sveučilišni poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu je upisao 2010. godine. Do sada je objavio dvanaest znanstvenih radova, od kojih je 7 indeksirano u Current Contentsu. Također, objavio je i dva poglavlja u knjigama.