

**Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta**

Postgraduální doktorské studium v biomedicině

Oborová rada: Experimentální chirurgie

Předseda: prof. MUDr. Zdeněk Krška, DrSc.



**UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta**

MUDr. Jan Hrubý

Vliv nového kryokonzervačního protokolu na imunogenicitu a rejekci
tepenných aloštěpů u potkanů

Influence of new cryopreservation protocol on immunogenicity and rejection of arterial
allografts in rats

Dizertační práce

Školitel: Priv.-Doz. MUDr. habil. Ivan Matia, Ph.D.

Konzultant: Doc. MUDr. Miroslav Špaček, Ph.D.

Praha, 2021

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne 19.3.2021

MUDr. Jan Hrubý

Identifikační záznam:

HRUBÝ, Jan. *Vliv nového kryokonzervačního protokolu na imunogenicitu a rejekci tepenných aloštěpů u potkanů. [Influence of new cryopreservation protocol on immunogenicity and rejection of arterial allografts in rats].* Praha, 2021. Počet stran: 117, počet příloh: 4. Disertační práce (PhD.). Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, II. chirurgická klinika kardiiovaskulární chirurgie. Vedoucí práce Priv.-Doz. MUDr. habil. Matia, Ivan, Ph.D.

PODĚKOVÁNÍ

Mé poděkování patří zejména mému školiteli Priv.-Doz. MUDr. habil. Ivanu Matiovi, Ph.D., který mne po celou dobu studia podporoval a poskytoval užitečné rady a bez jehož původní práce by tento projekt neposkytl tolik cenné srovnání obou prací. Dále bych chtěl poděkovat mému konzultantovi Doc. MUDr. Miroslavu Špačkovi, Ph.D., který stál za myšlenkou vzniku této práce a který definoval a zajistil technické a personální zajištění projektu. Další poděkování patří MUDr. Mikuláši Mlčkovi, Ph.D., který nám poskytl potřebné zázemí při práci s laboratorními zvířaty v prostřední operačního sálu na Fyziologickém ústavu 1. LF UK. Velký dík patří MUDr. Pavlu Měřičkovi, Ph.D., který svými znalostmi a zkušenostmi při kryokonzervaci tkání zajistil bezpečné a správné zamrazení a uchování odebraných štěpů a též MUDr. Ondřejovi Naňkovi, který nám poskytnutím kvalitního mikroskopu v prostorách Anatomického ústavu 1. LF UK umožnil histologicky vyšetřit odebrané štěpy. Závěrem bych rád poděkoval prof. MUDr. Jaroslavu Lindnerovi CSc., který podpořil realizovaný projekt a po celou dobu studia mne podporoval svými radami a zájmem o danou problematiku.

SOUHRN

Cílem předložené experimentální práce bylo studovat na potkanním modelu akutní buňkami a protilátkami zprostředkovanou imunitní reakci u příjemců štěpů břišní aorty ošetřených novým standardizovaným klinickým kryokonzervačním protokolem s pomalým rozmrazováním používaným v „Programu transplantace cévních štěpů v České republice“. Dalším cílem naší práce bylo porovnat vliv dvou základních typů konzervačních protokolů používaných v tomto programu (kryokonzervační protokol s pomalým rozmrazováním a protokol konzervace chladem) na akutní imunitní reakci po transplantaci takto ošetřených štěpů břišní aorty u potkanů.

Kryokonzervované štěpy břišní aorty jsme transplantovali syngenně mezi potkany kmene Lewis (skupina CRYO-ISO, doba kryokonzervace 172,6 dnů) a alogenně mezi potkany kmenů Brown – Norway a Lewis (skupina CRYO-ALO, doba kryokonzervace 179,3 dnů).

Štěpy jsme explantovali 30. pooperační den a následně vyšetřili histologickými a imunohistochemickými metodami se zaměřením na typické známky akutní rejekce ve třech základních vrstvách aortální stěny. Sledovali jsme přítomnost endotelových buněk, známky intimální hyperplázie, šířku tunica media, přítomnost nekrotizace a ukládání protilátek třídy G v této vrstvě, počet CD4+, CD8+ a LEW MHC II+ imunokompetentních buněk v adventiciální vrstvě aortální stěny. Protilátkovou imunitní odpověď příjemců jsme sledovali vyšetřením koncentrace donor specifických protilátek proti MHC antigenům I. a II. třídy v periferní krvi předoperačně a na 30. den po transplantaci.

Získaná data jsme statisticky porovnali se základními daty našeho minulého experimentu studujícího akutní rejekci chladem konzervovaných štěpů břišní aorty na stejném zvířecím modelu.

Kryokonzervované aloštěpy vykazovaly na 30. den po transplantaci normální morfologii aortální stěny se zachovalou diferenciací všech tří základních anatomických vrstev. Tunica intima kryokonzervovaných aloštěpů nevykazovala na rozdíl od chladem konzervovaných žádné nebo jen minimální známky intimální hyperplázie. Luminální povrch byl pokryt endoteliálními buňkami. Tunica media kryokonzervovaných aloštěpů nevykazovala na rozdíl od chladem konzervovaných známky nekrotizace s ukládáním imunoglobulinů G. Adventiciální infiltrace kryokonzervovaných aloštěpů buňkami CD4+, CD8+ byla desetkrát nižší ve srovnání s chladem konzervovanými aloštěpy. Statisticky vyšší koncentrace ve srovnání s předoperačními hodnotami u příjemců kryokonzervovaných aloštěpů jsme zaznamenali pouze u protilátek proti MHC

antigenům I. třídy. U příjemců chladem konzervovaných aloštěpů jsme zaznamenali na 30. den ve srovnání s předoperačními hodnotami statisticky významné zvýšení koncentrace u obou tříd anti MHC protilátek.

Závěrem naší experimentální studie je, že nový standardizovaný klinický kryokonzervační protokol s pomalým rozmrazováním vedl 30 dnů po transplantaci aloštěpů břišní aorty u potkanů ke snížení jejich imunogenicity a výraznému potlačení známk akutní rejekce těchto štěpů ve srovnání s akutní rejekcí chladem konzervovaných aloštěpů.

Klíčová slova: kryokonzervace, akutní rejekce, isogenní, alogenní cévní štěp, myointimální hyperplázie, MHC protilátky třídy I a II.

SUMMARY

The aim of the presented experimental work was to study an acute cell and antibody-mediated immune response in recipients of abdominal aortic grafts treated by a new standardized clinical cryopreservation/slow thawing protocol used in the "Vascular graft transplant program in the Czech Republic" in a rat model. Another aim of our study was to compare the influence of two basic types of conservation protocols used in this program (cryopreservation/slow thawing protocol and cold-stored protocol) on the acute immune response after transplantation of such treated abdominal aortic grafts in rats.

Cryopreserved abdominal aortic grafts were transplanted syngeneously between Lewis rats (CRYO-ISO group, cryopreservation period 172.6 days) and allogeneically between Brown-Norway and Lewis rats (CRYO-ALO group, cryopreservation period 179.3 days).

The grafts were explanted on day 30 after transplantation and subsequently examined by histological and immunohistochemical methods, focusing on typical signs of acute rejection in the three basic layers of the aortic wall. We monitored the presence of endothelial cells, signs of intimal hyperplasia, tunica media thickness, the presence of necrosis and deposition of immunoglobulin class G in this layer, the number of CD4+, CD8+ and LEW MHC II+ immunocompetent cells in the adventitial layer of the aortic wall. We monitored the recipient's antibody immune response by examining the concentration of donor-specific anti-MHC class I and II antibodies in peripheral blood preoperatively and on day 30 after transplantation.

We compared the obtained data statistically with the basic data of our previous experiment studying acute rejection of cold-stored abdominal aortic grafts on the same animal model.

Cryopreserved allografts showed regular aortic wall morphology with well-preserved differentiation of all three basic anatomical layers on day 30 after transplantation. Tunica intima of cryopreserved allografts showed no or only minimal signs of intimal hyperplasia, in contrast to cold-stored allografts. The luminal surface was covered by endothelial cells. Compared to cold-stored, tunica media of cryopreserved allografts did not show signs of necrosis and immunoglobulin class G deposition. Statistically higher concentrations compared to preoperative values in recipients of cryopreserved allografts were recorded only for anti-MHC class I antibodies.

Day 30 recipient sera of both cryopreserved and cold-stored allografts showed significant higher inhibition of fluorescence-labelled MHC class I antibody binding to donor quiescent splenocytes compared to preoperative values. However, the statistically higher inhibition of

fluorescence-labelled MHC class II antibody binding to donor quiescent splenocytes compared to preoperative values was observed only in recipients of cold-stored allografts.

In conclusion, aortal wall histology of rat allografts treated by our new standardized clinical cryopreservation/slow thawing protocol was comparable to that of the cryopreserved isografts on day 30 posttransplant. The immunogenicity of cryopreserved aortal allografts was significantly lower compared to that of cold-stored aortal allografts.

Key words: cryopreservation, acute rejection, isogenic, allogenic vascular graft, myointimal hyperplasia, MHC class I and II antibodies

OBSAH

1.	ÚVOD	12
1.1.	Tepenné štěpy v léčbě infekce cévních náhrad	12
1.2.	Experimentální kryokonzervační protokoly	13
1.2.1.	Hodnocení rejekce	18
1.2.2.	Proces kryokonzervace	18
1.2.2.1.	Proces vitifikace	19
1.2.3.	Proces rozmrazení	20
1.2.4.	Studená ischemie	20
1.3.	Klinické kryokonzervační protokoly ve světě	21
1.4.	Současný stav klinického použití tepenných štěpů v léčbě infekce cévní protézy v České republice	24
1.4.1.	Nový kryokonzervační protokol v „Programu transplantace cévních štěpů v České republice“	25
2.	CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	27
2.1.	Hypotéza	28
3.	MATERIÁL A METODY	29
3.1.	Etické prohlášení	29
3.2.	Základní rozvržení experimentu	29
3.3.	Charakteristika experimentálních skupin	30
3.4.	Chirurgická technika odběru štěpů břišní aorty	31
3.5.	Protokol kryokonzervace štěpů břišní aorty	33
3.6.	Uskladnění kryokonzervovaných štěpů břišní aorty	36
3.7.	Protokol pomalého rozmrazení kryokonzervovaných štěpů břišní aorty	36
3.8.	Chirurgická technika transplantace štěpů břišní aorty	37
3.9.	Časové údaje kryokonzervace, rozmrazení a transplantace štěpů břišní aorty	39
3.10.	Pooperační péče příjemcovských zvířat	41
3.11.	Odběr krevních vzorků za účelem stanovení koncentrace donor specifických protilátek u příjemců štěpů břišní aorty	42
3.12.	Explantace štěpů břišní aorty 30. den po transplantaci	42
3.13.	Histologické a imunohistochemické vyšetření explantovaných štěpů břišní aorty	42
3.13.1.	Detekce CD4+, CD8+ pozitivních buněk a buněk s von Willebrandovým faktorem	43
3.13.2.	Detekce Lewis MHC II pozitivních buněk	44
3.13.3.	Detekce imunoglobulinů třídy G	45
3.14.	Detekce donor specifických anti-MHC protilátek I. a II. třídy v periferní krvi příjemců	45
3.14.1.	Získání splenocytů dárcovských zvířat k vyšetření periferní krve příjemců průtokovou cytometrií	45
3.14.2.	Vyšetření krevních sér příjemců průtokovou cytometrií	46

3.15.	Statistické metody	47
4.	VÝSLEDKY	48
4.1.	Histologie a imunohistologie kryokonzervovaných aloštěpů (CRYO-ALO) a isoštěpů břišní aorty (CRYO-ISO) 30. den po transplantaci.....	48
4.2.	Stanovení koncentrace donor specifických protilátek proti MHC antigenům I. a II. třídy v sérech příjemců kryokonzervovaných aloštěpů a isoštěpů břišní aorty.	54
4.3.	Porovnání imunogenicity aloštěpů břišní aorty ošetřených novým kryokonzervačním protokolem s pomalým rozmrazováním (CRYO-ALO) a aloštěpů ošetřených klinickým protokolem pro uchovávání v chladu (COLD-ALO).....	55
4.3.1.	Srovnání obou protokolů konzervace aloštěpů z hlediska jednotlivých časů studené ischemie	55
4.3.1.1.	Časové intervaly kryokonzervačního protokolu s pomalým rozmrazováním u aloštěpů břišní aorty.....	55
4.3.1.2.	Časové intervaly protokolu pro uchovávání v chladu	56
4.3.2.	Srovnání histologického obrazu kryokonzervovaných (CRYO-ALO) a chladem konzervovaných aloštěpů břišní aorty (COLD-ALO) 30. den po transplantaci	56
4.3.3.	Srovnání koncentrace donor specifických protilátek proti MHC antigenům I. a II. třídy v sérech příjemců kryokonzervovaných a chladem konzervovaných aloštěpů břišní aorty na 30. den po transplantaci.	62
4.4.	Porovnání histologického obrazu isoštěpů břišní aorty ošetřených novým kryokonzervačním protokolem s pomalým rozmrazováním (CRYO-ISO) a isoštěpů ošetřených klinickým protokolem pro uchovávání v chladu (COLD-ISO).....	63
4.4.1.	Srovnání obou konzervačních protokolů isoštěpů z hlediska jednotlivých časů studené ischemie	63
4.4.1.1.	Časové intervaly kryokonzervačního protokolu s pomalým rozmrazováním u isoštěpů břišní aorty.....	63
4.4.1.2.	Časové intervaly protokolu chladem konzervovaných isoštěpů břišní aorty	64
4.4.2.	Srovnání histologického obrazu kryokonzervovaných a chladem konzervovaných isoštěpů břišní aorty 30. den po transplantaci.....	64
5.	DISKUSE	67
6.	ZÁVĚR	70
7.	LITERATURA.....	71
8.	VLASTNÍ PUBLIKAČNÍ AKTIVITA	75
9.	PŘÍLOHY	78
9.1.	Příloha I.....	78
9.2.	Příloha II.....	90
9.3.	Příloha III	107
9.4.	Příloha IV	115

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- AB0 – AB0 systém krevních skupin
- ALO – allogenní experimentální skupina
- CRYO skupina – skupina s transplantovaným zmrazeným štěpem
- COLD skupina – skupina s transplantovaným chladem konzervovaným štěpem
- BN – potkani kmene Brown-Norway
- CD4+ - clusters of differentiation 4+ buňky (pomocné T-lymfocyty)
- CD8+ - clusters of differentiation 8+ buňky (cytotoxické T-lymfocyty)
- ISO – isogenní experimentální skupina
- anti-MHC – anti-major histocompatibility complex (protilátky proti hlavnímu histokompatibilnímu systému)
- MHC – major histocompatibility complex (hlavní histokompatibilní systém)
- anti-HLA – protilátky proti hlavnímu histokompatibilnímu systému
- IgG – imunoglobuliny G
- IL-2 - interleukin 2
- LEW – potkani kmene Lewis
- KST – Koordinační středisko transplantací
- SÚKL – Státní ústav pro kontrolu léčiv
- EU – Evropská unie
1. LF UK - 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy
- IU – mezinárodní jednotka (international unit)
- CIT – čas studené ischemie (cold ischemic time)
- DMSO – dimethyl sulfoxid
- PTFE – polytetrafluorethylen
- POD – pooperační den

1. ÚVOD

1.1. Tepenné štěpy v léčbě infekce cévních náhrad

Infekční komplikace protetických rekonstrukcí břišní aorty prováděných otevřeně jsou v současné literatuře uváděny mezi 0.1-6.0 % (Moher et al., 2009). U endovaskulárních výkonů (EVAR) je incidence infekce stentgraftů mezi 0.2-0.7 % (Moher et al., 2009). V poslední době vzhledem k rostoucímu počtu endovaskulárně prováděných výkonů u starších nebo imunokompromitovaných pacientů je popisován nárůst infekčních komplikací endograftů (O' Connor et al., 2006, Slim et al., 2009).

Infekce umělé cévní náhrady nebo stentgraftu v aortální pozici je i v dnešní době zatížena vysokou morbiditou a mortalitou. Základem léčby je odstranění infikované cévní náhrady a dokonalý debridement infikovaných tkání v okolí. Součástí terapie je i dlouhodobé podávání antibiotik (Chakfé et al., 2020). I když existuje všeobecný konsensus týkající se nutnosti odstranění infikované protézy nebo stentgraftu a potřeby dlouhodobého podávání antibiotik, existují rozdílné názory na typ následné revaskularizace (extra – anatomická vs. *in situ* rekonstrukce) (Chakfé et al., 2020) pro zajištění perfúze distální části těla pacienta a volby použité náhrady. S ohledem na technickou složitost extra – anatomické rekonstrukce, suboptimální pozdní výsledky, riziko fatálního krvácení z podvázaného pahýlu aorty a pánevní ischemie získává na popularitě provedení *in situ* rekonstrukcí (Chakfé et al., 2020).

Volba vhodného typu náhrady u *in situ* rekonstrukcí je pak zcela zásadní. Nejnovější metaanalýza publikovaných výsledků léčby infekce cévních protéz v aortální oblasti uvádí jako nejčastěji používaný materiál pro *in situ* rekonstrukce dacronovou protézu (antibiotiky nebo stříbrem ošetřenou protézu), PTFE protézu, femorální žílu, chladem konzervované tepenné nebo žilní štěpy a kryokonzervované tepenné štěpy (Post et al., 2019).

Největší otázkou bezpečného použití kryokonzervovaných tepenných aloštěpů v léčbě infekcí je kvalita, resp. stupeň poškození jejich stěny procesem kryokonzervace a následného rozmrazení a též v čase probíhající změny v důsledku rejekce transplantované cévy. Kryokonzervační poškození stěny se může projevit v extrémním případě její rupturou v bezprostředním pooperačním období (Lejay et al., 2017). Imunitní reakce příjemce proti transplantované allogenní cévě se též může projevit jako pozdní trombóza s klinickým obrazem končetinové ischemie a vysokým rizikem amputace (Lejay et al., 2017) nebo jako dilatace s rizikem následné ruptury štěpu a fatálního krvácení (Lejay et al., 2017).

Z uvedených důvodů je kvalita a imunogenicita kryokonzervovaných cévních štěpů a její ovlivnění procesem kryokonzervace předmětem mnoha experimentálních studií

1.2. Experimentální kryokonzervační protokoly

Mezi první práce popisující vliv kryokonzervace na imunologické vlastnosti štěpů patří práce publikované Carrelem (Carrel et al., 1910) a následně též Bodem a Fabianem (Bode et al., 1910) již na počátku minulého století. Tito autoři popsali akutní rejekci a časné selhání transplantovaných štěpů kryokonzervovaných při teplotě $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Naprostá většina experimentálních prací však byla publikována v letech 1995-2009 a souvisí samozřejmě s technologickými možnostmi kryokonzervace. Byl při nich použit kryokonzervační protokol, který se v hlavních rysech shoduje s protokolem používaným v současné době v klinické praxi. Jednalo se o jakési preklinické ověření použitých technologií. Naprostá většina experimentálních prací byla provedena na modelu laboratorního potkana (Motomura et al., 1995, Pascual et al., 2004), jen malá část z nich na ovcích (Nataf et al., 1995), psech (J.R. Olmos-Zúñiga et al., 2016) a králících (Kreitman et al., 1997). Experimenty byly provedeny zejména na pracovištích v Evropě (Gabriel et al., 2004, Vogt et al., 1997, Chiesa et al., 1998), Spojených státech Amerických (Brockbank KGM et al., 2007) a v Asii (Moriyama et al., 2019, Saito et al., 2006, Motomura et al., 2019).

Názory na ovlivnění imunogenicity tepenných štěpů procesem kryokonzervace vycházející z těchto experimentů jsou značně rozdílné. Někteří autoři uvádějí, že imunogenicita štěpů zůstává procesem kryokonzervace nezměněna (Pascual et al., 2004, Moriyama et al., 2019, Bia et al., 2005, Nataf et al., 2019). Existují práce, které dokládají, že kryokonzervace imunogenecitu tepenných štěpů dokonce zvyšuje (Solanes et al., 2005, Saito et al., 2006, Gabriel et al., 2006). Největší část prací ale dokládá pozitivní účinek procesu kryokonzervace ve smyslu snížení imunogenicity tepenných štěpů (Giglia et al., 2002, Rodríguez et al., 2012, Knosalla et al., 1998, Motomura et al., 2019). Rozdílné závěry jednotlivých experimentů jsou zčásti podmíněny odlišným technologickým postupem nebo metodou vyhodnocení změn. Pro srovnání uvádíme jednotlivé kroky kryokonzervačních a rozmrazovacích protokolů nejvýznamnějších experimentů provedených na potkanech v tab. 1 a 2 a u ostatních zvířecích modelů v tab. 3 a 4.

Autor	Zvíře	Typ transplantace	Měřené parametry	Konzervační roztok	Čas studené ischemie	Kryokonzervace	Ukladná doba / doba uskladnění	Rozmražení	Krok 2 rozmražení	Před transplantací
Motomura et al., 1995	potkan	hrudní aorta	1.světelná mikroskopie 2.imunohistochemické vyšetření	Médium RPMI 1640	neuveđen	kontrolovanou rychlostí s poklesem teploty o -1°C/min do -40°C v roztoku RPMI 1640, 10%DMSO a cefazolimu sodném	páry kapalného dusíku teplota	rychlé	vodní lázeň o teplotě 37°C	DMSO byl odstraněn ve fyziologickém roztoku s klesající koncentrací DMSO(5%,2,5%,0%,0%) Štěp byl ponechán v roztoku RPMI při teplotě 4°C na suchém ledu
Moriyama et al., 2001	potkan	sestupná aorta do podkoží	světelná mikroskopie	neuveđen	neuveđen	kontrolovanou rychlostí s poklesem teploty o -1°C/min do -80°C v mediu TC-199 doplněném o 10% DMSO	páry kapalného dusíku čas neuveđen	rychlé	vodní lázeň o teplotě 37°C	kryoprotektivní médium bylo odstraněno ve fyziologickém roztoku s klesající koncentrací DMSO (5%, to 2,5%, to 0%)
Pascual et al., 2004	potkan	pánevní tepna do pánevní tepny	1.světelná mikroskopie 2.imunohistochemie 3.průchodnost štěpů	Médium MEM	neuveđen	kontrolovanou rychlostí s poklesem teploty o -1,0°C/min do -120°C v roztoku MEM, 10%DMSO, 20% fetálního bovinního séra. DMSO bylo přidáváno po 5min ve 4 krocích ke snížení cytotoxicity.	páry kapalného dusíku při teplotě- 145°C 30 dnů	automatické pomalé kontrolované rozmražení CM25 P.115, Carbuos Meta'licos S.A., Spain	rychlostí o 1°C/min na pokojovou teplotu	odstranění kryoprotektantu postupným ředěním
Saito et al., 2005	potkan	hrudní aorta do břišní aorty	1.světelná mikroskopie 2.imunohistochemie 3.PCR	neuveđen	neuveđen	kontrolovanou rychlostí s poklesem teploty o -1°C/min do -40°C a poté s poklesem teploty o -5°C/min do -80°C v kryokonzervačním mediu TC-199 doplněném o 10% DMSO	páry kapalného dusíku při teplotě -170°C 7-14dnů	rychlé	koupele ve fyziologickém roztoku o teplotě 37°C	přidání 1,5ml roztoku laktátu po dobu 1min, poté jeho odstranění, cyklus opakován 10x
Gabriel et al., 2006	potkan	subrenální aorta do subrenální aorty	1.světelná mikroskopie 2.zevní průměr 3.compliance	neuveđen	neuveđen	kontrolovanou rychlostí, s poklesem teploty o -1,1°C/min do -80°C v roztoku RPMI 1640, 10% DMSO, 10% fetálního sera, glutaminu a pyruvátu	po dosažení teploty -80°C vložení do par kapalného dusíku 10dnů	rychlé	vodní lázeň o teplotě 37°C	štěpy opláchnuty 3x ve fyziologickém roztoku

Tab.1 – Experimentální práce na potkanech s popsanou zvýšenou imunogenicitou tepenných štěpů po jejich kryokonzervaci a následném rozmražení

Autor	Zvíře	Typ transplantace	Měřené parametry	Konzervační roztok	Odběr-konzervace krok 1	Odběr-konzervace krok 2	Čas studené ischemie	Kryokonzervace	Uskladnění/doba uskladnění	Rozmražení	Krok 2 rozmražení	Před transplantací
Motomura et al., 1995	potkan	descendentní aorta do infrarenální aorty	mikroskopické vyšetření štěpů	Médium RPMI 1640	-		neuveden	kontrolovanou rychlostí s poklesem teploty o -1°C/min do -40°C v roztoku RPMI 1640, 10% DMSO, cefazolín sodný o koncentraci 0.5g/l	páry kapalného dusíku teplota 150°C	rychlé	vodní lázeň o teplotě 42°C	odstranění kryoprotektiva ve fyziologickém roztoku obsahujícím klesající koncentraci DMSO (5%, 2,5%, 1,25% a 0% DMSO)
Giglia et al., 2002	potkan	subrenální aorta do subrenální aorty	1. průměr štěpu v systole a diastole 2. compliance 3. mikroskopické vyšetření	Dulbeccovo modifikované Eagle médium(DMEM) a papaverin 0,12mg/ml	konzervační roztok o TT + 4°C se štěpy uložen na tající led po dobu 18-24hod	inkubace v roztoku DMEM a imipenemu po dobu 4hod při TT 37°C	18-24hod	kontrolovanou rychlostí s poklesem teploty o 0,5°C/min do -60°C v roztoku DMSO, chondroitin sulfátu a sera	páry kapalného dusíku při teplotě -160°C doba uskladnění neuvedena	rychlé na teplotu +4°C	štěpy uloženy do roztoku DMEM a manitolu	zbytkový DMSO a manitol odstraněn ředěním v mediu DMEM s klesající koncentrací manitolu
Nishizaki et al., 2003	potkan	hrudní aorta do subrenální aorty	buněčná viabilita	Tkáňové kultivační médium - 199 (tissue culture medium)			minimální čas neuveden	kontrolovanou rychlostí s poklesem teploty o -1°C/min do -80°C v roztoku mediu- 199, 5% hydroxy-ethyl-piperazon-ethan sulfonové kyseliny a 10% DMSO	páry kapalného dusíku při teplotě -160°C až -180°C 30dnů	rychlé	vodní lázeň o teplotě 40°C po dobu 5min	-
Rodriguez et al., 2012	potkan	llická tepna do llické tepny	mikroskopické vyšetření průchodnost štěpů	MEM (minimal essential medium)	MEM	MEM	teplota neuvedena	kontrolovanou rychlostí s poklesem teploty o -1°C do -120°C v roztoku MEM, 20% fetálního bovinního sera a 10% DMSO přidávaného ve 4 krocích po 5min do 10% koncentrace ke snížení toxicity(2,5%,5%,7,5%,10%)	páry kapalného dusíku o teplotě - 145°C po dobu 30dnů	pomalé kontrolované rozmražení rychlost vzestupu teploty o 1°C /min na pokojovou teplotu		odstranění kryoprotektantu postupným ředěním

Tab.2 - Experimentální práce na potkanech, u kterých byla popsána snížená nebo nezměněná imunogenicitu tepenných štěpů po jejich kryokonzervaci a následném rozmražení

Autor	Zvíře	Typ transplantace	Měřené parametry	Konzervační roztok	Čas studené ischemie	Kryokonzervace	Ukladání/doba uskladnění	Rozmražení	Krok 2 rozmražení	Před transplantací
Nataf et al., 1995	ovce	karotická tepna do karotické tepny	1.světelná a elektronová mikroskopie 2.průchodnost štěpů	Fyziologický roztok o teplotě +4°C	5	kontrolovanou rychlostí s poklesem teploty o -1,5°C/min do -40°C a -5°C/min do -130°C v roztoku RPMI 1640, 4% lidského albuminu a 10%DMSO	páry kapalného dusíku při teplotě -150°C až -170°C 60měsíců	rychlé	vodní lázeň o teplotě 40°C	DMSO byl odstraněn ve fyziologickém roztoku s klesající koncentrací DMSO(8%,6%,4%,2%) při teplotě 37°C
Nataf et al., 1995	ovce	karotická tepna do karotické tepny	1.světelná mikroskopie 2.imunohistochemické vyšetření 3.funkční vyšetření	neuveđen	5	kontrolovanou rychlostí s poklesem teploty o -1,5°C/min do -40°C a -5°C/min do -130°C v roztoku RPMI 1640, 4% lidského albuminu a 10%DMSO	páry kapalného dusíku při teplotě -150°C až -170°C 3 měsíce	rychlé	vodní lázeň o teplotě 40°C	DMSO byl odstraněn ve fyziologickém roztoku s klesající koncentrací DMSO(8%,6%,4%,2%) při teplotě 37°C
Solanes et al., 2005	prase	femorální tepna do femorální tepny	1.světelná mikroskopie 2.imunohistochemie 3.Vyšetření P selektinu a exprese NO synthasy 4.protilátky	5% Glukosa	2	kontrolovanou rychlostí s poklesem teploty o -0,7°C/min do -75°C v Krebs-Henseleitově roztoku a 12% DMSO	po dosažení teploty -70°C vložení do par kapalného dusíku	pomalé dvoustupňové před rozmražením a implantací byly štěpy ponechány 30min na suchém ledu a pak rychle rozmrazeny během 3 minut	vodní lázeň o teplotě 37°C	štěpy fixovány v 10% pufovaném formalínu a fyziologického roztoku pufovaném fosfáty
Bia et al., 2005	lidský	povrchová stehenní tepna - odběr	biomechanické vlastnosti a filtrační funkce	Dekontaminace ve fyziologickém roztoku s flukonazolem, penicilinem G, cefuroximem a gentamicinem o teplotě 4°C	24-48	kontrolovanou rychlostí s poklesem teploty o -2°C/min do -40°C a poté o -5°C/min do -90°C v roztoku 85% RPMI 1640, 5% roztoku lidského albuminu a 10% DMSO	páry kapalného dusíku při teplotě -142°C 30dnů	1.pomalé 2.rychlé	při pokojové teplotě 20°C/min po dobu 30min	zbytkové DMSO bylo odstraněno ve čtyřech 10min krocích s klesající koncentrací DMSO ve fyziologickém roztoku o teplotě 20°C nakonec štěp vložen do fyziologického roztoku
Olmos-Zuaiga et al., 2016	pes	levá plicnice do levé plicnice	1.mikrobiologie 2.průchodnost štěpů 3.světelná mikroskopie	neuveđen	neuveđen	kontrolovanou rychlostí s poklesem teploty o -1°C/min do -70°C v roztoku CS-C media specifického pro endotelové buňky, doplněný o endotelový růstový faktor, 10% DMSO a 20% Fetalní bovinní sérum a antibiotický-antimykotický koktejl	páry kapalného dusíku při teplotě -196°C 15 dnů	rozmražení během 30minut	rehydratace štěpů ve vodní lázni o teplotě 37°C po dobu 30min a následně vložení do vodní lázně o teplotě 37°C	vymytí DMSO ve fyziologickém roztoku o teplotě 37°C

Tab.3 - Experimentální práce na ostatních modelech s popsanou zvýšenou imunogenicitou tepenných štěpů po jejich kryokonzervaci a následném rozmrazení

Autor	Zvíře	Typ transplantace	Měřené parametry	Konzervační roztok	Odběr-konzervace krok 1	Odběr-konzervace krok 2	Čas studené ischemie	Kryokonzervace	Ukladnění/doba uskladnění	Rozmražení	Krok 2 rozmražení	Před transplantací
Boren et al., 1977	pes	karotická tepna do femorální tepny	histologické vyšetření průchodnost štěpů a jejich trombogenicita	štěpy umístěny do roztoku 15% DMSO + methylprednisolonu na dobu 5-10minut			neueden	nekontrovaná rychlost, rychlé zmrazení v parách kapalného dusíku na teplotu -196°C	páry kapalného dusíku od 5min do 90dnů teplota 150°C	rychlé	vodní lázeň o teplotě 37°C	-
Knosalla et al., 1996	pes	hrudní aorta do subrenální aorty	průchodnost štěpů výskyt anastomotických pseudovýdutí stupeň vhojení štěpu mikroskopické vyšetření	polyethylenglykol při teplotě 4°C po dobu 4hod	Dekontaminace v roztoku s vankomycinem 0.3mg/ml, lincomycinem 0.125mg/ml po dobu 48hod	inkubace v Ringerově roztoku, polyethylenglycolu o koncentraci 30g/l a 12,5% DMSO po dobu 120min	neueden	kontrolovanou rychlostí s poklesem teploty o -1° C/min na teplotu -40° C a -5° C/min na teplotu -130° C v roztoku polyethylenglykolu, Ringerova roztoku a 12.5% DMSO	páry kapalného dusíku teplota 150°C	rychlé	vodní lázeň o teplotě 42°C	štěpy opláchnuty ve fyziologickém roztoku obsahující klesající množství DMSO(8%,4%,2%)
Kreitmann et al., 1996	králík	infrarenální aorta do infrarenální aorty	průměr histologické vyšetření	Medium RPMI - 1640 o teplotě 4°C	Dekontaminace v mediu obsahujícím polymixin, vankomycin, cefoxitin a lincomycin po dobu 6hod		4hod	kontrolovanou rychlostí v roztoku 10% DMSO a 4% lidského albuminu konečná teplota a rychlost zmrazení neuedeny	páry kapalného dusíku teplota 150°C	rychlé	vodní lázeň o teplotě 37°C	štěpy ihned opláchnuty od DMSO a umístěny do media RPMI o teplotě +4°C
Pukacki et al., 2000	lidský	neprovedena	vyšetření mechanických vlastností	RPMI-1640	RPMI-1640 + 10% fetální serum+ 20% DMSO o TT 4°C se štěpy	inkubace v roztoku RPMI - 1640 + 10% FKS+20% DMSO po dobu 60min	1hod	kontrolovanou rychlostí s poklesem teploty o 1K/min do -80°C v roztoku RPMI 1640, 20%DMSO, 10%FKS	páry kapalného dusíku teplota neuedena 14-28 dnů	rychlé	vodní lázeň o teplotě 37°C po dobu 15min	vymytí DMSO ve fyziologickém roztoku po dobu 30min

Tab.4 - Experimentální práce na ostatních modelech, u kterých byla popsána snížená nebo nezměněná imunogenicita tepenných štěpů po jejich kryokonzervaci a následném rozmrazení

1.2.1. Hodnocení rejekce

Většina experimentálních prací, které popisují imunogenicitu kryokonzervovaných štěpů nebo ji srovnávají s imunogenicitou chladem konzervovaných štěpů je založena na porovnání histologického obrazu akutní rejekce a na imunohistochemickém vyšetření protilátek přítomných v tunica media (Solanes et al., 2005, Pukacki et al., 2000, Saito et al., 2006, Gabriel et al., 2006, Giglia et al., 2002, Motomura et al., 1995). Obecně se soudí, že imunogenicitu štěpů je dána zejména buněčnou komponentou, zatímco extracelulární matrix ji prakticky neovlivňuje (Matia et al., 2007). Z tohoto důvodu vidí řada autorů hlavní cestu ke snížení imunogenicity v decelularizaci cévní stěny (Williams et al., 2008, Gui et al., 2008, Lin et al., 2018). Největší význam v imunogenicitě cévní stěny je přisuzován hladkým svalovým buňkám tunica media. Na výsledné akutní rejekci se navíc podílí i ischemicko-reperfúzní postižení a inkompatibilita v hlavním histokompatibilním systému. Jsou publikovány i práce, které porovnávají vliv kryokonzervace na funkční a mechanické vlastnosti (Kreitmann et al., 1997, Pukacki et al., 2000, Bia et al., 2005, Gabriel et al., 2006) a práce zkoumající vliv na transkripci genů pro růstové faktory ovlivňující imunologické reparační pochody cévní stěny (Nishizaki et al., 2003, Saito et al., 2006).

1.2.2. Proces kryokonzervace

Experimentální práce, které popisují sníženou imunogenicitu kryokonzervovaných tepenných štěpů uvádějí velmi podobný proces kryokonzervace s použitím DMSO jako kryoprotektiva a s minimálními rozdíly v rychlostech poklesu teploty od 0,5 do 1 °C/min (Motomura et al., 1995, Knosalla et al., 1998, Pukacki et al., 2000, Nishizaki et al., 2003, Giglia et al., 2002, Pascual et al., 2004, Rodríguez et al., 2012). V těchto protokolech se využívá kontrolovaný automatizovaný proces zmrazení s cílovou teplotou mezi -60 °C až -130 °C a následné uložení štěpu v parách kapalného dusíku. Výjimkou je starší práce Borena et al., který popisuje rychlé nekontrolované zmrazení štěpů na teplotu -196 °C (Boren et al., 1978). I přesto však hodnotí 90 % štěpů bez známek akutní rejekce se zachovalou endotelovou integritou a minimální infiltrací adventicie lymfocyty. To přispělo i k uváděné lepší průchodnosti vyšetřovaných štěpů v prvních 3 měsících po transplantaci. Podobně jako rychlost zmrazení bylo i následné uchování štěpů v parách tekutého dusíku v těchto publikacích velmi podobné s cílovou teplotou mezi -160 °C až -196 °C a dobou skladování od několika dnů po několik týdnů. Autoři

též uvádí obdobnou délku studené ischemie štěpu, která nepřekročila 24hod (Pukacki et al., 2000, Giglia et al., 2002). K délce studené ischemie před kryokonzervací přispěla skutečnost, že někteří autoři zařadili do přípravy ke kryokonzervaci podobně jako v humánní praxi dekontaminační krok ve směsi antibiotik (Kreitmann et al., 1997, Knosalla et al., 1998, Giglia et al., 2002, Bia et al., 2005). Jiní autoři přidali antibiotika přímo do kryoprotektivního roztoku (Motomura et al., 1995, Olmos-Zúñiga et al., 2016), což nebylo spojeno s prodloužením studené ischemie. Nejkratší doba studené ischemie byla uvedena v práci Rodríguezové a činila 35minut (Rodríguez et al., 2012). Taková délka studené ischemie ale v klinické praxi není dosažitelná.

1.2.2.1. Proces vitrifikace

V experimentech studujících kryokonzervační protokoly se vyskytla též práce, jejíž autoři použili při zmrazování postup vitrifikační (Brockbank KGM et al., 2007). Cévy byly vloženy do vitrifikačního roztoku (VS55) obsahujícího vysokou koncentraci kryoprotektiva (24,2 % DMSO) a zmrazení rychlostí $-2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ na teplotu $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$, po které nastala fáze pomalého ($-0,2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) zmrazení na teplotu $-135\text{ }^{\circ}\text{C}$. Podstatou vitrifikačního přístupu je vyloučení tvorby krystalů ledu, jež vznikají při klasických postupech kryokonzervace a které mohou vést k poškození struktur extracelulárního matrixu a hladké svaloviny. Tím je možno vysvětlit významné uchování viability a funkční aktivity štěpů, která je publikována v některých experimentálních pracích (Brockbank KGM et al., 2007). Úskalím použití vitrifikačních přístupů je ovšem skutečnost, že vzniklá amorfni struktura je nestabilní a má tendenci se měnit na strukturu stabilnější, tedy krystalickou. Tento proces se nazývá devitrifikace a je to v podstatě krystalizace, ke které může dojít při neadekvátní teplotě skladování nebo během rozmrazování (Hunt et al., 1994, Pegg et al., 1997). Výzkumná skupina D. Pegga v polovině 90 let minulého století prokázala při pokusech na králičím modelu (Pegg et al., 1997), že je to právě devitrifikace během rychlého rozmrazování, která vede ke vzniku obávaných mikrofraktur v cévní stěně.

1.2.3. Proces rozmrazení

Rozdíly v publikovaných experimentálních kryokonzervačních protokolech se vyskytují zejména v rámci procesu rozmrazování štěpů. Mnoho autorů volilo pro rozmrazování rychlý postup spočívající ve vložení do teplé vodní lázně s teplotou 37 °C až 40 °C (Knosalla et al., 1998, Pukacki et al., 2000, Giglia et al., 2002, Nishizaki et al., 2003), které zajišťuje podle zkušeností z kryokonzervace buněčných suspenzí optimální přežití buněk. V polovině 90 let minulého století publikoval Hunt (Hunt et al., 1994) z výzkumné skupiny D. Pegg výsledky experimentů na králičích arteriích, které prokázaly při rychlém rozmrazení z teploty kapalného dusíku na jedné straně vysoké přežití endoteliálních buněk a buněk hladké svaloviny, na druhé straně ovšem výskyt fraktur cévní stěny v 75 % případů. Ke frakturám nedocházelo, pokud byly cévy zmrazené pouze na teplotu -80 °C a poté rychle rozmrazeny. Mechanismus vzniku fraktur objasnil Pegg a spol. v experimentech na králičím modelu v roce 1997 (Pegg et al., 1997). Při rychlém rozmrazení z teploty kapalného dusíku na teplotu -80 °C prokázal devitrifikaci, které bylo možno zabránit použitím protokolu pomalého rozmrazování. Z tohoto důvodu někteří autoři použili při kryokonzervaci cév v experimentech postupu pomalého rozmrazení i s použitím speciálních přístrojů, které umožňují pomalé kontrolované rozmrazování se vzestupem teploty o 1 °C/min (Rodríguez et al., 2012). Jednou z experimentálních prací, která přímo srovnává vliv pomalého a rychlého rozmrazení na poškození štěpů je práce Novotného a kol. (Novotný et al., 2017) i když na vzorku humánního materiálu (ascendentní aorty a srdeční chlopně). Na rozdíl od uvedených prací Špaček et al. při rozmrazování žilních humánních štěpů neprokázali významné rozdíly na morfologii cévní stěny při pomalém a rychlém způsobu rozmrazení, což může být zčásti dáno rozdílnou histologickou stavbou žilní a obvykleji studované tepenné stěny (Špaček et al., 2020). Nižší imunogenicita tak nepochybně přispívá k lepší průchodnosti a nižší četnosti komplikací spojených se strukturální deteriorací transplantovaných štěpů, která je některými autory též hodnocena (Giglia et al., 2002, Rodríguez et al., 2012).

1.2.4. Studená ischemie

Doba studené ischemie před zamrazením štěpů se v experimentálních pracích lišila od několika minut (Gu et al., 2004, Gabriel et al., 2006, Rodríguez et al., 2012) do 24 hodin (Moriyama et al., 2001, Buján et al., 2001, Giglia et al., 2002). Popsána byla však i 96 hodin trvající doba studené ischemie (Pascual et al., 2002).

Na důležitost kontroly doby studené ischemie před vlastní kryokonzervací upozornili ve své experimentální práci na psím modelu Páral a kol. (Páral et al., 2000). Již 24hodinová expozice fyziologickému roztoku při teplotě +4 °C vedla k výraznému poškození až ztrátě endotelu a výraznému edému cévní stěny. To vytváří podmínky pro její výrazné poškození krystalizací a vznik ruptur po transplantaci.

Knighť a kol. popsali ve své práci na potkanech, že 24 hodin trvající studená ischemie vyvolala významné poškození jak u isograftů, tak alograftů 4 týdny po transplantaci (Knighť et al., 2003).

1.3. Klinické kryokonzervační protokoly ve světě

Kryokonzervované tepenné štěpy v léčbě infekce cévních protéz v klinické praxi byly zavedeny Kiefferem a kolegy ve Francii koncem 80. let minulého století (Kieffer et al., 2004). Do roku 1996 byly touto skupinou používány chladem konzervované arteriální aloštěpy, které byly skladovány v konzervačních roztocích při teplotě 4 °C v průměru 13 dní (proto označované též jako „čerstvé“ nebo „fresh“ aloštěpy). V důsledku legislativních změn však v dalších letech byly pro tuto indikaci používány pouze kryokonzervované štěpy připravované Tkáňovou bankou v Paříži.

Trend v používání kryokonzervovaných štěpů místo štěpů konzervovaných chladem v řešení infekcí cévních náhrad se poté rozšířil i do dalších zemí západní Evropy (Chiesa et al., 1998, Teebken et al., 2004, Gabriel et al., 2006), Severní a Jižní Ameriky (Brockbank KGM et al., 2007, Rodríguez et al., 2012) a Asie (Moriyama et al., 2019). Techniky uchovávání chladem konzervovaných arteriálních aloštěpů a též kryokonzervační a rozmrazovací protokoly publikované velkými cévními centry jsou velmi nehomogenní (Chiesa et al., 1998, Teebken et al., 2004, Touma et al., 2014, Harlander-Locke et al., 2014). Jednotlivé protokoly se vzájemně liší ve vlastnostech konzervačních roztoků, v časech studené ischemie před implantací nebo kryokonzervací štěpů, a též v samotných technikách kryokonzervace a rozmrazení (Kieffer et al., 2004, Měřička et al., 2015). Všechny tyto aspekty mohou ovlivnit konečnou kvalitu implantovaných arteriálních aloštěpů a způsobit významné rozdíly v časných a pozdních komplikacích souvisejících s jejich implantací (Novotný et al., 2017).

V současné klinické praxi se ve světě používají značně odlišné kryokonzervační protokoly. Ty se navzájem liší ve všech základních bodech kryokonzervačního protokolu jako jsou vlastnosti

použitých konzervačních roztoků, čas studené ischemie nebo způsob rozmrazování štěpu před transplantací.

Závěry těchto prací s ohledem na vliv kryokonzervace na snížení imunogenicity štěpů a jejich kvality a tím i jejich použití v léčbě infekce cévních protéz a stentgraftů jsou značně rozdílné.

Největší Americká multicentrická klinická studie hodnotící užití kryokonzervovaných tepenných štěpů v případě infekce protézy v aortální pozici byla publikována v roce 2014 a zahrnovala 220 pacientů ve 14 centrech. 60 % pacientů mělo infekci protézy s pozitivním bakteriologickým nálezem, 16 % infekcí protézy bez pozitivního bakteriologického nálezu, 15 % aortoenterickou píštěl a 4 % infekční pseudoaneuryzma. U 24 % pacientů se po transplantaci vyskytla komplikace spojená s užitím alograftu. Jednalo se o trombosu štěpu (n=9), pokračující sepsi (n=17), rupturu štěpu (n=8), rekurentní infekci (n=8), pseudoaneuryzma (n=6) a aortoenterickou píštěl (n=4). Období bez komplikací transplantovaného štěpu byla 80 %, explantace štěpu 88 % a amputací končetiny 97 % během 5 let. Primární průchodnost nové rekonstrukce alograftem byla 97 %, mortalita pacientů po transplantaci 57 % během 5 let. Výsledky této multicentrické studie podporují teorii užití kryoalografu jako zlatého standardu v léčbě infekce cévní náhrady (Harlander-Locke et al., 2014).

V kryokonzervačním protokolu této americké studie se využívá procesu vitrifikace, kdy se alostěpy zmrazí v buněčném mediu se sérem a dimethylsulfoxidem (DMSO) kontrolovanou rychlostí s poklesem teploty o $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a následně se štěpy skladují v parách kapalného dusíku. Vzhledem ke skutečnosti, že tento proces vedl ke tvorbě ledových krystalů způsobujících buněčné poškození a následnou tvorbu kalcifikací v tepenných štěpech, začala být preferována alternativní metoda postupu zmrazování bez ledu. Při ní je upraven počáteční vitrifikační roztok (VS) zvýšením koncentrace tří kryoprotektantů 1,2-propandiolu, formamidu a DMSO na 83 %, čímž je riziko tvorby ledových krystalů významně sníženo. Všechny kryografty jsou zmrazovány ve vitfirikačním roztoku VS 83 kontrolovanou rychlostí o $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a poté skladovány při teplotě $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rozmrazeny jsou ve vodní lázni při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následuje vymytí vitrifikačního roztoku ze štěpů v sedmi krocích během kterých jsou štěpy vloženy na 15min do Dulbeccova modifikovaného Eaglova kultivačního media o teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ před jejich implantací.

Naproti tomu práce Toumy et al. z evropského pracoviště publikovaná ve stejném roce popisuje nepříznivé výsledky v případě užití kryoalografů v řešení infekcí nativní aorty a cévních náhrad v aortální pozici (Touma et al., 2014). V randomizované skupině bylo 54 pacientů, 45 mužů (83 %) a 9 žen (17 %). Indikací k transplantaci byla infekce aorty (n=17) a infekce aortální

rekonstrukce (n=37). 52 % pacientů mělo časnou pooperační komplikaci a 7 % komplikaci transplantované štěpu. 30denní mortalita byla 28 % a celková mortalita 39 % při průměrné době sledování 12 měsíců.

Alografty v této práci byly získány od dárců s prokázanou mozkovou smrtí. Po vymytí štěpů v heparinizovaném fyziologickém roztoku byly aloštěpy vloženy do studeného (4 °C) transportního média, které obsahovalo 0,9 % roztok NaCl a 0,2 % roztok glukózy (pH 6,8) bez přidaných antibiotik. Tepenné aloštěpy byly poté skladovány při teplotě 4 °C v roztoku SCOT (Macopharma Laboratories, Tourcoing, Francie) obsahujícím gentamicin (50 mg / ml), klindamycin (600 mg / ml) a vankomycin (500 mg / ml) a kryokonzervovány během 48–72 hodin. V letech 1998 až 2002 se kryokonzervační roztok skládal z 90 ml 4 % roztoku lidského sérového albuminu a 10 ml dimethylsulfoxidu (DMSO). Po 30 minutách kdy byly aloštěpy uchovávány při teplotě 4 °C byly poté vaky umístěny do par kapalného dusíku zmrazovací komory (Planer, Sunbury-on-Thames, Velká Británie) a kryokonzervovány řízenou rychlostí s poklesem teploty o -1 °C / minutu až do teploty -50 °C a poté o -5 °C / minutu na teplotu -140 °C. Zmrazené štěpy se poté až do použití skladovaly v parách kapalného dusíku. V den transplantace byly zmrazené tepny rychle rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 40 °C. Po odstranění kryoprotektantu byl štěp uchován ve 100 ml 0,9 % NaCl obsahujícího 0,2 % glukózy až do doby implantace.

Od roku 2002 byly aloštěpy ponechány 20 minut při teplotě 4 °C v roztoku SCOT obsahujícím 15 % DMSO a následně zmrazeny na cílovou teplotu -80 °C bez kontroly poklesu teploty a skladovány max. 2 roky. Rozmrazení štěpů probíhalo po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Poté byl štěp vložen do vodní lázně o teplotě 37 °C. Následovalo postupné vymývání kryoprotektantu v heparinizovaném roztoku při pokojové teplotě.

Uvedené experimentální i klinické práce demonstrují značné rozdíly v pohledu na problematiku imunogenicity tepenných štěpů a její ovlivnění použitým kryokonzervačním protokolem. Kromě samotného procesu zmrazení a rozmrazení, době studené ischemie dle našeho názoru hraje důležitou roli i typ roztoku, který je použit pro transport z místa odběru do tkáňového zařízení.

1.4. Současný stav klinického použití tepenných štěpů v léčbě infekce cévní protězy v České republice

V České republice jsou chladem konzervované tepenné štěpy používány v léčbě infekce cévních protéz od 90. let minulého století (Matia et al., 2007). Podobně jako program orgánové transplantace, je i program transplantace cév (tj. tkáň) v tomto případě zastřešen Koordinačním centrem transplantací, které vede čekací listinu pro nemocné indikované k transplantaci chladem konzervovaného nebo kryokonzervovaného cévního štěpu (Špaček et al., 2018).

V klinické praxi však může dojít k situaci, kdy po delší dobu není přítomen vhodný „čerstvý“ aloštěp a u pacienta se rozvine akutní stav vyžadující urgentní řešení. K těmto situacím patří např. akutní krvácení z anastomózy nebo krvácení z aortoduodenální píštěle. V těchto situacích je použití a okamžitá dostupnost kryokonzervovaného tepenného nebo žilního štěpu zásadní. Dalšími indikacemi k elektivnímu nebo časnému použití cévních alograftů je infekce cévních náhrad, při které je nutné infikovaný štěp v celém rozsahu explantovat a nahradit novou rekonstrukcí, nebo přítomnost kritické končetinové ischemie. I v těchto situacích je vzhledem k riziku septického stavu nebo končetinové amputace dostupnost vhodných cévních štěpů zásadní. Za účelem minimalizace rizika absence cévních aloštěpů proto vznikl pod vedením Pracovní skupiny pro cévní náhrady a alotransplantace České společnosti kardiovaskulární chirurgie (ČSKVCH), ve spolupráci s Koordinačním centrem transplantací a Tkáňovou bankou FNHK v ČR v roce 2013 program kryokonzervace cévních aloštěpů (Špaček et al., 2018).

Dalším důvodem k vytvoření programu transplantace cévních kryoštěpů byly legislativní změny, ke kterým došlo v roce 2004, kdy vešla v platnost Směrnice Evropského parlamentu a Rady (EU Directive 2004/23/EC) (Fellmer et al., 2011). Ta měla zajišťovat vysokou kvalitu transplantovaných tkání a buněk. Tím došlo k zastavení do té doby prováděných transplantací chladem konzervovaných tepenných aloštěpů v mnoha evropských zemích (Francie Kieffer et al. 2004, Německo Fellmer et al., 2011). V rámci implementace evropské legislativy se tyto postupy rozšířily do dalších zemí Evropské unie.

V České republice je nakládání s tepennými alografty stanoveno zákonem č. 285/2002 Sb., který umožňuje použití chladem konzervovaných cévních štěpů v režimu transplantace orgánů do 48 hodin od odběru (Špaček et al., 2018).

V důsledku rozvoje programu transplantace kryokonzervovaných cévních štěpů mohou být v současnosti pacienti indikovaní k tepenné transplantaci v České republice zařazeni na jednu z dvou čekacích listin. Rozhodnutí o zařazení pacienta na čekací listinu pro kryokonzervované

nebo chladem konzervované štěpy je dáno rozhodnutím indikujícího cévního chirurga. Po dvou letech existence programu kryokonzervace štěpů byl počet transplantovaných kryokonzervovaných a chladem konzervovaných štěpů v České republice prakticky stejný (Špaček et al., 2018).

1.4.1. Nový kryokonzervační protokol v „Programu transplantace cévních štěpů v České republice“

V roce 2011 byl v České republice zahájen klinický program transplantace kryokonzervovaných cévních štěpů. Všechny arteriální i žilní aloštěpy zařazené do programu jsou zpracovávány výhradně v tkáňové bance Fakultní nemocnice Hradec Králové podle nového standardizovaného protokolu kryokonzervace (Špaček et al., 2019). Odběr uvedených štěpů probíhá v rámci multiorgánových odběrů. Cévy se transportují do Tkáňové ústředny FNHK v roztoku Custodiolu za nízkých teplot (3-5 °C) v co nejkratší době po provedeném odběru.

Kryokonzervace cévního štěpu se provádí pomocí standardizovaného operačního postupu požadovaného tkáňového zařízení (tkáňová banka Fakultní nemocnice Hradec Králové) plně licencovanou příslušným vnitrostátním orgánem (Měřička et al., 2011, Měřička et al., 2011). Při odběru a zpracování cév jsou povoleny pouze kvalitní materiály a léky pro humánní použití a splňující požadavky směrnice Evropského parlamentu a Rady č. 23/2004 / ES. Po vstupní kontrole v tkáňovém zařízení jsou štěpy zpracovávány v místnosti čistoty stupně A (podle klasifikace EU GMP) s pozadím stupně B. Po dekontaminaci pomocí modifikované metody van Katz (Vogt et al., 1998) jsou nádoby vloženy do dvojité sterilních jednorázových plastových sáčků (Eva Bags; Maco Biotech, Eckbolsheim, Francie) obsahujících 50 ml předchlazeného 6 % roztoku hydroxyethylškrobu s molekulovou hmotností 130 000 Da (Voluven 6 %; Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe, Německo) a smísí se se stejným objemem předchlazeného kryoprotektivního roztoku (20 % dimethylsulfoxidu; WAK ChemieMedical GmbH, Steinbach, Německo). Vzorky roztoku pro bakteriologické a mykologické testy se odebírají ze sběrného roztoku a z konečného balení. Plastové sáčky se uzavírají tepelným svařováním. Sáčky uzavřené ve vnějších kovových kazetách se vloží do mrazicí komory programovatelného mrazáku a zmrazí se rychlostí 1 K / min až na teplotu -90 °C (následuje 5 K / min na teplotu -150 °C). Štěpy jsou až do klinického použití skladovány v parách kapalného dusíku v biologické nádobě vybavené automatickým plnicím systémem s nepřetržitým monitorováním teploty.

Po vyjmutí ze skladovacího kontejneru jsou kazety s vaky přepraveny na operační sál v parách kapalného dusíku ve speciálním přepravníku (Dry shipper). Na operačním sále jsou kazety z přepravníku vyjmuty a umístěny na 2 hodiny do chladničky s teplotou stoupající z + 2 °C na + 8 °C. Pokud je po vyjmutí z chladničky v plastových sáčcích stále nějaký led, může být další rozmrazování dokončeno při pokojové teplotě. Ihned poté, co zbývající led roztaje, jsou štěpy asepticky vyjmuty z vaků a uloženy v předchlazeném konzervačním roztoku (Celsior; Genzyme) až do jejich implantace.

2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Možné snížení imunogenicity aloštěpů břišní aorty procesem kryokonzervace bylo opakovaně studováno v pokusech na zvířatech. Některé práce nepopisovaly žádný vliv kryokonzervace na snížení antigenicity tepenných aloštěpů. Naopak jiné studie zjistily snížení imunogenicity kryokonzervovaných aloštěpů ve srovnání s chladem konzervovanými aloštěpy. V jednotlivých experimentech však byly použity velmi nekonzistentní kryokonzervační protokoly, které se výrazně lišily v tak zásadních bodech jako je např. typ konzervačního roztoku, čas teplé a studené ischemie, technika a délka kryokonzervace a následného rozmrazení štěpů. Jako nejvýraznější faktor snižující poškození a antigenicitu štěpů se ale jevilo jejich pomalé rozmrazování.

V klinické praxi má možné snížení antigenicity tepenných aloštěpů použitým typem kryokonzervačního a rozmrazovacího protokolu velký význam. Snížení antigenicity a následné rejekce transplantovaných tepenných aloštěpů vede jednak k výrazně lepším dlouhodobým výsledkům a jednak k omezení užívání imunosuprese a jejich nežádoucích účinků. Kryokonzervační a rozmrazovací protokoly používané v klinické praxi významných světových pracovišť jsou stejně jako v experimentálních podmínkách velmi nekonzistentní a jejich popisovaný vliv na imunogenicitu transplantovaných tepen je značně rozdílný. U většiny současných klinických protokolů se ale před vlastní transplantací používá rychlé rozmrazení štěpu.

Cílem naší studie proto bylo:

1. převést všechny jednotlivé kroky nového kryokonzervačního protokolu s pomalým rozmrazováním používaným v „Programu transplantace cévních štěpů v České republice“ do experimentálních podmínek na potkaním modelu
2. studovat na potkaním modelu akutní buňkami a protilátkami zprostředkovanou imunitní reakci u příjemců štěpů břišní aorty ošetřených tímto novým standardizovaným klinickým kryokonzervačním protokolem s pomalým rozmrazováním
3. porovnat vliv obou typů konzervačních protokolů používaných v „Programu transplantace cévních štěpů v České republice“ (kryokonzervační protokol s pomalým rozmrazováním a protokol konzervace chladem) na akutní buňkami a protilátkami zprostředkovanou imunitní reakci po transplantaci takto ošetřených štěpů břišní aorty na potkaním modelu

2.1. Hypotéza

Aloštěpy břišní aorty potkanů zpracované v souladu s novým klinickým kryokonzervačním protokolem s pomalým rozmrazováním používaným v „Programu transplantace cévních štěpů v České republice“ budou vykazovat 30 dní po jejich transplantaci nižší známky rejekce ve srovnání s aloštěpy zpracovanými v souladu s klinickým protokolem konzervace chladem používaným ve stejném programu.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Etické prohlášení

V průběhu experimentu byly dodržovány principy práce s laboratorními zvířaty dle platné evropské legislativy (Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes). Experiment byl též schválen Etickou komisí 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy (č.: UK 1. LF 563/13, MSMT-14808/2014-6).

3.2. Základní rozvržení experimentu

Jako dárce štěpů břišní aorty jsme v experimentu použili samce potkanů kmene Brown-Norway a Lewis. Štěpy subrenální aorty jsme odebrali od zvířat v celkové intramuskulární anestezii. Následně jsme štěpy zpracovali v souladu s novým kryokonzervačním protokolem s pomalým rozmrazováním používaným Tkáňovou bankou Fakultní nemocnice Hradec Králové v „Programu transplantace cévních štěpů v České republice“. Aortální štěpy jsme po odběru uskladnili v tekutém dusíku stejným postupem, jaký je užíván v klinické praxi. Po 6 měsících kryokonzervace jsme štěpy rozmrazili v souladu s novým klinickým protokolem pomalého rozmrazení. Takto rozmrazené štěpy jsme transplantovali samecům potkanů kmene Lewis. Získali jsme tak isogenní (aorta kmene Lewis transplantovaná příjemci kmene Lewis, skupina CRYO-ISO) a alogenní (aorta kmene Brown-Norway transplantovaná příjemci kmene Lewis, skupina CRYO-ALO) uspořádání experimentálních skupin.

Celý postup odběru, kryokonzervace, uskladnění, rozmrazení a transplantace štěpů břišní aorty jsme rozdělili do šesti časově definovaných fází. Ty jsme měřili a zaznamenali pro každý štěp zvlášť.

Kryokonzervované štěpy břišní aorty jsme explantovali 30. pooperační den. Štěpy jsme vyšetřili histologickými a imunohistochemickými metodami se zaměřením na typické známky akutní rejekce ve všech základních vrstvách aortální stěny. Sledovali jsme přítomnost endotelových buněk, známky intimální hyperplázie, šířku tunica media, přítomnost nekróz a ukládání protilátek třídy G v této vrstvě, počet CD4+, CD8+ a LEW MHC II+ imunokompetentních buněk v adventiciální vrstvě aortální stěny. Protilátkovou imunitní odpověď u příjemců kryokonzervovaných iso – a aloštěpů břišní aorty jsme sledovali vyšetřením

koncentrace donor specifických protilátek proti MHC antigenům I. a II. třídy v periferní krvi příjemcovských zvířat předoperačně a na 30. den po transplantaci.

K zjištění vlivu nového kryokonzervačního protokolu na antigenicitu tepenných štěpů jsme navzájem porovnali jednotlivé známky rejekce mezi isogenními a alogenními štěpy.

V poslední fázi experimentu jsme vzájemně srovnali histologické a imunohistochemické známky rejekce v potkaních štěpech břišní aorty ošetřených novým klinickým kryokonzervačním protokolem s pomalým rozmrazováním z našeho současného experimentu se známkami rejekce v potkaních chladem konzervovaných štěpech břišní aorty. K tomu jsme využili základní data původního experimentu Priv.-Doz. MUDr. habil Ivana Matiu, Ph.D., z kterého vycházel i náš současný experiment.

3.3. Charakteristika experimentálních skupin

K experimentu jsme použili samce potkanů kmene Brown-Norway a Lewis získané z chovné stanice Charles River v Německu. Zvířata byla následně chovaná podle pokynů Národního zdravotního ústavu. Každé transplantované zvíře bylo po celou dobu 30denního sledování umístěno v oddělené kleci. Zvířatům nebyla během experimentu podávána žádná imunosupresivní ani antiagregační léčba. Do studie jsme zahrnuli pouze zvířata, která prošla celým sledovacím obdobím.

Samce potkanů kmene Brown-Norway (BN, MHC haplotyp RT1) o hmotnosti 203 až 217 g (N = 3) jsme použili jako dárce alotransplantátů břišní aorty a samce potkanů kmene Lewis (LEW, haplotyp RT11) o hmotnosti 248 až 254 g (N = 3) jako dárce isotransplantátu břišní aorty. Samce potkanů kmene Lewis (LEW, haplotyp RT11) o hmotnosti 191 až 250 g (N = 12) jsme použili jako příjemce štěpů břišní aorty a následně rozdělili do dvou skupin podle typu transplantovaného subrenálního štěpu břišní aorty. Skupinu CRYO-ISO tvořili příjemci kmene Lewis (LEW, haplotyp RT11) syngenně transplantovaných kryokonzervovaných štěpů (LEW – LEW, N = 6, hmotnost 191 až 250 g). Skupinu CRYO-ALO tvořili příjemci kmene Lewis (LEW, haplotyp RT11) alogenně transplantovaných kryokonzervovaných štěpů (BN – LEW, N = 6, hmotnost 193 až 245 g). Jednotlivé charakteristiky experimentálních skupin jsou zobrazeny v tab. 5.

Tab.5 – Základní charakteristiky experimentálních skupin

Skupina	Dárce			Příjemce		
	Kmen	Počet	Hmotnost	Kmen	Počet	Hmotnost
CRYO-ALO	BN	3	203-217 g	LEW	6	193-245 g
CRYO-ISO	LEW	3	248-254 g	LEW	6	191-250 g

CRYO – ALO – alogenní transplantace kryokonzervovaných štěpů břišní aorty

CRYO – ISO – isogenní transplantace kryokonzervovaných štěpů břišní aorty

LEW – kmen Lewis

BN – kmen Brown-Norway

3.4. Chirurgická technika odběru štěpů břišní aorty

Vlastní odběr štěpu břišní aorty v obou skupinách jsme provedli po zvážení dárcovských zvířat a jejich uvedení do celkové anestezie pomocí intramuskulárně (do stehenního svalu) aplikované směsi ketaminu v dávce 100mg/kg (Narkamon®, Spofa Česká republika) a xylazinu v dávce 10mg/kg (Rometar®, Spofa Česká republika). Každé zvíře jsme poté uložili na operační desku s fixací všech 4 končetin. Následovala příprava operačního pole na břicho, která zahrnovala její oholení a desinfekci. Poté jsme pomocí nůžek provedli střední laparotomii s odsunutím střev laterálně tak, abychom si zpřístupnili cévní struktury retroperitonea. (Obr. 1) Během výkonu jsme používali běžné chirurgické nástroje určené k operacím na laboratorních zvířatech. Po zpřístupnění retroperitonea jsme již za pomoci operačního mikroskopu s 10násobným zvětšením provedli incizi zadního listu pobřišnice a poté preparovali subrenální úsek břišní aorty a přilehlý úsek dolní duté žíly za účelem získání štěpu a nitrožilní aplikace heparinu. Ten jsme podávali v dávce 100IU/kg tak, aby po naložení svorky na aortu nedošlo k její trombóze. Aortu jsme zasvorkovali po 3 min od instilace heparinu do dolní duté žíly pomocí speciálních minisvorek

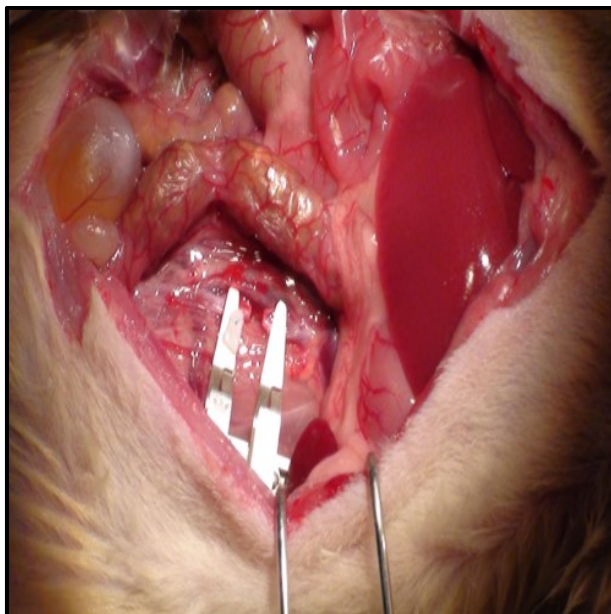
a následně resekovali cca 2 - 2,5 cm dlouhý úsek. (obr. 2) Štěp jsme ihned po jeho odběru propláchli 2ml roztoku Custodiol (Custodiol®, Dr. Franz Kohler Chemie GmbH, Německo) obsahující heparin (100 IU/ml) a dále zpracovali v souladu s klinicky používaným kryokonzervačním protokolem (viz níže). Dárcovská zvířata jsme po odběru štěpu eutanazovali letální dávkou tiopentalu aplikovaného intrakaválně nebo intramyokardiálně (Thiopental®, Spofa Česká republika).



Obr.1

Preparace subrenálního úseku břišní aorty v retroperitoneálním prostoru.

Sřevní kličky jsme odsunuli laterálně a zabalili do teplého čtverce.



Obr.2

Odběr štěpu ze subrenální aorty.

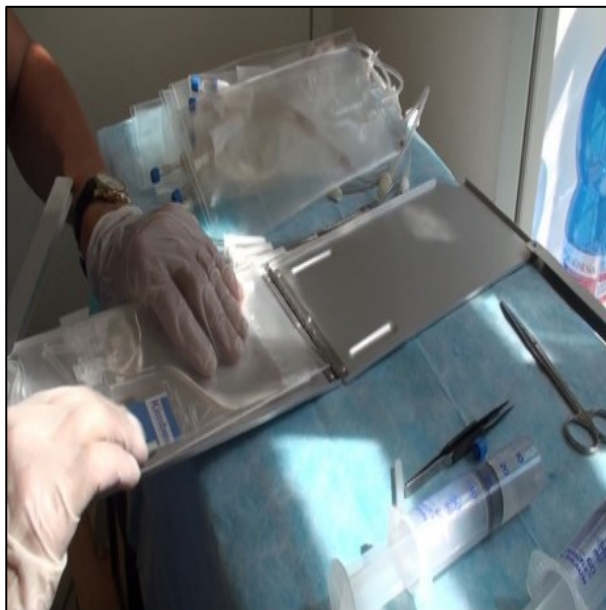
Břišní dutinu jsme si zpřístupnili pomocí speciálních kovových retractorů a vlastní retroperitoneum preparamovali za použití vatových štětiček, kterými jsme ozřejmili dostatečně dlouhý úsek břišní aorty, ze kterého jsme následně vytнули 2 cm dlouhý segment.

3.5. Protokol kryokonzervace štěpů břišní aorty

Nový kryokonzervační protokol s pomalým rozmrazováním používaným v „Programu transplantace cévních štěpů v České republice“ (Špaček et al., 2020) jsme upravili a adaptovali do experimentálních podmínek Fyziologického ústavu 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Při odběru štěpů břišní aorty potkanů a jejich následném zpracování jsme použili pouze vysoce kvalitní materiál a farmaka pro humánní použití splňující podmínky směrnice Evropského parlamentu a Rady č. 23/2004/ES. Všechna dárcovská zvířata z obou experimentálních skupin CRYO-ISO (N = 3) a CRYO-ALO (N = 3) jsme operovali najednou. Každý štěp břišní aorty jsme po odběru propláchli 2 ml roztoku Custodiolu (Custodiol®, Dr. Franz Kohler Chemie GmbH, Německo) obsahující 100 IU / ml heparinu a poté jsme ho umístili do 10 ml roztoku Custodiolu o teplotě 4°C. Následně jsme postupně odebírané štěpy břišních aort skladovali při teplotě tajícího ledu v uzavřených sterilních certifikovaných plastových nádobách (Medfor 250 ml Farnborough, Velká Británie) až do ukončení odběru všech štěpů.

Poté jsme je vložili do dvojitého sterilního plastového sáčku na jedno použití (CryoMACS Freezing Bag 500, Miltenyi Biotec GmbH, Německo) obsahující 25 ml vychlazeného 6% roztoku

hydroxyethylškrobu o molekulární hmotnosti 130 000 Da (Voluven 6 %, Fresenius Kabi, Německo) doplněného 20% roztokem kryoprotektantu dimethylsulfoxidu (DMSO, WAK ChemieMedical GmbH, Německo) a každý vak jsme následně uzavřeli zatavením ve svářečce (STERISEAL B 83–R, Cevor s.r.o., Troubsko u Brna, Česká republika). Do roztoku jsme nepřidávali žádná antibiotika. Sáčky jsme poté vložili do speciálních kovových kazet (ST 100, Consarctic GmbH, Schölkrippen, Německo) a uložili při teplotě tajícího ledu až do začátku procesu zmrazení (obr. 3). Následoval proces vlastního zamrazení, který probíhal při kontrolovaném poklesu teploty v programovatelném zmrazovacím zařízení KRYO – 10 (Planer, Biomed, Sunburry on Thames, Velká Británie) rychlostí – 1K/min do -90°C , a poté -5K/min do -150°C . Ihned po zamrazení jsme kazety se zamrazenými štěpy (obr. 4) převezli v transportním boxu do kryokonzervačního skladu Ústavu hematologie a krevní transfúze v Praze, kde jsme je uchovávali v parách tekutého dusíku a teplotě -190°C až do doby jejich implantace.



Obr.3

Příprava před zamrazením štěpů.

Plastové vaky jsme označili štítkem obsahujícím číslo štěpu a datum odběru a následně je vložili do speciálních kovových kazet umožňující zamrazení štěpu.



Obr.4

Zamrazený štěp subrenální aorty v plastovém vaku.

Vak obsahuje kryoprotektivní roztok. Každý vak jsme označili číslem a druhem potkana ze kterého byl štěp odebrán.

3.6. Uskladnění kryokonzervovaných štěpů břišní aorty

Po zamrazení štěpů břišní aorty jsme kovové kazety s cévami převezli z operačního sálu Fyziologického ústavu 1. LF UK do kryokonzervačního skladu tkáňového zařízení Ústavu hematologie a krevní transfúze v Praze. Zde jsme je skladovali v parách kapalného dusíku při teplotě - 180 °C až do doby implantace, ke které jsme je převezli zpět na operační sál v transportních boxech obsahujících suchý led (obr. 5). Průměrná doba uskladnění kryokonzervovaných štěpů břišní aorty v parách dusíku byla 176 dnů. (Tab. 6)



Obr.5

Uchovávání kryokonzervovaných štěpů.

Odebrané štěpy břišní aorty jsme po dobu 6 měsíců uchovávali v zamrazeném stavu v tkáňové bance Ústavu hematologie a krevní transfúze 1.LF UK v Praze.

3.7. Protokol pomalého rozmrazení kryokonzervovaných štěpů břišní aorty

Kazety se štěpy břišní aorty jsme transportovali v den implantace v parách tekutého dusíku z tkáňového zařízení Ústavu hematologie a krevní transfúze v Praze na operační sály Fyziologického ústavu. Zde jsme je vyjmuli z transportního zařízení a poté umístili do chladničky při teplotě + 4 °C po dobu 60 minut. Štěpy jsme následně nechali po dobu 30 min při pokojové teplotě. Po této fázi jsme štěpy břišní aorty vyjmuli z plastového vaku a každý štěp rozdělili na

dvě stejně dlouhé části, které jsme poté použili k transplantaci u dvou potkanů. Oba štěpy jsme po rozdělení uchovávali odděleně v 10 ml roztoku Custodiolu v lednici při teplotě +4°C až do začátku transplantace. Do roztoku nebyla přidávána žádná antibiotika. (Tab. 6)

3.8. Chirurgická technika transplantace štěpů břišní aorty

K transplantaci štěpů jsme použili optický mikroskop a 10násobné zvětšení. (Obr. 6) Vlastní realizaci anastomóz jsme provedli pomocí nevstřebatelného monofilního vlákna (10.0) a technikou jednotlivě zakládáných stehů tak, aby se co nejvíce minimalizoval vznik stenóz v anastomózách a riziko trombózy štěpu. (Obr. 7) Během výkonu bylo též pečováno o experimentální zvíře, které jsme za účelem minimalizace perioperačního stresu zahřívali tepelným zářičem.

Každého příjemce štěpů jsme před vlastním chirurgickým výkonem zvážili a následně uvedli do celkové anestezie pomocí intramuskulárně podané směsi sufentanilu v dávce 20 µg/kg (Sufenta®, Janssen Pharmaceutica Inc., Belgie) a azaperonu v dávce 1 mg/kg (Stresnil®, Janssen Pharmaceutica Inc., Belgie). Tuto kombinaci anestetik jsme volili vzhledem k požadavku na lepší buzení zvířat po provedené transplantaci. Následovala příprava operačního pole, laparotomie s odsunutím kliček střeva a preparace retroperitonea, ve kterém jsme vypreparovali dostatečně dlouhý úsek subrenální aorty a přilehlé dolní duté žíly. Po naložení svorek aproximátoru na subrenální úsek břišní aorty jsme provedli isogenní nebo alogenní transplantaci štěpů pomocí jednotlivě uzlených nevstřebatelných stehů.

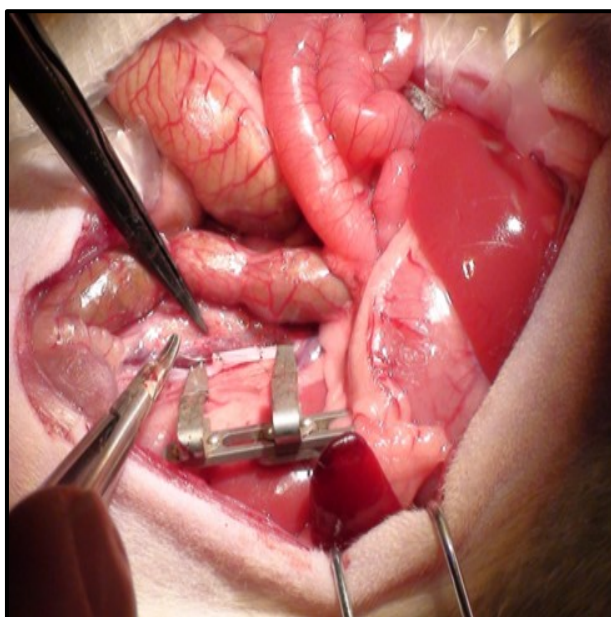
Po povolení svorek jsme zkontrolovali těsnost anastomóz, uložili kličky střeva zpět do dutiny břišní a provedli suturu laparotomie. Potkany jsme poté označili a uložili do předem označených vyhřívaných klecí, ve kterých jsme je dále sledovali až do jejich spontánního probuzení.



Obr.6

Vybavení experimentálního operačního sálu.

Experiment jsme provedli v prostorách fyziologického ústavu 1. LF UK v Praze za použití optického mikroskopu.



Obr.7

Transplantace rozmrazeného štěpu.

Našívání rozmrazeného štěpu subrenální aorty do břišní aorty byla klíčovou částí experimentu. Vlastní anastomózu jsme realizovali technikou jednotlivě uzlených prolenových stehů za použití optického mikroskopu a 10násobného zvětšení. Při realizaci anastomózy jsme použili speciální cévní svorku (aproximátor), která nám umožnila nejen zasvorkovat proximální a distální část břišní aorty, ale též našít štěp jako interpozit bez nežádoucího napětí v anastomóze.

3.9. Časové údaje kryokonzervace, rozmrazení a transplantace štěpů břišní aorty

Celý proces zahrnující odběr aorty, kryokonzervaci, skladování, rozmrazování a transplantaci jsme rozdělili do šesti časových úseků. Délku každého časového období jsme měřili pro každý štěp břišní aorty samostatně. Podrobné definice a trvání každého časového období jsme shrnuli v tab. 6. Celková doba studené ischemie kryokonzervovaných štěpů břišní aorty (před zmrazením + po rozmrazení) byla 313 ± 62 minut pro isografty a 504 ± 198 minut pro alografty. Mezi oběma skupinami jsme nepozorovali statisticky významný rozdíl.

Tab.6 – Definice a trvání jednotlivých časových úseků procesu kryokonzervace, uskladnění, rozmrazení a transplantace štěpu břišní aorty

Fáze procesu			Kryoštěpy	
Číslo	Název	Definice	Aloštěpy	Isoštěpy
1	Fáze studené ischemie před zamrazením	Časové období od naložení aortální svorky u dárcovského zvířete do vložení štěpů břišní aorty do roztoku DMSO. Štěpy břišní aorty byly v tomto období skladovány v roztoku Custodiol při teplotě tajícího ledu.	03:31 h (min 01:23, max. 04:45)	03:12 h (min 02:54, max. 03:28)
2	Fáze DMSO	Časové období od vložení štěpů břišní aorty do roztoku DMSO do zahájení kryokonzervace v programovatelném mrazícím zařízení.	00:38 h (min 00:19, max. 00:48)	00:40 h (min 00:38, max. 00:42)
3	Fáze kryokonzervace	Časové období od začátku kryokonzervace štěpů břišní aorty v programovatelném mrazícím zařízení do vložení kazet do tekutého dusíku.	02:38 h	02:38 h
4	Fáze skladování v parách dusíku	Časové období od vložení kazet do tekutého dusíku do jejich vyjmutí.	179,3 dnů (min 176, max. 181)	172,6 dnů (min 171, max. 176)
5	Fáze rozmrazení	Časové období od vyjmutím kazet z par tekutého dusíku do jejich vložení do roztoku Custodiolu.	01:25 h (min 01:10, max. 01:33)	01:33 h (min 01:10, max. 01:45)
6	Fáze studené ischemie po rozmrazení	Časové období od vložení štěpů břišní aorty do roztoku Custodiolu do jejich reperfúze u příjemcovského zvířete.	02:00 h (min 00:58, max. 03:27)	04:53 h (min 02:26, max. 07:07)

DMSO – dimethylsulfoxid

h – hodiny

min – minimum

max – maximum

3.10. Pooperační péče příjemcovských zvířat

V pooperačním průběhu a dalším sledování jsme nepodávali příjemcům žádné antiagregační nebo antikoagulační přípravky. Transplantovaným zvířatům jsme nepodávali též žádná imunosupresiva. Potkany jsme na začátku experimentu barevně označili, chovali jednotlivě v klecích, vedli u každého z nich denní záznam o celkovém stavu, hmotnosti, hybnosti a provedených odběrech. Zvířata jsme sledovali v místnosti s pokojovou teplotou, zajišťovali jim dostatečný přísun tekutin a potravy tak, abychom je co nejméně stresovali. Každý den jsme zvířata vážili, kontrolovali jejich celkový stav a prospívání. (Obr. 8)



Obr.8

Pooperační péče transplantovaných zvířat.

Po provedené transplantaci a odeznění celkové anestézie jsme každé zvíře umístili do předem označené chovné klece. V nich jsme zvířata uchovávali po celou dobu experimentu. U každého zvířete jsme vedli denní záznam o jeho hmotnosti, o aplikovaných lécích a pooperačním prospívání.

3.11. Odběr krevních vzorků za účelem stanovení koncentrace donor specifických protilátek u příjemců štěpů břišní aorty

Odběr krve za účelem stanovení koncentrace a dynamiky donor specifických anti MHC protilátek I. a II. třídy jsme provedli v obou skupinách 3 dny před transplantací a 30. den po transplantaci. Před transplantací jsme odběr prováděli punkcí očního sinu podle van Hercka (van Herck H. et al., 1998) v celkové anestezii. Třicátý pooperační den jsme krevní vzorky odebrali při explantaci štěpů punkcí dolní duté žíly. Vzorky jsme následně odstředili v Eppendorfových mikrozkušavkách a separované krevní sérum zamrazili až do doby vlastního stanovení koncentrace protilátek.

3.12. Explantace štěpů břišní aorty 30. den po transplantaci

Explantaci štěpů jsme u příjemců provedli 30. pooperační den. Zvířata jsme předoperačně zvážili a následně intramuskulárně aplikovanou směsí ketaminu v dávce 100 mg/kg a xylazinu v dávce 10 mg/kg uvedli do celkové anestezie. Poté jsme provedli re-laparotomii a způsobem popsaným podrobně v kapitole o transplantaci odebrali transplantovaný štěp subrenální břišní aorty. Při preparaci jsme hodnotili případné známky rejekce štěpů jako je aneurysmatická dilatace, přítomnost pseudovýdutě v anastomóze nebo jeho uzávěr. Tepny jsme poté připravili na histologické a imunohistochemické vyšetření. To zahrnovalo odstřížení té části štěpu, která přímo naléhala na vlastní anastomózu, ve které by bylo hodnocení zkresleno přítomností cizorodého materiálu. Během explantace jsme zvířatům též provedli odběr krevních vzorků do Eppendorfových zkumavek ke stanovení koncentrace a dynamiky donor specifických anti MHC protilátek I. a II. Třídy. (viz výše) Zvířata jsme nakonec eutanazovali letální dávkou thiopentalu podanou do dolní duté žíly.

3.13. Histologické a imunohistochemické vyšetření explantovaných štěpů břišní aorty

Všechny explantované štěpy jsme histologicky vyšetřili. K vlastní analýze jsme odebrali střední úseky štěpů fixované v 10 % formolu, aby vyšetření nebyla ovlivněna hojivými procesy v oblastech anastomóz a reakcí tkání na šicí materiál. Štěpy jsme po explantaci za použití operačního mikroskopu očistili od přiložených okolních tkání, odstranili jsme obě anastomózy a po konečné kontrole explantátů jsme přistoupili k další přípravě na histologické vyšetření. Části

očištěných štěpů jsme uložili do speciálních plastových boxů Sakura Finetek Tissue Tek© Cryomold holders (Sakura Finetek, Tokyo, Japonsko) a zalili je gelovým fixačním roztokem Sakura Finetek Tissue Tek© O. C. T. compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japonsko). Preparáty jsme ve vaničkách zamrazili v lázni s 2-methylbutanem (Fluka Chemika, Buchs, Švýcarsko) pomocí tekutého dusíku a následně jsme vaničky s preparáty uložili při teplotě -80 °C do dalšího zpracování.

Histologické vyšetření jsme provedli po definitivním zpracování a zalití do parafínu z 5 µm tlustých parafinových řezů za použití barvení hematoxylin-eosinem a barvení podle Van-Giesona na elastická vlákna. Hodnotili jsme šířku a kontinuitu intimy, rozsah intimální proliferace eventuálně destrukce a tloušťku mediální vrstvy. Tunica intima byla definována od povrchu intimálních buněk k vnitřní hranici tunica media, šířku mediální vrstvy jsme měřili mezi vnitřní a vnější elastickou membránou. Měření jsme prováděli v náhodných lokalizacích na 10 místech v každém řezu. Průměrnou hodnotu se standardní odchylkou jsme stanovili pro každou aortu i skupinu zvlášť. Preparáty jsme hodnotili naslepo tak, aby nebylo známo, ke které skupině vyšetřovaný vzorek patří a byla tak zajištěna nestrannost experimentu. Při histologickém vyšetřování jsme z preparátů pořizovali fotodokumentaci.

Vzorky pro imunohistochemické vyšetření jsme zpracovávali podobně jako u prostého histologického vyšetření také ze střední části štěpů, které jsme v plastových boxech (Tissue Tek©, Cryomold, Sakura, Japonsko) zalili gelovým fixačním roztokem (Tissue Tek©, Cryomold, Sakura, Japonsko). Boxy jsme následně vložili do lázně s 2-methylbutanem (Fluka, Chemika, Švýcarsko) a zamrazili pomocí tekutého dusíku. Po dobu, než jsme provedli imunohistochemické vyšetření, byly boxy skladovány při teplotě - 80°C.

3.13.1. Detekce CD4+, CD8+ pozitivních buněk a buněk s von Willebrandovým faktorem

Detekci imunokompetentních buněk jsme provedli dvojestupňovou nepřímou metodou, při které jsme použili imunoenzymový polymer.

Pro vyšetření přítomnosti a množství imunokompetentních buněk jsme použili 8 µm silné řezy, které jsme nejprve 10 minut fixovali chlazeným acetonem. Následně jsme preparáty osušili a opláchli v 0,2 % roztoku Triton X 100 a ve fosfátovém pufru. Takto připravené vzorky jsme 60 minut inkubovali v roztoku s primární protilátkou anti-CD4, (W3/25, Cymbus Biotechnology LTD, Hampshire, Velká Británie), anti-CD8 (OX-8, Cymbus Biotechnology LTD, Hampshire,

Velká Británie), anti-Von Willebrand factor (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dánsko). V dalším kroku jsme inhibovali endogenní peroxidázu v 0,3 % peroxidu vodíku a v 70 % metanolu. Tato fáze probíhala 30 minut. Následně jsme vzorky dalších 30 minut inkubovali v roztoku se sekundární protilátkou (imunoenzymový polymer Histofine® Simple Stain Rat MAX PO, Nichirei, Japonsko). Před finálním obarvením Harrisovým hematoxylinem a fixací v Entellanu (Merck KGaA, Darmstadt, Německo) jsme na vzorky 5 minut aplikovali 3,3 diaminobenzidin (Dako Liquid DAB + Substrate-Chromogen System, Dako, Glostrup, Dánsko).

Preparáty jsme hodnotili naslepo tak, aby nebylo známo, ke které skupině vyšetřovaný vzorek patří a byla tak zajištěna nestrannost experimentu. Na vyšetření jsme použili mikroskop s 1000násobným zvětšením. Počet buněk jsme stanovovali v pěti zorných polích, ze kterých jsme spočetli průměrnou hodnotu.

3.13.2. Detekce Lewis MHC II pozitivních buněk

Obdobně jako u detekce CD4⁺, CD8⁺ buněk jsme toto imunohistochemické vyšetření prováděli na 8 µm silných řezech. Pro vyšetření jsme ovšem použili třístupňovou nepřímou technikou. Vzorky jsme nejprve 10 minut fixovali v chlazeném acetonu, osušili a následně opláchli v 0.2 % roztoku Triton X 100 a fosfátovém pufru. Dále jsme za použití setu Biotin blocking system (Dako, Dánsko) zablokovali endogenní biotin. Po inkubaci s 10 % koňským sérem jsme vzorky 60 minut inkubovali s primární protilátkou. Dalším krokem byla inhibice endogenní peroxidázy v 0,3 % peroxidu vodíku a v 70 % metanolu. Poté proběhla třicetiminutová expozice biotinylovanou koňskou anti-myší protilátkou (Vector Lab, Burlingame, Velká Británie).

V posledních fázích celého procesu jsme preparáty inkubovali s R. T. U. Vectastain Elite ABC Reagent (Vector Lab, Burlingame, Velká Británie) a poté jsme na vzorky na 5 minut aplikovali 3,3 diaminobenzidin (Dako Liquid DAB + Substrate-Chromogen, Dako, Dánsko). Po kontrastním dobarvení jsme vzorky zalili do Entellanu (Merck, Německo). Preparáty jsme následně "slepě" hodnotili tak, aby výsledky vyšetření nemohly být ovlivněny.

Buňky jsme sčítali v pěti náhodně vybraných zorných polích při použití vyšetřovacího mikroskopu s 1000násobným zvětšením. Z výsledků jsme nakonec spočetli průměrnou hodnotu.

3.13.3. Detekce imunoglobulinů třídy G

Přítomnost imunoglobulinů ve stěně štěpů jsme zjišťovali přímou imunofluorescenční technikou. Řezy 8 μm silné jsme oplachovali ve fosfátovém pufru a dále sušili na vzduchu. Dalších třicet minut jsme vzorky inkubovali s primární protilátkou konjugovanou s fluorescein isothiocyanátem (FITC, Chemicon International Inc, Temecula, Kalifornie, Spojené státy americké). Vzorky jsme následně opět opláchli, fixovali v glycerinu a bezprostředně poté hodnotili za použití fluorescenčního mikroskopu.

3.14. Detekce donor specifických anti-MHC protilátek I. a II. třídy v periferní krvi příjemců

Krevní vzorky jsme odebrali zvířatům v obou skupinách 3 dny před transplantací a 30. den po transplantaci. Před transplantací jsme odběr prováděli punkcí očního sinu podle van Hercka (van Herck H. et al., 1998) v celkové anestezii. Třicátý pooperační den jsme krevní vzorky odebrali při explantaci štěpů punkcí dolní duté žíly. Vzorky jsme následně odstředili v Eppendorfových mikrozkuřavkách a separovali tak krevní sérum, ve kterém jsme koncentraci protilátek dále stanovovali.

3.14.1. Získání splenocytů dárcovských zvířat k vyšetření periferní krve příjemců průtokovou cytometrií

Jako zdroj splenocytů jsme použili sleziny od samců potkanů Brown-Norway ($n = 10$, váha 200-250 g) pocházejících z chovné stanice Charles River (Würzburg, Německo). Zvířata jsme před výkonem zvážili a uvedli do celkové anestézie pomocí intramuskulárně aplikované směsi ketaminu v dávce 100 mg/kg (Narkamon®, Spofa) a xylazinu v dávce 10 mg/kg (Rometar®, Spofa). Poté jsme nůžkami provedli střední laparotomii a pomocí retraktorů získali přístup do břišní dutiny, ze které jsme vyjmuli slezinu. Po odebrání slezin jsme zvířata eutanazovali injekčním podáním letální dávky tiopentalu do dolní duté žíly. Odebrané sleziny jsme následně zpracovali podle protokolu pro přípravu splenocytů.

Sleziny jsme po odběru rozdělili na menší kousky a propasírovali sítkem pomocí pístu injekční stříkačky. Drť jsme poté promyli ve fosfátovém pufru (PBS – Phosphate buffered saline) a vzniklou buněčnou suspenzi jsme dále smíchali s Biocoll separačním roztokem (BioScience,

Nottingham, Velká Británie). Směs jsme 20 minut odstředovali při 2000 ot. /min. a vzniklý supernatant jsme smíchali s 10 % fetálním telecím sérem (FCS) a RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs SG, Švýcarsko). Následně jsme směs odstředili v Eppendorfových mikrozkmavkách při 1200 ot. /min. po dobu 10 minut. Tento krok jsme prováděli dvakrát. Poté následovalo sečtení a kontrola viability buněk pomocí barvení tryptanovou modří. Buňky pak byly uloženy v nádobkách s kryokonzervačním roztokem (Iscove's Modified Dulbecco's Medium + 20 % FCS) v tekutém dusíku do dalšího zpracování.

3.14.2. Vyšetření krevních sér příjemců průtokovou cytometrií

Vazbu protilátek v příjemcovských potkaních sérech na klidové Brown-Norway splenocyty jsme zjišťovali průtokovou cytometrií. Splenocyty jsme rozmrazili, promyli ve fosfátovém pufru (PBS) a suspendovali v roztoku PBS s 1 % fetálním bovinním sérem (FBS). 100000 buněk jsme pak po dobu 30 minut inkubovali při 4 st. Celsia s 10 μ L příjemcovského potkaního séra. Buňky jsme poté dvakrát promyli v roztoku PBS s 1 % FBS a inkubovali s originálními protilátkami ke zjištění exprese MHC. Jako primární protilátky jsme použili Biotin-MHC I. třídy (anti-RT1.Ac, OX-27, Acris Antibodies GmbH, Herford, Německo) nebo Biotin-MHC II. třídy (anti-RT1.D, OX-17, BD Biosciences, Heidelberg, Německo) a jako sekundární protilátky PE-Cy7-Streptavidin (BD Biosciences, Heidelberg, Německo). FACSCanto II flow cytometrem (BD Biosciences, Heidelberg, Německo) jsme získali 10000 buněk a následně analyzovali pomocí FACSDiva™ programu (BD Biosciences, Heidelberg, Německo). Grafické zpracování nám umožnilo převedení a zhodnocení intenzity fluorescence. Vazba MHC protilátek I. nebo II. třídy na splenocyty, které nebyly inkubovány s potkaním sérem, jsme nastavili jako 100 %. Protilátky přítomné v sérech transplantovaných potkanů Lewis se kompetitivně navázaly na molekuly MHC I. a II. třídy exprimovaných na splenocytech z potkanů Brown-Norway. Kompetitivní inhibice vazby fluoresceinem označených protilátek MHC I. a II. třídy tak ve výsledku snížila naměřený fluorescenční signál.

3.15. Statistické metody

Získaná základní data z experimentu jsme statisticky zpracovali ve spolupráci s profesionálním statistikem z technologického centra Akademie věd České republiky.

Data jsme nejprve otestovali pomocí testů normality. Jako test normality jsme zvolili Kolmogorovův-Smirnovův test a dále testy šikmosti a špičatosti rozdělení dat. Jelikož data vykazovala jen nevýznamné odchylky od normality, zvolili jsme pro jejich popis a testování parametrické metody. Jako popisný ukazatel polohy souboru jsme zvolili aritmetický průměr a jako ukazatel variability jsme použili směrodatnou odchylku. Výšky sloupců u sloupcových grafů reprezentují průměry a chybové úsečky symbolizují 95 % konfidenční interval. Vzhledem k vyváženému typu designu jsme průměry všech sledovaných parametrů (CD4+ buňky, CD8+ buňky, MHC II+ buňky, anti MHC I a anti MHC II protilátky) mezi skupinami globálně porovnávali pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA). V případě významnosti hlavního efektu ($p < 0,05$) jsme následně provedli párové porovnávání dvojic skupin. K párovému porovnávání jsme použili Tukeyův post-hoc test, který v sobě zahrnuje korekci p-hodnoty vzhledem k mnohočetnému porovnávání. Veškeré výpočty a testování dat jsme provedli ve statistickém programu STATA (verze 12.1).

4. VÝSLEDKY

4.1. Histologie a imunohistologie kryokonzervovaných aloštěpů (CRYO-ALO) a isoštěpů břišní aorty (CRYO-ISO) 30. den po transplantaci

Kryokonzervované aloštěpy břišní aorty vyšetřované 30. den po transplantaci vykazovaly stejně jako isoštěpy pravidelnou morfolonii aortální stěny s jasnou diferenciací všech tří základních anatomických vrstev (obr. 9).

Luminální povrch tunica intima tvořila u obou typů štěpů jedna vrstva endoteliálních buněk (obr. 10). U aloštěpů jsme detekovali jenom minimální známky intimální hyperplázie. V tunica intima aloštěpů jsme nezaznamenali žádnou infiltraci příjemcovskými MHC buňkami II. třídy.

Svalová vrstva aloštěpů nevykazovala žádné známky nekrózy nebo depozice imunoglobulinu G (obr. 11, 12). Mezi alografty a isografty jsme nepozorovali žádný statistický významný rozdíl v šířce tunica media (tab. 7).

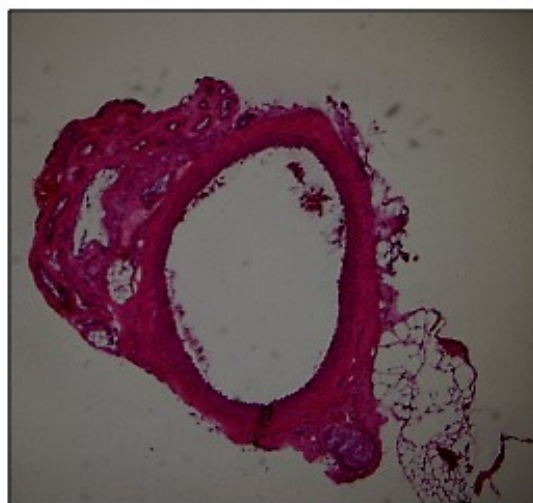
Infiltrace tunica adventitia kryokonzervovaných aloštěpů břišní aorty příjemcovskými MHC buňkami II. třídy byla statisticky vyšší ve srovnání s infiltrací adventiciální vrstvy isoštěpů (obr. 13) (tab. 3). Stejně rozdíly jsme pozorovali i při hodnocení infiltrace tunica adventitia CD4+ a CD8+ lymfocyty (obr. 14, 15) (tab. 7).

Hematoxilin-eosin, 30. den po transplantaci

CRYO-ALO



CRYO-ISO



Obr.9

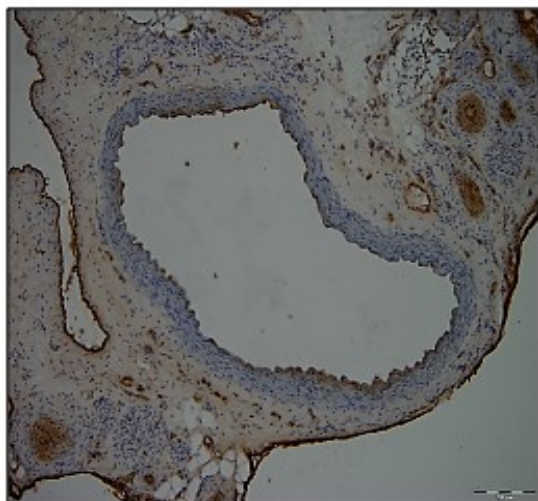
CRYO-ALO – aloštěpy vykazovaly pravidelnou morfolologii aortální stěny s jasnou diferenciací všech tří základních anatomických vrstev. V tunica adventitia těchto štěpů jsme pozorovali vyšší koncentraci buněk.

CRYO-ISO – isoštěpy vykazovaly pravidelnou morfolologii aortální stěny s jasnou diferenciací všech tří základních anatomických vrstev.

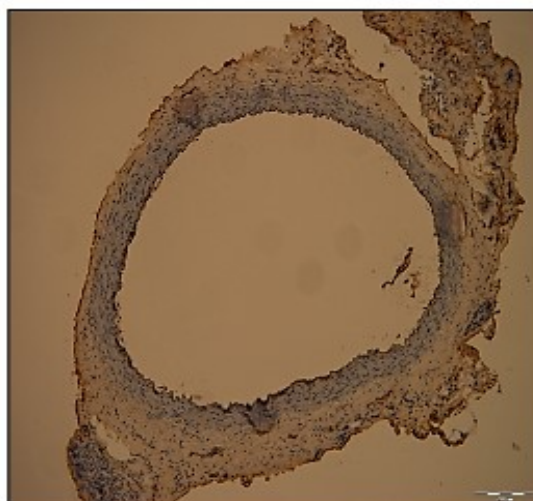
Zvětšeno 100x.

Endotelové buňky, 30. den po transplantaci

CRYO-ALO



CRYO-ISO



Obr.10

CRYO-ALO - Intraluminální povrch tunica intima aloštěpu byl pokryt souvislou vrstvou endotelových buněk.

CRYO-ISO - Intraluminální povrch tunica intima isoštěpu byl pokryt souvislou vrstvou endotelových buněk.

Endotelové buňky zabarveny na hnědo.

Zvětšeno 100x.

Primární protilátka: anti-Von Willebrand factor (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark)

Sekundární protilátka: Histofine® Simple Stain Rat MAX PO (Nichirei Biosciences Inc., Japan)

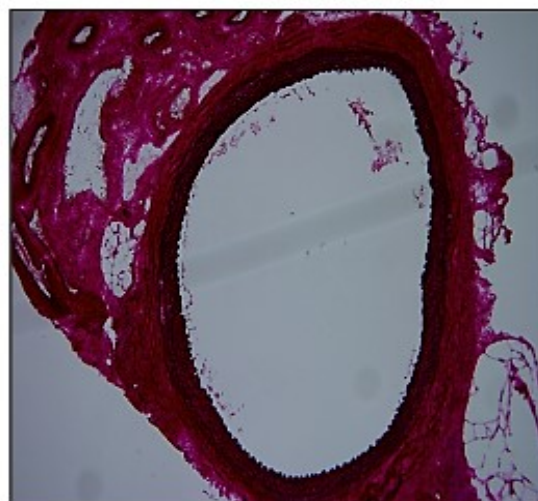
Detekční systém: Dako Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark)

Van Gieson elastika, 30. den po transplantaci

CRYO-ALO



CRYO-ISO

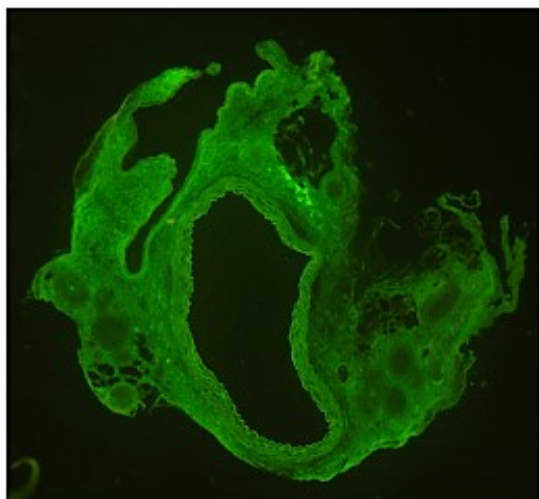


Obr.11

CRYO-ALO – normální morfologie muskulární vrstvy s přítomností elastických vláken u kryokonzervovaných aloštepů.
CRYO-ISO – normální morfologie muskulární vrstvy s přítomností elastických vláken u kryokonzervovaných isoštepů.
Zvětšeno 100x.

Imunoglobulin G, 30. den po transplantaci

CRYO-ALO



CRYO-ISO



Obr.12

CRYO-ALO – Absence ukládání imunoglobulinu třídy G ve svalové vrstvě u kryokonzervovaných aloštepů.

CRYO-ISO – Absence ukládání imunoglobulinu třídy G ve svalové vrstvě u kryokonzervovaných isoštepů.

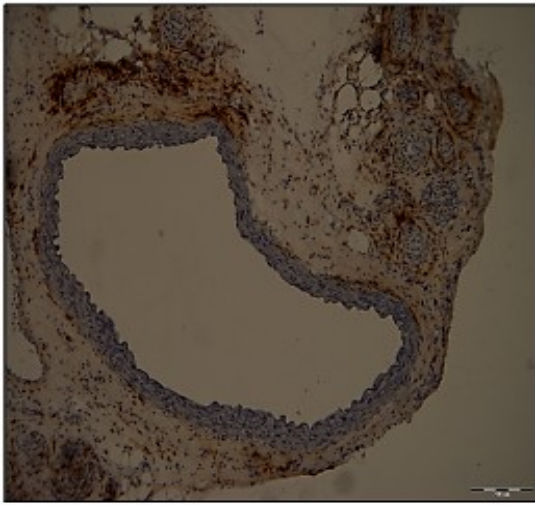
Zobrazeno pomocí fluorescenční mikroskopie.

Zvětšeno 100x.

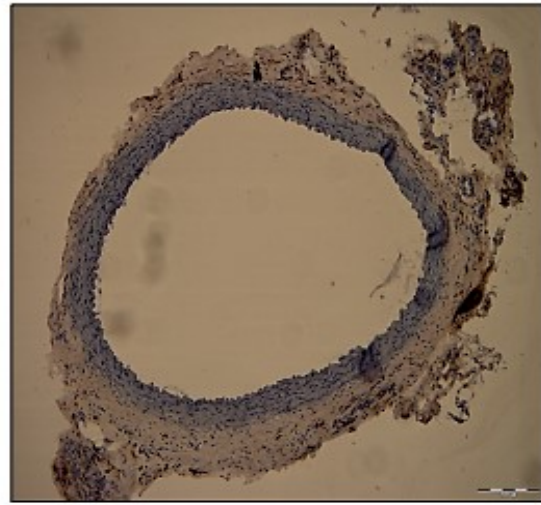
Primární protilátka: poškani IgG protilátka konjugované s fluorescein isothiocyanátem (Chemicon International Inc., Temecula, USA)

Lewis MHC II pozitivní buňky, 30. den po transplantaci

CRYO-ALO



CRYO-ISO



Obr.13

CRYO-ALO – mírně zvýšená infiltrace tunica adventitia příjemcovskými (kmen Lewis) MHC II pozitivními buňkami jako obraz buňkami zprostředkované rejekce těchto aloštěpů.

CRYO-ISO – minimální infiltrace tunica adventitia příjemcovskými (kmen Lewis) MHC II pozitivními buňkami u isoštěpů.

Pozitivní buňky zabarveny na hnědo.

Zvětšeno 100x.

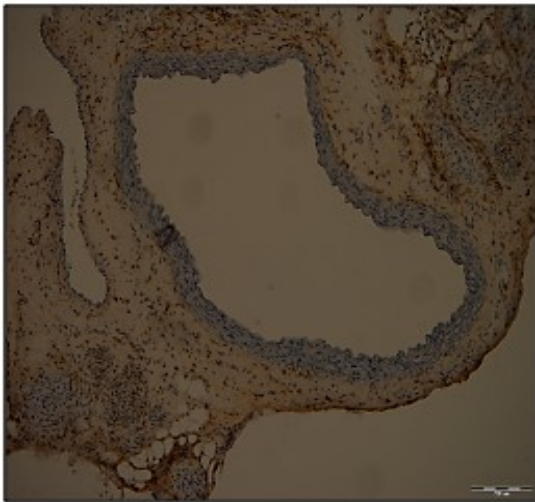
Primární protilátka: anti RT1.Bu (MRC-OX3, Cedarlane Laboratories Ltd., Burlington, Kanada)

Sekundární protilátka: horse anti mouse antibody (Vector Lab, Burlingame, USA)

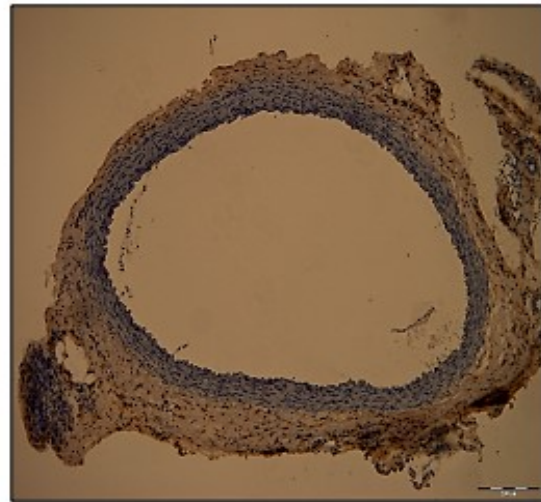
Detekční systém: R.T.U. Vectastain Elite ABC, Reagent (Vector Lab, Burlingame, USA)

CD4 pozitivní buňky, 30. den po transplantaci

CRYO-ALO



CRYO-ISO



Obr.14

CRYO-ALO – zvýšená infiltrace tunica adventitia CD4+ buňkami jako obraz buňkami zprostředkované rejekce aloštěpů.

CRYO-ISO – minimální infiltrace tunica adventitia CD4+ buňkami u isoštěpů.

Pozitivní buňky zabarveny na hnědo.

Zvětšeno 100x.

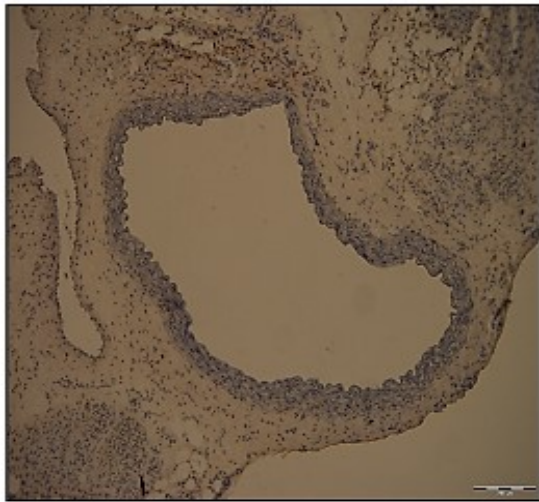
Primární protilátka: anti-CD4 (W3/25, Cymbus Biotechnology LTD, Hampshire, UK)

Sekundární protilátka: Histofine® Simple Stain Rat MAX PO (Nichirei Biosciences Inc., Japonsko)

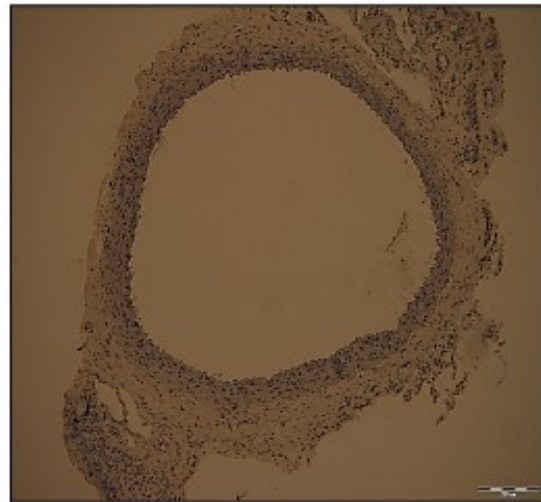
Detekční systém: Dako Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dánsko)

CD8 pozitivní buňky, 30. den po transplantaci

CRYO-ALO



CRYO-ISO



Obr. 15

CRYO-ALO – zvýšená infiltrace tunica adventitia CD8+ buňkami jako obraz buňkami zprostředkované rejekce aloštěpů.

CRYO-ISO – minimální infiltrace tunica adventitia CD8+ buňkami u isoštěpů.

Pozitivní buňky zabarveny na hnědo.

Zvětšeno 100x.

Primární protilátka: anti-CD8 (OX-8, Cymbus Biotechnology LTD, Hampshire, UK)

Sekundární protilátka: Histofine® Simple Stain Rat MAX PO (Nichirei Biosciences Inc., Japonsko)

Detekční systém: Dako Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dánsko)

Tab.7 Histologické a imunohistologické parametry vyšetřované u kryokonzervovaných štěpů břišní aorty 30. den po transplantaci.

		KRYOŠTĚPY 30. POD	
		ALOŠTĚPY (CRYO-ALO, N=6)	ISOŠTĚPY (CRYO-ISO, N=6)
Tunica intima	Endotelová vrstva	+	+
	Intimální hyperplázie	-	-
Tunica media	Nekróza svalových buněk	-	-
	IgG depozita	-	-
	Šířka tunica media (mikrometry)	75.4 ± 14.9	79.3 ± 15.4
Tunica adventicia	CD8+ buňky	6.9 ± 5.4*	2.2 ± 2.7
	CD4+ buňky	9.6 ± 6.5*	3.9 ± 2.6
	LEW MHC II+ buňky	20.7 ± 6.7*	6.3 ± 4.4

Aloštěpy břišní aorty zpracované v souladu s novým klinickým kryokonzervačním protokolem s pomalým rozmrazováním vykazovaly zachovalou morfologii aortální stěny. Ve srovnání s isoštěpy vykazovaly aloštěpy vyšší infiltraci tunica adventitia imunokompetentními buňkami příjemců.

* Celkové množství CD4+, CD8+ buněk a buněk Lewis MHC II. třídy v adventiciální vrstvě kryokonzervovaných aloštěpů břišní aorty bylo významně vyšší ($P < 0,05$), než jsme pozorovali u kryokonzervovaných isoštěpů.

4.2. Stanovení koncentrace donor specifických protilátek proti MHC antigenům I. a II. třídy v sérech příjemců kryokonzervovaných aloštěpů a isoštěpů břišní aorty.

U příjemců kryokonzervovaných aloštěpů břišní aorty (skupina CRYO-ALO) vykazovala séra odebraná 30. den po transplantaci vyšší inhibici vazby fluorescenčně značené protilátky na MHC antigeny I. a II. třídy na dárcovských splenocytech ve srovnání se séry odebranými před transplantací. Statistickou významnost ($p > 0,05$) jsme však pozorovali pouze u protilátek proti MHC antigenům I. třídy (tab. 8).

U příjemců kryokonzervovaných isoštěpů břišní aorty (skupina CRYO-ISO) nevykazovala jak séra odebraná před transplantací, tak séra odebrána 30. den po transplantaci žádnou inhibici vazby fluorescenčně značené protilátky na MHC antigeny I. a II. třídy na dárcovských splenocytech.

Tab.8 Procento naměřeného fluorescenčního signálu po smísení klidových splenocytů potkanů kmene Brown-Norway s vyšetřovaným sérem Lewis příjemců aortálních alo – a isoštěpů a s fluoresceinem značenými protilátkami proti Brown-Norway MHC antigenům I. a II. třídy.

	MHC I. třídy		MHC II. třídy	
	Den 0	Den 30	Den 0	Den 30
ALOŠTĚPY (CRYO-ALO, N=6)	111 %±22 %	47±19 %*	101±42 %	66±12 %
ISOŠTĚPY (CRYO-ISO, N=6)	111 %±7 %	97 %±5 %	90 %±20 %	98 %±7 %

* $P > 0.05$

4.3. Porovnání imunogenicity aloštěpů břišní aorty ošetřených novým kryokonzervačním protokolem s pomalým rozmrazováním (CRYO-ALO) a aloštěpů ošetřených klinickým protokolem pro uchovávání v chladu (COLD-ALO)

Protokol používaný v „Programu transplantace cévních štěpů v České republice“ pro zpracování chladem konzervovaných tepenných aloštěpů byl upraven do experimentálních podmínek a byl podrobně popsán v naší předchozí publikaci (Matia et al., 2007). Původní základní data výše uvedeného experimentu s chladem konzervovanými aloštěpy břišní aorty jsme porovnali se základními daty našeho současného experimentu. Na oba experimenty dohlížel stejný hlavní řešitel. (Priv.-Doz. MUDr. habil. Ivan Matia, Ph.D.)

Původní skupinu chladem konzervovaných aloštěpů břišní aorty jsme pro potřeby srovnávání a statistického zpracování označili v současném experimentu jako skupinu COLD-ALO (dárci aloštěpů byly potkani kmene Brown-Norway, příjemci aloštěpů byli potkani kmene Lewis (N = 8) o hmotnosti 280 až 380 g).

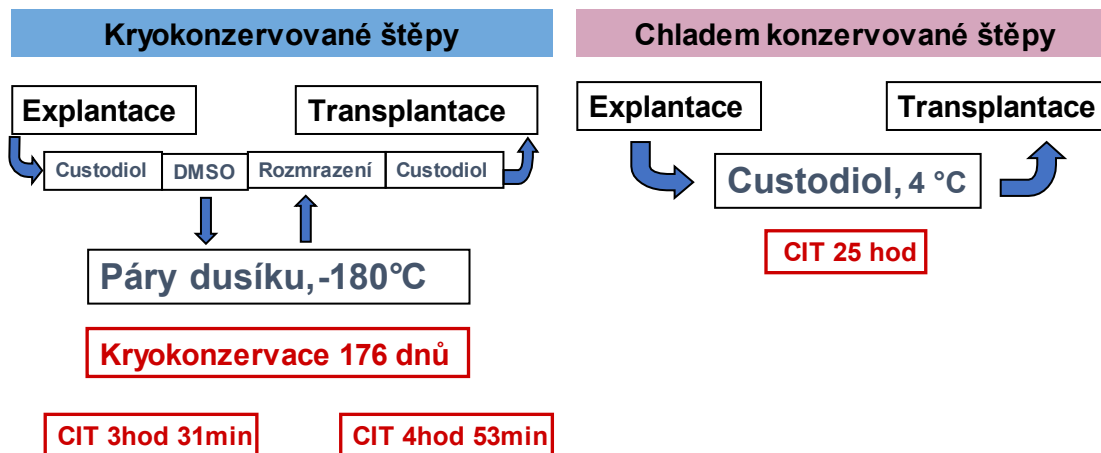
4.3.1. Srovnání obou protokolů konzervace aloštěpů z hlediska jednotlivých časů studené ischemie

4.3.1.1. Časové intervaly kryokonzervačního protokolu s pomalým rozmrazováním u aloštěpů břišní aorty

Podrobné definice a trvání každé časové periody kryokonzervace i pomalého rozmrazování jsou shrnuty v tab. 6. Průměrná doba studené ischemie aloštěpů břišní aorty před kryokonzervací byla 3 hodiny a 31 minut. Aloštěpy byly poté uloženy v DMSO roztoku po průměrnou dobu 38 minut (fáze DMSO). Průměrná doba samotného procesu kryokonzervace aloštěpů byla 2 hodiny a 38 minut (fáze kryokonzervace). Aloštěpy pak byly skladovány v parách kapalného dusíku v průměru 179 dnů. Průměrná doba pomalého rozmrazování byla 1 hodina a 25 minut. Průměrná doba mezi vložením rozmrazených aortálních štěpů do roztoku Custodiolu® a reperfúzí štěpů u příjemce (doba studené ischemie aloštěpu po rozmrazení) byla 4 hodiny a 53 minut. Průměrná celková doba studené ischemie kryokonzervovaných aloštěpů břišní aorty (před zmrazením a po rozmrazení) tak byla 8 hodin a 24 minut.

4.3.1.2. Časové intervaly protokolu pro uchování v chladu

Celková doba studené ischemie chladem konzervovaných aloštěpů břišní aorty skladovaných v roztoku Custodiolu o teplotě 4 °C byla v průměru 33 hodin a 40 minut (minimálně 20 hodin 40 minut, maximálně 47 hodin 10 minut).



Obr. 16

Schématické zobrazení adaptace klinických konzervačních protokolů tepenných aloštěpů používaných v „Programu transplantace cévních štěpů v České republice“ do podmínek našeho experimentu.

Kryokonzervované štěpy - kryokonzervační protokol tepenných aloštěpů s pomalým rozmrazováním.

Chladem konzervované štěpy – protokol pro konzervaci tepenných aloštěpů chladem.

CIT – čas studené ischemie

4.3.2. Srovnání histologického obrazu kryokonzervovaných (CRYO-ALO) a chladem konzervovaných aloštěpů břišní aorty (COLD-ALO) 30. den po transplantaci

Kryokonzervované aloštěpy břišní aorty (CRYO-ALO) vykazovaly ve srovnání s chladem konzervovanými aloštěpy (COLD-ALO) 30. den po transplantaci významně nižší známky rejekce ve všech základních anatomických vrstvách jejich stěny.

U kryokonzervovaných aloštěpů jsme pozorovali jenom minimální známky intimální hyperplázie bez infiltrace této vrstvy příjemcovskými MHC buňkami II. třídy. (Obr. 17)

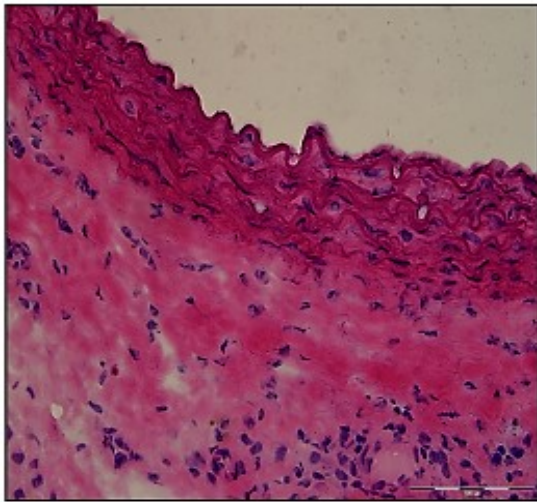
Tunica intima chladem konzervovaných aloštěpů byla výrazně hyperplastická a vykazovala známky masivní buněčné infiltrace. (Obr. 17) U obou typů aloštěpů byla tunica intima pokryta souvislou vrstvou endotelových buněk. (Obr. 18)

Tunica media kryokonzervovaných aloštěpů vykazovala normální anatomickou strukturu bez známek nekrotizace nebo depozic imunoglobulinu G. Tunica media chladem konzervovaných aloštěpů vykazovala známky desintegrace, nekrotizace svalových buněk a výraznou depozicí imunoglobulinů třídy G. (Obr. 19) Zároveň byla svalová vrstva chladem konzervovaných aloštěpů statisticky tenčí ($P < 0,05$) ve srovnání se svalovou vrstvou kryokonzervovaných aloštěpů. (Tab. 9)

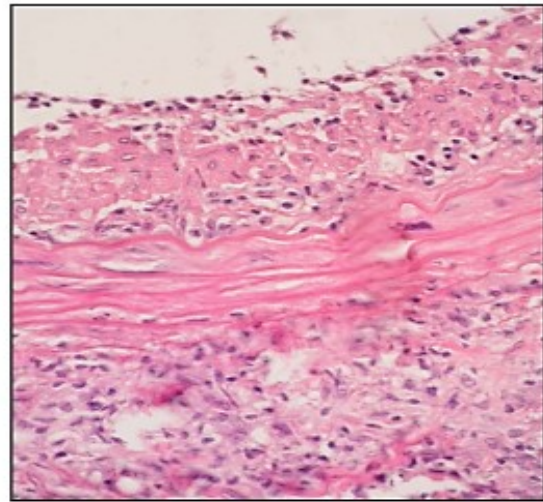
Adventiciální vrstva kryokonzervovaných aloštěpů vykazovala 10násobně nižší infiltraci příjemcovskými MHC II+ buňkami, CD4+ a CD8+ buňkami ve srovnání s chladem konzervovanými aloštěpy. (Obr. 20, 21, 22) (Tab. 9)

Hematoxilin-eosin, 30. den po transplantaci

CRYO-ALO



COLD-ALO

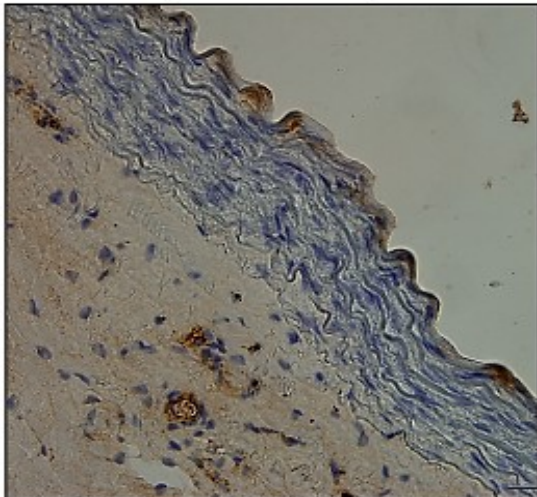


Obr.17

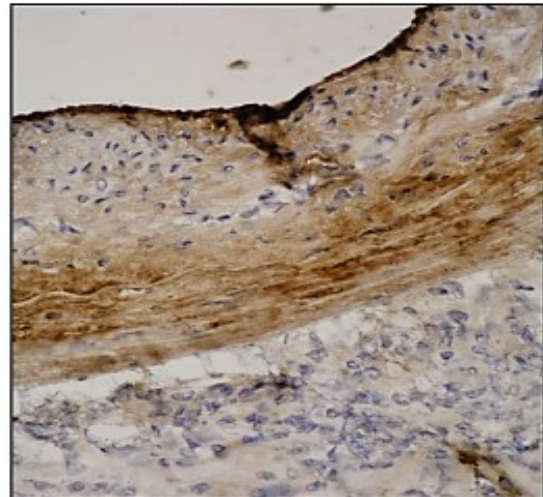
CRYO-ALO – tunica intima kryokonzervovaných aloštépů vykazovala minimální známky intimální hyperplázie.
COLD-ALO – u chladem konzervovaných aloštépů byly známky intimální hyperplázie a její infiltrace buňkami daleko výraznější.
Zvětšeno 400x.

Endotelové buňky, 30. den po transplantaci

CRYO-ALO



COLD-ALO



Obr.18

CRYO-ALO – Intraluminální povrch tunica intima kryokonzervovaných aloštépů byl pokryt souvislou vrstvou endotelových buněk.
COLD-ALO – Hyperplastická tunica intima chladem konzervovaných aloštépů byla pokryta souvislou vrstvou endotelových buněk.
Pozitivní buňky zabarveny na hnědo.

Zvětšeno 400x.

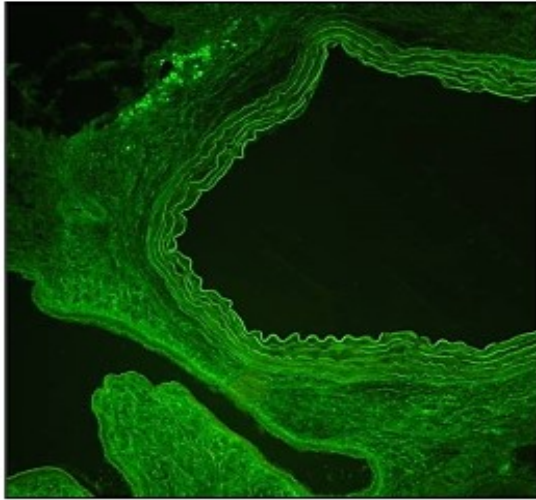
Primární protilátka: anti-Von Willebrand factor (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark)

Sekundární protilátka: Histofine® Simple Stain Ret MAX PO (Nichirei Biosciences Inc., Japan)

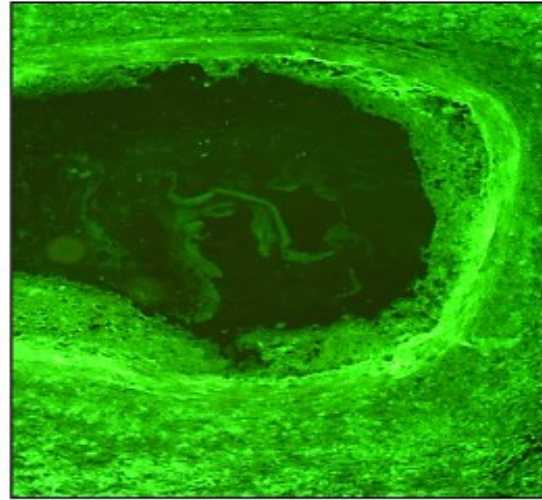
Detekční systém: Dako Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark)

Imunoglobulin G, 30. den po transplantaci

CRYO-ALO



COLD-ALO



Obr.19

CRYO-ALO – Tunica media kryokonzervovaných aloštěpů nevykazovala žádné známky ukládání imunoglobulinu třídy G nebo destrukci její anatomické stavby.

COLD-ALO – Tunica media chladem konzervovaných aloštěpů vykazovala výraznou destrukci její anatomické stavby s masivním ukládáním imunoglobulinu třídy G jako projevem protilátkami zprostředkované rejekce.

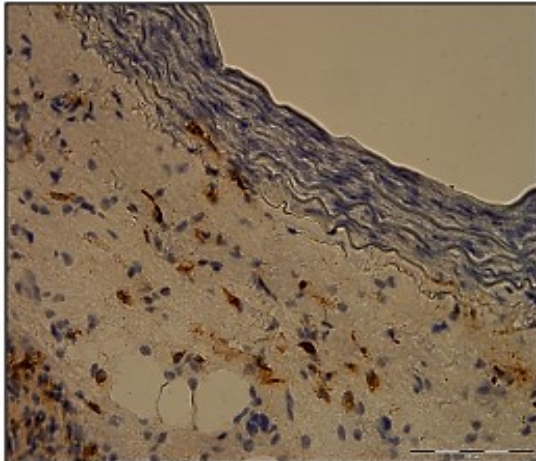
Zobrazeno pomocí fluorescenční mikroskopie.

Zvětšeno 200x.

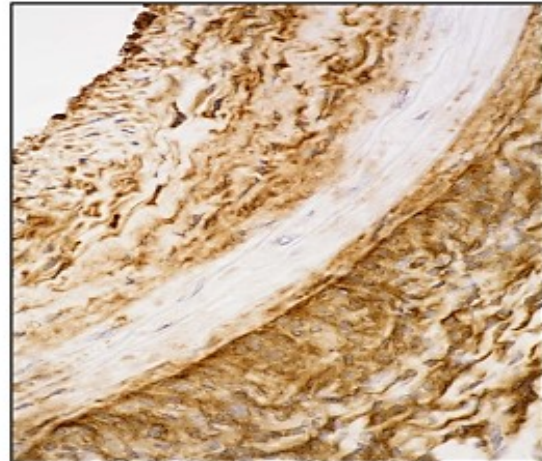
Primární protilátka: potkaní IgG protilátka konjugovaná s fluorescein isothiocyanátem (Chemicon International Inc., Temecula, USA)

Lewis MHC II pozitivní buňky, 30. den po transplantaci

CRYO-ALO



COLD-ALO



Obr.20

CRYO-ALO – tunica intima ani tunica media kryokonzervovaných aloštěpů nevykazovala žádné známky infiltrace příjemcovskými imunokompetentními buňkami. Jejich vyšší koncentrace byla zachycena ale v adventiciální vrstvě zejména v oblastech sousedících se svalovou vrstvou aortální stěny.

COLD-ALO – hyperplastická tunica intima chladem konzervovaných aloštěpů vykazovala značnou infiltraci příjemcovskými imunokompetentními buňkami. Jejich koncentrace v aortální stěně byla ale nejvyšší v adventiciální vrstvě v oblastech těsně sousedících se svalovou vrstvou.

Pozitivní buňky zbarveny na hnědo.

Zvětšeno 400x.

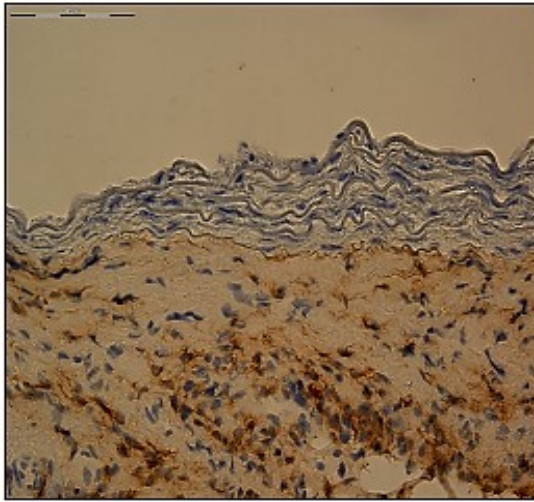
Primární protilátka: anti RT1.Bu (MRC-0X3, Cedarlane Laboratories Ltd., Burlington, Kanada)

Sekundární protilátka: horse anti mouse antibody (Vector Lab, Burlingame, USA)

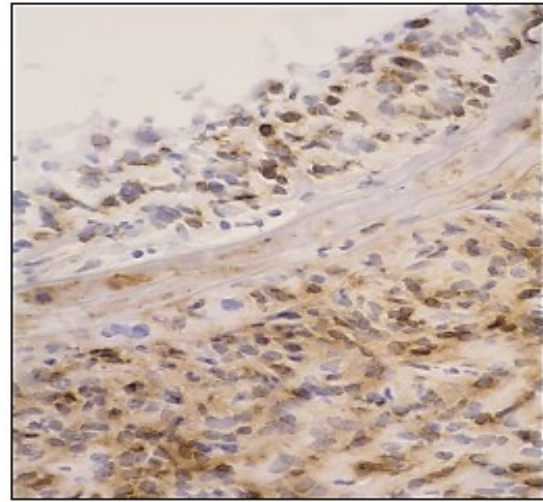
Detekční systém: R.T.U. Vectastain Elite ABC, Reagent (Vector Lab, Burlingame, USA)

CD4 pozitivní buňky, 30. den po transplantaci

CRYO-ALO



COLD-ALO



Obr.21

CRYO-ALO – nejvyšší infiltrace CD4+ buňkami byla zachycena v adventiciální vrstvě zejména v oblasti sousedících s svalovou vrstvou aortální stěny.

COLD-ALO – hyperplastická tunica intima chladem konzervovaných aloštěpů vykazovala značnou infiltrace CD4+ buňkami. Nejvyšší infiltrace aortální stěny CD4+ buňkami byla zachycena v adventiciální vrstvě v oblastech těsně sousedících se svalovou vrstvou.

Pozitivní buňky zabarveny na hnědo.

Zvětšeno 400x.

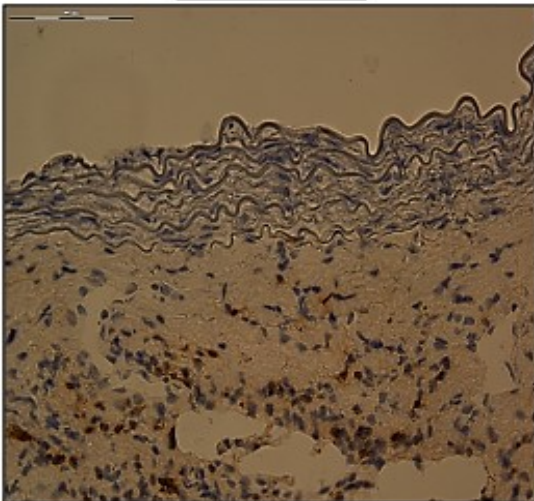
Primární protilátka: anti-CD4 (W3/25, Cymbus Biotechnology LTD, Hampshire, UK)

Sekundární protilátka: Histofine® Simple Stain Rat MAX PO (Nichirei Biosciences Inc., Japonsko)

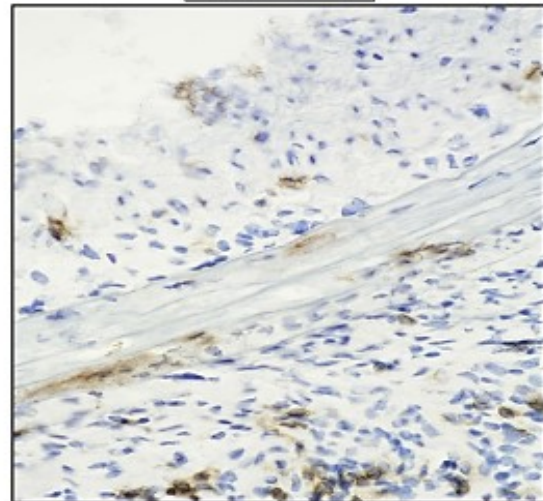
Detekční systém: Dako Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dánsko)

CD8 pozitivní buňky, 30. den po transplantaci

CRYO-ALO



COLD-ALO



Obr.22

CRYO-ALO – nejvyšší infiltrace kryokonzervovaných štěpů CD8+ buňkami byla zachycena v adventiciální vrstvě zejména v oblastech sousedících se svalovou vrstvou aortální stěny.

COLD-ALO – hyperplastická tunica intima chladem konzervovaných aloštěpů vykazovala infiltrace CD8+ buňkami. Největší infiltrace aortální stěny CD8+ buňkami byla zachycena v adventiciální vrstvě v oblastech těsně sousedících se svalovou vrstvou.

Pozitivní buňky zabarveny na hnědo.

Zvětšeno 400x.

Primární protilátka: anti-CD8 (OX-8, Cymbus Biotechnology LTD, Hampshire, UK)

Sekundární protilátka: Histofine® Simple Stain Rat MAX PO (Nichirei Biosciences Inc., Japonsko)

Detekční systém: Dako Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dánsko)

Tab.9 Histologické a imunohistologické parametry kryokonzervovaných a chladem konzervovaných aloštěpů břišní aorty 30. den po transplantaci.

Aloštěpy břišní aorty potkanů zpracované v souladu s kryokonzervačním protokolem s pomalým rozmrazováním používaným v „Programu transplantace cévních štěpů v České republice“ vykazovaly 30 dní po transplantaci významně menší známky rejekce ve všech třech základních anatomických vrstvách cévní stěny ve srovnání s aloštěpy zpracovanými v souladu s klinickým protokolem konzervace chladem používaných ve stejném transplantačním programu.

		ALOŠTĚPY 30. POD	
		KRYOKONZERVOVANÉ (CRYO-ALO)	CHLADEM KONZERVOVANÉ (COLD-ALO)
Tunica intima	Endotelová vrstva	+	+
	Intimální hyperplázie	-	+
	LEW MHC II+ buňky	-	+
	CD8+ lymfocyty	-	+
Tunica media	Nekróza svalových buněk	-	+
	IgG depozita	-	+
	Šířka tunica media (mikrometry)	75.4 ± 14.9*	61.3 ± 11.1
Tunica adventicia	CD8+ buňky	6.9 ± 5.4	59.8 ± 12.2
	CD4+ buňky	9.6 ± 6.5	108.8 ± 24.0

* Šířka mediální vrstvy kryokonzervovaných aloštěpů břišní aorty byla signifikantně vyšší (P <0,05) než u alograftů skladovaných v chladu.

4.3.3. Srovnání koncentrace donor specifických protilátek proti MHC antigenům I. a II. třídy v sérech příjemců kryokonzervovaných a chladem konzervovaných aloštěpů břišní aorty na 30. den po transplantaci.

Séra příjemců kryokonzervovaných i chladem konzervovaných aloštěpů vykazovala 30. den po transplantaci významně vyšší inhibici vazby fluoresceinem značených protilátek proti MHC antigenům I. třídy na dárcovské splenocyty ve srovnání s předoperačními hodnotami. U protilátek proti MHC antigenům II. třídy jsme statisticky vyšší inhibici vazby fluorescenčně značených protilátek na dárcovské splenocyty ve srovnání s předoperačními hodnotami pozorovali pouze u příjemců chladem konzervovaných aloštěpů břišní aorty (Tab.10).

Tab.10 Procento naměřeného fluorescenčního signálu po smísení klidových splenocytů potkanů kmene Brown-Norway s vyšetřovaným sérem Lewis příjemců kryokonzervovaných (CRO-ALO) a chladem konzervovaných (COLD-ALO) aloštěpů břišní aorty a s fluoresceinem značenými protilátkami proti Brown-Norway MHC antigenům I. a II. třídy.

	MHC I. třídy		MHC II. třídy	
	Den 0	Den 30	Den 0	Den 30
KRYO - KONZERVOVANÉ (CRYO-ALO)	111 ±7 %	47±19 %*	101±42 %	66±12 %
CHLADEM KONZERVOVANÉ (COLD-ALO)	76 ±9 %	42 ±3 %*	79 ±5 %	56 ±3 %*

* P>0.05

4.4. Porovnání histologického obrazu isoštěpů břišní aorty ošetřených novým kryokonzervačním protokolem s pomalým rozmrazováním (CRYO-ISO) a isoštěpů ošetřených klinickým protokolem pro uchovávání v chladu (COLD-ISO)

Protokol používaný v „Programu transplantace cévních štěpů v České republice“ pro zpracování chladem konzervovaných tepenných aloštěpů byl upraven do experimentálních podmínek a byl podrobně popsán v naší předchozí publikaci (Matia et al., 2007). Původní základní data experimentu s chladem konzervovanými isoštěpy břišní aorty jsme porovnali se základními daty našeho současného experimentu. Na oba experimenty dohlížel stejný hlavní řešitel. (Priv.-Doz. MUDr. habil. Ivan Matia, Ph.D.)

Původní skupinu chladem konzervovaných isoštěpů břišní aorty jsme pro potřeby srovnávání a statistického zpracování označili v současném experimentu jako skupinu COLD-ISO (dárci isoštěpů byly potkani kmene Lewis, příjemci isoštěpů byly potkani kmene Lewis (N = 4) o hmotnosti 290 až 330 g).

4.4.1. Srovnání obou konzervačních protokolů isoštěpů z hlediska jednotlivých časů studené ischemie

4.4.1.1. Časové intervaly kryokonzervačního protokolu s pomalým rozmrazováním u isoštěpů břišní aorty

Podrobné definice a trvání každé časové periody kryokonzervace i pomalého rozmrazování isoštěpů jsou shrnuty v tab. 6.

Průměrná doba studené ischemie isoštěpů břišní aorty před zmrazením byla 3 hodiny a 12 minut. Isoštěpy byly poté uloženy v DMSO roztoku po průměrnou dobu 40 minut (fáze DMSO). Průměrná doba samotného procesu kryokonzervace isoštěpů byla 2 hodiny a 38 minut (fáze kryokonzervace). Isoštěpy pak byly skladovány v parách kapalného dusíku v průměru 172 dnů. Průměrná doba pomalého rozmrazování byla 1 hodina a 33 minut. Průměrná doba mezi vložení rozmrazených aortálních isoštěpů do roztoku Custodiolu a reperfuzí štěpů u příjemce (doba studené ischemie isoštěpu po rozmrazení) byla 2 hodiny. Průměrná celková doba studené ischemie kryokonzervovaných isoštěpů břišní aorty (před zmrazením a po rozmrazení) tak byla 5 hodin a 12 minut.

4.4.1.2. Časové intervaly protokolu chladem konzervovaných isoštěpů břišní aorty

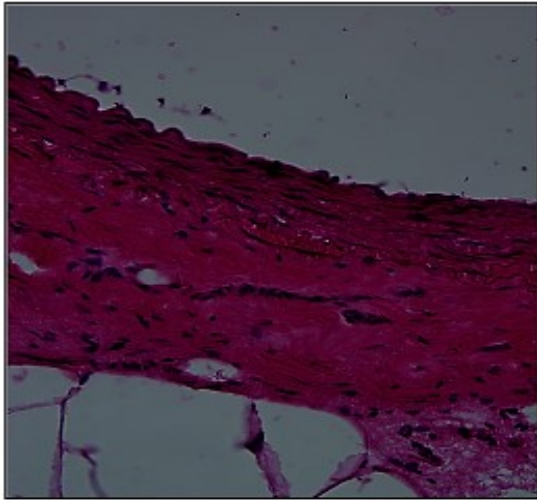
Celková doba studené ischemie chladem konzervovaných isoštěpů břišní aorty byla v průměru 33 hodin a 41 minut (minimálně 20 hodin 40 minut, maximálně 47 hodin 10 minut).

4.4.2. Srovnání histologického obrazu kryokonzervovaných a chladem konzervovaných isoštěpů břišní aorty 30. den po transplantaci

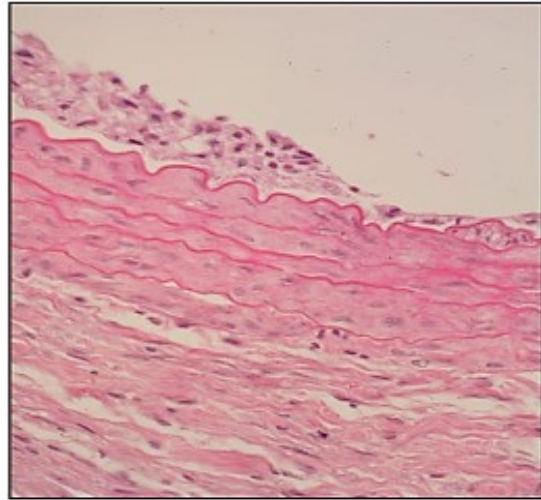
Kryokonzervované i chladem konzervované isoštěpy břišní aorty vykazovaly 30. den po transplantaci pravidelnou morfologii aortální stěny s jasnou diferenciací všech tří základních anatomických vrstev. (Obr. 23) Tunica intima u kryokonzervovaných i chladem konzervovaných isoštěpů byla pokryta jednou vrstvou endotelových buněk. (Obr. 24) Znamky intimální hyperplázie jsme pozorovali jenom v histologickém obraze chladem konzervovaných isoštěpů. V tunica media obou skupin jsme nepozorovali žádné známky nekróz nebo ukládání imunoglobulinu G. Mezi skupinami jsme nepozorovali ani statisticky významné rozdíly v šířce tunica media. V tunica adventitia obou typů štěpů jsme pozorovali mírnou infiltraci CD4 i CD8 pozitivními buňkami. Tato infiltrace byla ale u kryokonzervovaných isoštěpů statisticky nižší ($P < 0,05$) ve srovnání s chladem konzervovanými isoštěpy. (Tab. 11)

Hematoxilin-eosin, 30. den po transplantaci

CRYO-ISO



COLD-ISO



Obr.23

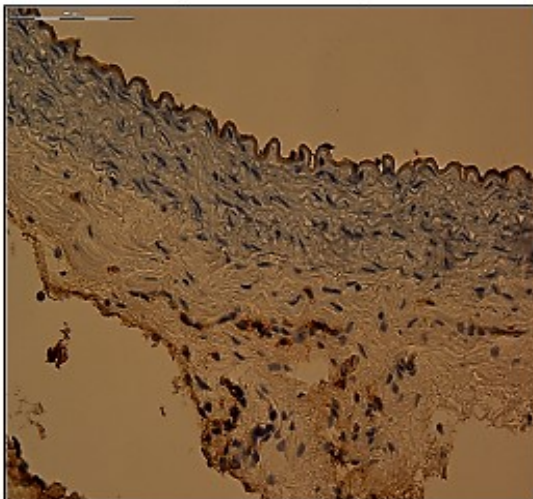
CRYO-ISO – kryokonzervované isoštěpy vykazovaly pravidelnou morfologii aortální stěny s jasnou diferenciací všech tří základních anatomických vrstev. Nepozorovali jsme známky intimální hyperplázie.

COLD-ISO – chladem konzervované isoštěpy vykazovaly pravidelnou morfologii aortální stěny s jasnou diferenciací všech tří základních anatomických vrstev. Štěpy ale vykazovaly mírný stupeň intimální hyperplázie.

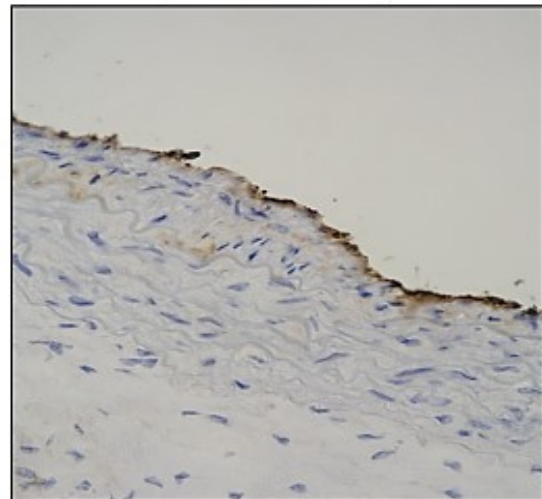
Zvětšeno 400x.

Endotelové buňky, 30. den po transplantaci

CRYO-ISO



COLD-ISO



Obr. 24

CRYO-ISO – Tunica intima u kryokonzervovaných isoštěpů byla pokryta jednou vrstvou endotelových buněk a nevykazovala žádné známky hyperplázie.

COLD-ISO – Intraluminální povrch tunica intima chladem konzervovaných isoštěpů byl pokryt souvislou vrstvou endotelových buněk. Štěpy vykazovaly známky mírné intimální hyperplázie.

Endotelové buňky zabarveny na hnědo.

Zvětšeno 400x.

Primární protilátka: anti-Von Willebrand factor (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark)

Sekundární protilátka: Histofine® Simple Stain Rat MAX PO (Nichirei Biosciences Inc., Japan)

Detekční systém: Dako Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark)

Tab.11 Histologické a imunohistologické parametry kryokonzervovaných a chladem konzervovaných isoštěpů břišní aorty 30. den po transplantaci.

Isoštěpy břišní aorty potkanů zpracované v souladu s kryokonzervačním protokolem s pomalým rozmrazováním vykazovaly ve srovnání s chladem konzervovanými isoštěpy 30. den po jejich transplantaci signifikantně nižší známky aktivace imunitního systému příjemce.

		ISOŠTĚPY 30. POD	
		KRYOKONZERVOVANÉ (CRYO-ISO)	CHLADEM KONZERVOVANÉ (COLD-ISO)
Tunica intima	Endotelová vrstva	+	+
	Intimální hyperplázie	-	+
Tunica media	Nekróza svalových buněk	-	-
	IgG depozita	-	-
	Šířka tunica media (mikrometry)	79.3 ± 15.4	80.2 ± 14.2
Tunica adventicia	CD8+ buňky	2.2 ± 2.7*	9.6 ± 7.1
	CD4+ buňky	3.9 ± 2.6*	25.3 ± 8.8

* Celkové množství CD4-pozitivních a CD8-pozitivních buněk v adventiciální vrstvě kryokonzervovaných isograftů břišní aorty bylo významně nižší (P <0,05) než množství pozorované u chladem konzervovaných isograftů.

5. DISKUSE

V předložené experimentální práci jsme zkoumali vliv nového standardizovaného klinického kryokonzervačního protokolu s pomalým rozmrazováním používaným v „Programu transplantace cévních štěpů v České republice“ na akutní rejekci kryokonzervovaných aloštěpů břišní aorty na modelu laboratorního potkana.

Při použití tohoto protokolu jsme aloštěpy břišní aorty po jejich odběru a krátké době studené ischemie kryokonzervovali kontrolovaným pomalým procesem. Štěpy jsme následně uchovávali půl roku v parách tekutého dusíku. Při jejich rozmrazování jsme použili protokol s pomalým spontánním rozmrazováním s následnou krátkou studenou ischemií. Při použití tohoto protokolu byly aloštěpy břišní aorty uloženy během obou fází studené ischemie v moderních kryokonzervačních roztocích, které jsou standartně používány při orgánových transplantacích.

Takto zpracované štěpy břišní aorty jsme následně transplantovali alogenním i isogenním příjemcům, explantovali 30. pooperační den a vyšetřili histologickými a imunohistochemickými metodami se zaměřením na typické známky akutní rejekce ve všech základních vrstvách aortální stěny. Tyto sledované parametry jsme porovnali jednak mezi isogenními a alogenními kryokonzervovanými štěpy a jednak mezi kryokonzervovanými a chladem konzervovanými štěpy z našeho předchozího experimentu.

Kryokonzervované aloštěpy břišní aorty vykazovaly 30. den po transplantaci jen velmi nízké známky imunitně zprostředkované destrukce cévní stěny. Naproti tomu chladem konzervované aloštěpy břišní aorty vykazovaly statisticky vyšší aktivaci imunitního systému příjemce s významnými známkami rejekce ve všech třech základních vrstvách cévní stěny.

Nejdůležitějšími faktory mající vliv na kvalitu a imunogenicitu tepen v době před začátkem jejich kryokonzervace jsou vlastnosti konzervačního roztoku a doba trvání studené ischemie (Rodríguez et al., 2012). V literatuře bylo popsáno, že dlouhá doba studené ischemie vedla k významnému poškození cévní stěny s tím, že endoteliální buňky jsou nejvíce náchylné na délku jejího trvání (Pascual et al., 2002). Knight a kol. prokázali u potkanů, že 24 hodin trvající doba studené ischemie vedla jak u isotransplantátů, tak i alotransplantátů 4 týdny po transplantaci k přetrvávajícím známkám poškození cévní stěny (Knight et al., 2003).

V našem experimentu byly časy studené ischemie před zmrazením aloštěpů břišní aorty 3–4 hodiny. Kryokonzervované štěpy jsme uložili bezprostředně po jejich získání do vychlazeného konzervačního roztoku používaného ke konzervaci solidních orgánů. Je velmi pravděpodobné, že tato velmi krátká doba studené ischemie vedla k významně nižšímu poškození

endotelu kryokonzervovaných štěpů před transplantací s následnou minimální intimální reakcí pozorovanou 30. den po transplantaci.

Rychlé rozmrazení ve vodní lázni o teplotě 37 ° C je zmiňováno ve většině nedávno publikovaných klinických prací jako standartní metoda rozmrazování kryokonzervovaných arteriálních aloštěpů (Antonopoulos et al., 2019). Nedávné experimentální studie však potvrdily vysoký rozsah poškození morfologie stěny takto rozmrazených cévních štěpů (Buján et al., 2001, Novotný et al., 2017). Protokol, při kterém byly aloštěpy rozmrazovány v pomalém kontrolovaném režimu vedl naopak jen k minimální imunitní odpovědi ve srovnání s imunitní odpovědí, kterou indukovali chladem konzervované aloštěpy břišní aorty (Rodríguez et al., 2012). V uvedeném experimentu byly kryokonzervované štěpy břišní aorty přeneseny ze skladovacího do rozmrazovacího zařízení, kde probíhal automatický pomalý proces rozmrazování s poklesem teploty o 1 ° C / minutu až do dosažení pokojové teploty. V dalším kroku byl původně použitý kryoprotektant odstraněn vymýváním štěpu v postupně rostoucích ředěních.

Tento způsob pomalého kontrolovaného rozmrazování však není vhodný pro klinické využití na operačním sále během přípravy kryokonzervovaných tepenných aloštěpů k transplantaci. V klinické praxi při použití kryokonzervovaného tepenného štěpu nejdříve štěpy rozmrazujeme v ledničce během 2hodin a následně štěpy ukládáme do vychlazeného konzervačního roztoku až do doby jejich implantace (Špaček et al., 2018).

Zvýšená regulace a exprese antigenů hlavního histokompatibilního komplexu v důsledku ischemického poškození štěpů nebo vlastním procesem kryokonzervace s rychlým rozmrazením vedoucím ke vzniku mikrofraktur může vést ke zvýšení imunogenicity arteriálních aloštěpů. A to pravděpodobně zejména v případech, kdy mikrofraktury zasahují až do mediální vrstvy tepen (Buján et al., 2001). Tyto antigeny spouštějí silnou produkci aloprotilátek proti MHC antigenům I. a II. třídy, která vede k apoptóze hladkých svalových buněk s destrukcí svalové vrstvy (Thaunat et al., 2006). Mediální vrstva aloštěpů břišní aorty ošetřených naším novým kryokonzervačním protokolem s pomalým rozmrazováním nevykazovala 30 dní po transplantaci žádné známky destrukce detekovatelné světelnou mikroskopií, žádné ukládání protilátek třídy G a žádné "svráštění". Tyto známky hlubokého poškození cévní stěny procesem kryokonzervace a následného rychlého rozmrazení mohou vést, kromě uvedené zvýšené imunogenicity a rejekce i k fatální ruptuře štěpu na podkladě prostého poškození jeho mechanických vlastností (Pukacki et al., 2000). Zvýšení imunogenicity s následnou rejekcí vedou pravděpodobně v klinické praxi pozorovaným pozdním komplikacím použití tepenných aloštěpů jako jsou aneurysmata, pseudoaneurysmata a pozdní ruptury cévních alotransplantátů (Rodríguez et al., 2012).

Statisticky vyšší koncentrace donor specifických protilátek ve srovnání s předoperačními hodnotami u příjemců kryokonzervovaných aloštěpů jsme pozorovali pouze u protilátek MHC I. třídy. Antigeny MHC II. třídy jsou exprimovány na imunologicky aktivovaných endoteliálních buňkách a buňkách hladkého svalstva (Lou et al., 1996). Je tedy možné, že náš kryokonzervační protokol s pomalým rozmrazováním inhiboval zvýšenou regulaci a expresi antigenů hlavního histokompatibilního komplexu v buňkách hladkého svalstva v průběhu prvních 30 dnů po transplantaci. Tuto hypotézu podporuje i absence ukládání IgG protilátek ve svalové vrstvě kryoštěpu ve sledovaném období. Účinek pozorované zvýšené produkce donor specifických protilátek proti MHC antigenům I. třídy na další průběh rejekce kryokonzervovaných aloštěpů však z našeho experimentu není jasný. Zkoumání tohoto účinku si vyžaduje nový experiment s delší dobou přežívání příjemců tepenných aloštěpů.

Určitým limitem předložené práce je vzájemné srovnání parametrů kryokonzervovaných štěpů ze současného experimentu s parametry chladem konzervovaných tepenných aloštěpů z našeho minulého experimentu. Příjemcovská zvířata kryokonzervovaných štěpů břišní aorty měli v naší studii menší hmotnost a nižší věk ve srovnání s příjemci chladem konzervovaných štěpů. Zjistili jsme však, že rozdíly v dopadu na rejekci aloštěpu břišní aorty mezi oběma konzervačními protokoly jsou mnohem výraznější, než jsme očekávali. K definitivnímu potvrzení našich pozorování jsou ale nutné další experimenty s přímým porovnáním obou konzervačních protokolů používaných v „Programu transplantace cévních štěpů v České republice“.

6. ZÁVĚR

Naše experimentální studie prokázala, že aloštěpy břišní aorty potkanů zpracované kryokonzervačním prokolem s pomalým rozmrazováním používaným v „Programu transplantace cévních štěpů v České republice“ vykazovaly v průběhu prvního měsíce po transplantaci jen minimální známky akutní rejekce a ve srovnání s isoštěpy nevykazoval jejich histologický obraz výrazné rozdíly. Navíc, kryokonzervované aloštěpy vykazovaly výrazně nižší imunogenicitu ve srovnání s chladem konzervovanými aloštěpy břišní aorty zpracovanými protokolem používaným ve stejném klinickém programu. K potvrzení tohoto pozorování jsou ale zapotřebí experimenty s přímým srovnáním obou typů konzervačních protokolů. V klinické praxi mohou totiž jejich pozitivní výsledky ovlivnit indikační kritéria a imunosupresivní terapii ve zmiňovaném „Programu transplantace cévních štěpů v České republice“.

7. LITERATURA

1. Antonopoulos CN et al. Cryopreserved Allografts for Arterial Reconstruction after Aorto-Iliac Infection. A Systematic Review and Meta-Analysis. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1 (2019), 120–128.
2. Bia D. et al. Femoral arteries energy dissipation and filtering function remain unchanged after cryopreservation procedure. *Transpl. Int.* 12 (2005), 1346–55.
3. Bode E. et al. Uber die transplantation freier und konservierter Gefasse. *Beitr. Klin. Chir.* 66 (1910), Heft 1.
4. Boren C.H. et al. Maintenance of viable arterial allografts by cryopreservation. *Surgery.* 4 (1978), 382–91.
5. Brockbank T.M. et al. Quantitative analyses of vitrified autologous venous arterial bypass graft explants. *Cell Preserv. Technol.* 5 (2007), 68–76.
6. Buján J. et al. Gradual thawing improves the preservation of cryopreserved arteries. *Cryobiology.* 4 (2001), 256–65.
7. Carrel A. et al. Latent life of arteries. *J Exp Med.* 12 (1910), 460–86.
8. Gabriel M. et al. The influence of cryopreservation on changes in diameter and compliance of allografts in an animal experimental model. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2 (2006), 169–75.
9. Gabriel M. et al. Cryopreserved arterial allografts in the treatment of prosthetic graft infections. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 6 (2004), 590–6.
10. Giglia J.S. et al. Cryopreservation Prevents Arterial Allograft Dilation. *Ann Vasc Surg.* 6 (2002), 762–767.
11. Gu S. et al. Abdominal aorta transplantation after programmed cryopreservation. *World J Gastroenterol.* 10 (2004), 555.
12. Gui L. et al. Development of Decellularized Human Umbilical Arteries as Small-Diameter Vascular Grafts. *Tissue Eng Part A.* 9 (2009), 2665–2676.
13. Harlander-Locke MP et al. The use of cryopreserved aortoiliac allograft for aortic reconstruction in the United States. *J Vasc Surg.* 3 (2014), 669-74.
14. Hunt C.J. et al. Fractures in Cryopreserved Arteries. *Cryobiology.* 5 (1994), 506–515.
15. Chakfé N. et al. European Society for Vascular Surgery (ESVS) 2020 Clinical Practice Guidelines on the Management of Vascular Graft and Endograft Infections. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 3 (2020), 339-384.

16. Chiesa R. et al. Fresh and cryopreserved arterial homografts in the treatment of prosthetic graft infections: experience of the Italian Collaborative Vascular Homograft Group. *Ann Vasc Surg.* 12 (1998), 457–62.
17. Knosalla C. et al. Treatment of vascular graft infection by in situ replacement with cryopreserved aortic allografts: an experimental study. *J Vasc Surg.* 4 (1998), 689–98.
18. Knight RJ et al. Cold ischemic injury, aortic allograft vasculopathy, and proinflammatory cytokine expression. *J Surg Res.* 2 (2003), 201–7.
19. Kreitmann B. et al. Growth potential of aortic autografts and allografts: effects of cryopreservation and immunosuppression in an experimental model. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 11 (1997), 943–52.
20. Lejay A. et al. Cryopreserved Cadaveric Arterial Allograft for Arterial Reconstruction in Patients with Prosthetic Infection. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 5 (2017), 636-644.
21. Lesèche G. et al. Long-term results of cryopreserved arterial allograft reconstruction in infected prosthetic grafts and mycotic aneurysms of the abdominal aorta. *J Vasc Surg.* 4 (2001), 616–622.
22. Lin C.-H. et al. In Vivo Performance of Decellularized Vascular Grafts: A Review Article. *Int J Mol Sci.* 7 (2018), 2101.
23. Lou H et al. Inhibition of Transplant Coronary Arteriosclerosis in Rabbits by Chronic Estradiol Treatment Is Associated With Abolition of MHC Class II Antigen Expression. *Circulation.* 12 (1996), 3355–3361.
24. Matia I. et al. Delayed administration of FK 506 is sufficient to suppress acute rejection changes after aortal transplantation in rats. *Transpl. Int.* 4 (2007), 371–80.
25. Měříčka P. et al. Cryopreservation of vascular grafts for clinical use Retrospective analysis of pre-freezing factors with potential impact on the quality and safety of vascular transplantations. *Cryobiology.* 3 (2015), 546–547.
26. Měříčka P. et al. Organizace a chirurgická technika odběru tkání v rámci multiorgánového odběru. Odběry orgánů k transplantaci – Odběry orgánov na transplantátě: Prague, Czech Republic. Karolinum Press. (2011), 240–251.
27. Měříčka P. et al. Legislativa dárcovství a odběrů tkání v České republice. Odběry orgánů k transplantaci – Odběry orgánov na transplantátě: Prague, Czech Republic. Karolinum Press. (2011), 223–239.
28. Moher D. L. A. et al. PRISMA Group Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses. the PRISMA statement *Plos Med.* 7 (2009).

29. Moriyama S. et al. Antigenicity of cryopreserved arterial allografts: comparison with fresh and glutaraldehyde treated grafts. *ASAIO J.* 3 (2001), 202–5.
30. Motomura N. et al. Histological change in cryopreserved rat aortic allograft. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 1 (1995), 53–60.
31. Nataf P. et al. Cryopreserved small-diameter arterial allografts for arterial by-pass procedures: an experimental study. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 1 (1995), 79–85.
32. Nataf P. et al. Evaluation of cryopreserved arteries as alternative small vessel prostheses. *Int J Artif Organs*. 4 (1995), 197–202.
33. Nishizaki K. et al. Evaluation of rat arterial allograft viability by measuring cytokine mRNA using real-time quantitative PCR. *Transplant Proc.* 1 (2003), 96–8.
34. Novotny R. et al. Cryopreserved human aortic root allografts arterial wall: Structural changes occurring during thawing. *PLoS One*. 12(4) (2017).
35. O'Connor S. et al. A systematic review and meta-analysis of treatments for aortic graft infection. *J Vasc Surg.* 1 (2006), 38-45.
36. Olmos-Zúñiga J.R. et al. Lyophilized allografts without pre-treatment with glutaraldehyde are more suitable than cryopreserved allografts for pulmonary artery reconstruction. *Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. Medicas e Biol.* 2 (2016).
37. Pascual G. et al. Long-term behaviour of cryopreserved arterial grafts versus prosthetic micrografts. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 4 (2004), 423–31.
38. Pascual G. et al. The use of ischaemic vessels as prostheses or tissue engineering scaffolds after cryopreservation. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1 (2002), 23–30.
39. Páral J. et al. Příspěvek ke konzervaci žilních štěpů. *Rozhl Chirurgie.* 79 (2000), 244–249.
40. Pegg D. E. et al. Fractures in Cryopreserved Elastic Arteries. *Cryobiology.* 2 (1997), 183–192.
41. Post Ivo C. J. H. et al. A systematic Review and Meta-Analysis on the Management of Open Abdominal Aortic Graft Infections. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2 (2019), 258-281.
42. Pukacki F. et al. The Mechanical Properties of Fresh and Cryopreserved Arterial Homografts. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1 (2000), 21–24.
43. Rodríguez M. et al. Immune response to the long-term grafting of cryopreserved small-diameter arterial allografts. *Histol Histopathol.* 7 (2012), 873–84.
44. Saito A. et al. Cryopreservation does not alter the antigenicity and development of vasculopathy in post-transplant rat aortas. *Cryobiology.* 2 (2006), 251–60.
45. Slim K. et al. Methodological index for non-randomized studies (MINORS): development and validation of a new instrument: *ANZ J Surg.* 9 (2009), 712-716.

46. Solanes N. et al. Effects of cryopreservation on the immunogenicity of porcine arterial allografts in early stages of transplant vasculopathy. *Cryobiology*. 2 (2005),130–41.
47. Song Y.C. et al. Cryopreservation of the Common Carotid Artery of the Rabbit: Optimization of Dimethyl Sulfoxide Concentration and Cooling Rate. *Cryobiology*. 10 (1995), 405–421.
48. Špaček M. et al. Organization model for allotransplantations of cryopreserved vascular grafts in Czech Republic. *Cell Tissue Bank*. 3 (2018), 437–445.
49. Špaček M. et al. Comparison of Different Thawing Protocols in Human Cryopreserved Venous Grafts. *Ann Vasc Surg*. 4 (2020), 347-354.
50. Špaček M. et al. Current vascular allograft procurement, cryopreservation and transplantation techniques in the Czech Republic. *Adv Clin Exp Med*. 4 (2019), 529-534.
51. Teebken O. et al. Cryopreserved Arterial Allografts for In situ Reconstruction of Infected Arterial Vessels. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 6 (2004), 597–602.
52. Thauat O et al. Direct and Indirect Effects of Alloantibodies Link Neointimal and Medial Remodeling in Graft Arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 10 (2006), 2359–2365.
53. Touma J. et al. In situ reconstruction in native and prosthetic aortic infections using cryopreserved arterial allografts. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 3 (2014), 292-9.
54. Van Herck H. et al. Orbital sinus blood sampling in rats as performed by different animal technicians: the influence of technique and expertise. *Lab Anim*. 4 (1998), 377-386.
55. Vogt PR et al. Cryopreserved arterial allografts in the treatment of major vascular infection: A comparison with conventional surgical techniques. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 6 (1998), 965–972.
56. Vogt P.R. et al. In situ repair of aortobronchial, aortoesophageal, and aortoenteric fistulae with cryopreserved aortic homografts. *J Vasc Surg*. 1 (1997), 11–7.
57. Williams C. et al. Altered structural and mechanical properties in decellularized rabbit carotid arteries. *Acta Biomater*. 5 (2009), 993–1005.

8. VLASTNÍ PUBLIKAČNÍ AKTIVITA

Publikace s IF k tématu dizertační práce:

Hruby J, Spunda R, Mericka P, Mlcek M, Pecha O, Splith K, Schmelzle M, Krenzien F, Lindner J, Spacek M Matia I. Influence of the new standardized clinical cryopreservation/slow thawing protocol on immunogenicity of arterial allografts in rats. PLoS One. 2020 IF 2.776 (2019)

Špaček M, Měříčka P, Janoušek L, Dalecká M, Benda A, Krs O, Slížová D, Špunda R, Hrubý J, Matia I, Honegrová B, Lindner J. Comparison of Different Thawing Protocols in Human Cryopreserved Venous Grafts. Ann Vasc Surg. 2019 Nov 16. pii: S0890-5096(19)30990-2. IF 1.179 (2018)

Spunda R, Hruby J, Mericka P, Mlcek M, Pecha O, Splith K, Schmelzle M, Krenzien F, Lindner J, Matia I, Spacek M Immunosuppressive protocols with tacrolimus after cryopreserved aortal allotransplantation in rats. PLoS One. 2018 Aug 9;13(8):e0201984. IF 2.776 (2018)

Špunda R., Hrubý J., Adamec M., Varga M., Lindner J., Špaček M., Matia I. Cold stored arterial allografts for in-situ reconstruction of infected prosthetic grafts: Review of immunosuppressive protocols used in clinical practice. European Surgery-Acta Chirurgica Austriaca. 2016, 48(Supplement 2), 166-168. ISSN 1682-8631. IF 0.287 (2016)

Hrubý J., Špunda R., Adamec M., Varga M., Lindner J., Špaček M., Matia I. Influence of cryoconservation on antigenicity of arterial allografts – review. European Surgery-Acta Chirurgica Austriaca. 2016, 48(Suppl 3) s192-s193. ISSN 1682-8631. IF 0.287 (2016)

Publikace v časopisech s IF (spoluautor):

Mitas P, Vejrazka M, Hrubý J, Spunda R, Pecha O, Lindner J, Spacek M. Prediction of compartment syndrome based on analysis of biochemical parameters. *Ann Vasc Surg.* 2014 Jan;28(1):170-7.

Lewis SC, Warlow CP, Bodenham AR, Colam B, Rothwell PM, Torgerson D, Dellagrammaticas D, Horrocks M, Liapis C, Banning AP, Gough M, Gough MJ. General anaesthesia versus local anaesthesia for carotid surgery (GALA): a multicentre, randomised controlled trial. GALA Trial Collaborative Group, *Lancet.* 2008 Dec 20;372(9656):2132-42. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61699-2. Epub 2008 Nov 27. IF 28.409 (2008)

Publikace v recenzovaných časopisech, bez IF (1. autor):

Hrubý J, Novotný R, Spaček M, Mitáš P, Hlubočký J, Janák D, Povýšil C, Lindner J. Surgical extirpation of glomus tumor from rare localization on the upper extremity. *Case Rep Vasc Med.* 2013;2013:570945.

Hrubý J, Semrád M, Vidim T, Mitáš P, Dostál O, Skalická L, Lindner J. [Outcomes of combined surgical and endovascular treatment of the venous thoracic outlet syndrome during 2000-2007 in the IInd Surgical Clinic of the VFN (General Faculty Hospital) and 1. LF UK (First Medical Faculty, Charles University) in Prague]. *Rozhl Chir.* 2010 Jan;89(1):69-72

Publikace v recenzovaných časopisech, bez IF (spoluautor):

Grus T, Mitáš P, Lukáč P, Hrubý J, Lindner J, Grusová G, Lambert L. Branched pedal bypass in the treatment of critical limb ischemia - a single center experience. *Rozhl Chir.* 2018;97(11):509-513

Špaček M., Mitáš P., Hrubý J., Špunda R., Měřička P., Lambert L., Lindner J. Composite venous allograft for femoro-pedal bypass grafting in critical limb ischaemia. *Cor et Vasa.* 2018, 60(3), E317-E320.

Novotný R., Lesenský J., Hrubý J., Hlubocký J., Mitáš P., Lindner J. Chondrosarcoma resection followed by a branched crural revascularization of the right calf.: Case report. *Case Rep Vasc Med*

Rob D, Ručka D, Chochola M, Karetová D, Hrubý J, Kusová E, Lubanda JC. [A rare case of mobile atherosclerotic plaque with a high embolic potential in the femoral artery]. *Vnitr Lek.* 2016 Jan;62(1):52-6. Review. Czech.

Novotný R, Mitáš P, Hlubocký J, Hrubý J, Slautin A, Špunda R, Lindner J. Juxtarenal Modular Aortic Stent Graft Infection Caused by *Staphylococcus aureus*. *Case Rep Vasc Med.* 016;2016:7597265.

Novotný R, Slavíková M, Hlubocký J, Mitáš P, Hrubý J, Lindner J. Basilic Vein Transposition Used as a Tertiary Vascular Access for Hemodialysis: 15 Years of Experience. *Open J Cardiovasc Surg.* 2016 Feb 1;8:1-4

Slais M, Mitáš P, Semrád M, Hrubý J, Lindner J, Stádler P. Multiple sequence revascularization of infrapopliteal arteries in the management of critically ischemic extremity. *Rozhl Chir.* 2010 Jan;89(1):59-63.

9. PŘÍLOHY

9.1. Příloha I

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

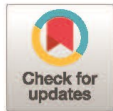
Influence of the new standardized clinical cryopreservation/slow thawing protocol on immunogenicity of arterial allografts in rats

Jan Hruby¹, Rudolf Spunda¹, Pavel Mericka², Mikulas Mlcek³, Ondrej Pecha⁴,
Katrín Splith^{5,6}, Moritz Schmelzle^{5,6}, Felix Krenzien^{5,6}, Jaroslav Lindner⁷,
Miroslav Spacek^{1‡}, Ivan Matia^{7,8†*}

1 2nd Department of Surgery—Department of Cardiovascular Surgery, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Czech Republic, 2 Tissue Bank, Faculty Hospital Hradec Kralove, Charles University- Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic, 3 Institute of Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic, 4 Technology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic, 5 Department of Surgery, Campus Charité Mitte and Campus Virchow-Klinikum, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, 6 Translational Centre for Regenerative Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany, 7 Department of Cardio-Vascular Surgery, Nord Hospital and Karl Landsteiner Institute for Cardio-Vascular Research, Vienna, Austria, 8 Teaching Center, Medizinische Universität Wien, Vienna, Austria

‡ Joint Senior Authors

* ivanmatia@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Hruby J, Spunda R, Mericka P, Mlcek M, Pecha O, Splith K, et al. (2020) Influence of the new standardized clinical cryopreservation/slow thawing protocol on immunogenicity of arterial allografts in rats. *PLoS ONE* 15(3): e0230234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230234>

Editor: Raffaele Serra, University Magna Graecia of Catanzaro, ITALY

Received: December 20, 2019

Accepted: February 25, 2020

Published: March 10, 2020

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230234>

Copyright: © 2020 Hruby et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Abstract

Objectives and design

At the present time there are two waiting list for patients with vascular prosthetic infection indicated for arterial transplantation in the Czech Republic. The inclusion of each patient for cold-stored or cryopreserved arterial transplantation is the preference of indicating surgeon. In this experimental work we studied the immunogenicity of rat aortal allografts treated by our new clinical cryopreservation/slow thawing protocol.

Material and methods

Brown-Norway (BN) (N = 6, 203–217 g) or Lewis (LEW) (N = 6, 248–254 g) abdominal aortal grafts treated in accordance with our new clinical cryopreservation/slow thawing protocol were orthotopically transplanted to Lewis recipients (N = 12, 191–245 g). Aortal wall histology and infiltration by recipient immune cells, as well as donor specific anti MHC class I and II antibodies in recipient serum were studied in both isografts and allografts on day 30 post-transplant. Core data of cryopreserved allografts were compared to our previous data of cold-stored aortal allografts treated in accordance with our clinical cold-storage protocol.

Results

Cryopreserved allografts showed regular morphology of aortal wall with clear differentiation of all three basic anatomical layers on day 30 posttransplant. Intimal layer showed no hyperplasia, luminal surface was covered by endothelial cells. No statistical difference was observed in tunica media thickness between isografts and allografts. The medial layer

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

showed no necrosis, shrinkage or immunoglobuline G deposition in any experimental group. The adventitial infiltration by immune cells was significantly higher ($P < 0.05$) in allografts. Cryopreserved allografts showed significant lower activation of both cell- and antibody mediated immunity compared to historical data of cold-stored allografts.

Conclusion

Aortal wall histology of rat allografts treated by our new standardized clinical cryopreservation/slow thawing protocol was comparable to that of the cryopreserved isografts on day 30 posttransplant. The immunogenicity of cryopreserved aortal allografts was significantly lower compared to that of cold-stored aortal allografts.

Introduction

Incidence rates of aortic grafts infection in patients after primary aortic surgery in the current endovascular era is considerable [1]. Major aortic graft infection is a life-threatening complication with high mortality and morbidity rates [2,3]. One of the most effective treatment modality of this devastating complication is the reoperation with replacement of an infected prosthesis by a cold-stored [4] or cryopreserved arterial allograft [5].

The recovery techniques of arterial allografts and subsequent cold-stored or cryopreservation/thawing protocols published by large vascular centers are very inhomogeneous [6,7]. The different properties of storage solutions, variation in cold ischemic time prior to implantation (cold-stored allografts) or cryopreservation, different freezing and thawing protocols are used worldwide [4–6]. All these aspects can influence the final quality of implanted arterial allografts and caused significant differences in the early and late graft-related complications [6].

In the Czech Republic, the cold stored arterial allografts are used as a substitute for infected vascular prosthesis since middle 1990s [7]. Both solid organ and cold-stored arterial transplantation programs are governed by the same legislation and managed by the “Transplantation Coordination Centre of the Czech Republic”. Therefore, the cold-stored arteries obtained during multi-organ recovery from braindead donors are stored in organ conservation solutions and must be transplanted to the patient included in the special “waiting list” within 48 hours after recovery [8].

However, cold-stored allografts were not in sufficient abundance for all the patients on the waiting list. Therefore, the clinical cryopreserved arterial transplantation program was started in 2011. All of arterial allografts included to the national program are processed exclusively in the Tissue Bank of The University Hospital Hradec Kralove under new standardized cryopreservation/slow thawing protocol [9].

At the present time there are two waiting list for patients indicated for arterial transplantation in the Czech Republic. The inclusion of each patient for cold-stored or cryopreserved arterial waiting list is the preference of indicating surgeon [9].

The experimental and clinical studies revealed strong antigenicity of both cold-stored and cryopreserved allografts, respectively [10,11]. This immunogenicity is responsible for late graft-related complication presented as graft dilatation, rupture or thrombosis [12]. In addition, this immunogenicity is influenced by all procedure steps in their pretransplant history [10].

Therefore the aim of our study was:

1. to transfer all steps of the new national standardized clinical cryopreservation/slow thawing protocol to the experimental settings,
2. to study acute immune reaction of rats recipients of cryopreserved arterial grafts treated by this protocol,
3. to compare the data of current cryopreservation/slow thawing experiment to data obtained previously by our cold-storage rat experiment to study the differences in immunogenicity of both cryopreserved and cold-stored aortal allografts, respectively.

Material and methods

Ethics statement

Principles of laboratory animal care were followed, and applicable national laws observed during the study. The study protocol was approved by the Committee on 1. Medical faculty of Charles University in Prague (1.LF 563/13, MSMT-14808/2014-6).

Animals

Male Brown-Norway rats (BN) (RT1ⁿ) (N = 3) weighting 203–217 g were used as donors of abdominal aortal allografts, and male Lewis rats (LEW) (RT1^l) (N = 3) weighting 248–254 g were used as donors of abdominal aortal isografts, respectively. The recipient animals of cryopreserved aortal grafts (male Lewis rats (LEW) (RT1^l)) were divided into two groups. Group CRYO-ISO was that of cryopreserved isografts (LEW to LEW, N = 6, weighting 191–250 g), group CRYO-ALLO was that of cryopreserved allografts (BN to LEW, N = 6, weighting 193–245 g).

Animals were obtained from Charles River, Germany and maintained according to the National Institute of Health guidelines. Each transplanted animal was housed in a separate cage during the entire 30-day follow-up period.

Operative procedure

All aspects of orthotopic abdominal aortic transplantation was described in details in our previous publications [13,14]. The cryopreserved aortal grafts in recent experiment were transplanted by the same anesthesiological and surgical techniques used previously in our cold-stored aortal grafts experiment. Both experiments were supervised by the same principal investigator (I.M.). Briefly, a 2–2.5 cm long segment of the infrarenal aorta was excised, prepared and stored in accordance to cryopreservation protocol. Cryopreserved aortal grafts were implanted orthotopically into the recipient's infrarenal aorta after a midline laparotomy using a 10/0 mono-filament interrupted suture. No anticoagulants or anti-platelet drugs were used in recipients during the 30-day follow-up period.

Protocol of cryopreservation

The new clinical cryopreservation/slow thawing protocol was modified to experimental operating room conditions of Institute of Physiology of 1st Medical faculty at the Charles University in Prague.

The all donor animals of each experimental group (CRYO-ISO (N = 3) and CRYO-ALLO (N = 3)) were operated at once. Each abdominal aortal graft was flushed after the recovery with 2 ml of Custodiol solution (Custodiol®; Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Germany) containing 100 IU/ml of heparin and placed into 10 ml of pre-cooled Custodiol solution, thereafter. Each graft was stored at the temperature of melting ice in closed sterile certified plastic jars

(Medfor 250 ml Farnborough, UK) until finalization of all donor's operations. Thereafter, the aortal grafts were put into double sterile disposable plastic bags (CryoMACS Freezing Bag 500, Miltenyi Biotec GmbH, Germany) containing 25ml of pre-cooled 6% solution of hydroxyethylstarch m.w. 130.000 Da (Voluven 6%, Fresenius Kabi, Germany). No antibiotics were added. The content of the bag was subsequently mixed with pre-cooled 20% dimethylsulfoxide (DMSO) (WAK ChemieMedical GmbH, Germany) in the 6% hydroxyethylstarch solution (Voluven 6%, Fresenius Kabi, Germany) and each bag was closed by sealing at the sealing machine (STERISEAL B 83-R, Cevor s.r.o., Troubsko u Brna, Czech Republic). The bags were put into outer metal cassette (ST 100, Consarctic GmbH, Schölkrippen, Germany) and stored at the temperature of melting ice until the beginning of freezing process. The controlled-rate freezing by the rate of $-1\text{K}/\text{min}$ to -90°C and $-5\text{K}/\text{min}$ to -150°C was performed at the programmable freezer (Kryo-10, Planer Biomed, Sunbury on Thames, England). After completion of freezing process, the cassettes were transferred in liquid nitrogen vapour phase to the Tissue Establishment of the Institute of Haematology in Prague. The grafts were stored in this institution in liquid nitrogen vapour phase by temperature of -190°C until the day of implantation.

Protocol of thawing

The cassettes with aortal grafts were transported at the day of implantation in liquid nitrogen vapour phase from the Tissue Establishment to the operating room of Institute of Physiology. The cassettes were removed from the shipper in the operating room and placed for about 60 minutes into a refrigerator with temperature of $+4^\circ\text{C}$ and then were kept for about 30 minutes by the room temperature. Subsequently, the aortal grafts were removed from the bag and each graft was divided into two pieces of an identical length to be used in two rat recipients. After dividing each aortal graft was stored separately in 10 ml of Custodiol solution in the refrigerator with temperature of $+4^\circ\text{C}$ until the beginning of anastomosis in the recipient animal. No antibiotics were added.

Time-periods of cryopreservation and thawing

The whole process of aortal recovery, cryopreservation, storage, thawing and transplantation was divided into the six time-periods. The duration of each time-period was measured for each aortal graft separately. Detailed definitions and duration of each time-period of the cryopreservation/slow thawing protocol for each experimental group are summarized in [Table 1](#). The individual data per aortal graft are given in [S1 Table](#).

The total cold ischemic time of cryopreserved aortal grafts (pre-freezing + post-thawing cold ischemic time) was 313 ± 62 minutes for isografts and 504 ± 198 minutes for allografts, respectively. No statistical difference was observed between both groups.

Blood samples

Blood samples for determination of donor specific anti-MHC Class I and II antibodies on day 0, and day 30 in all groups were collected by orbital sinus puncture as described previously [\[13\]](#).

Aortal grafts explantation on day 30

After the blood samples collection (see above) a midline re-laparotomy was performed in anaesthetized animals. Aortal grafts were excised after the administration of heparin ($100\text{ IU}/\text{kg}$). The animals were then euthanized by intracaval administration of a lethal dose of thiopental [\[13\]](#).

Table 1. Time-periods of the cryoconservation/slow thawing procedure.

Number	Name	Time periods Definition	Cryopreserved grafts	
			CRYO-ISO	CRYO-ALLO
1	PRE-FREEZING CIT (cold ischemic time)	Time period between aortal clamp in the donor animal and insertion of aortal grafts to DMSO solution. Aortal grafts were stored in Custodiol solution at the temperature of melting ice during this period.	03:12 hours (min 02:54, max 03:28)	03:31 hours (min 01:23, max 04:45)
2	DMSO time	Time period between insertion of aortal grafts to DMSO solution and start of cryoconservation at the programmable freezer.	00:40 hours (min 00:38 max 00:42)	00:38 hours (min 00:19, max 00:48)
3	CRYO time	Time period between the start of cryoconservation of aortal grafts at the programmable freezer and insertion of cassetes to liquid nitrogen	02:38 hours	02:38 hours
4	NITROGEN time	Time period between insertion and removal of cassetes out of liquid nitrogen.	172,6 days (min 171, max 176)	179,3 days (min 176, max 181)
5	THAWING time	Time period between removal of cassetes out of liquid nitrogen vapour phase and insertion of aortal grafts to Custodiol solution.	01:33 hours (min 01:10, max 01:45)	01:25 hours (min 01:10, max 01:33)
6	POST-THAWING CIT (cold ischemic time)	Time period between insertion of aortal grafts to Custodiol solution and reperfusion of aortal graft in recipient animal.	02:00 hours (min 00:58, max 03:27)	04:53 hours (min 02:26, max 07:07)

The process of recovery, cryoconservation, storage, thawing and transplantation of cryopreserved aortal grafts was divided into six defined and measured time periods.

CRYO-ISO—cryopreserved isografts

CRYO-ALLO—cryopreserved allografts

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230234.t001>

Parameters under study

Histological and immunohistological analysis of explanted aortal grafts. All histological and immunohistological techniques used were identical to those used in cold-stored aortal grafts experiment [13]. In short, the sections for histological and immunohistological analysis were taken from the midportion of the graft. The sections were stained with a Hematoxylin-Eosin and Van Gieson with elastica stain and analyzed using Olympus DP-Soft software.

Medial thickness were measured up to 10 locations in each section. The mean value and standard deviation (SD) (mean \pm SD) were calculated for each aorta as well as animal group. The specific antibodies for detection of endothelial cells, CD4+, CD8+, Lewis MHC class II+ cells, immunoglobulins G were used for immunohistological examination of aortal grafts. Detailed specifications of antibodies and immunohistological techniques are summarized in Table 2.

The slides were scored in a blinded fashion. CD4+, CD8+ and Lewis MHC class II+ cells were counted at 10 locations at x1000 magnification. The cellularity was defined as the mean value of the cells counted.

Flow cytometry analysis of blood sample. In vitro binding of cryopreserved aortal grafts recipient sera to quiescent Brown-Norway splenocytes was determined by flow cytometry. All procedures were identical to those used previously in cold-stored aortal grafts experiment [15]. Detailed specifications of antibodies used are summarized in Table 2.

Statistical analysis. The values in the text and tables are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). Comparisons of parameters under study between experimental groups (total cold ischemic time, tunica media thickness, CD4+, CD8+, MHC II+ cells, anti MHC I and anti MHC II antibodies) were performed using the analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey HSD Multiple Comparisons test. All analyses were conducted in Stata (version 12.1).

Results

Animals

Twelve aortal grafts were successfully transplanted. All recipient animals survived the whole 30 day follow-up period.

Table 2. Detailed specifications of antibodies and immunohistological techniques used.

Histology of aortal grafts	Hematoxilin eosin	
	Van Gieson elastic stain	
Immunohistology of aortal grafts	CD4+ cells	Primary antibody: anti-CD4 (W3/25, Cymbus Biotechnology LTD, Hampshire, UK) Secondary antibody: Histofine® Simple Stain Rat MAX PO (Nichirei Biosciences Inc., Japan) Detection system: Dako Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark)
	CD8+ cells	Primary antibody: anti-CD8 (OX-8, Cymbus Biotechnology LTD, Hampshire, UK) Secondary antibody: Histofine® Simple Stain Rat MAX PO (Nichirei Biosciences Inc., Japan) Detection system: Dako Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark)
	Endothelial cells	Primary antibody: anti-Von Willebrand factor (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) Secondary antibody: Histofine® Simple Stain Rat MAX PO (Nichirei Biosciences Inc., Japan) Detection system: Dako Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark)
	Lewis MHC class II + cells	Primary antibody: anti RT1.B ^h (MRC-OX3, Cedarlane Laboratories Ltd., Burlington, Canada) Secondary antibody: horse anti mouse antibody (Vector Lab, Burlingame, USA) Detection system: R.T.U. Vectastain Elite ABC Reagent (Vector Lab, Burlingame, USA)
	Immunoglobulines G	Primary antibody: anti rat IgG conjugated with fluorescein isothianate (Chemicon International Inc., Temecula, USA)
Flow cytometry analysis of aortal grafts recipients sera	MHC Class I	Primary antibody: anti-RT1.Ac (OX-27, Acris Antibodies GmbH, Herford, Germany) Secondary antibody: PE-Cy7-Streptavidin (BD Biosciences, Heidelberg, Germany)
	MHC Class II	Primary antibody: anti-RT1.D (OX-17, BD Biosciences, Heidelberg, Germany) Secondary antibody: PE-Cy7-Streptavidin (BD Biosciences, Heidelberg, Germany)

Specification of monoclonal and polyclonal antibodies used for histological analysis of aortal grafts (30 days after transplantation) and flow cytometry analysis of recipients sera (pretransplant and 30 days after transplantation, respectively).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230234.t002>

Histology and immunohistology of cryopreserved isografts and allografts on day 30 posttransplant

The both isografts and allografts explanted on day 30 posttransplant showed regular morphology of aortal wall with clear differentiation of all three basic anatomical layers (Fig 1A–1F). The luminal surface of tunica intima was covered by a monolayer of endothelial cells. No signs of intimal hyperplasia and no Lewis MHC group II positive cells infiltration of intimal layer were detected. The medial layer of both isografts and allografts showed no signs of necrosis or immunoglobulin G depositions (Fig 1F). Indeed, no statistical difference was observed in the thickness of tunica media of both groups (Table 3). The adventitial infiltration with MHC class II+ cells of Lewis origin, CD4+ and CD8+ cells was significantly higher in aortal allografts (Fig 1D and 1E) compared to isografts (Fig 1A and 1B) (Table 3).

Serum anti-MHC Class I and Class II antibodies in recipients of cryopreserved aortal isografts and allografts

Pretransplant as well as day 30 sera from isografted animals showed no inhibition of fluorescence-labelled MHC class I and class II antibody binding to donor quiescent splenocytes.

Day 30 sera from allografted animals showed higher inhibition of fluorescence-labelled MHC class I and class II antibody binding to donor quiescent splenocytes compared to day 0

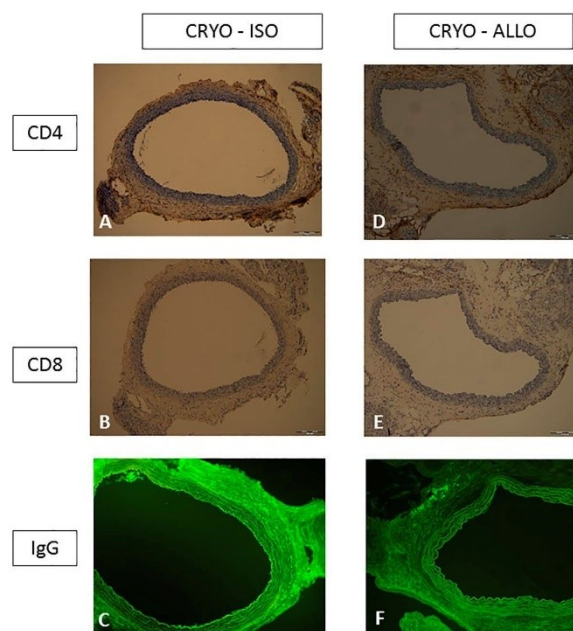


Fig 1. a,b,c,d,e,f. Representative light microscopic histological features of both isografts (a,b,c) and allografts (d,e,f) treated by our new cryopreservation/slow thawing protocol and obtained on day 30 following transplantation. Both isografts (Fig 1A, 1B, and 1C) and allografts (Fig 1D, 1E and 1F) showed clear differentiation of all three basic anatomical layers with no signs of intimal hyperplasia. No signs of medial layer destruction with immunoglobulins G deposition was detected in either isografts (Fig 1C) or allografts (Fig 1F). The adventitial infiltration of cryopreserved allografts by CD4+ (Fig 1D) and CD8+ cells (Fig 1E) (stained brown) was significantly higher compared to isografts (Fig 1A and 1B). Fig 1A and 1D – Anti CD4 antibody, original magnification x 100, positive cells stained brown. Fig 1B and 1E – Anti-CD8 antibody, original magnification x 100, positive cells stained brown. Fig 1C and 1F – Anti IgG fluorescein isothiocyanate conjugated antibody, original magnification x 100.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230234.g001>

sera. However statistical significance ($p > 0.05$) was observed only by MHC class I antibodies (Table 4).

Comparison of immunogenicity of rat aortal allografts treated by new clinical cryopreservation/slow thawing protocol to rat aortal allografts treated by clinical cold-storage protocol

The protocol used in the clinical program of cold-stored arterial allografts transplantation in the Czech Republic was modified to experimental operating room conditions and described in details in our previous publication [13]. The original core data of recent experiment were compared to historical data of our cold-stored allografts experiment [13]. Both experiments were supervised by the same principal investigator (I.M.).

The cold-stored allografts showed significant higher immunogenicity compared to cryopreserved allografts on day 30 posttransplant. The hyperplastic intima was infiltrated by recipient MHC class II+ cells and CD8+ cells. The medial layer showed signs of necrosis and deposition of immunoglobulins G and was significantly thinner ($P < 0.05$) compared to cryografts (Fig 2).

Table 3. Histological and immunohistological parameters of cryopreserved aortal grafts under study on day 30 posttransplant.

		CRYOGRAFTS on 30 POD	
		ISOGRAFTS (CRYO-ISO, N = 6)	ALLOGRAFTS (CRYO-ALLO, N = 6)
Intimal layer	Endothelial layer	+	+
	Intimal hyperplasia	-	-
Medial layer	SMC necrosis	-	-
	IgG deposition	-	-
	Medial thickness (mikrometer)	79.3 ± 15.4	75.4 ± 14.9
Adventitial layer	CD8+ cells	2.2 ± 2.7	6.9 ± 5.4*
	CD4+ cells	3.9 ± 2.6	9.6 ± 6.5*
	LEW MHC class II+ cells	6.3 ± 4.4	20.7 ± 6.7*

The rat aortal allografts processed in accordance with new clinical cryoconservation/slow thawing protocol showed normal anatomical structure of aortal wall with higher concentrations of immunocompetent cells in adventitial layer compared to isografts.

* The total amounts of CD4+, CD8+ and Lewis MHC class II+ cells in adventitial layer of cryopreserved aortal allografts were significantly higher ($P < 0.05$) than those observed in cryopreserved aortal isografts

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230234.t003>

The adventitial layer of cold-stored allografts showed ten-fold higher infiltration by CD4+ and CD8+ cells when compared to cryopreserved allografts.

Day 30 recipient sera of both cryopreserved and cold-stored allografts showed significant higher inhibition of fluorescence-labelled MHC class I antibody binding to donor quiescent splenocytes compared to preoperative values. However, the statistically higher inhibition of fluorescence-labelled MHC class II antibody binding to donor quiescent splenocytes compared to preoperative values was observed only in recipients of cold-stored allografts.

Discussion

The present study examined influence of the new standardized clinical cryoconservation/slow thawing protocol used in the Czech national "Cryopreserved vascular grafts program" on acute immunogenicity of cryopreserved aortal allografts in rats. This protocol allowed to process the aortal allografts by short pre-freezing cold ischemia, controlled freezing process, slow thawing process and short post-thawing cold ischemia as well. Indeed, using this protocol the aortal allografts were stored in modern solid organ conservation solution during both cold ischemic periods.

The rat cryopreserved aortal allografts showed only very low signs of immune mediated destruction on day 30 posttransplant. Indeed, the arterial isografts treated by this protocol showed only very small inflammatory reaction in their wall as well. Contrary, aortal allografts

Table 4. Percentage of fluorescence-labelled MHC class I and MHC class II antibody binding to Brown-Norway splenocyte in the presence of sera of Lewis recipients of aortal iso- or allografts.

	MHC class I		MHC class II	
	Day 0	Day 30	Day 0	Day 30
ISOGRAFTS (CRYO-ISO, N = 6)	111%±7%	97%±5%	90%±20%	98%±7%
ALLOGRAFTS (CRYO-ALLO, N = 6)	111%±22%	47±19%*	101±42%	66±12%

* $P > 0.05$

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230234.t004>

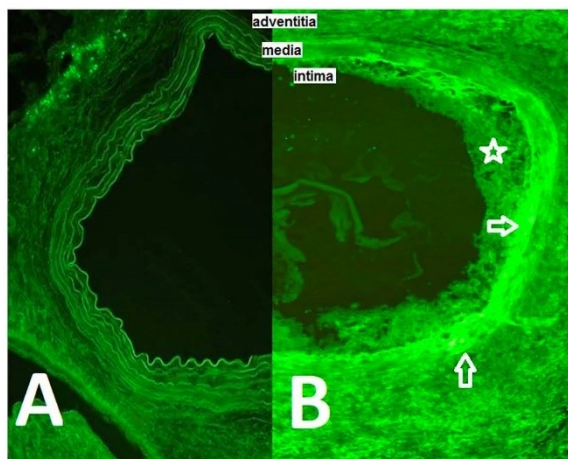


Fig 2. Representative histological features of cryopreserved (A) and cold-stored aortal allografts (B) on day 30 posttransplant. Immunofluorescent staining for immunoglobulins G with a fluorescein isothiocyanate-conjugated antibody. The rats aortal allografts processed in accordance with cryoconservation/slow thawing protocol used in the Czech national "Cryopreserved vascular grafts program" (A) showed clear differentiation of all three basic anatomical layers with no intimal hyperplasia and no IgG deposition in the medial layer. The rats aortal allografts processed in accordance with clinical cold-storage protocol (B) showed significant signs of rejection in all three wall layer represented by intimal hyperplasia (white star), destruction of medial layer with massive deposition of IgG (white arrows) and massive adventitial infiltration with immunocompetent cells of host origin. Original magnification x 100. adventitia-Tunica adventitia media-Tunica media intima-Tunica media.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230234.g002>

treated by cold storage protocol showed statistically higher activation of recipient's immune system with significant rejection changes in all three basic wall layers.

The most important issues of cryopreservation/thawing procedure during the pre-freezing period are both properties of conservation solution and duration of cold ischemia, respectively [10]. It was reported that prolonged cold-ischemia induced substantial damage to the arterial wall and that the endothelial cells are most susceptible to cold ischemia [16]. Indeed, Knight et al. have shown in rats, that 24 hours of cold ischemia induced vascular disease in both iso- and allografts at 4 weeks after transplantation [17].

In our experiment, pre-freezing ischemic times of aortal allografts were about 3–4 hours. Indeed, the cryopreserved grafts were stored immediately after recovery in pre-cooled organ preservation solution. It is very likely that this very short cold-ischemic time resulted both in significantly lower endothelial damage of cryopreserved grafts prior the transplantation and in minimal intimal reaction observed on day 30 posttransplant, respectively.

The fast warming at 37°C in a water bath is mentioned in the most of recent published clinical works as the standard thawing method of cryopreserved arterial allografts [2]. However, recent experimental studies confirmed high damage level of rapidly thawed vascular tissues [18,19]. Contrary to this the slow thawing protocol diminished the immune response induced by cold-stored rat arterial allografts and improved their behavior after implantation [10]. However, this protocol is not suitable for clinical condition in operating room during the preparation of cryopreserved aortal grafts for implantation. First, the cryopreserved arterial grafts were transferred from storage tank to the freezer where they were thawed according to a slow thawing program to room temperature at a warming rate of 1°C/minute. Second, the

cryoprotectant was removed gradually in tapered dilutions. According to our clinical protocol, the cassettes with cryopreserved grafts are thawed in a normal refrigerator within 2 hours and they are stored thereafter in the pre-cooled conservation solution until implantation [8].

Upregulation of major histocompatibility antigens expression by both ischemic and cryopreservation/fast thawing injury with appearance of microfractures may increase the immunogenicity of arterial allografts [18]. These antigens trigger strong donor specific anti-MHC Class I and anti-MHC Class II alloantibody production which drives the apoptosis of SMCs with medial layer destruction [20]. The medial layer of aortal allografts treated by our new cryopreservation/slow thawing protocol showed no signs of destruction detected by light microscopy, no IgG deposition and no shrinkage compared to isografts 30 days posttransplant. However, in this work we didn't use transmission electron microscopy to detect microfractures in aortal wall.

The statistically higher concentration of donor specific antibodies compared to preoperative values in recipients of cryopreserved allografts we observed only by anti MHC class I but not by anti MHC class II antibodies. MHC class II antigens are expressed on immunologically activated endothelial and smooth muscle cells [21]. So it is possible that our cryopreservation/slow thawing protocol inhibited upregulation of major histocompatibility antigens expression in medial smooth muscle cells during the 30 day follow-up period. This hypothesis can be supported with no appearance of IgG clusters in medial layer of cryopreserved allografts on day 30 posttransplant as well. However, the effect of these serum anti MHC class I antibodies on immunological rejection of aortal allografts during the longer follow-up period is not clear.

The most significant limitation of this study is the comparison of current cryopreserved allografts data with historical cold-stored allografts data only. Recipients of cryografts were substantially smaller than the recipient of cold-stored allografts due to different ages of experimental animals used in the two studies. However, the differences in the impact on aortal allograft rejection between both preservation protocols have been found to be much more pronounced than we expected. Therefore, further experiments with direct comparison of the two clinically used protocols are needed to confirm our observations.

Conclusion

In conclusion, the present study considered that histological features of rat aortal allografts treated by our new cryopreservation/slow thawing clinical protocol did not show significant differences compared to isograft 30 day following transplantation. In addition, significantly lower immunogenicity of cryopreserved allografts compared to historical data of cold-stored allografts treated by clinical protocol was observed. However, other experiments are needed to confirm this effect. In the end, their positive results can influence the indication criteria and immunosuppressive therapy in the Czech national "Cryopreserved vascular grafts program" in the future.

Supporting information

S1 Table. The individual data per aortal graft of all measured time-periods of the cryopreservation/slow thawing procedure.
(XLSX)

Author Contributions

Conceptualization: Rudolf Spunda, Pavel Mericka, Katrin Splith, Moritz Schmelzle, Felix Krenzien, Jaroslav Lindner, Miroslav Spacek, Ivan Matia.

Data curation: Jan Hruby, Rudolf Spunda, Pavel Mericka, Mikulas Mlcek, Katrin Splith, Moritz Schmelzle, Felix Krenzien, Miroslav Spacek, Ivan Matia.

Formal analysis: Jan Hruby, Ondrej Pecha, Moritz Schmelzle, Felix Krenzien, Miroslav Spacek, Ivan Matia.

Funding acquisition: Moritz Schmelzle, Jaroslav Lindner, Miroslav Spacek.

Investigation: Jan Hruby, Rudolf Spunda, Pavel Mericka, Felix Krenzien, Miroslav Spacek, Ivan Matia.

Methodology: Jan Hruby, Pavel Mericka, Mikulas Mlcek, Katrin Splith, Ivan Matia.

Project administration: Miroslav Spacek, Ivan Matia.

Resources: Mikulas Mlcek, Miroslav Spacek.

Software: Ondrej Pecha.

Supervision: Jaroslav Lindner, Ivan Matia.

Validation: Pavel Mericka, Ondrej Pecha, Ivan Matia.

Writing – original draft: Jan Hruby, Ivan Matia.

Writing – review & editing: Miroslav Spacek, Ivan Matia.

References

1. Berger P, Vaartjes I, Moll FL, De Borst GJ, Blankensteijn JD, Bots ML. Cumulative incidence of graft infection after primary prosthetic aortic reconstruction in the endovascular era. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2015; 49: 581–5. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2015.01.001> PMID: 25736515
2. Antonopoulos CN, Papakonstantinou NA, Hardy D, Lyden SP. Editor's Choice—Cryopreserved Allografts for Arterial Reconstruction after Aorto-Iliac Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2019; 58: 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2019.03.003> PMID: 31202560
3. Erb S, Sidler JA, Elzi L, Gurke L, Battegay M, Widmer AF, et al. Surgical and antimicrobial treatment of prosthetic vascular graft infections at different surgical sites: A retrospective study of treatment outcomes. *PLoS One*. 2014; 9.
4. Kieffer E, Gomes D, Chiche L, Fléron M-H, Koskas F, Bahnini A. Allograft replacement for infrarenal aortic graft infection: early and late results in 179 patients. *J Vasc Surg*. 2004; 39: 1009–1017. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2003.12.040> PMID: 15111853
5. Touma J, Cochenec F, Parisot J, Fialaire Legendre A, Becquemin J-P, Desgranges P. In Situ Reconstruction in Native and Prosthetic Aortic Infections Using Cryopreserved Arterial Allografts. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2014; 48: 292–299. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2014.04.023> PMID: 24923233
6. Heo S-H, Kim Y-W, Woo S-Y, Park Y-J, Kim D-K, Chung D-R. Recent Results of In Situ Abdominal Aortic Reconstruction with Cryopreserved Arterial Allograft. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2017; 53: 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2016.07.090> PMID: 27592735
7. Matia I, Adamec M, Varga M, Janousek L, Lipar K, Viklicky O. Aortolliac reconstruction with allograft and kidney transplantation as a one-stage procedure: long term results. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2008; 35: 353–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2007.09.022> PMID: 18065247
8. Špaček M, Měříčka P, Janoušek L, Štádl P, Adamec M, Vlachovský R, et al. Current vascular allograft procurement, cryopreservation and transplantation techniques in the Czech Republic. *Adv Clin Exp Med*. 2019; 28: 529–534. <https://doi.org/10.17219/acem/90037> PMID: 30684317
9. Špaček M, Měříčka P, Janoušek L, Štádl P, Adamec M, Vlachovský R, et al. Organization model for allotransplantations of cryopreserved vascular grafts in Czech Republic. *Cell Tissue Bank*. 2018; 19: 437–445. <https://doi.org/10.1007/s10561-018-9691-4> PMID: 29502254
10. Rodríguez M, Pascual G, Pérez-Köhler B, Cifuentes A, Garcia-Hondurilla N, Bellón JM, et al. Immune response to the long-term grafting of cryopreserved small-diameter arterial allografts. *Histol Histopathol*. 2012; 27: 873–84. <https://doi.org/10.14670/HH-27.873> PMID: 22648543
11. Konrad H, Wahle A, Altermann W, Schlaf G. Strong Humoral Anti-HLA Immune Response Upon Arbitrarily Chosen Allogeneic Arterial Vessel Grafts. *J Clin Cell Immunol*. 2017; 8: 1–10.

12. Szilagyi DE, Rodriguez FJ, Smith RF, Elliott JP. Late fate of arterial allografts. Observations 6 to 15 years after implantation. *Arch Surg*. 1970; 101: 721–33. <https://doi.org/10.1001/archsurg.1970.01340300077014> PMID: 5489297
13. Matia I, Lodererova A, Adamec M. Delayed administration of FK 506 is sufficient to suppress acute rejection changes after aortal transplantation in rats. *Transpl Int*. 2007; 20: 371–80. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2006.00446.x> PMID: 17326778
14. Spunda R, Hruby J, Mericka P, Mlcek M, Pecha O, Splith K, et al. Immunosuppressive protocols with tacrolimus after cryopreserved aortal allotransplantation in rats. Stepkowski S, editor. *PLoS One*. 2018; 13:
15. Matia I, Fellmer P, Splith K, Varga M, Adamec M, Kämmerer I, et al. Immunosuppressive protocol with delayed use of low-dose tacrolimus after aortic transplantation suppresses donor-specific anti-MHC class I and class II antibody production in rats. *Ann Transplant*. 2014; 19: 225–32. <https://doi.org/10.12659/AOT.889670> PMID: 24815872
16. Pascual G, Jurado F, Rodríguez M, Corrales C, López-Hervás P, Bellón JM, et al. The use of ischaemic vessels as prostheses or tissue engineering scaffolds after cryopreservation. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2002; 24: 23–30. <https://doi.org/10.1053/ejvs.2002.1663> PMID: 12127844
17. Knight RJ, Liu H, Fishman E, Reis ED. Cold ischemic injury, aortic allograft vasculopathy, and pro-inflammatory cytokine expression. *J Surg Res*. 2003; 113: 201–7. [https://doi.org/10.1016/s0022-4804\(03\)00199-9](https://doi.org/10.1016/s0022-4804(03)00199-9) PMID: 12957130
18. Buján J, Pascual G, López R, Corrales C, Rodríguez M, Turégano F, et al. Gradual thawing improves the preservation of cryopreserved arteries. *Cryobiology*. 2001; 42: 256–65. <https://doi.org/10.1006/cryo.2001.2329> PMID: 11748934
19. Novotny R, Slizova D, Hlubocky J, Krs O, Spatenka J, Burkert J, et al. Cryopreserved human aortic root allografts arterial wall: Structural changes occurring during thawing. *PLoS One*. 2017; 12: e0175007 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175007> PMID: 28414740
20. Thanaat O, Louedec L, Dai J, Bellier F, Groyer E, Delignat S, et al. Direct and Indirect Effects of Alloantibodies Link Neointimal and Medial Remodeling in Graft Arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26: 2359–2365. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000241980.09816.ac> PMID: 16917106
21. Lou H, Kodama T, Zhao YJ, Maurice P, Wang YN, Katz N, et al. Inhibition of Transplant Coronary Arteriosclerosis in Rabbits by Chronic Estradiol Treatment Is Associated With Abolition of MHC Class II Antigen Expression. *Circulation*. 1996; 94: 3355–3361. <https://doi.org/10.1161/01.cir.94.12.3355> PMID: 8989151

RESEARCH ARTICLE

Immunosuppressive protocols with tacrolimus after cryopreserved aortal allotransplantation in rats

Rudolf Spunda¹, Jan Hruby¹, Pavel Mericka², Mikulas Mlcek³, Ondrej Pecha⁴, Kathrin Splith⁵, Moritz Schmelzle⁶, Felix Krenzien⁵, Jaroslav Lindner¹, Ivan Matia^{6†}, Miroslav Spacek^{1‡*}

1 2nd Department of Surgery - Department of Cardiovascular Surgery, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Czech Republic, **2** Tissue Bank, Faculty Hospital Hradec Kralove, Charles University- Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic, **3** Institute of Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, **4** Technology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic, **5** Department of Surgery, Campus Charité Mitte and Campus Virchow-Klinikum, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, **6** Department of Cardio-Vascular Surgery, Hospital Hietzing and Karl Landsteiner Institute for Cardio-Vascular Research, Vienna, Austria

† Ivan Matia and Miroslav Spacek are joint senior authors on this work.

* mirekspacek@seznam.cz


 OPEN ACCESS

Citation: Spunda R, Hruby J, Mericka P, Mlcek M, Pecha O, Splith K, et al. (2018)

Immunosuppressive protocols with tacrolimus after cryopreserved aortal allotransplantation in rats. *PLoS ONE* 13(8): e0201984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201984>

Editor: Stanislaw Stepkowski, University of Toledo, UNITED STATES

Received: March 20, 2018

Accepted: July 23, 2018

Published: August 9, 2018

Copyright: © 2018 Spunda et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Funded by 1st Medical Faculty, Charles University in Prague grant 2017-260 372 to J.L. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Objectives and design

The aim of our study was to simulate in rats all aspects and techniques used in our new clinical program of cryopreserved alloarterial transplantation and investigate the influence of two immunosuppressive protocols with tacrolimus on acute rejection of these allografts.

Materials and methods

Cryopreserved abdominal aortic grafts were transplanted between Brown-Norway and Lewis rats. Tacrolimus (0.2 mg/kg daily) was administered from day 1 to day 30 (TAC1) or from day 7 to day 30 (TAC7), respectively. No immunosuppressed isogenic (ISO) and allogeneic (ALO) rats combination served as control. Aortal wall infiltration by immunocompetent cells (MHC II+ cells of recipient origin) was studied on day 30 after transplantation. Flow cytometry was used for the analysis of day 30 sera for the presence of donor specific anti-MHC class I and II antibodies.

Results

The aortal allografts in both immunosuppressed groups showed regular morphology of aortal wall with no depositions of immunoglobulin G on day 30. The adventitial infiltration of non-immunosuppressed aortal allografts by MHC class II positive cells of recipient origin was significantly higher (ALO 20.7±6.7 cells, P<0.001) compared to both immunosuppressed groups (TAC1 5.9±5.5 cells, TAC7 6.1±5.1 cells). Day 30 sera from the allogeneic non-immunosuppressed animals decreased significantly the binding of fluorescence-labelled MHC class I (46.9±19.4%) and class II (65.8±11.9%) antibody to donors spleen

cells compared with day 30 sera from both immunosuppressed groups (TAC1, anti-MHC class I $102.4 \pm 4.2\%$, $p < 0.001$, anti-MHC class II $102.6 \pm 6.0\%$), (TAC7, anti-MHC class I $79.9 \pm 3.3\%$, $p < 0.001$, anti-MHC class II $80.9 \pm 2.7\%$).

Conclusion

Both immunosuppressed protocols with tacrolimus (administration from day 1 or from day 7 following transplantation) were able to suppress acute cell- and antibody-mediated rejection of cryopreserved abdominal aortic allografts processed in accordance with our new standardized clinical protocol.

Introduction

One of the most dangerous complication in vascular surgery is infection of vascular prostheses or stentgrafts [1]. Contemporary therapy of choice in this life-threatening condition is reoperation with replacement of an infected foreign material with an arterial allograft [2]. The use of cold-stored arterial grafts (conserved in storage medium by 4°C) in the treatment of this complication was successfully introduced by Kieffer in Paris in the late eighties of 20th century [3]. Few years later was this method introduced in the Czech Republic as well [4,5].

However the implication of the Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of The Council on Setting Standards of Quality and Safety for the Donation, Procurement, Testing, Processing, Preservation, Storage and Distribution of Human Tissues and Cells led to the cessation of the further use of cold-stored arterial allografts in this indication in many European countries including France [1] and Germany [6]. In accordance with this trend we introduced the clinical program of cryopreserved alloarteries transplantation in the Czech Republic in 2011 [7].

After transplantation of cold-stored and cryopreserved arteries we can observe immune reaction similar to the rejection process in solid organ transplantation [8,9]. In patients after transplantation of arterial allografts with no immunosuppression we can find a higher incidence of graft related complication as graft ruptures, graft aneurysm formation or thrombosis [2]. On the other hand there is a good long term patency rates and no aneurysmal formation in patients after simultaneous organ and arterial transplantation with triple immunosuppression postoperatively [10,11,12].

Even though immunosuppression can improve results after allograft transplantation this therapy is not generally accepted. This is probably caused by wariness to decrease immune reaction in patients with florid infection [9,13].

In our previous experimental work we considered a positive effect of low-dose tacrolimus immunosuppression on the inhibition of acute cell- and antibody-mediated rejection of cold-stored arterial grafts in rats [13,14]. In addition, we confirmed a possibility of delaying the administration of low-dose tacrolimus after an arterial transplantation for 1 week without any negative influence on both types of rejection [14]. These conclusions led to introduction of new standardized immunosuppressive protocols with low-dose of tacrolimus in patients after cold-stored arterial transplantations in the Czech Republic [4].

Therefore, the aim of our study was to simulate in rats all aspects and techniques used in our clinical program of cryopreserved alloarterial transplantation and investigate influence of two immunosuppressive protocols with tacrolimus on the cell-mediated and antibody-mediated rejection of cryopreserved arterial allografts processed by this protocol.

Material and methods

Ethics statement

This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of Charles University, 1st Medical Faculty (no. UK 1.LF 563/13, MSMT-14808/2014-6)

Animals

Adult male inbred Brown-Norway (BN; RT1^b) and Lewis (LEW; RT1^d) rats were obtained from Charles River (Sulzfeld, Germany). Principles of laboratory animal care were followed and all rats were maintained according to the National Institute of Health Guidelines. Male LEW rats (n = 24, 191–250 g) were used as recipients of allogeneic or syngeneic cryopreserved abdominal aortal grafts. Male BN rats (n = 9, 191–254 g) were used as donors of allogeneic cryopreserved abdominal aortal grafts. Male LEW rats (n = 3, 248–254g) were used as donors of syngeneic cryopreserved abdominal aortal grafts. Each transplanted animal was held in a separate cage during the 30-day follow-up period.

Only animals that passed the whole follow-up period were included into the study.

Operative procedure of donor animals

The donor animals were anaesthetized by an intramuscular injection of ketamine (Narkamon[®], Spofa a.s., Prague, Czech Republic) at 100 mg/kg and xylazine (Rometar[®], Spofa a.s., Prague, Czech Republic) at 10 mg/kg. A 1,5–2,0 cm long segment of the infrarenal aorta was excised after the administration of heparin (100 IU/kg) via the inferior caval vein. The graft was gently flushed with 2 ml of Celsior[®] solution (Genzyme, Netherlands) containing 100 IU/ml of heparin, and prepared for cryoconservation as described below. The animals were then euthanized by intracaval administration of a lethal dose of thiopental (Thiopental[®], Spofa a.s., Prague, Czech Republic). There were excluded 2 recipients animals for not passing the whole follow up period. Both of them died on 1. postoperative day. The necropsy showed no surgical cause of death.

Protocol of cryoconservation

Cryoconservation of aortal grafts was performed by methods used in clinical practice of the Tissue Bank of The University Hospital Hradec Kralove in the Czech Republic. This Tissue Bank is fully licensed by the Czech national competent authority [15,16] and fully integrated to the clinical program of cryopreserved alloarteries transplantation in the Czech Republic since 2011 [7]. The clinical methods were modified to correspond with the conditions of work in an experimental operating room in which all below described procedures were performed. Only high quality material and drugs for human use meeting the requirements of the Directive of the European Parliament and Council No. 23/2004/EC were used by these procedures.

The 6–8 donor animals were operated at once. The flushed aortal graft of each donor animal was immediately after excision placed into pre-cooled Celsior[®] conservation solution (Genzyme, The Netherlands). The grafts were then stored at the temperature of melting ice in closed sterile certified plastic jars (Medfor 250 ml Farnborough, UK) until finalization of all donor's operations. The aortal grafts were subsequently put into double sterile disposable plastic bags (CryoMACS Freezing Bag 500, Miltenyi Biotec GmbH, Germany) containing 25ml of pre-cooled 6% solution of hydroxyethylstarch m.w. 130.000 Da (Voluven 6%, Fresenius Kabi, Germany). Each bag contained two aortal grafts from two different donors. The content of the

bag was subsequently mixed with the pre-cooled 20% dimethylsulfoxide (WAK ChemieMedi-cal GmbH, Germany) in the 6% hydroxyethylstarch solution (Voluven 6%, Fresenius Kabi, Germany). The plastic bags were closed by sealing at the sealing machine (STERISEAL B 83-R, Cevor s.r.o., Troubsko u Brna, Czech Republic), put into outer metal cassettes (ST 100, Con-sarctic GmbH, Schölkrippen, Germany) and stored at the temperature of melting ice until freezing. The controlled-rate freezing by the rate of -1K/min to -90°C, -5K/min to -150°C was performed at the programmable freezer (Kryo-10, Planer Biomed, Sunbury on Thames, England). The aortal grafts were stored in liquid nitrogen vapour phase by temperature of -190°C until implantation.

Thawing protocol

The outer metal cassettes with bags containing the aortal grafts were transported at the day of implantation in liquid nitrogen vapour phase from the Tissue Establishment of the Institute of Haematology in Prague to the operating room of Institute of Physiology of 1st Medical faculty, Charles University in Prague. In the operating room were the cassettes removed from the ship-per and placed for about 60 minutes into a refrigerator with temperature of +4°C and then were kept for another 60 minutes by the room temperature. Subsequently, the aortal grafts were removed from the bag and each of two grafts was divided into two pieces of an identical length to be used in two rat recipients. After dividing was each aortal graft stored separately in 10 ml of Custodiol solution (Custodiol[®], Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Germany) in the refrigerator with temperature of +4°C until the beginning of anastomosis in the recipient animal.

Operative procedure of recipient animals

The recipient animals were anaesthetized with intramuscular injection of sufentanil (Sufenta[®], Janssen Pharmaceutica Inc., Beerse, Belgium) at 20 µg/kg and azaperone (Stresnil[®], Janssen Pharmaceutica Inc., Beerse, Belgium) at 1 mg/kg to ensure more natural awakening.

Following a midline laparotomy, the aortal grafts were transplanted orthotopically into the recipient's infrarenal aorta with an interrupted 10/0 mono-filament suture (Ethicon Inc., Som-merville, New Jersey, USA). Neither anti-coagulants nor anti-platelet drugs were adminis-tered during the transplantation or in the postoperative period.

Animal groups

The recipient animals of cryopreserved aortal grafts were divided into four groups according to the postoperative immunosuppressive protocol: group ISO was that of isogenic control (LEW to LEW, n = 6, 191–250 g), group ALO was that of allogeneic control (BN to LEW, n = 6, 193–245 g) with no administration of tacrolimus; animals in group TAC1 (BN to LEW, n = 6, 228–242 g) were immunosuppressed from day 1 to day 30; and animals in group TAC7 (BN to LEW, n = 6, 195–212 g) were immunosuppressed from day 7 to day 30 after the transplantation.

Immunosuppressive therapy

Two different protocols of tacrolimus immunosuppression (day 1–30 in the group TAC1 and day 7–30 in the group TAC7, respectively) were used in animals after allogeneic cryopreserved aortal transplantation. Tacrolimus (Prograf[®]; Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japan) suspended in saline solution was administered intramuscularly in daily doses of 0.2 mg/kg. Pure saline

solution in equivalent volume was administered intramuscularly daily for first 6 days in group TAC7 animals and for 30 days in the non-immunosuppressed animals in group ISO and ALO.

Blood samples

Blood samples for determination of donor specific anti MHC antibodies on day 0, and day 30 in all groups and for determination of tacrolimus concentration on day 30 in immunosuppressed groups TAC1 and TAC7 were collected by orbital sinus puncture as described by van Herck [17]. The animals were anaesthetized by an intramuscular injection of ketamine (Narkamon[®], Spofa a.s., Prague, Czech Republic) at 100 mg/kg and xylazine (Rometar[®], Spofa a.s., Prague, Czech Republic) at 10 mg/kg during this procedure.

Arterial grafts explantation on day 30

The animals were anaesthetized by an intramuscular injection of ketamine (Narkamon[®], Spofa a.s., Prague, Czech Republic) at 100 mg/kg and xylazine (Rometar[®], Spofa a.s., Prague, Czech Republic) at 10 mg/kg on day 30. After the blood samples collection (see above) a mid-line re-laparotomy was performed. Aortal grafts were excised after the administration of heparin (100 IU/kg) via the inferior caval vein in all experimental groups. The animals were then euthanized by intracaval administration of a lethal dose of thiopental (Thiopental[®], Spofa a.s., Prague, Czech Republic).

Parameters under study

Animal weight. The animals body weight in all experimental groups was determined daily before intramuscular injection of saline solution with or without tacrolimus.

Concentration of tacrolimus in peripheral blood

In animals of group TAC1 and TAC7, blood levels of tacrolimus were evaluated with an enzyme enhanced immunoassay technique (Emit[®] 2000 Tacrolimus assay, Dade Behring Inc., Deerfield, Illinois, USA) on day 30 after transplantation.

Histologic analysis of explanted arterial grafts

The explanted aortal grafts were embedded in Sakura Finetek Tissue Tek Cryomold holders (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) and Sakura Finetek Tissue Tek O.C.T. compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan). The samples were frozen in 2-methylbutane (Fluka Chemika, Buchs, Switzerland), cooled with liquid nitrogen, and stored until processed at -80°C .

The sections for histological analysis were taken from the midportion of the graft to avoid tissue that may have reacted to the suture material. The 5 μm thick cross sections were stained with a Hematoxylin & Eosin and a Van Gieson with elastica stain.

Immunohistochemical analysis of explanted arterial grafts

The sections were taken from the midportion of the graft to avoid tissue that may have reacted to the suture material.

Detection of CD4+ cells, CD8+ cells and Von Willebrand factor. Immunohistochemistry was performed on 8 μm thick sections with a two-step indirect method. Briefly, the sections were fixed in cold acetone for 10 minutes. After rinsing in 0.2% Triton X 100 and phosphate-buffered saline, the specimens were incubated with a primary antibody (anti-CD4 (W3/25, Cymbus Biotechnology LTD, Hampshire, UK), anti-CD8 (OX-8, Cymbus Biotechnology LTD, Hampshire, UK), anti-Von Willebrand factor (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark)

for 60 min. Endogenous peroxidase was blocked by incubating in 0.3% H₂O₂ and 70% methanol for 30 minutes. Next, the sections were incubated with a secondary antibody (Histofine[®] Simple Stain Rat MAX PO, Nichirei, Japan) for 30 min, then incubated with Dako Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) for 5 min. The specimens were counterstained and dipped in Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

The slides were then scored in a blinded fashion. Cells were counted at 5 locations at x1000 magnification. The cellularity was defined as the mean value of the cells counted.

Detection of Lewis MHC class II positive cells. Immunohistochemistry was performed on 8 μm thick sections with a three-step indirect method. Briefly, the sections were fixed for 10 minutes in cold acetone. After sections were rinsed in 0.2% Triton X 100 and phosphate-buffered saline, endogenous biotin was blocked with the Biotin blocking system (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark). The tissues were then incubated in 10% horse serum to prevent unspecific binding, and then a primary antibody was applied for 60 min. Then, endogenous peroxidase was blocked in 0.3% H₂O₂ and 70% methanol for 30 minutes. The specimen was incubated with a secondary biotinylated horse anti-mouse antibody (Vector Lab, Burlingame, California, USA), followed by an incubation with R.T.U. Vectastain Elite ABC Reagent (Vector Lab, Burlingame, California, USA). Finally, specimens were incubated for 5 min with Dako Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark), counterstained, and dipped in Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

The slides were then scored in a blinded fashion. Cells were counted at 5 locations at x1000 magnification. The cellularity was defined as the mean value of the cells counted.

Detection of immunoglobulins

After processing, the 8-μm thick sections were rinsed in PBS and air-dried. The tissues were then incubated with primary antibody directly conjugated with fluorescein isothiocyanate (Chemicon International Inc, Temecula, California, USA) for 30 min. The specimens were then dipped in glycerine medium and immediately analysed under a fluorescence microscope.

Flow cytometry analysis of blood samples

Brown-Norway splenocytes were thawed, washed in phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in PBS with 1% fetal bovine serum (FBS). 100,000 cells were incubated for 30 min at 4°C with 10 μL of recipient serum. Cells were washed twice in PBS (1% FBS) and then incubated with original antibodies as follows: MHC expression on quiescent BN splenocytes was evaluated using a Biotin-MHC class I (anti-RT1.Ac, OX-27, Acris Antibodies GmbH, Herford, Germany) or a Biotin-MHC class II (anti-RT1.D, OX-17, BD Biosciences, Heidelberg, Germany) primary antibody and a PE-Cy7-Streptavidin secondary antibody (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). 10,000 cells were acquired on a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) and analyzed using FACSDiva™ software (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Graphic presentation in histograms allowed the determination of mean fluorescence intensity on a log scale. MHC class I or class II antibody binding on the cells without previous recipient's serum incubation was set to 100%. The serum antibodies from allografted LEW rats, when presented, were bound comparatively to MHC class I and MHC class II molecules on BN splenocytes. The inhibition of the fluorescence-labelled MHC class I and II antibody binding consequently decreased the measured fluorescence signal.

Statistical analysis

The values in the text and tables are expressed as the mean±standard deviation (SD). Bar charts in graphs represent means and whiskers symbolize 95% confidence intervals (CI) in all graphs. Comparisons of parameters under study between experimental groups (weight increase, CD4+ cells, CD8+ cells, MHC II+ cells, anti MHC I and anti MHC II antibodies) were performed using the analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey HSD Multiple Comparisons test. All analyses were conducted in Stata (version 12.1). All charts were accomplished using the Data-Driven Documents library in JavaScript (D3.js, version 3.0).

Results

Animals

An increase from pre-operative weight was observed in all groups on day 30. The weight increase expressed as a percentage of preoperative weight was significantly higher ($P < .05$) in both no immunosuppressed groups (group ISO +47.1±10.5%, group ALO +46.1±10.8%) compared to from day 1 immunosuppressed animals in group TAC1 (+29.7±4.4%). The weight increase (+41.0±5.6%) in from day 7 immunosuppressed animals (group TAC7) was compared to both no immunosuppressed groups (Fig 1) (S1 Table).

Immunosuppression with tacrolimus

Measurement for blood concentrations of tacrolimus were performed in order to assure adequate tacrolimus concentrations of 3–7 ng/mL by daily doses of 0.2 mg/kg. The mean tacrolimus blood level on day 30 in from day 1 immunosuppressed animals of group TAC1 was slightly higher (4.6±0.7 ng/mL) compared to from day 7 immunosuppressed animals of group TAC7 (4.0±0.2 ng/mL) ($P = 0.035$) (Table 1). No adverse effects of the tacrolimus administration, such as diarrhea or a persisted weight loss, were observed in any of the experimental animals.

Histology and immunohistology

The aortal grafts in both tacrolimus immunosuppressed groups (TAC1, TAC7) on day 30 showed regular morphology of aortal wall with clear differentiation of all three basic anatomical layers—tunica intima, media and adventitia. The luminal surface of intima was covered by a monolayer of endothelial cells. There were no signs of necrosis or destruction of tunica media. No IgG depositions were detected in tunica media in both immunosuppressed groups. The infiltration of tunica adventitia with mononuclear cells was comparable to isogenic grafts of group ISO (Fig 2a, 2b and 2c). The allografts showed normal histological feature of abdominal aorta with clear differentiation of all three basic anatomical layers, with no signs of intimal hyperplasia, smooth muscle cells necrosis or higher adventitial cellular infiltration.

Surprisingly the histology of allogeneic no immunosuppressed cryopreserved aortal grafts of group ALO showed regular morphology of aortal wall as well. All three basic layers were well preserved as well. No IgG depositions were found in muscular layer of allogeneic grafts. However, the infiltration of tunica adventitia with mononuclear cells was higher compared to isogenic and both immunosuppressed groups. (Fig 3)

Lewis MHC class II + cells, CD4+ cells, CD8+ cells in tunica adventitia

The adventitial infiltration by CD4+, CD8+, and Lewis MHC class II positive cells in both immunosuppressed groups (group TAC1 and TAC7) on day 30 was comparable to the adventitial infiltration of isogenic grafts in the group ISO.

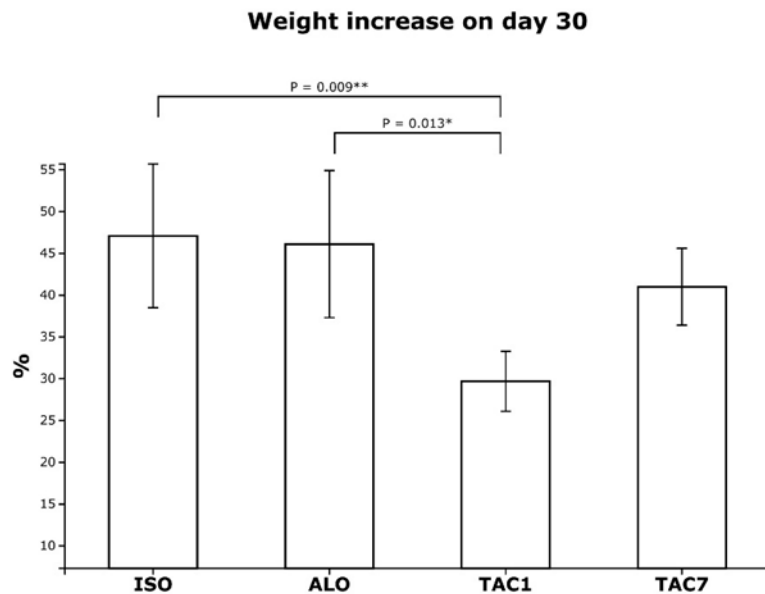


Fig 1. Weight increase on day 30 after transplantation of aortic grafts expressed as a percentage of preoperative weight. No immunosuppressed animals (group ISO, group ALO) showed significantly higher weight increase on day 30 when compared to from day 1 immunosuppressed animals (group TAC1). However, the weight increase in from day 7 immunosuppressed animals (group TAC7) was compared to animals without immunosuppression (group ISO, group ALO).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201984.g001>

The absence of immunosuppression in group ALO led to significantly higher infiltration of tunica adventitia with immunocompetent cells compared to all other groups (Table 2, Fig 3).

Anti MHC class I antibodies in serum

Sera of isogenic animals (group ISO, 97.1±4.7%) and from day 1 immunosuppressed animals (group TAC1, 102.4±4.2%) obtained on day 30 showed no change of inhibition of the binding of fluorescence-labeled MHC class I antibody to BN-splenocyte compared to pretransplant sera (group ISO, 110.6±7.1%, group TAC1, 113.6±29.3%) (Fig 4).

Table 1. Basic characteristics of experimental groups.

Group	Characteristic	Immunosuppression	Cryoconservation (days)	Weight increase on day 30 (%)	Tacrolimus blood level on day 30 (ng/mL)
ISO	LEW to LEW	no	172.7±2.6	47.1±10.5	no
ALO	BN to LEW	no	179.3±2.6	46.1±10.8	no
TAC1	BN to LEW	Tacrolimus day 1–30	180.2±6.9	29.6±4.4	4.6±0.7
TAC7	BN to LEW	Tacrolimus day 7–30	180.3±0.5	40.1±5.6	4.0±0.2

LEW—male Lewis rats

BN—male Brown-Norway rats

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201984.t001>

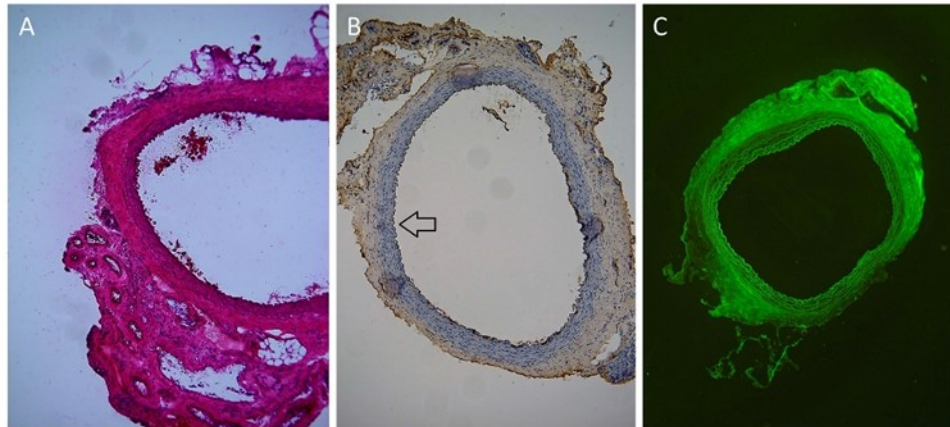


Fig 2. a, b, c. Representative light microscopic features of immunosuppressed cryopreserved aortal allografts obtained at 30 days following transplantation. a—The allografts showed normal histological feature of abdominal aorta with clear differentiation of all three basic anatomical layers, with no signs of intimal hyperplasia, smooth muscle cells necrosis or higher adventitial cellular infiltration. (Haematoxylin-Eosin, original magnification x 100). b—The luminal surface of allografts (arrow) was covered by monolayer of endothelial cells (stained brown). (Anti-Von Willebrand factor antibody, original magnification x 100). c—No deposition of immunoglobulins G was detected in the medial or intimal layer of cryopreserved allografts. (Anti-IgG fluorescein isothiocyanate-conjugated antibody, original magnification x 40).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201984.g002>

Sera from day 7 immunosuppressed animals (group TAC7) obtained on day 30, showed higher inhibition of the fluorescence-labeled MHC class I antibody binding to BN-splenocyte ($79.9 \pm 3.3\%$) compared to pretransplant sera ($103.7 \pm 6.6\%$, $p = 0.026$) (Fig 4).

Sera of allogeneic non-immunosuppressed animals (group ALO) obtained on day 30 after transplantation significantly decreased the binding of fluorescence-labeled MHC class I antibody to BN spleen cells ($46.9 \pm 19.4\%$), compared to pretransplant sera ($110.8 \pm 21.9\%$, $p < 0.001$) (Fig 4).

In addition, sera from the allogeneic non-immunosuppressed animals (group ALO) obtained on day 30 showed significant inhibition of fluorescence-labelled MHC class I antibody binding to BN spleen cells ($46.9 \pm 19.4\%$), compared with day 30 sera from the isogenic group (group ISO, $97.1 \pm 4.7\%$, $p < 0.001$), as well as with both immunosuppressed groups (group TAC1, $102.4 \pm 4.2\%$, $p < 0.001$), (group TAC7, $79.9 \pm 3.3\%$, $p < 0.001$) (Fig 4).

Anti MHC class II antibodies in serum

Isogenic group sera (group ISO) as well as both allogeneic immunosuppressed groups sera (group TAC1 and TAC7) showed no inhibition of the fluorescence-labelled MHC class II antibody binding to BN-splenocyte during the entire follow-up period (Fig 5). By contrast, only sera from allogeneic non-immunosuppressed animals (group ALO) obtained on day 30 after transplantation showed inhibition ($65.8 \pm 11.9\%$) of fluorescence-labelled MHC class II antibody binding to BN-splenocyte. However, this inhibition was not statistically significant compared to pretransplant values in this group ($100.5 \pm 41.9\%$) (Fig 5).

Discussion

The present study examined the effect of two immunosuppressive protocols with low dose tacrolimus on rejection of cryopreserved abdominal aortic allografts in rats. Rat allografts were

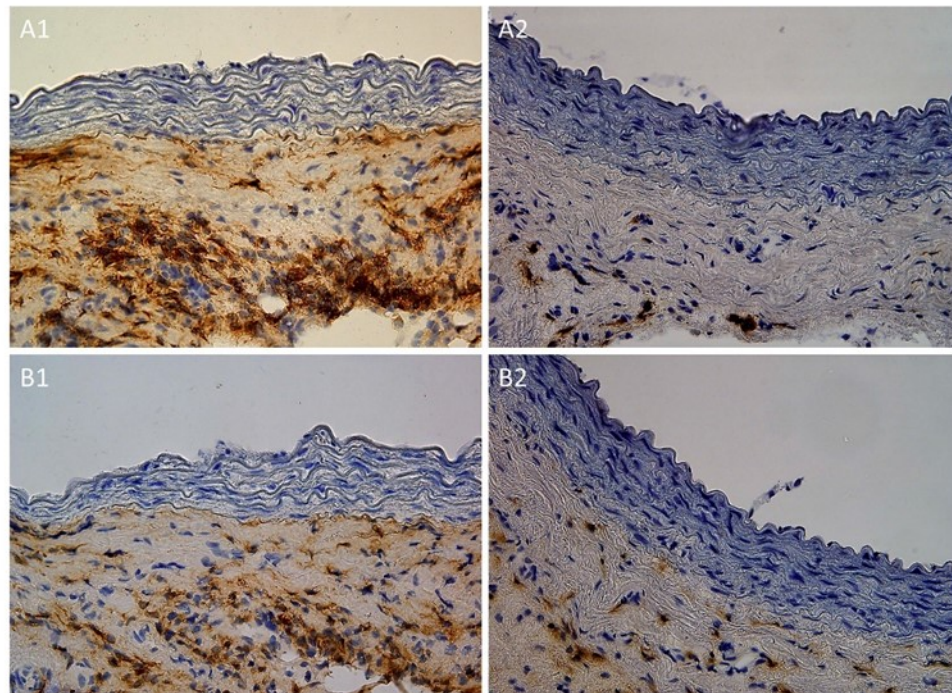


Fig 3. a1, a2, b1, b2. Representative light microscopic histological features of adventitial infiltration of cryopreserved allografts by mononuclear cell at 30 days following transplantation. The adventitial infiltration of Brown-Norway cryopreserved aortal grafts by MHC class II positive cell of Lewis origin (stained brown) (Fig 3 a1) was significantly reduced by both types of immunosuppressive protocols with tacrolimus (Fig 3 a2). The adventitial infiltration of Brown-Norway aortal grafts by CD4+ cell (Fig 3 b1) was significantly reduced by both immunosuppressive protocols with tacrolimus as well (Fig 3 b2). Original magnification $\times 400$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201984.g003>

processed in accordance to standardized cryoconservation and implantation protocol routinely used in the clinical setting in the Czech Republic since 2011. Both immunosuppressed protocols with tacrolimus (administration from day 1 or from day 7 following transplantation) were able to suppress cell-mediated and antibody-mediated rejection of cryopreserved abdominal aortic allografts during the 30 day follow-up period.

The model of rat or mice aortal allotransplantation is routinely used in experimental transplant medicine [18] and is closely related to the development of new immunosuppressive drugs since the 1960s. The immunosuppressive protocols with azathioprine [19], azathioprine and prednisone [20], 6-mercaptopurine [21], cyclosporine A [22], sirolimus [23], cyclosporine with methylprednisolone and azathioprine [24], mycophenolat mofetil [25], tacrolimus [18], 15-deoxyspergualin [26], cyclosporine A and FTY720 [27], tacrolimus and FR260330 [28], everolimus [29], everolimus with clopidogrel [30] were confirmed to be able to suppress to some degree the immune-mediated destruction of arterial allografts.

Despite of it, is the use of immunosuppression in patients after clinical arterial allograft implantation not generally accepted by vascular surgeons [1]. This is probably caused by no

Table 2. Assessments of rat cryopreserved aortic graft on day 30 after transplantation into the abdominal aorta.

Group	Characteristic	IS	Intima		Media		Adventitia ^a		
			Endothelial layer	Intimal hyperplasia	IgG deposition	SMC necrosis	LEW MHC class II+ cells ^{**}	CD8+ cells	CD4+ cells
ISO	LEW to LEW	no	+	-	-	-	6.3±4.4	2.2±2.7	3.9±2.6
ALO	BN to LEW	no	+	-	-	-	20.7±6.7 [†]	6.9±5.4 [†]	9.6±6.5 [†]
TAC1	BN to LEW	Tac 1-30	+	-	-	-	5.9±5.5	3.5±3.3	2.3±1.6
TAC7	BN to LEW	Tac 7-30	+	-	-	-	6.1±5.1	3.1±3.8	2.0±1.5

[†] The total amounts of Lewis MHC class II positive, CD8-positive and CD4-positive cells in tunica adventitia in group ALO were significantly higher ($P < 0.001$) than those observed in all the other groups (ISO, TAC1, TAC7).

+ positive finding, - negative finding

^a Numbers of Lewis anti MHC class II, CD8-positive and CD4-positive cells in one microscopic field viewed at a magnification of x1000

^{**} Major histocompatibility complex class II positive cells of Lewis origin

IS—immunosuppression

Tac—tacrolimus

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201984.t002>

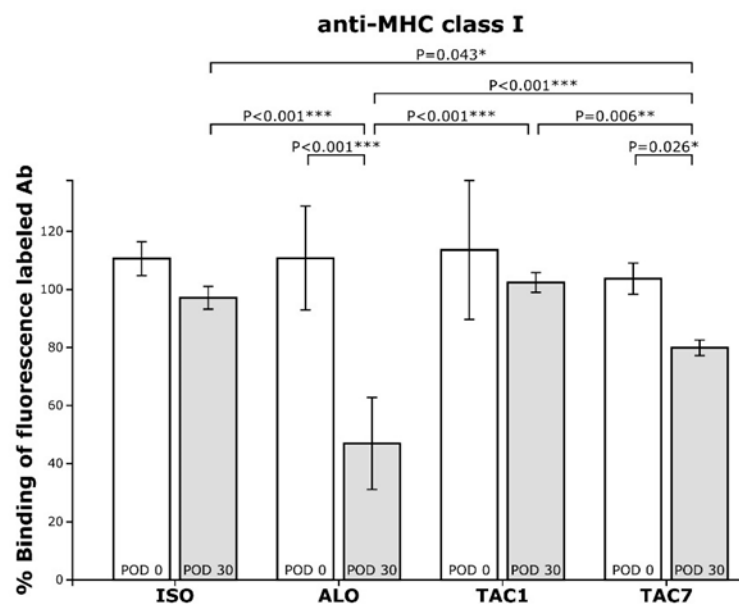


Fig 4. Anti MHC class I antibodies in serum. The percentage of binding of the anti-MHC class I antibody (anti-RT1.Ac, OX-27) to quiescent BN splenocytes in the presence of sera obtained from recipient rats pretransplant (POD 0) and on day 30 after transplantation (POD 30). ISO— isogeneic group with no immunosuppression. ALO—allogeneic group with no immunosuppression. TAC1—from day 1 immunosuppressed allogeneic group. TAC7—from day 7 immunosuppressed allogeneic group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201984.g004>

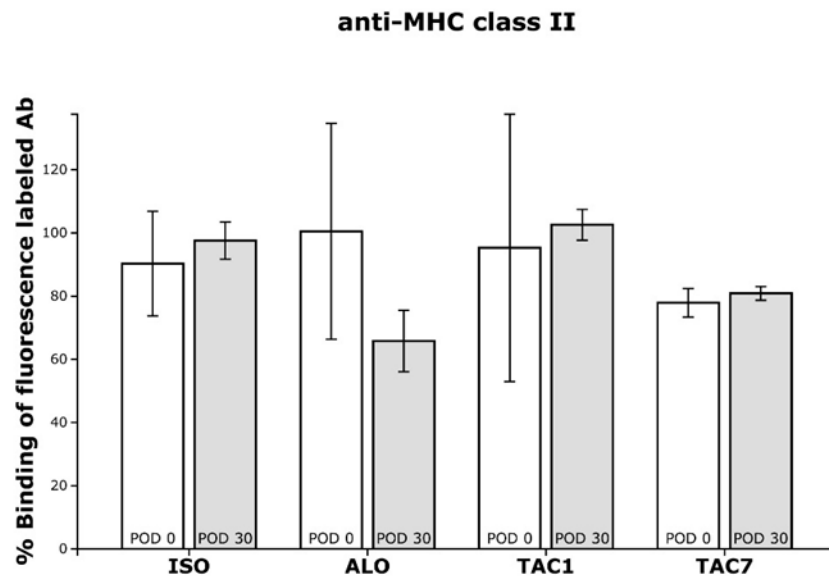


Fig 5. Anti MHC class II antibodies in serum. The percentage of binding of the anti-MHC class II antibody (anti-RT1.D, OX-17) to quiescent BN splenocytes in the presence of sera obtained from recipient rats pretransplant (POD 0) and on day 30 after transplantation (POD 30). ISO—iso-genetic group with no immunosuppression. ALO—allogeneic group with no immunosuppression. TAC1—from day 1 immunosuppressed allogeneic group. TAC7—from day 7 immunosuppressed allogeneic group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201984.g005>

acceptance of the antigenicity of arterial allografts by vascular surgeons [9] and/or a reluctance to use immunosuppressive treatment in patients with ongoing infection [31]. However, if the immunosuppressive therapy after clinical arterial transplantation is used, the drug most commonly used is cyclosporine A [32].

Recently, the most complex view on the use of cyclosporine A in patients after in situ revascularisation with cold-stored arterial allograft in the treatment of aortic graft infection represents the prospective, comparative, single-centre study published in 2011 by Pupka et al. [2]. One group of patients was immunosuppressed with cyclosporine A. Second group of patients had because of their own decision no immunosuppression. The immunosuppressive protocol was based on the administration of cyclosporine A on daily doses of 1–3 mg per kg of body mass with serum concentration of 140–150 mg/L. The drug was taken until the end of the study (mean follow up 22.8 months). The graft thrombosis (12%), rupture of the graft (12%) with death of the patient (8%) and graft aneurysm (8%) was observed only in non-immunosuppressed group. No adverse effects of immunosuppression were reported in this study [32].

However, published data confirm considerable vascular [33] and metabolic [34] side effects with the use of cyclosporine A. Indeed, in rat cardiac allografts led cyclosporine A to the increase of transplant arteriosclerosis by the up-regulation of the expression of tissue growth factor beta (TGF- β) [35]. In rat aortic allografts led the therapy with cyclosporine A to endothelialitis and accelerated arteriosclerosis [36]. In addition, the mice murine aortic

allografts study published by Eckl et al. also revealed that monotherapy with cyclosporine is not sufficient in preventing the formation of transplant arteriosclerosis [29].

An attractive alternative to cyclosporine A represents tacrolimus. Tacrolimus, a macrolide compound isolated from *Streptomyces tsukubaensis*, is 10 to 100 times more potent than cyclosporine A [37]. In clinical kidney transplantation resulted tacrolimus immunosuppression when compared with cyclosporine therapy in significantly reduced risk of graft failure, without an increase in the incidence of adverse events associated with long-term immunosuppression [38]. Moreover, it was proven that tacrolimus (5.0 mg/kg/day, intramuscular application, blood concentrations not determined) was able to enhance the viability and cellular integrity characteristics of the donor cells in cryopreserved thoracic aortas transplanted between Brown-Norway and Lewis rats [39].

All these facts about immunogenicity of arterial allografts, tacrolimus-based immunosuppression and our good results with triple immunosuppression in patients after simultaneous organ and vascular transplantation [40] led our group to study the immunosuppressive protocol with tacrolimus after rat cold-stored abdominal aortic transplantation in 2002 [13]. Subsequently in 2004, we started to use in patients after replacement of infected vascular prosthesis or stentgraft with cold-stored arterial allograft a standardized immunosuppressive protocol consisting of orally administered tacrolimus [4]. The drug is administered from day 7 after transplantation and is given throughout the entire period of allograft patency. The usual starting dose is 6 mg/day. The usual maintenance daily dose is 2 mg/day, respectively. The tacrolimus blood levels are determined periodically with blood concentration range between 4 and 7 ng/mL. No significant adverse effects of immunosuppression were observed in these patients.

In the present experiment we didn't observed any clinically significant adverse effects of immunosuppression with tacrolimus given intramuscularly in daily doses of 0.2 mg/kg/day. However, the postoperative weight increase in rats with administration of tacrolimus from day 1 after transplantation was significantly lower as in rats without immunosuppression or with delayed administration of immunosuppression.

In the study of tacrolimus induced hypertension of Takeda et al [41] the rats have obtained tacrolimus (5.0 mg/kg/day, peroral application, blood concentrations not determined) for 4 weeks. No surgery procedure was performed in this study. No significant differences in body weight at 4 weeks was observed in comparison with no treated rats. In the another toxicological study of tacrolimus in the Lewis rats with no surgery [42] led the tacrolimus therapy (4.0 mg/kg/day, peroral application, blood concentrations not determined) to initial loss of body weight in the 30 day follow-up period.

In the work of Azuma et al. resulted doses of 1.0 mg/kg/day (intramuscular application, blood concentrations not determined) in rats after aortal transplantation in adverse effects such as diarrhea and weight loss. In the followed aortal transplantation experiments was the daily dosis of tacrolimus fixed at 0,2 mg/kg/day. However, no blood levels of tacrolimus was measured in this study as well [18].

In our first experimental work with tacrolimus immunosuppression after cold-stored abdominal aortic transplantation in rats was the daily dosis of tacrolimus given intramuscularly fixed on 0.2 mg/kg/day. The plasma concentration of tacrolimus on day 30 after transplantation was 5.0 ± 0.7 ng/mL. This protocol showed good immunosuppressive effect on acute cell- and antibody-mediated rejection of cold-stored aortal grafts with no clinically manifested adverse effects [13,14].

Our clinical immunosuppressive protocol in patients with vascular prosthesis infection treated by transplantation of cold-stored arterial allografts consists of orally administered tacrolimus given from day 7 after transplantation. The usual starting dose of tacrolimus is 6 mg/day. The usual maintenance daily dose is 2 mg/day, respectively. The tacrolimus blood

levels are determined periodically with blood concentration range between 4 and 7 ng/mL. No significant adverse effects of tacrolimus immunosuppression were observed in those patients [4].

In this study we confirmed possibility to delaying of low dose tacrolimus therapy after cryopreserved rat abdominal aortic transplantation for 7 days without negative effect on their acute cell- and antibody-mediated rejection. In the rat heart allograft transplantation model rescued tacrolimus (1.28 mg/kg, intramuscular application, blood concentrations not determined) given only on day four, five and six after transplantation all grafts and prolonged significantly survival of heart allografts [43]. In addition, in the rat cold-stored carotid transplantation model suppressed the low-dose of tacrolimus (0.2 mg/kg/day, intramuscular application, blood concentrations not determined) immunologic reaction even with administration starting on day 3 after transplantation [18]. However cessation of the use of tacrolimus led to severe rejection of transplanted carotids with dense cell infiltration in adventitia and medial degeneration within 14 days.

The possibility of delaying immunosuppression was studied in cold-stored thoracic aorta to abdominal aorta transplantation model in mice as well [30]. The monotherapy with everolimus (mammalian target of rapamycin inhibitor) reduced in daily doses of 0.05 mg/kg (intraperitoneal application, blood concentration of 10 ± 1.0 ng/mL) the formation of transplant arteriosclerosis on day 30 when therapy was only started on postoperative days 7 or 14. In addition, delayed combined treatment with everolimus (0.05 mg/kg/day, intraperitoneal application, blood concentration of 10 ± 1.0 ng/mL) and clopidogrel (1 mg/kg/day, intraperitoneal application) administrated from day 7 or 14, reduced further the formation of transplant arteriosclerosis on day 30 after transplantation.

The antiplatelet therapy was in recipients of cryopreserved aortal allografts in our experiment not administered. However, in our clinical practice is the antiplatelet therapy in patients after cryopreserved arterial transplantation administered routinely.

In the end may this fact theoretically contribute to an increase in the immunosuppressive effect of tacrolimus in this specific patient population.

In the recently published work of Konrad H. et al was clearly demonstrated that cryopreserved arterial allografts used in clinical practice are highly immunogenic in terms of an HLA-directed immune response. This allogeneic immune response does not lead to an acute graft loss but to a chronic vascular degeneration process with clinically apparent thromboses with subsequent medical interventions up to amputations [9]. The low dose immunosuppression with sirolimus (mammalian target of rapamycin inhibitor) did not show any affective influence on antibody-mediated rejection of these cryopreserved arterial allografts. However, closely specification of this immunosuppressive protocol in towards to dosage, timing and blood concentration was not mentioned in this publication.

Our present study shows induction of donor specific anti MHC I and anti MHC II production in non-immunosuppressed recipients of cryopreserved aortal allografts during the 30 day follow-up period. Both immunosuppressive protocols with low-dose tacrolimus were sufficient to suppress this antibody production. The massive donor specific alloantibody response in mice recipients of cold-stored thoracic aortic allografts during the 30 day follow-up period was observed in the work of Heim et al. as well [30]. The delayed therapy with everolimus alone (0.05 mg/kg/day, intraperitoneal application, blood concentration of 10 ± 1.0 ng/mL) or in combinations with clopidogrel (1 mg/kg/day, intraperitoneal application) reduced the amount of donor-specific antibodies even if therapy was started on day 7 or on day 14. In our previous work we confirmed the suppressive effect of tacrolimus (0.2 mg/kg/day, intramuscular application from day 1 after transplantation, blood concentration of 5.57 ± 0.96 ng/mL) on donor specific antibody production in rats recipients of venous allografts as well [44].

In conclusion we have shown that low dose tacrolimus therapy was effective to suppress cell- and donor-specific antibody-mediated rejection of cryopreserved abdominal aortic allografts. We believe that clinical use of presented tacrolimus-based immunosuppressive protocol increase the success of the clinical program of cryopreserved alloarterial transplantation in the treatment of vascular prosthesis and stentgrafts infection in the Czech Republic.

Supporting information

S1 File. In this file there are all basic data regarding number of animals weight on the day 30, cold ischaemic time of transplanted grafts, cryoconservation time, thickness of tunica media on the day 30, number of CD 4 positive cells, as well as number of CD 8 positive cells, tacrolimus concentration and comparison between groups are available [S1 Table]. (XLS)

Author Contributions

Conceptualization: Pavel Mericka, Ivan Matia, Miroslav Spacek.

Data curation: Rudolf Spunda, Jan Hruby, Kathrin Splith, Moritz Schmelzle, Felix Krenzien, Ivan Matia, Miroslav Spacek.

Formal analysis: Jan Hruby, Ondrej Pecha, Ivan Matia.

Funding acquisition: Mikulas Mlcek, Miroslav Spacek.

Investigation: Rudolf Spunda, Jan Hruby, Pavel Mericka, Mikulas Mlcek, Kathrin Splith, Moritz Schmelzle, Felix Krenzien, Ivan Matia.

Methodology: Pavel Mericka, Mikulas Mlcek, Ondrej Pecha, Ivan Matia, Miroslav Spacek.

Project administration: Jaroslav Lindner, Ivan Matia, Miroslav Spacek.

Resources: Mikulas Mlcek, Moritz Schmelzle, Jaroslav Lindner, Miroslav Spacek.

Software: Ondrej Pecha.

Supervision: Pavel Mericka, Jaroslav Lindner, Ivan Matia, Miroslav Spacek.

Validation: Rudolf Spunda, Jan Hruby, Kathrin Splith, Ivan Matia.

Visualization: Jan Hruby, Kathrin Splith, Felix Krenzien.

Writing – original draft: Rudolf Spunda.

Writing – review & editing: Ondrej Pecha, Ivan Matia, Miroslav Spacek.

References

1. Kieffer E, Gomes D, Chiche L, Fieron MH, Koskas F, Bahnini A. Allograft replacement for infrarenal aortic graft infection: early and late results in 179 patients. *J Vasc Surg.* 2004; 39(5):1009–17. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2003.12.040> PMID: 15111853
2. Pupka A, Skora J, Janczak D, Plonek T, Marczak J, Szydelko T. In Situ Revascularisation with Silver-coated Polyester Prostheses and Arterial Homografts in Patients with Aortic Graft Infection—A Prospective, Comparative, Single-centre Study. *Eur J Vasc Endovasc.* 2011; 41(1):61–7.
3. Bahnini A, Ruotolo C, Koskas F, Kieffer E (1991) In situ fresh allograft replacement of an infected aortic prosthetic graft: eighteen months' follow-up. *J Vasc Surg* 14: 98–102. PMID: 2061963
4. Matia I, Adamec M, Janousek L, Lipar K, Marada T, Klein D, et al. [Clinical experience with cold-preservation of venous and arterial allografts. long-term outcomes]. *Rozhl Chir.* 2010; 89(1):45–54. PMID: 21351404

5. Sebesta P, Stadler P, Sedivy P, Zdrahal P, El Samman K, Jindrak V, et al. [Radical operation of infected aortofemoral prosthesis using fresh arterial allograft: our mid-term experience]. *Rozhl Chir.* 2011; 90(1):4–13. PMID: 21634128
6. Fellmer P, Matia I, Tautenhahn H-M, Jonas S (2011) [Effect of legal regulations on the use of fresh arterial homografts. Problems in clinical practice]. *Gefäßschirurgie* 16: 403–406.
7. Špaček M., Měříčka P., Janoušek L. et al. Organization model for allotransplantations of cryopreserved vascular grafts in Czech Republic. *Cell Tissue Bank* (2018). <https://doi.org/10.1007/s10561-018-9691-4>
8. Mirelli M, Stella A, Faggioli GL, Scolari MP, Iannelli S, Freyrie A, et al. Immune response following fresh arterial homograft replacement for aortoiliac graft infection. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1999; 18(5):424–9. <https://doi.org/10.1053/ejvs.1999.0936> PMID: 10612643
9. Konrad H et al. Strong humoral anti-HLA Immune Response Upon Arbitrarily Chosen Allogeneic Arterial Vessel Grafts. *J Clin Cell Immunol* 2017, 8:525
10. Matia I, Adamec M, Varga M, Janousek L, Lipar K, Viklicky O. Aortoiliac reconstruction with allograft and kidney transplantation as a one-stage procedure: long term results. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2008; 35(3):353–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2007.09.022> PMID: 18065247
11. da Gama AD, Sarmento C, Vieira T, do Carmo GX. The use of arterial allografts for vascular reconstruction in patients receiving immunosuppression for organ transplantation. *J Vasc Surg.* 1994; 24(2):271–8. PMID: 8040952
12. Sebesta P, Stadler P, Sedivy P, Bartik K. The seven-year secondary patency of a fresh arterial allograft in the femorocrural position in a heart transplant recipient. *Annals of vascular surgery.* 2010; 24(7):953 e7–e10.
13. Matia I, Lodererova A, Adamec M. Delayed administration of FK 506 is sufficient to suppress acute rejection changes after aortal transplantation in rats. *Transpl Int.* 2007; 20(4):371–80. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2006.00446.x> PMID: 17326778
14. Matia I, Fellmer P, Splith K, Varga M, Adamec M, et al. (2014) Immunosuppressive protocol with delayed use of low-dose tacrolimus after aortic transplantation suppresses donor-specific anti-MHC class I and class II antibody production in rats. *Ann Transplant* 19: 225–232. <https://doi.org/10.12659/AOT.889870> PMID: 24815872
15. Měříčka P, Špatenka J, Navrátil P. Organization and surgical technique of the tissue harvest in multi-organ harvests. In: Baláz P, Janek J, Adamec M (eds.). *Organ harvest for transplantation.* Karolinum: Prague 2011: 240–251 [In Czech].
16. Měříčka P., Straková H., Štěrba L., Schustr P., Vinš M.: Cryobank of the Tissue Establishment University Hospital Hradec Králové—Design and 10 year Experience of Operation, The thirteen Cryogenics 2014, IIR International Conference Proceedings, Icaris, Ltd. Prague, 2014, p. 177–182.
17. van Herck H, Baumans V, Brandt CJ, Hesp AP, Sturkenboom JH, van Lith HA, van Tintelen G, Beynen AC. Orbital sinus blood sampling in rats as performed by different animal technicians: the influence of technique and expertise. *Lab Anim.* 1998 Oct; 32(4):377–86. <https://doi.org/10.1258/002367798780599794> PMID: 9807751
18. Azuma N, Sasajima T, Kubo Y (1999) Immunosuppression with FK506 in rat arterial allografts: fate of allogeneic endothelial cells. *J Vasc Surg* 29: 694–702. PMID: 10194498
19. Vickery CM, McCombs HL, Warren R (1965) Experimental Small-Artery Grafts in Dogs Treated with Immunosuppressive Drugs. *N Engl J Med* 272: 325–331. <https://doi.org/10.1056/NEJM196502182720701> PMID: 14239113
20. Todd IA, Bactor ZN (1966) Experimental homotransplantation of arteries. *Transplantation* 4: 123–130. PMID: 5934344
21. Williams GM, ter Haar A, Krajewski C, Parks LC, Roth J (1975) Rejection and repair of endothelium in major vessel transplants. *Surgery* 78: 694–706. PMID: 1188613
22. Schmitz-Rixen T, Megerman J, Colvin RB, Williams AM, Abbott WM (1988) Immunosuppressive treatment of aortic allografts. *J Vasc Surg* 7: 82–92. PMID: 3257275
23. Gregory CR, Huie P, Billingham ME, Morris RE (1993) Rapamycin inhibits arterial intimal thickening caused by both alloimmune and mechanical injury. Its effect on cellular, growth factor, and cytokine response in injured vessels. *Transplantation* 55: 1409–1418. PMID: 8516827
24. Lemstrom K, Bruning J, Koskinen P, Bruggeman C, Lautenschlager I, et al. (1994) Triple-drug immunosuppression significantly reduces chronic rejection in noninfected and RCMV-infected rats. *Transplant Proc* 26: 1727–1728. PMID: 8030105
25. Hullett DA, Geraghty JG, Stoltenberg RL, Sollinger HW (1996) The impact of acute rejection on the development of intimal hyperplasia associated with chronic rejection. *Transplantation* 62: 1842–1846. PMID: 8990374

26. Lacha J, Rossmann P, Lodererova A, Havliekova J, Vitko S (2000) LF 08–0299 in the prophylaxis and treatment of chronic rejection in a rat aortic allograft model. *Transpl Int* 13 Suppl 1: S565–567.
27. Nikolova Z, Hof A, Rudin M, Baumlín Y, Kraus G, et al. (2000) Prevention of graft vessel disease by combined FTY720/cyclosporine. A treatment in a rat carotid artery transplantation model. *Transplantation* 69: 2525–2530. PMID: 10910272
28. Ouyang J, Xu D, Zhang X, Qi S, Ma A, et al. (2005) Effect of a novel inducible nitric oxide synthase inhibitor in prevention of rat chronic aortic rejections. *Transplantation* 79: 1386–1392. PMID: 15912108
29. Eckl S et al. Combination of clopidogrel and everolimus dramatically reduced the development of transplant arteriosclerosis in murine aortic allografts. *Transpl Int* 23 (2010) 959–966. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2010.01072.x> PMID: 20230539
30. Ch Heim. Et al: Delayed therapy with clopidogrel and everolimus prevents progression of transplant arteriosclerosis and impairs humoral alloimmunity in murine aortic allografts. *EJCTS* 47(2015) 180–187
31. Harlander-Locke MP, Harmon LK, Lawrence PF, Oderich GS, McCreedy RA, et al. (2014) The use of cryopreserved aortoiliac allograft for aortic reconstruction in the United States. *J Vasc Surg* 59: 669–674 <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2013.09.009> PMID: 24239113
32. Spunda R. et al. Cold-stored arterial allografts for in situ reconstruction of infected prosthetic grafts. Review of immunosuppressive protocols used in clinical practice. *Eur Surg* (2016) 48 (Suppl2):S166–S168
33. Freguin-Bouillard C, Godin M, Bellien J, Richard V, Remy-Jouet I, et al. (2011) Protective effect of mycophenolate mofetil on endothelial function in an aortic allograft model. *Transplantation* 91: 35–41 <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181fe12d6> PMID: 21441851
34. Tepperman E, Ramzy D, Prodder J, Sheshgiri R, Badiwala M, et al. (2010) Surgical biology for the clinician: vascular effects of immunosuppression. *Can J Surg* 53: 57–63 PMID: 20100415
35. Khanna AK, Hosenpud JS, Plummer MS, Hosenpud JD, et al. Analysis of transforming growth factor-beta and profibrogenic molecules in a rat cardiac allograft model treated with cyclosporine. *Transplantation* 2002; 73: 1543. PMID: 12042638
36. Mennander A, Paavonen T, Hayry P. Cyclosporine-induced endothelialitis and accelerated arteriosclerosis in chronic allograft rejection. *Transplant Proc* 1992; 24: 341–45 PMID: 1539306
37. Goto T. et al. FK 506:historical perspectives. *Transplant Proc.*1991, 23:2713–2717 PMID: 1721254
38. Vincenti F, Jensik SC, Filo RS, Miller J, Pirsch J (2002) A long-term comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine in kidney transplantation: evidence for improved allograft survival at five years. *Transplantation* 73: 775–782. PMID: 11907427
39. Kiji T. et al: Enhancement of cell viability in cryopreserved rat vascular grafts by administration of regenerating gene (REG) inducers. *J Vasc Res*, 2003 Mar-Apr; 40(2):132–9. <https://doi.org/10.1159/000070710> PMID: 12808349
40. Adamec M, Matia I, Janousek L, et al. Renal transplantation in patients with abdominal aortic aneurysm—a new surgical approach. *Transpl Int* 2004; 17: 647 PMID: 15480566
41. Takeda Y. et al. Mechanism of FK506-Induced Hypertension in the rat, *Hypertension*. 1999; 33:130–136. PMID: 9931093
42. Nalesnik et al. Toxicology of FK-506 in the Lewis rat. *Transplant proc.* 1987, 19 (5 Suppl 6):89–92. PMID: 2445084
43. Murase N and Todo S and Lee PH and Lai HS and Chapman F and Nalesnik MA and Makowka L and Starzl TE (1987) Heterotopic heart transplantation in the rat receiving FK-506 alone or with cyclosporine. *Transplant Proc.* 19 (5 Suppl). 71–75. ISSN 0041-1345
44. Splith et al. Antibody-mediated rejection of arterialed venous allografts is inhibited by immunosuppression in rats. *PLoS One*. 2014 Mar 11; 9(3):e91212. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091212> eCollection 2014 Plos one PMID: 24618652

9.3. Příloha III



Comparison of Different Thawing Protocols in Human Cryopreserved Venous Grafts

Miroslav Špaček,¹ Pavel Měříčka,² Libor Janoušek,³ Markéta Dalecká,⁴ Aleš Benda,⁴ Otakar Krs,⁵ Dáša Šližová,⁵ Rudolf Špunda,¹ Jan Hrubý,¹ Ivan Matia,⁶ Barbora Honegrová,² and Jaroslav Lindner,¹ Prague, and Králové, Czech Republic, and Vienna, Austria

Background: The aim of our study was to assess the impact of different thawing protocols on morphological changes arising in cryopreserved human saphenous vein grafts.

Methods: The study was performed in 12 saphenous vein grafts harvested in brain death donors. Storage in the vapor phase of liquid nitrogen for 3 or 5 years followed. Two thawing protocols were tested: slow thawing in a refrigerator at temperature +4°C for 2 hr and rapid thawing—in a water bath at +37°C. Grafts were processed for scanning electron microscopy. Comparisons of continuous parameters under study between experimental groups were performed using the *t*-test (age, cold ischemia time, exposure to cryoprotectant, time of storage, total thawing time, mean thawing rate, morphology scoring of thawed HSVG) and the median test (HSVG length). Categorical parameters (sex and blood group) were formally tested using the chi-square test.

Results: All samples were evaluated according to morphological changes and scored in terms of morphologically intact endothelium, confluent endothelium with structural inhomogeneity, disruption of the intercellular contacts, separation of the endothelial cells, complete loss of the endothelium, and damage of the subendothelial layers. There is no statistically significant difference between the sample sets at the significance level of 0.05. There was no association with donors' age, sex, and time of storage.

Statement of Ethics: The research was conducted ethically in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical approval was not required.

Disclosure Statement: The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding Sources: The work was supported by the project Progres Q38, grant SVV–2019–260 372 and Internal grant of General University Hospital, Prague, Czech Republic. We acknowledge the Imaging Methods Core Facility at BIOCEV, supported by the Czech-BioImaging large RI projects (LM2015062 funded by MEYS CR) for their support with obtaining SEM data presented in this paper. M.D. and A.B. acknowledge European Regional Development Fund-Project 'Modernization and support of research activities of the national infrastructure for biological and medical imaging Czech-BioImaging' (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001775).

Author Contributions: All authors fulfilled authorship criteria as defined by ICMJE Criteria for Authorship. M.Š., P.M., L.J. reviewed literature and wrote the manuscript. J.L. and I.M. reviewed literature, advised, edited, and reviewed the manuscript. R.S. and J.H. provided ideas and tables, images, and reviewed the manuscript. M.D. and A.B. made EM scans. O.K. and D.S. evaluated scans and scored samples. M.Š., P.M., and B.H. cooperated on freezing and thawing of HSVG samples.

¹2nd Department of Surgery-Department of Cardiovascular Surgery, 1st Medical Faculty, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic.

²Tissue Bank University Hospital Hradec, Hradec Králové, Czech Republic.

³Department of Transplantation Surgery, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

⁴Imaging Methods Core Facility at BIOCEV, Faculty of Science, Charles University in Prague, Kralove, Czech Republic.

⁵Department of Anatomy, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, Hradec Králové, Czech Republic.

⁶Department of Cardio-Vascular Surgery, Nord Hospital and Karl Landsteiner Institute for Cardio-Vascular Research, Vienna, Austria.

Correspondence to: Miroslav Špaček, MD, PhD, 2nd Department of Surgery-Department of Cardiovascular Surgery, 1st Medical Faculty, Charles University and General University Hospital, U Nemocnice 2, Praha 2, Prague, 128 08 Czech Republic; E-mail: miroslav.spacek@vfn.cz

Ann Vasc Surg 2020; 64: 347–354
<https://doi.org/10.1016/j.avsg.2019.11.026>

© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.
Manuscript received: September 24, 2019; manuscript accepted: November 12, 2019; published online: 16 November 2019

Conclusions: Human cryopreserved saphenous vein grafts in our experimental work showed no difference in terms of structural deterioration of the endothelial surface and basal membrane depending on different thawing protocols used.

INTRODUCTION

Long-term storage of cardiovascular grafts in cryobanks was started before the end of the last millennium. Development of storage of vascular tissue in these banks was stimulated in the first decade of the new millennium by the issue of EU Directives and national harmonized norms such as Act. No 296/2008 Coll. in the Czech Republic or the Tissue Act in FRG aimed on assurance of high quality and safety of cells and tissues used for transplantation in a human.^{1,2} This law caused radical change in standard procedures used in the tissue banks, including harvest and processing of vascular tissue.

Cryopreserved saphenous vein grafts are used worldwide for infrainguinal bypass grafting in patients with lack of autologous conduits, which is unavailable in up to 20% of patients.³ Although these grafts are associated with poor mid- and long-term patency, limb salvage rates in 1 and 2 years are acceptable.³ Limited patency rates suggest that the optimal selection of patients is needed to achieve clinical benefit. A significant risk factor associated with 30-day failure is ABO mismatch.⁴ Another limited, but feasible, alternative is to use homologous venous grafts for portal vein-superior mesenteric vein reconstruction during pancreatoduodenectomy for advanced pancreatic head cancer or for venous reconstruction in liver resection surgery.^{5,6}

Although not all questions regarding immunogenicity and optimal management have been solved, extensive research of both basic and clinical issues is being processed in recent years.^{7,8} This brings also practical impacts into clinical practice such as management of thawing procedures.^{9,10}

There are different thawing protocols for cryopreserved vascular grafts recommended in clinical practice. Most widely used Cryolife protocol using 37–42°C water bath may result in overall structural damage compared to thawing at room temperature in human aortic root allografts arterial wall.⁹ Large experimental data or recommendations for thawing protocols in human saphenous vein grafts are missing.

METHODS

The study was a part of standard validation of expiry time required by the harmonized Czech legislation

Act No 296/2008 Coll, Decree of the Ministry of Health No. 422/2008 Coll. and Internal Rule of the State Institute for Drug Control No. VYR 39 version 3 from February 10, 2018. The obligation of the tissue establishment to prove stability during the whole shelf life of the product is mentioned in Section 2.2.4 c of this rule. The inclusion criteria for donors were set by the Decree of the Ministry of Health and internal rules of the Tissue and Procurement Establishments: absence of systemic infections at the moment of donation, absence of malignant disease, absence of poisoning, no positivity in tests anti-HIV1, 2, HIV 1Ag, HTLV I, II, HBsAg, anti-HCV, RRR, TPHA, no pathological or post-traumatic changes of the vessel to be procured.

Allograft Processing and Cryopreservation Protocol

The study was performed in 12 HSVG harvested in brain death donors (multiorgan harvest) and sent to the tissue establishment EU TE CODE CZ 000427 (TE) in the cooled (+4°C) organ preservation solution (Celsior, Genzyme, The Netherlands) supplemented with Gentamycin and closed into sterile certified plastic jars (Medfor 250 mL Farnborough, UK). All allografts were harvested in the operation theater in patients that were organ donors and were pronounced clinically dead with compliance to the Czech Republic's transplant law.^{1,2} The jars were transported to the TE at the temperature of melting ice within 12 hr after the harvest together with the documentation of the harvest and samples of the donor's blood for performing serology tests in the licensed diagnostic laboratories. (Table I).

After input control in the TE, the grafts were processed in the clean room of grade A with the background B. After decontamination by a modified method of van Katz,¹¹ the vessels were put into double sterile disposable plastic bags (Eva Bags, Maco Biotech, France) containing 50 mL of precooled 6% solution of hydroxyethyl starch. m.w. 13,000 Da (Voluven 6%, Fresenius Kabi, FRG) and mixed with an equal volume of the precooled cryoprotective solution: 20% dimethylsulfoxide (WAK-Chemie Medical, GmbH, FRG). The samples of the solution for bacteriological and mycological tests were taken from the collection solution and from the final package. The plastic bags were closed by heat sealing. The bags closed into outer metal

Table I. Basic data on donors, collected tissue and processing before freezing

Thawing protocol I					
Randomized graft number	Age (years)	Sex	Blood group	HGSV length (cm)	Cold ischemia time (hr)
1	44	M	O, Rh-	50	17
2	18	M	A, Rh+	35	20
7	28	M	A, Rh+	60	12
8	61	M	O, Rh+	59	14
12	52	M	O, Rh+	65	15.5
9	18	M	A, Rh+	54	20
Mean	36.8	NA	NA	53.8	16.4
SD	16.6	NA	NA	9.7	3.0
Median	36.0	NA	NA	56.5	16.3
Thawing protocol II					
Randomized graft number	Age (years)	Sex	Blood group	HGSV length (cm)	Cold ischemia time (hr)
3	21	M	O, Rh+	47	15
4	51	M	O, Rh+	60	14
5	47	M	AB, Rh+	59	9
6	17	M	A, Rh+	28	20
11	41	F	O, Rh+	60	23
10	52	F	O, Rh+	60	15.5
Mean	38.2	NA	NA	52.3	16.1
SD	14.1	NA	NA	11.8	4.5
Median	44.0	NA	NA	60.0	15.3

NA, not applicable; HGSV, human great saphenous vein.

cassettes were put into the freezing chamber of the programmable freezer and freezing by the rate of 1 K/min to -90°C , -5K (/min to -150°C followed).^{12,13}

Storage in the vapor phase of liquid nitrogen for three or five years in the biological container KRYO CE 10K, Taylor Wharton, with automatic filling system and continuous temperature monitoring followed. Grafts selected for the study did not meet the criterion of sterility; other criteria required for clinical application were met. After thawing and removal from the cryoprotective solution, the grafts were sent to the Imaging Methods Core Facility in the cooled ($+4^{\circ}\text{C}$) organ preservation solution (Custodiol CE, Dr. Franz Kohler Chemie, GmbH, FRG).¹⁴ The samples were randomized for choosing thawing protocol no. 1 or no. 2.

Thawing Protocols

Experimental work was based on investigating 12 HSVGs randomly divided into 2 groups, each consisting of 6 samples. All allografts were thawed in their original packaging (packed by a double-layer technique and immersed in a cryoprotective

solution containing 10% dimethylsulfoxide). Two thawing protocols were tested:

Protocol 1—slow thawing routinely used in clinical practice: 6 human cryopreserved saphenous vein grafts thawed at a refrigerator $+4^{\circ}\text{C}$. Thawing times were as follows: median of 120 min.

Protocol 2—rapid thawing: 6 human cryopreserved saphenous vein grafts were placed directly into a water bath at $+37^{\circ}\text{C}$ and warming was stopped at the moment when the last remnants of ice disappeared. Thawing times were as follows: minimum 4:20 min, maximum 9, median of 5 min (Table II).

Specimen Preparation for (Scanning) Electron Microscopy

Grafts were processed for scanning electron microscopy (SEM) in the Imaging Methods Core Facility. The specimens for SEM were prepared immediately after the thawing procedure and transport. All grafts were cut by razor into 1-cm long segments and fixed for 24 hr in mixture of 2.5% glutaraldehyde and 2% formaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer. Before postfixation in 1% osmium tetroxide, the specimens were cut into smaller pieces by longitudinal cut.

Table II. Data on tissue processing, storage, thawing, and results of scoring of the morphological changes

Thawing protocol I					
Randomized graft number	Exposure to cryoprotectant (min)	Time of storage (years)	Total thawing time (min)	Mean thawing rate (°C/min)	Morphology scoring of thawed HGSV
1	15	5	5	39.6	4
2	20	5	4	49.5	3
7	20	5	5	39.6	6
8	15	5	5	39.6	6
12	25	3	9	22	4
9	20	5	4	49.5	3
Mean	19.2	4.7	5.3	40.0	4.3
SD	3.4	0.8	1.7	9.2	1.3
Median	20.0	5.0	5.0	40.0	4.0
Thawing protocol II					
Randomized graft number	Exposure to cryoprotectant (min)	Time of storage (years)	Total thawing time (min)	Mean thawing rate (°C/min)	Morphology scoring of thawed HGSV
3	20	5	120	1.65	3
4	15	5	120	1.65	6
5	20	5	120	1.65	3
6	20	5	120	1.65	5
11	25	5	120	1.65	6
10	25	3	120	1.65	4
Mean	20.8	4.7	120	1.7	4.5
SD	3.4	0.8	0.0	0.0	1.7
Median	20.0	5.0	120.0	1.7	4.5

HGSV, Human great saphenous vein.

After dehydration in a graded ethanol series and final transfer into 100% acetone, they were processed by a critical-point drying process in Leica CPD300 with CO₂ (critical-point dryer). The specimens were mounted on regular SEM stubs using conductive carbon and coated with 7 nm of platinum in a Leica ACE600 (sputter coater). They were observed in FEI Helios NanoLab 660 G3 UC scanning electron microscope. SEM images were acquired at 1 kV accelerating voltage and current 0.1 nA using an Everhart–Thornley detector (ETD) detecting secondary electrons.

Evaluation of Morphological Changes

Scoring system

1. Morphologically intact endothelium—putative physiological changes are not reflected in the superficial morphology of the endothelial cells.
2. Confluent endothelium with structural inhomogeneity—irregularities in the form of individual cells and changes of their membranes are detectable.

3. Disruption of intercellular contacts—continuity of endothelial coverage is lost, endotheliocytes shrink while still adhering to basal membrane.
4. Separation of endothelial cells—endotheliocytes separate from the basal lamina. Initially, they protrude by their intercellular edges into the lumen.
5. Complete loss of endothelium—denudation of the endothelial covering with the basal lamina exposed.
6. Damage of subendothelial layers—the luminal surface is covered only by remnants of basal membrane, deeper fibrous structure may be dissolved.

STATISTICAL ANALYSIS

The values in the text and tables are expressed as the mean ± standard deviation (SD) and median. Comparisons of continuous parameters under study between experimental groups were performed using the *t*-test and the median test. Categorical parameters were formally tested using the chi-square test.

P-values of these comparisons are presented, and *P* < 0.05 was considered as statistically significant.

RESULTS

Basic Allograft Characteristics

There were 12 HSVG samples analyzed. Basic characteristics on donors, collected tissue, and processing before freezing are shown in Table I. There was no statistically significant difference in terms of donors' age, time of cold ischemia of the graft before cryopreservation, or time of storage at liquid nitrogen temperatures. The mean thawing rate was calculated for the temperature range -194 till $+4^{\circ}\text{C}$.

Histological Analysis of the Human Saphenous Vein Grafts Wall

Thawing protocol 1 (thawing in a refrigerator $+4^{\circ}\text{C}$). One-third of samples (2/6) showed disruption of the continuity of endothelial coverage, with mostly intact endothelium on the majority of surface (Score 3)—Figure 1. Initial separation of endotheliocytes was seen in one-third of samples (2/6) with shrinking and commencing separation of endothelial cells, patchy losses of endothelia with no damage to the basal lamina (Score 4)—Figure 2. Complete loss of endothelial covering with damaged basal membrane exposing deeper fibrillar structures was seen in one-third of samples (2/6) (Score 6). It was usual that the same damage was visible throughout the vein examined. The microscopist had always examined several areas and selected the average damage in the sample for scanning.

Thawing Protocol 2 (Water Bath at $+37^{\circ}\text{C}$)

Very similar morphological changes were seen in the group 2. One-third of samples (2/6) showed morphologically almost intact endothelium or confluent endothelium with rare structural inhomogeneity (irregularities in the form of individual cells and changes of their membranes are detectable) with locally disrupted intercellular contacts (Score 3). In one sample, we detected protrusion of the intercellular edges of the endotheliocytes into the lumen (separation) (Score 4). In one case, there was complete loss of the endothelial covering with exposed basal lamina, but no subendothelial layers (Score 5), and once we have detected in this group deeper fibrous structures (Score 6), as we can demonstrate on Figure 3.

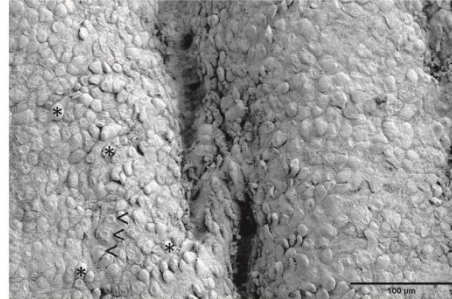


Fig. 1. Tiles of flat endotheliocytes completely cover luminal surface. Some of them are inflated (*asterisks*), some with central pits (*arrowheads*) giving probable evidence of low potassium level in outer environment. Randomized graft number 9.

The total score in both groups was 23 resp. 24 points (the sum of morphology scoring) for all 6 samples in each group, which shows very similar result in terms of morphological changes seen by the SEM after thawing.

We compared these findings to fresh saphenous vein grafts harvested during standard coronary artery bypass grafting procedure, with subsequent dilatation. These three samples were transported in Custodiol and within 24 hr prepared for electron microscopic scanning. We were surprised with the obtained results showing more damaged endothelial surface than thawed veins on average (Fig. 4). These results are not fully comparable (fresh samples were harvested and dilated by the surgeon during standard coronary artery bypass grafting procedure, using heparinized physiologic solution with blood. Standard protocol of harvest of saphenous vein grafts for cryopreservation includes the use of Custodiol CE, no touch recovery and no dilatation.) So, the samples were not evaluated statistically.

RESULTS OF THE STATISTICAL ANALYSIS

The values in the text and tables are expressed as the mean \pm SD and median in Tables I and II. Comparisons of continuous parameters under study between experimental groups were performed using the *t*-test (age, cold ischemia time, exposure to a cryoprotectant, time of storage, total thawing time, mean thawing rate, morphology scoring of thawed HSVG) and the median test (HSVG length). Categorical parameters (sex and blood group) were formally tested using the chi-square test. However, all



Fig. 2. Luminal surface in moderate condition. Shrinking and commencing separation of endothelial cells (*arrowheads*). Patchy losses of endothelia in the right lower quadrant (*asterisks*). Randomized graft number 11.

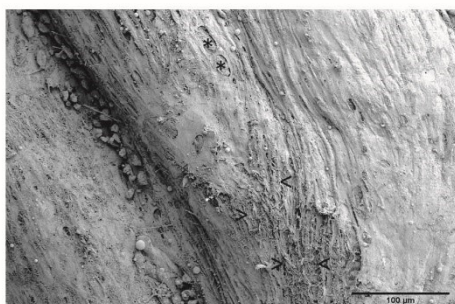


Fig. 3. Complete loss of endothelial covering with damaged basal membrane (*asterisks*) exposing deeper fibrillar structures (*arrowheads*). Randomized graft number 10.

frequencies must be greater than 5 for a 2 by 2 table. For a larger table, 80% of all cells may have frequency greater than 5 (and the rest at least 1). These assumptions were violated when $n = 12$. P -values of these comparisons are presented, and $P < 0.05$ was considered as statistically significant. Differences between groups are shown in [Table III](#) with adequate p -values.

DISCUSSION

The transplantation of fresh or cryopreserved vascular allografts in patients with a prosthetic graft infection or critical limb ischemia is necessary for their limb salvage and, in many cases, represents a life-saving procedure. While transplantation of fresh allografts has a long history in the Czech

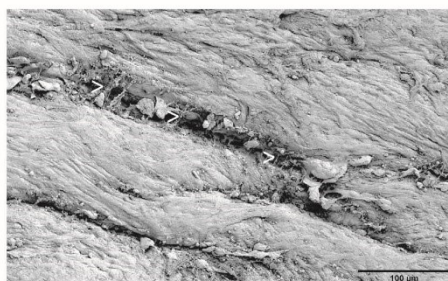


Fig. 4. Live sample for comparison—endotheliocytes are missing; here, there is no intrinsic damage of basal membrane. Longitudinal cracks with bridging fibers (*white arrowheads*) were caused by uncoiling the venous segment during preparation of specimen.

Republic, the standard use of cryopreserved vascular allografts was introduced into the clinical practice in 2011.^{1,2} Establishment of such a program into a clinical practice led to both basic and clinical research in terms of immunological response after transplantation, immunosuppressive treatment, and also to a simple and practical management of the graft during handling—comparison of thawing protocols.

In cryopreservation of cell suspensions, it is well proved that faster thawing results in higher viability of cryopreserved cells. In cryopreservation of solid tissues, the situation is more difficult, as the process must maintain original tissue integrity. In experiments on rabbit arteries, it was proved by the group of D. Pegg¹⁵ that rapid thawing caused microfractures of the artery wall. In a clinical situation, such finding may lead to early rupture of the transplanted artery. For this reason, it is necessary to find a compromise between preservation of cell viability and preservation of structural integrity of the cryopreserved tissue. The results of D. Pegg¹⁵ were confirmed recently in human arteries by Novotny.⁹ The data comparing slow and rapid thawing in venous grafts were lacking and are presented in this paper.

Different results in the extent of morphological damage between veins and arteries may be caused by differences in anatomical structures; crucial role may be played by the thickness of the media layer. There is practically no lamina elastica interna in the saphenous vein. The intima of the vein is lined with an endothelium differing from the endothelium of the arteries, in that the cells are not elongated in the direction of the vessel, but are rather irregularly polygonal or even wider than longer. Binding and elastic, very fine intimal filaments run

Table III. Difference between groups

Variable	P	Statistical test
Age (years)	0.893	<i>t</i> -test
Sex	0.121	Chi-square test ^a
Blood group	0.300	Chi-square test ^a
HGSV length (cm)	0.558	Median test
Cold ischemia time (hr)	0.892	<i>t</i> -test
Exposure to cryoprotectant (min)	0.458	<i>t</i> -test
Time of storage (years)	1.000	<i>t</i> -test
Total thawing time (min)	<0.001	<i>t</i> -test
Mean thawing rate (°C/min)	<0.001	<i>t</i> -test
Morphology scoring of thawed HGSV	0.837	<i>t</i> -test

^aFor a 2 by 2 table, all frequencies must be greater than 5. For a larger table, 80% of all cells may have frequency greater than 5 (and the rest at least 1). These assumptions were violated when $n = 12$.

longitudinally. Externally, the intima is bounded externally by a network of thicker, longitudinal elastic fibers that—but imperfectly—may represent an inner elastic blank; however, this blank is almost missing; so, there is no sharp border between the intima and the media. In the subendothelial layer of certain veins, there are bundles of longitudinal muscle fibers (v. saphena, v. iliaca, v. femoralis, v. umbilicalis, and many others).^{16,17} Pits found on the endothelial cells of Figure 4 are a manifestation of hypokalemia, which show that vessel endothelium and valves are very sensitive to environmental changes.

It must be pointed out, that the presented study was primarily focused on identifying microfractures and significant damage of basement membrane, which are crucial for good reendothelialization after transplantation and for prevention of blood clotting, which may lead to the graft failure. Long ‘cracks’ or trenches on electrograms are not ‘fractures’ or ‘cracks’ caused by thawing samples. They are fixative (after immersion in the fixation fluid, smooth muscle contraction occurs in the vessel wall) or preparative (longitudinal incision and deployment of the vessel into the surface) artifacts—this is particularly visible in Figure 3, where ‘bridging’ fibers are seen between 2 smooth muscle bundles at the depth of the vessel wall.^{13,18} We did not prove any microfractures with the methodology used.

M'Bengue-Gaye et al.¹⁹ in previous years clearly demonstrated that the cryopreservation technique in muscular vascular grafts (arterial) and consequent thawing have impact on both allografts' durability and clinical performance. Such damage can be

eliminated by manipulation of the rewarming process. Sample contractility is an important point of evaluation of morphological changes—the ability of contractile smooth muscle in the vessel wall could indicate tissue viability. Good preservation of viability of cells of HSVG after long-term storage was proven by our group recently.¹⁰ Thermal stresses develop in the frozen material as a result of differential thermal concentration and expansion described by Pegg,¹⁵ due to devitrification occurring in rapid thawing between -130 and -80°C . Clinical practices based on pioneering work of Pegg, Hunt, and Song^{15,18,20,21} and confirmed by our previous study of Novotny et al.⁹ recommend the slow thawing protocol for arterial grafts, and this opinion was widely adopted.

Special caution during surgical handling should be focused on no-touch harvest with both fresh and cryopreserved vein grafts (use of heparinized blood or Custodiol, no artificial dilatation, etc.)—Figure 4. Also, no-touch fast saphenous vein harvest during multiorgan retrieval may be advantageous in terms of vasa vasorum and subsequent endothelial preservation compared to standard or even minimally invasive surgical harvest.^{22–25}

CONCLUSION

Human cryopreserved saphenous grafts in our experimental work showed no difference in terms of structural deterioration of the endothelial surface and basal membrane depending on 2 different thawing protocols used. Different strength of media compared to human arteries, with less muscular cells and their impaired function, may play a key role in this process. There was no association with donors' age, sex and time of storage. Initial management of the graft including no-touch harvest, avoiding dilatation, preservation in Custodiol on 4°C , and immediate transport to TE facility for cryopreservation are essential to prevent structural deterioration of the graft, which may lead to unsatisfactory clinical results.²⁶ According to the published data, we do not plan to change the slow thawing protocol in our clinical practice. This paper presents our new results achieved in different veins thawing protocols and contributes to enlarging existing knowledge in the optimal management of cryopreserved allografts in clinical practice.

The authors would like to thank to Professor Pavel Martásek, head of BIOCEV, for support of this research. We also would like to thank Dr. Ondřej Pecha, Ph.D., Technology Center of

the Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic, for professional statistical analysis.

REFERENCES

- Špaček M, Měříčka P, Janoušek L, et al. Organization model for allotransplantations of cryopreserved vascular grafts in Czech Republic. *Cell Tissue Bank* 2018;19:437–45.
- Špaček M, Měříčka P, Janoušek L, et al. Current vascular allografts procurement, cryopreservation and transplantation technique in the Czech Republic. *Adv Clin Exp Med* 2019;28:529–34.
- Hartranft CA, Noland S, Kulwicki A, et al. Cryopreserved saphenous vein graft in infrainguinal bypass. *J Vasc Surg* 2014;60:1291–6.
- O'Banion LA, Wu B, Eichler CM, et al. Cryopreserved saphenous vein as a last-ditch conduit for limb salvage. *J Vasc Surg* 2017;66:844–9.
- Yamamoto M, Akamatsu N, Aoki T, et al. Safety and efficacy of cryopreserved homologous veins for venous reconstruction in pancreatoduodenectomy. *Surgery* 2017;161:385–93.
- Yamamoto M, Akamatsu N, Hayashi A, et al. Safety and efficacy of venous reconstruction in liver resection using cryopreserved homologous veins. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2017;24:511–9.
- Spunda R, Hruby J, Adamec M, et al. Cold-stored arterial allografts for in situ reconstruction of infected prosthetic grafts: review of immunosuppressive protocols used in clinical practice. *Eur Surg* 2016;48:166–8.
- Spunda R, Hruby J, Měříčka P, et al. Immunosuppressive protocols with tacrolimus after cryopreserved aortal allotransplantation in rats. *PLoS One* 2018;13:e0201984.
- Novotny R, Slizova D, Hlubocky J, et al. Cryopreserved human aortic root allografts arterial wall: structural changes occurring during thawing. *PLoS One* 2017;12:e0175007.
- Měříčka P, Špaček M, Janoušek L, et al. Assessment of viability of long-term stored cryopreserved allogeneic venous grafts using vital fluorescence dyes and confocal microscopy. *Cryo Letters* 2019 (in press).
- van Kats JP, van Tricht C, van Dijk A, et al. Microbiological examination of donated human cardiac tissue in heart valve banking. *Eur J Cardiothorac Surg* 2010;37:163–9.
- Goffin YA, Van Hoeck B, Jashari R, et al. Banking of cryopreserved heart valves in Europe: assessment of 10 years operation in the European Homograft Bank (EHB). *J Heart Valve Dis* 2000;9:207–14.
- Müller-Schweinitzer E. Cryopreservation of vascular tissues. *Organogenesis* 2009;5:97–104.
- Měříčka P, Špaček M, Janoušek L, et al. Cryopreservation of vascular grafts for clinical use: retrospective analysis of pre-freezing factors with potential impact on the quality and safety of vascular transplantations. *Cryobiology* 2015;71:546–7.
- Pegg DE, Wusteman MC, Boylan S. Fractures in cryopreserved elastic arteries. *Cryobiology* 1997;34:183–92.
- Langerak SE, Groenink M, van der Wall EE, et al. Impact of current cryopreservation procedures on mechanical and functional properties of human aortic homografts. *Transpl Int* 2001;14:248–55.
- Wolf J. *Histologie*. Praha, Czech Republic: Státní zdravotnické nakladatelství, 1966. p 382.
- Song YC, Khirabadi BS, Lightfoot F, et al. Taylor Vitreous cryopreservation maintains the function of vascular grafts. *Nat Biotechnol* 2000;18:296–9.
- M'Bengue-Gaye A, Fleury JP, Gerota J, et al. Transplantation of cryopreserved carotids in the rabbit: effect of cryoprotective agents. *Dakar Med* 1999;44:180–5.
- Hunt CJ, Song YC, Bateson EAJ, et al. Fractures in cryopreserved arteries. *Cryobiology* 1994;31:506–15.
- Song YC, Pegg DE, Hunt CJ. Cryopreservation of the common carotid artery of the rabbit: optimization of dimethyl sulfoxide concentration and cooling rate. *Cryobiology* 1995;32:405–21.
- Kopjar T, Dashwood MR. Endoscopic versus “No-touch” saphenous vein harvesting for coronary artery bypass grafting: a trade-off between wound healing and graft patency. *Angiology* 2016;67:121–32.
- Ahmed SR, Johansson BL, Karlsson MG, et al. Human saphenous vein and coronary bypass surgery: ultrastructural aspects of conventional and “no-touch” vein graft preparations. *Histol Histopathol* 2004;19:421–33.
- Dashwood MR, Tsui JC. ‘No-touch’ saphenous vein harvesting improves graft performance in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a journey from bedside to bench. *Vascul Pharmacol* 2013;58:240–50.
- Dreifaldt M, Souza D, Bodin L, et al. The vasa vasorum and associated endothelial nitric oxide synthase is more important for saphenous vein than arterial bypass grafts. *Angiology* 2013;64:293–9.
- Vogt PR, Zünd G, Lachat M, et al. Regarding “Early rupture and degeneration of cryopreserved arterial allografts”. *J Vasc Surg* 1998;27:189–90.



Cold-stored arterial allografts for in situ reconstruction of infected prosthetic grafts

Review of immunosuppressive protocols used in clinical practice

Rudolf Spunda · Jan Hruby · Milos Adamec · Martin Varga · Jaroslav Lindner · Ivan Matia · Miroslav Spacek

Received: 2 September 2015 / Accepted: 15 March 2016 / Published online: 4 May 2016
© Springer-Verlag Wien 2016

Abstract

Introduction Strong antigenicity of arterial allografts triggering immune response similar to rejection processes evident in solid organ transplant recipients was observed in animal experiments. A higher incidence of graft-related death, graft ruptures or thrombosis and graft aneurysm formation was observed in non-immunosuppressed patients after arterial implantation.

Methodology The use of immunosuppression is not generally accepted by vascular surgeons. In the cases in which immunosuppressive therapy is administered,

the drug most frequently used is cyclosporine A (CyA). This therapy has shown good mid-term results with no signs of recurrent infection. New immunosuppressive protocols with tacrolimus or sirolimus were published recently. These drugs are routinely used in solid organ transplant patients and show some advantages, compared to cyclosporine A, with respect to hypertension, dyslipidaemia, and renal function.

Results The authors present available clinical immunosuppressive protocols in this indication and the results. Moreover, our group has published good experimental and clinical results with immunosuppressive protocol featuring the delayed use of tacrolimus after transplantation of cold-stored arterial allograft.

Conclusion All this long-term experience with immunosuppression suggests the hypothesis that this therapy has a place in the armamentarium of the vascular surgeon performing arterial allograft implantations.

The supplement is dedicated to *Jubilee World congress of International College of Surgeons 2015*.

The publishing was sponsored by the Ministry of Health of the Czech Republic.

I. Matia and M. Spacek share senior authorship and have contributed equally to this work.

R. Spunda · J. Hruby · J. Lindner · M. Spacek (✉)
2nd Department of Surgery – Department of Cardiovascular Surgery, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic
e-mail: mirekspacek@seznam.cz

M. Adamec
The Czech Transplantations Coordinating Center, Prague, Czech Republic

M. Varga
Department of Surgery, Paracelsus Private Medical University of Salzburg, Salzburg, Austria

I. Matia
Department of Visceral, Transplant, Thorax and Vascular Surgery, University of Leipzig, Leipzig, Germany

I. Matia
Institute of Physiology, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

Keywords Vascular prosthesis infection · Stentgrafts infection · Arterial allografts · Immunosuppression · Tacrolimus

Introduction

Vascular prosthesis infection after aortoiliac reconstruction is one of the most severe complications that can occur in vascular surgery. Patients with this complication are mostly threatened by bleeding, sepsis, or the formation of aortoenteric fistulas. One of the recent types of management of this rare but life-threatening complication include the removal of the infected prosthetic graft followed by in-situ reconstruction with a cold-stored arterial allograft obtained during multiorgan harvest.

The use of cold-stored allografts started in the 1950s in the experimental work of Gutrie and Carrel; later in 1988 it was reintroduced by Kieffer et al. as surgical treatment of infrarenal aortic prosthetic graft infection. Later this technique was established in many vascular centers. Although in clinical praxis and animal experiments signs of immunological reaction against implanted cold-stored allografts have been found, the use of immunosuppression is not generally accepted by vascular surgeons. This is probably caused by the reluctance to use immunosuppressive treatment in patients with ongoing infection. It is also due to the relatively little experience with immunosuppressive therapy in vascular surgery centers, a lack of data/studies, and the small number of experimental studies in this field of vascular transplantations. In the cases in which immunosuppressive therapy is administered, the drug most frequently used is cyclosporine A (CyA). Recently published immunosuppressive protocols with tacrolimus or sirolimus, which are routinely used in solid organ transplants, show good immunosuppressive results with fewer side effects such as fibrotization of the graft wall, hypertension, or hyperlipidaemia.

Immunogenicity of cold-stored allografts

In animal experiments there were both cellular and humoral immunological reactions resulting from graft failure. These reactions include intimal proliferation, thickening of the tunica media, the presence of immunoglobulins in the muscular layer, and CD4, CD8 and MHC II cellular adventitial infiltration. Moreover, donor specific class I and class II anti MHC antibodies were found in the plasma of the recipients of cold-stored allografts. These findings were ascertained by histological and immunohistochemical screening. Allograft failure was mainly found in animals without immunosuppression. This failure manifests itself mainly as aneurysm formation or graft occlusion [1].

There is little possibility to histologically screen implanted allografts in clinical studies. However, Mirelli et al. [3, 5] carried out a prospective study that confirms immunological reaction against freshly implanted arterial grafts. This reaction was demonstrated both by an increase of CD3, CD4, and CD8 positive lymphocytes and by the increase of anti-HLA antibodies directed against donor-specific antigens. Moreover, CT scans showed a thickening of the graft walls. The antibody response among patients who received cyclosporine after transplantation was less manifest and delayed.

Clinical use of immunosuppression after cold-stored arterial allograft transplantation

Despite the experimentally confirmed inhibition of arterial allograft destruction by immunosuppression,

the use of immunosuppression in patients after arterial allograft implantation is not generally accepted by vascular surgeons.

In 2011 Pupka et al. published a complex view on the use of immunosuppression in patients after in-situ revascularization with cold-stored arterial allografts in the treatment of aortic graft infection [2]. In this perspective, a comparative, single-center study was one group of (24) patients immunosuppressed with cyclosporine A. A second group of (26) patients decided not to have any immunosuppression. A third group (27 patients) included patients for whom fresh arterial homograft was not available (no donor) or patients who did not agree with transplantation from a dead donor. These patients were treated by the implantation of a polyester collagen-sealed, silver coated prosthesis. The immunosuppressive protocol was based on the administration of cyclosporine A in daily doses of 1–3 mg per kg of body mass with a serum concentration of 140–150 mg/L. The drug was taken until the end of the study (mean follow up: 22.8 months). Graft thrombosis (12%), rupture of the graft (12%) with death of the patient (8%), and graft aneurysm (8%) were observed only in the non-immunosuppressed group. No adverse effects of immunosuppression were reported in this study.

In 2005 Mirelli et al. published a study on 30 patients who had undergone ABO-compatible homograft transplantation. Nine of these patients received immunosuppressive treatment with cyclosporine in doses of 1–3 mg/kg/day [3]. As mentioned above, the authors observed a strong induction of anti-HLA antibody response, similar to chronic rejection, in spite of the immunosuppressive treatment. However, compared to 21 non-immunosuppressed patients the antibody response among patients treated with cyclosporine A was less pronounced and delayed. Clinically, no differences were noted between patients treated with or without cyclosporine, and no patients had signs of recurrent infection upon late follow-up.

In 2011 Sebesta et al. described good clinical results and no deterioration of arterial allografts in 23 patients after substitution of infected aortofemoral prostheses with cold-stored allografts and immunosuppression by cyclosporine A (a serum concentration of 50–150 mg/L) [4].

In 1999 Mirelli et al. also described immune response following fresh arterial homograft replacement for aortoiliac graft infection and found them to be immunogenic, inducing strong anti-HLA antibody response, similar to chronic rejection, in spite of immunosuppressive treatment using cyclosporine A (1–3 mg/kg/day) [5].

Moreover, the same group shown 1 year earlier (1998) in a study investigating nine recipients of aortic transplants that patients undergoing aortic allotransplantation should have induced immunological tolerance by appropriate immunosuppressants.

This recommendation was obtained by detection of mismatch specific IgG antibodies to HLA class I and HLA class II antigens 1, 3, 6, and 12 months post implantation.

Based on experimental experience with delayed administration of tacrolimus, some European vascular centers started to use an immunosuppressive protocol consisting of orally administered tacrolimus given from day 7 post-transplant in patients after arterial allotransplantation. The drug blood level generally ranged between 4 and 7 µg/L. Tacrolimus is administered throughout the entire period of allograft patency and blood levels are determined periodically. The average starting daily dose is 6 mg/day administered perorally and the maintenance daily dose is 2 mg/day.

Conclusion

Vascular allografts have their place in the treatment of infection complications of standard materials used in vascular reconstructive surgery, despite prosthesis advancement. The understanding of pathophysiological processes after vascular allograft transplantation is important to minimize their deterioration and to ensure good long-term patency rates and good quality of life of every individual patient treated by this technique. The most frequent complication in long-term vascular outcome (wall thickening, aneurysmatic dilation, stenosis) may occur through an immunological mechanism. Experimental and clinical experiences show that there is definitely place for immunosuppression in the armamentarium of vascular surgeons performing vascular implantations. Moreover, ABO compatibility between donor and recipient is also recommended to decrease the immune-mediated destruction of arterial allografts. Indeed, there is a possibility to delay the administration of immuno-

suppression in patients after arterial transplantation during the early postoperative period. This immunosuppressive protocol offers the possibility to treat infection in the first days after allograft implantation without suppression of the recipient's immune system.

Compliance with ethical guidelines

Conflict of interest R. Spunda, J. Hruby, M. Adamec, M. Varga, J. Lindner, I. Matia, and M. Spacek state that there are no conflicts of interest.

Ethical standards The accompanying manuscript does not include studies on humans or animals.

References

1. Matia I, Lodererova A, Adamec M. Delayed administration of FK 506 is sufficient to suppress acute rejection changes after aortal transplantation in rats. *Transpl Int.* 2007;20:371–380.
2. Pupka A, Skora J, Janczak D, Plonek T, Marczak J, et al. In situ Revascularisation with silver-coated polyester prostheses and arterial homografts in patients with aortic graft infection – a prospective, comparative, single-centre study. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2011;41:61–67.
3. Mirelli M, Buzzi M, Pasquinelli G, Tazzari PL, Testi G, et al. Fresh and cryopreserved arterial homografts: immunological and clinical results. *Transplant Proc.* 2005;37:2688–2691.
4. Sebesta P, Stadler P, Sedivy P, Zdrahal P, El Samman K, et al. Radical operation of infected aortofemoral prosthesis using fresh arterial allograft: our mid-term experience. *Rozhl Chir.* 2011;90:4–13.
5. Mirelli M, Stella A, Faggioli GL, Scolari MP, Iannelli S, Freyrie A, Buscaroli A, De Santis L, Resta F, Bonomini V, D'Addato M. Immune response following fresh arterial homograft replacement for aortoiliac graft infection. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1999;1999(18):424–429.