

615.44-092.4:611-018

NĚKOLIK POZNÁMEK KE KONZERVACI TKÁNÍ IN VITRO*

MUDr. Rudolf KLEN

KÚNZ — fakultní nemocnice, Tkáňová ústředna, Hradec Králové

Není pochyb o tom, že přenos čerstvé autogenní tkáně má obvykle největší naději na úspěch, nicméně častější úspěšné používání cizorodých štěpů ukazuje, že cizorodé tkáně v některých případech soutěží s autogenními štěpy, v neřídých případech jsou pak jedinou možností, jak provést nutnou nebo nezbytnou operaci. Tyto případy jsou všeobecně známé a chci jen upozornit na naše pozorování, podle něhož je autotransplantace autogenního kostního štěpu kontraindikována po vynětí kostního nádoru, protože se v autogenních štěpech tvoří recidivy, kdežto v cizorodých štěpech jsme zatím ještě žádnou nepozorovali (1). Musíme přísně dbát, aby indikace k používání cizorodých tkání byly přesně

dodržovány, abychom zabránili diskreditaci této léčebné metody, která je snadno možná tam, kde cizorodé konzervované tkáně jsou snadno dostupné. Zhotovení tkáňové konzervy se skládá z odběru, úpravy a konzervace, která v zásadě řeší otázku dárcovství.

Výsledek transplantace záleží nejen na správné indikaci a dokonalém provedení operace, ale též na vlastnostech štěpu. Zatím co konzervace tkání je celkem propracována, neznáme přesná kritéria výběru tkáňových štěpů. Že pro osud implantovaného chrupavkového štěpu je rozhodující dobrý stav proteinopolysacharidového komplexu, jsme se přesvědčili u králíků, kterým jsme implantovali čerstvou normální homogenní chrupavku a pro srovnání čerstvou papainizovanou homogenní chrupavku. Zatímco normální

*). Přepracovaná přednáška přednesená v Ústavu experimentální biologie a medicíny AMV SSSR v Moskvě.

chrupavka způsobila zcela malou reakci a velmi dlouho přežívala, způsobily papainizované štěpy bouřlivou reakci místní i v regionálních lymfatických uzlinách, která je v krátké době zničila (2).

První etapou při zhotovení tkáňového štěpu je výběr vhodné tkáně a jedna z prvních otázek, kterou si při tom klademe, je odhad stupně autolýzy. Ten záleží hlavně na druhu tkáně a jejím stavu před smrtí, dále na době uplynulé mezi smrtí a odběrem a konečně na teplotě, při níž je mrtvé tělo uloženo.

Obsah a stav polysacharidů cévního štěpu má význam na příklad pro jeho imunologické, mechanické a antikoagulační vlastnosti, a proto jsme histochemicky sledovali na aortách opic jejich depolymerizaci za 2,5 a 10 hodin při pokojové teplotě a při $+4^{\circ}\text{C}$. Nejodolnější se ukázaly látky ze skupiny kyselých mukopolysacharidů, méně jsou odolné polysacharidy s nesubstituovanými 1,2 glykolovými skupinami. Tukové látky jsou nejcitlivější. Celkem lze říci, že uložením opičích těl v teplotě $+4^{\circ}\text{C}$ se asi dvakrát zpomaluje autolýza (3).

Hniloba je druhý způsob rozkladu tkáně a děje se mimo působení fermentů vlastních též fermenty sit venia verbo „parazitujícího“ organismu. Ten záleží především na druhu kontaminace a způsobu konzervace. Pozorovali jsme, že hniloba je rychlejší rozklad tkáně než autolýza. *Penicillium nigricans* parazitující na kloubní chrupavce konzervované v mulu nasáklém v roztoku F 1/2 v atmosféře CO_2 při $+4^{\circ}\text{C}$ působí již za 14 dní podstatný úbytek glykogenu, za 1 měsíc zvýšený úbytek látek barvicích se Halle-Müllerovou metodou a za 3 měsíce úplné vymizení buněčných struktur na rozdíl od nekontaminovaných tkání konzervovaných zcela stejným způsobem. Tento urychlený rozklad neumíme přesně charakterizovat a nevíme, zda se oba pochody sčítají, či potencují (4).

Nejčastější vlivy vnějšího prostředí, které mění tkáň, je vysychání a působení vzdušného kyslíku. Přesvědčili jsme se, že vysychání je možno makroskopicky snadno orientačně sledovat podle ztráty lesklosti povrchu. Aby se zabránilo oxidování, ukládají se tkáně buď do vakua nebo do atmosféry některých plynů, což je technicky obvykle snazší. Všechny používané plyny však nejsou zcela netečné. Tak například dusík se rozpouští v tucích, tkáň pak černá a podle našich pozorování je i jinak účinný. Tak soudíme na základě pozorování, že výpotek z chrupavčitých a kostních štěpů uložených v něm obsahuje vločky, na rozdíl od štěpů uložených ve vzduchu, kyslíku, argonu nebo kyslíčnicku uhličitým při jinak zcela stejných podmínkách konzervace (5).

Otázka kontraindikace odběru štěpu je značně komplikovaná a otevřená. Tak například podle našeho názoru směrnice Committee on Blood Vessel Banks pro výběr cévních štěpů považujeme jen za rámcové a doporučujeme je doplnit předně zkouškou na perforaci. Pro přehlédnutí endotelálního povrchu cévního štěpu, který má zvláštní

důležitost pro vznik trombů a je špatně přístupný přímému pozorování, jsme vypracovali endoskopickou metodu, kterou jmenujeme arterioendoskopie. Provádí se tak, že dobře propláchnutou cévu zavěsíme v nádobě s Tyrodovým roztokem a do cévy zasuneme endoskop. Snadno zjistíme různé odstupy větví a po mírném zatažení do délky jsou dobře patrné příčné neperforující trhliny. Časné známky autolýzy jsou charakterizovány odchýlením endotelu, které se vystupňuje až do odloučení. Dále nalézáme různé drobné infiltrace, například žluté tečkovité nebo bílé tečkovité, bílé čárkovité nebo ateromatózní vředy s velmi bizarním uspořádáním spodiny. Systematicky provedená arterioendoskopie nás dobře informuje o endotelálním povrchu štěpu (6). Stav vrstev pod endotelem můžeme zhruba zjistit rentgenovým vyšetřením. Tímto šetrným způsobem můžeme zachytit i začáteční fáze kalcifikace nebo drobné kalcifikace, které se často nalézají při odstupu větví, kde bychom se pohmatem bez poškození štěpu asi nezjistili. Ani ortorentgenograficky uložené kalcifikace nám neuniknou (7). Diafonoskopii provádíme současně při arterioendoskopii, zdá se nám však nepřesná a nepřináší nové poznatky. Opatrně provedená palpce se může uplatnit u preparátů, u nichž máme podezření na Mönckebergovu sklerózu. Při prohlídce řezné plochy štěpu se snažíme určit tloušťku jednotlivých vrstev. Všechny zjištěné odchylky od normy jsou signálem pro podrobnější vyšetření, které utváří náš definitivní soud.

Získání sterilní tkáně je obtížný úkol zvláště u přežívajících tkání. Je řada metod dekontaminujících štěp. Na našem pracovišti jsme vypracovali zcela jednoduchý, velmi účinný a laciný způsob povrchové dezinfekce biochemicky aktivních kostních, chrupavčitých a fasciálních štěpů, jímž bylo dosud zpracováno na 3000 štěpů, které byly úspěšně použity v klinice. Sterility jím dosahujeme za 15 minut. Morfologicky se jeví jeho působení na *Bacillus anthracoides* například vylitím plazmy, vymizením gramnegativně se barvících částí, úplným rozpadem mikroba. Postup je patentován pod číslem 92515 a může být využit i na jiných pracovištích.

Důležitá etapa zhotovení některých tkáňových štěpů je úprava. Do této kapitoly též spadá příprava heterogenních štěpů, která musí být intenzívně studována, protože tyto štěpy po vhodné úpravě mají podle našich osmiletých zkušeností, zahrnujících asi 1500 konzerv, značnou použitelnost zvláště v kostní chirurgii, protože je zřejmé, že dnešním požadavkům na kostní štěpy nelze vyhovět jen homogenním materiálem. Důležité je, že při jejich opětovaném používání nebyla zjištěna alergická reakce (8).

Konzervací sterilních tkáňových štěpů nazýváme takový postup, jímž se zastaví nebo zvolní předně činnost autochtonních tkáňových enzymů a zadruhé změny chemicky labilních látek. Autolýze podléhají všechny tkáně. U mrtvých štěpů-biologických protéz (například os purum, formaldehydizované cévy apod.) jsou enzymy

zničeny a labilní látky přeměněny na látky poměrně stabilní. Ty sice mohou též měnit své složení hlavně působením vlivů vnějšího prostředí, ale tyto změny nepovažujeme za autolýzu. Po dobu konzervace má si štěp uchovat vlastnosti, které jsou důležité pro úspěch přenosu. Jakmile tyto vlastnosti ztrácí, dochází k expiriu. Zjišťovali jsme expirium kloubní chrupavky psa konzervované hemibioticky při $+4^{\circ}\text{C}$ v mulu namočeném v roztoku F 1/2, 10% homogenním séru a parafínovém oleji tím způsobem, že jsme různé dlouhou dobu konzervované terče implantovali do kloubu a zjišťovali jejich osud za 3 měsíce. Zjistili jsme, že za 14 dní jsou makroskopicky všechny terče dobře přihojené, za 28 dnů terče konzervované v mulu s roztokem F 1/2 byly rozpadlé, ostatní dobře přihojené a po 84 dnech konzervace byly i štěpy konzervované v 10% séru z větší části rozpadlé; štěpy z parafínu jevíly též první známky rozpadu. Histologické nálezy makroskopický obraz zpřesnily (9).

Způsoby konzervace tkání se dělí na dvě skupiny podle toho, zda při nich tkáň přežívá, či zda jsou při nich uchovávány v mrtvém stavu. Podle našeho názoru je nutné mrtvé štěpy dělit do dvou podskupin, a to předně do podskupiny štěpů biochemicky účinných a do skupiny biologických protéz. Mezi mrtvé biochemicky účinné štěpy řadíme ty, jejichž biochemické složení není podstatně změněno od složení živých normálních tkání, to jsou například normální tkáň konzervované zmrazením. Za biologickou protézu považujeme štěpy živočišného původu, jejichž složení je hrubě změněno od složení stejné živé normální tkáň. To jsou tkáň vystavené působení vyšších teplot nebo chemických působků, jako například formaldehydu, etanolu apod., někdy kombinací obou těchto způsobů. Od biologických protéz musíme odlišovat umělé protézy, což jsou náhrady tkáň zhotovené z alloplastického materiálu.

Při konzervaci přežívajících tkání i biochemicky účinných štěpů lze použít tří principů. Trvání organismu v čase záleží na chemických změnách vzniklých ve tkáních. Tak vznikl pojem „fyzilogický čas“, který je odlišný od našeho konvenčního času a je do značné míry individuální pro každý organismus. Fyzilogický čas lze považovat za jeden z parametrů života. Einstein v teorii relativity dokázal, že hmotné vlastnosti — pohyb, prostor a čas jsou na sobě závislé a že se změnou jedné se mění i ostatní. Tak dochází k tak zvané „dilataci času“, při níž se mění průběh dějů probíhajících v jiném prostoru. To znamená, že na planetách větších, než je naše Země, kde je též silnější gravitační pole, se plynutí děje prodlužuje. Též na soustavách, které se pohybují větší rychlostí, se děje prodlužují. K prodloužení dějů dochází tehdy, je-li rychlost soustavy alespoň 200 000 km za vteřinu. K dvojnásobnému prodloužení dějů dochází při rychlosti 260 000 km za vteřinu při srovnání s rychlostí dějů, jež probíhají na tělese, které je vzhledem k prvnímu v klidu. Bylo by tedy teoreticky možno počítat při konzervaci tkání s astronautikou.

Za druhé bude asi v budoucnu při konzervaci tkání využito působení enzymatických inhibitorů a kyselé reakce. Zatím byly těmito způsoby učiněny první kroky. K plnému uplatnění této metody dojde po objevení látky, která vhodným způsobem vratně sníží enzymatické pochody. Při usilovném výzkumu cytostatik může se na takovou látku přijít.

Nejrozšířenější metodou konzervace tkání je působení snížení teploty. Teplota je jedním ze základních faktorů, které řídí rychlost a do určité míry i kvalitu látkové výměny. Snížená teplota působí předně podle zákonů termodynamiky na rychlost probíhajících reakcí a za druhé snižuje aktivitu tkáňových enzymů. V hrubých rysech se rychlost biochemických reakcí dá vyjádřit matematicky tak zvaným teplotním koeficientem navrženým van't Hoffem a propracovaným Arrheniusem. Je tedy konzervace přežívajících tkání biologicko-ekologický problém zabývající se především působením snížené teploty; konzervace mrtvých biochemicky účinných štěpů je biochemická termodynamická záležitost.

Působení chladu na tkáň musíme sledovat ve třech časových etapách: 1. po dobu mrazení, 2. od skončení zmrazení až do definitivního rozmrazení a 3. při rozmrazování, a to hlavně z hlediska fyzikálního, biochemického a biologického. Jde zvláště o změny hydratace, iontové, osmotické, koloidní, difúze, permeability a rychlosti chemických reakcí. Souhrnně se tyto změny projevují jednak všeobecnými biologickými změnami, z nichž nejdůležitější je vliv na životaschopnost a antigenní účinnost; jednak speciálními změnami, například u kosti osteogenní princip.

Kvalitativní a kvantitativní rozdíly v pronikání chladu záleží na četných zcela jemných rozdílech ve složení mrazené tkáň a na rychlosti pronikání chladu. V suspenzi erytrocytů v glycerinsalinu probíhá pochod takto: Led při skle ve stadiu, kdy je ještě zachován tekutý roztok solí, má houbovitou strukturu a skládá se z krystalů vody, v jejichž okách je koncentrován roztok krystaloidů. Oka mezi sebou souvisejí, což lze dokázat tím, že po určité době stání se původně stejnoměrné zabarvení suspenze změní a na dně je suspenze červenější od sedlých erytrocytů.

I tento příklad je značně jednoduchý při srovnání se způsobem pronikání chladu pevnou tkání, zvláště jde-li o větší blok tkáň s poměrně malým povrchem. U tkání je průnik chladu komplikován dále i různým, často spleťtým uspořádáním morfologických částí o různých teplotních koeficientech, které tvoří několik vrstev. Vzpomeňme na příklad Haverského systému kostí nebo uspořádání kolagenní membrány a elastických vláken cév.

O rozdílech v mrznutí při rychlém a pomalém zmrazování stejně jako o způsobu rozmrazování a použití ochranných protimrazicích prostředků se nebudu zmiňovat, protože jsou dobře známy. Chci jen zdůraznit, že pomalé mrazení je velmi důležité pro biologické objekty, protože při nich obvykle vznikají krystaly jen v mimo-

buněčných prostorech. Tento fakt je definicí pomalého mrazení a ne jeho početní vyjádření. Snad u žádné měkké tkáně nedochází při pomalém mrazení k prasknutí buněčné blány. Kostní trámce mrazení trhá a mění též utváření chrupavkových kanálů (10). Po rozmrazení buňka reimbibuje vodu, takže okamžitý histologický vzhled je často k nerozpoznání od histologického obrazu nezmrazené normální tkáně.

Zvláštní pozornost vyžaduje nádorová tkáň. Všeobecně lze říci, že nádorové buňky jsou odolnější proti zmrazení a rozmrazení, takže u některých nádorových kmenů není zapotřebí k zajištění jejich přežití ochranných protimrazicích prostředků jako u normálních tkání. To je asi způsobeno rozdílem fyzikálně chemické struktury normální buňky a buňky nádorové. Jestliže tato fyzikálně chemická struktura nádorové buňky je dřívější stadium než plně vyvinutý morfologický obraz nádoru, studujeme, zda by nebylo možno využít tohoto jevu k časné diagnostice některých nádorů (11).

Jak jsme již řekli, hraje vliv prostředí, v němž je tkáň uložena, důležitou úlohu. Pozorovali jsme to na příkladu vlivu různých kapalin na přežívání nebo usmrcení *Escherichia coli*, kterou jsme vystavili působení náhlého zchlazení.

Z toho je zřejmé, že jedním z nejdůležitějších faktorů v této problematice je obsah vody, který značně kolísá nejen u různých tkání, ale i individuálně. Tyto rozdíly byly dokázány i pro tak málo hydratovanou tkáň, jako je kost. Je zajiště správné při epikritickém hodnocení, které předchází odběr, uvážit i tyto faktory. Známe totiž stavy, u nichž tkáň ztrácí značnou část vody, jindy musíme předpokládat její větší obsah. Pro praxi odběru je na příklad důležitý opomíjený fakt, že u osob stížených poraněním nebo onemocněním mozku, jejichž těla bývají častým zdrojem humánních štěpů, dochází ne zřídka k zvláštní poruše ledvin s hypernatrémií, hyperchlorémií a azotémií, která podstatně mění vlastnosti tkání.

Již staré pravidlo učilo, že „corpora non agunt, nisi soluta“. Protože lze dostatečně nízkým vakuem dosáhnout sublimace vodních par z ledu, bylo těchto principů využito a postupně se pracovalo nesporně praktická konzervační metoda sušení za mrazu — lyofilizace. Protože tento způsob je komplikovaný a nákladný, vypracovali jsme jednoduchou metodu sušení fascií určených především k poúrazovým plastikám dura mater, která dobře zachovává morfologickou strukturu.

Domnívám se, že chirurgie pouhých extirpací, resekcí a podobných mutilujících byt dnes ne-

zbytných operací dosáhla svého vrcholu. S postupným rozvojem prevence a konzervativní léčby nádorů bude tato chirurgie ztrácet význam. Chirurgií budoucnosti je chirurgie rekonstrukční, kterou lze do určité míry zařadit k prevenci. Této chirurgii jsou konzervované tkáně již dnes vítaným pomocníkem. Možnost dalšího rozmachu používání konzervovaných tkání vyplývá z pokusů s transplantací orgánů a údů. Že konzervace celých orgánů a údů chladem je schůdná cesta pro další práci, ukázaly pokusy, při nichž se podařilo oživit zmrzlé krysy.

Zbývá však ještě vykonat mnoho průkopnické práce v základním výzkumu a mnoho těžké práce spojené s realizací kladných výsledků. Vyspělá technika a plánovaný rozsáhlý rozvoj biologických věd se budou zajisté významnou částí podílet na splnění této formy budoucího lékařství. Pak prorocký obraz Fra Angelico o zázraku patronů chirurgů svatého Kosmy a Damiána o transplantaci nohy černocho bělochovi přestane být idealistickou vidinou a stane se prací člověka.

Souhrn

Jsou probrány nejdůležitější úseky konzervace normálních a nádorových tkání, tj. výběr vhodné tkáně, autolýza, hníloba, vliv prostředí a teploty, které autor dokládá vlastními pozorováními.

Резюме

Рассмотрены важнейшие моменты консервирования нормальных и опухолевых тканей, т. е. выбор подходящей ткани, автолиз, загниваемость, влияние среды и температуры. Своё изложение автор документирует собственными наблюдениями.

Summary

Report on the preservation of normal and tumour tissue, i. e. selection of suitable tissue, autolysis, putrefaction, effect of environment and temperature. Personal experiences are presented.

Písemnictví

1. Klen R.: Radiobiologica, Radiotherapie 1961; 2/1 : 109.
2. Klen R., Jirásek J.: Státní výzkum XI-2-4, r. 1961.
3. Klen R., Hradil I.: IV. mezinár. angiolog. kongres, Praha 1961, v tisku.
4. Klen R., Herout V.: Folia Biol. (Praha) 1959; 5 : 140.
5. Klen R.: nepublikováno.
6. Klen R.: Lyon chirurg 1958; 54 : 4 : 549.
7. Klen R.: Čechosl. med. obozr. 1958; IV/4 : 318.
8. Klen R.: Acta chir. plast. 1960; 2/2 : 153.
9. Klen R., Herout V.: Folia Biol. (Praha) 1960; 5 : 367.
10. Klen R.: Orthop., travmat. protezir. 1958; 2 : 38.
11. Klen R., Sýkora I.: Folia Biol. (Praha) 1961; 7 : 373.