

## Wpływ rozproszenia złogów wapnia na trwałość allogennych aortalnych zastawek serca. Fazowość mineralizacji

Influence of calcium deposits dispersion on aortic leaflets. Phases of mineralization

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Histologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie  
Kierownik: Prof. dr hab. med. *Tadeusz Cichocki*

<sup>2</sup>Zakład Biofizyki Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie,  
Kierownik: Prof. dr hab. *Eugeniusz Rokita*

<sup>3</sup>Klinika Chorób Serca i Naczyń Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie  
Kierownik: Prof. dr hab. med. *Wiesława Tracz*

<sup>4</sup>Klinika Chirurgii Serca, Naczyń i Transplantologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie,  
Kierownik: Prof. dr hab. med. *Jerzy Sadowski*

### Dodatkowe słowa kluczowe:

allograft  
zastawki aortalne  
mineralizacja  
histologia

### Additional key words:

allograft  
aortic valve  
mineralization  
histology

Celem pracy było porównanie zawartości wapnia i rozproszenia złogów wapniowych w płatkach allogennych aortalnych zastawek serca usuniętych z powodu dysfunkcji oraz analiza związku obydwu parametrów z trwałością allograftów. Mineralizacja była oceniana histochemicznie (metoda von Kossa) oraz fizykochemicznie metodą absorpcji atomowej (AAS). Morfometrycznie w oparciu o komputerowy analizator obrazów mikroskopowych mierzono powierzchnię płatka objętą procesem wapnienia. Metodą AAS oceniano zawartość wapnia i fosforu w suchej masie płatka i wyliczono stosunek Ca/P. Otrzymane wyniki posłużyły do obliczenia współczynnika rozproszenia wapnia w badanych płatkach w oparciu o wzór:  $D_c = 1 / Ca_c / A_p$ , gdzie  $Ca_c$  = zawartość wapnia w suchej masie;  $A_p$  = procent powierzchni płatka objęty wapnieniem. Stwierdzono dwufazową korelację zawartości wapnia i powierzchni płatka objętej mineralizacją. Początkowo następuje szybkie powiększanie się obszaru, w którym osadzają się związki wapnia (rosnące rozproszenie Ca), stopniowo przechodząc w proces wysycania wapniem obszarów uprzednio objętych procesem kalcyfikacji, co niekorzystnie wpływa na trwałość allograftu. Trwałość zastawek korelowała ze stopniem rozproszenia wapnia ( $D_c$ ) ( $p < 0,001$ ), natomiast nie stwierdzono istotnego związku trwałości allograftów z całkowitą zawartością wapnia. W 93,8% przypadków zastawek o niskiej trwałości (<11,6 lat) stwierdzono obniżony stopień rozproszenia wapnia ( $D_c$ ). Uzyskane wyniki wskazują, że obniżenie stopnia rozproszenia wapnia prowadzi do skrócenia czasu funkcjonowania graftu i jest wskaźnikiem lepiej określającym trwałość allograftu niż całkowita zawartość wapnia.

This investigation was aimed at comparison of calcium content and calcium dispersion in allogenic aortic valve leaflets removed due to dysfunction, to establish the influence of both parameters on graft durability. Calcification was assessed histochemically (von Kossa) as well as physicochemically using atomic absorption spectroscopy (AAS). The morphometric data (leaflet area involved in the calcification process) were obtained by computer-assisted image analysis system. The dry weight content of leaflet calcium and phosphorus were assessed by atomic absorptive spectroscopy (AAS) and Ca/P ratio was calculated. Calcium dispersion coefficient ( $D_c$ ) was established according to the formula:  $D_c = 1 / Ca_c / A_p$ , where  $Ca_c$  = calcium dry weight concentration;  $A_p$  = percent of leaflet area involved in calcification. We found biphasic correlation between calcium concentration and area involved in calcification. The first one was characterized by rising dispersion of calcium deposits while for the second one saturation with hydroxyapatite of formerly calcified areas was predominant, negatively influencing graft durability. Allograft durability was correlated with calcium dispersion ( $D_c$ ) ( $p < 0.001$ ), while no significant correlation was found with calcium concentration. Decreased  $D_c$  was characteristic for 93.8% of low durability grafts (<11.6 years). Our results suggest that lowered calcium dispersion decreasing allograft lifetime and is a better predictor of allograft durability than the total calcium content.

Adres do korespondencji:  
Dr n. med. Grzegorz Lis  
Katedra Histologii CM UJ  
31-034 Kraków, ul. Kopernika 7  
Tel.: (+12) 422 70 27  
e-mail: mmlis@cyf-kr.edu.pl

### Wstęp

Allogenne aortalne zastawki serca są od blisko czterdziestu lat z powodzeniem stosowane w leczeniu wad zastawkowych [22,26]. Stanowią interesującą alternatywę

dla zastawek sztucznych zważywszy na ich naturalny charakter, cichą pracę, czy brak konieczności stosowania antykoagulantów. Pozyskiwane są ze zwłok osób zmarłych z przyczyn losowych, od dawców wielonarzą-

dowych lub też w trakcie przeszczepu serca. Sposób przygotowania i przechowywania, a także technika operacyjna z biegiem lat ulegała licznym zmianom, które doprowadziły do zwiększenia trwałości allograftów i wydłużenia czasu funkcjonowania do około 15-20 lat obecnie [4,6,15,20,22,27,32]. Wciąż jednak istotnym problemem jest proces postępującej biodegradacji przeszczepionej tkanki, przejawiający się między innymi zanikiem śródbłonna i komórek zrębu, zmianami w strukturze i organizacji włókien kolagenowych i elementów macierzy, naciekami zapalnymi oraz mineralizacją [7,11,12,18,21].

Biominieralizacja jest złożonym procesem obejmującym powstawanie jąder krystalizacji (nukleację), wzrost i dojrzewanie kryształów [23]. Istotny wpływ na charakter i czas rozwoju powyższych etapów wywierają biologicznie aktywne związki (cytokiny, białka enzymatyczne, glikoproteiny macierzy) produkowane i wydzielane przez komórki własne śródbłonna i zrębu zastawki, jak również komórki zapalne [2,10,28]. W przypadku przewagi czynników promujących mineralizację prowadzi to do zwiększania obszaru objętego procesem mineralizacji i/lub wysycania związkami wapnia powstałych uprzednio ognisk.

Obecność kalcyfikacji allogennych aortalnych zastawek serca jest różnie oceniana w publikowanych pracach. Jest to wynikiem stosowania różnych (często nieporównywalnych ze sobą) technik badawczych. Większe, silniej wysyczone wapniem obszary są łatwo wykrywane echokardiograficznie czy mikroskopowo stosując rutynowe techniki. Jednak stwierdzenie obecności mineralizacji drobinowej występującej w formie rozszaniach ziaren nie jest łatwe i wymaga zastosowania metod histochemicznych lub fizykochemicznych. Stąd stosunkowo duże różnice w odsetku zastawek zaliczanych do zmineralizowanych występujące w badaniach prowadzonych różnymi metodami (*in vitro*, *in vivo*) [8,16,18,25].

Jakkolwiek negatywny wpływ wapnienia na trwałość allograftów jest powszechnie podkreślany, to jednak obserwowane różnice w charakterze, rozprzestrzenieniu i dynamice zmian mineralizacyjnych, uzasadniają prowadzenie dalszych badań w tym zakresie.

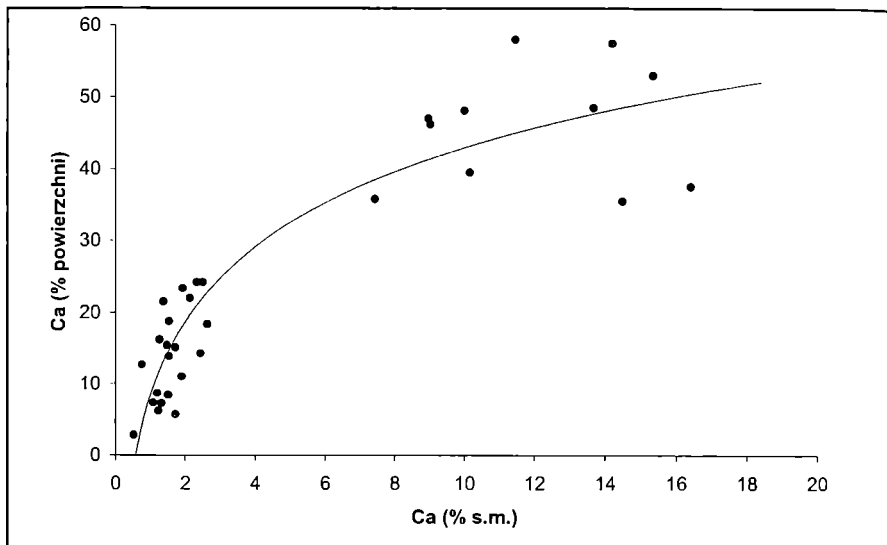
Celem pracy było porównanie zawartości wapnia w płatkach allogennych aortalnych zastawek serca usuniętych w czasie reoperacji, ze stopniem rozproszenia w tkance, w celu określenia związku obu parametrów z trwałością allograftów.

### Materiał i metodyka

Badany materiał pochodził z Kliniki Chirurgii Serca i Naczyń Instytutu Kardiologii Collegium Medicum UJ. Przedmiotem analizy były płatki 32 allogennych zastawek aortalnych, usuniętych z powodu dysfunkcji. W chwili wszczepienia allograftów wiek pacjentów wynosił od 13 do 61 lat (średnio  $37,4 \pm 11,47$  lat), natomiast w chwili reoperacji od 20 do 69 lat (średnio  $49 \pm 12$  lat). Dysfunkcja badanych zastawek homogennych wystąpiła w czasie od 28 do 244 miesięcy (średnio  $139,2 \pm 52,14$  m-ca;  $11,6$  lat) po wszczepieniu.

### Metodyka przygotowania i wszczepiania allograftów

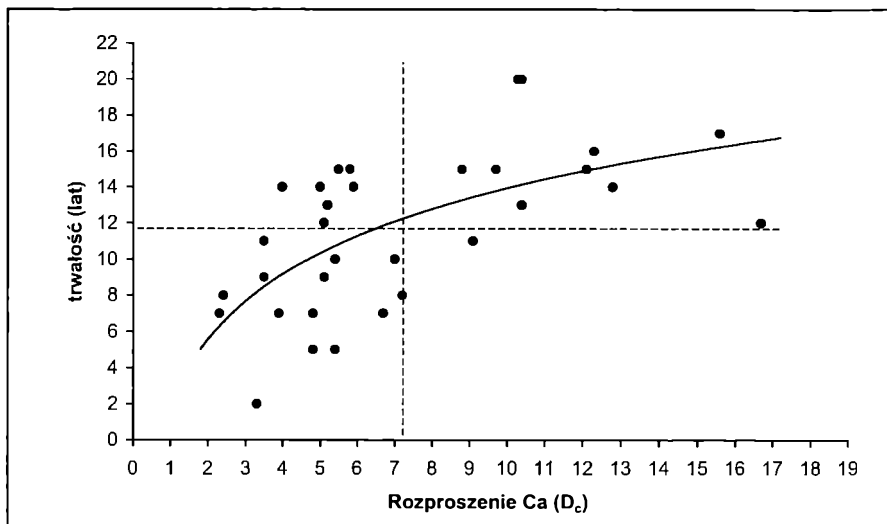
Wszczepiane zastawki pobierane były w trakcie rutynowych sekcji w Zakładzie Medycyny Sądowej CM UJ



Rycina 1

Dwufazowy związek pomiędzy zawartością wapnia w płatkach allogennych aortalnych zastawek – wyrażoną jako procent suchej masy (s.m.), a obszarem płatka objętym procesem wapnienia – wyrażonym jako procent całkowitej badanej powierzchni.

Biphasic relationship between the calcium content – expressed as a percent of dry weight (d.w.) and the area involved in calcification – expressed as a percent of the total examined leaflet area.



Rycina 2

Zależność między trwałością allogennych aortalnych zastawek serca – wyrażoną w latach, a stopniem rozproszenia w nich depozytów wapniowych – wyrażonym współczynnikiem rozproszenia Ca (Dc). Liniami przerywanymi zaznaczono średnią trwałość (11,6 lat) i średnie rozproszenie Ca ( $D_c = 7,2$ ).

The relationship between durability (years) and dispersion of calcium deposits (expressed as Ca dispersion coefficient (Dc)) of the explanted aortic allogenic heart valves. Dashed lines present the mean value of allograft durability (11.6 years) and the mean Ca dispersion coefficient ( $D_c = 7.2$ ).

od osób zmarłych z przyczyn losowych i przechowywane w Banku Zastawek Kliniki Chirurgii Serca i Naczyń przez okres do 4 tygodni w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$  w płynach odżywczych z dodatkiem antybiotyków. Dokładny sposób przygotowania i skład płynów był zgodny z podanym przez Yacoub'a i wsp. [32] z późniejszymi modyfikacjami i został przedstawiony w pracy Dziatkowiaka i wsp. [5].

Zastawki były wszczepiane metodą Rossa [27], zmodyfikowaną następnie przez Barrat-Boyesa [1], a od 1986 roku według zmodyfikowanej metody Dziatkowiaka [4,6].

### Badania mikroskopowe i fizykochemiczne

Po wstępnej ocenie makroskopowej usunięte płatki dzielono na pół z przeznaczeniem odpowiednio do badań mikroskopowych i spektrometrycznych. Do badań mikroskopowych materiał utrwalano w formaldehydzie 4% przez okres 5 dni w temperaturze pokojowej, zalepiano w parafinie i krojono przy użyciu mikrotomu na skrawki o grubości 7 mm, wzdłuż płaszczyzny poprzecznego przekroju biegnącego promiennie od pierścienia do wolnego brzegu płatka. Po odparafinowaniu skrawki barwiono przeglądowo hematoksyliną i eozyną oraz

metodą von Kossa w celu lokalizacji związków wapniowych [24]. Do oceny rozległości procesu mineralizacji posłużono się komputerowym analizatorem obrazów mikroskopowych (IMAGER-512; IMAL, Łódź), zainstalowanym na komputerze klasy IBM PC i współpracującym z kamerą CCD K 17 (WZT – Warszawa), zamontowaną na mikroskopie optycznym JENAMED (Carl Zeiss Jena). W trzech rejonach płatka (przyspoidlowym, centralnym, pośrednim) mierzono pole powierzchni skrawka objęte procesem mineralizacji (dodatnia reakcja von Kossa) i przedstawiono je jako odsetek całej badanej powierzchni.

Do badań fizykochemicznych materiał zabezpieczano w alkoholu etylowym 99,6%. W celu wykonania pomiarów płatki odtłuszczano w mieszaninie chloroformu i metanolu (3:1), po czym suszono w komorze próżniowej przez 48 godzin. Suchy materiał proszkowano w młynku żelaznym, a następnie odważano 2 mg które rozpuszczano w mieszaninie kwasu nadchlorowego (8 ml) i azotowego (2 ml). Otrzymany roztwór podgrzewano przez 5 godzin do temperatury  $180^{\circ}\text{C}$  i po uzupełnieniu wodą destylowaną do objętości 25 ml badano w spektrometrze AAS. Spektrometria metodą absorpcji atomo-

wej posłużyła do określenia zawartości wapnia i fosforu w badanych płatkach jako wskaźnika stopnia ich mineralizacji. Z uzyskanych danych wyliczono stosunek Ca/P dający informację o chemicznym charakterze złożeń.

#### Współczynnik rozproszenia wapnia ( $D_c$ )

Na podstawie wyników uzyskanych przy zastosowaniu metod mikroskopowych i fizykochemicznych wyliczono współczynnik rozproszenia wapnia ( $D_c$ ), zgodnie z następującym wzorem:

$$D_c = 1 / (Ca/A_p)$$

gdzie

$Ca_c$  = zawartość wapnia w suchej masie;

$A_p$  = procent powierzchni płatka objęty mineralizacją.

W analizie statystycznej zastosowano test *Manna-Whitneya*. Dla oceny zależności między rozprzeszczeniem mineralizacji, a zawartością wapnia w tkance oraz związku parametrów mineralizacji z trwałością allograftów określano współczynnik korelacji (R), jak również przeprowadzano analizę regresji badając kształt stwierdzonego związku między zmiennymi. Za znamienne uznawano różnice przy poziomie istotności  $p < 0,05$ .

## Wyniki

### Ocena makroskopowa i histologiczna

Obserwowanej makroskopowo deformacji i destrukcji płatków (tabela 1), towarzyszyło znaczne uszkodzenie ich mikrostruktury. W 19 przypadkach (59,4%) nastąpiło niemal zupełne zatarcie budowy warstwowej płatka. W pozostałych 13 zastawkach (40,6%) struktura warstwowa była w różnym stopniu zachowana. Wszystkie zastawki niemal całkowicie pozbawione były śródbłonka, a powierzchnia płatków była nierówna, postrzępiona, pokryta nitkami włókniaka i mikrozakrzepami. W zewnętrznych warstwach *fibrosa* i *ventricularis* jak również pomiędzy poszczególnymi warstwami widoczne były liczne rozwarstwienia tkanki często wypełnione masami krwinkowymi lub złożami włókniaka. Komórki zrębu rozmieszczone były nierównomiernie przy czym we wszystkich przypadkach występowały obszary płatka pozbawione całkowicie komórek. Jedyne w 6 przypadkach (18,75%) nie stwierdzono w płatkach nacieku zapalnego. W czterech dalszych przypadkach (12,5%) był on bardzo ograniczony. W pozostałych 22 badanych płatkach (68,75%) mieszane nacieki komórkowe stanowiły istotny element obrazu. Dominowały w nich komórki jednojądrzaste (limfocyty, histocyty, komórki plazmatyczne), w 4 przypadkach (12,5%) z dużym udziałem komórek wielojądrzastych.

### Mineralizacja

Obecność mineralizacji różnego stopnia stwierdzono histochemicznie oraz metodą absorpcji atomowej we wszystkich badanych zastawkach. Zawartość wapnia w suchej masie wahała się od 0,52% do 16,4% (MED = 2,03%). Obszar objęty mineralizacją wynosił od 2,8% do 58% powierzchni płatka (MED = 20,15%).

Stosunek Ca/P w badanym materiale wynoszący średnio 2,57 wskazuje, że głównym minerałem obecnym w badanym materiale był hydroksyapatyt, typowa dla tkanek twardego człowieka forma fosforanu wapnia. W 14 przypadkach jednak stosunek Ca/P był znacząco wyższy (6,62, max/min = 5,85-9,58) niż w pozostałej grupie (2,025, max/min = 0,56-2,6). Wskazywało to na obecność w tej grupie innych niż hy-

Tabela 1

### Cechy makroskopowe usuniętych allograftów.

Macroscopic features of explanted allografts.

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

droksyapatyt soli wapniowych (amorficzne, ośmiowapniowe), w tym również niesfosforanowych (np. węglany, mleczany).

Istotny związek ( $R=0,89$ ) zawartości wapnia w suchej masie z rozległością procesu wapnienia został przedstawiony na wykresie (rycina 1). Początkowo następuje szybkie powiększanie się obszaru, w którym osadzają się związki wapnia (rosnące rozproszenie Ca), stopniowo przechodząc w proces wysycania wapniem obszarów uprzednio objętych procesem kalcyfikacji. W badanym materiale obecność silnie wysycanych wapniem obszarów stwierdzono w 13 przypadkach, głównie w miejscach uszkodzeń struktury płatka (ogniskowe skrzepiny, zwłóknienia zapalne). Za wyjątkiem jednego, we wszystkich powyższych przypadkach stosunek Ca/P wynoszący około 2 wskazuje, że głównym minerałem złożeń jest hydroksyapatyt.

### Stopień rozproszenia złożeń wapniowych ( $D_c$ )

Wyliczony współczynnik rozproszenia wapnia ( $D_c$ ) wynosił od 2,3 do 16,7, średnio  $7,2 \pm 3,35$ .

Czas funkcjonowania wszczepionej zastawki korelował ze stopniem rozproszenia ( $D_c$ ) wapnia ( $R = 0,6$ ;  $p < 0,001$ ) (rycina 2). Nie stwierdzono natomiast statystycznie istotnego związku trwałości graftu z zawartością w nim wapnia. Obniżony stopień rozproszenia ( $D_c < 7,2$ ) stwierdzono w 93,8% przypadków graftów o niskiej trwałości ( $p < 0,001$ ). Wśród graftów o wysokiej trwałości 59% zastawek cechowało się wysokim stopniem rozproszenia ( $D_c > 7,2$ ), choć należy zaznaczyć, że jedynie w dwóch przypadkach był on na poziomie wyższym niż obserwowanym średnio w badanych przez nas prawidłowych zastawkach aortalnych (ok. 13,7) (dane niepublikowane).

### Dyskusja

Porównanie wyników otrzymanych z zastosowaniem dwóch metod (histochemicznej i fizykochemicznej) oceniających różne aspekty mineralizacji umożliwiło wykazanie, że proces wpływ procesu mineralizacji allograftów aortalnych zastawek serca na ich trwałość jest różny, zależny od charakterystyki samego zjawiska, które

przebiega w dwóch fazach o odmiennym znaczeniu klinicznym. W pierwszej fazie dominuje rozprzeszczenie się obszaru, w którym gromadzą się sole wapniowe, przy stosunkowo niewielkim wzroście zawartości Ca w tkance. Podłożem dla wiązania wapnia mogą być tu fizykochemiczne zmiany w macierzy organicznej płatka (np. w strukturze kolagenu, składzie białek niekolagenowych), będące efektem określonych procedur pozyskiwania i przechowywania allograftów do czasu wszczepienia [9,23]. Klinicznie jest to proces niezauważalny, i w naszej opinii, nie można mu przypisywać jednoznacznie negatywnego wpływu na trwałość graftu. Wydaje się, że scharakteryzowana powyżej pierwsza faza mineralizacji odzwierciedla przebiegający w przyspieszonym tempie naturalny proces zwiększania zawartości wapnia w tkance starzejącej się zastawki.

W drugiej fazie, która może być badana klinicznie, dominuje wysycanie wapniem tkanki przy znacznie wolniejszej ekspansji terytorialnej zjawiska. Wyraża się to obniżeniem współczynnika rozproszenia wapnia ( $D_c$ ). Depozytami wapniowymi tworzonymi w tym etapie są głównie hydroksyapatyty. Wskazuje na to stosunek Ca/P wynoszący około 2 w przypadku badanych przez nas zastawek, w których rozwinął się ten etap mineralizacji. Wydaje się, że podłożem dla rozwoju tej fazy mineralizacji mogą być lokalne uszkodzenia mechaniczne płatka oraz procesy zapalne. Choć rola czynnika mechanicznego w degeneracji zastawek allograftów i rozwoju mineralizacji jest dawno dostrzeżona, to jednak wciąż budzi pewne kontrowersje. Vesely i wsp. w swoich badaniach nad wytrzymałością zastawek biologicznych postulują, że rozwój zwapnień jest zjawiskiem wtórnym w stosunku do mechanicznych uszkodzeń tkanki [31]. Stwierdzili oni, że umiarkowane stopnia mineralizacja płatka nie powodowała zmniejszenia jego elastyczności, natomiast przedarcia obecne w umiarkowanie zwapniałych płatkach były zlokalizowane w miejscach, w których nie stwierdzano procesów mineralizacyjnych. Potwierdza to nasze obserwacje, że zastawki o umiarkowanie rozległym obszarze mineralizacji wykazują większą trwałość niż zastawki o niewielkim obszarze mi-

neralizacji [14]. W badanym materiale perforacji płatka były częściej obserwowane w płatkach atroficznych, bez makroskopowych cech mineralizacji. Może to wskazywać paradoksalnie, że umiarkowany poziom uwapnienia w pewien sposób wywiera korzystny wpływ na integralność struktury płatka [30,31].

W obecnej pracy wykazano, że czas funkcjonowania graftu nie zależy bezpośrednio od zawartości wapnia w tkance, natomiast jest skorelowany ze stopniem rozproszenia krystalizacji. W badanym przez nas materiale nawet stosunkowo silnie uwapnione zastawki wykazywały znaczną trwałość pod warunkiem, że stopień rozproszenia wapnia był wysoki. Istotne obniżenie stopnia rozproszenia wapnia – charakterystyczne dla drugiej fazy rozwoju mineralizacji – może być efektem powstawania ognisk zapalnych, w których aktywność komórkowa (makrofagi, granulocyty, limfocyty, fibroblasty) prowadzi do wytworzenia macierzy bardziej podatnej na mineralizację (przewaga promotorów mineralizacji) niż w prawidłowych płatkach (przewaga inhibitorów i/lub supresja promotorów mineralizacji), a nawet niż, w płatkach w pierwszej fazie mineralizacji [2,29].

Jak wynika z ostatnio publikowanych badań [10,13,17], procesy zapalne wydają się być istotnym czynnikiem w rozwoju zarówno naczyniowych zmian miażdżycowych jak i destrukcji zastawek allogennych. Z uwagi na to podejmowane są badania nad wpływem na stan zastawek farmakoterapii przeciwzapalnej i hipolipemizującej [3,19]. Obecnie nie dysponujemy jednak wynikami które jednoznacznie wskazywałyby na korzystny wpływ terapii przeciwzapalnej na trwałość allogennych zastawek aortalnych.

## Wnioski

Mineralizacja allogennych aortalnych zastawek serca jest dwufazowa. Pierwsza faza charakteryzuje się wysoką dynamiką ekspansji terytorialnej, natomiast w drugiej fazie dominuje wysycanie tkanki związkami wapnia (głównie hydroksyapatytem) i obniżenie stopnia rozproszenia Ca, co prowadzi do skrócenia czasu funkcjonowania graftu. Stopień rozproszenia depozytów wap-

niowych jest wskaźnikiem lepiej określającym trwałość allograftu niż całkowita zawartość wapnia.

## Piśmiennictwo

1. **Barrat-Boyes B.C., Roche A.H.G., Whitlock R.M.L.:** Six years review of the results of freehand aortic valve replacement using an antibiotic sterilised homograft valve. *Circulation* 1977, 55, 353.
2. **Bostrom K.:** Insights into the mechanism of vascular calcification. *Am. J. Cardiol.* 2001, 88, (Suppl.), 20E.
3. **Dichtl W., Dulak J., Frick M. et al.:** HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003, 23, 58.
4. **Dziatkowiak A., Pfitzner R., Andres A. et al.:** Modified techniques for subcoronary insertion of allografts. W: *Cardiac Valve Allografts 1962-1987*. Yankah AC [Red.]. Steinkopf Verlag. Darmstadt 1988, 141-7.
5. **Dziatkowiak A., Pfitzner R., Malinowski J. i wsp.:** Bank homogennych zastawek serca dla kardiocirurgii. Doświadczenia własne na 1376 zastawkach. Wybrane Zagadnienia z Chirurgii. Wiechowski S. [Red.] Fundacja PPCh 1996, 391-3.
6. **Dziatkowiak A., Pfitzner R., Sadowski J. et al.:** Aortic root replacement using antibiotic sterilized "fresh" unstented homografts - modification of annulus enforcement. [W:] *Biologic and Bioprosthetic Valves*. Bodnar E, Yacoub M. [Red.] Yorke Medical Books, 1986, 314-20.
7. **Gall K.L., Smith S.E., Willmette C.A., O'Brien M.F.:** Allograft heart valve viability and valve-processing variables. *Ann. Thorac. Surg.* 1998, 65, 1032.
8. **Gavin J.B., Herdson P.B., Monro J.L., Barratt-Boyes B.G.:** Pathology of antibiotic-treated human heart valve allografts. *Thorax* 1973, 28, 473.
9. **Giachelli C.M.:** Ectopic calcification. Gathering hard facts about soft tissue mineralization. *Am. J. Pathol.* 1999, 154, 671.
10. **Giachelli C.M.:** Ectopic calcification: new concepts in cellular regulation. *Z. Kardiol.* 2001, 90, S3, III31.
11. **Grunkeimer G.L., Bodnar E.:** Comparison of structural valve failure among different models of homograft valves. *J. Heart Valve Dis.* 1994, 3, 556.
12. **Koolbergen D.R., Hazekamp M.G., 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.* 2002, 124, 689.
13. **Libby P., Ridker P.M., Maseri A.:** Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002, 105, 1135.
14. **Lis G.J., Rokita E., Podolec P. et al.:** Mineralization and organic phase modifications as contributory factors of accelerated degeneration in homograft aortic valves. *J. Heart Valve Dis.* 2003, 12, 741.
15. **Lund O., Chandrasekaran V., Grocott-Mason R. et al.:** Primary aortic valve replacement with allografts over twenty-five years: valve-related and procedure-related determinants of outcome. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1999, 117, 77.
16. **Maxwell L., Gavin J.B., Barratt-Boyes B.G.:** Differences between heart valve allografts and xenografts in the incidence and initiation of dystrophic calcification. *Pathology* 1989, 21, 5.
17. **Meir K., Leitersdorf E., Hennekens C.H. et al.:** Inflammation in atherosclerosis: Causal or casual? The need for randomized trials. *Am. Heart J.* 2003, 146, 199.
18. **Mitchell R.N., Jonas R.A., Schoen F.J.:** Structure-Function correlations in cryopreserved allograft cardiac valves. *Ann. Thorac. Surg.* 1995, 60, S108.
19. **Mohler E.R. III.:** Are atherosclerotic process involved in aortic valve calcification? *Lancet* 2000, 356, 524.
20. **Ng S.K., O'Brien M.F., Harrocks S., McLachlan G.J.:** Influence of patient age and implantation technique on the probability of re-replacement of the homograft aortic valve. *J. Heart Valve Dis.* 2002, 11, 217.
21. **Niwaya K., Sakaguchi H., Kawachi K., Kitamura S.:** Effect of warm ischemia and cryopreservation on cell viability of human allograft valves. *Ann. Thorac. Surg.* 1995, 60, S114.
22. **O'Brien M.F., Stafford E.G., Gardner M.A.H. et al.:** Allograft aortic valve replacement: long-term follow-up. *Ann. Thorac. Surg.* 1995, 60, S65.
23. **Pawlikowski M., Pfitzner R.:** Mineralizacja serca i dużych naczyń. Wydawnictwo IGSMiE PAN. Kraków 1999.
24. **Pearse A.G.:** *Histochemistry*. Churchill Livingstone. Edinburgh & London. [Vol.1] 1968, [Vol. 2] 1972.
25. **Podolec P., Rokita E., Cichocki T. i wsp.:** Mineralizacja allogennych zastawek aortalnych serca. *Przegl. Lek.* 1998, 55, 442.
26. **Ross D.:** Homograft replacement of the aortic valve. *Lancet* 1962, 2, 487.
27. **Ross D.N., Martelli V., Wain W.H.:** Allograft and autograft valves used for aortic valve replacement. [W:] *Tissue heart valves*. Ionescu M. Butterworths. London 1979.
28. **Schoen F.J.:** *The Heart*. [W:] Cotran R.S., Kumar V.K., Collins T, eds. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders, 1999, 543-599.
29. **Srivatsa S.S., Harrity P.J., Maercklein P.B. et al.:** Increased cellular expression of matrix proteins that regulate mineralization is associated with calcification of native human and porcine xenograft bioprosthetic heart valves. *J. Clin. Invest.* 1997, 99, 996.
30. **Tomazic B.B., Edwards W.D., Schoen F.J.:** Physicochemical characterization of natural and bio-prosthetic heart valve calcific deposits: Implication for prevention. *Ann. Thorac. Surg.* 1995, 60, S322.
31. **Vesely I., Barber J.E., Ratliff N.B.:** Tissue damage and calcification may be independent mechanisms of bioprosthetic heart valve failure. *J. Heart Valve Dis.* 2001, 10, 471.
32. **Yacoub M., Kittle G.:** Sterilization of valve homografts by antibiotic solutions. *Circulation* 1970, 41, 29.