

UNIVERZITA KARLOVA

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

HABILITAČNÍ PRÁCE

Ovlivnění rejekce po transplantaci cévních
štěpů v experimentu a klinické praxi

MUDr. Rudolf Špunda, Ph.D.

II. chirurgická klinika kardiovaskulární chirurgie 1. LF UK a VFN

Praha, 2023

Ovlivnění rejekce po transplantaci cévních štěpů v experimentu a klinické praxi

Obor Chirurgie

MUDr. Rudolf Špunda, Ph.D.

II. chirurgická klinika kardiovaskulární chirurgie 1. LF UK a VFN

U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2

tel.: 224962784, e-mail: rudolf.spunda@vfn.cz

Poděkování

Poděkovat bych chtěl prof. MUDr. Jaroslavu Lindnerovi, CSc., přednostovi II. chirurgické kliniky kardiovaskulární chirurgie 1.LF UK a VFN, za trvalou podporu v klinické i vědecké práci. Dále bych rád poděkoval doc. MUDr. Miroslavu Špačkovi, Ph.D., mému školiteli postgraduálního studia, bez jehož podpory by tato práce nikdy nevznikla. Poděkování náleží též skupině kolegů, díky jejichž spolupráci mohly proběhnout experimentální i klinické studie, které tato práce hodnotí, především MUDr. Pavlu Měříčkovi, Ph.D., doc. MUDr. Ivanu Matiovi, Ph.D., MUDr. Janu Hrubému, Ph.D., MUDr. Radce Lainkové a MUDr. Myroslavu Salmayovi.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto habilitační práci vypracoval samostatně a uvedl všechny zdroje v ní použité. Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Turnitin, za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne

MUDr. Rudolf Špunda, Ph.D.

Seznam zkratek

AB0	- AB0 systém krevních skupin
ALO	- alogenní experimentální skupina
BN	- potkani kmene Brown-Norway
BIOCEV	- Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd ČR a Univerzity Karlovy ve Vestci
CD4+	- clusters of differentiation 4+ buňky (pomocné T-lymfocyty)
CD8+	- clusters of differentiation 8+ buňky (cytotoxické T-lymfocyty)
ČVUT	- České vysoké učení technické
DMSO	- dimethylsulfoxid
ISO	- isogenní experimentální skupina
TAC1	- od 1. dne imunosuprimovaná experimentální skupina
TAC7	- od 7. dne imunosuprimovaná experimentální skupina
anti-MHC	- anti-major histocompatibility complex (protilátky proti hlavnímu histokompatibilnímu systému)
MHC	- major histocompatibility complex (hlavní histokompatibilní systém)
FTY720	- fingolimod (sphingosine-1-phosphate receptor modulator)
FR260330	- inhibitor NO syntázy
IgG	- imunoglobuliny G
IL-2	- interleukin 2
IS	- imunosuprese
TGF- β	- transforming growth faktor beta
LEW	- potkani kmene Lewis
KST	- Koordinační středisko transplantací
SÚKL	- Státní ústav pro kontrolu léčiv
SCGE	- Single cell gel electrophoresis
EU	- Evropská unie
1. LF UK	- 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy
IU	- mezinárodní jednotka (international unit)
CIT	- čas studené ischemie (cold ischemic time)
PBS	- fosfátový pufr
FBS	- fetální bovinní sérum
POD	- pooperační den
VSM	- vena saphena magna
WL	- waiting list

Obsah

Poděkování	3
Prohlášení	4
Seznam zkratk	5
Obsah.....	6
1. Souhrn.....	9
2. Summary	11
3. Úvod.....	13
3.1. Cévní alografty	13
3.2. Infekce cévních protéz	13
3.3. Současný stav klinického použití alograftů.....	14
4. Cíle, metodika a výsledky komentovaných prací	15
4.1. Imunosuprese po transplantaci kryokonzervovaných tepenných alograftů v experimentu	15
4.2. Imunosupresivní protokoly používané v klinické praxi po transplantaci chladem konzervovaných alograftů	16
4.3. Vliv nového kryokonzervačního protokolu na imunogenicitu a rejekci tepenných alograftů u potkanů.....	17
4.4. Porovnání různých protokolů rozmrazování lidských kryokonzervovaných žilních štěpů	18
4.5. Hodnocení životaschopnosti buněk pomocí fluorescenčních vitálních barviv a konfokální mikroskopie při hodnocení zmrazovacích a rozmrazovacích protokolů používaných při kryokonzervaci alogenních žilních štěpů.....	19
4.6. Mechanické vlastnosti čerstvých a kryokonzervovaných žilních štěpů: vliv kryokonzervace a rozmrazení	20
4.7. Viabilita tepenných štěpů hodnocená pomocí comet assay	21
5. Diskuze	22
5.1. Imunosuprese po transplantaci cévních alograftů	22

5.2.	Vliv kryokonzervace a rychlosti rozmrazení na imunogenicitu tepenných alograftů..	23
5.3.	Vliv kryokonzervace a rychlosti rozmrazení na kvalitu a vitalitu žilních štěpů	24
5.4.	Závislost mechanických vlastností žilních štěpů na kryokonzervaci a protokolu rozmrazení	26
5.5.	Ovlivnění viability tepenných štěpů protokoly odběru, kryokonzervace a rozmrazení	26
6.	Závěr	28
7.	Literatura (abecední řazení se jmennými odkazy v textu práce)	29
8.	Přílohy.....	37
8.1.	Příloha 1: 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).....	37
8.2.	Příloha 2: Spunda R., Hruby J., Adamec M., Matia I., Spacek M. 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	37
8.3.	Příloha 3: Hruby J, Spunda R, Mericka P, Mlcek M, Pecha O, Splith K, et al. Influence of the new standardized clinical cryopreservation/slow thawing protocol on immunogenicity of arterial allografts in rats. PLoS ONE 2020;15(3)	37
8.4.	Příloha 4: 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; (b) Nov 16	37
8.5.	Příloha 5: Měříčka P, Janoušek L, Benda A, Lainková R, Sabó J, Dalecká M, Prokšová P, Salmay M, Špunda R, Pecha O, Jandová M, Gregor J, Štěrba L, Špaček M, Lindner J. Cell Viability Assessment Using Fluorescence Vital Dyes and Confocal Microscopy in Evaluating Freezing and Thawing Protocols Used in Cryopreservation of Allogeneic Venous Grafts. International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22(19).....	37
8.6.	Příloha 6: Chlup H, Špunda R, Salmay M, Měříčka P, Lainková R, Slautin A, Janoušek L, Jandová M, Gregor J, Lindner J, Špaček M. Mechanical properties of fresh and	

cryopreserved venous grafts: influence of cryopreservation and thawing. J Mech Behav Biomed Mater – under review	38
8.7. Příloha 7: Pilin A, Mazura I, Lainková R, Salmay M, Měříčka P, Pecha O, Janoušek L, Špunda R, Lindner J, Špaček M. Viability of human arterial allografts monitored by comet assay. Physiol. Res. – in press	38

1. Souhrn

Cévní štěpy určené k alogenní transplantaci jsou tepny a žíly odebírané v rámci multiorgánových odběrů a dále používané ve specifických indikacích na specializovaných cévně-chirurgických centrech. Lze je použít jako „čerstvé“ tzn. chladem konzervované do 48 hod. od odběru anebo jako zmrazené – kryoprezervované. Kryoprezervované cévní alografty jsou také odebírány v rámci multiorgánových odběrů, dále jsou pak v zchlazeném konzervačním roztoku převezeny do kryobanky, kde jsou zpracovány, zmrazeny a uloženy v parách tekutého dusíku. V cévní chirurgii mají cévní alografty nezastupitelné místo při řešení infekcí cévní protézy, kde je jejich biologická povaha výhodná z hlediska odolnosti vůči infekci. Další indikací, kde jsou cévní alografty používány, jsou revaskularizace končetin u pacientů s kritickou končetinovou ischemií ve stadiu trofických defektů, kteří mají spotřebované vlastní autologní štěpy z předchozích rekonstrukčních výkonů a použití umělé cévní protézy je u nich spojeno s vysokým rizikem infekce a uzávěru rekonstrukce. V uvedených indikacích lze použít jak čerstvé, tak kryoprezervované cévní alografty. V případě čerstvých štěpů je však omezením jejich nedostatečná dostupnost. Čekací doba pacientů zařazených na waiting list (WL), který je veden Koordinačním střediskem transplantací (KST) v Praze trvá průměrně 2-3 týdny. Jsou situace, kdy je tepenný štěp potřebný urgentně, a zejména pro tyto situace slouží zásoba štěpů kryoprezervovaných, které jsou dostupné okamžitě.

Současně s rozvojem používání cévních alograftů probíhaly a dále probíhají experimentální výzkumy týkající se antigenicity a ovlivnění rejekce, která se klinicky projevuje například trombózou s následnou obliterací, dilatací a/nebo rupturou štěpu.

Předkládaná habilitační práce hodnotí experimentální práce provedené v této souvislosti jak na zvířecích modelech, tak na humánních štěpech. První prací je experiment realizovaný na zvířecím modelu, který objasňuje ovlivnění rejekce kryoprezervovaných cévních alograftů podáváním imunosuprese. V souvislosti s jejich použitím při řešení infekčních komplikací jsme v tomto experimentu rovněž zjišťovali, zda je možné efektivně podávat imunosupresi se sedmidenním odstupem, kdy odložené podávání IS léčby negativně neovlivní imunitní reakci nemocného v počáteční fázi boje vůči infekci cévní protézy a nekompromituje pacienta v časném perioperačním období. Další práce se zabývá vlivem kryokonzervace a následného rozmrazení na imunogenicitu cévních alograftů na zvířecím modelu. Výsledky jsou porovnány s dříve provedeným experimentem s čerstvými cévními alografty. Na tento experiment navazuje práce, která hodnotí vliv techniky rozmrazování humánních žilních alograftů na strukturální změny endotelu a prezentuje naše nové výsledky dosažené při různých protokolech

rozmrazování žil. Přispívá k rozšíření dosavadních poznatků v oblasti optimálního managementu kryokonzervovaných žilních alograftů v klinické praxi. Další komentovaná publikace hodnotí vitalitu rozmrazených žilních alograftů. V této práci je vitalita buněk hodnocena elektronovou mikroskopií za použití fluorescenčních barviv. Zároveň je hodnocena vitalita ve vztahu k rychlému a pomalému protokolu rozmrazování. V další publikaci je popisována závislost mechanických vlastností čerstvých a kryoprezervovaných žilních alograftů na procesu kryokonzervace a protokolu rozmrazování. Ta byla hodnocena na mechanickém modelu v experimentu s humánními žilami. Poslední prezentovaná práce hodnotí viabilitu humánních tepenných alograftů. Pomocí comet assay jsou vyšetřeny různými protokoly rozmrazené cévní kryografty i čerstvé cévní štěpy odebrané v rámci multiorgánových a kadaverózních odběrů.

Imunogenicita a rejekční změny cévních alograftů zásadním způsobem ovlivňují výsledky rekonstrukcí při jejich klinickém použití a mají tak veliký vliv na výsledky léčby cévně-chirurgických pacientů. Cílem této práce je zhodnocení dosavadních poznatků o vlastnostech cévních alograftů, ovlivnění rejekce imunosupresí a vlivu kryokonzervace a rozmrazování na jejich imunogenicitu, vitalitu a mechanické vlastnosti. Zjištěné skutečnosti jsou implementovány do klinické praxe.

2. Summary

Vascular grafts intended for allogeneic transplantation are arteries and veins obtained as part of multi-organ procurement and further used in specific indications at specialized vascular surgery centers. They can be used as "fresh", i.e. cold-preserved within 48 hours of harvest, or frozen – cryopreserved. Cryopreserved vascular allografts are also obtained as a part of multi-organ harvests, but after that they are transported in a cooled preservation solution to a cryobank where they are processed, frozen and stored in liquid nitrogen vapour. Vascular allografts have an irreplaceable place in the management of vascular prosthesis infections, where their biological nature is advantageous in terms of resistance to infection.. Another indication where vascular allografts are used is limb revascularization in patients with critical limb ischemia at the trophic defect stage, who have used up their own autologous grafts from previous reconstructive procedures and the use of an artificial vascular prosthesis is associated with a high risk of infection and reconstruction occlusion.. Both fresh and cryopreserved vascular allografts can be used in this indications. However, a major limitation of fresh grafts is their lack of availability. The waiting time for patients included in the nationwide waiting list (WL), which is stored and updated in the Transplantation Coordination Centre (KST) in Prague, is 2-3 weeks on average. There are situations when an artery graft is needed urgently, and especially for these situations the inventory of cryopreserved grafts is available immediately.

In parallel with the development of the use of vascular allografts, experimental studies on antigenicity and the influence of rejection, which is clinically manifested, for example, by thrombosis with subsequent obliteration, dilatation and/or graft rupture, have been and continue to be conducted.

The present thesis evaluates the experimental investigations carried out in this context both in animal models and in human grafts. The first work is an experiment carried out in an animal model, which clarifies the influence of immunosuppression on the rejection of cryopreserved vascular allografts. In the context of their use in the management of infectious complications of vascular prosthesis, we also investigated, whether immunosuppression can be effectively administered with a seven-day delay. where the delayed administration of IS treatment does not adversely affect the patient's immune response in the initial phase of the fight against vascular prosthesis infection and does not compromise the patient in the early perioperative period. Another described publication deals with the effect of cryopreservation and subsequent thawing on the immunogenicity of vascular allografts in an animal model. The results are compared with a previously performed experiment with fresh vascular allografts. This experiment is

followed by a paper that evaluates the effect of the thawing technique of human vein allografts on structural changes in the endothelium and presents our new results obtained with different thawing protocols. It contributes to the existing knowledge in the field of optimal management of cryopreserved vein allografts in clinical practice. Another annotated publication evaluates the viability of thawed vein allografts. In this paper, cell viability is assessed by electron microscopy using fluorescent dyes. Vitality is also evaluated in relation to a fast and slow thawing protocol. In another publication, the dependence of the mechanical properties of fresh and cryopreserved vein allografts on the cryopreservation process and thawing protocol is described. This dependence was evaluated in a mechanical model in an experiment with human veins. The last presented work evaluates the viability of human vein allografts. Thawed vascular cryografts as well as fresh vascular grafts obtained as part of multi-organ and cadaveric harvests are examined using the comet assay.

The immunogenicity and rejection changes of vascular allografts have a major impact on the outcome of reconstructions in their clinical use and thus have a great influence on the treatment outcomes of vascular surgical patients. The aim of this study is to evaluate the current knowledge on the properties of vascular allografts, the influence of rejection by immunosuppression and the effect of cryopreservation and thawing on their immunogenicity, viability and mechanical properties. The findings are implemented into clinical practice.

3. Úvod

3.1. Cévní alografty

Cévní alografty mají v současné cévní chirurgii nezastupitelnou roli při řešení infekcí cévních protéz a také jako ultimum refugium při revaskularizaci dolních končetin u pacientů s ischemickou chorobou ve stádiu trofických defektů, kteří nemají vhodný autologní štěp. V uvedených indikacích lze použít buď čerstvé (chladem konzervované) nebo kryokonzervované cévní alografty, tepenné i žilní. Transplantace čerstvých tepenných štěpů má v České republice dlouhou historii, zatímco používání kryokonzervovaných alograftů bylo zavedeno do klinické praxe až od roku 2011.

Cévní alografty by měly před transplantací splňovat základní kritéria jako ABO kompatibilitu, anatomicky vhodné rozměry ve smyslu délky a průsvitu a optimálně bezprostřední dostupnost. Právě omezená dostupnost je v případě chladem konzervovaných cévních alograftů jejich zásadní nevýhoda. Čekací doba pacientů zařazených na waiting list (WL), který je spravován Koordinačním střediskem transplantací (KST) v Praze trvá průměrně 2-3 týdny. Tato doba může pro pacienty znamenat ztrátu končetiny nebo rozvoj život ohrožujících komplikací. Dlouhá čekací doba na vhodný čerstvý štěp byla jedním z hlavních důvodů vzniku programu „Kryokonzervovaných cévních alograftů“. Do něj jsou zapojena velká cévně – chirurgická a transplantační centra v České republice, která spolupracují s Tkáňovou ústřednou v Hradci Králové. Štěpy jsou odebírány v rámci multiorgánových odběrů, následně uloženy do zchlazeného konzervačního roztoku a transportovány do kryobanky. V kryobance jsou po vstupní kontrole a přípravě zmrazeny a uloženy v parách tekutého dusíku. V případě potřeby jsou z kryobanky uvolněny a v transportním boxu převezeny do příslušného centra pro konkrétního pacienta.

3.2. Infekce cévních protéz

Na počátku padesátých let došlo k významnému rozmachu používání cévních protéz. Ty jsou vyráběny ze syntetických materiálů jako je dakron nebo polytetrafluorethylen (PTFE). Jejich používání při rekonstrukcích cévního řečiště bylo podporováno neomezenou dostupností na rozdíl od autologních a allogenních štěpů. Zároveň byly pozorovány dobré výsledky stran

průchodnosti rekonstrukcí. Pětiletá průchodnost se u protetických aortoilických bypassů pohybuje kolem 90 %, v případě femoropopliteálních rekonstrukcí je mezi 38-68 % (Prager et al., 2001, AbuRahma et al., 1999, Johnson et al., 2000, Klinkert P. et al., 2003). Současně s narůstajícím počtem protetických rekonstrukcí se však začaly objevovat jejich infekční komplikace. Tyto komplikace jsou relativně málo časté, avšak svým průběhem velmi závažné (Bahini et al. 1991). Pacienti jsou ohroženi sepsí, tvorbou pseudoaneurysmat, krvácením, periferní embolizací, protézo-enterickou píštělí i úmrtím. Vyskytují se v 1,5-2 % případů, při rekonstrukcích v třísele dosahuje jejich incidence až 5 %. Jsou spojeny s 50 % rizikem amputace končetiny a v případě aortoilických nebo aortofemorálních rekonstrukcí až se 70 % mortalitou. V případě rekonstrukcí nitrobřišních může dojít ke vzniku protézo-enterické píštěle, která se vyskytuje méně často, v 1-2 %. Svou závažností však již patří k život ohrožujícím komplikacím (Wilson et al., 2016, Hannon et al., 1996, Donato et al., 2014, Špunda 2019).

3.3. Současný stav klinického použití alografitů

Léčba protetických infekčních komplikací spočívá v antibiotické terapii, odstranění infikované protézy a zajištění cévního zásobení distálně od rekonstrukce. Pro tyto rekonstrukce je vhodné použít biologický materiál, který umožňuje prostup antibiotik a který má reálnou šanci se vhojit. Pokud jsou vyčerpány možnosti autologních cév, je použití cévních alografitů metodou volby (Kieffer et al. 2004). V této indikaci jsou alografty úspěšně používány v mnoha dalších cévněchirurgických centrech (Kniemeyer et al. 1994; Vogt et al. 1996; Chiesa et al. 1998; Teebken et al. 2004; Harlander-Locke et al. 2014; Touma et al. 2014).

Další indikační skupinu, ve které může být transplantován alogenní cévní štěp tvoří pacienti s kritickou končetinovou ischemií ve stadiu trofických defektů, kteří mají spotřebovány vlastní cévní štěpy, např. venu saphenu magnu (VSM). Z indikace záchrany končetiny je i zde metodou volby transplantace aloštěpu (Adamec et al. 2011; Matia et al. 2006, 2007, 2010; Prager et al. 2002). V obou uvedených indikacích lze použít čerstvé či kryokonzervované cévní alografty. Vzhledem ke stupni urgency u části indikovaných pacientů bývá často zásadní, aby byl aloštěp dostupný maximálně v řádu několika dnů. V tomto kontextu je tedy možnost okamžitého využití kryokonzervovaného cévního alograftu z kryobanky jednoznačnou výhodou. Do kryobanky jsou navíc ukládány štěpy různých krevních skupin i různých anatomických rozměrů, tepenné i žilní. Většinou je tak možný okamžitý výběr optimálních štěpů pro jednotlivé pacienty (Špaček et al., 2018, Špaček et al., 2019, Špunda 2019).

4. Cíle, metodika a výsledky komentovaných prací

Cílem habilitační práce je zhodnocení a shrnutí dosavadních dílčích výsledků jednotlivých publikovaných prací, tedy otázkami, kterými jsme se v rámci naší výzkumné skupiny v souvislosti s otázkami cévních transplantací, zabývali. Výsledky výzkumu objasňují antigenicitu štěpů a její ovlivnění technologickými postupy při odběrech, uchovávání a rozmrazování a také imunosupresi. Dále hodnotí vitalitu a mechanické vlastnosti cévních alograftů. Níže jsou popsány hlavní cíle a principy jednotlivých prací, podrobná metodika včetně statistických analýz a výsledků jsou popsány v jednotlivých článcích (Příloha 1-7). V diskuzi jsou pak hodnoceny výsledky a jejich přínos a implementace do klinické praxe.

4.1. Imunosuprese po transplantaci kryokonzervovaných tepenných alograftů v experimentu

Cílem první komentované práce je objasnění přínosu imunosupresivní terapie na rejekci kryokonzervovaných cévních alograftů. Podstatou práce je experiment realizovaný na zvířecím modelu, kdy byly provedeny transplantace kryokonzervovaných alograftů mezi dvěma alogenními kmeny potkanů – Brown-Norway (BN) a Lewis (LW). Ve dvou skupinách jsme potkanům po alogenní transplantaci (BN do LEW) podávali imunosupresi. V první skupině od prvního a ve skupině druhé od sedmého pooperačního dne. Intramuskulárně jsme aplikovali takrolimus v dávce 0,2 mg/kg/den, přičemž jsme jeho hladinu kontrolovali v periferní krvi. V dalších dvou kontrolních skupinách jsme provedli isogenní (LEW do LEW) respektive alogenní (BN do LEW) transplantaci, přičemž imunosuprese v těchto skupinách nebyla podávána. Štěpy jsme po 30 dnech explantovali a následně hodnotili buňkami i protilátkami zprostředkovanou rejekci. Tato práce navazuje na dříve provedený experiment s chladem konzervovanými alografty (Matia et al. 2007). Jedná se tedy o analogii postupů používaných v současné klinické praxi v České republice, za přísného dodržení technologie zpracování štěpů.

Při hodnocení výsledků aortální štěpy v obou takrolimem imunosuprimovaných skupinách vykazovaly 30. den pravidelnou morfologii aortální stěny s jasnou diferenciací všech tří základních anatomických vrstev – intimy, média a adventicie bez známek intimální hyperplazie, nekrózy hladkých svalových buněk nebo vyšší buněčné infiltrace adventicie. Luminální povrch intimy byl pokrytý souvislou vrstvou endotelových buněk. Nebyly zjištěny žádné známky nekrózy nebo destrukce média a zároveň v ní nebyla detekována žádná depozita

IgG. Infiltrace adventicie mononukleárními buňkami byla srovnatelná s kontrolní isogenní skupinou. Překvapivě i histologie štěpů kontrolní alogenní skupiny (alogenní transplantace bez imunosuprese) vykazovala pravidelnou morfolonii stěny aorty. Všechny tři základní vrstvy byly rovněž dobře zachovány. Ve svalové vrstvě alogenních štěpů nebyla nalezena žádná depozita IgG. Infiltrace adventicie mononukleárními buňkami však byla vyšší ve srovnání s isogenní a oběma alogenními imunosuprimovanými skupinami. V periferní krvi byla zjištěna indukce donor specifických protilátek proti MHC I. třídy u neimunosuprimovaných příjemců v alogenní skupině. Oba imunosupresivní protokoly s použitím nízké dávky takrolimu byly dostatečně účinné k potlačení produkce těchto protilátek (Špunda 2019).

Příloha 1: Spunda R, Hruba 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)

4.2. Imunosupresivní protokoly používané v klinické praxi po transplantaci chladem konzervovaných alograftů

Druhá přiložená publikace má za cíl zhodnotit imunosupresivní protokoly používané v klinické praxi po transplantaci arteriálních alograftů použitých při řešení infekcí cévních protéz. Porovnává různé druhy imunosupresiv s přihlédnutím k nežádoucím účinkům a rizikům léčby. Navzdory tomu, že byla experimentálními studiemi byla prokázána imunogenicita cévních alograftů, kterou lze podstatně ovlivnit podáváním imunosuprese, nejsou imunosupresiva po transplantacích cévních alograftů všeobecně akceptována. V České republice i ve světě bylo provedeno více studií, které podávání imunosuprese podporují. Nejvíce používaným lékem v této indikaci je cyklosporin A (Mirelli et al., 1999, Štádlér et al., 2005, Pupka et al. 2004). Pupka v r. 2011 publikoval soubor pacientů u kterých byla léčena infekce protetiké aortální náhrady. Soubor pacientů rozdělil celkem na 3 skupiny, přičemž pouze jedna skupina pacientů byla po reoperaci a náhradě infikované protézy cévním alograftem léčena cyklosporinem A. Pacientům z druhé skupiny byl sice implantován alograft, imunosupresi po operaci však nedostávali. Pacientům ze třetí skupiny byla implantována cévní protéza potažená stříbrem z důvodu nedostupnosti cévního alograftu nebo nesouhlasem pacienta s transplantací štěpu od mrtvého dárce. Závažné komplikace popsal celkem u 32 % pacientů. Ty zahrnovaly trombózu štěpu (12 %), aneuryzmatické změny (8 %) a rupturu štěpu (12 %). V souvislosti

s komplikacemi 8 % pacientů zemřelo. Uvedené komplikace se vyskytly pouze pacientů, kteří nebyli léčeni imunosupresivou. Ve své studii zároveň nepopisuje žádné vedlejší nežádoucí účinky podávání imunosuprese (Pupka et al., 2011). Mirelli také popsal efekt cyklosporinu A u pacientů po transplantaci cévních alograftů. Na souboru 30 pacientů po transplantaci cévního alograftu studoval vliv imunosuprese cyklosporinem A na produkci anti-MHC protilátek. Produkci protilátek anti-MHC pozoroval překvapivě i ve skupině imunosuprimovaných pacientů. Hladina protilátek a rychlost jejího nárůstu však byla nižší než u pacientů bez imunosuprese (Mirelli et al., 2005). Ze studií je patrné, že podávání imunosuprese časně po transplantaci alograftů omezením funkce imunitního systému zvyšuje riziko zhoršení probíhající infekce. Naopak, pokud imunosupresiva nejsou podávána, rejekční změny způsobují degeneraci štěpu s rizikem závažných komplikací. Na základě experimentálních prací a klinických zkušeností začala některá evropská centra používat protokol opožděného podávání imunosuprese. Při tomto protokolu je podáván takrolimus od 7. pooperačního dne po celou dobu, po kterou je rekonstrukce alograftem funkční. Počáteční dávka je 6 mg, udržovací dávka průměrně 2 mg denně. Léčivo se podává perorálně a pravidelně je kontrolována jeho hladina v periferní krvi v rozmezí od 4 do 7 µg/l (Špaček et al., 2018, Špunda, 2019).

Příloha 2. Špunda R., Hruby J., Adamec M., Matia I., Špaček M. 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

4.3. Vliv nového kryokonzervačního protokolu na imunogenicitu a rejekci tepenných alograftů u potkanů

Třetí práce porovnává rejekci po transplantaci chladem konzervovaných a kryokonzervovaných tepenných alograftů. Jejím cílem je objasnění vlivu procesu kryokonzervace a rozmrazení na imunogenicitu tepenných štěpů. Experiment byl proveden na zvířecím modelu a byl použit protokol pomalého rozmrazování štěpů, při kterém jsou alografty po vyjmutí z převozního boxu uloženy na 60 minut do lednice při teplotě 4 °C a dále na 60 minut do prostředí při pokojové teplotě. Štěpy byly následně transplantovány mezi alogenními kmeny potkanů – z BN do LEW. Po 30 dnech byly štěpy explantovány a histologicky a imunohistochemicky vyšetřeny. Zároveň byla změřena koncentrace a dynamika donor specifických anti MHC protilátek I. a II. třídy z periferní krve. Při histologickém vyšetření jsme hodnotili především tloušťku a kontinuitu

intimy, rozsah intimální proliferace eventuálně destrukce a tloušťku mediální vrstvy. Imunohistochemicky jsme detekovali infiltraci cévní stěny CD4⁺, CD8⁺, Lewis MHC II pozitivními buňkami a depozita IgG. Výsledky byly porovnány s dříve provedeným experimentem s čerstvými štěpy a může tak hodnotit vliv procesu kryokonzervace a rozmrazení na imunogenicitu alograftů (Matia et al., 2007). Výsledky práce ukázaly, že chladem konzervované tepenné alografty mají významně vyšší imunogenicitu v porovnání s kryokonzervovanými štěpy. Histologické a imunohistochemické vyšetření po 30 dnech od transplantace prokázalo u chladem konzervovaných štěpů destrukci cévní stěny se známkami nekrózy média s ukládáním depozit IgG. V hyperplastické intimě byla patrna výrazná infiltrace buněk MHC II. třídy a CD8⁺. V adventicii těchto štěpů byla zjištěna desetkrát vyšší infiltrace imunokompetentními buňkami CD4⁺ a CD8⁺ než u kryokonzervovaných štěpů. V případě chladem konzervovaných štěpů byla zjištěna zvýšená hladina anti MHC I. i II. třídy, zatímco v případě kryoprezervovaných štěpů byla zjištěna elevace pouze anti MHC I. třídy (Špunda 2019).

Příloha 3: Hruby J, Spunda R, Mericka P, Mlcek M, Pecha O, Splith K, et al. Influence of the new standardized clinical cryopreservation/slow thawing protocol on immunogenicity of arterial allografts in rats. PLoS ONE 2020; 15(3)

4.4. Porovnání různých protokolů rozmrazování lidských kryokonzervovaných žilních štěpů

Cílem další práce je zhodnocení, zda mají různé protokoly rozmrazování cévních štěpů vliv na strukturální změny endotelu. Byly testovány dva postupy rozmrazování: pomalé rozmrazování v chladničce při teplotě +4 °C po dobu 120 minut (medián) a rychlé rozmrazování ve vodní lázni při teplotě +37 °C, kdy se pohybovala doba rozmrazení od 4:20 do 9 minut (medián 5 minut). Při obou způsobech rozmrazování byly štěpy uloženy v původním obalu v roztoku 10 % DMSO (dimethylsulfoxid). Štěpy byly po rozmrazení zpracovány pro skenovací elektronovou mikroskopii a následně vyšetřeny. Míru poškození endotelu jsme hodnotili šestistupňovým skórovacím systémem - 1. morfologicky neporušený endotel, 2. konfluentní endotel se strukturální nehomogenitou (detekce nepravidelností v podobě jednotlivých buněk a změny jejich membrán), 3. narušení mezibuněčných kontaktů (ztrácí se kontinuita endoteliální vrstvy, endotelie se zmenšují, přičemž stále přiléhají k bazální membráně), 4.

oddělení endoteliálních buněk od bazální membrány, 5. úplná ztráta endotelových buněk s obnaženou bazální membránou, 6. poškození subendoteliálních vrstev cévní stěny. Na experiment byly použity vyřazené humánní žilní štěpy (VSM), které již nemohly být použity v klinické praxi. Z výsledků práce je patrné, že kryokonzervované lidské safény nevykazovaly žádný rozdíl, pokud jde o strukturální poškození povrchu endotelu a bazální membrány v závislosti na dvou různých použitých protokolech rozmrazování. Tyto výsledky jsou odlišné v porovnání s obdobnými experimenty s tepennými štěpy, kde byly detekovány mikrofraktury cévní stěny po rychlém rozmrazení (Pegg et al., 1997). Rozdílné výsledky v rozsahu morfologického poškození mezi alogenními žilami a tepnami mohou být způsobeny rozdíly v histologické stavbě cévní stěny; rozhodující roli může hrát tloušťka mediální vrstvy.

Příloha 4: Špaček M, Měřička 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. 2020; 64(4), 347-354

4.5. Hodnocení životaschopnosti buněk pomocí fluorescenčních vitálních barviv a konfokální mikroskopie při hodnocení zmrazovacích a rozmrazovacích protokolů používaných při kryokonzervaci alogenních žilních štěpů

Ve spolupráci s kolegy z BIOCEVu jsme provedli experimentální práci, která hodnotí viabilitu rozmrazených humánních žilních štěpů. Jejím cílem bylo zjištění působení zamrazení a různých protokolů rozmrazování a teplé ischemie na životaschopnost buněk cévní stěny. Štěpy byly rozmrazeny pomalým protokolem v lednici nebo rychle ve vodní lázni při teplotě 37 °C. Viabilita buněk byla hodnocena elektronovou mikroskopií za použití fluorescenčních barviv. Ta obarvují vitální buňky na principu enzymatické aktivity či prostupují poškozenými buněčnými membránami a obarvují tak jádra neživých buněk. Štěpy byly v experimentu rozmrazeny pomalým a rychlým protokolem. Obarvení a vyšetření elektronovou mikroskopií bylo provedeno bezprostředně po rozmrazení a dále po 24 a 48hodinové kultivaci při teplotě +37 °C. Vyšetřením byla zjištěna více než 70 % viabilita ve vzorcích nehledě na rychlost rozmrazení. Tato skutečnost je nepochybně v přímé souvislosti s krátkou dobou studené ischemie od odběru štěpu do jeho definitivního zamrazení. Statisticky významný pokles životaschopnosti po 48hodinové kultivaci byl pozorován pouze při použití protokolu pomalého

rozmrazování. Možným vysvětlením by mohlo být "poškození vlivem roztoku" během pomalého rozmrazování, které způsobilo mírné snížení buněčnosti štěpu (štěpy jsou rozmrazovány v kryoprotektivním roztoku DMSO). Možný vliv tohoto jevu na imunogenicitu kryoprezervovaných štěpů by měl být předmětem dalšího zkoumání.

Příloha 5: Měříčka P, Janoušek L, Benda A, Lainková R, Sabó J, Dalecká M, Prokšová P, Salmay M, Špunda R, Pecha O, Jandová M, Gregor J, Štěrba L, Špaček M, Lindner J. Cell Viability Assessment Using Fluorescence Vital Dyes and Confocal Microscopy in Evaluating Freezing and Thawing Protocols Used in Cryopreservation of Allogeneic Venous Grafts. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(19)

4.6. Mechanické vlastnosti čerstvých a kryokonzervovaných žilních štěpů: vliv kryokonzervace a rozmrazení

Cílem další práce je posouzení závislosti mezi mechanickými vlastnostmi humánních cévních štěpů a procesem kryokonzervace, respektive protokolem rozmrazování. Autoři předkládají práci zabývající se porovnáním čerstvých a kryokonzervovaných humánních žilních štěpů s využitím experimentálně získaných údajů o závislosti tlaku na deformaci, resp. napětí na deformaci, v obvodovém a axiálním směru. Tlakové zatížení vzorků bylo simulováno analogicky žilnímu a arteriálnímu prostředí. Byly porovnány hodnoty dosažených deformací a tuhostí v obvodovém a axiálním směru. Mechanická odezva čerstvých žilních štěpů se od kryokonzervovaných výrazně liší především v axiálním směru. To bylo pozorováno jak při simulovaném žilním, tak při arteriálním tlakovém zatížení. Kromě toho byla při rychlém rozmrazení kryokonzervovaných štěpů VSM pozorována změna obvodové tuhosti při arteriálním zatížení. Takový způsob rychlého rozmrazení navíc přináší větší rozptyl mechanických vlastností (zejména tuhosti a dosažených deformací při arteriální zátěži) než pomalu rozmrazované žilní štěpy.

Příloha 6: Chlup H, Špunda R, Salmay M, Měříčka P, Lainková R, Slautin A, Janoušek L, Jandová M, Gregor J, Lindner J, Špaček M. Mechanical properties of fresh and cryopreserved venous grafts: influence of cryopreservation and thawing. *J Mech Behav Biomed Mater* – under review

4.7. Viabilita tepenných štěpů hodnocená pomocí comet assay

Cílem poslední prezentované práce je zhodnocení viability tepenných štěpů v závislosti na technice jejich získání a zpracování. Zkoumány byly 4 skupiny tepenných štěpů a to: 1. pomalu rozmrazené kryografty, 2. rychle rozmrazené kryografty, 3. chladem konzervované – odebrané v rámci multiorgánových odběrů, 4. kadaverózní – odebrané při sekcích. Viabilita byla hodnocena pomocí tzv. comet assay (Single cell gel electrophoresis – SCGE), při které byla pomocí elektroforézy po lýze endotelových buněk detekována degradace DNA. Jako kritérium viability byl zvolen interval zachování jaderné DNA v rozmezí do 90 %, tj. pokles maximálně o 10 % celkového množství. Tímto vyšetřením tak bylo možné zjistit životaschopnost intimálních buněk v endotelové vrstvě v jednotlivých skupinách štěpů. Ze zjištěných hodnot byl určen poměr nedegradovaných a degradovaných jader. Tento poměr byl u kadaverózních vzorků 0,63, u pomalu rozmrazených 2,9, u rychle rozmrazených 1,9 a u multiorgánových vzorků 0,68. Výsledkem studie bylo potvrzení předpokladu, že nejméně vhodné z hlediska degradace DNA jsou štěpy získané při sekcích z těl zemřelých osob. Odběr štěpů při multiorgánových odběrech dosahuje z hlediska životaschopnosti sledované kometovým testem mírně lepších výsledků. Nejlepších výsledků lze dosáhnout při použití kryokonzervovaných pomalu rozmrazovaných štěpů, pravděpodobně z důvodu nejkratší dosažené doby teplé a studené ischemie štěpu a fyziologičtějšího zacházení během doby rozmrazování.

Příloha 7: Pilin A, Mazura I, Lainková R, Salmay M, Měříčka P, Pecha O, Janoušek L, Špunda R, Lindner J, Špaček M. Viability of human arterial allografts monitored by comet assay. *Physiol. Res.* – in press

5. Diskuze

5.1. Imunosuprese po transplantaci cévních alograftů

Experimentální studie na zvířecích modelech i klinické studie prokázaly, že cévní alografty vyvolávají v příjemcovském organismu imunitní odpověď (Plissonnier et al., 1995, Lopez-Cepero et al., 2002, Azuma et al., 1999). Ta způsobuje rejekci, která vede k trombotickým uzávěrům, aneurysmatickým změnám, nebo rupturám štěpů s následnými vážnými komplikacemi od ztráty končetiny po úmrtí (Szilagyi et al., 1970, Kieffer et al., 1993). I přes tyto skutečnosti však není imunosupresivní léčba ve specializovaných cévně-chirurgických centrech, která se touto problematikou zabývají, všeobecně akceptována. Pokud již imunosupresi používají, nejčastěji podávaným lékem je cyklosporin A. Ten má však v porovnání s moderními imunosupresivy používanými v transplantační medicíně více nežádoucích účinků (Freguin-Bouilland et al., 2011, Tepperman et al., 2010, Shin et al., 1997, Zoja et al., 1986) V některých pracích jsou popisovány značné vaskulární a metabolické vedlejší účinky, které způsobují aterosklerotické změny v alograftu (Khana et al., 1997). Tato skutečnost byla objasněna zvýšením exprese TGF – β (transforming growth factor beta) (Khanna et al., 2002). Častým argumentem odmítání imunosupresivní léčby v klinické praxi u pacientů s infekcí cévní protézy je omezení funkce imunitního systému v situaci, kdy je naopak potřeba, aby byl imunitní systém schopný s infekcí aktivně bojovat. Tato doba závisí na průběhu infekce a léčbě, obvykle však nepřevyšuje jeden týden. Na základě těchto skutečností byly provedeny experimentální studie s novým protokolem imunosuprese s odloženým podáváním takrolimu (Matia et al., 2014, Heim et al., 2015, Ensminger et al., 2002, Špunda 2019). Takrolimus je moderní imunosupresivum běžně užívané po transplantaci jater a ledvin (Faivre et al. 2001, Vincenti et al., 2002). Obdobně jak o cyklosporin zabraňuje aktivaci imunitního systému inhibicí aktivity kalcineurinu. Na rozdíl od cyklosporinu však také interferuje s TGF- β v cévní stěně alograftů, který je zodpovědný za fibrotizaci v jejich stěně (Dumont et al., 2000, Wang et al., 1994). Tento fakt může být po transplantaci cévních aloštěpů zásadní a s přihlédnutím k tomu, že je takrolimus výrazně účinnější než cyklosporin, jeví se jeho používání k imunosupresi v této indikaci vhodnější (Goto T. et al., 1991). Imunosuprese podávaná od sedmého pooperačního dne byla v experimentech s čerstvými i kryokonzervovanými alografty dostatečně účinná k potlačení buněčné i protilátkami zprostředkované rejekce (Matia et al. 2007, Špunda et al. 2018, Špunda 2019). Tento fakt vedl v některých cévně-chirurgických centrech k zavedení opožděného podávání takrolimu po transplantaci cévních alograftů do klinické praxe. Takrolimus je podáván od 7. pooperačního

dne po celou dobu, po kterou je rekonstrukce alograftem funkční. Počáteční dávka je 6 mg, udržovací dávka průměrně 2 mg denně. Léčivo se podává perorálně a pravidelně je kontrolována jeho hladina v periferní krvi v rozmezí od 4 do 7 µg/l (Špaček et al., 2018). Dosavadní klinické zkušenosti z našeho pracoviště s tímto imunosupresivním protokolem jsou velmi dobré.

5.2. Vliv kryokonzervace a rychlosti rozmrazení na imunogenicitu tepenných alograftů

Na zvířecím modelu jsme zjistili, že kryokonzervované aortální potkaní štěpy vyvolávají výrazně menší imunitní reakci než štěpy čerstvé (chladem konzervované). Ta u kryoštěpů spočívala v infiltraci adventicie imunokompetentními buňkami a produkci anti-MHC protilátek I. třídy. Produkce protilátek anti-MHC II. třídy ani ukládání depozit IgG ve stěně kryokonzervovaných alograftů nebyla pozorována. Stejně tak jsme u kryoštěpů nepozorovali destrukci cévní stěny tak jako u štěpů chladem konzervovaných (Špunda 2019). Zaměřili jsme se tedy na další studium mechanismů, které k nižší antigenicitě mohou přispívat.

Nejdůležitějšími otázkami postupu kryokonzervace/rozmrazování v období před zmrazením jsou jednak vlastnosti konzervačního roztoku a jednak délka trvání studené ischemie (Rodrigues et al., 2012). Bylo zjištěno, že dlouhodobá studená ischemie vyvolává značné poškození arteriální stěny a že endotelové buňky jsou ke studené ischemii nejcitlivější (Pascual et al., 2002, Knight et al. 2003). V našem experimentu byla doba ischemie před zmrazením aortálních alograftů přibližně 3-4 hodiny. Je velmi pravděpodobné, že tato velmi krátká doba studené ischemie měla za následek výrazně nižší poškození endotelu kryokonzervovaných štěpů před transplantací a tím pádem minimální intimální reakci pozorovanou 30. den po transplantaci. V recentně publikovaných klinických pracích je jako standardní metoda rozmrazování kryokonzervovaných tepenných alograftů uváděno rychlé zahřátí ve vodní lázni při teplotě 37 °C (Antonopoulos et al., 2019). Tento protokol rychlého rozmrazování však způsobuje poškození cévní stěny alograftů s tvorbou mikrotrhlin a akumulace tekutiny v cévní stěně (Buján et al., 2001). Naproti tomu při použití protokolu pomalého rozmrazování dochází k minimální imunitní odpovědi příjemce na transplantované cévní aloštěpy (Rodríguez et al. 2012).

Rychlé rozmrazení kryokonzervovaných alograftů se vznikem mikrotrhlin způsobuje expresi antigenů hlavního histokompatibilního komplexu a tím ke zvýšení jejich antigenicity.

Patrné je to zejména v případech, kdy fraktury zasahují do mediální vrstvy cévy (Buján et al., 2001). Exprimované antigeny spouštějí produkci anti MHC protilátek I. a II. třídy, které následně způsobují destrukci svalové vrstvy (Thaunat et al. 2006). V našem experimentu jsme zaznamenali statisticky významnou produkci protilátek anti MHC I. třídy. Naproti tomu nedošlo k významné produkci protilátek anti MHC II. třídy, které jsou exprimovány na imunologicky aktivovaných endoteliálních a hladkých svalových buňkách (Lou et al., 1996). S přihlédnutím k tomu, že jsme v mediální vrstvě jsme u kryokonzervovaných alograftů nezaznamenali žádná depozita IgG, je možné, že náš protokol pomalého rozmrazení inhiboval právě expresi antigenů MHC v buňkách hladké svaloviny během 30denního sledovacího období. Vliv sérových protilátek proti MHC I. třídy na imunologickou rejekci aortálních alograftů během sledovacího období z experimentu není jasný.

5.3. Vliv kryokonzervace a rychlosti rozmrazení na kvalitu a vitalitu žilních štěpů

Při kryokonzervaci buněčných suspenzí bylo prokázáno, že rychlejší rozmrazování vede k vyšší životaschopnosti kryokonzervovaných buněk. U kryokonzervace pevných tkání je situace složitější, protože proces rozmrazení musí respektovat a zachovat původní integritu tkáně. Při pokusech na králičích tepnách bylo prokázáno, že rychlé rozmrazování způsobuje mikrotrhliny ve stěně tepny (Pegg et al., 1997, Hunt et al 1994). V klinické praxi může takové poškození vést k časně ruptuře transplantované tepny. Z tohoto důvodu je nutné najít kompromis mezi zachováním životaschopnosti buněk a zároveň zachováním strukturální integrity kryokonzervovaných alograftů. Provedené experimentální studie na tepenných štěpech doporučují pomalé rozmrazování štěpů s přihlédnutím k jejich možnému poškození i funkci (Song et al., 2000, 1995, M'Bengue-Gaye et al., 1999). Experimentální práce provedená naší skupinou ukázala, že na rozdíl od tepen, kryokonzervované žilní alografty v nevykazují žádný rozdíl, pokud jde o strukturální poškození povrchu endotelu a bazální membrány v závislosti na dvou různých protokolech rozmrazování. Klíčovou roli v tomto rozdílu může hrát odlišná stavba stěny v porovnání s lidskými tepnami.

Kryokonzervační protokoly zajišťující dobrou viabilitu buněk po rozmrazení jsou považovány za zlatý standard uchování aloštěpů bez ohledu na to, že po transplantaci je nutná imunosupresivní léčba jako prevence rychlé deteriorace štěpu s jeho následnou okluzí nebo rupturou (Špunda et al., 2018, Špunda 2019, Matia et al., 2007, Jonas et al., 2014). Výsledky

konfokální elektronové mikroskopie za použití fluorescenčních vitálních barviv ukázaly vysokou životaschopnost buněk bezprostředně po rozmrazení při použití obou protokolů rozmrazování (pomalé i rychlé). Nepochybně je to důsledek správné kontroly podmínek před zmrazením (zamezení dlouhé doby teplé ischemie odběrem alograftu v rámci multiorgánových odběrů orgánů, použití roztoku pro konzervaci orgánů pro skladování odebraných štěpů během transportu a jejich včasné zpracování kryobance) i účinné kryoprotekce pomocí 10 % DMSO a bezpečného 3-5letého skladování v plynné fázi kapalného dusíku při teplotě nižší než -160 °C (Špaček et al., 2019). K těmto výsledkům může přispět i použití pomalého zmrazování řízenou rychlostí. Při tomto protokolu je menší riziko, že dojde k devitrifikaci a poškození štěpu (Měřička P. et al., 2011; Měřička P. et al., 2014, Taylor et al., 2019). Po rozmrazení byla viabilita buněk relativně stabilní během 48hodinové kultivace, což je interval, během kterého pravidelně dochází k opožděnému nástupu buněčné smrti (Baust et al. 2017). Pouze po použití protokolu pomalého rozmrazování došlo ke statisticky významnému poklesu životaschopnosti buněk. Tento výsledek však není překvapivý, protože pomalé rozmrazování vede k delšímu vystavení buněk koncentrovaným roztokům elektrolytů při teplotách pod bodem mrazu a buňky jsou poškozeny tzv. efektem roztoku, který může způsobit okamžitou nebo opožděnou buněčnou smrt. Naproti tomu rychlé rozmrazení způsobuje v případě arteriálních štěpů mikrotrhliny v cévní stěně, což v klinické praxi může způsobit časnou rupturu transplantované cévy (Pegg et al., 1997, Hunt et al., 1994). U žilních štěpů jsme mikrotrhliny způsobené rychlým rozmrazením nepozorovali, nicméně kombinaci protokolů pomalého chlazení a pomalého rozmrazování považujeme za kompromis mezi dosažením vysoké viability buněk po rozmrazení a zamezením rizika poškození strukturální integrity rozmrazeného cévního štěpu. Snížení viability u pomalu rozmrazovaných štěpů může být také ovlivněn použitím DMSO, který stále zůstává dominantním kryoprotektivem při kryokonzervaci cévních tkání bez ohledu na zprávy poukazující na jeho toxicitu (Goffin et al., 2000, Jashari et al, 2013, Awan et al, 2020). Je pravděpodobné, že pozorovaná opožděná buněčná smrt v tomto experimentálním modelu může nastat po transplantaci rozmrazených cévních štěpů a může způsobit jemné snížení buněčnosti štěpu, což vede ke snížení jeho imunogenicity, jak bylo pozorováno v pokusech s potkany (Spunda et al.,2018, Špunda 2019, Hruby et al., 2020).

5.4. Závislost mechanických vlastností žilních štěpů na kryokonzervaci a protokolu rozmrazení

Biomechanické studie prováděné na cévách jsou většinou limitovány jejich provedením, a to buď jednoosým nebo dvouosým tahovým zatížením. V experimentu provedeném naší pracovní skupinou byly vzorky čerstvých a kryokonzervovaných VSM testovány jako celek a axiální i obvodové deformace byly zaznamenávány synchronně. Tím jsme se v tomto modelu více přiblížili podmínkám, jakým jsou cévy vystavovány v lidském těle. Experimentální práce provedené s kryokonzervovanými tepennými štěpy v minulosti, kdy byly použity tradiční metodické přístupy porovnání mezního tahového napětí a deformace neprokázaly žádný statisticky významný rozdíl mezi nativními a kryokonzervovanými tepennými štěpy. Stejně tak nebyl prokázán žádný statisticky významný rozdíl v mezním tahovém napětí a deformaci mezi pomalu a rychle rozmrazovanými kryokonzervovanými tepennými štěpy (Lomas et al., 2013, Novotný et al., 2020). Naše studie založená na podrobné analýze deformací v axiálním a obvodovém směru provedené na žilní tkáni ukázala odlišné výsledky. Pro testování jsme použili dříve popsany protokol (Špaček et al., 2019). Rychlost rozmrazování kryokonzervovaných vzorků SVG neměla v této studii významný vliv na jejich mechanické vlastnosti. Pokud však byly porovnány čerstvé (chladem konzervované) s pomalu a rychle rozmrazovanými kryokonzervovanými VSM, mechanické vlastnosti rychle rozmrazovaných žil v obvodovém směru jsou na rozdíl od pomalu rozmrazovaných ovlivněny především v axiálním směru. V obvodovém směru byly změny mechanické odezvy při zatížení pozorovány také, ale v mnohem menší míře než v axiálním (Camasão et al., 2021, Kim et al., 2011). Výsledky studie ukázaly, že charakteristiky pomalu rozmražených žilních štěpů se mírně blíží charakteristikám čerstvých VSM. Jak také vyplývá z našich předchozích studií, poškození endotelu a bazální membrány je u pomalu rozmrazovaných cévních štěpů určených k transplantaci nižší a ochrana těchto intimálních struktur vede k menším známkám rejekce. Souhrnně lze spolu s výsledky mechanických testů pro manipulaci s kryokonzervovanými žilními štěpy doporučit spíše pomalý způsob rozmrazování cévních štěpů (Špaček et al., 2019).

5.5. Ovlivnění viability tepenných štěpů protokoly odběru, kryokonzervace a rozmrazení

Comet assay (kometový test), známý také jako Single cell gel electrophoresis – SCGE je analytická metoda vyvinutá pro studium degradace DNA pomocí elektroforézy po lýze buněk

a vizualizaci fragmentů DNA pomocí fluorescenčního barviva (Singh et al. 1988, Nandhakumar S. et al. 2011, Kumaravel et al. 2007, Johnson et al., 2013). V závislosti na různých faktorech, jako je autolýza, účinek toxických látek, ischemie tkáně, doba od rozmrazení nebo odběru, se jaderná DNA rozpadá a její fragmenty putují v elektrickém poli a vytvářejí obraz komety s hlavou a ocasem různé velikosti. Vychází se z předpokladu, že stupeň degradace jaderné DNA je ukazatelem životaschopnosti buněk, a tedy použitelnosti štěpu. V experimentu byly použity 3 typy štěpů - kryokonzervované, chladem konzervované (odebrané při multiorgánových odběrech) a kadaverózní (odebrané při pitvách). Je nutné podotknout, že všechny zkoumané typy štěpů se ve světě používají pro cévní rekonstrukce. Ve všech vzorcích byla zjištěna jak nedegradovaná DNA, tak degradovaná DNA v různém stupni rozpadu. Přítomnost degradované DNA může být způsobena autolytickými procesy, zejména u kadaverózních a multiorgánových štěpů. V těchto případech je doba teplé a studené ischemie delší než v případě kryokonzervovaných štěpů. Předpokládá se, že vzorky, u nichž převažují nedegradovaná jádra, jsou vhodnější pro implantaci štěpu. Výsledek studie potvrdil předpoklad, že nejméně vhodné z hlediska degradace DNA jsou kadaverózní štěpy získané z těl zemřelých osob na pitevně. Mírně lepší výsledky byly prokázány u čerstvých, chladem konzervovaných štěpů. Nejlepších výsledků lze dosáhnout při použití kryokonzervovaných pomalu rozmrazovaných štěpů, pravděpodobně z důvodu dosažení nejkratší doby teplé a studené ischemie štěpu. Je zřejmé, že pokud není v době odběru při multiorgánovém odběru orgánů vhodný příjemce štěpu, je nejlepší provést kryokonzervaci místo jeho delšího uchování a čekání na případného příjemce.

6. Závěr

Použití cévních štěpů pro účely alogenních transplantací v klinické medicíně a výsledky takovéto léčby jsou do značné míry závislé na technologii odběru a zpracování štěpů v každé konkrétní zemi, kde takový program existuje. Odlišnosti jsou jak v samotném původu štěpů, tak v jejich zpracování, uchování a v případě kryokonzervovaných štěpů i v jejich rozmrazení. Jak je patrné v textu výše, jedná se někdy o rozdíly přímo opačné. V zájmu bezpečnosti pacientů je tedy třeba vždy konkrétní technologii a používaný postup v konkrétní zemi experimentálně testovat a dosažené výsledky jsou platné pro takovou konkrétní situaci. Je výhodné, pokud lze ověřit bezpečnost léčby na experimentálním zvířecím modelu, potom lze výsledky do určité míry zobecnit a přispět tímto způsobem k poznání v této oblasti lékařství.

V České republice jsou transplantovány cévy řadu let v tzv. režimu fresh, tedy v rámci transplantací orgánů. Z důvodu nedostatku štěpů zejména v akutních situacích byl zahájen program kryokonzervovaných cévních štěpů. Autoři se snažili z celosvětově existujících technologických postupů zpracování cévních štěpů pro kryoprezervaci vybrat ty, které by přinesly co nejmenší riziko následných komplikací u nemocných, kterým je štěp transplantován. Tyto snahy začínají samotným odběrem štěpu, kdy se ukázalo, že odběr v rámci multiorganových odběrů a následné časné zpracování v Tkáňové ústředně, včetně použití konkrétních kritických materiálů, vede k maximálnímu zachování vitality buněk, endotelu a neporušení bazální membrány. Tento postup vede následně k nižší expresi povrchových antigenů, které stimulují organismus příjemce ve smyslu rejekce štěpu. Otázka ovlivnění rejekce je zásadní, jak s ohledem na dosažení maximální možné průchodnosti štěpu, nižší četnosti komplikací typu dilatace nebo ruptury, tak na druhou stranu i s ohledem na možné komplikace samotné imunosupresivní léčby.

Z tohoto důvodu byl navržen tzv. low-dose protokol IS léčby, který za důsledné monitorace klinického stavu pacienta je možné za určitých okolností po asi 2 letech omezit, případně zcela vysadit. Podstatná je otázka testování mechanických vlastností cévních štěpů, a rozdíly dosažené v jednotlivých skupinách žilních a tepenných štěpů. Samotný způsob testování jsme upravili tak, aby co nejlépe odpovídal reálné klinické situaci a získaná data byla relevantní. Experimentální data získaná rozsáhlým testováním uvedených hypotéz na zvířecím modelu podpořila svými výsledky technologický postup zpracování i klinický program transplantací cévních štěpů, tak, jak je v posledních 10 letech v ČR používán. Celou řadu otázek ještě zbývá zodpovědět, ale předložený soubor experimentálních prací představuje ucelenou snahu autorů o dosažení odpovědí v zájmu nemocných v této oblasti chirurgie.

7. Literatura (abecední řazení se jmennými odkazy v textu práce)

1. AbuRahma AF, Robinson PA, Holt SM. Prospective controlled study of polytetrafluoroethylene versus saphenous vein in claudicant patients with bilateral above knee femoropopliteal bypasses. *Surgery*. 1999; 126(4):594-601; discussion 601-2.
2. Adamec M, Matia I, Janousek L. Immunosuppression following venous allografts transplantations-the authors' experience. *Rozhl Chir*. 2011; 90(2):130–133
3. 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: 31202580
4. Awan, M.; Buriak, I.; Fleck, R.; Fuller, B.; Goltsev, A.; Kerby, J.; Lowdell, M.; Mericka, P.; Petrenko, A.; Petrenko, Y.; et al. Dimethyl sulfoxide: A central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regen. Med*. 2020, 15, 1463–1491.
5. Azuma N, Sasajima T, Kubo Y. Immunosuppression with FK506 in rat arterial allografts: fate of allogeneic endothelial cells. *J Vasc Surg* 1999; 29(4):694-702
6. Bahnini A, Ruotolo C, Koskas F, Kieffer E In situ fresh allograft replacement of an infected aortic prosthetic graft: eighteen months' follow-up. *J Vasc Surg*. 1991; 14(1):98–102
7. Baust, J.M.; Snyder, K.K.; VanBuskirk, R.G.; Baust, J.G. Changing Paradigms in Biopreservation. *Biopreserv. Biobank*. 2009; 7, 3–12.
8. 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
9. Camasão DB, Mantovani D. The mechanical characterization of blood vessels and their substitutes in the continuous quest for physiological-relevant performances. A critical review. *Mater Today Bio*. 2021 Mar 7;10:100106. doi: 10.1016/j.mtbio.2021.100106. PMID: 33889837; PMCID: PMC8050780.
10. Chiesa R, Astore D, Piccolo G, Melissano G, Jannello A 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* 1998; 12(5):457–462

11. de Donato G, Setacci F, Galzerano G, Ruzzi U, Borrelli MP, Mazzitelli G, Setacci C. Prosthesis infection: prevention and treatment. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 2014 Dec; 55(6):779-92.
12. Dumont FJ. FK506, an immunosuppressant targeting calcineurin function. *Curr Med Chem* 2000; 7(7):731-48.
13. Ensminger SM, Spriewald BM, Witzke O, Morrison K, Pajaro OE, Morris PJ, et al. Kinetics of transplant arteriosclerosis in MHC-Class I mismatched and fully allogeneic mouse aortic allografts, *Transplantation*, 2002; vol. 73 (pg. 1068-74
14. Faivre L, Saoudi S, Astier A, et al. FK 506 dose in transplantation: from theory to practice. *Transplant Proc* 2001; 33(4):2594-7
15. Fréguin-Bouilland C, Godin M, Bellien J, Richard V, Remy-Jouet I, Dautreux B, Henry JP, Compagnon P, Thuillez C, Plissonnier D, Joannidès R. Protective effect of mycophenolate mofetil on endothelial function in an aortic allograft model. *Transplantation* 2011; 91: 35-41
16. Goffin, Y.A.; Van Hoeck, B.; Jashari, R.; Soots, G.; Kalmar, P. Banking of cryopreserved heart valves in Europe: Assessment of a 10-year operation in the European Homograft Bank (EHB). *J. Heart Valve Dis.* 2000; 9, 207–214.
17. Goto T, Kino T, Hatanaka H, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H. FK 506: historical perspectives. *Transplant Proc* 1991; 23:2713-2717
18. Hannon RJ, Wolfe JH, Mansfield AO. Aortic prosthetic infection: 50 patients treated by radical or local surgery. *Br J Surg* 1996; 83(5):654-8.
19. Harlander-Locke MP, Harmon LK, Lawrence PF, Oderich GS, McCready RA et al. The use of cryopreserved aortoiliac allograft for aortic reconstruction in the United States. *J Vasc Surg* 2014; 59(3):669–674
20. Heim C, Eckl S, Preidl R, Ramsperger-Gleixner M, Koch N, Goldmann K, Spriewald BM, Weyand M, Ensminger SM. Delayed therapy with clopidogrel and everolimus prevents progression of transplant arteriosclerosis and impairs humoral alloimmunity in murine aortic allografts. *EJCTS* 2015;47: 180-187
21. Hunt CJ, Song YC, Bateson EAJ, et al. Fractures in cryopreserved arteries. *Cryobiology* 1994; 31:506e15.
22. Jashari, R.; Van Hoeck, B.; Ngakam, R.; Goffin, Y.; Fan, Y. Banking of cryopreserved arterial allografts in Europe: 20 years of operation in the European Homograft Bank (EHB) in Brussels. *Cell Tissue Bank*. 2013, 14, 589–599.
23. Johnson L. A., Ferris J. A. J. *Forensic Science International* 2002; 126(1):43-47

24. Johnson WC, Lee KK. A comparative evaluation of polytetrafluoroethylene, umbilical vein, and saphenous vein bypass grafts for femoral-popliteal above-knee revascularization: a prospective randomized Department of Veterans Affairs cooperative study. *J Vasc Surg* 2000; 32(2):268-77.
25. Jonas, S.; Matia, I.; Fellmer, P.; Splith, K.; Varga, M.; Adamec, M.; Kämmerer, I.; Feldbrügge, L.; Krenzien, F.; Hau, H.-M.; 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, 225–232.
26. Khanna AK, Hosenpud JS, Plummer MS, Hosenpud JD. Analysis of transforming growth factor-beta and profibrogenic molecules in a rat cardiac allograft model treated with cyclosporine. *Transplantation* 2002; 73: 1543.
27. Khanna A, Kapur S, Sharma V, et al. In vivo hyperexpression of transforming growth factor-beta1 in mice: stimulation by cyclosporine. *Transplantation* 1997; 63(7):1037-9.
28. Kieffer E, Gomes D, Chiche L, et al. Allograft replacement for infrarenal aortic graft infection: early and late results in 179 patients. *J Vasc Surg* 2004; 39(5):1009-17.
29. Kieffer E, Bahnini A, Koskas F, et al. In situ allograft replacement of infected infrarenal aortic prosthetic grafts: results in forty-three patients. *J Vasc Surg* 1993;
30. Kim J, Baek S. Circumferential variations of mechanical behavior of the porcine thoracic aorta during the inflation test. *J Biomech.* 2011 Jul 7;44(10):1941-7. doi: 10.1016/j.jbiomech.2011.04.022. Epub 2011 May 7. PMID: 21550609.7(2):349-55; discussion 355-6.
31. Klinkert P, Schepers A, Burger DH, et al. Vein versus polytetrafluoroethylene in above-knee femoropopliteal bypass grafting: five-year results of a randomized controlled trial. *J Vasc Surg* 2003; 37(1):149-55.
32. Kniemeyer HW, Torsello G, Hennes N, Grabitz K, Sandmann W Fresh homologous arterial transplant as aorto-iliac- femoral vascular replacement in prosthesis infection. *Vasa* 1994; 23(3):268–273
33. Knight RJ, Liu H, Fishman E, Reis ED. Cold ischemic injury, aortic allograft vasculopathy, and proinflammatory 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
34. Kumaravel T.S. et al. Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology* 2009; 25(1):53–6.

35. Lomas, R.J., Dodd, PDF, Rooney, P., Pegg, DE, Hogg, PA, Eagle, ME, Bennet, KE, Clarkson, A, Kearney, JN A Standardised Protocol for the Validation of Banking Methodologies for Arterial Allografts. *Cell Tissue Bank* 2013; 14, 495-503
36. Lopez-Cepero M, Sanders CE, Buggs J, Bowers V. Sensitization of renal transplant candidates by cryopreserved cadaveric venous or arterial allografts. *Transplantation* 2002; 73(5):817-9.
37. 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
38. Matia I, Adamec M, Janousek L, Lipar K, Viklicky O Fresh arterial grafts as conduits for vascular reconstructions in transplanted patients. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006;32(5):549–556
39. 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.
40. Matia I, Janousek L, Marada T, Adamec M Cold-stored venous allografts in the treatment of critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007; 34(4):424–431
41. Matia I, Adamec M, Janousek L, Lipár K, Marada T et al. Clinical experience with cold-preservation of venous and arterial allografts. Long-term outcomes. *Rozhl Chir* 2010; 89(1):45–54
42. Matia I, Fellmer P, Splith K, Varga M, Adamec M, Kämmerer I, Feldbrügge L, Krenzien F, Hau HM, Atanasov G, Schmelzle M, Jonas S. 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 May 12;19:225-32. doi: 10.12659/AOT.889870.
43. M'Bengue-Gaye A, Fleury JP, Gerota J, et al. Transplantation of cryopreserved carotids in the rabbit: effect of cryoprotective agents. *Dakar Med* 1999;44:180e5.
44. Měřička P., Špatenka J., Navrátil P.: Organizace a chirurgická technika odběru tkání v rámci multiorgánového odběru In: Baláž P., Janek J., Adamec M. (eds.). Odběry orgánů k transplantaci/ Odbery orgánov na transplantacie. Karolinum Praha 2011; 240-251.
45. Měřička 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.
46. Mirelli M, Stella A, Faggioli GL, et al. Immune response following fresh arterial homograft replacement for aortoiliac graft infection. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1999; 18(5):424-9.
 47. 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.
 48. Møller, P., Azqueta, A., Boutet-Robinet, E., Koppen G., Bonassi S., Milič M., Gajski G., Costa S., Teixeira J.P.. Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. *Nat Protoc* 2020; 15, 3817–3826
 49. Nandhakumar S., Parasuraman S., Shanmugam M. et al. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics* 2011; 2(2):107-111.
 50. Novotny R, Mericka P, Chlupac J, Matejka R, Kristek J, Marada T, Konarik M, Ivak P, Sterba L, Hlubocky J, Pirk J, Janousek L, Froncek J. The Effect of Different Thawing Rates on Cryopreserved Human Iliac Arteries Allograft's Structural Damage and Mechanical Properties. *Biomed Res Int.* 2020; Oct 8;2020:6545190. doi: 10.1155/2020/6545190. PMID: 33102587; PMCID: PMC7568151.
 51. 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
 52. Pegg DE, Wusteman MC, Boylan S. Fractures in cryopre- served elastic arteries. *Cryobiology* 1997; 34:183e92.
 53. Plissonnier D, Nochy D, Poncet P, et al. Sequential immunological targeting of chronic experimental arterial allograft. *Transplantation* 1995; 60(5):414-24.
 54. Prager M, Polterauer P, Bohmig HJ, et al. Collagen versus gelatin-coated acron versus stretch polytetrafluoroethylene in abdominal aortic bifurcation graft surgery: results of a seven-year prospective, randomized multicenter trial. *Surgery* 2001; 130(3):408-14.
 55. Prager M, Ho'izenbein Th, Aslim E, Domenig K, M}uhlbacher F, Kretschner G Fresh arterial homograft transplanta- tion: a novel concept for critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Surg* 2002; 24(4):314–321

56. Pupka A, Skora J, Janczak D, et al. Immunosuppression in the treatment of vascular prosthesis infection with arterial transplantation. *Pol Merkur Lekarski* 2004; 16(91):8-11.
57. 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. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 2011; 41: 61-67.
58. Rodríguez M, Pascual G, Pérez-Köhler B, Cifuentes A, Garcia-Honduvilla N, Bellón JM, et al. Immune response to the long-term grafting of cryopreserved small-diameter arterial allografts. *Histol Histo- pathol.* 2012; 27: 873–84. <https://doi.org/10.14670/HH-27.873> PMID: 22648543
59. Shin GT, Khanna A, Sharma VK, et al. In vivo hyperexpression of transforming growth factor-beta 1 in humans: stimulation by cyclosporine. *Transplant Proc* 1997; 29(1-2):284
60. Singh N.P. et al. A simple technique for the quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 1988; 175(1):184–91.
61. 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; 32:405e21.
62. Song YC, Khirabadi BS, Lightfoot F, et al. Taylor Vitreous cryopreservation maintains the function of vascular grafts. *Nat Biotechnol* 2000;18:296e9.
63. Špaček M, Měříčka P, Janoušek L, Štádler P, Adamec M, Vlachovský R, Guňka I, Navrátil P, Thieme F, Mitáš P, Špunda R, Špatenka J, Staffa R, Němec P, Lindner J. Organization model for allotransplantations of cryopreserved vascular grafts in Czech Republic. *Cell Tissue Bank.* 2018 Sep;19(3):437-445.
64. Špaček M, Měříčka P, Janoušek L, Štádler P, Adamec M, Vlachovský R, Guňka I, Navrátil P, Thieme F, Špunda R, Burkert J, Staffa R, Němec P, Lindner J. Current vascular allograft procurement, cryopreservation and transplantation techniques in the Czech Republic. *Adv Clin Exp Med.* 2019(a) Apr;28(4):529-534.
65. Špaček M., Chlup H., Mitáš P., Veselý J., Lambert L., Mlček M., Krajíček M., Lindner J., Grus T. Three-layer collagen-based vascular graft designed for low-flow peripheral vascular reconstructions. *J Appl Biomed.* 2019; 17(1), 47-52.

66. Spunda R., Hruby J., Adamec M., Matia I., Spacek M. 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
67. Špunda R, Hrubý J, Měříčka P, Mlček M, Pecha O, Splith K, Schmelzle M, Krenzien F, Lindner J, Matia I, Špaček M. Immunosuppressive protocols with tacrolimus after cryopreserved aortal allotransplantation in rats. *PLoS One*. 2018; 13(8), e0201984. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0201984
68. Špunda R. Imunosuprese po transplantaci kryokonzervovaných tepenných alloštěpů v experimentu. [Immunosuppressive therapy after transplantation of cryopreserved arterial allografts in rats]. Praha, 2019. 117 s., 6 příl. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta
69. Stadler P, Sebesta P, Klika T, et al. Allografts in the vascular surgery. *Rozhl Chir* 2005; 84(7):350-5
70. Szilagyi DE, Rodriguez FJ, Smith RF, Elliott JP. Late fate of arterial allografts. Observations 6 to 15 years after implantation. *Arch Surg* 1970; 101(6):721-33.
71. Taylor, M.J.; Weegman, B.P.; Baicu, S.C.; Giwa, S.E. New Approaches to Cryopreservation of Cells, Tissues, and Organs. *Transfus. Med. Hemother.* 2019; 46, 197–215.
72. Teebken OE, Pichlmaier MA, Brand S, Haverich A Cryopreserved arterial allografts for in situ reconstruction of infected arterial vessels. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004; 27(6):597–602
73. Tepperman E, Ramzy D, Prodger J, Sheshgiri R, Badiwala M, Ross H, RAO V. Surgical biology for the clinician: vascular effects of immunosuppression. *Can J Surg* 2010; 53: 57-63
74. Thanaat O et al. Direct and Indirect Effects of Alloantibodies Link Neointimal and Medial Remodeling in Graft Arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 2359– 2365.
75. Touma J, Cochennec F, Parisot J, Fialaire Legendre A et al. In situ reconstruction in native and prosthetic aortic infections using cryopreserved arterial allografts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2014; 48(3):292–299
76. Vogt PR, von Segesser LK, Goffin Y, Niederhauser U, Genoni M et al. Eradication of aortic infections with the use of cryopreserved arterial homografts. *Ann Thorac Surg* 1996; 62(3):640–645

77. Vincenti F, Jensik SC, Filo RS, et al. A long-term comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine in kidney transplantation: evidence for improved allograft survival at five years. *Transplantation* 2002; 73(5):775-82.
78. Vogt PR, Brunner-La Rocca HP, Carrel T, von Segesser LK, Ruef C et al. Cryopreserved arterial allografts in the treatment of major vascular infection: a comparison with conventional surgical techniques. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 116(6):965–972
79. Wang T, Donahoe PK, Zervos AS. Specific interaction of type I receptors of the TGF-beta family with the immunophilin FKBP-12. *Science* 1994; 265(5172):674-6.
80. Wilson WR, Bower TC, Creager MA, Amin-Hanjani S, O'Gara PT, Lockhart PB, Darouiche RO, Ramlawi B, Derdeyn CP, Bolger AF, Levison ME, Taubert KA, Baltimore RS, Baddour LM; American Heart Association Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease of the Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Peripheral Vascular Disease; and Stroke Council. Vascular Graft Infections, Mycotic Aneurysms, and Endovascular Infections: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2016 Nov 15; 134(20):e412-e460.
81. Zoja C, Furci L, Ghilardi F, et al. Cyclosporin-induced endothelial cell injury. *Lab Invest* 1986; 55(4):455-62

8. Přílohy

- 8.1.** Příloha 1: 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)

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0201984>

- 8.2.** Příloha 2: Spunda R., Hruby J., Adamec M., Matia I., Spacek M. 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

<https://www.springermedizin.at/cold-stored-arterial-allografts-for-in-situ-reconstruction-of-in/14925624>

- 8.3.** Příloha 3: Hruby J, Spunda R, Mericka P, Mlcek M, Pecha O, Splith K, et al. Influence of the new standardized clinical cryopreservation/slow thawing protocol on immunogenicity of arterial allografts in rats. PLoS ONE 2020;15(3)

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0230234>

- 8.4.** Příloha 4: Špaček M, Měřička 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; (b) Nov 16

[https://www.annalsofvascularsurgery.com/article/S0890-5096\(19\)30990-2/fulltext](https://www.annalsofvascularsurgery.com/article/S0890-5096(19)30990-2/fulltext)

- 8.5.** Příloha 5: Měřička P, Janoušek L, Benda A, Lainková R, Sabó J, Dalecká M, Prokšová P, Salmay M, Špunda R, Pecha O, Jandová M, Gregor J, Štěřba L, Špaček M, Lindner J. Cell Viability Assessment Using Fluorescence Vital Dyes and Confocal Microscopy in Evaluating Freezing and Thawing Protocols Used in Cryopreservation of Allogeneic Venous Grafts. International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22(19)

<https://www.mdpi.com/1422-0067/22/19/10653>

- 8.6.** Příloha 6: Chlup H, Špunda R, Salmay M, Měřička P, Lainková R, Slautin A, Janoušek L, Jandová M, Gregor J, Lindner J, Špaček M. Mechanical properties of fresh and cryopreserved venous grafts: influence of cryopreservation and thawing. *J Mech Behav Biomed Mater* – under review
- 8.7.** Příloha 7: Pilin A, Mazura I, Lainková R, Salmay M, Měřička P, Pecha O, Janoušek L, Špunda R, Lindner J, Špaček M. Viability of human arterial allografts monitored by comet assay. *Physiol. Res.* – in press