

**UNIVERZITA KARLOVA**

**2. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**Faktory ovlivňující dlouhodobé přežití kryoprezervovaných allograftů v  
RVOT**

**Factors influencing the long-term survival of the cryopreserved allografts in  
RVOT**

MUDr. Mariia Havova

Praha, 2024



Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Fyziologie a patofyziologie člověka na Klinice kardiovaskulární chirurgie 2. LF UK a FN Motol

**Školitel:**                    **doc. MUDr. Vilém Rohn, CSc.**

**Oponenti:**                    **doc. MUDr. Jaroslav Benedík, Ph.D.**

**doc. MUDr. Petr Němec, CSc., MBA**

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby oborové rady Fyziologie a patofyziologie člověka dne ..... v ..... od ..... hod. Předsedou komise pro obhajobu disertační práce byl jmenován: .....

Předseda oborové rady a garant doktorského studijního programu: prof. MUDr. Otomar Kittnar, MBA, CSc.

Děkan fakulty: prof. MUDr. Marek Babjuk, CSc.

Tato práce vznikla za podpory Interního grantu Dětského kardiocentra 2. LF UK a FN Motol

S disertační prací je možno se seznámit na Oddělení Ph.D. studia děkanátu 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 (tel. 224 435 836).

# OBSAH

ABSTRAKT .....	5
ABSTRACT .....	6
1. ÚVOD.....	7
2. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE.....	9
3. MATERIÁL A METODIKA.....	9
4. VÝSLEDKY.....	16
5. DISKUZE.....	17
6. ZÁVĚR.....	24
7. SOUHRN.....	25
SUMMARY .....	26
LITERATURA .....	27
PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI .....	32

## ABSTRAKT

**Cíle:** Volba optimálního typu chlopenní náhrady u pacientů s vrozenou srdeční vadou, podstupujících rekonstrukce RVOT (výtokový trakt pravé komory) v různých věkových kategoriích je opakovaně diskutována a přes publikované doporučené postupy se názory jednotlivých pracovišť liší. Na základě retrospektivní analýzy dat pacientů, kteří podstoupili rekonstrukce RVOT, histopatologického vyšetření explantovaných allograftů a allograftů před implantací, jsme v této studii zkoumali rizikové faktorů selhání konduktů. Dalším cílem práce bylo navrhnout potenciální způsoby zlepšení výsledků dlouhodobého přežití konduktů a zjistit, který typ náhrady by měl být preferován v případě primoooperace a/nebo reintervence na RVOT.

**Materiály a metody:** Retrospektivní část studie zahrnovala statistickou analýzu dat u celkem 766 implantací konduktu do RVOT u 590 pacientů a u 249 sekundárních a následných implantací u 197 pacientů. Endpointem studie bylo selhání konduktu, definované jako explantace konduktu; perkutánní balonková pulmonální valvuloplastika (včetně katetrizační náhrady pulmonální chlopně, plastiky kmene plicnice s výjimkou angioplastiky levé a/nebo pravé větve plicnice) a úmrtí pacienta. Dále jsme posoudili histopatologické známky strukturální degenerace, stupeň buněčné prezervace a přítomnost antigen-prezentujících buněk (APC) u 57 kryoprezervovaných allograftů následně použitých pro rekonstrukci RVOT a korelace těch změn s klinickými charakteristikami dárce, dobou kryoprezervace a typy a průměry allograftů. Poté jsme hodnotili mikroskopickou strukturu explantovaných konduktů u 24 pacientů v souvislosti s dobou implantace, stupeň degenerativních změn a známky buněčné rejekce explantátů.

**Výsledky a závěr:** Závěrem práce lze konstatovat, že rekonstrukce výtokového traktu pravé komory prokazuje dobré střednědobé a přijatelné dlouhodobé výsledky bez ohledu na typ implantovaného konduktu u primoooperací a reintervencí. Dlouhodobé přežití konduktů v RVOT bylo nepříznivě ovlivněno velikostí

použitých konduktů, mladším věkem příjemce, mladším věkem dárce, použitím aortálních allograftů, vstupní diagnózou a typem operace. U sekundárních a následujících intervencí bylo negativním prediktorem přežití konduktu také pohlaví dárce. Mikroskopické strukturální změny lze detekovat téměř ve všech kryoprezervovaných allograftech. Změny ovlivňují jak cévní stěnu, tak cípy chlopně. Allografty před implantací prokázaly výrazně sníženou buněčnou prezervaci negativně korelující s počty APC. Mikroskopický vzhled dlouhodobých explantátů je často nespecifický a nálezy známek rejekce allograftů jsou vzácné.

**Klíčová slova:** RVOT, Allograft, Xenograft, Reoperace, Selhání konduktu, Antigenprezentující buňky, Kryoprezervace, Degenerace, Histopatologie.

## **ABSTRACT**

**Background:** The valved conduit of choice in right ventricular outflow tract (RVOT) reconstruction provides a challenge for cardiac surgeons. In our study, we aimed to assess risk factors for conduit failure based on retrospective analysis of patient data who underwent RVOT reconstructions, morphological and histological examination of explanted allografts, and allografts before implantation. Furthermore, the aim of the study was to propose potential ways to improve long-term outcomes of conduit survival and determine which type of conduit should be preferred in case of primary operation and/or reintervention on the RVOT.

**Methods:** We performed a retrospective analysis of a total of 766 records of valved conduit implantation in the right ventricular outflow tract in 590 patients and 249 records of valved conduit secondary and subsequent replacement in 197 patients. The study endpoints were defined as conduit explants; balloon dilatation of the graft (excluding balloon dilatation of left/right pulmonary artery), transcatheter pulmonary valve implantation; heart transplantation, or death of the patient. We also assessed histopathological signs of structural degeneration, degree of cellular

preservation, and presence of antigen-presenting cells (APC) in 57 cryopreserved allografts subsequently used for the RVOT reconstruction, and correlated the changes with donor clinical characteristics, cryopreservation times, and allograft types and diameters. Then we studied the microscopical structure of explanted conduits in 24 patients in correlation to the duration of implantation, assessed the degree of degenerative changes, and searched for signs of cellular rejection.

**Results and conclusions:** Right ventricular outflow tract reconstruction demonstrates good mid-term and acceptable long-term outcomes regardless of the type of conduit implanted. Long-term survival of conduits was adversely affected by the younger age of the recipient, the younger age of the donor, the small size of the conduit at implantation, the use of aortic allografts, underlying congenital heart disease, and the type of surgery. In reoperative RVOT, worse long-term graft survival was associated with the younger age of the recipient at implantation, the small size of the conduit, younger age of the donor and male donor in case of allograft implantation. Allografts before implantation show markedly reduced cellular preservation negatively correlating with the numbers of APC. More preserved allografts may be therefore prone to stronger immune rejection. The microscopic appearance of long-term explanted conduits is often non-specific and signs of cellular rejection are sparse.

**Keywords:** Right ventricular outflow tract, Allograft, Xenograft, Reoperation, Conduit failure, Antigen Presenting Cells, Cryopreservation, Degeneration, Heart Valve, Histopathology.

## 1. ÚVOD

Rekonstrukce RVOT (výtokový trakt pravé komory) u pacientů s vrozenou srdeční vadou v různých věkových kategoriích stále zůstává diskutabilní problematikou v chirurgii chlopenních vad. Včasná identifikace dysfunkce RVOT, správné načasování a výběr vhodného způsobu rekonstrukce má zásadní vliv na pooperační výsledky a dlouhodobé přežití použité chlopenní náhrady. Existuje řada možností

rekonstrukce RVOT. Jejím cílem je pomocí náhradního materiálu replikovat anatomickou, histologickou a biomechanickou charakteristiku chlopní, případně celého RVOT. V současné době používané chlopenní náhrady se dělí na mechanické a biologické. Mezi biologické chlopenní náhrady patří xenografty, allografty a autografty. Alternativou a další možností rekonstrukce RVOT jsou chirurgické rekonstrukce chlopní pomocí perikardu nebo polytetrafluorethylenových membrán.<sup>1</sup> Uvedené typy náhrad prošly a stále procházejí nepřetržitým vývojem, který je charakterizován neustálým zlepšováním jejich technických, hemodynamických a biokompatibilních parametrů a prokázaly svou účinnost a bezpečnost v klinické praxi. Nicméně, navzdory pokroku, který na poli designu a vývoje chlopenních náhrad od poloviny 20. století nesporně nastal, optimální typ chlopenní náhrady nebyl dosud nalezen. Použití každé protézy, popřípadě chirurgického způsobu rekonstrukce, je spojeno se vznikem souvisejících komplikací, což má za následek dysfunkce, ev. selhání konduitů.

Ideální chlopenní náhrada by měla splňovat následující podmínky:

1. Měla by mít nulový gradient a nulovou regurgitaci
2. Být kompatibilní s tělem příjemce
3. Být neimunogenní
4. Neměla by degradovat krevní elementy
5. Být viabilní s velmi dlouhou trvanlivostí (u dětí by měla navíc mít růstový potenciál)
6. Být neomezeně dostupná v jakémkoliv množství
7. Být netrombogenní a odolná vůči infekci, měla by umožnit pevné vhojení do anulu operovaného, a přitom by neměla vyžadovat antikoagulační léčbu<sup>2</sup>

Za „zlatý standard“ rekonstrukce RVOT je v současné době považováno použití allograftu.<sup>3</sup> Zásadní výhodou allograftů jsou jejich hemodynamické a reologické vlastnosti dané zachováním nativní anatomie a vztahů mezi cípy.<sup>4</sup> Nicméně tendence k degeneraci allograftů je v průběhu let stále patrná<sup>5</sup> a je všeobecně známým faktem,



že s největší pravděpodobností pacienta čeká reoperace v důsledku selhání použité chlopenní náhrady.

## **2. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE**

Podstatou projektu bylo v rámci spolupráce klinik dětské a dospělé kardiologie zkoumání příčin a patofyziologických mechanismů ovlivňujících dlouhodobé přežití a degenerace allograftů v RVOT. Cílem práce bylo na základě retrospektivní analýzy dat pacientů, kteří podstoupili rekonstrukce RVOT, morfologického a histologického vyšetření explantovaných allograftů a allograftů před implantací, stanovit rizikové faktory selhání konduktů, navrhnout potenciální způsoby zlepšení dlouhodobých výsledků a zjistit, který typ náhrady by měl být preferován v případě primóperace a/nebo reintervence na RVOT.

Hypotézu jsme formulovali následovně: „Na dlouhodobé přežití implantovaných allograftů má největší vliv jeho velikost. Jiné rizikové faktory, jako je věk a pohlaví dárce, doba a způsob prezervace allograftů, včetně času od odběru do prezervace, pohlaví pacienta, vstupní diagnózy včetně předchozích zákroků a počtu reoperací, typu operačního zákroku a operační techniky, ABO matching mají minimální nebo žádný vliv.“ Druhá pracovní hypotéza byla formulována následovně: „Dlouhodobé přežití allograftů má převahu nad xenografty.“

Předpokládané výsledky práce by měly být přínosné v klinické praxi v oboru kardiologie, zejména v chirurgické léčbě vrozených srdečních vad u dětí a dospělých, podstupujících rekonstrukci RVOT. Na základě vyhodnocení a systematizace výše uvedených rizikových faktorů by měly výsledky umožnit zlepšení dlouhodobého přežití implantovaných konduktů.

## **3. MATERIÁL A METODIKA**

### ***3.1. Retrospektivní analýza dat pacientů, kteří podstoupili rekonstrukci RVOT pomocí allograftů nebo xenograftů***

V období od února 1981 do prosince 2016 byli do retrospektivní studie zařazeni děti a dospělí pacienti, kteří podstoupili rekonstrukci RVOT pomocí allograftů nebo

xenograftů v Dětském kardiocentru 2. LF UK a FN Motol a na Klinice kardiovaskulární chirurgie 2. LF UK a FN Motol. Bylo provedeno celkem 766 implantací obou typů konduktů – allograftů a xenograftů (vč. biologických chlopenních protéz). K rekonstrukci RVOT bylo použito 590 allograftů (306 pulmonálních, 211 aortálních, v 73 případech údaje o typu allograftů nebyly k dispozici – data staršího původu). Xenografty byly implantovány v 176 případech – do téhle skupiny byly zařazeny jak konduity, tak samotné biologické chlopenní protézy jako náhrada pulmonální chlopně u jinak zcela normálního RVOT.

Pro potřeby studie byl soubor rozdělen – v druhé době byla doplněna retrospektivní analýza dat pacientů, kteří podstoupili druhou a další operaci s rekonstrukcí RVOT pomocí allograftů nebo xenograftů v období od října 1988 do října 2016 v našem centru. Během tohoto období bylo provedeno celkem 249 reimplantací obou typů konduktů u 197 pacientů (ve věku od 13 dnů do 42 let). Medián sledování byl 5,7 let s nejčasnější explantací konduitu 133 dní po implantaci. Celkově bylo v této skupině pro rekonstrukce RVOT použito 191 allograftů (127 plicních, 57 aortálních, v 7 případech údaje o typu allograftů nebyly k dispozici kvůli staršímu původu dat). V 53 případech byly použity xenografty (v případě sekundární a následné implantace byly použité pouze xenografty Hancock a 5 intervencí s neznámým typem konduitu (data staršího původu).

Věkový limit dárce allograftů byl stanoven od novorozenců do 65 let. Doba expirace kryoprezervovaných allograftů byla arbitrárně stanovena na 5 let ode dne odběru konduitu. Pro volbu velikosti allograftů u malých dětí kromě standardního CT měření jsme používali nomogramy (např. povrch těla pacienta). V některých případech byl allograft perioperačně bikuspidalizován.

Klinické proměnné definované jako možné negativní prediktory dlouhodobého přežití konduktů v RVOT byly rozděleny do několika skupin a zahrnovaly:

- Faktory transplantátu (biologické, biomechanické a fyzikálně-chemické charakteristiky konduitu, určené technologií jejich výroby, skladování a přípravou k implantaci)
  - typ konduitu (allograft versus xenograft, u skupiny allograftů – aortální versus pulmonální allograft)
  - velikost allograftů
  - způsob prezervace allograftů (čerstvý versus kryoprezervovaný)
  - doba od odběru allograftů do jeho prezervace
- Individuální charakteristiky donora
  - věk dárce
  - pohlaví dárce
- Faktory recipienta, určené jeho klinickým stavem před operací, specifikou perioperačního a taky časného a pozdního pooperačního období
  - věk pacienta
  - pohlaví pacienta
  - ABO matching
  - vstupní diagnóza včetně předchozích intervencí a počtu re-intervencí na RVOT
  - typ chirurgického zákroku (skupiny Ross/non-Ross).

Endpointem studie bylo selhání konduitu, definované jako explantace konduitu; perkutánní balonková pulmonální valvuloplastika (včetně katetrizační náhrady pulmonální chlopně), plastika kmene plicnice s výjimkou angioplastiky levé a/nebo pravé větve plicnice) a úmrtí pacienta. Vylučovací kritéria pro obě skupiny pacientů zahrnovala perioperační mortalitu (včetně krátkodobé mortality do 30 dnů od operace) a infekční endokarditidu na pulmonální chlopni před současnou operací.

#### *Statistická analýza získaných dat*

Získaná data o přežívání konduitu v prvním souboru pacientů, kteří podstoupili rekonstrukci RVOT pomocí alograftů nebo xenograftů v období od února 1981 do

prosinec 2016 (primoimplantace a reoperace, skupina A) s ohledem na zvolené možné negativní faktory byla analyzována pomocí Kaplan-Meierových křivek. Rozdíly mezi jednotlivými skupinami konduktů byly testovány pomocí Log-Rank testu. Vlivy jednotlivých faktorů byly zpracovány pomocí Coxova modelu poměrného hazardu. Analýzy byly prováděny pomocí statistického balíčku R, verze 3.6.1. Hladina významnosti byla zvolena 5% ( $p=0,05$ ;  $p$ -hodnoty nižší než 5% byly považovány za statisticky významné).

V druhém souboru pacientů (kteří podstoupili sekundární a následující operaci s rekonstrukcí výtokového traktu pravé komory, skupina B) k hodnocení vztahu mezi jednotlivými proměnnými a výsledky jsme také použili Coxův model poměrného hazardu (statistický balíček R)<sup>6</sup>. Pro každé srovnání jsme provedli dvě analýzy: neupravený model, kde srovnáváme model s jednou kovariátou s modelem bez jakéhokoli dalšího prediktora, a upravený model, kde jsme přidali čtyři asociace nalezené v předchozí práci (věk pacienta při intervenci, velikost a typ konduktu, vstupní diagnóza pacienta) a srovnáváme model s těmito čtyřmi prediktory a kovariátem zájmu s modelem pouze se čtyřmi prediktory. Pro srovnání jsme použili test poměru věrohodností. Všechny  $p$ -hodnoty uváděné v hlavním textu byly upraveny pro více srovnání pomocí metody Benjamini–Hochberg.<sup>7</sup> Křivky přežití a jejich 95% intervaly spolehlivosti byly vizualizovány pomocí R balíčku *survminer*.<sup>8</sup>

### ***3.2. Strukturální integrita a buněčná viabilita kryoprezervovaných allograftů před implantací v RVOT***

Prospektivní část studie byla založena na histopatologickém vyšetření kryoprezervovaných allograftů před implantací, následně použitých pro rekonstrukci výtokového traktu pravé komory v období od listopadu 2017 do května 2019. Cílem této části prospektivní studie bylo: zhodnotit známky strukturální degenerace a přítomnost antigen-prezentujících buněk (APC); dále zhodnotit souvislost stanovených mikroskopických změn s klinickými charakteristikami dárce, dobou

kryoprezervace, typem a velikostí allograftů. Klinické proměnné sledované u odebraných allograftů zahrnovaly: typ allograftů, jeho velikost, doba studené ischemie, doba od konce dekontaminace do zahájení kryoprezervace a samotná doba kryoprezervace. Klinické charakteristiky dárce zahrnovaly: věk, pohlaví, krevní skupina, výška, váha a tělesný povrch (BSA – body surface area) spočítaná v metrech čtverečních pomocí Mostellerova vzorce.<sup>9</sup>

Během operačního výkonu s rekonstrukcí výtokového traktu pravé komory byl získán vzorek cévní stěny allograftů. V případě, kdy implantaci allograftů předcházela redukce jeho velikosti (bikuspidalizace), byl také získán vzorek cípu allograftů. Celkem bylo provedeno histopatologické vyšetření 57 vzorků cévní stěny (48 pulmonálních, 9 aortálních) a 20 vzorků cípu implantovaného allograftu (17 pulmonálních, 3 aortální) světelným mikroskopem. Věkový limit dárce byl stanoven od novorozenců do 65 let.

#### *Histopatologické zpracování vzorků*

Každý vzorek byl fixován v 10% formolu a vložen do parafinového bloku. Všechny mikroskopické preparáty byly barveny hematoxylinem a eosinem (HE). Pro přesné posouzení mikroskopických známek strukturální degenerace byly použité další barvení, specifické pro jednotlivé složky cévní stěny a cípů chlopně. Všechny vzorky byly barveny Massonovým trichromem, který zdůrazňuje hladké svalové buňky a fibrózní tkáň, Weigertovým resorcin-fuchsinem, který zdůrazňuje elastická vlákna; také bylo použito Alcianová modř/periodic acid-Shiff barvení, které ukazuje přítomnost mukoidních extracelulárních matrixových substancí (MEMA). Konkrétní morfologické proměnné posuzované v cévní stěně zahrnovaly: fragmentaci/ztrátu elastických vláken, ztenčování elastických vláken, dezorganizaci elastických vláken, přítomnost laminární mediální nekrózy, intralamelární a translamelární MEMA, fibrózu, neovaskularizaci, kalcifikaci, nekrózu a přítomnost aterosklerotického intimálního platu. Standardní definice uvedených proměnných odpovídaly mezinárodní nomenklatuře pro degenerativní onemocnění aorty od

Společnosti kardiovaskulární patologie a Asociace pro evropskou kardiovaskulární patologii.<sup>10</sup>

U vzorků chlopních cípů byly posuzovány následující proměnné: redukce elastických vláken, myxoidní změny, fibróza, kalcifikace, hemorhagie, nekróza a celková rozlišitelnost jednotlivých vrstev chlopně (zona fibrosa, spongiosa a ventricularis). Posouzení zachování buněčné složky bylo založeno na standardním HE barvení a imunohistochemii. Při barvení HE se hodnotil stupeň jaderné pyknózy, úbytek buněk a ztráta buněk. Pro imunohistochemké vyšetření byly použity specifické primární protilátky: anti-vimentin zdůrazňující celkovou celularitu vzorku, anti- $\alpha$ -kaldezmou demonstrující hladké svalové buňky a anti-CD34 pro barvení endoteliálních buněk. Většina výše uvedených proměnných byla hodnocena 0 až 3 (neexistující, mírná, střední, významná), s výjimkou fibrózy, kalcifikace, nekrózy, hemoragií, neovaskularizace a aterosklerózy, které byly ohodnoceny 0 nebo 1 (neexistující nebo přítomné). Pro zdůraznění přítomnosti imunitních buněk bylo provedeno imunohistochemické barvení S100 $\beta$ , CD20, CD3 a CD8 antigenů a byl spočítán počet pozitivních buněk pro 10 high-power fields ( $\times 400$ ). Pro zdůraznění APC byla použita anti-S100 $\beta$ , CD20 pro B-lymfocyty a CD4 a CD8 pro odpovídající podtypy T-lymfocytů. Byla také vyhodnocena přítomnost neutrofilů a eosinofilů v HE. HRP/DAB PolyDetector (Bio SB) byl použit jako detekční systém pro všechny výše uvedené protilátky.

#### *Statistická analýza získaných dat*

Pro statistickou analýzu získaných dat byl použit programovací jazyk Python (verze 3.7.7). Všechny proměnné zahrnuté do studie byly párově korelovány. Histopatologické proměnné byly také hodnoceny jako skupiny pomocí kanonické korelační analýzy. Skupiny proměnných reprezentovaly cévní a strukturální degeneraci chlopně a buněčnou viabilitu. K hodnocení párových asociací byl použit Pearsonův korelační koeficient. Pro posouzení nezávislosti mezi dvojicemi proměnných byly použity následující statistické testy: test na korelační koeficient

pro numerická klinická a numerická histopatologická data, chi-kvadrát test nezávislosti pro kategoriální klinická a nominální histopatologická data, Welchův t-test pro binární klinická a numerická histopatologická data a Welchová analýza rozptylu (nebo ANOVA) pro kategoriální klinická a numerická histopatologická data. Hodnoty  $p < 0,05$  byly považovány za významné. Byl použit interval spolehlivosti 95 %.

### **3.3. Mikroskopické hodnocení explantovaných allograftů**

Další prospektivní část zahrnovala odběr, morfologické a histologické vyšetření explantovaných allograftů při jejich výměně u pacientů po rekonstrukci RVOT v období od listopadu 2017 do května 2020 v Dětském kardiocentru 2. LF UK a FN Motol a na Klinice kardiovaskulární chirurgie 2. LF UK a FN Motol. Cílem vyšetření bylo přesnější srovnání morfologických změn, které způsobily selhání allograftů s nutností následující reoperace. Při makroskopickém vyšetření explantovaných allograftů byly hodnoceny metrické charakteristiky (velikost chlopně, velikost cípů), počet cípů, jejich tvar, přítomnost fibrotizace, kalcifikace či jiných změn (trombóza, hemoragie). Mikroskopické vyšetření allograftů zahrnovalo posouzení stavu všech morfologických částí chlopně, viability buněk chlopně, stavu endotelu, fibrotizací, kalcifikací, hemoragií, stavu elastiky, kyselých mukosubstancí, změn na cévách a přítomnosti rejekčních infiltrátů.

Do studie bylo prospektivně zařazeno 24 pacientů, kteří podstoupili explantaci konduitů (10 pulmonálních allograftů, 7 aortálních allograftů, 8 allograftů neznámého původu, 1 xenograft) v důsledku jeho selhání ve výtokovém traktu pravé komory. Věk pacientů se v době implantace pohyboval od 1 měsíce do 24 let (průměr 59, medián 31, interkvartilový rozsah 13–62 měsíců). Doba implantace se pohybovala od 6 měsíců do 23 let (průměr 131, medián 133, interkvartilový rozsah 68–197 měsíců). Další analýza byla provedena s ohledem na vstupní diagnózu pacienta a počet předchozích intervencí na RVOT.

Explantované konduity byly fixovány v 10% formolu a dekalifikovány. Mikroskopická struktura konduitů byla hodnocena pomocí světelné mikroskopie s užitím základních barvicích metod a imunohistochemie. Všechny mikroskopické preparáty byly barveny hematoxylinem a eosinem. Pro správné posouzení stupně strukturální degradace byly provedeny další barvení a imunohistochemie, které zvýrazňovaly jednotlivé složky cévní stěny a cípů chlopní. Všechny vzorky byly barveny Massonovým trichromem zvýrazňujícím hladké svalové buňky a pojivovou tkáň, Weigertovým resorcin-fuchsinem zvýrazňujícím elastická vlákna a alcianovou modří/ PAS reakce (Periodic Acid Schiff), která prokazuje přítomnost glykosaminoglykanů. K provedení imunohistochemického vyšetření byly použity specifické protilátky: anti-vimentin zvýrazňující celkové zachování buněčných komponent vzorků, anti- $\alpha$ -kaldesmon prokazující hladké svalové buňky a anti-CD34 barvicí endotelové buňky. Pro posouzení známek buněčné rejekce bylo provedeno imunohistochemické barvení antigenů CD20, CD3 a CD8, a byl spočítán počet pozitivních buněk na 1 vysoce zvětšené pole ( $\times 400$ ).

#### **4. VÝSLEDKY**

Během sledování zemřelo celkem 53 (mortalita 9 %) z 590 pacientů ve skupině A a 21 (mortalita 11%) ze 197 pacientů ve skupině B. Čtyři pacienti ve skupině A a dva pacienti ve skupině B následně podstoupili transplantaci srdce. U 56 (skupina A) a 23 (skupina B) implantovaných konduitů byla následně provedena pulmonální angioplastika a/nebo transkatetrová implantace pulmonální chlopně (TPVI) v důsledku selhání konduitu. Allograft musel být explantován v 161 (skupina A) a 52 (skupina B) případech.

Ve skupině A pětiletá průchodnost (freedom from graft failure) všech konduitů stanovila 90,2%, 10letá průchodnost všech konduitů stanovila 79,5%, 15letá průchodnost všech konduitů stanovila 73,5%. Ve skupině B pětiletá průchodnost všech konduitů stanovila 77% (75% u allograftů a 88% u xenograftů), 10letá průchodnost všech konduitů stanovila 48% (50% u allograftů a 44% u xenograftů),



15letá průchodnost všech konduktů stanovila 21%, (23% u allograftů a 11% u xenograftů).

Většina vzorků allograftů před implantací prokázala známky degenerace, obvykle mírného stupně, a výrazně sníženou buněčnou viabilitu, což bylo více patrné u aortálních allograftů, korelující s počtem APC v cévní stěně jak v základním barvení, tak v IHC. Byla také zjištěna korelace mezi stupněm degenerace vzorků cévní stěny a věkem, výškou, hmotností a BSA dárců. Tyto zjištění byla nezávislá na době prezervace.

Všechny explantované konduity byly kompletně avitální, s úseky nekrotizace, hyalinizace, kalcifikací, metaplastické kosti a přerůstání fibrózním pannem. Ve třech případech byly zastiženy okrsky zánětu rejekčního charakteru. Tři další pacienti vykazovali v průběhu operace i následně mikroskopicky známky subakutní infekční endokarditidy. Jak tíže mikroskopických změn, tak i přítomnost rejekčních infiltrátů byly nezávislé na době trvání implantace či jakékoliv jiné klinické proměnné.

## 5. DISKUZE

V dnešní době se allografty postupně staly metodou první volby jak u primóoperací, tak u sekundárních a následujících rekonstrukcí RVOT. Obecně výhody jejich použití zahrnují technicky snadnou implantaci, lepší hemodynamiku (zlepšení funkce pravé komory po operaci), odolnost vůči infekci a snížený počet tromboembolických příhod pooperačně. Další výhodou je to, že nevyžadují antikoagulaci a možnost jejich použití jako záplaty pro rekonstrukce stenózy distální části plicnice.

Rekonstrukce RVOT allograftem může být provedena s vynikajícím dlouhodobým přežitím pacientů, přijatelným dlouhodobým přežitím allograftů a dobrou kvalitou života pacientů. Ve studii od Browna et al. byla hlášena 60% průchodnost allograftu (doba do selhání konduity s nutností jeho explantace/katetrové intervence) po dobu 5 let a 43% po dobu 15 let<sup>11</sup>, Niwaya et al. hlásili 82% průchodnost allograftu po 8

letech <sup>12</sup>, Stark et al. popisovali 58% a 31% průchodnost allograftu po 10 a 15 letech. <sup>13</sup> Bielefeld et al. hlásili průchodnost allograftů (definovanou jako dobu do selhání konduktů v případě časného úmrtí pacientů, úmrtí, související s konduitem, chirurgické a/nebo katetrové intervenci na allograftu bez nutnosti jeho explantace, a explantace konduitu) u skupiny 35 pacientů, kteří podstoupili explantace allograftu po 5, 10 a 12,4 letech po operaci, 89% (95% CL 79–100%), 76% (95% CL 49–100%) a 76% (95% CL 49–100%). <sup>14</sup> Naše data ukazují následující výsledky: ve skupině A, která zahrnovala všechny pacienty, kteří podstoupili rekonstrukce RVOT včetně primoooperací a reintervencí - pětiletá průchodnost (freedom from graft failure - definována jako doba do selhání konduktů s nutností následné explantace konduitu, nebo perkutánní balonkové pulmonální valvuloplastiky, včetně katetrizační náhrady pulmonální chlopně, plastiky kmene plicnice s výjimkou angioplastiky levé a/nebo pravé větve plicnice nebo úmrtí pacienta) všech konduktů stanovila 90,2%, 10letá průchodnost všech konduktů stanovila 79,5%, 15letá průchodnost všech konduktů stanovila 73,5%. V této skupině jsou naše data v souladu s předchozími studii. Ve skupině B (u pacientů, kteří postoupili sekundární a následující rekonstrukce RVOT) byla 5letá průchodnost konduktů u všech implantovaných konduktů 77% (75% u allograftů a 88% u xenograftů), 10letá průchodnost stanovila 48% (50% u allograftů a 44% xenograftů), 15letá průchodnost byla 21% s 23% u allograftů a 11% u xenograftů, kde se naše data liší od dat hlášených Bielefeldem a spol. Srovnání se studii popisujícími přežití allograftu nebo xenograftu u pediatrických populací je obtížné, protože tyto konduity jsou menší a většinou jsou umístěny do neortotopické pozice. <sup>12</sup> Kalfa et al. uvádí lepší dlouhodobé výsledky u pacientů, kteří podstoupili Ross nebo Ross–Kono operaci než u pacientů s jinými vrozenými srdečními vadami. <sup>16</sup> To může být způsobeno tím, že allograft je implantován do ortotopické pozice, což snižuje turbulence v konduitu a zvyšuje jeho trvanlivost, další příčinou je uváděna možnost oversize konduitu. I když nebylo v naší studii srovnání přežití allograftu u pacientů z Ross a non-Ross statisticky významné ve skupině pacientů, kteří podstoupili sekundární a následující rekonstrukce RVOT –

pravděpodobně kvůli malému počtu pacientů ve skupině Ross, kde je incidence reoperací vzácná – což může potvrdit lepší dlouhodobé přežití allograftu ve výše uvedené skupině.

Mírně překvapivé bylo, že dlouhodobé výsledky přežití allograftů a xenograftů v RVOT se výrazně nelišily v žádné skupině pacientů. Při tomto srovnání je nutné vzít v úvahu, že ve skupině A do souboru xenograftů byli také zahrnuti pacienti, kterým byla implantována pouze biologická chlopenní protéza. V tomto případě, bioprotézy byly použity pouze jako náhrada pulmonální chlopně a implantovány do zcela normálního RVOT, zatímco allografty byly použity u komplexních vrozených srdečních vad s náhradou pulmonální chlopně a rekonstrukci RVOT, někdy i pro plastiku větve plicnice. Každopádně naše studie ukázala dobré dlouhodobé výsledky všech typu použitých konduktů.

Kumulativní mortalita v naší studii byla 9% (53 pacientů) z 590 pacientů ve skupině A a 11% (21 pacientů) u 197 příjemců sekundárních a následujících konduktů implantovaných do RVOT ve skupině B. Mortalita je pravděpodobně hlavně spojena s ranou chirurgickou érou a vstupní diagnózou pacientů (TA a PA a PS). Tato data jsou v souladu s údaji publikovanými Rodefeldem a spol., kde diagnóza truncus arteriosus ( $p = 0,001$ ) a operace provedena před rokem 1992 ( $p = 0,05$ ) zůstávaly signifikantními negativními prediktory v multivariační analýze.<sup>17</sup>

Mezi negativní prediktory akcelerované degenerace allograftů v RVOT podle předchozích studií patří také malá velikost allograftu, mladší věk příjemce, aortální typ allograftu a doba teplé ischemie<sup>14,18,19</sup> Naše data byla konzistentní co se týče velikosti konduktu a věku příjemce při intervenci, ve skupině A signifikantním negativním prediktorem byl také aortální typ allograftů.

Při zkoumání počtu zákroků na RVOT jako možného negativního prediktoru akcelerované degenerace konduktů, porovnání primárního s jakýmkoli následujícím konduitem neprokazuje statistický významný rozdíl ( $p = 0,57$ ). Při porovnání sekundárních, terciárních a kvartérních implantací konduktu do výtokového traktu

pravé komory statistická analýza také prokázala, že počet rekonstrukcí pravděpodobně není spojen s vyšším rizikem selhání konduktů. Podle Bielefelda et al. je přežití allograftů při reoperaci na RVOT podobné přežití allograftů při primoooperaci - ačkoli ne statisticky významné, pojistně matematické křivky pro allografty, implantované u primoooperací a reoperací prokázaly lepší přežití konduktů u skupiny allograftů, které byly implantovány jako sekundární a následující.<sup>14</sup> Meyns et al. také uvádí, že druhý allograft funguje stejně dobře jako první, kde Kaplan–Meierova křivka přežití allograftu pro první a druhé allografty implantované ve skupině pacientů, kteří dostali dva allografty, ukazuje, že přežití druhého konduktu je o něco lepší než prvního.<sup>20</sup> Zřejmě v tomto případě je potřeba vzít v úvahu, že pacienti při implantaci druhého allograftů jsou starší. Výsledky jsou také v souladu s Lewisem et al., kteří neprokázali žádné důkazy o horším dlouhodobém přežití sekundárního allograftu.<sup>21</sup>

V našem souboru (skupina B) mají allografty od ženských dárců v RVOT tendenci mít nižší riziko selhání. To je nečekané vzhledem k předchozím publikacím od Kalfa et al., které ukázaly, že allografty od ženských dárců významně mění výsledky dlouhodobého přežití allograftu, implantovaných do RVOT v multivariační analýze. Podle jejich studie je doporučeno pro rekonstrukce výtokového traktu pravé komory vybrat allograft od mužského dárce staršího 30 let, pokud je k dispozici.<sup>22</sup> Nicméně, v naší studii se při dalším testování match/mismatch pohlaví dárce/příjemce neprokázaly jako statisticky významné. Takže vliv pohlaví dárce na přežití allograftů stále není jasný a důkazy verifikující toto tvrzení by měly být potvrzeny v dalších výzkumech zaměřených na match/mismatch pohlaví dárce/příjemce ve větších souborech.

Statistická analýza zaměřená na vstupní diagnózu a typ operace (skupina Ross vs. non-Ross) jako možné negativní prediktory dlouhodobého přežití konduktů v RVOT ve skupině A je v souladu s předchozími publikacemi, kde pacienti s diagnózou truncus arteriosus a double-outlet right ventricle prokázali vyšší riziko selhání použitého konduktu, zatímco pacienti s diagnózou Fallotovy tetralogie a skupina

pacientů, kteří podstoupili Ross/Ross-Konno operace měli v dlouhodobém sledování lepší přežití konduktů RVOT. <sup>17,11</sup>

Existuje nedostatek údajů týkajících se toho, zda některé z klinických proměnných, uvedených výše korespondují s konkrétními mikroskopickými nálezy. Eventuální prediktivní hodnota histopatologického vyšetření kryoprezervovaných allograftů před jejich implantací zůstává nejasná.

Příznaky strukturální degenerace konduktů v naší studii byly obecně mírné a mohly být přítomny již v době odběru. Nicméně nelze vyloučit možný vliv kryoprezervace, doby ischemie nebo manipulací s konduitem, protože světelná mikroskopie nemusí být dostatečně citlivá na detekci jemnějších změn. <sup>24</sup> Ve studii jsme neprokázali žádnou korelaci mezi stupněm mikroskopické degenerace a dobou studené ischemie, dobou od konce dekontaminace do zahájení kryoprezervace nebo dobou kryoprezervace. Tyto výsledky jsou v souladu s předchozími studiemi. Fiala a kol. nezaznamenali žádné změny v množství kolagenu a elastinu, mezní napětí pro všechny vzorky kryoprezervovaných allograftů po 10 letech kryoprezervace se také nelišilo. <sup>25</sup> Kubiková a spol. nenašli žádnou korelaci mezi mikroskopickou strukturou aortálních a pulmonálních allograftů a jejich mechanickými vlastnostmi. <sup>26</sup> Některé studie zkoumající ultrastrukturu kryoprezervovaných allograftů však ukazují podstatné strukturální deteriorace kolagenu na ultrastrukturní úrovni ve srovnání s čerstvými allografty. <sup>27</sup> Kryoprezervované allografty mohou také projevovat změny v extracelulární matrix na funkční úrovni. Na základě studie od Kana a kol. se zdá, že metabolismus kolagenu je změněn s relativně zachovanou syntézou kolagenu, ale se sníženou celkovou syntézou proteinů a zvýšenou aktivitou kolagenolýzy. <sup>28</sup>

Na druhé straně je negativní účinek kryoprezervace na buněčnou složku allograftů zřejmý. Všechny vzorky cévní stěny v naší studii a všechny vzorky cípu chlopní kromě jednoho prokázaly příznaky snížené buněčné viability, obvykle ve vyšší míře. Je zřejmé, že viabilitu buněk nelze posuzovat pouze na základě barvení jader HE a

imunohistochemické detekci buněčných antigenů, jako je vimentin nebo h-kaldesmon. Nicméně můžeme určitě potvrdit významnou regresi buněčné složky. Přesto nebyla pozorována korelace stupně devitalizace s dobou prezervace. Dočasná ischemie, poškození v důsledku manipulace nebo poškození během reperfúze po implantaci může také vést k variabilní ztrátě viabilních buněk.<sup>24,29</sup> Endotel se zdá být nejvulnerabilnější strukturou. Předchozí studie prokázaly vysokou citlivost endotelu k ischemii. Když jsou uchovávány v antibiotickém roztoku, začínají endotelové buňky ztrácet viabilitu po 24 hodinách, čas se může lišit v závislosti na délce teplé a studené ischemie nebo komorbiditách dárce.<sup>19</sup> V případě kryoprezervovaných allograftů z našeho centra dochází k téměř úplné ztrátě endotelové vrstvy a narušení bazální membrány již během odběru.<sup>30,31</sup> Současná studie podporuje tyto tvrzení. Dále jsme prokázali významnou korelaci mezi stupněm strukturální degenerace a sníženou buněčnou viabilitou jak u vzorků cévní stěny, tak u vzorků cípů chlopní. Interpretace těchto výsledků je náročná, protože chybí další studie podporující naše zjištění. Proto můžeme pouze spekulovat, že narušená extracelulární matrix může zvýšit detachment a následnou ztrátu buněk během prezervace allograftů.

Stupeň buněčné viability allograftu se odráží v míře zachované imunogenicity.<sup>19</sup> Dřívější studie kladly důraz na zachování buněčné viability, protože viabilní fibroblasty mohou zajistit delší přežití allograftů.<sup>32</sup> Nicméně zachovaná buněčná viabilita je doprovázena viabilními imunitními buňkami, které mohou hrát roli v rozvoji časného nebo pozdního selhání allograftu. Je potřeba zdůraznit, že míra, kterou imunitní reakce přispívá k selhání allograftu stále zůstává nejasná, i když skutečnost, že mechanismy vlivu imunitní odpovědi na allograft existují je nezpochybnitelná.<sup>33</sup> Tato imunitní reakce může být zejména u malých dětí. Velké množství pacientů, kteří podstoupili implantace kryoprezervovaných allograftů do RVOT, následně vyvinuli sérovou pozitivitu pro ALA (anti-human leukocyte antibodies) proti tkáni dárce.<sup>19,24</sup> Ve studii jsme se zaměřili na hodnocení viabilních S100β+ APC se základními počty lymfocytů. Zřejmě je počítání APC daleko od

globálního přístupu k objasnění složitých mechanismů imunogenicity allograftu.<sup>24</sup> Naše výsledky prokázaly významnou negativní korelaci mezi úrovní snížené buněčné viability a počty S100β<sup>+</sup> buněk. Na základě našich výsledků mohou být allografty s lepší buněčnou viabilitou náchylnější k silnější imunitní reakci. Někteří autoři dokonce doporučují dočasnou perioperační imunosupresi.<sup>12</sup> Nicméně se nám nepodařilo prokázat žádnou asociaci mezi počty buněk S100β<sup>+</sup> a dobou studené ischemie, dobou od konce dekontaminace do zahájení kryoprezervace nebo dobou kryoprezervace. Kromě APC se zdá, že viabilní endotelové buňky hrají roli v imunogenicitě allograftu. Podle předchozích studií<sup>34,35</sup> viabilní endotelové buňky projevují vysokou úroveň antigenicity. Na druhé straně snížená buněčná viabilita může negativně ovlivnit dlouhodobé přežití allograftu, pokud je kombinována s vyšším stupněm strukturální degenerace. S ohledem na skutečnost, že obnova extracelulární matrix vyžaduje viabilní intersticiální buňky<sup>24</sup>, použití výrazně degenerovaného allograftu v kombinaci s jeho decelularizací může mít negativní dopad na jeho dlouhodobé přežití. Narušená extracelulární matrix může být základem kalcifikací.<sup>24</sup> Aortální allografty prokázaly významně vyšší stupeň devitalizace ve srovnání s pulmonálními allografty, což by mohlo svědčit o jejich případně nižší imunogenicitě. Několik studií<sup>18,12</sup> udává že aortální typ allograftu je jedním z negativních prediktorů dlouhodobého přežití konduktů. Vysvětlení by mohlo spočívat v odlišné patogenezi časného a pozdního selhání allograftu. Baskett RJ et al.<sup>19</sup> navrhli, že časté výskyty časné dysfunkce allograftu mezi prvními 6 až 12 měsíci po operaci v pediatrické populaci jsou pravděpodobně imunitně zprostředkovány. Selhání allograftů, na druhé straně, může být důsledkem neimunitního degenerativního procesu, pravděpodobně způsobeného vyšším vnitřním množstvím elastinu a vápníku v aortálních allograftech, což je činí náchylnějšími k následné kalcifikaci.<sup>36</sup> V každém případě možnou větší náchylnost pulmonálních allograftů k výše zmíněnému imunitně zprostředkovanému časnému selhání nelze plně potvrdit, protože jsme nenašli žádný statisticky významný rozdíl v počtu zachovaných imunitních buněk S100β<sup>+</sup> ve srovnání s aortálními allografty.

Neustálá snaha o snížení antigenicity vedla k používání decelularizovaných allograftů. Používání decelularizovaných allograftů pro rekonstrukci RVOT u dětí bylo dle dostupných literárních dat spojeno s nízkou incidencí strukturální degenerace allograftů a selhání konduktů. Vzhledem k výsledkům předchozích studií a výsledkům analýzy našeho souboru bychom mohli spekulovat, že děti, které jsou náchylné k silnější imunitní reakci, by mohly mít prospěch z decelularizovaných allograftů od mladších dárců s dobře zachovanou mikroskopickou strukturou. Na druhé straně decelularizace nemusela být vhodnou technikou pro allografty od starších dárců s pokročilejší strukturální degenerací. Jak bylo zmíněno výše, takové allografty v kombinaci s decelularizací mohou představovat zvýšené riziko urychlené degenerace. Tato hypotéza musí být potvrzena dalšími prospektivními studiiemi ve větších souborech s dlouhodobým sledováním příjemců, i když publikovaná data prokázala příznivé výsledky decelularizovaných allograftů v prvním desetiletí po operaci.<sup>38</sup>

## **6. ZÁVĚR**

Retrospektivní analýza představena v této disertační práci splnila vytyčený cíl – výsledky poskytují informace o faktorech ovlivňujících dlouhodobé přežití konduktů, implantovaných do výtokového traktu pravé komory. Studie je součástí dlouhodobých výzkumných projektů Centra pro Vrozené srdeční vady Dětského kardiocentra a Kliniky Kardiovaskulární chirurgie 2.LF UK a FN Motol ve spolupraci s Oddělením transplantací a tkáňové banky FN Motol.

Výsledky naší práce nepotvrdily její hypotézu – analýza prokázala, že dlouhodobé přežití konduktů ve výtokovém traktu pravé komory bylo nepříznivě ovlivněno nejen velikostí použitých konduktů, ale také mladším věkem příjemce, mladším věkem dárce, použitím aortálních allograftů, vstupní diagnózou a typem operace. U sekundárních a následujících intervencí negativním prediktorem přežití konduktu bylo také pohlaví dárce – v tomto případě se výsledky naší studie výrazně liší od výsledků předchozích publikací.



Naše studie také ukázala, že dlouhodobé přežití mezi allografty a xenografty v RVOT při vynikajícím přežití pacientů, nevykazuje statisticky významné rozdíly jak pro primóperace, tak pro sekundární a následná intervence, což znamená, že oba typy konduktů lze v klinické praxi bezpečně používat pro rekonstrukce RVOT.

Závěrem práce lze také konstatovat, že mikroskopické strukturální změny lze detekovat téměř ve všech kryoprezervovaných allograftech. Změny ovlivňují jak cévní stěnu, tak cípy chlopně. Obvykle šlo o mírné změny, které u stěny cévy korelovaly s věkem, výškou, hmotností a povrchem těla dárců. Selhání štěpu je nevyhnutelné, s účastí jak imunitních, tak neimunitních mechanismů. Mikroskopický vzhled dlouhodobých explantátů je často nespecifický a nálezy známek rejekce allograftů jsou vzácné. Vyšetření krátkodobých a střednědobých explantátů může být přínosnější.

Věříme, že závěry výzkumu budou úspěšně aplikovány do klinické praxe a budou užitečné pro řadu kardiochirurgických pracovišť při volbě vhodného typu konduktu implantovaného do výtokového traktu pravé komory.

## **7. SOUHRN**

- Pulmonální allograft je dnes nejčastěji používaný kondukt v RVOT, zejména u malých dětí, díky svým vynikajícím vlastnostem. Tato studie prokazuje bezpečnost a účinnost obou typů konduktů (allograftů a xenograftů) pro primární a/nebo sekundární a následující rekonstrukci RVOT u komplexních vrozených srdečních vad. Navzdory postupné deterioraci, byla funkce konduktu v RVOT výborná s vynikajícím přežitím pacientů.
- Analýza prokázala, že mladší věk příjemce, mladší věk dárce, menší velikost konduktu při implantaci, použití aortálních allograftů, vstupní diagnóza pacientů, typ operace a allografty od mužských dárců v případě reoperace jsou rizikové faktory pro selhání konduktů. Pacienti, kteří podstoupili

Ross/Ross-Konno operaci, prokázali lepší dlouhodobé výsledky ve srovnání s pacienty s vrozenými srdečními vadami.

- Studie ukazuje, že sekundární a následující rekonstrukce RVOT lze provést s dobrým střednědobým a přijatelným dlouhodobým přežitím konduitu s relativně nízkou morbiditou a mortalitou pacientů, i když selhání konduitu a explantace jsou nevyhnutelné.
- Histopatologické hodnocení krátkodobých a střednědobých explantovaných konduitu může přispět k objasnění přesného patogenetického mechanismu selhání alograftu, protože mikroskopická struktura dlouhodobých explantátů je často nespecifická a známky celulární rejekce jsou vzácné.
- U kryoprezervovaných alograftů před implantací jsme pozorovali markantně snížené zachování buněčné struktury, negativně korelující s počtem APC. Více prezervované alografty tak mohou být náchylnější k silnější imunitní rejekci.

## SUMMARY

- The pulmonary allograft is the most commonly used RVOT conduit, especially in small children, due to its excellent characteristics. This study demonstrates the safety and efficacy of both types of conduits (allografts and xenografts) as a cardiovascular substitute for primary and/or reoperative RVOT reconstruction of both simple and more complex congenital cardiac defects. Despite a gradual deterioration, graft function in the RVOT over time and patient survival were excellent.
- The analysis identified younger age of the recipient, the younger age of the donor, the smaller size of the conduit at implantation, the use of aortic allografts, underlying congenital heart disease, the type of surgery and male donor in case of reoperative allograft implantation as risk factors for conduit failure. Patients, who underwent the Ross/Ross-Konno procedure showed

better long-term results in comparison to patients with congenital heart diseases.

- The study shows that reoperative RVOT reconstruction can be performed with good mid-term and acceptable long-term event-free graft survival and can be accomplished with reasonably low morbidity and mortality, although conduit failure and explant are inevitable.
- Histopathological assessment of short-term and intermediate-term explanted conduits may contribute to understanding of exact pathogenic mechanisms of allograft failure as the microscopic appearance of long-term explants is often non-specific and signs of cellular rejection are sparse.
- Allografts before implantation show markedly reduced cellular preservation negatively correlating with the numbers of APC. More preserved CAHV may be therefore prone to stronger immune rejection.

## LITERATURA

1. Brown JW, Ruzmetov M, Vijay P, Rodefeld MD, Turrentine MW. Right ventricular outflow tract reconstruction with a polytetrafluoroethylene monocusp valve: a twelve-year experience. *J Thorac Cardiovasc Surg*. May 2007;133(5):1336-43. doi:10.1016/j.jtcvs.2006.12.045
2. Cc pMJD. Mechanické srdeční chlopně versus bioprotézy. *Interní Med.*; 2006.
3. Warrell DA, Cox TM, Firth JD, Dwight J. *Oxford textbook of medicine : cardiovascular disorders : selected and updated chapters from the Oxford textbook of medicine, fifth edition*. 5th ed. Oxford University Press; 2016:xvii, 668 p. : ill. (b&w, and col.).
4. Fiala R. Mechanické a morfologické vlastnosti lidských chlopenních štěpů v závislosti na délce kryoprezervace. *Mechanické a morfologické vlastnosti lidských chlopenních štěpů v závislosti na délce kryoprezervace* /. 2019;
5. van de Woestijne PC, Mokhles MM, de Jong PL, Witsenburg M, Takkenberg JJ, Bogers AJ. Right ventricular outflow tract reconstruction with an allograft

- conduit in patients after tetralogy of Fallot correction: long-term follow-up. *Ann Thorac Surg.* Jul 2011;92(1):161-6. doi:10.1016/j.athoracsur.2011.02.036
6. Therneau TM, Grambsch PM. *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model.* 1st 2000. ed. Statistics for biology and health. Springer New York : Imprint: Springer; 2000.
  7. Hochberg Y, Benjamini Y. More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat Med.* Jul 1990;9(7):811-8. doi:10.1002/sim.4780090710
  8. Kassambara A, Kosinski M, Biecek P, Fabian S. survminer: Drawing Survival Curves using ‘ggplot2’. *R package version 03.* 2017;1
  9. Mosteller RD. Simplified calculation of body-surface area. *N Engl J Med.* Oct 22 1987;317(17):1098. doi:10.1056/NEJM198710223171717
  10. Halushka MK, Angelini A, Bartoloni G, et al. Consensus statement on surgical pathology of the aorta from the Society for Cardiovascular Pathology and the Association For European Cardiovascular Pathology: II. Noninflammatory degenerative diseases - nomenclature and diagnostic criteria. *Cardiovasc Pathol.* 2016;25(3):247-257. doi:10.1016/j.carpath.2016.03.002
  11. 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.* Aug 2005;80(2):655-63; discussion 663-4. doi:10.1016/j.athoracsur.2005.02.053
  12. Niwaya K, Knott-Craig CJ, Lane MM, Chandrasekaren K, Overholt ED, Elkins RC. Cryopreserved homograft valves in the pulmonary position: risk analysis for intermediate-term failure. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Jan 1999;117(1):141-6; discussion 46-7. doi:10.1016/s0022-5223(99)70479-4
  13. Stark J, Bull C, Stajevic M, Jothi M, Elliott M, de Leval M. Fate of subpulmonary homograft conduits: determinants of late homograft failure. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Mar 1998;115(3):506-14; discussion 514-6. doi:10.1016/S0022-5223(98)70312-5

14. Bielefeld MR, Bishop DA, Campbell DN, Mitchell MB, Grover FL, Clarke DR. Reoperative homograft right ventricular outflow tract reconstruction. *Ann Thorac Surg*. Feb 2001;71(2):482-7; discussion 487-8. doi:10.1016/s0003-4975(00)02521-2
15. da Costa FDA, Etnel JRG, Torres R, Balbi Filho EM, Calixto A, Mulinari LA. Decellularized Allografts for Right Ventricular Outflow Tract Reconstruction in Children. *World J Pediatr Congenit Heart Surg*. 09 2017;8(5):605-612. doi:10.1177/2150135117723916
16. Kalfa DM, Loundou A, Nouaille de Gorce Y, et al. Pulmonary position cryopreserved homograft in non-Ross patients: how to improve the results? *Eur J Cardiothorac Surg*. Dec 2012;42(6):981-7. doi:10.1093/ejcts/ezs248
17. Rodefeld MD, Ruzmetov M, Turrentine MW, Brown JW. Reoperative right ventricular outflow tract conduit reconstruction: risk analyses at follow up. *J Heart Valve Dis*. Jan 2008;17(1):119-26; discussion 126.
18. Tweddell JS, Pelech AN, Frommelt PC, et al. Factors affecting longevity of homograft valves used in right ventricular outflow tract reconstruction for congenital heart disease. *Circulation*. Nov 07 2000;102(19 Suppl 3):III130-5. doi:10.1161/01.cir.102.suppl\_3.iii-130
19. Baskett RJ, Ross DB, Nanton MA, Murphy DA. Factors in the early failure of cryopreserved homograft pulmonary valves in children: preserved immunogenicity? *J Thorac Cardiovasc Surg*. Nov 1996;112(5):1170-8; discussion 1178-9. doi:10.1016/S0022-5223(96)70130-7
20. Meyns B, Jashari R, Gewillig M, et al. Factors influencing the survival of cryopreserved homografts. The second homograft performs as well as the first. *Eur J Cardiothorac Surg*. Aug 2005;28(2):211-6; discussion 216. doi:10.1016/j.ejcts.2005.03.041
21. Lewis MJ, Malm T, Hallbergson A, et al. Long-Term Follow-Up of Right Ventricle to Pulmonary Artery Biologic Valved Conduits Used in Pediatric

- Congenital Heart Surgery. *Pediatr Cardiol.* Jan 2023;44(1):102-115. doi:10.1007/s00246-022-02956-3
22. Kalfa D, Macé L, Metras D, Kreitmann B. How to choose the best available homograft to reconstruct the right ventricular outflow tract. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Oct 2011;142(4):950-3. doi:10.1016/j.jtcvs.2011.03.005
23. Koirala B, Merklinger SL, Van Arsdell GS, et al. Extending the usable size range of homografts in the pulmonary circulation: outcome of bicuspid homografts. *Ann Thorac Surg.* Mar 2002;73(3):866-9; discussion 869-70. doi:10.1016/s0003-4975(01)03559-7
24. Lisy M, Kalender G, Schenke-Layland K, Brockbank KG, Biermann A, Stock UA. Allograft Heart Valves: Current Aspects and Future Applications. *Biopreserv Biobank.* Apr 2017;15(2):148-157. doi:10.1089/bio.2016.0070
25. Fiala R, Kočová P, Kubíková T, et al. 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.* Jun 2019;20(2):221-241. doi:10.1007/s10561-019-09762-x
26. Kubíková T, Kočová P, Fiala R, et al. Histological Composition and Mechanical Properties of Cryopreserved Samples of Aortic and Pulmonary Valves. *Solid State Phenomena.* 12/01 2016;258:341-344. doi:10.4028/[www.scientific.net/SSP.258.341](http://www.scientific.net/SSP.258.341)
27. Schenke-Layland K, Madershahian N, Riemann I, et al. Impact of Cryopreservation on Extracellular Matrix Structures of Heart Valve Leaflets. *The Annals of thoracic surgery.* 04/01 2006;81:918-26. doi:10.1016/j.athoracsur.2005.09.016
28. Kano M, Masuda Y, Tominaga T, et al. Collagen synthesis and collagenase activity of cryopreserved heart valves. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Oct 2001;122(4):706-11. doi:10.1067/mtc.2001.115421
29. Kitagawa T, Masuda Y, Tominaga T, Kano M. Cellular biology of cryopreserved allograft valves. *J Med Invest.* Aug 2001;48(3-4):123-32.

30. Burkert J, Krs O, Vojáček J, et al. Cryopreserved semilunar heart valve allografts: leaflet surface damage in scanning electron microscopy. *Zentralbl Chir.* Aug 2008;133(4):367-73. doi:10.1055/s-2008-1076872
31. Krs O, Slízová D, Burkert J, Spatenka J, Hottmar P. Impact of processing on surface structure of human cardiac valve allografts. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2004;47(2):97-9.
32. Heacox AE, McNally RT, Brockbank KGM. Factors affecting the viability of cryopreserved allograft heart valves. Steinkopff; 1988:37-42.
33. Koolbergen DR, Hazekamp MG, de Heer E, et al. The pathology of fresh and cryopreserved homograft heart valves: an analysis of forty explanted homograft valves. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Oct 2002;124(4):689-97. doi:10.1067/mtc.2002.124514
34. Lupinetti FM, Christy JP, King DM, el Khatib H, Thompson SA. Immunogenicity, antigenicity, and endothelial viability of aortic valves preserved at 4 degrees C in a nutrient medium. *J Card Surg.* Dec 1991;6(4):454-61. doi:10.1111/j.1540-8191.1991.tb00345.x
35. Yankah AC, Wottge HU, Muller-Hermelink HK, et al. Transplantation of aortic and pulmonary allografts, enhanced viability of endothelial cells by cryopreservation, importance of histocompatibility. *J Card Surg.* Mar 1987;2(1 Suppl):209-20. doi:10.1111/jocs.1987.2.1s.209
36. Livi U, Abdulla AK, Parker R, Olsen EJ, Ross DN. Viability and morphology of aortic and pulmonary homografts. A comparative study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* May 1987;93(5):755-60.
37. da Costa FD, Takkenberg JJ, Fornazari D, et al. Long-term results of the Ross operation: an 18-year single institutional experience. *Eur J Cardiothorac Surg.* Sep 2014;46(3):415-22; discussion 422. doi:10.1093/ejcts/ezu013
38. Cleveland DC, Williams WG, Razzouk AJ, et al. Failure of cryopreserved homograft valved conduits in the pulmonary circulation. *Circulation.* Nov 1992;86(5 Suppl):II150-3.

## PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

### Původní vědecké práce in extenso, které jsou podkladem disertace

#### Publikace s IF

- Havova M, Gebauer R, Antonova P, Spatenka J, Burkert J, Fabian O, Modrak M, Rohn V. Clinical experience of reoperative right ventricular outflow tract reconstruction with valved conduits: risk factors for conduit failure in long-term follow-up. *Cell Tissue Bank*. 2024 Mar;25(1):87-98. doi: 10.1007/s10561-023-10088-y. Epub 2023 Apr 21. PMID: 37085639; PMCID: PMC10902091. **(Impact factor - 1.5 (2022), 5 year impact factor 1.7 (2022))**
- Fabian O, Havova M, Gebauer R, Poruban R, Spatenka J, Burkert J, Rohn V, Chaloupecky V, Komarek A, Kala T, Janousek J. Structural Integrity and Cellular Viability of Cryopreserved Allograft Heart Valves in Right Ventricular Outflow Tract Reconstruction: Correlation of Histopathological Changes with Donor Characteristics and Preservation Times. *Braz J Cardiovasc Surg*. 2022 Oct 8;37(5):639–47. doi: 10.21470/1678-9741-2020-0710. PMID: 35072402; PMCID: PMC9670335. **(Impact Factor 1.283)**

#### Publikace bez IF

- Fabián, Ondřej & Havova, Mariia & Gebauer, Roman & Poruban, Rudolf & Materna, Ondřej & Spatenka, Jaroslav & Burkert, Jan & Chaloupecký, Vaclav & Rohn, Vilém & Mikuš, Filip & Obešlová, Eliška & Janoušek, Jan. (2021). Microscopical assessment of explanted allograft heart valves: a limited contribution of histopathology to the pathogenic mechanism of the graft failure in long-term explants. *Cor et Vasa*. 63. 339-344. 10.33678/cor.2020.098.



- Havova, Mariia & Antonova, Petra & Gebauer, Roman & Fabián, Ondřej & Chaloupecký, Václav & Vlk, Lukáš & Hornofová, Ludmila & Rohn, Vilém. (2019). Right ventricular outflow tract obstruction. *Intervenční a akutní kardiologie*. 18. 15-17. 10.36290/kar.2019.045.

### **Původní vědecké práce in extenso bez vztahu k tématu disertace**

#### **Publikace s IF**

- Antonová P, Rohn V, Chaloupecky V, Simkova I, Kaldararova M, Zeman J, Popelova J, Havova M, Janousek J. Predictors of mortality after atrial correction of transposition of the great arteries. *Heart*. 2022 Nov 10;108(23):1881-1886. doi: 10.1136/heartjnl-2021-320035. PMID: 35851319. **(Impact Factor 5.213)**
- Fabian O, Gebauer R, Tomek V, Hornofova L, Havova M, Materna O, Janousek J. Spectrum of postmortem autopsy findings in native and surgically corrected hearts with congenital malformations: a 10-year single-center experience. *Cardiovasc Pathol*. 2021 Mar-Apr;51:107309. doi: 10.1016/j.carpath.2020.107309. Epub 2020 Nov 12. PMID: 33189923. **(Impact Factor 3.7)**

### **Přednášky, plakátová sdělení na odborných setkáních které jsou podkladem disertace**

- XXVI. výroční sjezd České kardiologické společnosti [ 05/2018 ] Způsoby rekonstrukce RVOT u dětí a dospělých s vrozenou srdeční vadou
- VIII. sjezd České společnosti kardiovaskulární chirurgie [ Brno, 11/2018 ] Dlouhodobý osud alograftů v RVOT
- Studentská vědecká konference 2.LF UK [ Praha, 2020 ] Dlouhodobý osud alograftů v RVOT

- XI. Sjezd České společnosti kardiovaskulární chirurgie [ Brno, 10/2022 ]  
Clinical experience of reoperative right ventricular outflow tract reconstruction with allografts and xenografts

**Přednášky, plakátová sdělení na odborných setkáních bez vztahu k tématu disertace**

- XI. Sjezd České společnosti kardiovaskulární chirurgie [ 10/2022 ] Chirurgie dialyzačních přístupů. Naše zkušenosti v FN Motol.
- XI. Sjezd České společnosti kardiovaskulární chirurgie [ Brno, 10/2022 ]  
Entrapment syndrom arteria poplitea. Klinické zkušenosti.
- XII. Symposium České společnosti pro cévní přístup [ Olomouc, 11/2023 ]  
Chirurgické řešení pseudoaneurysmatu brachiocephalického AV zkratu – kazuistika.