

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **05.06.2012**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18.12.2013**
(Věstník č. 51/2013)

(21) Číslo dokumentu:

2012-376

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

A61F 2/24 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)

(71) Přihlašovatel:

Institut klinické a experimentální medicíny, Praha 4, CZ
Straka František MUDr., Praha 4, CZ
Mašín Jaroslav Ing., Čestlice, CZ
Schorník David MUDr., Praha 8, CZ

(72) Původce:

Straka František MUDr., Praha 4, CZ
Pirk Jan Prof. MUDr., DrSc., Praha 3, CZ
Mašín Jaroslav Ing., Čestlice, CZ
Schorník David MUDr., Praha 8, CZ

(74) Zástupce:

PatentCentrum Sedlák a Partners s.r.o., Husova 5, České
Budějovice, 37001

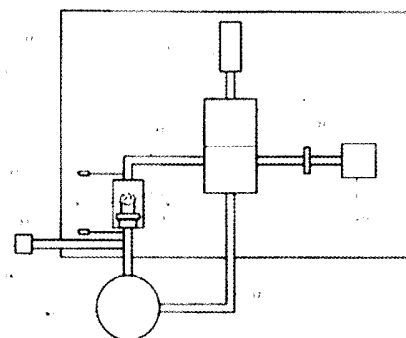
(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob výroby perikardiální náhrady srdeční
chlopně, perikardiální náhrada srdeční
chlopně vyrobená tímto způsobem, zařízení
pro kondicioning a modifikaci tkáně
autologního perikardu pro perikardiální
náhradu srdeční chlopně**

(57) Anotace:

Perikardiální náhrada (1) srdeční chlopně je vyrobena z živé tkáně autologního perikardu obsahující živé perikardiální intersticiální buňky a živou perikardiální extracelulární matici následujícím způsobem: nejprve se zjistí velikost a tvar pacientovy patologické vlastní chlopně metodou trojrozměrné transesofageální echokardiografie v reálním čase, nebo metodou počítačové tomografie, nebo metodou magnetické rezonance, a následně se z jediného dílu živé vlastní tkáně autologního perikardu pacienta, obsahující živé perikardiální intersticiální buňky a živou extracelulární matici, vyrobí perikardiální náhrada (1) srdeční chlopně určená pro implantaci se stentem (2) nebo bez stentu, přičemž velikost a tvar chlopní náhrady (1) se volí tak, aby odpovídaly velikosti a tvaru pacientovy vlastní chlopně a kořene aorty. Předmětem vynálezu je dále zařízení (5) pro kondicioning a modifikaci živé autologní tkáně perikardu tvořící perikardiální náhradu (1) srdeční chlopně, které zahrnuje pulzní čerpadlo (6) pro pohon buněčného kultivačního média, nádrž (7) pro řízení kapacity kapaliny regulující činnost perikardiální náhrady (1) srdeční chlopně, komoru (8) pro uložení

perikardiální náhrady (1) srdeční chlopně, v níž je uspořádán nosič (9) perikardiální chlopní náhrady (1) a výměník (10) plynu pro vpouštění CO₂ do buněčného kultivačního média. Nádrž (7) pro řízení kapacity kapaliny, komora (8) pro uložení perikardiální náhrady (1) srdeční chlopně a výměník (10) plynu jsou uloženy v inkubátoru (11) s vnitřní atmosférou tvořenou vzduchem smíchaným s 5 % CO₂o teplotě 36 až 37 °C a jednotlivé součásti zařízení (5) jsou vzájemně propojeny hadicovým systémem (12).



CZ 2012 - 376 A3

Způsob výroby perikardiální náhrady srdeční chlopně, perikardiální náhrada srdeční chlopně vyrobená tímto způsobem, zařízení pro kondicioning a modifikaci tkáně autologního perikardu pro perikardiální náhradu srdeční chlopně

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu výroby perikardiální náhrady srdeční chlopně, srdeční chlopně vyrobená tímto způsobem, zařízení pro kondicioning a modifikaci tkáně autologního perikardu pro perikardiální náhradu srdeční chlopně.

Dosavadní stav techniky

Implantace chlopnenních náhrad je stále častějším chirurgickým výkonem. Jedním z hlavních témat kardiologie a příbuzných oborů se proto stává výroba chlopnenních náhrad.

Běžně se jako chlopnenní náhrady používají celé prasečí chlopně nebo se cípy chlopnenních náhrad vyrábí z hovězího perikardu. Nevýhoda takto získaných chlopní spočívá v tom, že jsou pro organismus pacienta cizí, imunogenní. Organismus se jejich přijetí brání, což s sebou přináší rozvoj degenerativních změn a nutnost reoperace pro poškození těchto chlopní. Aby bylo zabráněno infekcím a rozvoji degenerativních změn, je nutné podrobit xenogenní chlopně přísným sterilizačním postupům za použití síťovacích činidel a jiných chemických ošetření, např. stabilizace v glutaraldehydu, takže při implantaci do srdce pacienta je tkáň takové chlopně mrtvá. Taková tkáň je inertní vůči novému prostředí, neumožňuje infiltraci a kolonizaci hostitelskými buňkami, což je nutné pro remodelování a udržování normální živé tkáně srdeční chlopně. Následkem je rozvoj degenerativních změn a poruchy funkce chlopnenní náhrady. Nezanedbatelné je i riziko uvolňování glutaraldehydu a jiných chemických činidel z tkáně a možnost jejich cytotoxického působení.

Další variantou výroby chlopnenních náhrad je použití uměle vytvořených matric mezibuněčné hmoty, které jsou osazeny živými autologními buňkami. Metodou tkáňového inženýrství tak jsou vytvořeny umělé tkáně osazené živými buňkami, které lze použít pro výrobu cípů chlopnenních náhrad. Např. US 5 899 937 popisuje kolonizaci extracelulární matrice (ECM) prasečí aortální chlopně, která je nejprve decelularizována, aby byla následně osazena autologními buňkami pacienta odebranými z jeho kůže. Nevýhoda tohoto řešení spočívá



v tom, že je použita neživá, xenogenní matrice, která je v těle pacienta imunogenní. DE 100 53 014 a WO 96/39814 popisují využití metod tkáňového inženýrství pro kolonizaci umělých matic autologními buňkami a umístění matrice do pulzního reaktoru s živným médiem pro pěstování kolonizujících buněk na matrici. Nevýhodou tohoto řešení zůstává fakt, že takto vytvořená tkáň je umělá, není stejně trvalá jako vlastní lidská tkáň, a velkým problémem je dostatečné ukotvení kolonizujících buněk na matrici.

Z dokumentů US 5 554 184 je známé použití autologního perikardu pro výrobu chlopenní náhrady. Nevýhoda tohoto postupu je, že perikard je stabilizován a zesíťován v roztoku glutaraldehydu, což znamená, že se buňky perikardiální tkáně usmrtí, takže takto vytvořená chlopenní náhrada není živá a podléhá podobným problémům jako výše uvedené prasečí a hovězí chlopně, vyjma imunogenní reakce pacienta. Z dokumentů UA 77043, UA 67333, UA 63819 a UA 63826 je známé použití autologního perikardu pro výrobu nebo plastiku částí srdečních chlopní nebo úprav samotného srdce (UA 63826). I podle těchto dokumentů je odebraný autologní perikard ošetřen v glutaraldehydu, tzn., že pro vlastní implantaci je použita mrtvá tkáň.

Nevýhody výše uvedených chlopenních náhrad spočívají dále v jejich tuhosti, která způsobuje jejich vyšší průtokové gradienty a horší mechanické vlastnosti (menší poddajnost). Chlopně vytvořené z mrtvých tkání podléhají dystrofické kalcifikaci, s následnou poruchou své funkce. Jejich životnost je 10 až 15 let, a poté je nutné jejich vyjmutí a nahrazení novou chlopenní náhradou. Známé mechanické chlopenní náhrady také vyžadují dlouhodobou antikoagulační léčbu a jsou spojeny s trombotickými komplikacemi a zvýšeným rizikem infekční endokarditidy, což nutně přináší zhoršenou kvalitu života pacientů.

Úkolem vynálezu je vytvoření perikardiální náhrady srdeční chlopně, která by zůstala funkční po celou dobu pacientova života, měla hemodynamické, mechanické a histologické vlastnosti skutečné lidské chlopně, byla schopná produkce extracelulární hmoty, její opravy, remodelování a buněčné homeostáze a nebyla vytvořena z tělu cizí tkáně.

Podstata vynálezu

Tento úkol je vyřešen vytvořením způsobu výroby biologické náhrady srdeční chlopně vytvořené z tkáně autologního perikardu, vytvořením perikardiální náhrady srdeční chlopně podle tohoto způsobu, použitím modifikované živé tkáně autologního perikardu podle výše



uvedeného způsobu a vytvořením zařízení pro kondicioning a modifikaci živé autologní tkáně perikardu tvořící perikardiální náhradu srdeční chlopně.

Podstata způsobu výroby biologické chlopní náhrady srdeční chlopně vytvořené z tkáně autologního perikardu spočívá v tom, že se nejprve zjistí velikost a tvar pacientovy patologické vlastní chlopně metodou trojrozměrné transesofageální echokardiografie v reálném čase, nebo metodou počítačové tomografie (CT), nebo metodou magnetické rezonance (MRI), a následně se z jediného dílu živé vlastní tkáně autologního perikardu pacienta, obsahující živé perikardiální intersticiální buňky (PIC) a živou extracelulární matici, vyrobí chlopní náhrada určená pro implantaci se stentem nebo bez stentu. V obou případech se chlopeň vytváří z jediného dílu perikardu, cípy tedy zůstávají v komisurách spojeny, jak je tomu normálně v lidském organismu. V případě, že by se použilo techniky vytvoření chlopně ze tří dílů perikardu, musely by se jednotlivé části v komisurách sešít, čímž by se chlopeň stala náchylnější k poškození. Chlopeň je vytvořena ve tvaru pacientovy chlopně a kořene aorty, takže je pacientovi „šitá na míru“. Vytváření chlopně z jednoho dílu s úpravami tvaru dle kořene aorty tak vytváří perikardiální náhradu srdeční chlopně, která je v podstatě stejná, jako by vyrostla v lidském těle. Speciální tvar opěr stentu vytvořených dle tvaru kořene aorty pacienta technikou rapid prototyping umožní vytvořit v kombinaci se živou tkání perikardu fyziologickou živou perikardiální náhradu srdeční chlopně, aby vytvořila normální fyziologický tvar chlopně, který umožní její správnou funkci. Při výrobě vlastní perikardiální náhrady srdeční chlopně se postupuje tak, že se z jediného dílu živé vlastní tkáně autologního perikardu pacienta, obsahující živé perikardiální intersticiální buňky a živou extracelulární matici, vyrobí perikardiální náhrada srdeční chlopně určená pro implantaci se stentem nebo bez stentu, přičemž velikost a tvar chlopní náhrady se volí tak, aby odpovídaly velikosti a tvaru pacientovy vlastní chlopně a kořene aorty. K šití je použit u nedegradabilních stentů nevstřebatelný šicí materiál, u vstřebatelných (biodegradabilních) stentů vstřebatelný šicí materiál. Při použití vstřebatelného šicího materiálu a biodegradabilních stentů zůstává nakonec v těle pacienta po rozkladu šicího materiálu i stentu pouze živá tkáň perikardiální náhrady srdeční chlopně přirostlá k tkáni aorty, pulmonální chlopně nebo pulmonálního či trikuspidálního či mitrálního prstence.

U perikardiální náhrady srdeční chlopně se stentem se nejprve připraví anatomicky modelovaný stent odpovídající tvaru pacientovy chlopně a kořene aorty a následně se tkáň autologního perikardu přišije ke stentu. Anatomicky modelovaný stent tvaruje tkáň perikardu během kondicionování a usnadňuje uložení perikardiální náhrady srdeční chlopně v kořeni aorty, což zkvalitňuje funkci a životnost chlopní náhrady.



U perikardiální náhrady srdeční chlopně bez stentu se nejprve připraví anatomicky modelovaný úchytný systém sestávající z profilovaných opor a následně se tkáň autologního perikardu upevní k úchytnému systému. Anatomicky tvarovaný úchytný systém tvaruje tkáň perikardu, která postupně získává tvar srdeční chlopně. Po přišití perikardiální náhrady srdeční chlopně bez stentu do kořene aorty si chlopní náhrada zachová tvar vymodelovaný na úchytném systému. Protože v perikardiální náhradě chybí stent, tělo si nemusí zvykat na cizí materiál a chlopní náhradu snáz přijme. Alternativním řešením k uchycení tkáně perikardu je anatomicky modelovaný dočasný stent, který umožní tvarování chlopní náhrady během kondicionování s minimálním šitím komisur a s bazí chlopně fixovanou pomocí zavíracích nebo těsnicích komponent.

Perikardiální náhrada srdeční chlopně s anatomicky modelovaným stentem se po dobu 7 až 21 dnů podrobí dynamickému kondicioningu a hemodynamickému testování v pulzním reaktoru tvořeném hydrodynamickým okruhem umělého srdce. Hemodynamickým zatěžováním chlopní náhrady se ovlivňuje tkáň autologního perikardu, aktivují se a diferencují perikardiální intersticiální buňky, po přetvoření jejich fenotypu dochází k produkci extracelulární matrice, čímž se zlepšují strukturální vlastnosti perikardiální chlopní náhrady, že se podobá pacientově původní chlopni. Během dynamického kondicioningu dochází ke zvýšení obsahu kolagenních a elastických vláken a glykosaminoglykanů, což vede ke zlepšení mechanobiologických vlastností tkáně a ke zlepšení hemodynamických vlastností chlopní náhrady. Díky hemodynamickému zatěžování se histologický profil perikardiální chlopní náhrady podobá profilu skutečné lidské srdeční chlopně.

Ve výhodném provedení způsobu zařízení pro kondicioning a modifikaci živé autologní tkáně perikardu se vytváří fyziologické prostředí k dynamickému zatěžování perikardiální náhrady srdeční chlopně s odpovídajícími systolickými a diastolickými tlaky v mmHg 110-140/70-80 a průtoky 5-6 l/min. Tím se dosahuje přípravy perikardiální tkáně k funkci chlopní náhrady. Lze modelovat i zátěžové situace, např. zvýšením tlaku nebo pulzní frekvence a monitorovat tak chování chlopní náhrady při zvýšené zátěži, která je normální v lidském organismu, např. při fyzické práci nebo sportu.

Je výhodné, že během dynamického kondicioningu se měří hemodynamické vlastnosti perikardiální náhrady srdeční chlopně, zejména průtokové gradienty a domykavost perikardiální náhrady srdeční chlopně pomocí echokardiografického vyšetření nebo pomocí průtokových a tlakových senzorů. Perikardiální náhrada srdeční chlopně vytvořena



z perikardiální tkáně díky kondicioningu a hemodynamickému zatěžování vykazuje stejný transvalvulární gradient (maximální gradient do 6 mmHg, střední cca 3 mmHg) jako přirozená aortální chlopeň při systémových tlacích s normálním zavíráním a otevíráním cípů a bez regurgitace. Tyto gradienty jsou nižší než u v současnosti používaných chlopenních náhrad.

Výhodou způsobu výroby podle tohoto vynálezu je, že povrch perikardiální náhrady srdeční chlopně se endotelizuje, tj. pokryje endoteliálními buňkami. K tomuto účelu budou autologní cirkulující progenitorové endoteliální a endoteliální buňky izolovány z pacientovy periferní krve imunomagnetickými separačními metodami nebo pomocí průtokové cytometrie. Tyto buňky budou pomnoženy a následně osety na povrch chlopenní náhrady in vitro následujícími způsoby: (1) přidání endotelových progenitorových buněk přímo do dynamického kultivačního systému s předpokladem jejich spontánního vychytání na chlopenní náhradě, anebo (2) dočasné přemístění chlopně do statického systému, např. do misky, a její osazení endotelovými progenitorovými buňkami. V obou případech mohou být endotelové progenitorové buňky před osazením chlopně namnoženy in vitro a vhodným složením kultivačního média předdiferencovány směrem k endotelovým buňkám. Správný směr diferenciací buněk bude ověřen barvením na antigeny nezralých/ kmenových buněk, např. CD34, CD133 a endoteliální antigeny KDR (VEGFR-2), CD31, von Willebrandův faktor.

Dalším způsobem je, že k endotelizaci budou použity autologní endotelové buňky ze srdeční chlopně pacienta odebrané pomocí katetrové endoteliální biopsie povrchu srdeční chlopně nebo endokardu. Výhodnější z praktického hlediska bude odběr endotelu z trikuspidální chlopně a nebo endokardu z pravé komory srdeční. Tyto buňky budou předtím, než budou nasety na autologní perikard in vitro namnoženy.

Dalším způsobem je, že se endotelizace povrchu chlopenní náhrady provádí až v těle pacienta in vivo po kondicionování v pulzním zařízení a po implantaci chlopenní náhrady pomocí endoteliálních progenitorových buněk přítomných v krvi.

Uchycení buněk na perikardiální chlopenní náhradě je pravděpodobné z následujících důvodů: (1) odloupení (alespoň částečné) přirozeného mesotheliálního krytu perikardu během manipulace s ním a (2) obnažení extracelulární matrix perikardu, kterou lze považovat za atraktivní substrát pro buněčnou adhesi (např. kvůli přítomnosti specifických aminokyselinových sekvencí a dalších ligandů pro adhesní receptory buněk).



V jiném výhodném provedení vynálezu se vývoj chlopně a její endotelizace provádí přirozenou cestou in vivo po implantaci chlopenní náhrady pomocí endoteliálních progenitorových buněk přítomných v krvi. Je tak vynechána fáze výroby perikardiální náhrady srdeční chlopně, kdy v pulzním zařízení pro kondicioning a modifikaci živé tkáně autologního perikardu probíhá hemodynamické zatěžování a kondicioning. Tato fáze probíhá přímo v těle pacienta. Ani jako v případě fáze v pulzním reaktoru nejsou použita chemická činidla pro úpravu perikardu. Tento způsob je výhodný v případě, že je potřeba provést implantaci chlopenní náhrady urychleně.

Perikardiální náhrada srdeční chlopně získá dynamickým zatěžováním a endotelizací histologický profil, který je do značné míry podobný profilu skutečné lidské chlopně.

Nakonec je výhodné, že během dynamického kondicioningu a/nebo hemodynamického testování v zařízení pro kondicioning a modifikaci živé tkáně autologního perikardu se k perikardiální náhradě srdeční chlopně přivádí alespoň jedna látka ze skupiny kmenových buněk, progenitorových endoteliálních buněk, izolovaných perikardiálních intersticiálních buněk, chlopenních intersticiálních buněk, krevních prvků, růstových faktorů, antikalcifikačních činidel, síťovacích činidel, antibiotik, cytokinů, imunomodulačních a výživných látek. Tyto látky zlepšují vlastnosti tkáně perikardiální náhrady srdeční chlopně. Intenzitu proliferace a tvorby mezibuněčné matrice lze ovlivnit délkou kondicioningu, použitím růstových faktorů a i vlastní endotelizací povrchu tkáně chlopenní náhrady.

Podstata vynálezu dále spočívá v tom, že perikardiální náhrada srdeční chlopně vytvořená z tkáně autologního perikardu podle výše uvedeného způsobu výroby je vyrobena z živé tkáně autologního perikardu obsahující živé perikardiální intersticiální buňky a živou perikardiální extracelulární matici. Taková náhrada srdeční chlopně zůstane funkční po celý pacientův život. Její implantací odpadne dlouhodobná antikoagulační léčba, sníží se výskyt infekční endokarditidy nebo trombotických komplikací. Díky lepším přirozeným vlastnostem autologní perikardiální tkáně, její fyziologičtější poddajnosti ve srovnání například s tužšími xenogenními biologickými náhradami fixovanými glutaraldehydem nebo mechanickými srdečními náhradami, nebude docházet k poškození krevních buněk při jejich průchodu chlopenní náhradou.

Ve výhodném provedení perikardiální náhrady srdeční chlopně je tkáň autologního perikardu uspořádána na stentu nebo na úchytném systému sestávajícím z profilovaných opěr, čímž je zajištěn tvar perikardiální náhrady srdeční chlopně.



Také je výhodné, že stent je vytvořen ze vstřebatelného biokompatibilního nebo biodegradabilního materiálu a autologní perikardiální chlopeč po přišití ve tvaru, odpovídajícím tvaru původního prstence chlopeč v kořeni aorty, přiléhá ke stěně cévy nebo srdce. Za výhodnější se považuje šití v supraanulární pozici. Vstřebatelné biodegradabilní stenty budou dočasně fixovat živou perikardiální srdeční chlopeč v této anatomické pozici, dokud chlopeč nevroste do stěny cévy nebo srdce. Tou dobou je již stent vstřebán a zanechává perikardiální chlopeční náhradu na svém místě.

Ve výhodném provedení je vtoková část perikardiální srdeční náhrady přišita přímo do kořene aorty bez použití stentu.

Použití živé tkáně autologního perikardu modifikované výše uvedeným způsobem jako materiálu pro výrobu perikardiální náhrady srdeční chlopeč je výhodné v tom, že tkáň takto vytvořené chlopeč je zatížena nižším rizikem dystrofické kalcifikace a nedochází k poruchám její funkce vlivem autoimunní reakce. Živé buňky perikardiální tkáně jsou schopny buněčného dělení a metabolické aktivity umožňující regeneraci tkáně mezibuněčné hmoty (ECM) a adaptaci na oběhové síly.

Podstatou vynálezu také je, že je vytvořeno zařízení pro kondicioning a modifikaci živé autologní tkáně perikardu tvořící perikardiální náhradu srdeční chlopeč. Zařízení zahrnuje pulzní čerpadlo pro pohon proudění buněčného kultivačního média pro buňky v tkáni, nádrž pro řízení kapacitance kapaliny regulující činnost perikardiální náhrady srdeční chlopeč, komoru pro uložení perikardiální náhrady srdeční chlopeč, v níž je uspořádán úchytný systém s nosičem perikardiální chlopeční náhrady, výměník plynu pro vpouštění CO_2 do buněčného kultivačního média. Nádrž pro řízení kapacitance kapaliny, komora pro uložení perikardiální chlopeční náhrady a výměník plynu jsou uloženy v inkubátoru s vnitřní atmosférou tvořenou 5 % CO_2 a o teplotě 36 až 37°C. Jednotlivé součásti zařízení jsou vzájemně propojeny hadicovým systémem.

Ve výhodném provedení je komora pro uložení perikardiální náhrady srdeční chlopeč vytvořena z plexiskla s plastovými a kovovými komponenty pro vizuální a echokardiografické hodnocení perikardiální náhrady srdeční chlopeč během kondicioningu.

Zařízení je ve výhodném provedení před a za komorou opatřeno čidlem tlaku a/nebo čidlem pH a/nebo čidlem pO_2 a/nebo čidlem pCO_2 a/nebo čidlem teploty. Perikardiální náhrada



srdeční chlopně a kultivační médium je tak pod neustálým dohledem, aby nedošlo během kondicioningu a modifikace k jejímu poškození.

Je výhodné, aby kultivační médium pro kultivaci buněk obsahovalo lidské sérum, nejlépe autologní sérum pacienta. Perikardiální tkáň se tak nachází ve svém vlastním prostředí, na které se adaptuje. V jiném provedení kultivační médium pro kultivaci buněk obsahuje autologní krevní deriváty. Perikardiální tkáň během kondicioningu tak je neustále obklopena autologními tělními tekutinami, dochází k minimálnímu kontaktu s chemikáliemi, které by ji mohly poškodit.

Nádrž pro řízení kapacitance kapaliny obsahuje prostředky pro změnu odporu proudění kapaliny v zařízení. Lze tak řídit tlak kapaliny v zařízení, kterému je perikardiální náhrada srdeční chlopně vystavena.

Hadicový systém je opatřen vstupy pro přivádění do zařízení alespoň jedné látky ze skupiny kmenových buněk, progenitorových endoteliálních buněk, izolovaných perikardiálních intersticiálních buněk, chlopenních intersticiálních buněk, krevních prvků, růstových faktorů, antikalcifikačních činidel, síťovacích činidel, antibiotik, cytokinů a imunomodulačních a výživných látek. Tyto látky podporují kondicioning a modifikaci perikardiální tkáně tvořící náhradu srdeční chlopně.

Ve výhodném provedení je komora tvořena základní částí s otvorem a odnímatelnou částí s otvorem, přičemž obě části jsou válcového tvaru a jsou spolu rozebíratelně spojeny pomocí závitu. Nosič je spojen se základní částí, což je výhodné pro umístování perikardiální náhrady do komory. Základní část se odšroubuje od odnímatelné části, perikardiální náhrada srdeční chlopně se nasadí na nosič, k němuž se ve třech bodech přišije. Poté se k základní části přišroubuje odnímatelná část a komora se napustí kultivačním médiem, které do ní proudí otvorem v základní části a vytéká otvorem v odnímatelné části.

Ve výhodném provedení je válcový dutý nosič spojen se vstupní částí válcového tvaru, která je spojena se základní částí komory. Dutým válcovým nosičem proudí kultivační médium, které vytváří tlak, simulující tlak krve, kterému bude vystavena perikardiální náhrada srdeční chlopně v srdci.

Výhody perikardiální náhrady srdeční chlopně vyrobené podle výše uvedeného způsobu spočívají v použití tkáně, která je tělu vlastní, proto nevzbuzuje imunogenní reakce, a tělo



náhradu srdeční chlopně vyrobenou z autologního perikardu snáze přijme. Autologní perikardiální tkáň je živá, proto schopná opravy, remodelace své matrice a buněčné homeostáze.

Objasnění výkresů

Vynález bude blíže objasněn pomocí obrázků na výkresech, na nichž znázorňují obr. 1 perikardiální náhradu srdeční chlopně bez stentu, obr. 2 perikardiální náhrada srdeční chlopně se stentem (longitudinální způsob šití při uchycení perikardu na stentu) a šicí manžetou, obr. 3 řez perikardiální náhradou srdeční chlopně se stentem a šicí manžetou, obrázek 4a – perikardiální náhradu srdeční chlopně s rovnou bazí stentu a šicí manžetou nasazenou na úchytném systému před umístěním do zařízení pro kondicioning a modifikaci (cirkulární způsob šití) a 4b – perikardiální náhradu srdeční chlopně na anatomicky tvarovaném stentu nasazenou na úchytném systému před umístěním do zařízení pro kondicioning a modifikaci (cirkulární způsob šití), obr. 5 perikardiální náhradu srdeční chlopně se stentem a šicí manžetou nasazenou na úchytném systému před umístěním do zařízení pro kondicioning a modifikaci (longitudinální způsob šití), obr. 6a perikardiální náhradu srdeční chlopně bez stentu uloženou na úchytném systému se šicí manžetou a fixačním kroužkem rovného tvaru pro upevnění tkáně na držáku v zařízení pro kondicioning a modifikaci, obr. 6b perikardiální náhradu srdeční chlopně bez stentu uloženou na úchytném systému se šicí manžetou a fixačním kroužkem anatomického tvaru pro upevnění tkáně na držáku v zařízení pro kondicioning a modifikaci, obr. 7a sériově vyrobený stent z biokompatibilního materiálu s rovnými opěrami, obr. 7b sériově vyrobený stent z biokompatibilního materiálu se zpevněnými opěrami u báze stentu, obr. 8 sériově vyrobený stent s drátěnými opěrami s očky, obr. 9 stent se třemi zahnutými opěrami ve tvaru prstence aortální chlopně dle trojrozměrné echokardiografie, CT angiografie nebo MRI, obr. 10 úchytný systém tvořený nosičem a sériově vyrobeným stentem pro perikardiální chlopní náhradu, obr. 11 anatomicky tvarovaný stent, obr. 12a anatomicky tvarovaný stent s rovnou bazí s drátěnými opěrami a s očky, obr. 12b anatomicky tvarovaný stent s drátěnými opěrami a s očky, obr. 13 nosič chlopní náhrady, obr. 14 blokové schéma zařízení pro dynamický kondicioning perikardiální náhrady srdeční chlopně a obr. 15 komoru pro uložení perikardiální náhrady srdeční chlopně.

Příklady uskutečnění vynálezu

Rozumí se, že dále popsané a zobrazené konkrétní příklady uskutečnění vynálezu jsou představovány pro ilustraci, nikoli jako omezení příkladů provedení vynálezu na uvedené případy. Odborníci znalí stavu techniky najdou nebo budou schopni zjistit za použití rutinního experimentování větší či menší počet ekvivalentů ke specifickým uskutečněním vynálezu, která jsou zde speciálně popsána.

Živé lidské perikardiální náhrady 1 srdeční chlopně jsou konstruovány na základě trojrozměrné anatomické geometrie kořene aorty a původní patologické chlopně pacienta. Před vlastní operací se provede trojrozměrná transesofageální echokardiografie v reálném čase, CT angiografie nebo MRI, kterými se zjistí přesný tvar chlopně a kořene aorty pacienta. Na základě těchto informací se technologií rapid prototyping vyrobí stent 2, který svým tvarem a velikostí odpovídá tvaru kořene aorty, což při následné implantaci usnadní přesné anatomické uložení perikardiální náhrady 1 srdeční chlopně a její srůst ke stěnám aorty.

Následuje odběr autologní tkáně perikardu pacienta. Odběr se provádí minimálně invazivním způsobem využitím flexibilního instrumentaria s použitím perikardioskopie a laserového nože. Odběr je proveden za sterilních operačních podmínek na operačním sále za lokální anestezie nebo mírné celkové anestezie (např. s použitím Propofolu). Postup zahrnuje subxifoidální nebo apikální kanylaci perikardiálního prostoru pod echokardiografickou kontrolou 15-20 French flexibilním nástrojem pro perikardektomii s optickým kanálem pro vizualizaci vnitřní části perikardu a laserovým nebo elektrokauterizačním perikardiotomickým řezacím pracovním hrotem na flexibilním zakončení katetru (perikardiotomu). Celý systém je flexibilní a umožňuje volné pohyby katetru i optického zařízení při jeho zavádění i uvnitř perikardu. Nejprve je zaveden vodič a poté celé flexibilní instrumentarium s optickým systémem a laserovým nožem. Odběr tkáně perikardu je proveden pod optickou kontrolou, aby byl pro pacienta bezpečný. To umožňuje event. i zastavení krvácení, pokud to bude potřebné. K odběru je využit vlastní zaváděcí systém. Tento flexibilní nástroj umožňuje jednak perikardioskopii a současně po zavedení potřebného instrumentária i miniinvazivní odběr perikardu. Po odběru perikardu je v perikardu do druhého dne ponechán drén k zajištění bezpečnosti pro pacienta a k eventuálnímu odvádění např. serosní tekutiny nebo k prevenci rizika krvácení. Trojrozměrná transesofageální echokardiografie, CT a MRI také pomohou zhodnotit místo v perikardu vhodné pro odběr, aby neobsahovalo adheze a kalcifikace, a dále pomáhají zhodnotit přítomnost perikardiální tekutiny a blízkost perikardu k srdci.

Většina pacientů s onemocněním srdeční chlopně může být po určitou dobu stabilizována medikamenty, je proto možné provedení odběru perikardu a anatomického stanovení jeho velikosti před vlastní operací. Díl perikardu o rozměrech 7,5 – 11 x 2,5 – 3 cm je dostatečný pro vytvoření srdeční chlopně v různých velikostech. Velikost a tvar záleží na každém pacientovi. Odebraný perikard pro zatěžování in vitro v bioreaktoru je okamžitě převezen na sterilní pracoviště v utěsněné nádobce s médiem pro kultivaci buněk (Dulbecco's Modified Eagle's Medium [DMEM], 10% fetálního bovinního séra [FBS], 2% antibiotického/antimykotického roztoku) při tělní teplotě, aby PIC byly udrženy při životě. Malý díl perikardu může být zkontrolován konfokální mikroskopií nebo jinými mikroskopickými technikami, aby byla zjištěna kvalita a koncentrace PIC a ECM. Pouze perikard adekvátní kvality je vybrán pro konstrukci srdeční chlopně a její implantaci.

Živá lidská perikardiální náhrada 1 srdeční chlopně je vytvořena v třech modelech:

- 1) Se stentem 2 vyrobeným ze vstřebatelného biodegradabilního materiálu pro otevřenou chirurgickou implantaci
- 2) Bez stentu, určená pro otevřenou chirurgickou implantaci
- 3) Se stentem 2 vyrobeným ze vstřebatelného biodegradabilního materiálu pro implantaci katetrem.

Jako alternativní lze i u těchto tkání použít nedegradabilní typy stentů jak pro chirurgickou, tak pro katetrovou implantaci.

Živá lidská perikardiální náhrada 1 srdeční chlopně se stentem 2 vyrobeným ze vstřebatelného biodegradabilního materiálu je určena pro supraanulární umístění, aby byla maximalizována efektivní plocha perikardiální náhrady 1 srdeční chlopně a snížen odpor průtoku krve. Jsou určeny jak pro otevřenou chirurgickou implantaci, tak pro katetrové umístění a vyžadují vyjmutí nemocné srdeční chlopně. Vstřebatelné biodegradabilní stenty 2 dočasně fixují živou perikardiální náhradu srdeční chlopně v anatomické pozici, dokud chlopeň nevroste do stěny aorty. Tou dobou jsou již stenty 2 vstřebány a zanechávají funkční perikardiální tkáň náhrady 1 srdeční chlopně na svém místě. Tyto stenty 2 jsou vyrobeny z polylaktidů (polymerů kyseliny mléčné), kyseliny polyglykolové, ε-kaprolactonu, polyhydroxyalkanoátu (PHA) nebo jiných biokompatibilních vstřebatelných biopolymerů.

Stent 2 pro otevřenou chirurgickou implantaci sestává z báze 17 umístěné na přítokové části, která je tvarována tak, aby odpovídala tvaru aortálního prstence pacienta. Z báze 17



vystupují tři opěry **4**, na nichž jsou zavěšeny komisury **18** chlopně. Tvar stentu **2**, jeho obvod, výška opěr **4** a vzdálenost jejich rozmístění na bázi **17** záleží na velikosti požadované chlopní náhrady **1** pro každého pacienta, podle zobrazení jeho srdeční chlopně a kořene aorty, jak bylo popsáno výše (trojrozměrnou echokardiografií, CT nebo MRI). Tloušťka stentu **2** záleží na materiálu, z něhož je vyroben, biodegradabilní stenty **2** jsou silnější než např. drátěné (nitinol, titan, Elgiloy apod.), aby si zachovaly sílu a funkčnost.

Stenty **2** pro konstrukce živé lidské perikardiální náhrady **1** srdeční chlopně jsou vytvořeny ve dvou provedeních. V prvním provedení je šicí manžeta **15** připevněna ke stentu **2a** je součástí perikardu, z něhož je ušita chlopeň.

Ve druhém provedení jsou stent **2** a šicí manžeta **15** dvě různé komponenty, které jsou sestaveny dohromady švy (sešitím) nebo svorkami poté, co je perikard přišitý ke stentu **2**. Oddělené uspořádání usnadňuje přišití perikardu ke stentu **2** a umožňuje použití větších šicích manžet **15**, když je potřeba utěsnit nepravidlosti v aortálním prstenci. Stenty **2** a šicí manžety **15** jsou výhodně potaženy nebo impregnovány různými činidly pro zvýšení odolnosti vůči trombóze, kalcifikaci a vytvoření pannu (prorůstání tkání), výhodně alfa olejová kyselina, Carbofilm.

Živá lidská perikardiální náhrada **1** srdeční chlopně bez stentu **2** pro otevřenou chirurgickou implantaci zahrnuje šití lidské perikardiální náhrady **1** srdeční chlopně přímo do aorty v místě původní srdeční chlopně bez použití stentu **2**. Velikost a tvar chlopního prstence a výška uchycení v komisurách **18** jsou určeny trojrozměrným snímáním (trojrozměrná echokardiografie, CT, MRI) pacientovy původní chlopně a kořene aorty před konstruováním perikardiální náhrady **1**. Komisury **18** takové perikardiální náhrady **1** srdeční chlopně jsou vytvořeny z tkáně modifikovaného perikardu, které mohou být podloženy tkaným polyesterovým materiálem nebo jiným biokompatibilním nebo absorbovatelným materiálem. Tyto nášivky jsou přišity do stěny aorty, aby upevnily místa komisurálních úchytů v blízkosti sino-tubulární junkce. Vtoková část takové perikardiální náhrady **1** srdeční chlopně je přišita přímo na aortální prstenec nebo do aorty nebo je opatřena šicí manžetou **15** vytvořenou z vlastní tkáně perikardu, který usnadní přírůst perikardiální náhrady **1** srdeční chlopně k aortálnímu prstenci. Je také možné použít šicí manžetu **15** z polyesterové tkaniny nebo z jiného biokompatibilního materiálu, které se v současné době běžně používají.

Alternativní způsob šití živé lidské perikardiální náhrady **1** srdeční chlopně bez použití stentu **2** zahrnuje vytvoření trojcípé chlopně z dílu perikardu za použití řezného nástroje a vyříznutí



předem definovaného tvaru z modifikované tkáně perikardu, který je přišit ke stěně aorty nad prstencem a tvoří tak vlastní chlopeň.

Živá lidská perikardiální náhrada **1** srdeční chlopně bez stentu **2** je připevněna k dočasnému anatomicky tvarovanému stentu **2**, který je použit pro zavěšení a formování bezstentové perikardiální náhrady **1** do tvaru pacientovy srdeční chlopně během dynamického zatěžování v zařízení **5** (viz obr. 14) pro kondicioning a modifikaci živé autologní tkáně perikardu. Po 7 až 21 dnech dynamického zatěžování je perikardiální náhrada **1** srdeční chlopně bez stentu **2** odebrána z dočasného stentu **2** a implantována do srdce pacienta buď otevřenou chirurgickou implantací nebo katetrovým zavedením.

Živá lidská perikardiální náhrada **1** srdeční chlopně pro implantaci katetrem je upevněna na skládací vstřebatelný biodegradabilní stent. Je umístěna tříselnou tepnou nebo žílou pomocí katetru. V jednom výhodném provedení je vytvořena jako samorozvinovací, v jiném provedení se rozevírá pomocí balonku. Je opatřena háčky pro usnadnění uchycení v pozici původní srdeční chlopně. S využitím endovaskulárních a robotických technologií je implantována endovaskulárním a endokardiálním přístupem.

Po odběru je autologní tkáň perikardu ihned uložena do manipulačního média pro kultivaci buněk, aby její buňky byly udrženy při životě. Perikard je zbaven povrchových adipóz (tukových tkání) a upraven do odpovídajícího tvaru.

Poté je perikard položen na stent **2** a obalí jej. List perikardu je těsně ke stentu přišit, čímž se vytvoří pevné spojení u báze **17** stentu **2**. Na stentu **2** jsou vytvořeny tři opěry **4**, na nichž je tkáň perikardu zavěšena, čím se vytvoří komisury **18**. Rozmístění opěr **4** zajišťuje kompletní fyziologickou koaptaci cípů **19** perikardiální náhrady **1** srdeční chlopně. Jedním ze způsobů šití je vytvoření komisur **18** obalením opěr **4** perikardem přes vrchol každé z opěr **4**. Druhým způsobem je šití tkáně perikardu podél tenkého stentu **2** pokračujícím stehem s uchycením v pevných bodech na vrcholech opěr **4** v komisurách **18** a ve středních částech cípů **19**. Oba způsoby umožňují vynechat použití šicího prstence a šicí manžety, které se u současných chlopní používají k usnadnění přišití chlopních náhrad do aortálního prstence. Perikardiální náhrada **1** srdeční chlopně podle tohoto vynálezu se přišívá u nemocných přímo uchycením za perikard, který je k tomuto účelu přizpůsoben a nahrazuje i speciální šicí manžetu **15**. Ta je podle vynálezu vytvořena také z autologního perikardu.



Během přípravy a sešívání živé lidské perikardiální náhrady **1** srdeční chlopně je potřeba po minutách zvlhčovat autologní tkáň perikardu buněčným kultivačním médiem, aby byla zachována životaschopnost tkáně. Výroba náhrady **1** srdeční chlopně by neměla trvat déle než 15–30 minut.

Po sešití je živá lidská perikardiální náhrada **1** srdeční chlopně upevněna na nosič **9** perikardiální náhrady **1** tvořící součást úchytného systému **3** a uzavřena v komoře **8** pro uložení perikardiální náhrady **1** srdeční chlopně, která je součástí zařízení **5** (obr. 14) pro kondicioning a modifikaci živé autologní tkáně perikardu.

Zařízení **5** (obr. 14) pro kondicioning a modifikaci živé autologní tkáně perikardu tvoří pulzní čerpadlo **6** pro pohon buněčného kultivačního média, nádrž **7** pro řízení kapacity kapaliny regulující činnost perikardiální náhrady **1** srdeční chlopně, komora **8** pro uložení perikardiální náhrady **1** srdeční chlopně, v níž je uspořádán nosič **9** perikardiální chlopní náhrady **1**, výměník **10a,b** plynu pro vpouštění a vypouštění atmosféry s 5% CO₂ do buněčného kultivačního média. Jednotlivé součásti jsou vzájemně propojeny hadicovým systémem **12**. Nádrž **7** pro řízení kapacity kapaliny, komora **8** pro uložení perikardiální chlopní náhrady **1** a výměník **10** plynu jsou uloženy v inkubátoru **11** s vnitřní atmosférou tvořenou 5% CO₂ a při simulované teplotě těla 37°C. Zařízení je výhodně opatřeno čidly **13** umístěnými před a za komorou **8**, která monitorují tlak a stav kultivačního média během kondicioningu, jeho pH, obsah pO₂ a pCO₂ a teplotu.

Kultivační médium je tvořeno DMEM, 10% FBS, 2% antibiotického a/nebo antimykotického roztoku, nejvýhodněji lidským kultivačním médiem s použitím vlastního séra od pacienta, pro něž se chlopní náhrada **1** připravuje. Kultivační médium tedy s výhodou obsahuje vlastní sérum nebo jiné krevní deriváty pacienta.

Nádrž **7** pro řízení kapacity kapaliny je opatřena prostředky pro řízení odporu proudění kapaliny v zařízení. Lze jí regulovat hydrostatický tlak, který odpovídá systolickému a diastolickému tlaku v normálním krevním oběhu (120-140/60-80 mmHg) a který slouží k otevírání a uzavírání cípů **19** perikardiální náhrady **1** srdeční chlopně. Nastavení hydrostatického tlaku lze provést na základě informací z tlakových čidel **13** umístěných v oběhu před a za komorou **8** sloužící k dynamickému zatěžování tkáně perikardu. Jeho výšku lze regulovat polohou nádrže **7** vzhledem ke kultivační komoře **8** nebo změnou průsvitu výtokové části v hadicovém systému **12** vycházejícím z kultivační komory **8**. V celém



zařízení **5** (obr. 14) proudí kultivační medium, kterým se celé zařízení **5**(obr. 14) naplní při zahájení kondicioningu.

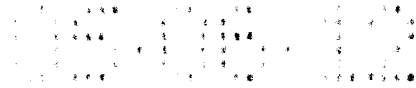
Nádrž pro řízení kapacity kapaliny je dále opatřena vstupy **14**, kterými lze provádět výměnu média nebo do systému přidávat např. různé typy buněk nebo výživných látek. Tímto způsobem lze do kultivačního systému přivádět alespoň jednu látku nebo kombinace níže vyjmenovaných látek a buněk: např. skupiny kmenových buněk, progenitorových endoteliálních buněk, izolovaných perikardiálních intersticiálních buněk, chlopenních intersticiálních buněk, krevních prvků, růstových faktorů, antikalcifikačních činidel, síťovacích činidel, antibiotik, cytokinů, imunomodulačních a výživných látek.

Celé zařízení **5**(obr. 14) pro kondicioning a modifikaci živé autologní tkáně perikardu je podle tohoto příkladu provedení připojeno na automatický monitorovací systém řízený počítačem, který sleduje požadované údaje. Před a za kultivační komorou jsou uspořádána čidla **13**, která monitorují tlak, pH, obsah pO₂, pCO₂ nebo teplotu v kultivační komoře **8**.

Komora **8** je tvořena základní částí **22** s otvorem **23** a odnímatelnou částí **24** s otvorem **25**. Obě části **22**, **24** jsou válcového tvaru a jsou spolu rozebíratelně spojeny pomocí závitů **28**. Odnímatelná část **24** se při vkládání perikardiální náhrady **1** srdeční chlopně na nosič **9** snadno odšroubuje. K nosiči **9** se perikardiální náhrada **1** srdeční chlopně přišije třemi stehy, které prochází otvory **20** vytvořenými v nosiči. Je také možné použít fixační kroužek **16**, který se přes perikardiální náhradu **1** srdeční chlopně přetáhne po jejím nasazení na nosič **9**.

V případě bezstentových srdečních náhrad **1** perikardiální chlopně je na nosič **9** upevněn dočasný stent **2**, na nějž se bezstentová perikardiální náhrada **1** srdeční chlopně nasadí, aby byla sešitá perikardiální tkáň vytvarována do tvaru srdeční chlopně.

Válcový dutý nosič **9** je spojen se vstupní částí **26** válcového tvaru, která je spojena se základní částí komory **22** pomocí závitů **27**. Komora **8** je vyplněna kultivačním médiem, které do komory **8** proudí otvorem **23** a prochází vstupní částí **26** a nosičem **9**. Vystavuje tak na perikardiální náhradu **1** stejnému systolickému a diastolickému tlaku, jakému bude vystavena v srdci. Tlak a rychlost pulzů kultivačního média lze regulovat zvýšením nebo snížením průsvitu hadicového systému **12**, nastavením čerpadla **6** a nádrže **7** pro řízení kapacity kapaliny.



Perikardiální náhrada **1** srdeční chlopně z autologního perikardu je vytvořena v zařízení pro kondicioning a modifikaci živé autologní tkáně perikardu **5** (obr. 14). Doba kondicionování je optimálně po dobu jednoho až tří týdnů, kdy extracelulární matrice živého autologního perikardu je dostatečně posílena a remodelována. Prokázali jsme, že počet intersticiálních perikardiálních buněk se po kondicioningu dvou až čtyřnásobně zvýší, čímž perikardiální tkáň získá vlastnosti chlopní tkáně, včetně anatomických, hemodynamických, histologických a mechanických vlastností. Živá autologní perikardiální náhrada **1** srdeční chlopně s endotelizovaným povrchem tak bude zbavena trombotických komplikací, nebude podléhat dystrofickým změnám s kalcifikacemi a nebude tedy docházet k poruchám její funkce vlivem autoimunní reakce, jako je tomu u xenogenních biologických náhrad někdy již za několik let po operaci. Živé buňky jsou schopny buněčného dělení a metabolické aktivity, umožňující produkci extracelulární matrix a regeneraci tkáně a adaptaci na síly, kterým je chlopeň vystavena v systémovém oběhu člověka. Autologní perikardiální chlopní náhrada není imunogenní pro svého příjemce. Obsahuje povrchové ligandy, které podporují endotelizaci povrchu tkáně endoteliálními progenitorovými buňkami in vitro nebo in vivo.

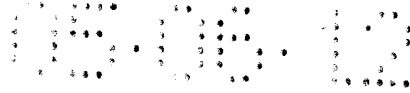
Průmyslová využitelnost

Způsob výroby perikardiální chlopní náhrady srdeční chlopně, perikardiální náhrada srdeční chlopně a zařízení pro kondicioning a modifikaci autologní tkáně perikardu tvořící náhradu srdeční chlopně podle tohoto vynálezu lze využít pro implantaci srdečních chlopní pro pacienty všech věkových kategorií, protože se snižuje riziko nutnosti reimplantace takové srdeční chlopně a snižují se rizika trombotických a infekčních komplikací a požadavky na následnou léčbu po implantaci.



Přehled vztahových značek použitých na výkresech

- 1 perikardiální náhrada srdeční chlopně
- 2 stent
- 3 úchytný systém
- 4 opěra
- 5 zařízení pro kondicioning a modifikaci živé autologní tkáně perikardu
- 6 pulzní čerpadlo
- 7 nádrž pro řízení kapacity kapaliny
- 8 komora pro uložení chlopní náhrady
- 9 nosič chlopní náhrady
- 10a výměník plynu-vstup plynu do komory
- 10b výměník plynu-odvod zplodin plynu ze zařízení pro kondicioning a modifikaci
- 11 inkubátor
- 12 hadicový systém
- 13 čidlo
- 14 vstup
- 15 šicí manžeta
- 16 fixační kroužek
- 17 báze stentu
- 18 komisura
- 19 cíp perikardiální náhrady srdeční chlopně
- 20 otvory pro šití
- 21 filtr
- 22 základní část komory
- 23 otvor v základní části komory
- 24 odnímatelná část komory
- 25 otvor v odnímatelné části komory
- 26 vstupní část nosiče
- 27 závit spojující nosič chlopní náhrady se základní částí komory
- 28 závit spojující základní a odnímatelnou část komory



Seznam zkratk

CT	počítačová tomografie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ECM	extracelulární matrice
FBS	fetální bovinní sérum
MRI	magnetická resonance
PIC	perikardiální intersticiální buňky



PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob výroby perikardiální náhrady (1) srdeční chlopně vytvořené z tkáně autologního perikardu **vyznačující se tím, že** nejprve se zjistí velikost a tvar pacientovy patologické vlastní chlopně metodou trojrozměrné transesofageální echokardiografie v reálném čase, nebo metodou počítačové tomografie (CT angiografie), nebo metodou magnetické rezonance (MRI), a následně se z jediného dílu živé vlastní tkáně autologního perikardu pacienta, obsahující živé perikardiální intersticiální buňky (PIC) a živou extracelulární matici, vyrobí perikardiální náhrada (1) srdeční chlopně určená pro implantaci se stentem (2) nebo bez stentu, přičemž velikost a tvar chlopní náhrady (1) se volí tak, aby odpovídaly velikosti a tvaru pacientovy vlastní chlopně a kořene aorty.
2. Způsob podle nároku 1 **vyznačující se tím, že** u perikardiální náhrady (1) srdeční chlopně se stentem (2) se nejprve připraví anatomicky modelovaný stent (2) odpovídající tvaru pacientovy patologické vlastní chlopně a kořene aorty a následně se tkáň autologního perikardu upevní ke stentu (2).
3. Způsob podle nároku 1 **vyznačující se tím, že** u perikardiální náhrady (1) srdeční chlopně bez stentu se nejprve připraví dočasný anatomicky modelovaný úchytný systém (3) pro modelování tvaru perikardiální náhrady (1) srdeční chlopně sestávajícího z nosiče (9) opatřeného profilovanými opěrami (4) nebo opatřeného dočasným stentem, a následně se tkáň autologního perikardu upevní k úchytnému systému (3) přišitím do otvorů (20) v nosiči (9), přičemž perikardiální náhrada (1) srdeční chlopně se z dočasného úchytného systému (3) sejme po skončení kondicioningu.
4. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 1 až 3 **vyznačující se tím, že** perikardiální náhrada (1) srdeční chlopně s anatomicky modelovaným stentem (2) nebo perikardiální náhrada (1) srdeční chlopně bez stentu upevněná na úchytném systému (3) se po dobu 7 až 21 dnů podrobí dynamickému kondicioningu a hemodynamickému testování v zařízení (5) pro kondicioning a modifikaci živé autologní tkáně perikardu tvořeném hydrodynamickým okruhem umělého srdce, přičemž se hemodynamickým zatěžováním perikardiální náhrady (1) srdeční chlopně ovlivňuje tkáň autologního perikardu, aktivují se a diferencují perikardiální intersticiální buňky, po přetvoření jejich fenotypu dochází k produkci extracelulární



matrice, přičemž se zvyšuje obsah kolagenních a elastických vláken a glykosaminoglykanů a zlepšují se mechanobiologické vlastnosti tkáně a hemodynamické vlastnosti perikardiální náhrady (1) srdeční chlopně.

5. Způsob podle nároku 4 **vyznačující se tím, že** zařízení (5) pro kondicioning a modifikaci živé autologní tkáně perikardu vytváří fyziologické prostředí k dynamickému zatěžování perikardiální náhrady (1) srdeční chlopně s odpovídajícími systolickými a diastolickými tlaky v mmHg 110-140/70-80 a průtoku 5-6 l/min.
6. Způsob podle nároku 4 a 5 **vyznačující se tím, že** během dynamického kondicioningu se měří hemodynamické vlastnosti perikardiální náhrady (1) srdeční chlopně, zejména průtokové gradienty a domykavost chlopní náhrady (1) pomocí echokardiografického vyšetření nebo pomocí průtokových a tlakových senzorů (13).
7. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 1 až 6 **vyznačující se tím, že** povrch perikardiální náhrady (1) srdeční chlopně se endotelizuje, tj. pokryje autologními endoteliálními buňkami.
8. Způsob podle nároku 7 **vyznačující se tím, že** k endotelizaci se použijí autologní cirkulující progenitorové endoteliální buňky a cirkulující endoteliální buňky, izolované z krve pacienta imunomagnetickými separačními metodami nebo pomocí průtokové cytometrie a namnožené in vitro.
9. Způsob podle nároku 7 **vyznačující se tím, že** k endotelizaci se použijí autologní endotelové buňky ze srdeční chlopně pacienta odebrané pomocí katetrové endoteliální biopsie povrchu srdeční chlopně nebo endokardu a namnožené in vitro.
10. Způsob podle nároku 7 **vyznačující se tím, že** endotelizace se provádí in vitro ve statické kultuře nebo v zařízení (5) pro kondicioning a modifikaci živé autologní tkáně perikardu.
11. Způsob podle nároku 7 **vyznačující se tím, že** endotelizace se provádí přirozenou cestou in vivo po implantaci perikardiální náhrady (1) srdeční chlopně pomocí cirkulujících endoteliálních progenitorových buněk a cirkulujících endoteliálních buněk přítomných v krvi v těle pacienta.



12. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 4 až 11 **vyznačující se tím, že** během dynamického kondicioningu a/nebo hemodynamického testování se k perikardiální náhradě (1) srdeční chlopně přivádí alespoň jedna látka ze skupiny zahrnující kmenové buňky, progenitorové endotelové buňky, izolované perikardiální intersticiální buňky, chlopenní intersticiální buňky, krevní prvky, růstové faktory, antikalciфикаční činidla, síťovací činidla, antibiotika, cytokiny, imunomodulační a výživné látky.
13. Perikardiální náhrada srdeční chlopně vytvořená z tkáně autologního perikardu **vyznačující se tím, že** je vyrobena z živé tkáně autologního perikardu obsahující živé perikardiální intersticiální buňky a živou perikardiální extracelulární matici.
14. Perikardiální náhrada srdeční chlopně podle nároku 13 **vyznačující se tím, že** tkáň autologního perikardu a z něj vytvořená šicí manžeta (15) jsou uspořádány na stentu (2) nebo na úchytném systému (3) sestávajícím z nosiče (9) a z profilovaných opor (4).
15. Perikardiální náhrada srdeční chlopně podle nároku 14 **vyznačující se tím, že** stent (2) a šicí manžeta (15) jsou vyrobeny z nevstřebatelného biokompatibilního materiálu.
16. Perikardiální náhrada srdeční chlopně podle nároku 14 **vyznačující se tím, že** stent (2) a šicí manžeta (15) jsou vyrobeny ze vstřebatelného biodegradabilního materiálu.
17. Perikardiální náhrada srdeční chlopně podle nároku 14 **vyznačující se tím, že** je přišita do kořene aorty ve fyziologickém tvaru chlopně, přičemž šicí manžeta (15) je vytvořena ze živého autologního perikardu nebo pokryta živým autologním perikardem.
18. Použití živé tkáně autologního perikardu modifikované způsobem podle alespoň jednoho z nároků 1 až 12 jako materiálu pro výrobu perikardiální náhrady (1) srdeční chlopně.



19. Zařízení (5) pro kondicioning a modifikaci živé autologní tkáně perikardu pro perikardiální náhradu srdeční chlopně **vyznačující se tím, že** zahrnuje pulzní čerpadlo (6) pro pohon proudění buněčného kultivačního média pro buňky v tkáni, nádrž (7) pro řízení kapacitance kapaliny regulující činnost perikardiální náhrady (1) srdeční chlopně, komoru (8) pro uložení perikardiální náhrady (1) srdeční chlopně, v níž je uspořádán válcový dutý nosič (9) perikardiální chlopní náhrady (1), výměník (10) plynu pro vpouštění CO₂ do buněčného kultivačního média, přičemž nádrž (7) pro řízení kapacitance kapaliny, komora (8) pro uložení perikardiální náhrady (1) srdeční chlopně a výměník (10a, b) plynu jsou uloženy v inkubátoru (11) s vnitřní atmosférou tvořenou vzduchem smíchaným s 5 % CO₂ o teplotě 36 až 37°C a jednotlivé součásti zařízení (5) jsou vzájemně propojeny hadicovým systémem (12).
20. Zařízení podle nároku 19 **vyznačující se tím, že** komora (8) pro uložení perikardiální náhrady (1) srdeční chlopně je vytvořena z plexiskla s plastovými a kovovými komponenty pro vizuální a echokardiografické hodnocení perikardiální náhrady (1) srdeční chlopně během kondicioningu.
21. Zařízení podle nároku 19 nebo 20 **vyznačující se tím, že** nosič (9) je tvořen plastovým nátrubkem tvarově upraveným pro nasazení perikardiální náhrady (1) srdeční chlopně se stentem (2) nebo bez stentu.
22. Zařízení podle alespoň jednoho z nároků 19 až 21 **vyznačující se tím, že** je opatřeno čidlem (13) tlaku a/nebo čidlem pH a/nebo čidlem pO₂ a/nebo čidlem pCO₂ a/nebo čidlem teploty.
23. Zařízení podle alespoň jednoho z nároků 19 až 22 **vyznačující se tím, že** kultivační médium pro kultivaci buněk obsahuje lidské sérum.
24. Zařízení podle alespoň jednoho z nároků 19 až 23 **vyznačující se tím, že** kultivační médium pro kultivaci buněk obsahuje autologní krevní deriváty.
25. Zařízení podle alespoň jednoho z nároků 19 až 24 **vyznačující se tím, že** nádrž (7) pro řízení kapacitance kapaliny obsahuje prostředky pro změnu odporu proudění kapaliny v zařízení (5).

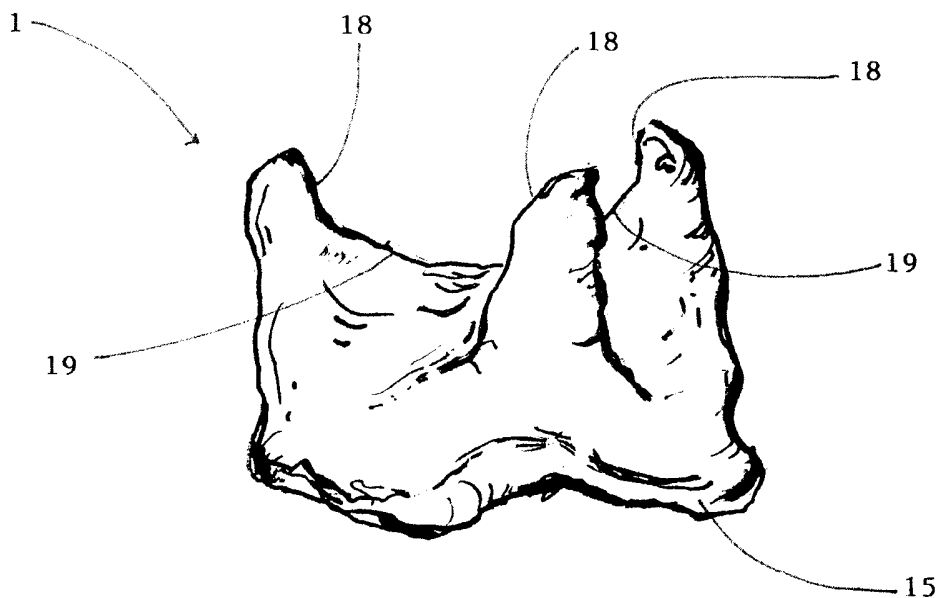


26. Zařízení podle alespoň jednoho z nároků 19 až 25 **vyznačující se tím, že** hadicový systém (12) je opatřen vstupem (14) pro přivádění do zařízení (5) alespoň jedné látky ze skupiny kmenových buněk, progenitorových endotelových buněk, izolovaných perikardiálních intersticiálních buněk, chlopenních intersticiálních buněk, krevních prvků, růstových faktorů, antikalciфикаčních činidel, síťovacích činidel, antibiotik, cytokinů, imunomodulačních a výživných látek.
27. Zařízení podle nároku 20, **vyznačující se tím, že** komora (8) je tvořena základní částí (22) s otvorem (23) a odnímatelnou částí (24) s otvorem (25), přičemž obě části (22, 24) jsou válcového tvaru a jsou spolu rozebíratelně spojeny závitkem (28).
28. Zařízení podle nároku 27, **vyznačující se tím, že** nosič (9) je spojen se základní částí (22).
29. Zařízení podle nároku 28, **vyznačující se tím, že** válcový dutý nosič (9) je spojen se vstupní částí (26) válcového tvaru, která je spojena se základní částí komory (22) pomocí závitku (27).

1/15

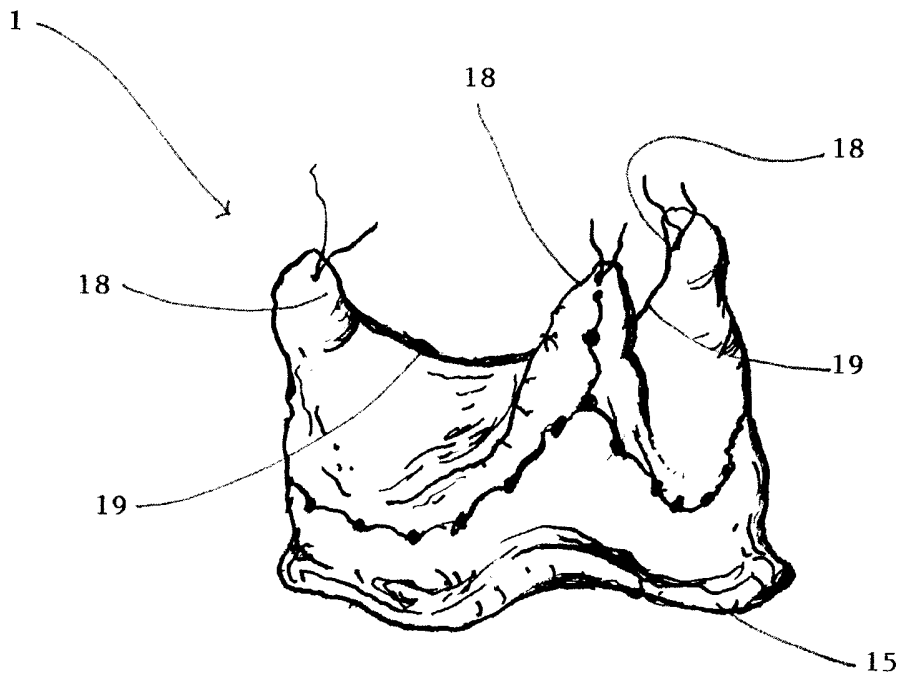


OBR. 1



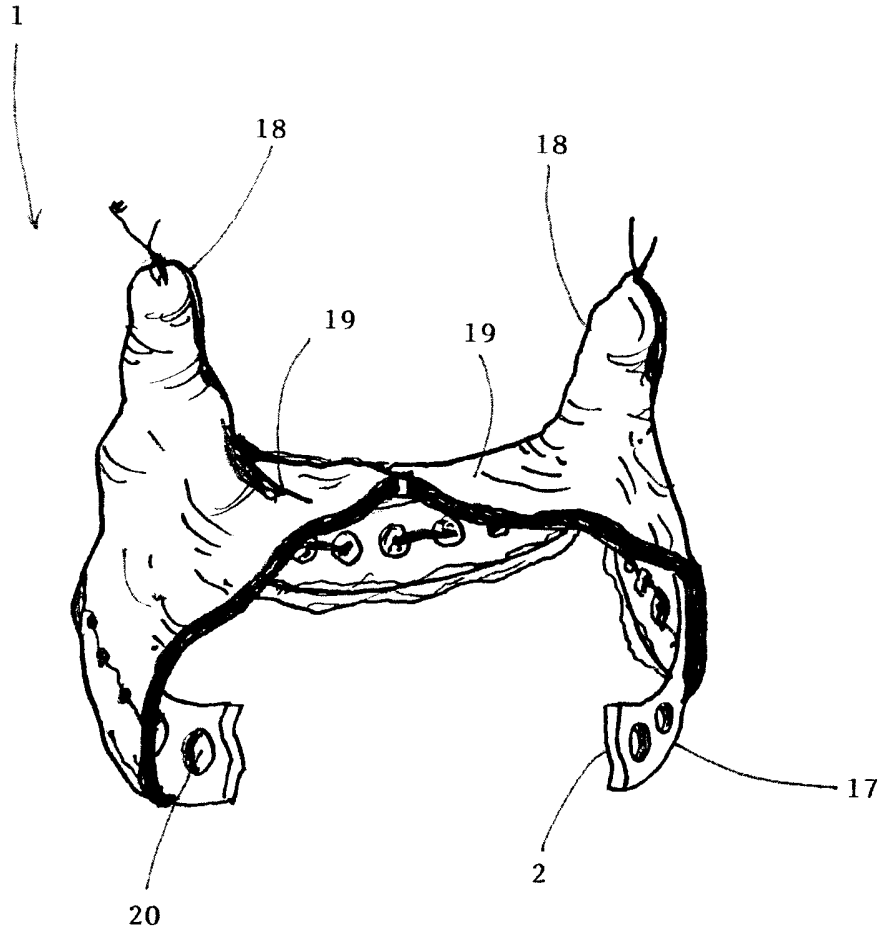


OBR. 2

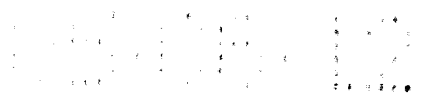




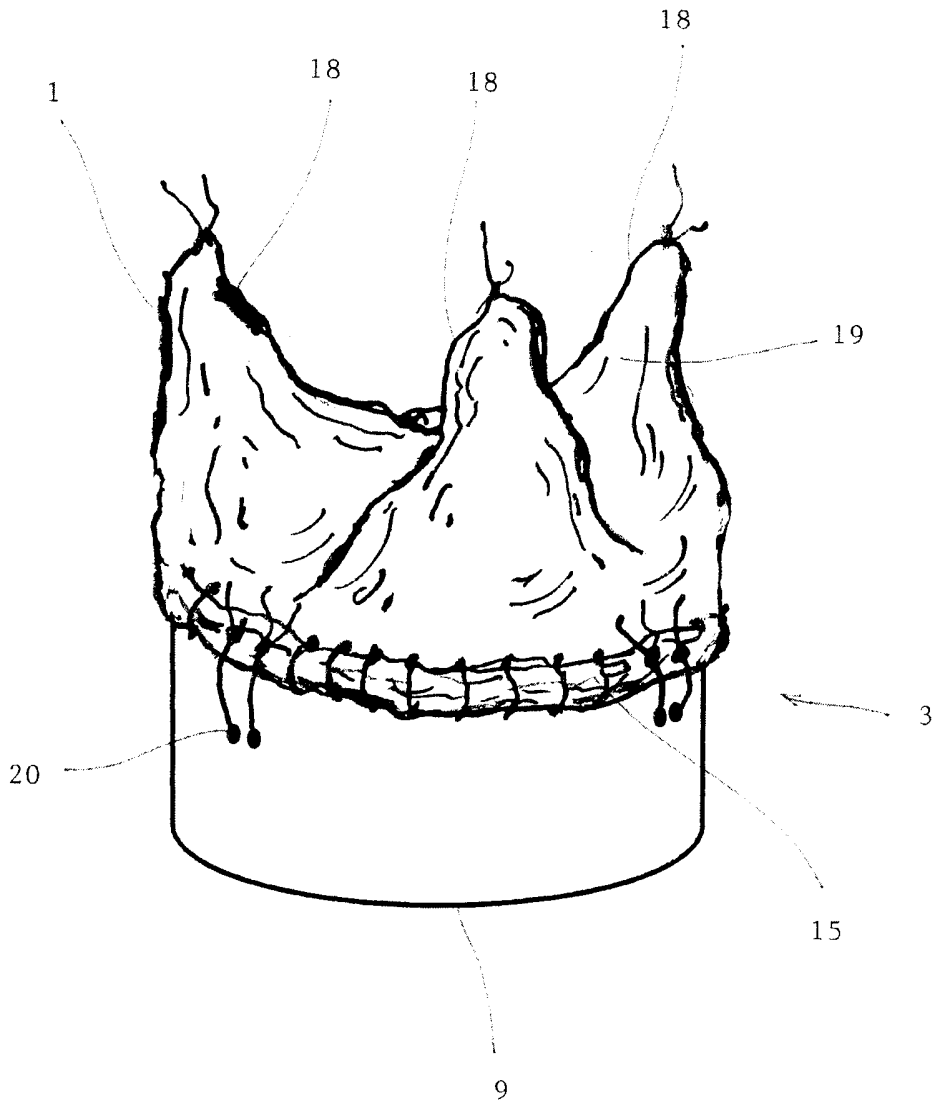
OBR. 3



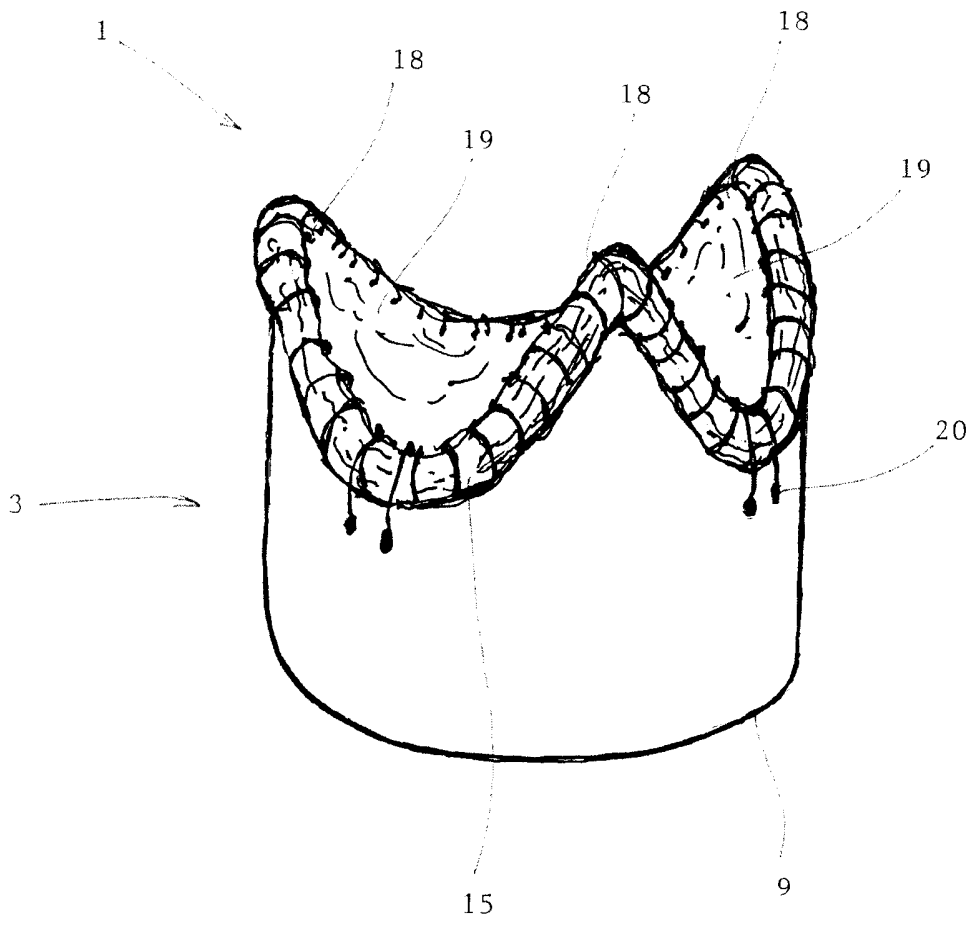
6/15



OBR. 4a

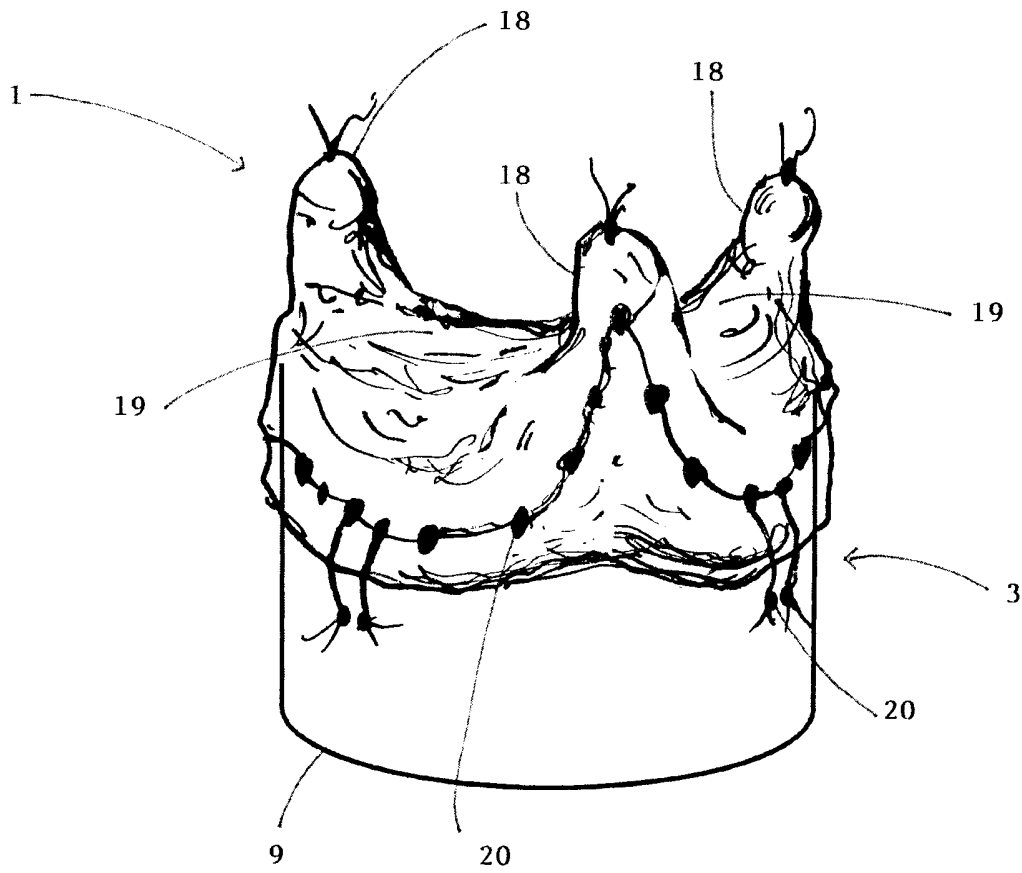


OBR. 4b



6/15

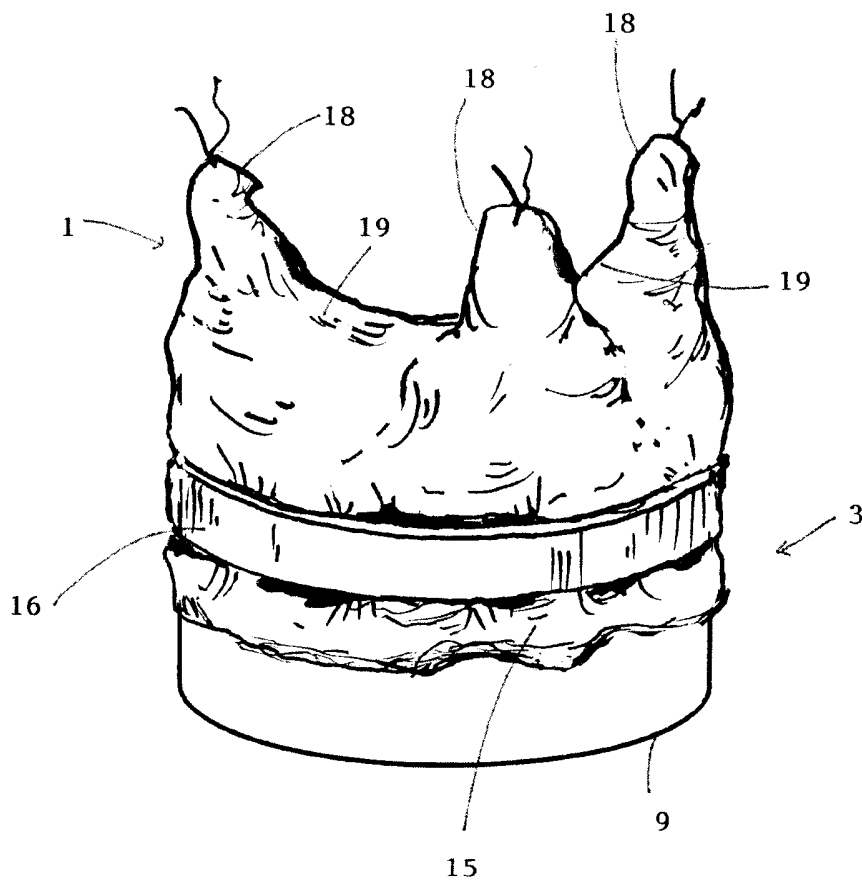
OBR. 5



7/15



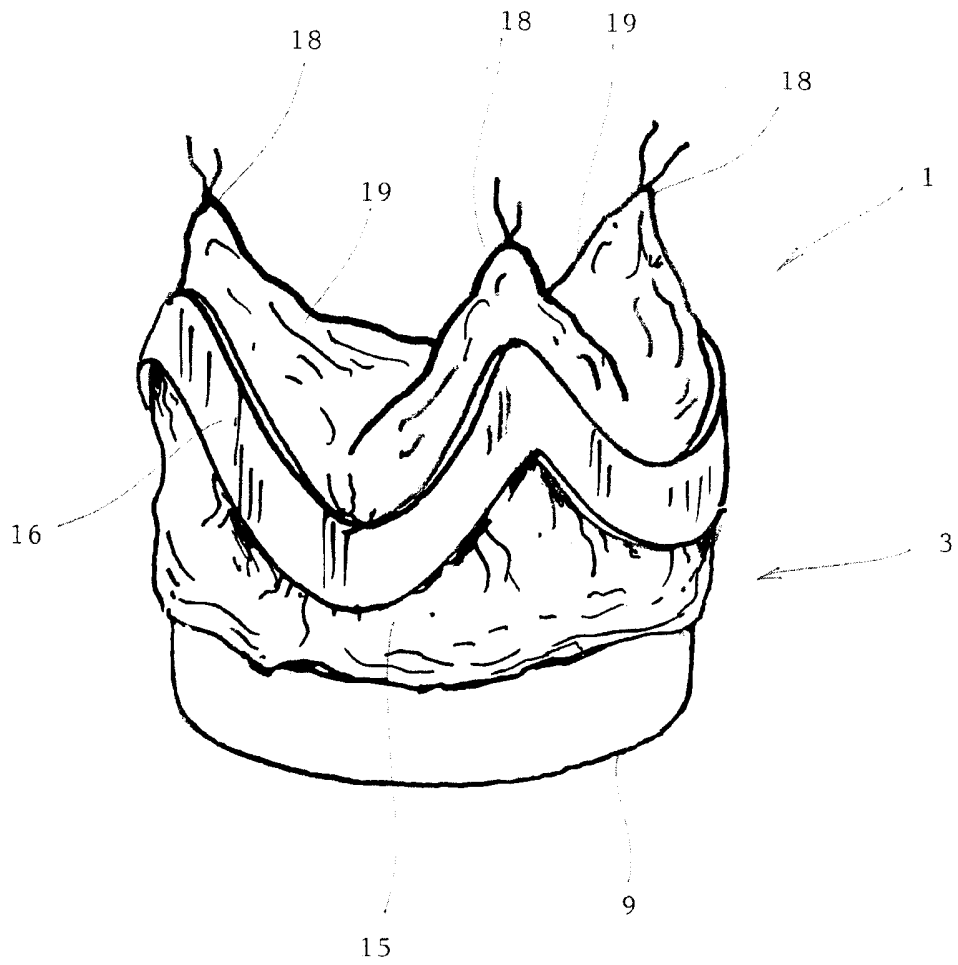
OBR. 6a



8/15

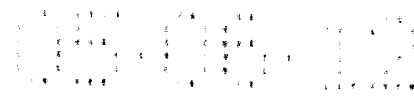


OBR. 6b

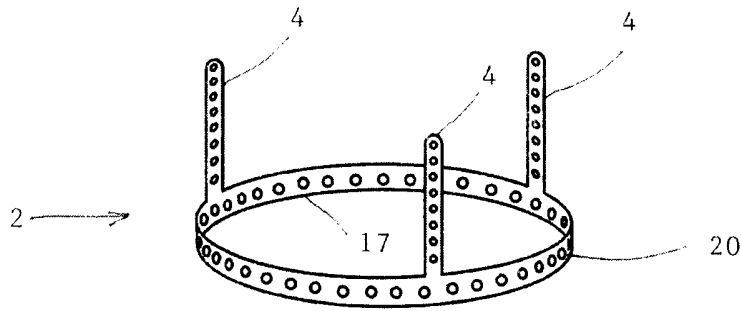


9/15

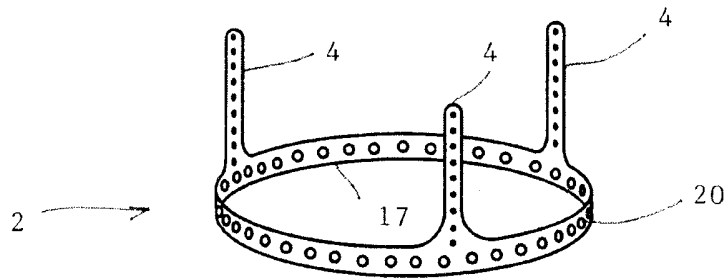
PV 2012-376



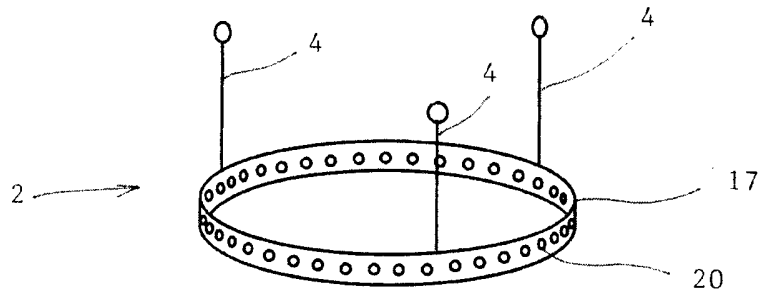
OBR. 7a



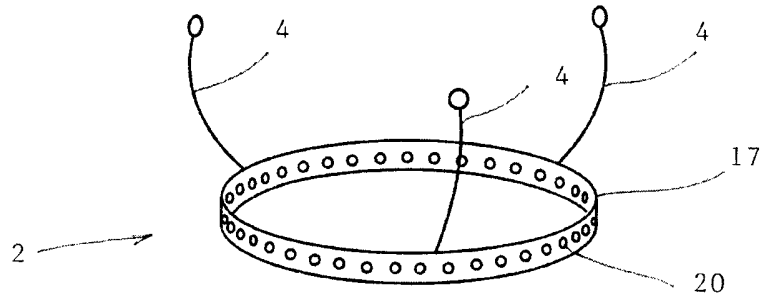
OBR. 7b



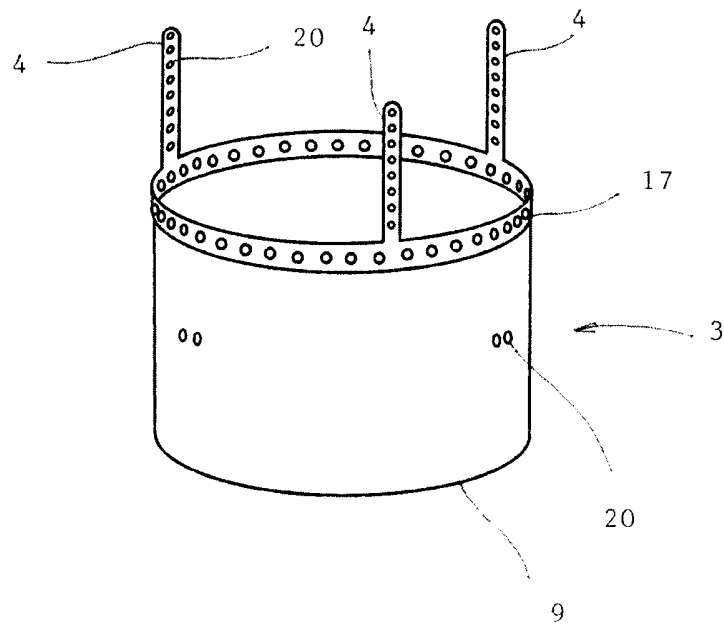
OBR. 8



OBR. 9



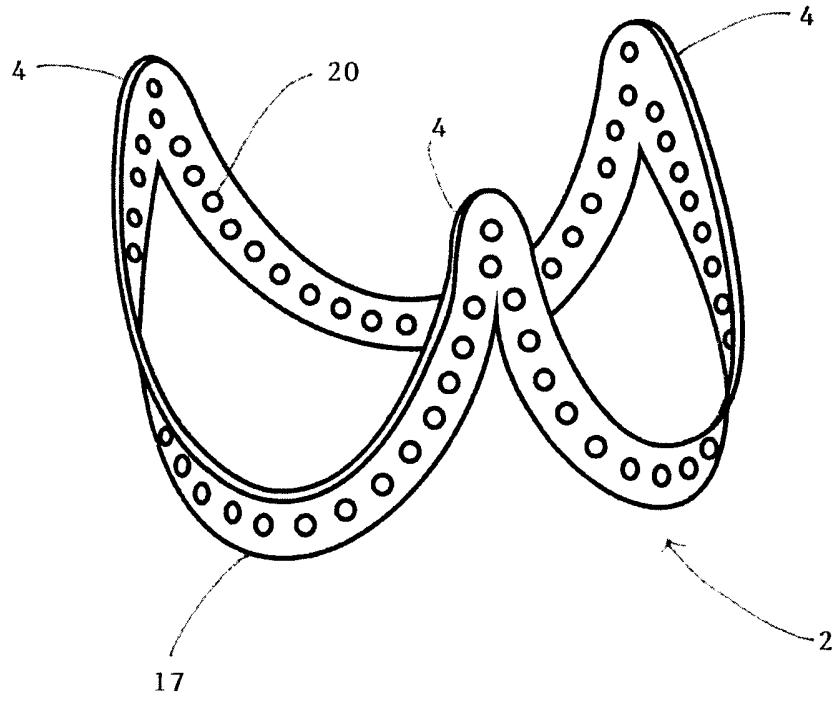
OBR. 10



10/15

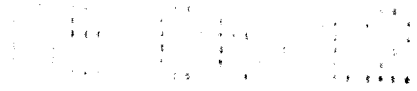
PV 2012-376

OBR. 11

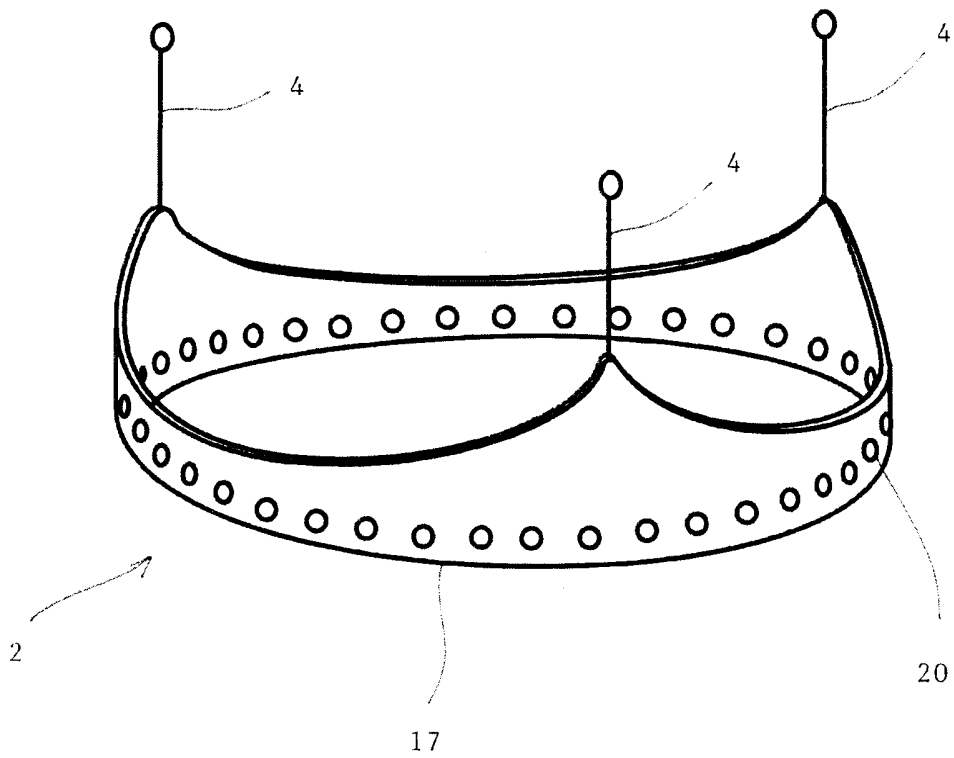


11/15

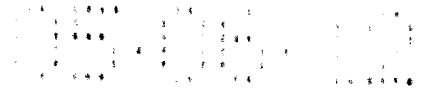
PV 2012-376



OBR. 12a

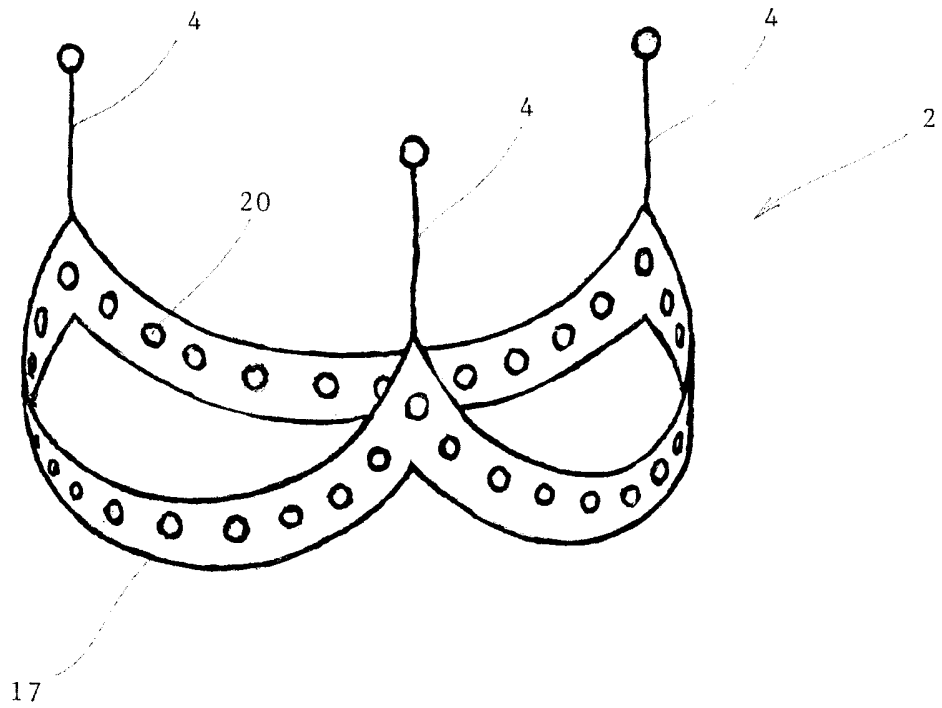


12/15

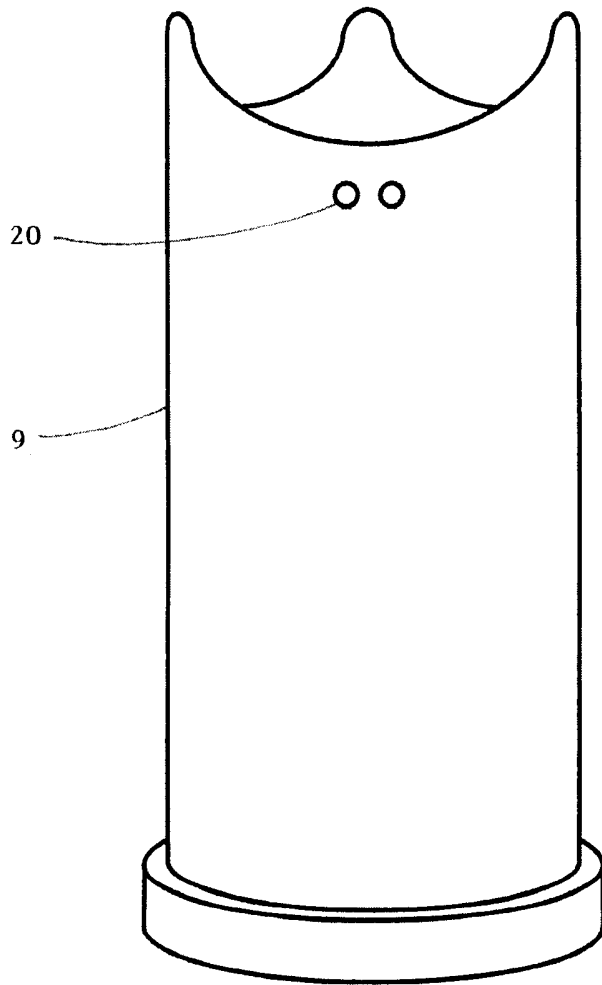


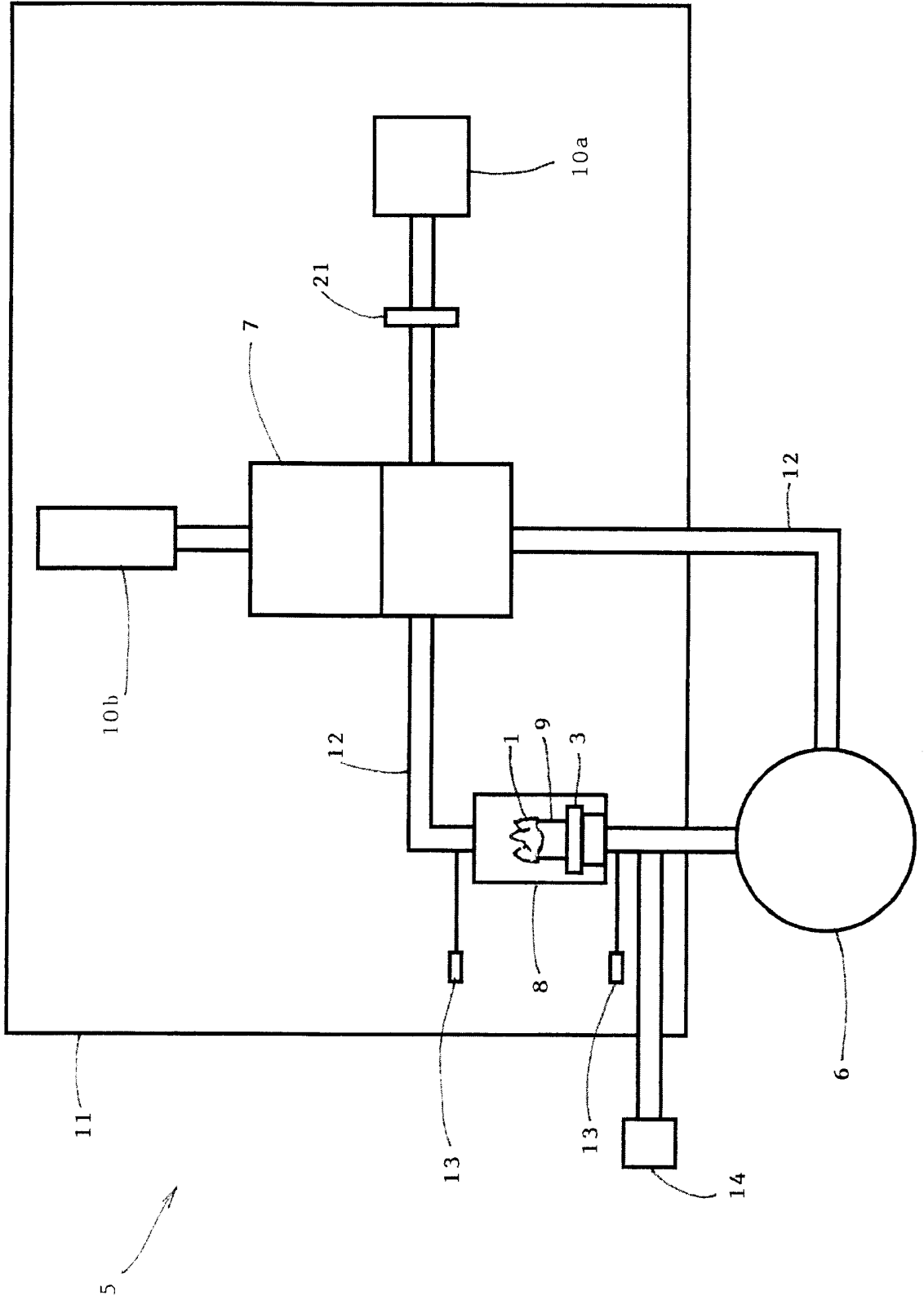
PV 2012-376

OBR. 12b



OBR. 13





OBR. 14

15/15

OBR. 15

