

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Doktorský studijní program v biomedicíně

Studijní obor: Experimentální chirurgie



**MUDr. Martin Varga**

Název závěrečné práce

**Allogenní žilní štěp v rekonstrukční cévní chirurgii - použití  
imunoprese v experimentu.**

Title

Allogenuous venous graft in reconstructive vascular surgery - the use of  
immunosuppression in experiment.

Typ závěrečné práce

Disertační

Vedoucí závěrečné práce:

MUDr. Martin Oliverius, PhD.

Konzultant:

MUDr. Ivan Matia, PhD.

Praha, 2012

**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, 05.05.2012

MUDr. Martin Varga

Podpis

Identifikační záznam:

VARGA, Martin. *Allogenní žilní štěp v rekonstrukční cévní chirurgii - použití imunosuprese v experimentu. [Allogeneous venous graft in reconstructive vascular surgery - the use of immunosuppression in experiment]*. Praha, 2012. 84 stran, počet příloh 5. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta/ Institut klinické a experimentální medicíny. Školitel Oliverius, Martin

**OBSAH**

<b>OBSAH</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRAKT (CZECH)</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT (ENGLISH)</b>	<b>5</b>
<b>1 ÚVOD</b>	<b>6</b>
<b>2 HYPOTÉZY PRÁCE</b>	<b>10</b>
<b>3 CÍLE PRÁCE</b>	<b>11</b>
<b>4 MATERIÁL A METODY</b>	<b>12</b>
4.1 Zvířata	12
4.2 Operační postup	12
4.3 Skupiny zvířat	13
4.4 Protokol imunosuprese	13
4.5 Histologické a imunohistochemické vyšetření	14
4.5.1 Imunohistochemické vyšetření	14
4.5.2 Detekce CD4, CD8 a buněk s von Willebrand. faktorem	15
4.5.3 Detekce imunoglobulinů	15
4.5.4 Detekce RT1.B pozitivních buněk	15
4.6 Statistické metody	16
<b>5 EXPERIMENT 1</b>	<b>18</b>
5.1 Materiál a metody	18
5.2 Výsledky	18
5.3 Diskuze	18
<b>6 EXPERIMENT 2</b>	<b>21</b>
6.1 Materiál a metody	21
6.2 Výsledky	21
6.3 Diskuze	22
<b>7 EXPERIMENT 3</b>	<b>25</b>
7.1 Materiál a metody	25
7.2 Výsledky	25
7.3 Diskuze	27
<b>8 EXPERIMENT 4</b>	<b>29</b>
8.1 Materiál a metody	29
8.2 Výsledky	29
8.3 Diskuze	30
<b>9 ZÁVĚRY DIZERTAČNÍ PRÁCE</b>	<b>36</b>
<b>10 LITERATURA</b>	<b>37</b>
<b>11 SEZNAM PUBLIKACÍ</b>	<b>42</b>
11.1 Publikace, které jsou podkladem disertace	42
11.2 Publikace bez vztahu k tématu disertace	42
<b>12 SEZNAM PŘÍLOH</b>	<b>45</b>
<b>13 PŘÍLOHA A</b>	<b>46</b>
<b>14 PŘÍLOHA B</b>	<b>52</b>
<b>15 PŘÍLOHA C</b>	<b>60</b>
<b>16 PŘÍLOHA D</b>	<b>68</b>
<b>17 PŘÍLOHA E</b>	<b>74</b>

**ABSTRAKT (CZECH)**

**Úvod:** Výzkum použití imunosuprese v kardiovaskulární chirurgii a intervenční kardiologii je v současnosti zaměřen na 3 velké oblasti: 1) ovlivnění intimální hyperplazie koronárních i periferních žilních bypasů, 2) ovlivnění rejekce cévních allograftů, 3) ovlivnění intimální hyperplazie koronárních tepen po jejich perkutánní plastice. Jedním z moderních imunosupresivních přípravků vhodným k použití v těchto indikacích je takrolimus - FK506. Při použití v experimentu inhiboval FK506 reakci tepenných alloštěpů i rozvoj intimální hyperplazie po perkutánní plastice koronárních tepen.

**Cíl práce:** Ověřit účinky imunosuprese pomocí FK506 na průběh arterializace syngenních a allogenních žilních štěpů u potkanů.

**Materiál a metody:** Samce potkanů kmene Lewis (LEW) (n = 46) jsme použili jako příjemce žilních štěpů. Dárce allogenních štěpů byli potkani kmene Brown-Norway (BN) (n = 13) a syngenních štěpů potkani kmen Lewis (LEW) (n = 10). Příjemce jsme rozdělili do šesti skupin. Ve skupině A, E a F byla zvířata po syngenní (LEW do LEW) a ve skupině B, C a D po allogenní (BN do LEW) transplantaci. Zvířata ve skupině C a F dostávala denně 0.02 mg a zvířata ve skupině D a F 0.01 mg FK506 na 100 g váhy. Skupina A a B byla bez imunosuprese. Třicátý pooperační den jsme srovnávali histologické nálezy mezi skupinami.

**Výsledky:** Rozdíl koncentrace FK506 30. pooperační den mezi zvířaty s vyšší a nižší dávkou byl signifikantní ( $p < 0.001$ ) v allogenním (skupina C a D) i syngenním (skupina E a F) experimentu. Po syngenní transplantaci jsme pozorovali proces arterializace žilní stěny (adaptace na tlakové podmínky v tepenném řečišti) u všech zvířat (skupina A, E a F). Použití FK506 mělo v tomto procesu inhibiční vliv na rozvoj intimální hyperplazie. Tato inhibice byla závislá na dávce imunosuprese (šířka tunica intima ve skupině A  $12.7 \pm 7.0 \mu\text{m}$ , ve skupině E  $7.0 \pm 3.0 \mu\text{m}$  a ve skupině F  $5.0 \pm 1.0 \mu\text{m}$ ). U allogenních zvířat bez imunosuprese (skupina B) jsme 30.den po transplantaci pozorovali rejekci žilní stěny s destrukcí a desorganizací intimální vrstvy bez rozvoje intimální proliferace. Použití FK506 v obou dávkách mělo inhibiční vliv na rozvoj rejekce allogenní žilní stěny a umožnilo proces její arterializace. Mezi skupinami C a D jsme nezaznamenali statisticky významné rozdíly v tloušťce intimální vrstvy ani v stupni infiltrace žilní stěny CD4+, CD8+ a Lewis MHC třídy II pozitivními buňkami.

**Závěr:** U autologních žilních štěpů vedlo podávání FK506 k inhibici rozvoje intimální hyperplazie. Tento inhibiční účinek FK506 byl závislý na dávce.

U allogenních žilních štěpů potlačilo podávání FK506 jejich rejekci. Tato inhibice umožnila proces žilní přestavby a arterializaci žilní stěny. K supresi rejekce byla dostačující i poloviční dávka FK506 nutná k inhibici rejekce tepenných alloštěpů na stejném zvířecím modelu.

**Klíčová slova:** žilní allograft - imunosuprese - transplantace - FK506 - intimální hyperplazie

**ABSTRACT (ENGLISH)**

**Background:** The investigation of the immunosuppression usage in cardiovascular surgery and interventional cardiology is, at present, concentrated on three main topics: 1) influence on intimal hyperplasia of coronary and peripheral vascular reconstructions 2) influence on rejection of allogeneic vascular grafts and 3) influence on intimal hyperplasia of coronary arteries after endovascular interventions. Modern immunosuppressive drug FK506 (Tacrolimus) could have a positive effect for these indications. In experimental study, FK506 inhibited rejection of arterial allografts and also inhibited intimal hyperplasia in percutaneous coronary interventions.

**Aims:** The purpose of this study was to evaluate the effect of systemic tacrolimus treatment on the process of arterialisation of allogeneic and syngeneic venous grafts in a rat vein-to-artery implantation model.

**Material and Methods:** Lewis (LEW) rats were used as recipients of syngeneic (Lewis) or allogeneic (Brown-Norway; BN) ilio-lumbar veins which were implanted into abdominal aorta. Recipients were divided into six groups. In groups A, E and F were animals after syngeneic (LEW to LEW) and in groups B, C and D were animals after allogeneic (BN to LEW) transplantations. Animals in the groups C and F had daily intramuscular injections of tacrolimus of 0.2 mg/kg and animals in groups D and F 0.1 mg/kg, respectively. The groups A and B had no treatment. Light microscope evaluations of arterialised vein grafts were performed 30 days after operation.

**Results:** The blood level of FK506 30 days after transplantation was statistically different between the allogeneic groups C and D and between syngeneic groups E and F ( $p < 0.001$ ). In syngeneic groups (A, E, F) we observed venous graft arterialisation in all animals. The use of FK506 led to inhibition of intimal hyperplasia in these animals. Moreover, this inhibition was dose dependent (thickness of intimal layer: group A  $12.7 \pm 7.0 \mu\text{m}$ , group E  $7.0 \pm 3.0 \mu\text{m}$  and group F  $5.0 \pm 1.0 \mu\text{m}$ ). The process of venous graft arterialisation was also present in the allogeneic group D with a minimal dose as well as in group C with low dose of FK506. But we observed no difference in thickness of the intimal layer between these groups (group C  $15.0 \pm 8.4 \mu\text{m}$ , group D  $15.1 \pm 6.1 \mu\text{m}$ ). In contrast, the allogeneic group B without immunosuppression showed no histological signs of arterialisation with destruction of intimal layer without signs of proliferation.

**Conclusion:** Treatment with FK506 showed a dose dependent inhibition of neointimal hyperplasia in arterialised syngeneic vein grafts in rats.

In allogeneic vein grafts, FK506 was sufficient even at a minimal dose (half-dose compared to that use in arterial transplantation model) to inhibit acute rejection and facilitated their arterialisation 30 days after transplantation.

**Key words:** venous allograft - immunosuppression - transplantation- FK506 - intimal hyperplasia

## **1 ÚVOD**

### **Použití imunosuprese v kardiovaskulární chirurgii a intervenční kardiologii**

Výzkum použití imunosuprese v kardiovaskulární chirurgii a intervenční kardiologii je v současnosti zaměřen na 3 velké oblasti: 1) ovlivnění intimální hyperplazie koronárních i periferních žilních bypasů, 2) ovlivnění rejekce cévních allograftů, 3) ovlivnění intimální hyperplazie koronárních tepen po jejich perkutánní plastice<sup>1-3</sup>. Z dostupných imunosupresivních přípravků se v těchto oblastech nejčastěji používají: cyklosporin A (CyA), sirolimus a nově i takrolimus (FK506)<sup>3-9</sup>.

### **Intimální hyperplazie žilních autoštěpů**

Pro pacienty trpící těžšími stupni ischemické choroby dolních končetin a vyžadující cévní rekonstrukci je materiálem volby vlastní véna saphena magna<sup>10,11</sup>. Implantace žilního štěpu do tepenného řečiště vede ke změnám v žilní stěně a k její adaptaci na nové biomechanické podmínky<sup>12</sup>. Tento složitý biologický proces je nazýván arterializací žilního štěpu. Arterializace je spojena s charakteristickými změnami v proliferaci, migraci a apoptóze buněk cévní stěny a v produkci extracelulární matrix<sup>13</sup>. Tato adaptace vede k typickým anatomickým změnám žilní stěny: intimální hyperplázii, ztluštění mediální vrstvy s dobře organizovanými vrstvami hladkých svalových buněk a neovaskularizaci adventiciální vrstvy<sup>12,14,15</sup>.

U autologních žilních štěpů je ale nadměrná intimální hyperplazie s následnou progresí aterogeneze častou příčinou jejich pozdních uzávěrů<sup>16</sup>. Pro pacienta to znamená riziko ischémie postižené končetiny s případnou amputací. Rozsah intimální hyperplazie je úměrný stupni poškození endotelové vrstvy žilního štěpu. To je způsobeno zejména chirurgickou manipulací, ischémii a také chronickou fyzickou traumatizací žilní stěny v tepenném řečišti<sup>14,17-21</sup>.

Tyto nové poznatky v patofyziologii intimální hyperplazie vedly k vývoji nových terapeutických metod zaměřených na její potlačení. V klinické praxi se to projevilo zejména zavedením stentů potažených léky (sirolimus, paklitaxel) používaných v léčbě koronárních stenóz<sup>22,23</sup>. Několik klinických studií prokázalo, že sirolimus

uvolňující stenty a stenty uvolňující paklitaxel jsou lepší než prosté kovové stenty. U léky uvolňujících stentů se prokázal nižší počet restenóz i závažných srdečních příhod<sup>24,25</sup>. Na druhou stranu byl ale počet trombóz těchto stentů v 1. roce po implantaci vyšší než u klasických kovových stentů<sup>26</sup>. Příčinou těchto trombóz je fakt, že stenty potažené léky vedou ke značnému zpoždění reendotelizace a hojení poranění cévní stěny.

V cévní chirurgii není medikamentózní ovlivnění intimální hyperplazie cévních náhrad běžné. V experimentálních pracích ale mělo použití sirolimu výrazný inhibiční vliv na rozvoj intimální hyperplazie žilních autoštěpů u myši<sup>5</sup>. Největším limitem použití látek s antiproliferativním účinkem u cévních náhrad je to, že zatím nebylo vyvinuto médium vhodné k jejímu použití u periferních žilních bypasů.

### **Rejekce žilních alloštěpů**

Mnoho pacientů s těžkými stupni ischemické choroby dolních končetin a nemožností použití cévní protézy pro vysoké riziko infekce nebo omezený výtok v periférii je kontraindikovaných k cévní rekonstrukci z důvodů nepřítomnosti vhodné vlastní véna saphena magna<sup>27</sup>. U většiny těchto pacientů je následně provedená vysoká amputace postižené končetiny.

V poslední době se objevuje množství literárních údajů hodnotících výsledky cévních rekonstrukcí pomocí allogenních žilních i tepenných štěpů<sup>27</sup>. Tyto štěpy umožňují nejen zvýšit počet zachráněných končetin u pacientů s chronickou kritickou ischemií, ale také zkvalitnit život nemocných s ischemickou chorobou dolních končetin. Jejich největší nevýhodou je ale rejekce, která vede v konečném důsledku k morfologickému a funkčnímu poškození štěpů s následným rizikem amputace postižené končetiny.

Allogenní žilní štěpy byly v minulosti považovány za minimálně imunogenní. Z posledních poznatků ale vyplývá, že žilní stěna allogenních štěpů vyvolává v těle příjemce imunitní reakci způsobenou expresí HLA antigenů třídy I a II na povrchu jejich buněk<sup>28-30</sup>. Tyto antigeny stimulují buněčnou i humorální imunitu příjemce. Výsledkem kaskády imunitních reakcí je ztráta normální struktury žilní stěny, která se klinicky projeví jako trombóza a uzávěr nebo jako dilatace a ruptura štěpu<sup>31</sup>. Mezi hlavní komponenty cévní stěny vyvolávající imunitní odpověď

příjemce patří vzhledem ke svému obsahu MHC antigenů endotelová vrsta v luminu cévy, endotel ve vasa vasorum a svalové buňky <sup>31</sup>.

Výsledky cévních allovenózních rekonstrukcí se pohybují v širokém spektru jednorocní průchodnosti (10-70 %) <sup>6</sup>. Dlouhodobou průchodnost rekonstrukce ovlivňuje ve značné míře rejekce štěpu. Použití imunosuprese u příjemců ale není ve světě běžné. Také není stanoven definovaný imunosupresivní protokol. Některá pracoviště nedávají imunosupresi vůbec, jiná používají monoterapii prednisonem, azathioprimem či cyklosporinem A <sup>6,27</sup>.

Studie na potkanech, psech a prasatech jasně prokázaly, že žilní allografty jsou antigenní stejně jako jiné allogenní tkáně <sup>32-34</sup>. Stevens a spol. prokázali, že vznik dárcovských specifických protilátek u příjemce předcházela rozvoji uzávěru žilního alloštěpu <sup>34</sup>. Navíc byla průchodnost žilních alloštěpů a tvorba protilátek přímo ovlivněna shodou v MHC systému mezi dárcem a příjemcem. V experimentech na psech prodloužila kompatibilita v MHC systému mezi příjemcem a dárcem průchodnost žilních alloštěpů. Nezabránila však pozdnímu uzávěru těchto štěpů <sup>2</sup>.

### **Použití imunosuprese v kardiologii a kardiovaskulární chirurgii**

Cyklosporin A (CyA) je nejčastějším imunosupresivem používaným po cévních transplantacích v klinické praxi <sup>6</sup>. Nevýhodou CyA po transplantaci cévních alloštěpů je kromě jiného i indukce produkce TGF-beta (transforming growth factor) a tím zvýšení fibrinogeneze <sup>35</sup>. FK506 inhibuje časnou fázi aktivace T lymfocytů závislou na interleukinu-2 a také inhibuje produkci TGF-beta <sup>36</sup>. V klinice se používá v kombinaci s jinými imunosupresivy při potlačení imunitní reakce, zejména po transplantaci ledvin a jater <sup>37</sup>.

FK506 (generický název: tacrolimus) patří mezi moderní imunosupresivní přípravky. I když má odlišnou chemickou strukturu než cyklosporin A, patří spolu s ním do skupiny kalcineurínových inhibitorů <sup>38</sup>. V dostupné literatuře mimo výsledků publikovaných naším pracovištěm jsme se neseťkali s použitím FK506 po cévních transplantacích <sup>39</sup>.

FK506 je ve srovnání se sirolimem méně účinný při potlačování proliferace a migrace hladkých svalových buněk cévní stěny a má také nižší antiproliferativní účinek na endoteliální buňky <sup>40,41</sup>. V prasečím modelu byla míra reendotelizace

koronárních tepen podobná mezi stenty uvolňujícími takrolimus a prostými kovovými stenty<sup>3,42</sup>. Je pravděpodobné, že právě tyto vlastnosti FK506 povedou k jeho využití v další generaci lékem potažených stentů<sup>3</sup>.

V experimentu byl FK506 úspěšně použit také po transplantaci aortálních štěpů<sup>7</sup>. V naší vlastní experimentální práci jsme dokonce prokázali imunosupresivní účinky FK506 po transplantaci břišní aorty u potkanů i při jeho oddálené aplikaci<sup>43</sup>. Hladina FK506 se v našem experimentu pohybovala kolem 5 ng/ml při denní dávce 0.02 mg na 100 g hmotnosti zvířete.

Podávání imunosuprese je u každého pacienta limitováno jejími nežádoucími účinky. Proto je nutné používat co nejnižší, ale ještě efektivní dávku. K ověření této dávky u jednotlivých imunosupresiv slouží i zvířecí modely. V naší práci jsme se proto zaměřili na studium vlivu takrolimu (FK506) na intimální hyperplázii žilních autograftů a rejekci žilních allograftů na potkaním modelu.

## **2 HYPOTÉZY PRÁCE**

### **Hypotéza 1**

Předpokládáme, že model interpozice iliolumbálních žil do břišní aorty potkanů bude technicky zvládnutelný a umožní sledování změn ve stěně žilních štěpů v syngenních i allogenních podmínkách.

### **Hypotéza 2**

Předpokládáme, že imunosuprese pomocí FK506 povede k potlačení rozvoje intimální hyperplazie arterializovaných autologních žilních štěpů u potkana.

### **Hypotéza 3**

Předpokládáme, že imunosuprese pomocí FK506 povede k potlačení rejekce transplantovaných žilních alloštěpů u potkana a umožní jejich adaptaci na podmínky tepenného řečiště.

### **Hypotéza 4**

Předpokládáme, že antigenicita žilních alloštěpů je ve srovnání s tepennými alloštěpy nižší a k potlačení jejich rejekce bude dostatečná i poloviční dávka imunosuprese účinné po transplantaci aorty.

### **3 CÍLE PRÁCE**

#### **Cíl práce 1**

Vytvořit a otestovat model interpozice iliolumbálních žil do břišní aorty potkanů.

#### **Cíl práce 2**

Po interpozici autologních iliolumbálních žil do břišní aorty potkana použít systémově podávanou imunosupresi FK506 a vyhodnotit v histologických nálezech po 30 dnech od implantace její vliv na intimální hyperplázii těchto autologních štěpů.

#### **Cíl práce 3**

Po interpozici allogenních iliolumbálních žil do břišní aorty potkana použít systémově podávanou imunosupresi FK506 a vyhodnotit v histologických nálezech po 30 dnech od transplantace její vliv na rejekční změny a průběh arterIALIZACE těchto alloštěpů.

#### **Cíl práce 4**

Po interpozici allogenních iliolumbálních žil do břišní aorty potkana použít systémově podávanou imunosupresi FK506 v poloviční dávce použité po allotransplantaci tepen a vyhodnotit v histologických nálezech po 30 dnech od allotransplantace její vliv na rejekční změny a průběh arterIALIZACE těchto alloštěpů.

## **4 MATERIÁL A METODY**

### **4.1 Zvířata**

V experimentu jsme použili celkem 91 samců potkanů různých kmenů (Wistar  $n = 22$ , Lewis  $n = 56$ , Brown-Norway  $n = 13$ ) dodaných z chovné stanice Charles River, Německo. Se zvířaty jsme pracovali v souladu s pravidly zákona ČNR č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání a projekt pokusu byl schválen etickou komisí Institutu klinické a experimentální medicíny a Fakultní Thomayerovy nemocnice s poliklinikou. Každé zvíře bylo v průběhu celého pokusu drženo v samostatné kleci.

K zavedení modelu a chirurgické techniky interpozice iliolumbálních žil do abdominální aorty u potkana (cíl práce 1) jsme použili jako dárce i příjemce syngenních žilních štěpů samce potkanů kmene Wistar ( $n = 22$ ) o váze 250 až 400 g ( $336 \pm 35$  g).

K cílům práce 2, 3 a 4 jsme jako příjemce syngenních nebo allogenních žilních štěpů užívali samce potkanů kmene Lewis (LEW) (RT1I) ( $n = 46$ ) o váze 200 až 340 g ( $279 \pm 40$  g).

Jako dárce syngenních žilních štěpů jsme použili samce potkanů kmene Lewis (LEW) (RT1I) ( $n = 10$ ) o váze 280 až 300 g ( $295 \pm 8$  g).

Jako dárce allogenních žilních štěpů jsme použili samce potkanů kmene Brown-Norway (BN) (RT1n) ( $n = 13$ ) o váze 220 až 300 g ( $254 \pm 24$  g).

### **4.2 Operační postup**

Dárce žilních štěpů jsme před výkonem uvedli do celkové anestézie pomocí intramuskulárně aplikované směsi ketaminu (Narkamon®, Spofa Czech Rep) 100 mg/kg a xylazinu (Rometar®, Spofa Czech Rep) 10 mg/kg. Po laparotomii a preparaci jsme odebrali dva 1-1.5 cm dlouhé segmenty iliolumbálních žil. Oba štěpy byly uloženy samostatně ve fyziologickém roztoku při pokojové teplotě do doby transplantace. Průměrný čas studené ischemie štěpů (CIT) v rámci celého

pokusu byl 199 minut bez statisticky signifikantního rozdílu mezi skupinami (Tab. 1).

Příjemce žilních štěpů jsme před výkonem uvedli do celkové anestezie pomocí intramuskulárně aplikované směsi sufentanilu (Sufenta®, Janssen Pharmaceutica Inc.) 20 µg/kg a azaperonu (Stresnil®, Janssen Pharmaceutica Inc.) 1 mg/kg. Žilní štěpy jsme po laparotomii transplantovali ortotopicky do subrenálního úseku břišní aorty příjemce (Obr. 1). V pooperačním a celém sledovaném období jsme příjemcům žilních štěpů nepodávali žádné antiagregační nebo antikoagulační přípravky.

### **4.3 Skupiny zvířat**

Celkově jsme v rámci experimentu vytvořili 7 skupin zvířat označených velkými písmeny (A, B, C, D, E, F a T). Podrobné charakteristiky skupiny A až F uvádíme v tabulce 1.

Skupina T byla složená z potkanů kmene Wistar a sloužila pouze k nácviku operační techniky a v tabulkách ji dál neuvádíme.

Skupina A byla složená z potkanů po syngenní (LEW do LEW) a skupina B po allogenní (BN do LEW) transplantaci bez podávání imunosuprese.

Zvířata ve skupině C a skupině D byla po allogenní transplantaci (BN do LEW) s podáváním imunosuprese.

Zvířata ve skupině E a F byla po syngenní (LEW do LEW) transplantaci.

### **4.4 Protokol imunosuprese**

FK506 (Prograf®, Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japan) jsme příjemcům žilních štěpů aplikovali intramuskulárně v jedné denní dávce 0.02 mg na 100 g hmotnosti zvířete ve skupině C a F a 0.01 mg na 100 g hmotnosti zvířete ve skupině D a E. Imunosupresi jsme podávali od 1. do 30. pooperačního dne (Tab 1.). Hladiny FK506 jsme stanovovali za použití homogenní enzymové imunoanalýzy soupravou Emit® 2000 Tacrolimus assay, Dade Behring, třicátý den po transplantaci.

## 4.5 Histologické a imunohistochemické vyšetření

Žilní štěpy jsme explantovali po střední laparotomii v celkové anestézii u heparinizovaných zvířat 30.den po transplantaci. Zvířata byla následně usmrcena letální dávkou thiopentalu (Thiopental®, Spofa a.s., Czech Rep) aplikovaného do dolní duté žíly.

Explantované štěpy jsme následně vložili do malých plastických boxů (Tissue Tek®, Cryomold, Sakura, Japonsko) a zalili gelem (Tissue Tek®.C.D.Compound, Sakura, Japonsko). Následně jsme vzorky zmrazili za použití 2-metylbutanu (Fluka, Chemika, Švýcarsko) a tekutého dusíku. Do vlastního histologického a imunohistochemického barvení jsme vzorky skladovali při teplotě -80°C. K imunohistochemické analýze jsme použili protilátky uvedené v tabulce 2. Všechny řezy jsme dokumentovali za pomoci digitálního fotoaparátu Olympus Cammedia C-5050 připevněného na mikroskop Olympus BX51 při 400-násobném zvětšení. Snímky jsme převedli bez komprese do formátu TIFF. K jejich hodnocení jsme použili originální software Olympus DP- Soft Verze 3.2. Tloušťku intimální vrstvy (od povrchu endoteliálních buněk po vnitřní hranici mediální vrstvy žilní stěny) jsme měřili v 10 náhodných lokalizacích v každém řezu. Průměrnou hodnotu a standardní odchylku (průměr ± SD) jsme stanovili pro každou žílu i experimentální skupinu.

### 4.5.1 Imunohistochemické vyšetření

Tkáně pro průkaz antigenů jsme odebírali, stejně jako v případě klasické histologie, ze střední části štěpů. Po odběru jsme žíly vložili do malých plastických boxů (Tissue Tek®, Cryomold, Sakura, Japonsko) a zalili do média (Tissue Tek® O.C.D.Compound, Sakura, Japonsko). Následně jsme vzorky zmrazili za použití 2-metylbutanu (Fluka, Chemika, Švýcarsko) a tekutého dusíku. Do doby, než jsme provedli imunohistochemickou detekci antigenů, byly vzorky skladovány při teplotě -80°C. K imunohistochemické analýze jsme použili protilátky uvedené v tabulce 2.

#### 4.5.2 Detekce CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> pozitivních buněk a buněk s von Willebrandovým faktorem

Detekci jsme prováděli na řezech 8 µm silných dvoustupňovou nepřímou technikou s použitím imunoenzymového polymeru. Řezy jsme fixovali v chlazeném acetonu 10 minut. Po usušení a oplachu v 0.2 % roztoku Triton X100 a fosfátovém fyziologickém roztoku, jsme vzorky inkubovali 60 minut s primární protilátkou. Po inhibici endogenní peroxidázy v 0.3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v 70 % methanolu (30 minut) jsme vzorky inkubovali 30 minut se sekundární protilátkou (imunoenzymový polymer Histofine® Simple Stain Rat MAX PO, Nichirei, Japonsko). Následně jsme na vzorek 5 minut aplikovali 3,3 diaminobenzidin (Dako Liquid DAB+ Substrate-Chromogen, Dako, Dánsko), kontrastně dobarvili Harrisovým hematoxylinem a zamontovali do Entellanu (Merck, Německo).

Vzorky s průkazem CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> buněk jsme hodnotili naslepo bez znalosti příslušnosti vzorku ke skupině. Buňky jsme počítali v 5-ti zorných polích při 1000-násobném zvětšení. K analýze jsme použili vždy průměrný počet buněk ze všech pěti polí.

#### 4.5.3 Detekce imunoglobulinů

Detekci jsme prováděli na 8 µm silných řezech za použití přímé imunofluorescenční techniky. Po usušení řezů a oplachu ve fosfátovém fyziologickém pufru jsme vzorky usušili na vzduchu a inkubovali 30 minut s protilátkou značenou fluoresceinem (FITC). Po oplachu jsme vzorky zamontovali do glycerinu a okamžitě hodnotili pod fluorescenčním mikroskopem.

#### 4.5.4 Detekce RT1.B<sup>u</sup> pozitivních buněk

Detekci jsme prováděli na 8 µm silných řezech za použití třístupňové nepřímé techniky. Řezy jsme fixovali v chlazeném acetonu 10 minut. Po usušení a oplachu v 0.2 % roztoku Triton X 100 a fosfátovém fyziologickém roztoku jsme blokovali endogenní biotin s použitím Biotin blocking system (Dako, Dánsko). Vzorky jsme následně inkubovali s 10 % koňským sérem a poté 60 minut s primární protilátkou. Po inhibici endogenní peroxidázy v 0.3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v 70 % methanolu

(30 minut), jsme na vzorky aplikovali biotinylovanou koňskou anti-myší protilátku (Vector Lab, Burlingame, UK). Následně jsme vzorky inkubovali s R.T.U.

Vectastain Elite ABC Reagent (Vector Lab, Burlingame, UK) a dál jsme aplikovali 3,3 diaminobenzidin (Dako Liquid DAB + Substrate- Chromogen Dako) na 5 minut, kontrastně dobarvili a zalili do Entellanu (Merck, Německo).

Vzorky s průkazem RT1.B<sup>U</sup> buněk jsme hodnotili naslepo bez znalosti příslušnosti vzorku ke skupině. Buňky jsme počítali v 5-ti zorných polích při 1000-násobném zvětšení. K analýze jsme použili vždy průměrný počet buněk ze všech pěti polí.

#### 4.6 Statistické metody

K statistickému zpracování a porovnání tloušťky intimální vrstvy štěpů, počtu lymfocytů a Lewis MHC II třídy pozitivních buněk mezi jednotlivými skupinami jsme použili test ANOVA s následným použitím testu Tukey HSD Multiple Comparisons test. Ke srovnání koncentrace FK506 mezi skupinami jsme užili test dle Kruskal-Wallis.

Tabulka 1. Základní údaje experimentálních skupin a operačního zákroku.										
LEW – potkan Lewis										
BN – potkan Brown-Norway										
*.** Rozdíl mezi oběma skupinami s imunosupresí byl statisticky signifikantní (p = 0,001)										
Skupina	Charakteristika	Imunosuprese	Počet zvířat	Úmrtí	Doba studené ischemie (min)	Operační čas (min)	Aortální svorka (min)	Váha den 0 (g)	Váha den 30 (g)	Hladina FK506 30 den (ng/ml)
A	LEW - LEW	Ne	8	2	215±138	130±19	79±8	223±21	295±17	Ne
B	BN - LEW	Ne	10	1	199±85	115±13	66±10	317±18	366±25	Ne
C	BN - LEW	FK506 0,02mg/100g	8	1	190±85	100±14	75±9	275±20	305±16	5.57±0.96*
D	BN - LEW	FK506 0,01mg/100g	8	2	192±76	96±6	66±6	314±15	334±48	3.20±0.66*
E	LEW - LEW	FK506 0,01mg/100g	6	0	190±85	90±7	60±6	320±40	360±24	3.50±0.59**
F	LEW - LEW	FK506 0,02mg/100g	6	1	180±80	95±12	62±7	330±30	360±18	6.10±0.90**

**Tabulka 2. Základní charakteristiky protilátek**

Protilátky použité při imunohistochemickém vyšetření v jednotlivých skupinách. RT1.Bu – buňky MHC II. třídy u kmene Lewis, FITC – fluorescein isothiocyanát

Specifická protilátka	Původ	Výrobce	Ředění	Buněčný klon	Detekční systém
Von Willebrandův faktor	zajíc	DakoCytomation	5000x		Histofine
Imunoglobulíny	ovce	Chemicon International	10x		FITC
CD4+ buňky	myš	Cymbus Biotechnology	800x	W3/25	Histofine
CD8+ buňky	myš	Cymbus Biotechnology	500x	OX-8	Histofine
RT1.Bu	myš	Cedar Lane	50x	MRC-OX3	Vector

## **5 EXPERIMENT 1**

### **5.1 Materiál a metody**

Skupiny zvířat

Skupina zvířat T byla složena z potkanů kmene Wistar a sloužila pouze k nácviku operační techniky a vypracování a zavedení modelu interpozice iliolumbálních žil u potkana.

### **5.2 Výsledky**

K nácviku chirurgické techniky a vypracování modelu interpozice iliolumbálních žil jsme použili 22 potkanů kmene Wistar. V průběhu experimentu uhynulo 12 potkanů (55 %) nejčastěji v důsledku krvácení z anastomózy. U 10 potkanů jsme provedli úspěšnou interpozici iliolumbální žíly do abdominální aorty s dlouhodobým přežitím zvířete a průchodnou anastomózou. Operační postup je podrobně popsán na obrázku 1.

### **5.3 Diskuze**

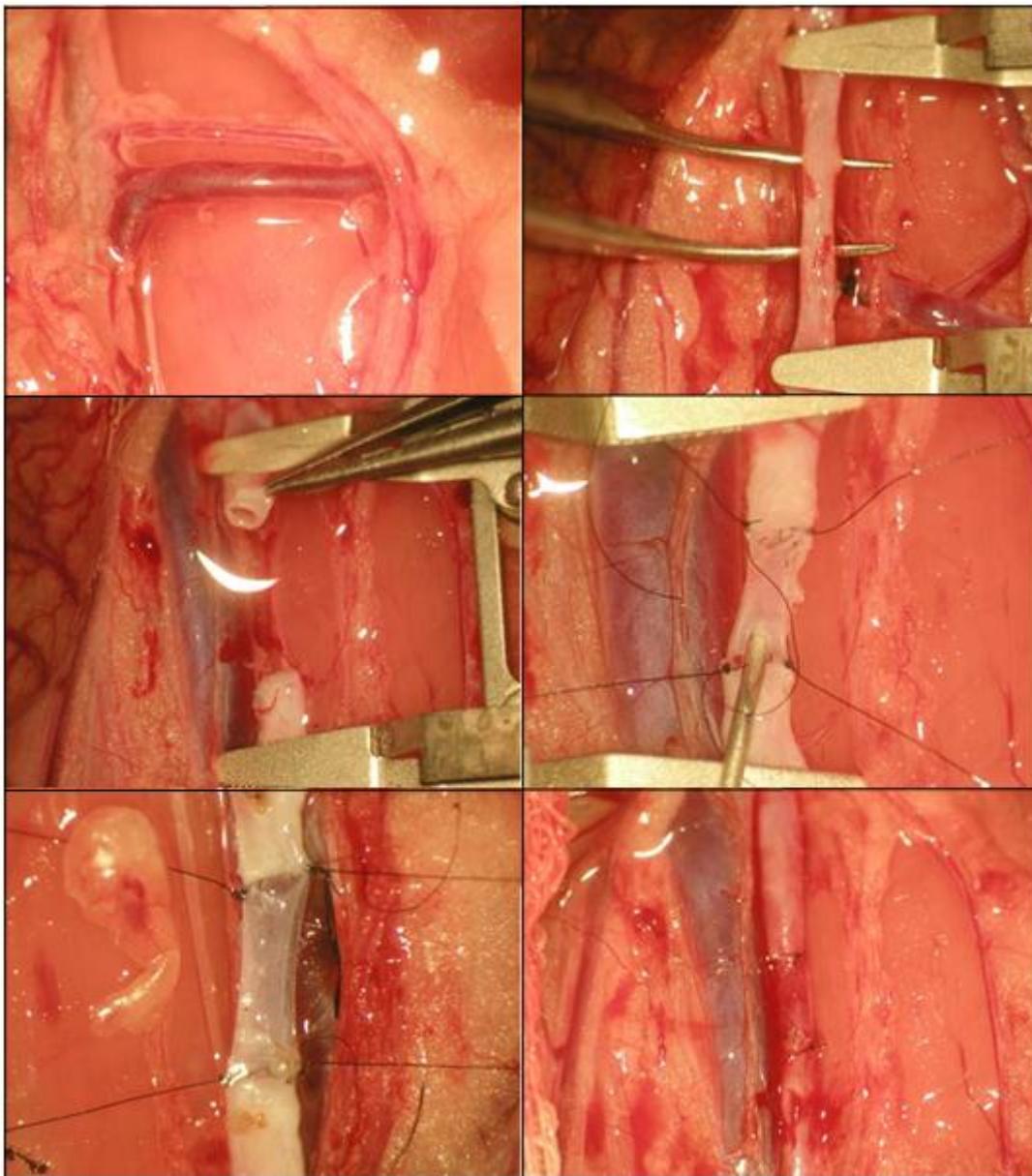
Experimenty na potkanech jsou ve srovnání s většími zvířaty výhodné pro malou náročnost na ošetrovatelskou péči a také pro nižší finanční náklady. Operace jsou ale technicky náročné vzhledem k malým rozměrům anatomických struktur. Použití operačního mikroskopu a nácvik mikrochirurgických technik je tudíž nutností.

V literatuře je popsáno několik experimentálních modelů žilní arterializace na malých zvířatech (myš, potkan): interpozice dolní duté žíly do aorty, interpozice povrchové epigastrické žíly do femorální tepny, interpozice iliolumbální žíly do břišní aorty, interpozice dolní duté žíly do karotické arterie, implantace jugulárního venózního patche do břišní aorty, implantace jugulárního venózního patche do karotické arterie <sup>1</sup>.

Vzhledem k našim předešlým zkušenostem s implantací břišní aorty do břišní aorty potkana jsme se rozhodli v rámci experimentu s arterializací venózních štěpů v naší laboratoři zavést a otestovat model transplantace iliolumbální žíly do aorty potkana<sup>43</sup>. Tento model umožňuje jednak použití 2 iliolumbálních žil z jednoho dárcovského zvířete a jednak je anastomóza na břišní aortě ve srovnání s femorální nebo karotickou artérií technicky lépe proveditelná.

Stejnou chirurgickou techniku jako u aorto-aortální mikrochirurgické anastomózy jsme ale vzhledem k podstatně jemnější struktuře žilní stěny nemohli u implantace iliolumbální žíly do aorty použít. Aorto-aortální anastomózu jsme v minulém experimentu prováděli pomocí jednotlivých stehů, protože oba štěpy držely vzhledem k silné svalové vrstvě svůj tvar a šití bylo jednodušší.

Žilní štěpy naproti tomu vůbec nedržely svůj tvar a při šití byly nutné časté proplachy k ozřejmení lumen. Stěna byla navíc velice jemná a trhala se při sebemenším pohybu. Proto jsme nakonec prováděli anastomózy pokračujícím stehem a po počátečních neúspěších se nám povedlo zavést model interpozice iliolumbálních žil do abdominální aorty potkana s vysokou úspěšností pooperačního přežívání. Tím jsme v naší laboratoři zavedli model žilní arterializace, který bude možné použít při dalších experimentech týkajících se syngenních nebo allogenních žil.

**Obrázek 1 - Pohled do operačního pole při transplantaci žilního štěpu**

Po odběru iliolumbální žíly a vypreparování abdominální aorty jsme tuto následně přerušili za fixace pahýlů ve stabilní poloze pomocí aproximátoru. Následně jsme fixovali všechny 4 cípy štěpu a pokračujícím stehem jsme šili přední polovinu horní i dolní anastomózy. Po otočení svorek aproximátoru o 180° jsme pokračovali v šití zadní strany obou anastomóz. Po derotaci a puštění svorek aproximátoru a hemostáze operačního pole jsme vizuálně hodnotili průtok distálně od transplantovaného štěpu.

Zvětšení 12x

## **6 EXPERIMENT 2**

### **6.1 Materiál a metody**

#### Skupiny zvířat

K ověření hypotézy 2 (imunosuprese pomocí FK506 povede k potlačení rozvoje intimální hyperplazie arterializovaných žilních autologních štěpů) jsme zhodnotili a porovnali histologické a imunohistochemické nálezy kontrolní syngenní skupiny A bez imunoprese se syngenní skupinou E s nižší (0.01 mg/100 g hmotnosti zvířete) a syngenní skupinou F s vyšší (0.02 mg/100 g hmotnosti zvířete) dávkou FK506. Podrobné charakteristiky skupin uvádí tabulka 1.

### **6.2 Výsledky**

#### Zvířata

Tři zvířata v této části experimentu zemřela. Dvě ve skupině A na peroperační krvácení a jedno na předávkování anestetiky ve skupině F. Ani u jednoho zvířete nedošlo k uzávěru cévní rekonstrukce.

#### Imunosuprese

Ve skupině E byla koncentrace FK506 měřená 30. pooperační den  $3.50 \pm 0.59$  ng/ml a ve skupině F  $6.10 \pm 0.90$  ng/ml. Rozdíl mezi skupinami byl statisticky významný ( $p = 0.001$ ) (Tab. 3). Průjem jako nežádoucí účinek použití FK506 jsme pozorovali téměř u všech zvířat.

#### Tunica intima

Lumen žilních štěpů bylo ve všech skupinách pokryto endoteliálními buňkami. U syngenních imunoprimovaných skupin E a F stejně jako u syngenní skupiny A bez imunoprese došlo k hyperplázii subendoteliální neointimální vrstvy. Ve skupině A bez léčby byla průměrná tloušťka intimální vrstvy  $12.7 \pm 7.0\mu\text{m}$ . Ve

skupinách E a F léčených FK506 jsme zaznamenali statisticky významnou inhibici intimální hyperplazie ve srovnání se skupinou A ( $p < 0.01$ ). Šíře intimální vrstvy štěpů s vyšší dávkou FK506 (skupina F) byla ve srovnání s žilními štěpy s nižší dávkou FK506 (skupina E) statisticky nižší ( $p < 0.05$ ) ( $5.0 \pm 1.0 \mu\text{m}$  versus  $7.0 \pm 3.0 \mu\text{m}$ ) (Graf 1, Tab. 3, Obr. 2).

#### Tunica media

U syngenních imunosuprimovaných skupin E a F proběhl do 30. pooperačního dne proces adaptace žilní stěny na tlakové podmínky v tepenném řečišti s novotvorbou vícečetné svalové vrstvy. U obou skupin nebyly v mediální vrstvě přítomny CD4+, CD8+ ani Lewis MHC třídy II pozitivní buňky. Histologický obraz v obou skupinách byl shodný s obrazem v syngenní skupině A bez imunosuprese (Tab. 3).

#### Tunica adventitia

Ve všech syngenních skupinách (A, E a F) jsme 30. den po transplantaci pozorovali infiltraci intersticia mononukleárními buňkami. Stupeň infiltrace CD4+, CD8+ a Lewis MHC třídy II pozitivními buňkami byl mezi skupinami bez statisticky významného rozdílu.

### 6.3 Diskuze

U syngenních štěpů došlo ve všech skupinách 30. pooperační den k arterializaci žilní stěny s proliferací intimální vrstvy a hladkých svalových buněk v mediální vrstvě. Podávání FK506 ale vedlo k významnému potlačení rozsahu intimální hyperplazie ve srovnání se štěpy bez imunosuprese. Tento inhibiční účinek FK506 byl závislý na jeho denní dávce.

Ve shodě s naší prací byla inhibice intimální hyperplazie po použití FK506 pozorována i na koronárním prasečím modelu. Hamada a spol. prokázali 4 týdny po implantaci stentů uvolňujících FK506 do koronární tepny výrazně nižší neointimální formaci ve srovnání s prostými metalickými stenty<sup>3</sup>.

Předchozí experimenty na buněčných kulturách prokázaly také antiproliferativní účinek FK506 na hladké svalové buňky cévní stěny<sup>3,42</sup>. V našem experimentu jsme ve skupině s vyšší dávkou FK506 pozorovali tendenci ke ztenčení mediální vrstvy ve srovnání se skupinou bez imunosuprese. Toto ztenčení mediální vrstvy ale nebylo statisticky signifikantní. V adventiciální vrstvě jsme nezjistili žádné rozdíly v infiltraci CD4 +, CD8 + a MHC II třídy pozitivními buňkami mezi skupinami s imunosupresí a bez ní.

Naše studie potvrdila inhibiční účinek FK506 na tvorbu intimální hyperplazie u autologních žilních štěpů po jejich implantaci do tepenného řečiště. V případě vytvoření vektoru k lokální aplikaci může FK506 představovat účinný lék v terapii intimální hyperplazie v kardiovaskulární chirurgii.

Další diskuze k této části našeho experimentu je uvedena v článku v příloze A: Varga, M., Matia, I., Lodererova, A., Adamec, M. Tacrolimus inhibits intimal hyperplasia in arterialised veins in rats. *Bratislava Medical Journal*, 2012, vol.113, no.1, p.5-9. ISSN 0006-9248.

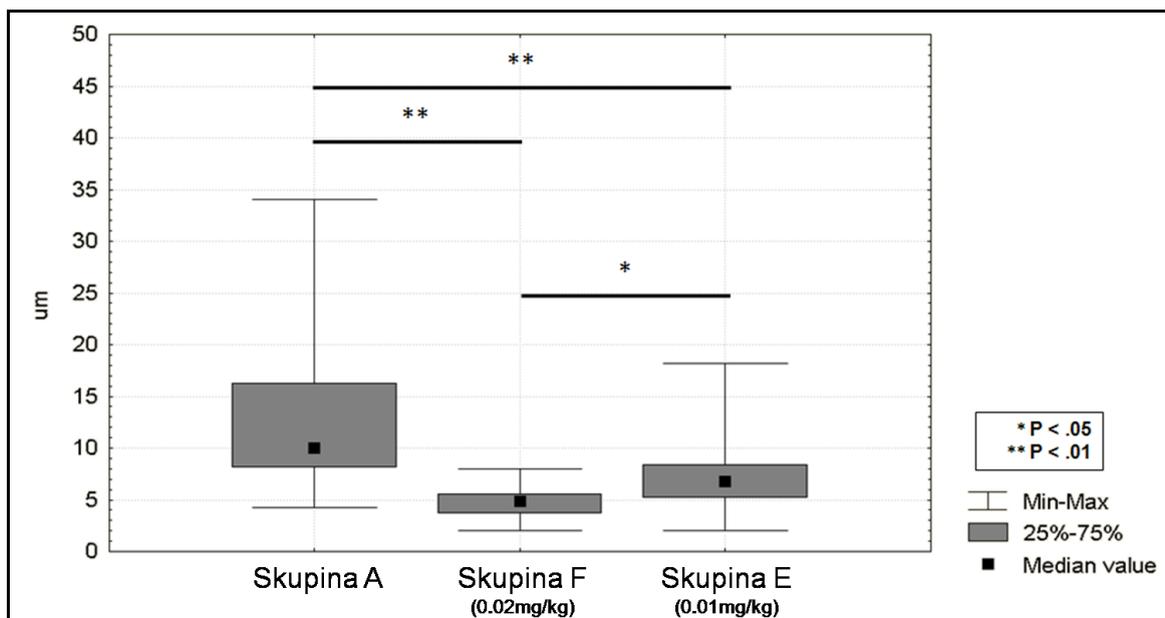
**Tabulka 3. Autologní skupiny A, E a F. Sledované parametry 30. pooperační den.**

- 1) Šíře intimální vrstvy ve skupině E a F léčené FK506 byla statisticky významně nižší ( $p < 0,01$ ) v porovnání se skupinou A bez léčby.
- 2) Šíře intimální vrstvy ve skupině F s vyšší dávkou FK506 byla statisticky významně nižší ( $p < 0,05$ ) v porovnání se skupinou E s nižší dávkou.

\* Šíře intimální a mediální vrstvy je vyjádřena v  $\mu\text{m}$

\*\* Počty Lewis anti MHC II. třídy, CD8 a CD4 pozitivních buněk v jednom zorném poli při zvětšení 1000x

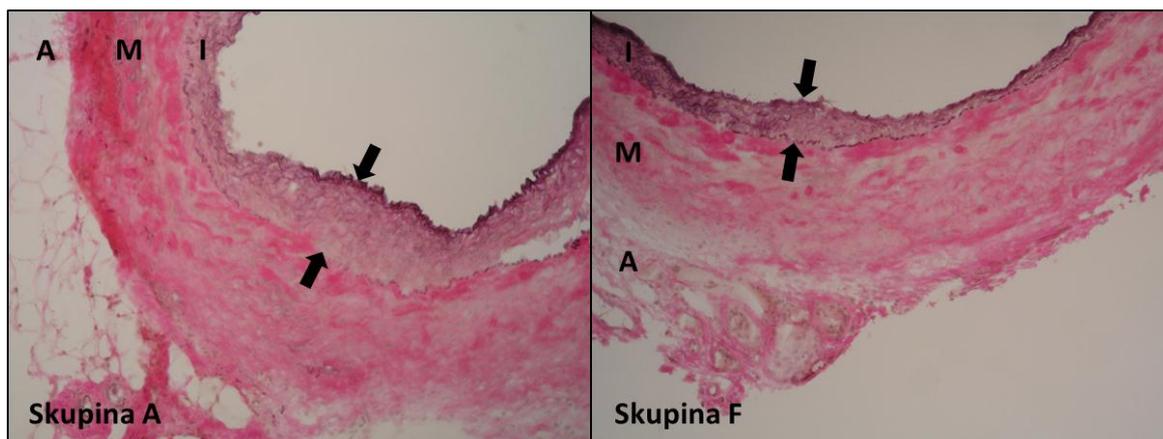
Skupina	Charakteristika	Imunosuprese	Intima*		Medie*	Adventitie**		
			Šíře	Endotelová vrstva	Šíře	CD4+ buňky	CD8+ buňky	LEW MHC II+ buňky
A	LEW – LEW	Ne	12.7±7.0	+	103.2±24.6	12.5±7.7	0.8±1.7	16.6±7.5
E	LEW - LEW	FK506 0,01mg/100g	7.0±3.0 <sup>1</sup>	+	102.3±31.0	6.5±3.3	0.7±1.1	13.2±6.4
F	LEW - LEW	FK506 0,02mg/100g	5.0±1.0 <sup>1,2</sup>	+	95.9±33.3	11.9±5.0	0.9±1.3	14.5±5.7



**Graf 1 - Šíře tunica intima u autologní skupiny A bez imunosuprese a autologních skupin E a F s imunosupresí FK506.**

Rozsah intimální hyperplazie 30. den po transplantaci byl v obou skupinách s imunosupresí (E a F) ve srovnání se skupinou A bez imunosuprese signifikantně nižší ( $p < 0.01$ ). Šíře tunica intima 30. pooperační den ve skupině F s vyšší dávkou FK506 byla statisticky nižší ( $p < 0.05$ ) než ve skupině E s nižší dávkou FK506.

**Obrázek 2 - Reprezentativní histologické snímky potkaních autologních žilních štěpů skupiny A bez imunosuprese a skupiny F s vyšší dávkou FK506 30. den po jejich transplantaci do infrarenální abdominální aorty.**



Oba vzorky jsou barvené Van Gieson elastikou, zvětšeno 200x. Proces arterializace byl v obou skupinách reprezentován intimální hyperplázií a proliferací hladkých svalových buněk v tunica media. Intimální proliferace (černé šipky) byla inhibována u všech zvířat léčených takrolimem. I – tunica intima, M – tunica media, A – tunica adventitia

## **7 EXPERIMENT 3**

### **7.1 Materiál a metody**

#### Skupiny zvířat

K ověření hypotézy 3 (imunosuprese pomocí FK506 povede k potlačení rejekce transplantovaných žilních alloštěpů u potkana a umožní jejich adaptaci na podmínky tepenného řečiště) jsme srovnávali histologické a imunohistochemické nálezy kontrolní syngenní skupiny A bez imunoprese s allogenní skupinou B bez imunoprese a allogenní skupinou C s imunopresí pomocí FK506 v denní dávce 0.02 mg/100 g hmotnosti zvířete. Podrobné charakteristiky jednotlivých skupin uvádí tabulka 1.

### **7.2 Výsledky**

#### Zvířata

V této části experimentu zemřela čtyři zvířata. Dvě ve skupině A a jedno ve skupině B na peroperační krvácení a jedno na předávkování anestetiky ve skupině C. Ani u jednoho zvířete nedošlo k uzávěru cévní rekonstrukce.

#### Imunosuprese

Ve skupině C byla průměrná hodnota koncentrace FK506 měřená 30. pooperační den  $5.57 \pm 0.96$  ng/ml (Tab. 4). Průjem jako nežádoucí účinek použití FK506 jsme pozorovali téměř u všech zvířat.

#### Tunica intima

Lumen žilních štěpů bylo ve všech skupinách pokryto endoteliálními buňkami. U allogenní imunoprimované skupiny C došlo také k hyperplázii subendoteliální neointimální vrstvy (Obr. 3). Histologický obraz byl stejný jako jsme pozorovali u syngenní skupiny A. U allogenních zvířat bez imunoprese (skupina B) došlo k

destrukci a desorganizaci intimální vrstvy. Intimální proliferaci, která je typickou známkou adaptace žilní stěny na tlakové podmínky v tepenném řečišti, jsme v této skupině nepozorovali. Šíře intimální vrstvy byla v této skupině statisticky nižší ve srovnání s oběma předešlými skupinami ( $p < 0.01$ ), (Tab. 4, Graf 2).

#### Tunica media

V allogenní skupině s imunosupresí (skupina C) byl 30. pooperační den přítomen obraz adaptace žilní stěny na tlakové podmínky v tepenném řečišti s novotvorbou vícečetné svalové vrstvy. V mediální vrstvě nebyly přítomny anebo jen zcela minimálně CD4+, CD8+ a Lewis MHC třídy II pozitivní buňky a imunoflourescenční barvení neprokázalo depozici IgG. Tento histologický obraz byl shodný s obrazem syngenních žilních štěpů v kontrolní skupině A bez imunosuprese (Tab. 4).

Tloušťka mediální vrstvy ve skupině C se statisticky nelišila od tloušťky mediální vrstvy u zvířat ve skupině A (Obr. 3).

Na druhé straně u allogenní skupiny bez imunosuprese (skupina B) nedošlo k vytvoření svalových vrstev a medie byla infiltrována všemi typy sledovaných imunokompetentních buněk (Obr. 3).

#### Tunica adventitia

Ve všech skupinách jsme 30. den po transplantaci pozorovali infiltraci intersticia mononukleárními buňkami. Stupeň infiltrace buňkami CD8+ a Lewis MHC třídy II pozitivními buňkami byl bez statisticky signifikantního rozdílu mezi syngenní skupinou A a allogenní imunosuprimovanou skupinou C. Infiltrace buňkami CD4+ byla u allogenní imunosuprimované skupiny C dokonce nižší než u skupiny A (Tab. 4).

V adventiciální vrstvě allogenních štěpů bez imunosuprese (skupina B) jsme pozorovali statisticky vyšší ( $p < 0.001$ ) infiltraci CD4+, CD8+ i Lewis MHC třídy II pozitivními buňkami (Tab. 4, Graf 3, Graf 4, Graf 5).

### 7.3 Diskuze

Výsledky této části naší práce prokázaly arterializaci žilních alloštěpů 30. pooperační den po žilní transplantaci jen v podmínkách imunosuprese. V podmínkách bez imunosuprese vedla rejekce k destrukci intimální vrstvy a desorganizaci struktury celé žilní stěny.

U allogenních žil malého kalibru vede destrukce jejich stěny k trombóze a uzávěru<sup>44</sup>. Na psím modelu při interpozici dolní duté žíly do abdominální aorty vedl proces rejekce k aneurymatické dilataci transplantované žíly v období 30 denního sledování<sup>45</sup>. V našem modelu na potkanech jsme žádnou tvorbu výdutí žilních štěpů ve skupině bez imunosuprese 30 dnů po operaci nepozorovali. Nicméně se domníváme, že by k tomu došlo při prodloužení doby sledování.

Od 70. let minulého století byly zkoumány různé imunosupresivní protokoly, které by vedly k inhibici imunitní reakce příjemce a prodloužení průchodnosti žilních alloštěpů<sup>8,46</sup>. Methylprednisolon a azathioprin, a to ani v kombinaci s prednisonem (v dávce 5 mg/kg/den a 2.5 mg/kg/den), nebyly schopny inhibovat imunitní reakci příjemce a prodloužit průchodnost alloštěpů na psím modelu<sup>44,47,48</sup>. Cyklosporin A byl poprvé použit na psím modelu allogenní transplantace jugulární žíly do oblasti arteria carotis Bandlienem a spol. v roce 1983<sup>49</sup>. Použití imunosuprese vedlo při dávce CyA 20 mg/kg/den k zvýšení tříměsíční průchodnosti na 80 %. Při použití azathioprinu ve stejném modelu byla průchodnost žilních alloštěpů po 3 měsících 0 %. Nicméně v dalších studiích bylo nutné k dosažení 100 % průchodnosti žilních alloštěpů 20 týdnů od implantace použití kombinace CyA a mykofenolát mofetilu<sup>2</sup>. V monoterapii nebyl ani cyklosporin A v dávce 10 mg/kg/den, ani mykofenolát mofetil v dávce 20mg/kg/den schopen zlepšit průchodnost žilních alloštěpů.

Cyklosporin A v dávce 20 mg/kg/den zabránil dle studie Mingoliho a spol. aneurymatické dilataci dolní duté žíly v průběhu 30 dnů od její transplantace do abdominální aorty psů<sup>45</sup>. V jiných experimentech ale přerušování podávání CyA vedlo k uzávěru chladem konzervovaných i kryokonzervovaných žilních alloštěpů do 30 dnů<sup>47,50</sup>.

Cyklosporin A může způsobit poškození buněk endoteliální vrstvy a stimulovat fibrózu cévní stěny cestou zvýšené produkce transformujícího růstového faktoru

beta (transforming growth factor-beta) <sup>35,51</sup>. V případě použití cyklosporinu A jako imunosupresiva po transplantaci žil bylo k potlačení rejekce nutné podávání buď vysokých dávek cyklosporinu A, nebo jeho kombinace s jinými imunosupresivy nebo antiagregancii <sup>2,45,52</sup>. Žádná z těchto vlastností CyA není vhodná při jeho dlouhodobém použití u polymorbidních cévních pacientů.

FK506 (takrolimus) je ve srovnání s cyklosporinem A účinnější imunosupresivum a v klinické praxi se běžně používá po orgánových transplantacích <sup>37</sup>. V našem experimentu potlačil FK506 v dávce prokázaně účinné u tepenných alloštěpů infiltraci allogenní žilní stěny CD8+ a CD4+ buňkami. Tento efekt vedl k inhibici destrukce žilní stěny zprostředkované T lymfocyty a umožnil její arterializaci stejně jako v případě syngenních žilních štěpů. Dále jsme u allogenních žil s imunosupresí pozorovali proliferaci hladkých svalových buněk v mediální vrstvě. Zdá se, že suprese příjemcovské imunitní reakce v časném potransplantačním období vede k zachování allovenózních hladkých svalových buněk dárce. Přítomnost a následná proliferace těchto buněk vedla k zesílení a arterializaci žilní stěny u všech imunosuprimovaných žilních alloštěpů. Při absenci imunosuprese nebyly allogenní žilní štěpy schopny vyvinout typické známky arterializace. Allogenní hladké svalové buňky dárce byly zničeny masivní infiltrací imunokompetentních buněk příjemce a tím nemohlo dojít k jejich proliferaci a adaptaci na nové biomechanické podmínky tepenného systému.

Další diskuze k této části našeho experimentu je uvedena v článku v příloze B: Matia, I., Varga, M., Lodererová, A., Adamec, M. The positive effect of immunosuppression on adaptation of venous allografts to arterialisation in rats. *European journal of vascular and endovascular surgery*, 2010, vol. 39, no. 4, p. 478-484. ISSN 1078-5884.

## **8 EXPERIMENT 4**

### **8.1 Materiál a metody**

#### Skupiny zvířat

K ověření hypotézy 4 (antigenicita žilních alloštěpů je ve srovnání s tepennými alloštěpy nižší a k potlačení jejich rejekce bude dostatečná poloviční dávka imunosuprese účinné po transplantaci aorty) jsme srovnávali histologické a imunohistochemické nálezy mezi kontrolní syngenní skupinou A bez imunosuprese a allogenní imunosuprimovanou skupinou C (FK506 v dávce 0.02 mg/100 g hmotnosti zvířete) a allogenní imunosuprimovanou skupinou D s poloviční dávkou imunosuprese (FK506 v dávce 0.01 mg/100 g hmotnosti zvířete). Podrobné charakteristiky skupin uvádí tabulka 1.

### **8.2 Výsledky**

#### Zvířata

V této části experimentu uhynulo 5 zvířat. Dvě ve skupině A na pooperační krvácení a dvě ve skupině D a jedno ve skupině C na předávkování anestetiky. Ani u jednoho zvířete nedošlo k uzávěru cévní rekonstrukce.

#### Imunosuprese

Ve skupině D byla průměrná hodnota koncentrace FK506 měřená 30. pooperační den  $3.20 \pm 0.65$  ng/ml. Rozdíl mezi skupinou C ( $5.57 \pm 0.96$  ng/ml) a skupinou D byl statisticky významný ( $p = 0.001$ ) (Tab. 4). Průjem jako nežádoucí účinek použití FK506 jsme pozorovali téměř u všech zvířat.

#### Tunica intima

Lumen žilních štěpů bylo 30. pooperační den ve všech skupinách pokryto endoteliálními buňkami. U allogenní imunosuprimované skupiny D došlo stejně

jako ve skupině C k hyperplázii subendoteliální neointimální vrstvy (Obr. 3). Histologický obraz byl stejný jako jsme pozorovali u syngenní skupiny A. Mezi skupinami (skupina A, C s vyšší a D s nižší dávkou FK506) jsme nezaznamenali statisticky významné rozdíly v tloušťce intimální vrstvy (Graf 2, Tab. 4, Obr. 3).

#### Tunica media

I v imunosuprimované allogenní skupině D byl přítomen obraz adaptace žilní stěny na tlakové podmínky v tepenném řečišti s novotvorbou vícečetné svalové vrstvy 30. pooperační den. V mediální vrstvě nebyly přítomny anebo jen zcela ojediněle CD4+, CD8+ a Lewis MHC třídy II pozitivní buňky. Imunoflourescenční barvení neprokázalo depozici IgG v této vrstvě. Tento histologický obraz byl shodný s obrazem žilních štěpů skupiny C s vyšší dávkou FK506 i syngenní skupiny A bez imunosuprese (Obr. 3, Tab. 4).

#### Tunica adventitia

Ve skupině D jsme 30. den po transplantaci také pozorovali infiltraci tunica adventitia mononukleárními buňkami. Stupeň infiltrace CD8+ a Lewis MHC třídy II pozitivními buňkami byl bez statisticky signifikantního rozdílu mezi allogenními imunosuprimovanými skupinami C a D a syngenní skupinou A. Infiltrace CD4+ buňkami byla u skupiny D stejně jako u skupiny C dokonce nižší než u skupiny A (Tab. 4).

### 8.3 Diskuze

Výsledky této části naší práce prokázaly stejný morfologický obraz 30. den po žilní transplantaci u zvířat suprimovaných nízkou i minimální dávkou FK506. V podmínkách bez imunosuprese vedla rejekce k destrukci intimální vrstvy a desorganizaci struktury celé žilní stěny. U obou imunosuprimovaných skupin vedlo podávání FK506 k potlačení imunitní reakce příjemce proti antigenům žilní stěny. Navíc podávání FK506 umožnilo i v minimální dávce remodelaci žilní stěny a její přizpůsobení na změnu tlakových podmínek v tepenném řečišti (tzv. arterializaci žilního štěpu).

V dostupné literatuře jsme se mimo výsledků publikovaných naším pracovištěm neseťkali s klinickým ani experimentálním použitím FK506 po žilní transplantaci<sup>39,53</sup>. Optimální dávka FK506 po tepenné transplantaci u potkanů byla zkoumána Azumou a spol.<sup>7</sup>. Závěrem jejich práce bylo, že denní dávka 0.02 mg na 100 g zvířete je bezpečná a zároveň ještě dostatečná k potlačení akutní rejekce tepen s tvorbou intimální hyperplazie. Tato dávka byla dostatečná i k prevenci chronické rejekce. V našem předcházejícím experimentu jsme navíc prokázali, že stejná dávka je účinná i při podávání až od sedmého dne po tepenné transplantaci<sup>43</sup>.

V tomto experimentu jsme prokázali, že rejekce žilních alloštěpů byla potlačena i poloviční dávkou FK506 se sérovou koncentrací 3.2 ng/ml. Tato dávka byla ještě dostatečná k potlačení infiltrace žilní stěny CD8+ a CD4+ buňkami a inhibici T-buňkami zprostředkované destrukce žilní stěny. To vedlo k zachování allogenózních hladkých svalových buněk dárce. Přítomnost a následná proliferace těchto buněk vedla k zesílení a arterializaci žilních alloštěpů.

Další diskuze k této části našeho experimentu je uvedena v článku v příloze C: Varga, M., Matia, I., Lodererova, A., Adamec, M. The minimal dose of FK506 is sufficient to facilitate the arterialisation of venous allografts in rats. *European Surgery Acta Chirurgica Austriaca*, 2012, V tisku. ISSN 1682-8631.

**Tabulka 4. Sledované parametry 30. pooperační den.**

Parametry ileolumbálních žilních štěpů 30. pooperační den po jejich transplantaci do abdominální aorty.

Šíře intimální vrstvy allogenních žilních štěpů v podmínkách minimální imunosuprese (skupina D) se nelišila od syngenní skupiny (skupina A) ani allogenní skupiny s vyšší dávkou FK506 (skupina C).

1) Šíře intimální vrstvy ve skupině B byla statisticky významně nižší ( $p < 0,01$ ) v porovnání se skupinou A, C a D.

2) Celkový počet Lewis MHC II. třídy pozitivních, CD8 pozitivních a CD4 pozitivních buněk ve skupině B byl signifikantně vyšší ( $p < 0,001$ ) v porovnání s ostatními skupinami (A, C, D).

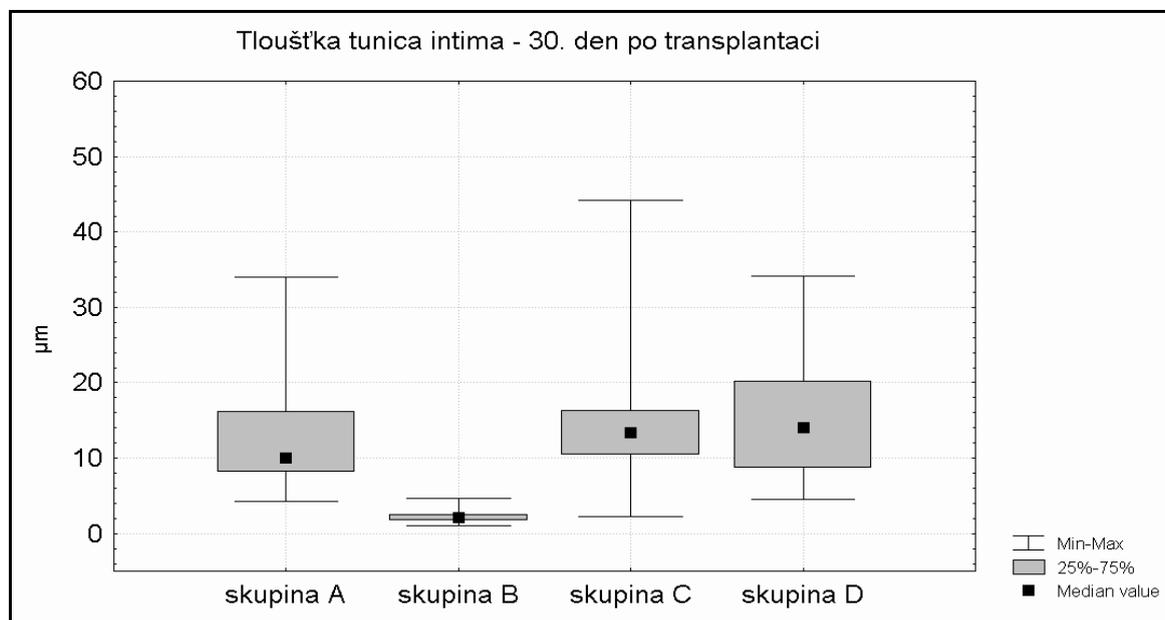
3) Celkový počet CD4 pozitivních buněk ve skupině A byl signifikantně vyšší ( $p < 0,01$ ) v porovnání s oběma skupinami s imunosupresí (C a D).

\* Šíře intimální vrstvy je vyjádřena v  $\mu\text{m}$

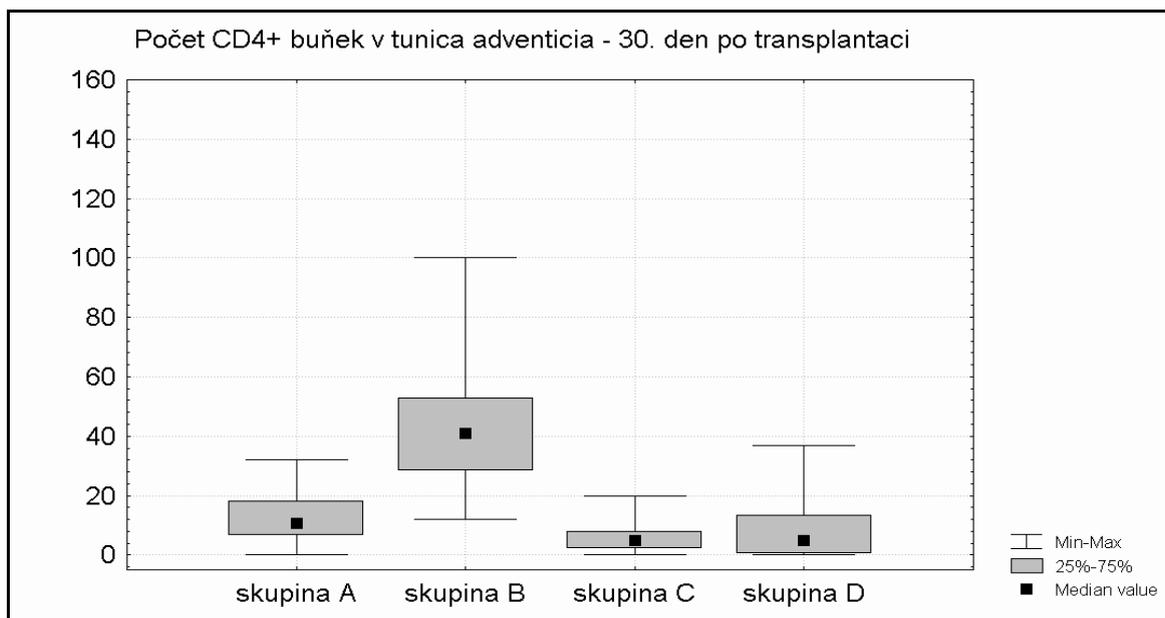
\*\* Počty Lewis anti MHC II. třídy, CD8 a CD4 pozitivních buněk v jednom zorném poli při zvětšení 1000x

\*\*\* Příjemcovské (Lewis) buňky s pozitivním hlavním histokompatibilním komplexem II. třídy

Skupina	Charakteristika	Imunosuprese	Intima*		Medie		Adventitie**		
			Šíře	Endotelová vrstva	IgG depozice	Vrstva hladkých svalů	CD4+ buňky	CD8+ buňky	LEW MHC II+ buňky***
A	LEW - LEW	Ne	12.7±7.0	+	-	+	12.48±7.66	0.76±1.66	16.60±7.45
B	BN - LEW	Ne	2.2±0.7 <sup>1</sup>	+	-	-	42.69±19.96 <sup>2</sup>	24.11±13.99 <sup>2</sup>	99.96±24.88 <sup>2</sup>
C	BN - LEW	FK506 0,02mg/ 100g	15.0±8.4	+	-	+	5.80±4.63 <sup>3</sup>	1.78±2.60	14.61±6.20
D	BN - LEW	FK506 0,01mg/ 100g	15.1±6.1	+	-	+	7.67±8.29 <sup>3</sup>	2.63±2.6	16.96±10.46

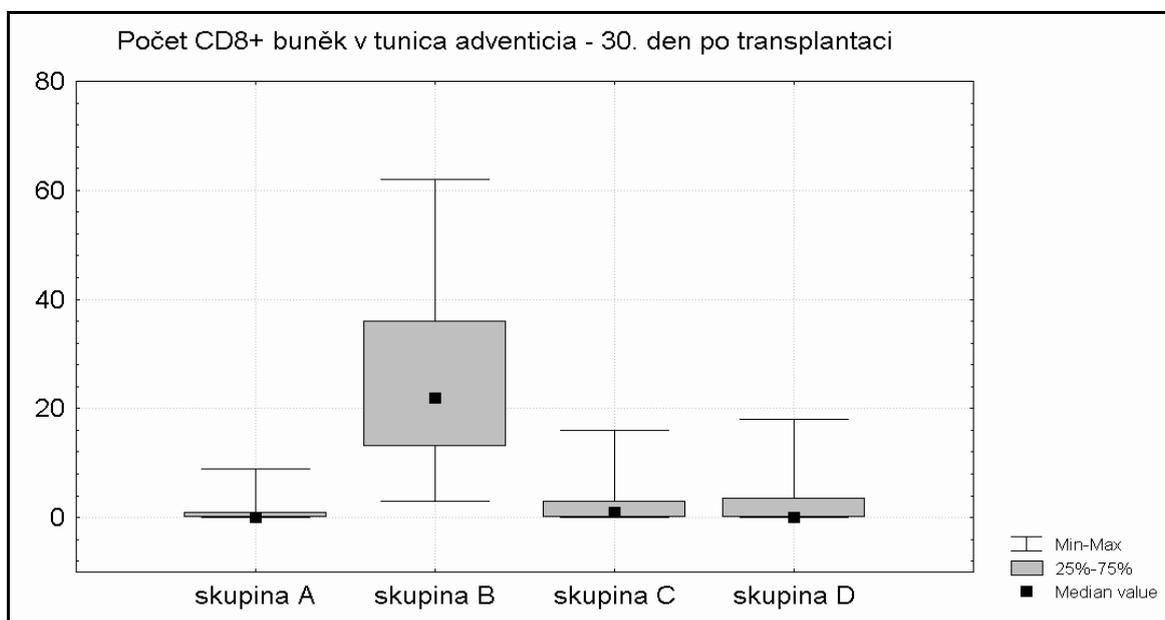
**Graf 2 - Šíře tunica intima u allogenních skupin B, C, D a kontrolní skupiny A**

Rozsah intimální proliferace 30. den po transplantaci v obou allogenních skupinách s imunosupresí (skupina C, D) byl srovnatelný s intimální proliferací v syngenní skupině A. Šířka intimy 30. pooperační den v allogenní skupině B byla statisticky nižší ( $p < 0,01$ ) ve srovnání se všemi ostatními skupinami (skupina A, C, D).



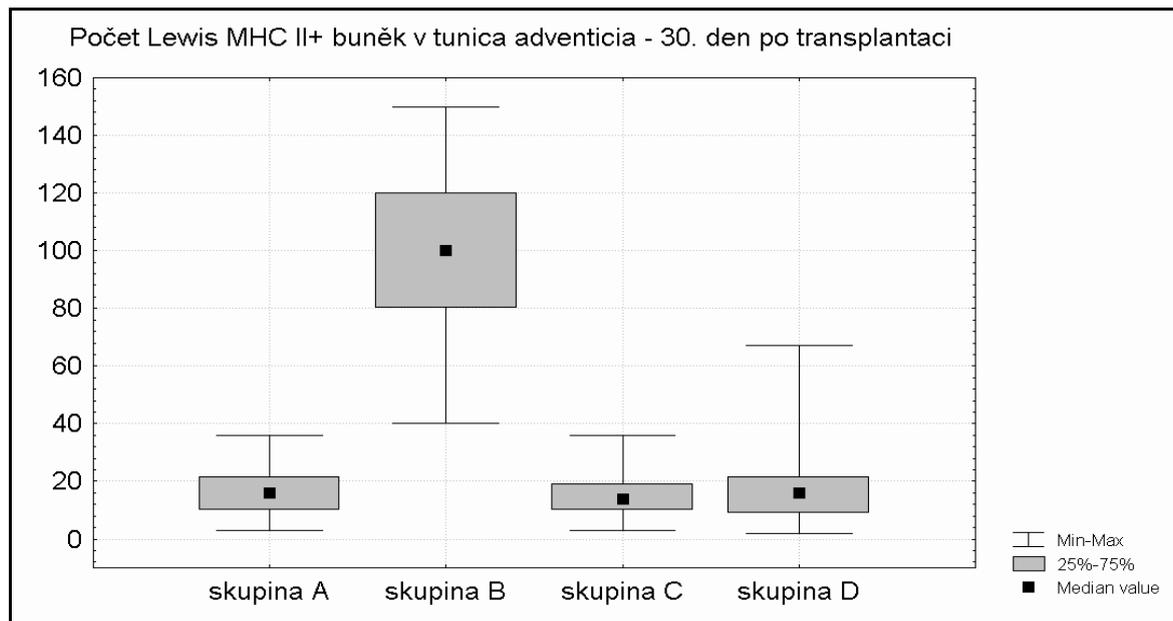
### Graf 3 - Infiltrace tunica adventitia CD4+ buňkami

Rozsah infiltrace tunica adventitia 30. den po transplantaci byl ve skupině B signifikantně vyšší ( $p < 0.001$ ) ve srovnání s ostatními skupinami (A, C, D). Celkový počet CD4 pozitivních buněk ve skupině A byl signifikantně vyšší ( $p < 0.01$ ) ve srovnání s oběma allogenními skupinami s imunosupresí (C a D).



### Graf 4 - Infiltrace tunica adventitia CD8+ buňkami

Rozsah infiltrace tunica adventitia 30. den po transplantaci byl v obou imunosuprimovaných allogenních skupinách (C,D) srovnatelný se syngenní skupinou A. V allogenní skupině bez imunosuprese (skupina B) byla infiltrace této vrstvy signifikantně vyšší ( $p < 0.001$ ) ve srovnání se všemi ostatními skupinami.



**Graf 5 - Infiltrace tunica adventitia Lewis MHC II+ buňkami**

Celkový počet Lewis MHC II třídy pozitivních buněk ve skupině B byl 30. den po transplantaci signifikantně vyšší ( $p < 0.001$ ) ve srovnání s ostatními skupinami (A, C, D).

**Obrázek 3 - Reprezentativní histologické snímky potkaních žilních štěpů 30. den po jejich transplantaci do infrarenální abdominální aorty.**

	Skupina A LEW - LEW bez FK506	Skupina B BN - LEW bez FK506	Skupina C BN - LEW FK506 0.02mg/100g	Skupina D BN - LEW FK506 0.01mg/100g
Hematoxylin- Eosin 100x				
Van Gieson elastika 100x				
Von Willebrandův faktor 200x				
CD4+ buňky 100x				
CD8+ buňky 200x				
Lewis MHC II třidy pozitivní buňky 100x				
Imunoglobuliny 100x				

Transverzální řezy byly nabarveny hematoxylinem - eosinem, Van Gieson- elastikou a imunologickým barvením s protilátkami anti-vWF, anti-CD4+, anti CD8+ a anti-Lewis MHC II třídy. Proces arterializace v syngenní skupině A jako i v allogenních skupinách s imunosupresí (skupina C a D) byl reprezentován: 1) endotelizací žilního lumen (Von Willebrandův faktor), 2) intimální hyperplázií (hematoxylin - eosin), 3) formací mnohočetných elastických vláken v neointimální vrstvě (Van Gieson elastika), 4) formací mediální vrstvy tvořené mnohočetnými hladkosvalovými vlákny, 5) nízkou infiltrací adventície mononukleárními buňkami (CD4+, CD8+, MHC II+). V allogenní skupině bez imunosuprese (skupina B) došlo k masivní infiltraci žilní stěny imunokompetentními buňkami příjemce a rejekci štěpu (CD4+, CD8+, MHC II+). Tato imunitní reakce vedla k destrukci intimální vrstvy a desorganizaci struktury žilní stěny štěpů (hematoxylin - eosin, Van Gieson elastika). I přes tento nálezu zůstalo lumen desorganizované žilní stěny pokryto souvislou endotelovou vrstvou (Von Willebrandův faktor). V žádné ze skupin jsme neprokázali přítomnost imunoglobulínů v medii žilní stěny.

## **9 ZÁVĚRY DIZERTAČNÍ PRÁCE**

### **Závěr 1**

Naše studie prokázala, že model interpozice iliolumbálních žil do břišní aorty potkanů je technicky zvládnutelný a vhodný ke sledování změn souvisejících s arterializací žilních auto- i alloštěpů.

### **Závěr 2**

Naše studie prokázala, že imunosuprese pomocí FK506 vedla k potlačení rozvoje intimální hyperplazie arterializovaných žilních autologních štěpů u potkana.

### **Závěr 3**

Naše studie prokázala, že imunosuprese pomocí FK506 v denní dávce 0.02 mg/100 g váhy zvířete vedla k potlačení rejekce transplantovaných žilních alloštěpů u potkana a umožnila jejich adaptaci na podmínky tepenného řečiště.

### **Závěr 4**

Naše studie prokázala, že k potlačení rejekce žilních alloštěpů potkanů je dostatečná i poloviční denní dávka (0.01 mg/100 g váhy zvířete) imunosuprese účinné po transplantaci tepen a i tato dávka umožnila průběh arterializace žilních alloštěpů.

**10 LITERATURA**

1. Schachner T, Laufer G, Bonatti J: In vivo (animal) models of vein graft disease. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006 30:451
2. Wagner E, Roy R, Marois Y, Douville Y, Guidoin R: Fresh venous allografts in peripheral arterial reconstruction in dogs. Effects of histocompatibility and of short-term immunosuppression with cyclosporine A and mycophenolate mofetil. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995 110:1732
3. Hamada N, Miyata M, Eto H, et al.: Tacrolimus-eluting stent inhibits neointimal hyperplasia via calcineurin/NFAT signaling in porcine coronary artery model. *Atherosclerosis.* 2012 208:97
4. Brockbank KG, McNally RT, Walsh KA: Cryopreserved vein transplantation. *J Card Surg.* 1992 7:170
5. Schachner T, Zou Y, Oberhuber A, et al.: Local application of rapamycin inhibits neointimal hyperplasia in experimental vein grafts. *Ann Thorac Surg.* 2004 77:1580
6. Randon C, Jacobs B, De Ryck F, Beele H, Vermassen F: Fifteen years of infrapopliteal arterial reconstructions with cryopreserved venous allografts for limb salvage. *J Vasc Surg.* 2010 51:869
7. Azuma N, Sasajima T, Kubo Y: Immunosuppression with FK506 in rat arterial allografts: fate of allogeneic endothelial cells. *J Vasc Surg.* 1999 29:694
8. Posner MP, Makhoul RG, Altman M, et al.: Early results of infrageniculate arterial reconstruction using cryopreserved homograft saphenous conduit (CADVEIN) and combination low-dose systemic immunosuppression. *J Am Coll Surg.* 1996 183:208
9. Carpenter JP, Tomaszewski JE: Immunosuppression for human saphenous vein allograft bypass surgery: a prospective randomized trial. *J Vasc Surg.* 1997 26:32
10. Management of peripheral arterial disease (PAD). TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). Section D: chronic critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000 19 Suppl A:S144
11. Carpenter JP, Tomaszewski JE: Human saphenous vein allograft bypass grafts: immune response. *J Vasc Surg.* 1998 27:492

12. Kwei S, Stavrakis G, Takahas M, et al.: Early adaptive responses of the vascular wall during venous arterialization in mice. *Am J Pathol.* 2004 164:81
13. Gibbons GH, Dzau VJ: The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med.* 1994 330:1431
14. Westerband A, Crouse D, Richter LC, et al.: Vein adaptation to arterialization in an experimental model. *J Vasc Surg.* 2001 33:561
15. Zou Y, Dietrich H, Hu Y, Metzler B, Wick G, Xu Q: Mouse model of venous bypass graft arteriosclerosis. *Am J Pathol.* 1998 153:1301
16. Wallitt EJ, Jevon M, Hornick PI: Therapeutics of vein graft intimal hyperplasia: 100 years on. *Ann Thorac Surg.* 2007 84:317
17. Raja SG, Haider Z, Ahmad M, Zaman H: Saphenous vein grafts: to use or not to use? *Heart Lung Circ.* 2004 13:403
18. Chlupac J, Filova E, Bacakova L: Blood Vessel Replacement: 50 years of Development and Tissue Engineering Paradigms in Vascular Surgery. *Physiol Res.* 2009 58:S119
19. Angelini GD, Passani SL, Breckenridge IM, Newby AC: Nature and pressure dependence of damage induced by distension of human saphenous vein coronary artery bypass grafts. *Cardiovasc Res.* 1987 21:902
20. Leask RL, Butany J, Johnston KW, Ethier CR, Ojha M: Human saphenous vein coronary artery bypass graft morphology, geometry and hemodynamics. *Ann Biomed Eng.* 2005 33:301
21. Mitra AK, Gangahar DM, Agrawal DK: Cellular, molecular and immunological mechanisms in the pathophysiology of vein graft intimal hyperplasia. *Immunol Cell Biol.* 2006 84:115
22. Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, et al.: A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med.* 2002 346:1773
23. Stone GW, Ellis SG, Cox DA, et al.: A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2004 350:221
24. Moses JW, Leon MB, Popma JJ, et al.: Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med.* 2003 349:1315

25. Babapulle MN, Joseph L, Belisle P, Brophy JM, Eisenberg MJ: A hierarchical Bayesian meta-analysis of randomised clinical trials of drug-eluting stents. *Lancet*. 2004 364:583
26. Stone GW, Moses JW, Ellis SG, et al.: Safety and efficacy of sirolimus- and paclitaxel-eluting coronary stents. *N Engl J Med*. 2007 356:998
27. Farber A, Major K, Wagner WH, et al.: Cryopreserved saphenous vein allografts in infrainguinal revascularization: analysis of 240 grafts. *J Vasc Surg*. 2003 38:15
28. Madden R, Lipkowitz G, Benedetto B, Kurbanov A, Miller M, Bow L: Decellularized cadaver vein allografts used for hemodialysis access do not cause allosensitization or preclude kidney transplantation. *Am J Kidney Dis*. 2002 40:1240
29. Lopez-Cepero M, Sanders CE, Buggs J, Bowers V: Sensitization of renal transplant candidates by cryopreserved cadaveric venous or arterial allografts. *Transplantation*. 2002 73:817
30. Balzer KM, Luther B, Sandmann W, Wassmuth R: Donor-specific sensitization by cadaveric venous allografts used for arterial reconstruction in peripheral arterial occlusive vascular disease. *Tissue Antigens*. 2004 64:13
31. Couvelard A, Leseche G, Scoazec JY, Groussard O: Human allograft vein failure: immunohistochemical arguments supporting the involvement of an immune-mediated mechanism. *Hum Pathol*. 1995 26:1313
32. Axthelm SC, Porter JM, Strickland S, Baur GM: Antigenicity of venous allografts. *Ann Surg*. 1979 189:290
33. Wagner E, Roy R, Marois Y, Douville Y, Guidoin R: Posttransplant antibodies and fresh venous allograft failure in dogs. *Transplantation*. 1994 58:537
34. Stevens SL, Tyler JD, Freeman MB, et al.: Factors affecting patency of venous allografts in miniature swine. *J Vasc Surg*. 1990 12:361
35. Khanna A, Kapur S, Sharma V, Li B, Suthanthiran M: In vivo hyperexpression of transforming growth factor-beta1 in mice: stimulation by cyclosporine. *Transplantation*. 1997 63:1037
36. Faivre L, Saoudi S, Astier A, et al.: FK 506 dose in transplantation: from theory to practice. *Transplant Proc*. 2001 33:2594

37. Vincenti F, Jensik SC, Filo RS, Miller J, Pirsch J: A long-term comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine in kidney transplantation: evidence for improved allograft survival at five years. *Transplantation*. 2002 73:775
38. Thomson AW, Bonham CA, Zeevi A: Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. *Ther Drug Monit*. 1995 17:584
39. 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 34:424
40. Hafizi S, Mordi VN, Andersson KM, Chester AH, Yacoub MH: Differential effects of rapamycin, cyclosporine A, and FK506 on human coronary artery smooth muscle cell proliferation and signalling. *Vascul Pharmacol*. 2004 41:167
41. Steffel J, Latini RA, Akhmedov A, et al.: Rapamycin, but not FK-506, increases endothelial tissue factor expression: implications for drug-eluting stent design. *Circulation*. 2005 112:2002
42. Matter CM, Rozenberg I, Jaschko A, et al.: Effects of tacrolimus or sirolimus on proliferation of vascular smooth muscle and endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006 48:286
43. 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
44. Carpenter EW, Lindenauer SM: Immunosuppression in arterial and venous allografts. *Arch Surg*. 1973 106:77
45. Mingoli A, Edwards JD, Feldhaus RJ, et al.: Fresh vein allograft survival in dogs after cyclosporine treatment. *J Surg Res*. 1996 62:95
46. Perloff LJ, Reckard CR, Rowlands DT, Jr., Barker CF: The venous homograft: an immunological question. *Surgery*. 1972 72:961
47. Vermassen F, Degrieck N, De Kock L, et al.: Immunosuppressive treatment of venous allografts. *Eur J Vasc Surg*. 1991 5:669
48. Ricotta JJ, Collins GJ, Jr., Rich NM, Reynolds DG: Failure of immunosuppression to prolong venous allograft survival. *Arch Surg*. 1980 115:99

49. Bandlien KO, Toledo-Pereyra LH, MacKenzie GH, Choudhury SP, Cortez JA: Immunosuppression with cyclosporine. A new approach to improve patency of venous allografts. *Arch Surg.* 1983 118:829
50. Augelli NV, Lupinetti FM, el Khatib H, Sanofsky SJ, Rossi NP: Allograft vein patency in a canine model. Additive effects of cryopreservation and cyclosporine. *Transplantation.* 1991 52:466
51. Zoja C, Furci L, Ghilardi F, Zilio P, Benigni A, Remuzzi G: Cyclosporin-induced endothelial cell injury. *Lab Invest.* 1986 55:455
52. Miller VM, Bergman RT, Gloviczki P, Brockbank KG: Cryopreserved venous allografts: effects of immunosuppression and antiplatelet therapy on patency and function. *J Vasc Surg.* 1993 18:216
53. Matia I, Adamec M, Janousek L, et al.: [Clinical experience with cold-preservation of venous and arterial allografts. long-term outcomes]. *Rozhl Chir.* 2010 89:45

## 11 SEZNAM PUBLIKACÍ

### 11.1 Publikace, které jsou podkladem disertace

#### a) S impact factorem

[1] **Varga**, M., Matia, I., Lodererova, A., Adamec, M. The minimal dose of FK506 is sufficient to facilitate the arterialisation of venous allografts in rats. *European Surgery Acta Chirurgica Austriaca*, 2012, V tisku. ISSN 1682-8631. **IF 0,534** z r. 2010.

[2] **Varga**, M., Matia, I., Lodererova, A., Adamec, M. Tacrolimus inhibits intimal hyperplasia in arterialised veins in rats. *Bratislava Medical Journal*, 2012, vol.113, no.1, p.5-9. ISSN 0006-9248. **IF 0,345** z r. 2010.

[3] Matia, I., **Varga**, M., Lodererová, A., Adamec, M. The positive effect of immunosuppression on adaptation of venous allografts to arterialisation in rats. *European journal of vascular and endovascular surgery*, 2010, vol. 39, no. 4, p. 478-484. ISSN 1078-5884. **IF 2,872**.

[4] Matia, I., Adamec, M., **Varga**, M., Janoušek, L., Lipár, K., Viklický, O. Aortoiliac reconstruction with allograft and kidney transplantation as a one-stage procedure: long term results. *European journal of vascular and endovascular surgery*, 2008, vol. 35, no. 3, p. 353-357. ISSN 1078-5884. **IF 3,007**.

#### b) Bez impact factoru

[1] Matia, I., Adamec, M., Janoušek, L., Lipár, K., Marada, T., Klein, D., Baláž, P., **Varga**, M., Chlupáč, J., Rokošný, S. Klinické zkušenosti s použitím chladem konzervovaných žilních a tepenných alloštěpů: dlouhodobé výsledky. *Rozhledy v chirurgii*, 2010, roč. 89, č. 1, s. 45-54. ISSN 0035-9351.

### 11.2 Publikace bez vztahu k tématu disertace

#### a) S impact factorem

[1] **Varga**, M., Sixta, B., Bem, R., Matia, I., Jirkovska, A., Adamec, M. Application of gentamicin- collagen sponge shortened wound healing after minor amputations in diabetic patients- a prospective, randomised trial. *Archives of Medical Science*, 2012, V tisku. ISSN 1734-1922. **IF 1,199** z r.2010.

[2] **Varga**, M., Matia, I., Kučera, M., Oliverius, M., Adamec, M. Polypropylene mesh repair of incisional hernia after kidney transplantation: single center experience and review of the literature. *Annals of Transplantation*, 2011, Vol 16, no. 3, p. 121-125. ISSN 1425-9524. **IF 0,975** z r. 2010.

[3] Oliverius, M., Kala, Z., **Varga**, M., Gürlich, R., Lánská, V., Kubešová, H. Radical surgery for pancreatic malignancy in the elderly. *Pancreatology*, 2010, vol. 10, no. 4, p. 499-502. ISSN 1424-3903. **IF 2,128**.

#### **b) Bez impact factoru**

[1] Dubský, M., Jirkovská, A., Bém, R., Pagáčová, L., Fejfarová, V., **Varga**, M., Skibová, J., Langkramer, Š., Syková, E. Terapie kritické končetinové ischemie u pacientů se syndromem diabetické nohy pomocí autologních kmenových buněk. *Vnitřní lékařství*, 2011, roč. 57, č. 5, s. 451-455. ISSN 0042-773X.

[2] **Varga**, M., Matia, I., Kučera, M., Sixta, B., Kočík, M., Oliverius, M., Pirk, J., Adamec, M. Akutní uzávěr splachnického řečiště po kardiochirurgických výkonech. *Cor et Vasa*, 2010, roč. 52, č. 4, s. 252-256. ISSN 0010-8650.

[3] Oliverius, M., **Varga**, M., Honsová, E. Chirurgická léčba gastrointestinálních stromálních nádorů. *Onkologie*, 2010, roč. 4, č. 1, s. 9-12. ISSN 1802-4475.

[4] **Varga**, M., Valsamis, A., Matia, I., Peregrin, J., Honsová, E., Šafanda, M., Oliverius, M. Transarteriální chemoembolizace u hepatocelulárního karcinomu jater. *Rozhledy v chirurgii*, 2009, roč. 88, č. 8, s. 434-438. ISSN 0035-9351.

[5] **Varga**, M., Oliverius, M., Valsamis, A., Kučera, M., Gürlich, R., Šafanda, M., Matia, I., Honsová, E. Resekce pankreatu pro metastázy karcinomu ledviny. *Klinická onkologie*, 2009, roč. 22, č. 6, s. 288-290. ISSN 0862-495X.

[6] Gürlich, R., Oliverius, M., Lipár, K., **Varga**, M., Špičák, J., Štirand, P., Valsamis, A., Novotný, J., Vyhnánek, F. Výsledky jednoletého přežití u

nemocných po resekci hlavy slinivky břišní s resekci žil portomezenterické oblasti (PMO). *Rozhledy v chirurgii*, 2009, roč. 88, č. 8, s. 417-421. ISSN 0035-9351.

[7] Valsamis, A., Oliverius, M., **Varga**, M., Mareš, K. Primární retroperitoneální tumor - extraadrenální paragangliom - kazuistika. *Rozhledy v chirurgii*, 2008, roč. 87, č. 5, s. 263-267. ISSN 0035-9351.

## **12 SEZNAM PŘÍLOH**

### **Příloha A**

**Varga, M., Matia, I., Lodererova, A., Adamec, M.** Tacrolimus inhibits intimal hyperplasia in arterialised veins in rats. *Bratislava Medical Journal*, 2012, vol.113, no.1, p.5-9. ISSN 0006-9248. **IF 0,345** z r. 2010.

### **Příloha B**

Matia, I., **Varga, M., Lodererová, A., Adamec, M.** The positive effect of immunosuppression on adaptation of venous allografts to arterialisation in rats. *European journal of vascular and endovascular surgery*, 2010, vol. 39, no. 4, p. 478-484. ISSN 1078-5884. **IF 2,872.**

### **Příloha C**

**Varga, M., Matia, I., Lodererova, A., Adamec, M.** The minimal dose of FK506 is sufficient to facilitate the arterialisation of venous allografts in rats. *European Surgery Acta Chirurgica Austriaca*, 2012, V tisku. ISSN 1682-8631. **IF 0,534** z r. 2010.

### **Příloha D**

Matia, I., Adamec, M., **Varga, M., Janoušek, L., Lipár, K., Viklický, O.** Aortoiliac reconstruction with allograft and kidney transplantation as a one-stage procedure: long term results. *European journal of vascular and endovascular surgery*, 2008, vol. 35, no. 3, p. 353-357. ISSN 1078-5884. **IF 3,007.**

### **Příloha E**

Matia, I., Adamec, M., Janoušek, L., Lipár, K., Marada, T., Klein, D., Baláž, P., **Varga, M., Chlupáč, J., Rokošný, S.** Klinické zkušenosti s použitím chladem konzervovaných žilních a tepenných alloštěpů: dlouhodobé výsledky. *Rozhledy v chirurgii*, 2010, roč. 89, č. 1, s. 45-54. ISSN 0035-9351.

**TACROLIMUS INHIBITS INTIMAL HYPERPLASIA IN  
ARTERIALISED VEINS IN RATS**

*Varga, M., Matia, I., Lodererova, A., Adamec, M.*

**BRATISLAVA MEDICAL JOURNAL**

2012, vol.113, no.1, p.5-9. ISSN 0006-9248.

## EXPERIMENTAL STUDY

# Tacrolimus inhibits intimal hyperplasia in arterialised veins in rats

Varga M<sup>1</sup>, Matia I<sup>2</sup>, Lodererova A<sup>3</sup>, Adamec M<sup>1</sup>

*Transplant Surgery Department, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.  
ivmi@ikem.cz*

**Abstract:** *Objectives:* We investigated whether tacrolimus (FK506) can inhibit neointimal formation in arterialised vein grafts in rats.

*Methods:* Lewis iliolumbar veins were implanted into the abdominal aorta of isogenic rats. Animals in the treatment groups had daily intramuscular injections of tacrolimus at 0.2 mg/kg (group B) and 0.1 mg/kg (Group C), respectively. The control group A had no treatment. Light microscope evaluations of arterialised vein grafts were performed 30 days after operation. We determined the presence of endothelial cells, the thickness of intima and media, and the degree of infiltration by MHC class II positive, CD4 positive, and CD8 positive cells into the adventitia.

*Results:* The intimal thickness in group B ( $5.0 \pm 1.0 \mu\text{m}$ ) was statistically lower ( $P < 0.05$ ) when compared to group C ( $7.0 \pm 3.0 \mu\text{m}$ ). The intimal thickness in untreated group A ( $12.7 \pm 7.0 \mu\text{m}$ ) was statistically higher ( $P < 0.01$ ) when compared to both treated groups B and C, respectively. The medial thickness and degree of adventitial infiltration by MHC class II positive, CD8 positive, and CD4 positive cells did not differ between groups.

*Conclusion:* Treatment with tacrolimus (FK506) showed a dose dependant inhibition of neointimal hyperplasia in arterialised vein grafts in rats (Tab. 1, Fig. 3, Ref. 22). Full Text in free PDF [www.bmj.sk](http://www.bmj.sk).

**Key words:** intimal hyperplasia, tacrolimus, FK506; rats.

Saphenous vein grafts are a material of choice for peripheral vascular reconstruction in the surgical treatment of peripheral arterial occlusive disease. Late failure of saphenous vein grafts develops as a result of intimal hyperplasia which is characterized by cell proliferation and extracellular matrix synthesis with subsequent accelerated atherogenesis (1). It has been shown that the level of intimal hyperplasia is directly linked to the degree of endothelial denudation, which, in vein grafts is caused by luminal distension during surgery, ischemia, damage at surgical anastomoses and continued physical trauma under arterial conditions (2–4). Moreover arterial tangential pressure, medial damage and thickening as well as shear stress changes and altered flow patterns are involved in the development of intimal hyperplasia (5–7).

All these new findings in pathophysiology of intimal hyperplasia led to the development of many new therapeutic agents

aimed at treating this condition (1). However, the successes of laboratory studies have not been implicated in the clinic largely. Exception from this are drug-eluting stents used in percutaneous coronary interventions for the treatment of coronary stenosis (8, 9). Several clinical trials have demonstrated that sirolimus-eluting stents and paclitaxel-eluting stents are superior to bare metal stents by decreasing the restenosis rates as well as major adverse cardiac events (10, 11). However, stent thrombosis after 1 year was more common with both sirolimus-eluting stents and paclitaxel-eluting stents than with bare metal stents (12). The reason for it was that both types of drug-eluting stents caused significant delay in arterial healing characterised by persistent fibrin deposition and delayed re-endothelialisation when compared to bare metal stents. Recently a new generation of tacrolimus-eluting stents has been developed and investigated in animal experiments with good results (13).

Tacrolimus (FK506) and sirolimus (rapamycin) are macrolide antibiotics with immunosuppressive and both anti-proliferative and anti-inflammatory activity commonly used in transplanted patients after solid organ transplantation (14, 15). Tacrolimus is less potent than sirolimus for inhibiting vascular smooth muscle cell proliferation or migration (16). However, tacrolimus was reported to have less anti-proliferative effect on cultured endothelial cells compared to sirolimus (17). In a porcine coronary model, the degree of re-endothelialisation was similar with tacrolimus-eluting stent and bare metal stents (13). Therefore, tacrolimus is suggested to be a promising compound for the next generation of drug-eluting stents (13).

<sup>1</sup>Transplant Surgery Department, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic, <sup>2</sup>Universitätsklinikum Leipzig AöR, Department für Operative Medizin, Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Transplantations-, Thorax- und Gefäßchirurgie, Leipzig, Deutschland, and <sup>3</sup>Department of Pathology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

**Address for correspondence:** I. Matia MD, PhD, Universitätsklinikum Leipzig AöR, Department für Operative Medizin, Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Transplantations-, Thorax- und Gefäßchirurgie, Liebigstrasse 20, D-04103 Leipzig, Deutschland.  
Phone: +420.2.61364105, Fax: +420.2.61362822

**Acknowledgement:** The work was supported by Grant No. MZO 00023001 awarded by Ministry of Health of the Czech Republic.

In our own experiments we have used tacrolimus in rats after arterial and venous transplantations. Tacrolimus administered intramuscularly was sufficient to suppress acute rejection changes and inhibit intimal proliferation in aortal allografts (18). In addition, we have proven the positive effect of tacrolimus on the wall-remodelling process of venous allografts following their implantation into the arterial system (19).

The purpose of this study was to study the effect of systemic tacrolimus treatment on neointimal hyperplasia and medial thickening using a rat vein-to-artery implantation model.

## Methods

Principles of laboratory animal care were followed, and applicable national laws observed during the study.

### Animals

Male Lewis rats (LEW) (RT1<sup>l</sup>) weighing 200 to 330 g (n=27) were used in the study. Nine Lewis rats were used as donors and eighteen Lewis rats were used as recipient of ilio-lumbar vein grafts. Animals were obtained from Charles River, Germany. All the rats were maintained according to the National Institute of Health guidelines. Each transplanted animal was held separately in a confinement cage during the entire follow-up period.

### Operative procedure

The operative procedure was the same as used in our previous experiment with venous transplantation in rats (19). Briefly, the donor animals were anesthetized by an intramuscular injection of ketamine (Narkamon®, Spofa a.s., Prague, Czech Republic) at 100 mg/kg and xylazine (Rometa®, Spofa a.s., Prague, Czech Republic) at 10 mg/kg. Two 1–1.5 cm long segments of the ilio-lumbar veins were excised and stored in saline solution at room temperature until their transplantation. The mean ischemic time for the vein grafts was 172 minutes, with no statistical differences between the experimental groups.

The recipient animals were anesthetized with an 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. After a midline laparotomy, the venous grafts were implanted with a running 10-0 mono-filament suture (Ethicon Inc., Sommerville, New Jersey, USA), into the recipients infrarenal aorta.

Neither anti-coagulants nor anti-platelet drugs were used in this experiment.

### Animal groups

The recipient animals were divided into three groups. Animals in the treatment groups had daily intramuscular injections of tacrolimus at 0.2 mg/kg (group B, n=6) and 0.1 mg/kg (group C, n=6), respectively. The control group A (n=6) had no treatment.

The rats in presented study were operated as a part of larger rat venous transplantation study. In this whole experiment only one syngeneic control group A (no treatment) was operated. The

group B and C results in this work are compared to original control group A results (19).

### Immunosuppressive therapy

The immunosuppressive protocol in presented syngeneic vein-to-artery model was the same as that in the allogeneic model. Briefly, treated animals received intramuscularly in saline solution suspended tacrolimus (Prograf®, Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japan) at 0.2 mg/kg/day (group B) and 0.1 mg/kg (group C), respectively. Immunosuppression begun on day 1 after transplantation and was administered for the whole 30 day follow-up period. On day 30, tacrolimus blood levels were evaluated in both groups using an enzyme enhanced immunoassay technique (Emit® 2000 Tacrolimus assay, Dade Behring Inc., Deerfield, Illinois, USA). Venous grafts were removed after a midline re-laparotomy and processed for histology and immunohistochemistry. The animals were euthanized by intracaval administration of a lethal dose of thiopental (Thiopental®, Spofa, a.s., Prague, Czech Republic).

### Histology and immunohistochemistry

Histologic and immunohistochemical analyses were performed according to the methods described previously in our allogeneic vein-to-artery transplantation model (19). Briefly, after harvest were the venous grafts 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 then subsequently frozen in 2-methylbutane (Fluka Chemika, Buchs, Switzerland) cooled by liquid nitrogen and stored till processed at –80 °C.

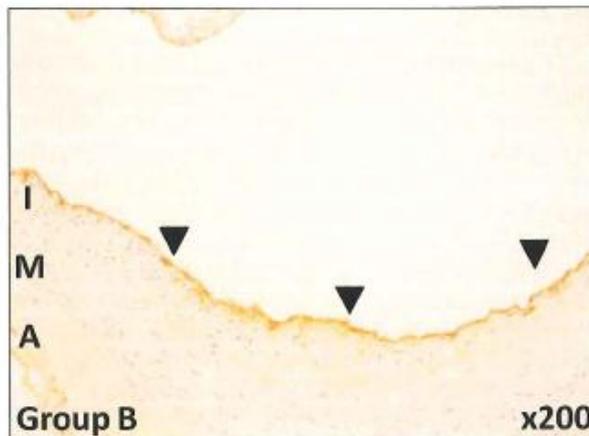
### Histologic analysis

Digital image analysis was used to quantify the intimal hyperplasia as described previously (19). Briefly, frozen cross sections (5 µm) from the midportion of the graft were stained with a Hematoxylin & Eosin and a Van Gieson with elastica stain. Each section was photographed with an Olympus Cammedia C-5050 digital camera (Olympus, Hamburg, Germany) and analyzed with Olympus DP-Soft software version 3.2. Measurements for intimal (from the endothelial surface to the inner border of the tunica media) and medial thickness (from the inner to the outer border of the tunica media) were made in blinded fashion in up to 10 locations in each section. The mean value and standard deviation (mean±SD) were calculated for each vein and each animal group.

### Immunohistochemical analysis

Detection of CD4<sup>+</sup> cells, CD8<sup>+</sup> cells, and Von Willebrand factor

Immunohistochemistry was performed on 8 µm thick sections with a two-step indirect method as described previously (19). Briefly, after 10 min fixation in cold acetone and rinsing in 0.2 % Triton X 100 and phosphate-buffered saline, the sections 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. After blocking of endogenous peroxidase activity by 30 min incubation



**Fig. 1.** Representative light microscopic features of vein treated with tacrolimus at higher dose (group B) obtained 30 days after implantation to the infrarenal abdominal aorta. Immunostaining with anti-Von Willebrand factor antibody. Positive endothelial cells are stained brown (black marks).

I – tunica intima, M – tunica media, A – tunica adventitia.

in 0.3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 70 % methanol, the sections were incubated with a secondary antibody (Histofine® Simple Stain Rat MAX PO, Nichirei, Japan) for 30 min and then incubated with Dako Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) for 5 minutes. Finally, the specimens were counterstained and dipped in Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and scored in a blinded fashion. Cells were counted at 5 locations at x1000 magnification and 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 as described previously (19). Briefly, after 10 min fixation in cold acetone and rinsing 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). After incubation in 10% horse serum (prevention of unspecific binding), a primary anti-RT1.B<sup>+</sup> antibody (MRC-OX3, Cedarlane Laboratories Ltd., Burlington, Ontario, Canada) was applied for 60 min. Endogenous peroxidase was blocked in 0.3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 70 % methanol (30 minutes). The specimen was then incubated with a secondary biotinylated horse anti-mouse antibody (Vector Lab, Burlingame, California, USA), followed by incubation with R.T.U. Vectastain Elite ABC Reagent (Vector Lab, Burlingame, California, USA), followed by 5 min incubation with Dako Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark). Finally, the specimens were counterstained and dipped in Entellan®.

#### Statistical analysis

Comparisons of intimal and medial thicknesses and numbers of lymphocytes and Lewis MHC class II positive cells between the experimental groups were performed with analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey HSD Multiple Comparisons test. P values less than .05 were considered significant. The values in the text and tables are expressed as the mean±standard deviation (SD).

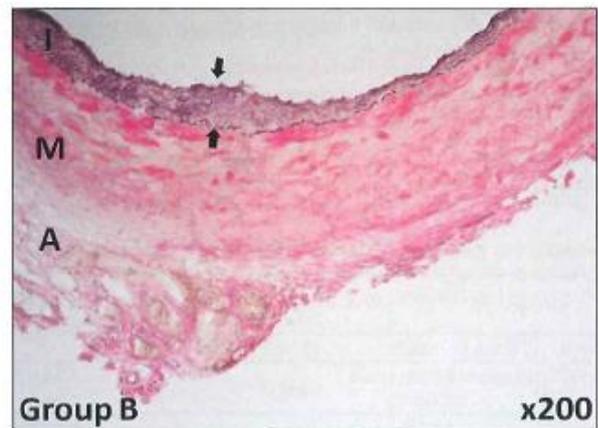
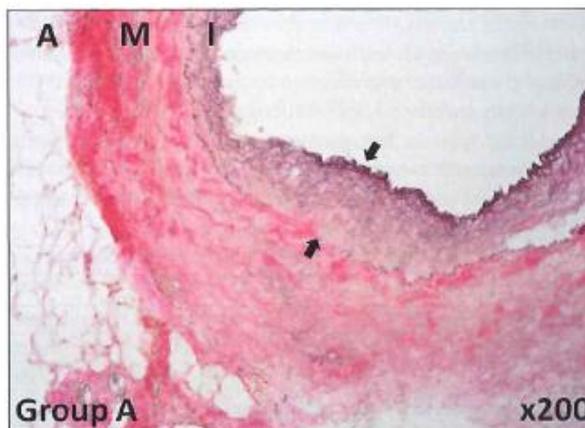
## Results

#### Immunosuppression

The mean blood level of tacrolimus, measured on day 30 after venous arterialisation, was 6.10±0.90 ng/mL in group B, and 3.50±0.59 ng/mL in group C, respectively. The difference between both immunosuppressed groups was statistically significant ( $p < 0.001$ ).

#### Graft patency

No venous graft thromboses or occlusions were observed in any of the animals on day 30 after arterialisation.



**Fig. 2.** Representative light microscopic features of non-treated veins (group A) and veins treated with tacrolimus at higher dose (group B) obtained 30 days after implantation to the infrarenal abdominal aorta. Both slides are stained with a Van Gieson with elastica stain. The process of arterialization in both groups was represented by intimal hyperplasia and formation of smooth muscle cells layers in the tunica media. Intimal proliferation (marked by black arrows) was inhibited by tacrolimus in all treated animals. I – tunica intima, M – tunica media, A – tunica adventitia.

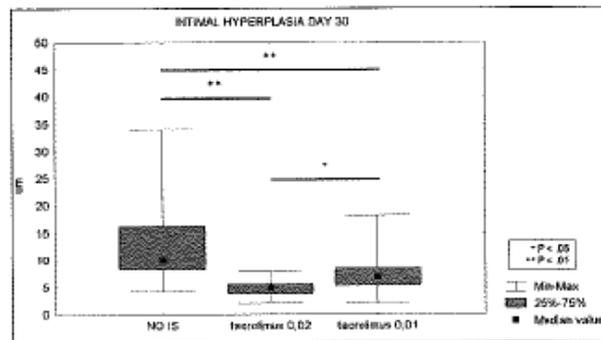


Fig. 3. The intimal thickness of veins treated with tacrolimus was significantly lower ( $P < .01$ ) compared to the non-treated veins 30 days after their arterialisation. NO IS – no immunosuppression group A.

#### Tunica intima

In all animal groups, 30 days after arterialisation, the luminal surface of the venous grafts was covered by a monolayer of endothelial cells (Fig. 1). Hyperplasia of the subendothelial neointima developed in all veins during that time period (Fig. 2). In arterialised veins with no treatment (group A) was the mean intimal thickness  $12.7 \pm 7.0 \mu\text{m}$ . In veins treated with tacrolimus we observed statistically significant reduction of intimal hyperplasia when compared to untreated veins in group A ( $p < 0.01$ ). Moreover, intimal thickness in veins with higher dose of tacrolimus ( $5.0 \pm 1.0 \mu\text{m}$ ) was statistically lower ( $p < 0.05$ ) when compared to veins with lower dose of tacrolimus ( $7.0 \pm 3.0 \mu\text{m}$ ) (Tab. 1, Fig. 3)

#### Tunica media

In all venous grafts led the process of adaptation to arterial pressure to the formation of multiple smooth muscle cell layers 30 days after arterialisation. Medial thickness in animals treated with higher (group B) as well as lower (group C) dose of tacrolimus ( $95.9 \pm 33.3 \mu\text{m}$  and  $102.3 \pm 31.0 \mu\text{m}$ , respectively) did not statistically differ from medial thickness in animals with no treatment ( $103.2 \pm 24.6 \mu\text{m}$ ) (Tab. 1).

#### Tunica adventitia

The degree of adventitial infiltration by CD4+, CD8+ and Lewis MHC class II cells did not differ between non-treated and immunosuppressed arterialised veins (Tab. 1).

## Discussion

The present study examined the effect of intramuscular application of tacrolimus on the development of neointimal hyperplasia and medial thickening in arterialised vein grafts. Tacrolimus was chosen as it represent a promising compound for the use in drug-eluting stents as well as it was successfully used to inhibit acute rejection in our previous arterial and venous transplantation models (18, 19).

In this experiment we demonstrated an inhibitory effect of tacrolimus on the development of intimal hyperplasia in veins one month after their implantation to arterial system. This inhibitory effect was dose dependent and was present even when tacrolimus mean blood levels were about 3 ng/mL.

Inhibition of intimal hyperplasia by tacrolimus was recently observed in porcine coronary model. Hamada et al observed 4 weeks after implantation of tacrolimus-eluting stents a significantly lower neointimal formation when compared to bare-metal stents (13). Densitometric analysis of Western blotting of isolated protein from porcine coronary arteries 4 weeks after stenting demonstrated that the expression of calcineurin, nuclear factor of activated T cell and interleukin-2 was significantly lower.

Our previous experiment confirmed positive effect of tacrolimus, at same blood level used in this study, on development of the intimal proliferation 30 days following arterialisation of venous allografts (19). The degree of intimal proliferation, a specific feature of vein arterialisation, did not differ between syngeneic venous grafts and allogeneic venous grafts treated by tacrolimus. Contrary, there were only minimal signs of intimal hyperplasia in non-treated allogeneic veins as a result of venous wall destruction by host immune system. Moreover, in arterial allografts, tacrolimus at same dosage was sufficient to inhibit the overexpression of neointimal proliferation, a specific feature of arterial wall rejection (18).

In this study, all treated vein grafts were covered by monolayer of endothelial cells 4 weeks after arterialisation. We haven't observed any delayed re-endothelialisation when compared to the non-treated animals. This is in accordance with a work of Steffel et al (20) who have clearly demonstrated that tacrolimus neither affects tissue factor expression in human aortic endothelial cells nor inhibits endothelial cell proliferation.

All the veins in the present study developed proliferation of vascular smooth muscle cells in medial layer. This proliferation contributed to an increase in vascular wall thickness and mass, the

Tab. 1. The parameters of rats ilio-lumbar venous grafts 30 days after their implantation to the abdominal aorta.

Group	IS	Intima*		Media*	Adventitia**		
		Thickness	Endothelial layer	Thickness	MHC class II+ cells	CD8+ cells	CD4+ cells
A	NO	$12.7 \pm 7.0$	+	$103.2 \pm 24.6$	$16.6 \pm 7.5$	$0.8 \pm 1.7$	$12.5 \pm 7.7$
B	FK506 0.2 mg/kg	$5.0 \pm 1.0^{1,2}$	+	$95.9 \pm 33.3$	$14.5 \pm 5.7$	$0.9 \pm 1.3$	$11.9 \pm 5.0$
C	FK506 0.1 mg/kg	$7.0 \pm 3.0^3$	+	$102.3 \pm 31.0$	$13.2 \pm 6.4$	$0.7 \pm 1.1$	$6.5 \pm 3.3$

<sup>1</sup> The intimal thicknesses in veins treated with tacrolimus (group B, group C) were statistically lower ( $p < 0.01$ ) when compared to the non-treated veins (group A). <sup>2</sup> The intimal thickness in veins treated with tacrolimus at higher dose (group B) was statistically lower ( $p < 0.05$ ) when compared to veins treated with tacrolimus at lower dose (group C). <sup>3</sup> The intimal and medial thicknesses are expressed in  $\mu\text{m}$ , \*\* Numbers of MHC class II, CD8 and CD4 positive cells in one eyepiece at original magnification  $\times 1000$ , IS – immunosuppression.

other typical feature of venous arterialisation (21). Previous cell cultures experiments have demonstrated the anti-proliferative effect of tacrolimus on vascular smooth muscle cells and the calcineurin/nuclear factor of activated T cell signaling pathway in vitro (13, 17). Despite observed tendency of medial layer thinning in higher-dosage tacrolimus group, this thinning was not of statistical significance when compared to non-treated veins.

There were no differences in CD4+, CD8+ and MHC class II positive cells adventitial layer infiltration between treated and non-treated arterialised vein grafts in our study. Schachner et al (15) have influenced the formation of intimal hyperplasia by local application of sirolimus (rapamycin) in vein-to-artery implantation model in mouse. They observed association between reduction of vein graft disease and decreased amount of infiltration of adventitial layer by CD8+ cells. We haven't observed any difference in CD8+ infiltration between treated and non-treated animals. This could be explained by the fact that sirolimus was used locally in pluronic gel applied in the perivascular spaces of grafted veins and that sirolimus can contribute to massive T-cell apoptosis (22).

In conclusion, the present study confirmed inhibitory effect of tacrolimus on formation of intimal hyperplasia in the vein-to-artery implantation model. This is in accordance with recent experimental findings that newly developed tacrolimus-eluting stents inhibited neointimal hyperplasia and restenosis after stenting. Thus, tacrolimus may represent a potent drug in the therapeutic approaches to inhibit accelerated intimal hyperplasia in cardiovascular surgery in case that local, efficacious drug delivery mechanism will be developed.

## References

1. Wallitt EJ, Jevon M, Hornick PI. Therapeutics of vein graft intimal hyperplasia: 100 years on. *Ann Thorac Surg* 2007; 84 (1): 317–323.
2. Raja SG, Haider Z, Ahmad M, Zaman H. Saphenous vein grafts: to use or not to use? *Heart Lung Circ* 2004; 13 (4): 403–409.
3. Westerband A, Crouse D, Richter LC et al. Vein adaptation to arterialization in an experimental model. *J Vasc Surg* 2001; 33 (3): 561–569.
4. Chlupac J, Filova E, Bacakova L. Blood Vessel Replacement: 50 years of Development and Tissue Engineering Paradigms in Vascular Surgery. *Physiol Res* 2009; 58 (Suppl. 2): S119–S139.
5. Angelini GD, Passani SL, Breckenridge IM, Newby AC. Nature and pressure dependence of damage induced by distension of human saphenous vein coronary artery bypass grafts. *Cardiovasc Res* 1987; 21 (12): 902–907.
6. Leask RL, Butany J, Johnston KW et al. Human saphenous vein coronary artery bypass graft morphology, geometry and hemodynamics. *Ann Biomed Eng* 2005; 33 (3): 301–309.
7. Mitra AK, Gangahar DM, Agrawal DK. Cellular, molecular and immunological mechanisms in the pathophysiology of vein graft intimal hyperplasia. *Immunol Cell Biol* 2006; 84 (2): 115–124.
8. Morice MC, Serruys PW, Sousa JE et al. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med* 2002; 346 (23): 1773–8170.
9. Stone GW, Ellis SG, Cox DA et al. A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 2004; 350 (3): 221–231.
10. Moses JW, Leon MB, Popma JJ et al. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med* 2003; 349 (14): 1315–1323.
11. Babapulle MN, Joseph L, Belisle P et al. A hierarchical Bayesian meta-analysis of randomised clinical trials of drug-eluting stents. *Lancet* 2004; 364 (9434): 583–591.
12. Stone GW, Moses JW, Ellis SG et al. Safety and efficacy of sirolimus- and paclitaxel-eluting coronary stents. *N Engl J Med* 2007; 356 (10): 998–1008.
13. Hamada N, Miyata M, Ito H et al. Tacrolimus-eluting stent inhibits neointimal hyperplasia via calcineurin/NFAT signaling in porcine coronary artery model. *Atherosclerosis* 2010; 208 (1): 97–103.
14. Thomson AW, Bonham CA, Zeevi A. Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. *Ther Drug Monit* 1995; 17 (6): 584–591.
15. Schachner T, Zou Y, Oberhuber A et al. Local application of rapamycin inhibits neointimal hyperplasia in experimental vein grafts. *Ann Thorac Surg* 2004; 77 (5): 1580–1585.
16. Hafizi S, Mordt VN, Andersson KM et al. Differential effects of rapamycin, cyclosporine A, and FK506 on human coronary artery smooth muscle cell proliferation and signalling. *Vascul Pharmacol* 2004; 41 (4–5): 167–176.
17. Matter CM, Rozenberg I, Jaschko A et al. Effects of tacrolimus or sirolimus on proliferation of vascular smooth muscle and endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 48 (6): 286–292.
18. 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): 371–380.
19. Matia I, Varga M, Lodererova A, Adamec M. The Positive Effect of Immunosuppression on Adaptation of Venous Allografts to Arterialisation in Rats. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2009.
20. Steffel J, Latini RA, Akhmedov A et al. Rapamycin, but not FK-506, increases endothelial tissue factor expression: implications for drug-eluting stent design. *Circulation* 2005; 112 (13): 2002–2011.
21. Kwei S, Stavrakis G, Takahas M et al. Early adaptive responses of the vascular wall during venous arterialization in mice. *Am J Pathol* 2004; 164 (1): 81–89.
22. Li Y, Li XC, Zheng XX et al. Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat Med* 1999; 5 (11): 1298–1302.

Received April 11, 2011.  
Accepted September 20, 2011.

**THE POSITIVE EFFECT OF IMMUNOSUPPRESSION ON  
ADAPTATION OF VENOUS ALLOGRAFTS TO  
ARTERIALISATION IN RATS**

*Matia, I., Varga, M., Lodererová, A., Adamec, M.*

**EUROPEAN JOURNAL OF VASCULAR AND ENDOVASCULAR SURGERY**

2010, vol. 39, no. 4, p. 478-484. ISSN 1078-5884.



## The Positive Effect of Immunosuppression on Adaptation of Venous Allografts to Arterialisation in Rats<sup>☆</sup>

I. Matia<sup>a,\*</sup>, M. Varga<sup>a</sup>, A. Lodererova<sup>b</sup>, M. Adamec<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Transplant Surgery, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958/9, 140 21 Prague, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Pathology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

Submitted 26 August 2009; accepted 16 November 2009

Available online 16 December 2009

### KEYWORDS

FK506;  
Rats;  
Transplantation;  
Venous allografts

**Abstract** *Objectives and Design:* We investigated whether immunosuppression was necessary for transplanted allogeneic veins to adapt to arterialisation. We used a transplant rat model with or without immunosuppression.

*Material and Methods:* Iliolumbar veins from Lewis (LEW) or Brown–Norway (BN) rats were transplanted into the abdominal aorta of isogenic (LEW to LEW; group A) or allogeneic (BN to LEW; groups B and C) rats. Group C had daily intramuscular injections of 0.2 mg kg<sup>-1</sup> FK506. Light microscope evaluations of grafts were performed at 30 days following transplantation. We determined the presence of endothelial cells, the intensity of intimal proliferation and the degree of infiltration by Lewis major histocompatibility complex (MHC) class II positive, CD4-positive and CD8-positive cells into the adventitia.

*Results:* Groups A and C displayed similar results in intimal thickness (12.7 ± 7.0 μm vs. 15.0 ± 8.4 μm, respectively) and degree of adventitial infiltration by MHC class II positive (16.6 ± 7.5 vs. 14.6 ± 6.2, respectively), CD8-positive (0.8 ± 1.7 vs. 1.8 ± 2.6, respectively) and CD4-positive (12.5 ± 7.7 vs. 5.8 ± 4.6, respectively) cells. In contrast, allogeneic rats without immunosuppression (group B) showed infiltration of host immunocompetent cells and destruction of the venous wall with no histological signs of arterialisation.

*Conclusion:* Immunosuppressive therapy is necessary for venous allograft adaptation to arterialisation in rats.

© 2009 European Society for Vascular Surgery. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

<sup>☆</sup> Presented at the XXIII Annual Meeting 3–6 September, 2009, European Society for Vascular Surgery, Oslo, Norway.

\* Corresponding author. Tel.: +420 2 6136 4105; fax: +420 2 6136 2822.

E-mail address: ivmi@medicon.cz (I. Matia).

Vascular peripheral reconstructive surgery involves the interposition of an autologous vein into the arterial circulatory tree. This results in an adaptation of the venous wall to the new biomechanical conditions.<sup>1</sup> Vein remodelling is a complex biological process that requires alterations in cell proliferation, cell death, cell migration and degradation and/or production of extracellular matrix components.<sup>2</sup> These adaptive interactions amongst vascular cells, their substrates and the local environment lead to the typical anatomical changes associated with venous arterialisations: intimal hyperplasia, circumferential medial thickening with well-organised concentric layers of smooth muscle cells and adventitial neovascularisation.<sup>1,3</sup>

In specific indications, allogeneic veins are used for peripheral vascular reconstruction in humans.<sup>4,5</sup> Immunological studies have shown that venous allografts that had been cold-stored or cryopreserved were antigenic and elicited an immune response in the recipient.<sup>6–8</sup> Allovenous wall rejection could play an important role in the low patency rates of venous allografts. Currently, low patency is the primary limitation of venous allografts for clinical use.<sup>5,9</sup>

Different types of immunosuppressive drugs have been examined as possible adjuncts for reducing antigenicity and improving the patency rates of venous allografts, but these studies have shown different results in animals and humans.<sup>9–12</sup> Currently, immunosuppressive therapy following allovenous reconstruction is generally not accepted in clinical practice.

FK506 (tacrolimus) is a modern immunosuppressive drug that belongs to the group of calcineurin inhibitors. One of its most important immunosuppressant effects is the inhibition of interleukin-2 (IL-2)-dependent T-cell activation.<sup>13</sup> FK506 is routinely used clinically, in combination with other types of immunosuppressive drugs, to inhibit immune responses following renal and liver transplantations.<sup>14</sup> In previous studies, we confirmed the positive effect of FK506 administration on arterial transplantation. FK506 inhibited wall destruction in the abdominal aorta caused by acute rejection, assessed 30 days following transplantation into the rat arterial system.<sup>15</sup>

This study aimed to investigate the process of allovenous arterialisations under conditions of FK506 immunosuppression. Because medial smooth muscle cell proliferation is a dominant feature of the venous arterialisations process, we hypothesised that immunosuppression would, to some degree, preserve smooth muscle cell content in allografted veins, and that smooth muscle cell preservation would be necessary for successful allovenous arterialisations.

## Material and Methods

Principles of laboratory animal care were followed, and applicable national laws observed during the study. Ethical approval by local ethical committee was obtained for this study.

### Animals

Male Lewis rats (LEW) (RT1<sup>l</sup>) in the weight range of 200–340 g ( $N = 26$ ) were used as recipients of allogeneic or syngeneic iliolumbar vein grafts and male Brown–Norway

rats (BN) (RT1<sup>n</sup>) in the weight range of 220–300 g ( $N = 9$ ) were used as donors for the allogeneic group, and LEW (RT1<sup>l</sup>) in the weight range of 280–300 g ( $N = 5$ ) were used as donors for the syngeneic group. Animals were obtained from Charles River, Germany. All the rats were 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 procedures

The donor animals were anaesthetised with an intramuscular injection of ketamine (Narkamon<sup>®</sup>, Spofa a.s., Prague, Czech Republic) at a dose of 100 mg kg<sup>-1</sup> and xylazine (Rometar<sup>®</sup>, Spofa a.s., Prague, Czech Republic) at 10 mg kg<sup>-1</sup>. Two 1–1.5-cm long segments of the iliolumbar veins were excised and these excised veins were stored in saline solution at room temperature until transplantation. The mean ischaemic time for iliolumbar venous grafts during the entire experiment was 201 ± 103 min, with no significant statistical differences amongst the experimental groups (Table 1).

Animals that were used as recipients of venous grafts with planned follow-up were given less invasive anaesthesia to ensure more natural awakening. The recipients were anaesthetised with an intramuscular injection of sufentanil (Sufenta<sup>®</sup>, Janssen Pharmaceutica Inc., Beerse, Belgium) at 20 µg kg<sup>-1</sup> and azaperone (Stresnil<sup>®</sup>, Janssen Pharmaceutica Inc., Beerse, Belgium) at 1 mg kg<sup>-1</sup>. Following a midline laparotomy into the recipient's infrarenal aorta, the venous grafts were transplanted with a running 10/0 monofilament suture (Ethicon Inc., Sommerville, NJ, USA).

Neither anticoagulants nor anti-platelet drugs were administered during the harvest, operative time or in the postoperative period.

### Animal groups

The recipient animals were divided into three groups. Groups A and B comprised rats that received isogenic (LEW to LEW) and allogeneic (BN to LEW) venous transplantations, respectively. Neither group was given immunosuppression. Group C comprised rats that received allogeneic venous transplantations (BN to LEW) and were given immunosuppression (Table 1).

### Immunosuppressive therapy

FK506 (Prograf<sup>®</sup>, Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japan) was the immunosuppressive drug given to the recipient animals in group C. FK506 was suspended in normal saline solution and administered intramuscularly in daily doses of 0.2 mg kg<sup>-1</sup>. On day 30, following transplantation, blood levels of FK506 were evaluated with an enzyme-enhanced immunoassay technique (Emit<sup>®</sup> 2000 Tacrolimus assay, Dade Behring Inc., Deerfield, IL, USA). The blood was drawn from infrarenal vena cava punctured prior to euthanasia.

On day 30, anaesthetised, heparinised animals in all experimental groups received a midline re-laparotomy to remove the venous grafts. The animals were then euthanised by intracaval administration of a lethal dose of

**Table 1** Basic characteristics of each experimental group and operative procedures.

Group	Characteristic	Immunosuppression	No of animals	Death	CIT <sup>a</sup> (min)	OP time (min)	Aortal clamp (min)	Weight day 0 (g)	Weight day 30 (g)	FK506 blood level day 30 (ng/mL)
A	LEW to LEW	no	8	2	215 ± 138	130 ± 19	79 ± 8	223 ± 21	295 ± 17	no
B	BN to LEW	no	10	1	199 ± 85	115 ± 13	66 ± 10	317 ± 18	366 ± 25	no
C	BN to LEW	FK506	8	1	190 ± 85	100 ± 14	75 ± 9	275 ± 20	305 ± 16	5.57 ± 0.96

LEW, male Lewis rats; BN, male Brown-Norway rats; CIT, cold ischaemic time; OP time, duration of operation.

<sup>a</sup> The mean cold ischaemic time (CIT) of ilio-lumbar venous grafts was with no statistical difference between all the experimental groups (Group A vs. Group B  $p = 0.46$ , Group A vs. Group C  $p = 0.59$ , Group B vs. Group C  $p = 0.42$ ).

thiopental (Thiopental<sup>®</sup>, Spofa a.s., Prague, Czech Republic). The removed grafts were processed for histology and immunohistochemistry.

### Histology and immunohistochemistry

Histological and immunohistochemical analyses of venous grafts were performed according to methods described previously for our arterial transplantation model.<sup>15</sup> Briefly, the venous grafts were embedded in Sakura Finetek Tissue Tek<sup>®</sup> Cryomold holders (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) and Sakura Finetek Tissue Tek<sup>®</sup> O.C.T. compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan). The samples were subsequently frozen in 2-methylbutane (Fluka Chemika, Buchs, Switzerland) cooled by liquid nitrogen and then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Histological analysis

The samples obtained were cut into 5- $\mu\text{m}$  sections and stained with Haematoxylin-Eosin and a Van Gieson with elastica stain. The sections were taken from the mid-portion of the graft to avoid tissue that may have reacted to the suture material. Each section was photographed with an Olympus Cammedia C-5050 digital camera (Olympus, Hamburg, Germany) mounted on an Olympus BX51 microscope at a magnification of  $\times 400$ . The images were digitally captured in TIFF format with no compression and analysed with Olympus DP-Soft software Version 3.2. Intimal thickness was measured from the endothelial surface to the inner border of the tunica media. Measurements were made in up to 10 locations in each section. The mean value and standard deviation (mean  $\pm$  SD) were calculated for each vein and each animal group.

### Immunohistochemical analysis

Information on the antibodies used for all immunohistochemical analyses is shown in Table 2.

### Detection of CD4+ cells, CD8+ cells and Von Willebrand factor

Immunohistochemistry was performed on 8- $\mu\text{m}$ -thick sections with a two-step indirect method. Briefly, the sections were fixed in cold acetone for 10 min. After rinsing in 0.2% Triton X100 and phosphate-buffered saline, the specimens were incubated with a primary antibody for 60 min. Endogenous peroxidase was blocked by incubating in 0.3% hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and 70% methanol for 30 min. Next, the sections were incubated with a secondary antibody (Histofine<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

The slides were then scored in a blinded fashion. Cells were counted at five locations at  $\times 1000$  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- $\mu\text{m}$ -thick sections with a three-step indirect method. Briefly, the sections were fixed for 10 min in cold acetone. After sections were rinsed in 0.2% Triton X100 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 non-specific binding, and then a primary antibody was applied for 60 min. Then, endogenous peroxidase was blocked in 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 70% methanol for 30 min. The specimen was incubated with a secondary biotinylated horse anti-mouse antibody (Vector Lab, Burlingame, CA, USA), followed by an incubation with R.T.U. Vectastain Elite ABC Reagent (Vector Lab, Burlingame, CA, 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).

**Table 2** The list of monoclonal and polyclonal antibodies used for immunohistochemical staining of ilio-lumbar venous grafts.

Specificity	Origin	Company	Dilution	Clone	Detection
Von Willebrand factor	Rabbit	DakoCytomation	5000x		Histofine
CD4+ cells	Mouse	Cymbus Biotechnology LTD	800x	W3/25	Histofine
CD8+ cells	Mouse	Cymbus Biotechnology LTD	500x	OX-8	Histofine
RT1.B <sup>®</sup> <sup>a</sup>	Mouse	Cedar Lane	50x	MRC-OX3	Vector

<sup>a</sup> Major histocompatibility complex class II positive cells of host origin.

### Statistical analysis

The values in the text and figures are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). Comparisons of intimal thicknesses and numbers of lymphocytes and Lewis MHC class II positive cells between the experimental groups were performed with the analysis of variance (ANOVA) method, followed by the Tukey HSD Multiple Comparisons test. The  $p$  values  $< 0.05$  were considered significant.

### Results

#### Animals

A total of 30 LEWs were intended for transplantations, but only 26 survived the procedure. Four animals died during the experiment. Three died due to perioperative bleeding (two from group A and one from group B) and one animal was overdosed with anaesthetics (group C). The increase in fatal bleeding in the group A, compared to the other groups, was due to technical failures, which arose initially (and this group was operated at the start of the experiment).

An increase from preoperative weight was observed in all groups at 30 days. The percentage weight increase was significantly higher ( $p < 0.01$ ) in the syngeneic group A compared to both allogeneic groups. This was probably due

to the lower weight of animals in syngeneic group A on day 0 when compared to both allogeneic groups (Table 1).

#### Immunosuppression

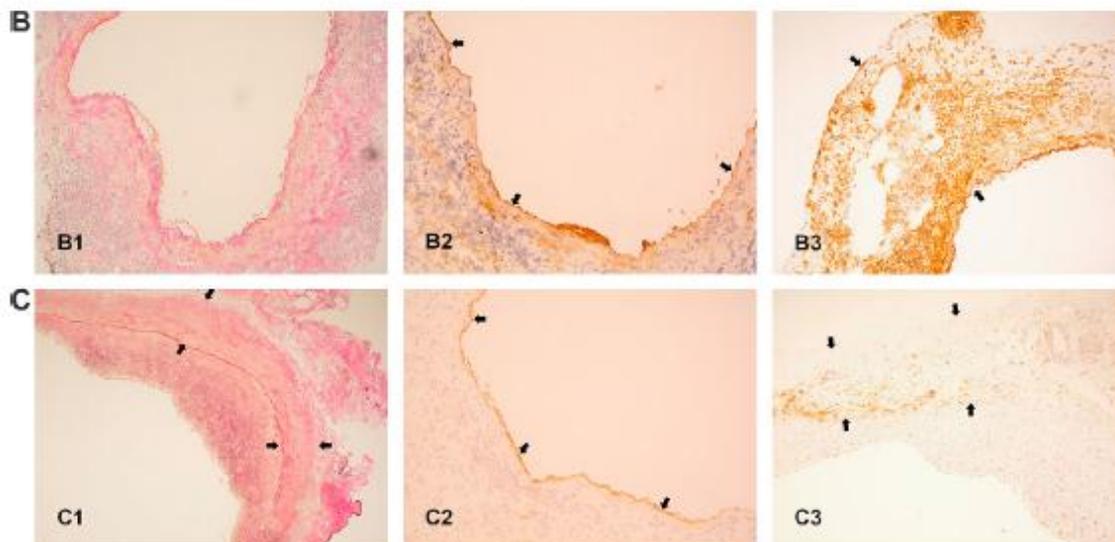
The mean blood level of FK506, measured on day 30 after transplantation, in group C was  $5.57 \pm 0.96$  ng ml<sup>-1</sup>. Diarrhoea was an adverse effect of FK506 administration, and it was observed in five out of seven animals in the immunosuppressed group C.

#### Graft patency

No venous graft thromboses or occlusions were observed in any of the animals on day 30 following transplantation.

#### Tunica intima

In all groups, at 30 days following transplantation, the luminal surface of the venous allograft was covered by a monolayer of endothelial cells. In immunosuppressed ilio-lumbar vein allografts, hyperplasia of the subendothelial neointima developed during that period. The neointima was formed primarily from elastic tissue (Fig. 1). The same feature was observed in syngeneic arterialised venous grafts of group A. The intima thicknesses did not differ between these two experimental groups (Table 3).



**Figure 1** Representative light microscopic histological features of immunosuppressed (group C) and non-immunosuppressed (group B) rat venous allografts obtained at 30 days following transplantation into the infrarenal abdominal aorta. The process of arterialisation in allogeneic immunosuppressed venous grafts was represented by: (C1) (Van Gieson with elastica) intimal hyperplasia and formation of elastic tissue laminae in the neointima (layer of smooth muscle cells in the tunica media is marked with black arrows); (C2) (Von Willebrand factor positive cells) endothelialisation of the luminal surface (black arrows show positive monolayer of endothelial cells) and (C3) (Lewis MHC class II positive cells) low adventitial infiltration of immunocompetent cells (adventitial layer is marked with black arrows). In allogeneic non-immunosuppressed venous grafts, massive infiltration of the host immunocompetent cells led to tissue rejection. (B1, B3) (Van Gieson with elastica, Lewis MHC class II positive cells) the disorganisation of the allogeneous wall structure is evident with no signs of arterialisation (venous wall is marked by black arrows) and (B2) (Von Willebrand factor positive cells) the luminal surface of disorganised venous allografts was covered by endothelial cells (black arrows show the monolayer of endothelial cells). Magnification =  $\times 100$ .

**Table 3** Assessments of rat ilio-lumbar venous grafts 30 days after transplantation into the abdominal aorta. IS – immunosuppression.

Group	Characteristic	IS	Intima <sup>d</sup>		Media	Adventitia <sup>e</sup>		
			Thickness	Endothelial layer	Multiple smooth muscle layers	LEW MHC class II+ cells <sup>f</sup>	CD8+ cells	CD4+ cells
A	LEW to LEW	no	12.7 ± 7.0	+	+	16.6 ± 7.5	0.8 ± 1.7	12.5 ± 7.7
B	BN to LEW	no	2.2 ± 0.7 <sup>a</sup>	+	–	99.9 ± 24.9 <sup>b</sup>	24.1 ± 14.0 <sup>b</sup>	42.7 ± 20.0 <sup>b</sup>
C	BN to LEW	FK506	15.0 ± 8.4	+	+	14.6 ± 6.2	1.8 ± 2.6	5.8 ± 4.6 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Intimal thicknesses of non-immunosuppressed venous allografts (group B) were statistically lower ( $P < 0.01$ ) than that observed in both the other groups (A and C).

<sup>b</sup> The total amounts of Lewis MHC class II positive, CD8-positive, and CD4-positive cells in group B were significantly higher ( $P < 0.001$ ) than those observed in both the other groups (A and C).

<sup>c</sup> The total amount of CD4-positive cells in immunosuppressed allogeneic veins (group C) was significantly lower ( $P < 0.01$ ) than that found in the isogeneic group A.

<sup>d</sup> Intimal thicknesses are expressed in  $\mu\text{m}$ .

<sup>e</sup> Numbers of Lewis MHC class II, CD8-positive, and CD4-positive cells in one microscopic field viewed at a magnification of  $\times 1000$ .

<sup>f</sup> Major histocompatibility complex class II positive cells of host origin.

The absence of immunosuppression in allogeneic ilio-lumbar vein grafts (group B) resulted in the destruction of the intima and disorganisation of the whole venous wall structure. Minimal or no signs were observed of elastic tissue formation in this layer when compared to syngeneic or immunosuppressed venous grafts (Fig. 1). However, this elastic tissue formation was not quantified. The intimal thickness was statistically lower in venous allografts without immunosuppression than in venous allografts with immunosuppression ( $p < 0.01$ ) (Fig. 2).

### Tunica media

In immunosuppressed venous allografts, the process of adaptation to arterial pressure led to the formation of multiple smooth muscle layers at 30 days following transplantation. Minimal or no infiltration of host MHC class II, CD4-positive and CD8-positive cells was observed in the medial layer of immunosuppressed venous allografts. These

histological signs of venous arteriatisation were identical to those observed in syngeneic venous grafts (Fig. 1).

In contrast, no typical concentric smooth muscle layers were observed in non-immunosuppressed allogeneic venous grafts at 30 days following transplantation. Furthermore, the medial layer was infiltrated with all types of host immunocompetent cells in these allografts (Fig. 1).

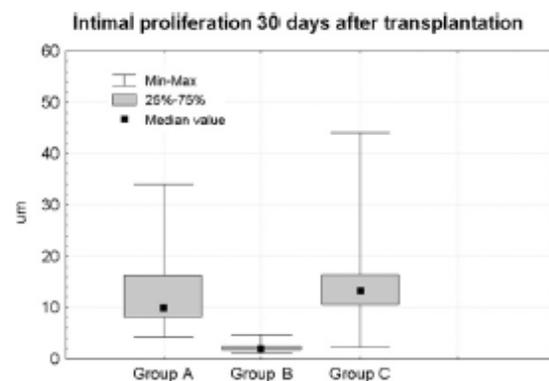
### Tunica adventitia

In immunosuppressed venous allografts on day 30 the adventitial layer was characterised by the infiltration by mononuclear cells (Fig. 1). Moreover, adventitial infiltration of CD4+ cells was significantly lower in immunosuppressed allogeneic animals ( $p < 0.01$ ) compared to that observed in isogeneic grafts. However, the degree of adventitial infiltration by CD8+ and Lewis MHC class II + cells was comparable in immunosuppressed allogeneic and syngeneic arteriatised veins (Table 3).

In non-immunosuppressed venous allografts, tissue rejection led to massive wall infiltration by immunocompetent cells (Fig. 1). The total amounts of CD4+, CD8+ and host MHC class II positive cells that infiltrated the adventitial layer in the absence of immunosuppression were significantly higher ( $p < 0.001$ ) than those observed in immunosuppressed allogeneic veins (Table 3).

### Discussion

The present study examined the morphological changes of venous allografts implanted into the arterial system of rats. The results revealed that immunosuppression was necessary for the development of venous wall adaptation to arterial pressure within 30 days of transplantation. The suppression of the recipient immune response in the early post-transplantation phase led to the preservation of venous smooth muscle cells in transplanted veins. The presence and subsequent proliferation of these smooth muscle cells contributed to an increase in vascular wall thickness and mass, the typical features of venous arteriatisation observed in syngeneic conditions.<sup>1</sup>



**Figure 2** Intimal proliferation at 30 days following transplantation did not differ between syngeneic venous grafts (group A) and allogeneic immunosuppressed venous grafts (group C). The intimal thickness in allogeneic non-immunosuppressed venous grafts (group B) was significantly lower ( $P < 0.01$ ) compared to both groups A and C.

In the absence of immunosuppression, allogeneic venous grafts were unable to develop the typical signs of venous wall arterialisation. Allogeneic smooth muscle cells were destroyed by massive infiltration of immunocompetent cells and were not able to proliferate or adapt to the new biomechanical conditions in the arterial system.

There are two principal animal models described in the literature for studying the process of arterialisation *in vivo*. The first one, which was also used in this study, generates neointimal hyperplastic lesions and is performed by the dissection, removal and storage of vessels prior to interposition into the arterial circulatory system.<sup>3,16</sup> The second one, first described by Kwei *et al.*,<sup>1</sup> connects the animal's external jugular vein to the carotid arterial circulation *in situ* (arterio-venous connection). Thus, the arterialised venous segment is never exteriorised from the body of the animal. The main difference between these models is the status of endothelial and smooth muscle cells at the beginning of the remodelling process.<sup>1</sup> In the '*in situ* model', at 7 days post-surgery, the intact endothelial layer promoted the proliferation of smooth muscle cells, the formation of smooth muscle cell layers and caused minimal apoptosis in the vascular wall;<sup>1</sup> however, the '*ex situ* model', at 7 days, showed significant cell loss and vessel degeneration. This resulted secondary to increased tensile stress following exposure to arterial blood pressure, vessel-wall ischaemia and free-radical oxidative injury associated with reperfusion.<sup>3,16</sup> In the *ex situ* model, venous wall cell death occurred early, following implantation, both by necrosis and apoptosis. This was soon replaced by cellular proliferation in the adventitia and the tunica media. This resulted in increased microvessel density and smooth muscle cell regeneration during the first week.<sup>3</sup> Neointimal formation took place thereafter.<sup>3</sup>

Because ischaemic-reperfusion injury is inevitable in venous transplantation, all the venous grafts in our experiment were damaged at implantation. We assumed there were no differences in damage between the groups, because all groups had similar cold ischaemic times. However, smooth muscle cell regeneration and proliferation, followed by neointimal hyperplasia, were only possible in allogeneic venous grafts with immunosuppression. Without immunosuppression, allogeneic venous grafts exhibited massive infiltration by immunocompetent cells and destruction of the venous wall.

In this study, we used FK506 for immunosuppression, which is more potent than cyclosporine A.<sup>14</sup> In other studies, a combination of cyclosporine A and mycophenolate mofetil was used in dogs following allogeneic venous transplantation.<sup>11</sup> They found a 100% patency rate at 20 weeks after implantation and immune reactions were markedly reduced. However, given alone, neither cyclosporine A at a 10 mg kg<sup>-1</sup> per day nor mycophenolate mofetil at 20 mg kg<sup>-1</sup> per day improved the overall patency of venous allografts. In the work of Mingoli *et al.*,<sup>10</sup> cyclosporine A at 20 mg kg<sup>-1</sup> day reduced aneurysmal dilatation and immunological responses at 30 days following allogeneic venous transplantations in dogs. However, discontinuing cyclosporine A immunosuppression led to the occlusion of cold-stored<sup>17</sup> as well as cryopreserved<sup>18</sup> venous allografts within 30 days.

Other studies have reported on the therapeutic potential of immunosuppression for the treatment of vein graft disease in syngeneic vein-to-artery implantations. Schachner *et al.*<sup>19</sup> demonstrated reduced intimal thickness and decreased inflammatory cell infiltration following perivascular application of rapamycin in a mouse model. This reduction of vein graft disease was associated with a decreased amount of CD8+ cell infiltration. In our model, we found no differences in the adventitial CD8+ cellular infiltration between syngeneic grafts and allogeneic immunosuppressed grafts. Moreover, the extent of intimal proliferation in immunosuppressed allografts was comparable to that observed in syngeneic grafts.

Immunosuppressive therapy following allogeneic reconstructions is not generally accepted in clinical practice, despite experimental<sup>10</sup> and clinical<sup>7</sup> evidence of the potential benefits. We believe that inhibition of rejection and reduced destruction of the allogeneic venous wall with low systemic immunosuppression could improve the low patency rate of allogeneic transplantation. In our clinical practice, we have given this drug to patients with allogeneic or alloarterial grafts at a mean daily dosage of 2 mg, which resulted in mean blood levels of 5 ng ml<sup>-1</sup>. We found no or minimal adverse effects associated with this immunosuppressive regimen in a small, but high-risk, group of vascular patients.<sup>5</sup> However, a controlled prospective clinical study is needed to investigate the impact of this immunosuppressive regimen on the patency rates of allogeneic grafts.

In conclusion, the present study considered the positive effect of FK506 immunosuppression on the wall-remodelling process of venous allografts following implantation into the arterial system in rats. We suggest that the principal effects of FK506 under these conditions were the suppression of CD8+ infiltration in the venous adventitial layer and the prevention of vascular smooth muscle cell depletion. The use of FK506 in clinical venous allotransplantation could be potentially beneficial for increasing of the allogeneic bypasses patency rates by the inhibition of venous wall destruction by the host's immune system.

## Acknowledgements

This work was supported by grant no. NR/9371-3/2007 awarded by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic.

## References

- 1 Kwei S, Stavakis G, Takahas M, Taylor G, Folkman MJ, Gimbrone Jr MA, et al. Early adaptive responses of the vascular wall during venous arterialization in mice. *Am J Pathol* 2004; **164**:81–9.
- 2 Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med* 1994; **330**:1431–8.
- 3 Westerland A, Crouse D, Richter LC, Aguirre ML, Wixon CC, James DC, et al. Vein adaptation to arterialization in an experimental model. *J Vasc Surg* 2001; **33**:561–9.
- 4 Farber A, Major K, Wagner WH, Cohen JL, Cossman DV, Lauterbach SR, et al. Cryopreserved saphenous vein allografts in infrainguinal revascularization: analysis of 240 grafts. *J Vasc Surg* 2003; **38**:15–21.

- 5 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;34:424–31.
- 6 Carpenter JP, Tomaszewski JE. Human saphenous vein allograft bypass grafts: immune response. *J Vasc Surg* 1998;27:492–9.
- 7 Lopez-Cepero M, Sanders CE, Buggs J, Bowers V. Sensitization of renal transplant candidates by cryopreserved cadaveric venous or arterial allografts. *Transplantation* 2002;73:817–9.
- 8 Balzer KM, Luther B, Sandmann W, Wassmuth R. Donor-specific sensitization by cadaveric venous allografts used for arterial reconstruction in peripheral arterial occlusive vascular disease. *Tissue Antigens* 2004;64:13–7.
- 9 Posner MP, Makhoul RG, Altman M, Kimball P, Cohen N, Sobel M, et al. Early results of infrageniculate arterial reconstruction using cryopreserved homograft saphenous conduit (CADVEIN) and combination low-dose systemic immunosuppression. *J Am Coll Surg* 1996;183:208–16.
- 10 Mingoli A, Edwards JD, Feldhaus RJ, Hunter 3rd WJ, Nassetti R, Cavallari N, et al. Fresh vein allograft survival in dogs after cyclosporine treatment. *J Surg Res* 1996;62:95–102.
- 11 Wagner E, Roy R, Marois Y, Douville Y, Guidoin R. Fresh venous allografts in peripheral arterial reconstruction in dogs. Effects of histocompatibility and of short-term immunosuppression with cyclosporine A and mycophenolate mofetil. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:1732–44.
- 12 Carpenter JP, Tomaszewski JE. Immunosuppression for human saphenous vein allograft bypass surgery: a prospective randomized trial. *J Vasc Surg* 1997;26:32–42.
- 13 Faivre L, Saoudi S, Astier A, Hamadas C, Conort O, Boivin H, et al. FK 506 dose in transplantation: from theory to practice. *Transplant Proc* 2001;33:2594–7.
- 14 Vincenti F, Jensik SC, Filo RS, Miller J, Pirsch J. A long-term comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine in kidney transplantation: evidence for improved allograft survival at five years. *Transplantation* 2002;73:775–82.
- 15 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.
- 16 Zou Y, Dietrich H, Hu Y, Metzler B, Wick G, Xu Q. Mouse model of venous bypass graft arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1998;153:1301–10.
- 17 Vermassen F, Degrieck N, De Kock L, Goubeau J, Van Landuyt K, Noens L, et al. Immunosuppressive treatment of venous allografts. *Eur J Vasc Surg* 1991;5:669–75.
- 18 Augelli NV, Lupinetti FM, el Khatib H, Sanofsky SJ, Rossi NP. Allograft vein patency in a canine model. Additive effects of cryopreservation and cyclosporine. *Transplantation* 1991;52:466–70.
- 19 Schachner T, Zou Y, Oberhuber A, Tzankov A, Mairinger T, Laufer G, et al. Local application of rapamycin inhibits neointimal hyperplasia in experimental vein grafts. *Ann Thorac Surg* 2004;77:1580–5.

**THE MINIMAL DOSE OF FK506 IS SUFFICIENT TO FACILITATE  
THE ARTERIALISATION OF VENOUS ALLOGRAFTS IN RATS**

*Varga, M., Matia, I., Lodererova, A., Adamec, M.*

**EUROPEAN SURGERY ACTA CHIRURGICA AUSTRIACA**

2012, V tisku. ISSN 1682-8631.

Eur Surg (2012) 44/2: 1–7  
DOI 10.1007/s10353-012-0083-x  
© Springer-Verlag 2012

european  
surgery  
ACA Acta Chirurgica Austriaca  
Printed in Austria

## The minimal dose of FK506 is sufficient to facilitate the arterialisation of venous allografts in rats

M. Varga<sup>1</sup>, I. Matia<sup>2</sup>, A. Lodererova<sup>3</sup>, M. Adamec<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Transplant Surgery Department, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

<sup>2</sup>Department for Visceral, Transplantation, Thoracic and Vascular Surgery, University Hospital Leipzig, Germany

<sup>3</sup>Department of Pathology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

Received May 30, 2011; accepted January 1, 2012

**Summary.** *Background:* We investigated whether a minimal dose of FK506 is sufficient to inhibit the rejection of venous allografts and facilitate allograft adaptation to arterialisation in rats.

*Methods:* Iliolumbar veins from Brown Norway (BN) rats were transplanted into the abdominal aorta of Lewis (LEW) rats. Recipient animals received daily intramuscular injections of 0.1 mg kg<sup>-1</sup> FK506. Light microscope evaluations of grafts were performed 30 days after transplantation. We investigated the presence of endothelial cells, the intensity of intimal proliferation, the deposition of immunoglobulin G molecules into the medial layer and the degree of adventitial infiltration by Lewis MHC class II-positive, CD4-positive and CD8-positive cells. All results were compared to previously reported data for syngeneic, allogeneic non-immunosuppressed and allogeneic FK506-low-dose immunosuppressed animals.

*Results:* All allografts under minimal FK506 immunosuppression showed typical histological signs of arterialisation 30 days after transplantation. Intimal thickness (15.1 ± 6.1 μm) and the degree of adventitial infiltration by MHC class II-positive (16.96 ± 10.46), CD8-positive (2.63 ± 2.6) and CD4-positive (7.67 ± 8.29) cells were not significantly different when compared to untreated syngeneic veins and allogeneic veins treated with a low dose of FK506, respectively.

*Conclusions:* Even the minimal dose of FK506 was sufficient to inhibit the acute rejection of venous allografts and facilitate allograft arterialisation 30 days after transplantation.

**Keywords:** Allograft, veins, tacrolimus, FK506, rats.

### Introduction

The autogenous greater saphenous vein is the material of choice for peripheral vascular reconstruction in patients suffering from severe forms of peripheral arterial occlusive disease. In some cases, when prosthetic grafts are not recommended, allogeneic veins are used for limb-salvaging peripheral vascular reconstruction. This occurs mainly in patients with gangrene and a high risk of infection or in patients with poor run-off [1]. To lower the high rate of thrombosis, which is enhanced by rejection, immunosuppressive treatment has been administered to patients with venous allografts in some centres [2, 3]. Cyclosporine A, a calcineurin inhibitor, is most frequently used for immunosuppression [2, 4, 5]. In our previous experimental work, we confirmed that immunosuppressive therapy is required for venous allograft adaptation to arterialisation in rats. In that study, we used FK506, a calcineurin inhibitor that is newer and more efficient than cyclosporine A. Moreover, we recently published the first clinical experiments with FK506 in patients subjected to peripheral allogenous reconstruction. The majority of these patients had an FK506 blood level of approximately 5 ng ml<sup>-1</sup> [3].

However, patients indicated for vascular reconstruction with venous allografts often suffer from pathologies that can be amplified by calcineurin inhibitors, such as cardiovascular diseases [2, 3]. The goal in these situations is to control the venous allograft rejection with the minimal effective dose.

In our previous experimental work, we have proven that FK506 at a daily dose of 0.2 mg kg<sup>-1</sup> and a mean blood level of 5.0 ng ml<sup>-1</sup> was sufficient to inhibit the acute rejection of arterial allografts in rats [6]. The same immunosuppression protocol was used thereafter in experiments involving venous allograft transplantation. In that study, 3 groups of rats were studied. Group A comprised rats that had received isogeneic venous transplants. Group B and C comprised rats that had received allogeneic venous transplants. Animals in Group

Correspondence: Marín Varga, MD, Transplant Surgery Department, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958/9, 140 21 Prague, Czech Republic.  
Fax: +420-2-6136-2822  
E-mail: mavg@medicon.cz

C were immunosuppressed by a low dose of FK506 (0.2 mg kg<sup>-1</sup> daily). The process of adaptation to arterial pressure led to the development of subendothelial neointima hyperplasia and the formation of multiple smooth muscle layers in tunica media, with little or no infiltration of the tunica adventitia by host MHC class II, CD4-positive and CD8-positive cells in Group A (isogenic) or in Group C (allogenic immunosuppressed). However, the absence of immunosuppression in Group B (allogenic non-immunosuppressed) resulted in the destruction of the intima and disorganisation of the venous wall structure with no histological signs of arterialisation [7].

The main difference in the histological structure between venous and arterial grafts lies in the medial layer. The arterial tunica media is quite thick and is composed of a uniform population of well-differentiated smooth muscle cells. In contrast, the venous medial layer is composed only of a few layers of smooth muscle cells. This low amount of antigenic material in the allovenous wall could theoretically enable the administration of FK506 at lower doses than those required for arterial allografts.

The aim of our experiment was to expand on our previous work by studying whether the minimal dose of FK506 is sufficient to suppress acute rejection in venous allografts and facilitate the arterialisation process. The rejection-related changes in the allovenous wall upon transplantation of Brown Norway iliofemoral veins into the infrarenal aorta of Lewis rats were studied after a 30-day follow-up period.

## Materials and methods

### Animals

Male Lewis rats (LEW) (RT1<sup>l</sup>) weighing 314 ± 15 g (*N* = 8) were used as recipients, and male Brown Norway rats (BN) (RT1<sup>n</sup>) weighing 248 ± 5 g (*N* = 4) were used as donors of allogeneic iliofemoral vein grafts. Animals were obtained from Charles River, Germany. Each transplanted animal was housed in a separate cage for the entire 30-day follow-up period. The basic principles of laboratory animal care were followed, and all applicable national laws were observed during the study. Approval from the local ethical committee was obtained for this study.

### Operative procedures

The operative procedure was the same as that used in our previous venous allograft arterialisation experiment [7]. Briefly, donor animals were anaesthetised by intramuscular injection of ketamine (Narkamon<sup>®</sup>, SPOFA a.s., Prague, Czech Republic) at 100 mg/kg and xylazine (Rometar<sup>®</sup>, SPOFA a.s., Prague, Czech Republic) at 10 mg/kg. Two segments of the iliofemoral veins (1–1.5 cm in length) were excised and stored in saline solution at room temperature until transplantation. The mean ischemic time for the vein grafts was 192 ± 76 minutes.

The recipient animals with planned follow-up were anaesthetised with less invasive anaesthesia (intramuscular injection of 20 µg/kg sufentanil and 1 mg/kg aza-

perone; Stresnil<sup>®</sup>, Janssen Pharmaceutica Inc., Beerse, Belgium) to ensure a more natural awakening.

The venous allografts were implanted into the infrarenal aorta of the recipient rats after a midline laparotomy using a running 10/0 monofilament suture (Ethicon Inc., Somerville, New Jersey, USA).

Neither anti-coagulants nor anti-platelet drugs were used in the experiment.

### Animal groups

All of the results obtained in this minimal-dose experiment pertain to Group D and have been compared to the results for Groups A, B and C obtained in a previous venous-allograft-arterialisation experiment [7]. Briefly, Group A comprised rats that received isogenic venous transplants (LEW to LEW, *N* = 8), and Group B comprised rats that received allogeneic venous transplants (BN to LEW, *N* = 10). Neither group received immunosuppressive therapy. Animals in Group C received allogeneic venous transplants (BN to LEW, *N* = 8) and received low-dose FK506 immunosuppressive therapy (0.2 mg kg<sup>-1</sup> daily).

### Immunosuppressive therapy

Animals in the FK506-minimal-dose group (Group D) received intramuscular injections of FK506 suspended in saline solution (Prograf<sup>®</sup>, Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japan) at daily doses of 0.1 mg kg<sup>-1</sup>. Immunosuppression was initiated on day 1 after transplantation and was administered for the entire 30-day follow-up period.

On day 30, FK506 blood levels were evaluated using an enzyme-enhanced immunoassay technique (Emit<sup>®</sup> 2000 Tacrolimus assay, Dade Behring Inc., Deerfield, Illinois, USA), and the venous grafts were removed after a midline re-laparotomy and processed for histology and immunohistochemistry. The animals were then euthanised by the intracaval administration of a lethal dose of thiopental (Thiopental<sup>®</sup>, SPOFA a.s., Prague, Czech Rep).

### Histology and immunohistochemistry

Histologic and immunohistochemical analyses of venous allografts in Group D were performed according to the same methods described for a previous venous-allograft-arterialisation experiment [7]. Briefly, after harvesting, the venous allografts were placed in Sakura Finetek Tissue Tek<sup>®</sup> Cryomold holders (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) and embedded in Sakura Finetek Tissue Tek<sup>®</sup> O.C.T. compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan). The samples were subsequently frozen in 2-methylbutane (Fluka Chemika, Buchs, Switzerland) and then cooled by liquid nitrogen and stored at -80 °C until processing.

### Histologic analysis

Digital image analysis was used to quantify intimal hyperplasia, as described previously [7]. Briefly, frozen cross sections (5 µm) from the midportion of the

allograft were stained with hematoxylin/eosin and Elastic-Van Gieson stain. Each section was photographed with an Olympus Cammedia C-5050 digital camera (Olympus, Hamburg, Germany) and analysed with Olympus DP-Soft Version 3.2 software. Measurements of intimal thickness (from the endothelial surface to the inner border of the tunica media) were made in up to 10 locations in each section in blinded fashion. The mean value and standard deviation (mean  $\pm$ SD) were calculated for each allograft.

#### Immunohistochemical analysis

##### Detection of CD4-positive cells, CD8-positive cells and von Willebrand factor

Immunohistochemistry was performed on 8- $\mu$ m-thick sections in a two-step indirect method, as described previously [7]. Briefly, after 10-min fixation in cold acetone and rinsing in phosphate-buffered saline containing 0.2% Triton X-100, the sections were incubated with a primary antibody (anti-CD4, W3/25, Cymbus Biotechnology LTD, Hampshire, UK; anti-CD8, OX-8, Cymbus Biotechnology LTD, Hampshire, UK; or anti-von Willebrand factor, Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) for 60 min. Sections were incubated in 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 70% methanol for 30 min to block endogenous peroxidase activity. The sections were then incubated with a secondary antibody (Histofine<sup>®</sup> Simple Stain Rat MAX PO, Nichirei, Japan) for 30 min and subsequently incubated with the Dako Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) for 5 minutes. Finally, the specimens were counterstained, dipped in Entellan<sup>®</sup> (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and scored in a blinded fashion. Cells were counted in five locations at 1000x magnification. Cellularity was defined as the mean number of cells counted.

##### Detection of Lewis MHC class II-positive cells

Immunohistochemistry was performed on 8- $\mu$ m-thick sections with a three-step indirect method, as described previously [7]. Briefly, after 10-min fixation in cold acetone and rinsing in phosphate-buffered saline containing 0.2% Triton X-100, endogenous biotin was blocked with a biotin blocking system (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark). After incubation in 10% horse serum to prevent non-specific binding, a primary anti-RT1.B<sup>u</sup> antibody (MRC-OX3, Cedarlane Laboratories Ltd., Burlington, Ontario, Canada) was applied for 60 min. Endogenous peroxidase was blocked by treatment with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 70% methanol for 30 minutes. The specimen was then incubated with a secondary biotinylated horse anti-mouse antibody (Vector Lab, Burlingame, California, USA), followed by incubation with R.T.U. Vectastain Elite ABC Reagent (Vector Lab, Burlingame, California, USA) and a 5-min incubation with Dako Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark). Finally, the specimens were counterstained and dipped in Entellan<sup>®</sup> (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

#### Detection of immunoglobulins

Immunohistochemistry was performed on 8- $\mu$ m-thick sections with a direct method. Briefly, sections were rinsed in phosphate-buffered saline and air-dried. The tissues were then incubated with a fluorescein isothiocyanate-conjugated antibody (Chemicon International Inc., Temecula, California, USA) for 30 min. The specimens were then dipped in glycerine medium and immediately analysed by fluorescence microscopy.

#### Statistical analysis

Comparisons of intimal thicknesses and numbers of lymphocytes and Lewis MHC class II -positive cells in the FK506-minimal-dose Group D and all other groups were performed with analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey HSD multiple comparisons test. *P* values less than 0.05 were considered significant. The values in the text and tables are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD).

#### Results

The basic characteristics of the FK506-minimal-dose Group D (mean cold ischaemic time, 192  $\pm$  76 min; duration of operation, 96  $\pm$  6 min; aortal clamp duration, 66  $\pm$  6 min) were not significantly different from those in Groups A, B or C [7].

#### Animals

Two animals in the FK506-minimal-dose Group D died during the experiment due to anaesthetic overdose.

A weight increase after the operation was observed in all animals. This increase was not significantly different from the weight gain of animals in the FK506-low-dose Group C [7].

#### Immunosuppression

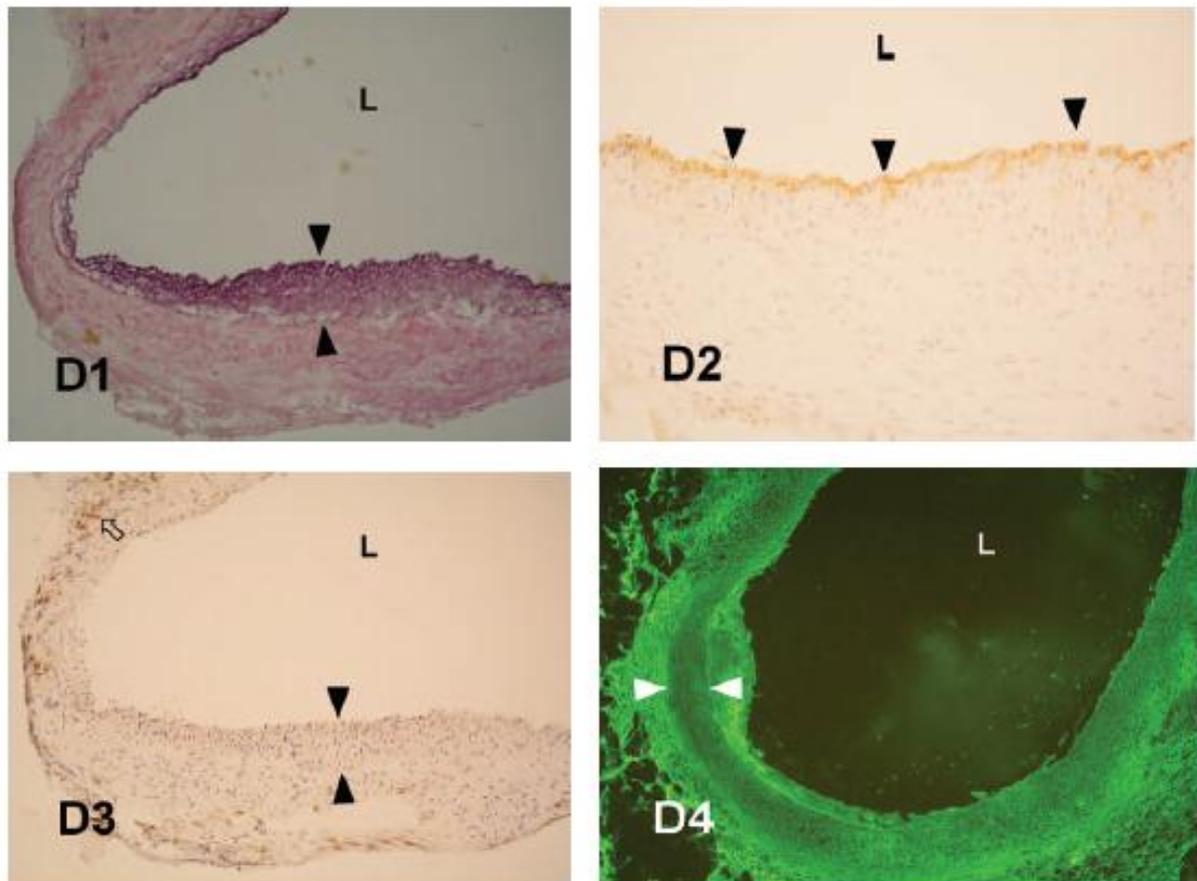
The mean blood level of FK506 measured on day 30 after transplantation was 3.20  $\pm$  0.66 ng ml<sup>-1</sup>. This level was statistically lower (*p* < 0.001) than that measured in the FK506-low-dose Group C (5.57  $\pm$  0.96 ng ml<sup>-1</sup>). Diarrhoea was observed as an adverse effect of the FK506 administration in three out of six experimental animals.

#### Graft patency

No venous graft thromboses or occlusions were observed in any animal in the FK506-minimal-dose Group D on day 30 after transplantation.

#### Tunica intima

The luminal surfaces of all venous allografts under minimal FK506 immunosuppression were covered by a monolayer of endothelial cells on day 30 after the transplant (Fig. 1). In all allografts, the development



**Fig. 1:** D1 – Vein stained with Elastica-Van Gieson. Magnification = 100x. The neointimal layer is marked with black arrows. D2 – Vein stained for von Willebrand factor-positive cells. Magnification = 200x. The von Willebrand-positive endothelial monolayer is marked with black arrows. D3 – Vein immunohistochemically stained to identify Lewis MHC class II-positive cells. Magnification = 100x. The neointimal layer is marked with black arrows; positive cells are marked with transparent arrows. D4 – Vein stained for immunoglobulins with a fluorescein isothiocyanate-conjugated antibody. Magnification = 100x. The layer of smooth muscle cells in the tunica media is marked with white arrows. Representative light microscopic histological features of rat aortae under minimal FK506 immunosuppression obtained at 30 days following transplantation into the infrarenal abdominal aorta. The inhibition of the host immune response by even the minimal dose of FK506 was sufficient to facilitate arteriaisation in allogeneic venous grafts. The arteriaisation of venous allografts was represented by the following: 1 – intimal hyperplasia (D1); 2 – endothelialisation of luminal surface (D2); 3 – low adventitial infiltration by Lewis MHC class II-positive cells (D3) and 4 – formation of multiple smooth muscle layers in the tunica media with no signs of immunoglobulin G deposition (D4). L – Lumen

of the subendothelial neointimal hyperplasia was observed during this period (Fig. 1). The intimal thickness in the FK506-minimal-dose Group D ( $15.1 \pm 6.1 \mu\text{m}$ ) did not differ significantly from that in syngeneic Group A ( $12.7 \pm 7.0 \mu\text{m}$ ) or that in FK506-low-dose Group C ( $15.0 \pm 8.4 \mu\text{m}$ ).

#### *Tunica media*

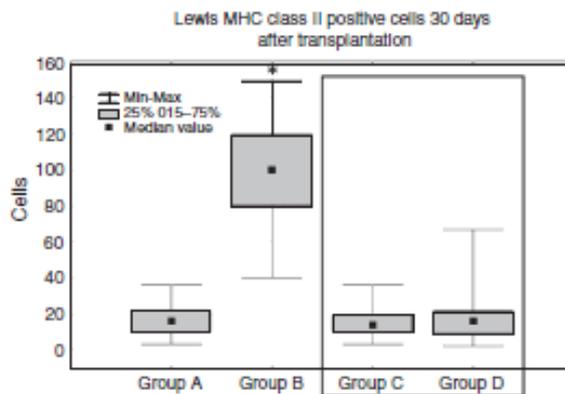
The process of adaptation to arterial pressure during the 30-day follow-up period allowed the formation of multiple smooth muscle layers in all aortae under minimal FK506 immunosuppression. Moreover, minimal or no infiltration of host MHC class II-positive, CD4-positive or CD8-positive cells was observed in the medial layer of these venous allografts. In addition, the histological features of the aortae in FK506-minimal-dose Group D were identical to those observed in the

FK506-low-dose allogeneic venous grafts of Group C, as well as the syngeneic venous grafts of Group A.

Immunofluorescent staining revealed no IgG deposition in the medial layer of any experimental animal under minimal FK506 immunosuppression (Fig. 1). This feature was also observed in venous allografts under low FK506 immunosuppression (Group C) and in non-immunosuppressed allografts (Group B).

#### *Tunica adventitia*

The degree of adventitial infiltration by CD8-positive and Lewis MHC class II-positive cells in venous allografts under minimal FK506 immunosuppression was statistically similar to that in aortae under low FK506 immunosuppression (Group C) and that in syngeneic veins (Group A) (Fig. 2). The CD4-positive cellular infiltration in both immunosuppressed groups (Group D and Group



**Fig. 2:** The degree of adventitial infiltration by Lewis MHC class II-positive cells in Brown Norway allografts (transplanted into LEW rats) under minimal FK506 immunosuppression (Group D) was statistically similar to the adventitial infiltration in Brown Norway allografts under low FK506 immunosuppression (Group C) and in syngeneic veins (Group A). The total number of Lewis MHC class II-positive cells in non-immunosuppressed Brown Norway allografts (Group B) was significantly higher ( $P < 0.001$ ) than that of either immunosuppressed group (C, D)

C) was even lower than that in the isogenic control (Group A) (Table 1).

## Discussion

The results presented here reveal that a minimal dose of FK506 for immunosuppression was sufficient to facilitate wall remodelling in venous allografts after their implantation into the arterial system. The acute rejection of the allograft wall in animals that received no immunosuppressive therapy resulted in the destruction of the intima and disorganisation of the entire venous wall structure, with no signs of arteriosclerosis.

The optimal dose of FK506 in a rat arterial transplantation model was studied by Azuma et al. [8]. These

authors confirmed that a dose of  $0.2 \text{ mg kg}^{-1}$  per day was sufficient to suppress immune response, even intimal hyperplasia, without major adverse effects, and that the long-term administration of FK506 at the same dosage was essential for preventing immunological reaction. Moreover, in our own experiments, we found that this dosage of FK506 was sufficient to suppress acute arterial rejection, even when administration began on day 7 after transplantation [6].

Vein arteriosclerosis is a complex biological process involving venous wall cellular components that leads to several typical anatomical features: intimal hyperplasia, circumferential medial thickening with well-organised concentric layers of smooth muscle cells and adventitial neovascularisation [9–11]. We believe that the suppression of the host immune response in the early post-transplantation phase by a minimal dose of FK506 allows the preservation of allograft smooth muscle cells. The presence and subsequent proliferation of these smooth muscle cells contributed to an increase in vascular wall thickness and mass, typical features of venous arteriosclerosis observed under syngeneic conditions [6, 9].

In the non-immunosuppressed condition, allograft smooth muscle cells in the transplanted veins were destroyed by the massive infiltration of immunocompetent cells and were not able to proliferate or adapt to the new biomechanical conditions in the arterial system [7].

Animal studies in rats [12], dogs [13] and swine [14] have clearly demonstrated that venous allografts are as antigenic as any other allograft tissue. Stevens et al. [14] have shown that the development of donor-specific alloantibodies by the host precedes venous allograft occlusion. Moreover, both graft patency and the development of alloantibodies are directly influenced by MHC compatibility. In other experimental studies in dogs, MHC compatibility prolonged the patency of venous allografts but was not able to prevent their late failure [15].

In small-calibre allografts, the destruction of the venous wall leads to thrombosis and occlusion [16]. In a canine model, the interposition of the inferior caval vein

**Tab. 1: The adventitial infiltration of rat iliofemoral allografts by immunocompetent cells 30 days after their transplantation into the abdominal aorta**

Group	Characteristic	IS	Tunica adventitia*		
			CD4+ cells	CD8+ cells	LEW MHC class II+ cells†
A	LEW to LEW	No	12.48 ± 7.66	0.76 ± 1.66	16.60 ± 7.45
B	BN to LEW	No	42.69 ± 19.96	24.11 ± 13.99	99.96 ± 24.88
C	BN to LEW	FK506 $0.2 \text{ mg kg}^{-1}$	5.80 ± 4.63	1.78 ± 2.60	14.61 ± 6.20
D	BN to LEW	FK506 $0.1 \text{ mg kg}^{-1}$	7.67 ± 8.29	2.63 ± 2.6	16.96 ± 10.46

The extent of adventitial infiltration under minimal FK506 immunosuppression (Group D) was not significantly different from that under low FK506 immunosuppression (Group C).

\*Numbers of Lewis anti-MHC class II, CD8- and CD4-positive cells observed under one eyepiece at original magnification (1000x).

†Major histocompatibility complex class II positive cells of Lewis origin.

IS = immunosuppression, LEW = male Lewis rats, BN = male Brown Norway rats

to the abdominal aorta led to the rejection and subsequent aneurysmal dilatation of transplanted veins during a 30-day follow-up period [17]. In our rat model, we observed no aneurysmal dilatation of non-suppressed alloveins 30 days after transplantation. However, this phenomenon might be observed after a longer follow-up period.

Since the beginning of the 1970s, different protocols for immunosuppression have been used to inhibit the host immune reaction and to increase the patency rates of venous allografts [18]. Neither methylprednisolone nor azathioprine, even in combination with prednisone (at 5 mg kg<sup>-1</sup> per day and 2.5 mg kg<sup>-1</sup> per day, respectively), was able to inhibit the host immune response and prolong allograft patency rates in a canine model of venous allotransplantation [16, 19, 20]. Cyclosporine A (CyA) was first used as an immunosuppressant in a canine jugular vein-to-carotid artery allotransplantation model by Bandlien et al. in 1983 [21]. CyA at 20 mg kg<sup>-1</sup> per day increased the patency rate at 3 months to 80%, a significant improvement over azathioprine, which had a 0% patency rate within the same time interval. However, in other canine studies, only a combination of CyA and mycophenolate mofetil was sufficient to achieve a 100% patency rate at 20 weeks after implantation [15]. In a canine model of inferior caval allovein arterialisation, CyA at 20 mg kg<sup>-1</sup> per day reduced aneurysmal dilatation 30 days after transplantation [17]. In other experimental works, the discontinuation of CyA treatment led to the occlusion of venous allografts within 30 days [19].

It has been demonstrated that CyA can induce endothelial cell injury, and it can also stimulate arterial wall fibrosis by triggering the production of TGF- $\beta$  (transforming growth factor-beta) [22, 23]. Moreover, a high dose of CyA [17], or even a combination of CyA and other immunosuppressive [15] or antiplatelet drugs [24], was shown to be required to inhibit rejection in the allovenous wall. None of these properties is particularly encouraging for long-term use in polymorbid vascular patients.

The immunosuppressive drug FK506 was shown to be more potent than CyA in our model of histocompatible venous allotransplantation [25]. A mean blood level of only 3.2 ng ml<sup>-1</sup> FK506 was sufficient to suppress the infiltration of the allovenous wall by CD8-positive and CD4-positive cells. This led to the inhibition of the T-cell-mediated destruction of the rat allovenous wall in our model.

In conclusion, the present study showed that even the minimal dose of FK506 was sufficient to suppress the rejection of the allovenous wall in rats. The inhibition of the host immune system allowed the wall remodelling process to occur in arterialised venous allografts. We suggest that the principal effects of FK506 under these conditions were the suppression of immunocompetent cell infiltration and the suppression of the cell-mediated response to venous alloantigens, which prevented vascular smooth muscle cell depletion. Minimal FK506 immunosuppression could potentially increase the patency rates of venous allografts in elderly vascular patients undergoing clinical venous allotransplantation by inhibiting immune-mediated venous wall destruction

while minimising the side effects of chronic immunosuppression.

## Funding

This work was supported by Grant No. MZO 00023001 awarded by the Czech Republic Ministry of Health.

## Conflict of interest

M. V., I. M., A. L., and M. A. declare that there is no conflict of interest. ■ Au: Please check ■

## References

- [1] TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). Management of peripheral arterial disease (PAD). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;19(Suppl A):S1-xxvii, S1-250.
- [2] Randon C, Jacobs B, De Ryck F, Beele H, Vermassen F. Fifteen years of infrapopliteal arterial reconstructions with cryopreserved venous allografts for limb salvage. *J Vasc Surg* 2010;51:869-77.
- [3] 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;34:424-31.
- [4] Brockbank KG, McNally RT, Walsh KA. Cryopreserved vein transplantation. *J Card Surg* 1992;7:170-6.
- [5] Posner MP, Makhoul RG, Altman M, Kimball P, Cohen N, Sobel M, et al. Early results of infrageniculate arterial reconstruction using cryopreserved homograft saphenous conduit (CADVEIN) and combination low-dose systemic immunosuppression. *J Am Coll Surg* 1996;183:208-16.
- [6] 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.
- [7] Matia I, Varga M, Lodererova A, Adamec M. The positive effect of immunosuppression on adaptation of venous allografts to arterialisation in rats. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2010;39:478-84.
- [8] Azuma N, Sasajima T, Kubo Y. Immunosuppression with FK506 in rat arterial allografts: fate of allogeneic endothelial cells. *J Vasc Surg* 1999;29:694-702.
- [9] Kwei S, Stavrakis G, Takahas M, Taylor G, Folkman MJ, Gimbrome MA Jr, et al. Early adaptive responses of the vascular wall during venous arterialization in mice. *Am J Pathol* 2004;164:81-9.
- [10] Westerband A, Crouse D, Richter LC, Aguirre ML, Wixon CC, James DC, et al. Vein adaptation to arterialization in an experimental model. *J Vasc Surg* 2001;33:561-9.
- [11] Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med* 1994;330:1431-8.
- [12] Axthelm SC, Porter JM, Strickland S, Baur GM. Antigenicity of venous allografts. *Ann Surg* 1979;189:290-3.
- [13] Wagner E, Roy R, Marois Y, Douville Y, Guidoin R. Posttransplant antibodies and fresh venous allograft failure in dogs. *Transplantation* 1994;58:537-42.
- [14] Stevens SL, Tyler JD, Freeman MB, Hopkins F, Lewis T, Bray J, et al. Factors affecting patency of venous allografts in miniature swine. *J Vasc Surg* 1990;12:361-6.
- [15] Wagner E, Roy R, Marois Y, Douville Y, Guidoin R. Fresh venous allografts in peripheral arterial reconstruction in dogs. Effects of histocompatibility and of short-term immunosuppression with cyclosporine A and mycophenolate mofetil. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:1732-44.
- [16] Carpenter EW, Lindenauer SM. Immunosuppression in arterial and venous allografts. *Arch Surg* 1973;106:77-8.
- [17] Mingoli A, Edwards JD, Feldhaus RJ, Hunter WJ 3rd, Naspetti R, Cavallari N, et al. Fresh vein allograft survival in dogs after cyclosporine treatment. *J Surg Res* 1996;62:95-102.
- [18] Perloff LJ, Beckard CR, Rowlands DT Jr, Barker CF. The venous homograft: an immunological question. *Surgery* 1972;72:961-70.

- [19] Vermassen F, Degrieck N, De Kock I, Goubeau J, Van Landuyt K, Noens L, et al. Immunosuppressive treatment of venous allografts. *Eur J Vasc Surg* 1991;5:669–75.
- [20] Ricotta JJ, Collins GJ Jr, Rich NM, Reynolds DG. Failure of immunosuppression to prolong venous allograft survival. *Arch Surg* 1980;115:99–101.
- [21] Bandlien KO, Toledo-Pereyra LH, MacKenzie GH, Choudhury SP, Cortez JA. Immunosuppression with cyclosporine. A new approach to improve patency of venous allografts. *Arch Surg* 1983;118:29–33.
- [22] Zoja C, Furci I, Ghilardi F, Zilio P, Benigni A, Remuzzi G. Cyclosporin-induced endothelial cell injury. *Lab Invest* 1986;55:455–62.
- [23] Khanna A, Kapur S, Sharma V, Li B, Suthanthiran M. In vivo hyperexpression of transforming growth factor-beta1 in mice: stimulation by cyclosporine. *Transplantation* 1997;63:1037–9.
- [24] Miller VM, Bergman RT, Gloviczki P, Brockbank KG. Cryopreserved venous allografts: effects of immunosuppression and antiplatelet therapy on patency and function. *J Vasc Surg* 1993;18:216–26.
- [25] Vincenti F, Jensik SC, Filo RS, Miller J, Pirsch J. A long-term comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine in kidney transplantation: evidence for improved allograft survival at five years. *Transplantation* 2002;73:775–82.

**AORTOILIAC RECONSTRUCTION WITH ALLOGRAFT AND  
KIDNEY TRANSPLANTATION AS A ONE-STAGE PROCEDURE:  
LONG TERM RESULTS**

*Matia, I., Adamec, M., Varga, M., Janoušek, L., Lipár, K., Viklický, O.*

**EUROPEAN JOURNAL OF VASCULAR AND ENDOVASCULAR SURGERY**

2008, vol. 35, no. 3, p. 353-357. ISSN 1078-5884.

## Aortoiliac Reconstruction with Allograft and Kidney Transplantation as a One-stage Procedure: Long Term Results

I. Matia,<sup>1\*</sup> M. Adamec,<sup>1</sup> M. Varga,<sup>1</sup> L. Janousek,<sup>1</sup> K. Lipar<sup>1</sup> and O. Viklicky<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Transplant Surgery, and <sup>2</sup>Department of Nephrology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

**Objectives.** An increasing number of aortoiliac lesions and abdominal aortic aneurysms occur in renal failure patients waiting for renal transplantation. The aim of our study was to assess long term results of simultaneous renal transplantation and surgical repair of aortoiliac lesions with arterial allografts.

**Design.** A retrospective observational study.

**Patients and methods.** From October 1997 to June 2007, we performed simultaneous aortoiliac reconstructions using fresh arterial allografts and kidney transplantation in 14 patients with chronic renal failure (men 9, women 5, mean age 53 years). The indication for vascular reconstruction was an asymptomatic abdominal aneurysm in 6 patients or aortoiliac stenosis/occlusion in 8 patients. The median follow up period for the cohort was 55.5 months (range from 1 to 116 months).

**Results.** Three patients died during the follow up period. In none of them there was an allograft (neither arterial nor renal) related death. No signs of arterial grafts infection or aneurysmal formation and no need for secondary intervention (angioplasty and/or thrombolysis) of any arterial reconstruction was observed during the follow up period in any patient. The renal grafts failed in three patients.

**Conclusions.** Our experience suggests that it is possible and safe to use arterial allografts in the treatment of arterial occlusive disease or abdominal aortic aneurysm simultaneously with renal transplantation.

© 2007 European Society for Vascular Surgery. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Aortoiliac reconstruction; Kidney transplantation; Arterial transplantation; Arterial allografts; Abdominal aortic aneurysm; Aortic allograft.

### Introduction

Improvements in the care of patients with end stage kidney disease have resulted in increased number of patients waiting for renal transplantation.<sup>1</sup> Haemodialysis and chronic renal failure are associated with hypertension and lipid disorders that predispose to accelerated atherosclerosis and many of potential recipients suffer from aortoiliac atherosclerosis or abdominal aortic aneurysms (AAA).<sup>2</sup> The age and number of comorbidities of renal recipients is increasing as well. Transplant surgeons therefore face a more frequent need for vascular intervention prior to or simultaneously with the transplantation.<sup>1</sup>

There are few reports of simultaneous aortoiliac vascular reconstruction and kidney transplantation.<sup>3–9</sup> In all patients included, the vascular prosthesis were used as conduits for arterial reconstruction with varied success.

In our retrospective observational single-center study we report the long term results of simultaneous renal transplantation and aortoiliac reconstruction using fresh arterial allografts obtained from the same donor.

### Patients and Methods

The study was approved by our local ethical committee.

#### Patient population

From October 1997 to June 2007 1800 adult kidney transplantations were performed at our Department. In 14 renal graft recipients (0.7% of all kidney

\*Corresponding author. I. Matia, MD, Department of Transplant Surgery, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958/9, 140 21 Prague, Czech Republic.  
E-mail address: [ivmi@medicon.cz](mailto:ivmi@medicon.cz)

transplantations) we simultaneously used fresh arterial grafts as vascular conduits for aortoiliac reconstructions. The mean age of patients, comprising 9 males and 5 females was 53 years (range 32 to 67 years). The median follow up period was 55.5 months (range 1 to 116 months).

Three patients (21%) in this group had a previous history of at least one unsuccessful renal transplantation with subsequent graftectomy. The aetiology of the renal failure included renal arteries occlusion in 3 cases (21%), chronic pyelonephritis in 2 cases (14%), glomerulonephritis in 2 cases (14%), vascular nephrosclerosis in 2 cases (14%), renal polycystosis in 2 cases (14%), diabetic nephropathy in 1 case (7%), tubulointerstitial nephritis in 1 case (7%), and bilateral nephrectomy due to Grawitz tumour in 1 case (7%). Of the renal recipients, 12 (86%) were current or past smokers, 7 (50%) had ischaemic heart disease, and 2 (14%) had diabetes.

In thirteen (93%) of the presented patients simultaneous aortoiliac reconstruction and renal transplantation was electively planned. The aortoiliac lesions were preoperatively verified by angiography (conventional or computed) and patients were put on a special waiting list for renal transplant candidates.

An asymptomatic AAA was present in 6 cases (46%). The median diameter of aneurysms was 53 mm (range 45 to 65 mm). Three patients were operated in the period before the endovascular treatment of AAA was introduced at our Institute. Two were not suitable for an endovascular procedure due to tortuosity of the iliac vessels. One patient was operated on 16 months after unsuccessful stentgraft implantation due to significant iliac occlusive disease.

Four patients (31%) with claudication presented with bilateral iliac occlusions or stenoses not suitable for endovascular treatment. All were selected for simultaneous aortobiiliac reconstruction and renal transplantation.

One patient (8%) with unilateral claudications due to iliac occlusion and one patient (8%) with toe gangrene due to prosthetic aortofemoral bypass occlusion were selected for simultaneous aortofemoral bypass and kidney transplantation. The renal artery was anastomosed to the arterial allograft in both cases.

One patient (8%) who had received two failed renal transplantations and also presented with a iliac occlusion was selected for iliofemoral bypass to provide a good blood supply for the renal graft transplanted simultaneously.

An acute iliac artery resection and replacement due to dissection during renal transplantation was performed in one (7%) of fourteen presented patients. The iliac allograft obtained from the same donor as

renal and liver grafts was used for the arterial substitution. The iliofemoral grafts are obtained regularly with liver but not renal grafts at our Institute.

#### *Harvest and preservation of arterial grafts*

All arterial and renal grafts were obtained from donors with the diagnosis of cerebral death in the course of a multiorgan harvest. The mean age of donors (14 males) was 31.5 years (range 15 to 44 years). Renal and arterial grafts obtained from one donor were both used in a single recipient.

After removal the arterial grafts were flushed with conservation solutions used in renal harvest. The grafts were then stored at a temperature of about 4 degrees Centigrade using the same types of solutions as those used for flushing, with no additional antibiotics. The mean cold ischemic time was 12.7 hours (range 5 to 24 hours) for arterial and 14.3 hours (range 7 to 26) for renal grafts, respectively.

The types of arterial allografts obtained during multiorgan harvest and used as conduits for vascular reconstructions are summarized in Table 1.

#### *Immunosuppressive therapy*

The immunosuppressive protocol in patients with the renal and arterial transplantations performed simultaneously did not differ from those used after a simple renal transplantation at our department. In the case of renal graft failure, the immunosuppression was restricted to monotherapy with cyclosporine A or tacrolimus as described previously.<sup>10</sup>

After arterial and renal transplantation patients are carefully monitored by vascular surgeons and

**Table 1.** Types of fresh arterial allografts used for vascular reconstruction and specifications of renal transplantation procedures in 14 patients

No.	Type of fresh arterial allograft (FAG)	Number of renal allograft arteries	Renal allograft arterial anastomosis
1	Aortobiliofemoral	1	FAG
2	Aortobiliofemoral	2	FAG
3	Ilio-femoral	1	FAG
4	Ilio-femoral	1	FAG
5	Aortoiliac	1	FAG
6	Ilio-femoral	1	FAG
7	Thoracic aorta	2	FAG
8	Ilio-femoral	2	FAG
9	Thoracic aorta	1	EIA
10	Thoracic aorta	1	EIA
11	Thoracic aorta	2	EIA
12	Aortobiliofemoral	1	FAG
13	Aortobiliofemoral	1	FAG
14	Ilio-femoral	3	FAG

FAG – fresh arterial allograft, EIA – external iliac artery.

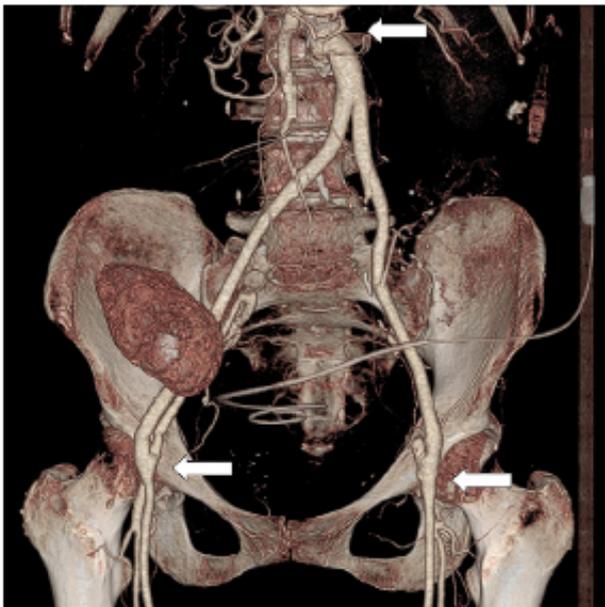
nephrologists during the entire follow up period. The patency of the arterial reconstructions was verified by clinical examinations, ultrasonography and/or angiography (conventional or computed), periodically (Fig. 1). The function of transplanted kidneys and level of immunosuppressive drugs are monitored in accordance with our Institute's standard policy stipulating the level of care to be extended to organ recipients.<sup>10</sup>

#### *Anticoagulants and antithrombotic drugs*

In all but one patient acetylsalicylic acid was used as an antithrombotic drug. In one patient after implantation of an aortic valve prosthesis warfarin was prescribed.

### Results

There were three deaths (21%) during the follow up period. Two patients died one month and 32 months, respectively, after vascular reconstruction and renal transplantation due to gastrointestinal (GIT) hemorrhage.



**Fig. 1.** CT angiography 108 months after simultaneous aortobifemoral bypass with arterial allograft and renal transplantation in to left iliac fossa. The second renal transplantation in to right iliac fossa was performed at 71 months after the primary procedure. No sings of arterial allograft dilatation or stenosis were seen during the all follow up period. Arrows show proximal and distal anastomoses of arterial aortobifemoral allograft. The CT scan is published by permission of Department of Radiology of Institute for Clinical and Experimental Medicine in Prague.

Another one died at 27 months due to intracerebral hemorrhage. One patient was lost to follow up 60 months after operation. There was no arterial or renal allograft related deaths in the presented group of patients.

Three patients (21%) developed a problem with wound healing. In two of them a wound dehiscence required re-suturing and in another one a wound lymph leak was treated conservatively. An ischemic colitis with colon perforation developed in one patient after a simultaneous abdominal aortic aneurysm (AAA) repair and renal transplantation in the early postoperative period. The inferior mesenteric artery was ligated during the AAA resection. A subtotal colectomy was undertaken 8 days after the primary operation. Subsequently, an acute renal graft failure with a short-term need for dialysis developed. The acute rejection was successfully treated. No signs of arterial allograft infection were noticed in this patient during the subsequent follow up period.

No patient developed signs of arterial grafts infection, stenosis or dilatation of implanted allografts and there was no need for secondary interventions (angioplasty and/or thrombolysis) during the follow up period.

One primary renal allograft failure due to acute rejection with consecutive graftectomy occurred in one patient. Renal allografts failed due to chronic rejection in two (14%) other patients 62 and 96 months after transplantation. In one of them a second renal transplantation in the contralateral iliac fossa was performed 71 months after the primary operation. The renal artery was anastomosed to the arterial allograft. This second renal allograft failed after 30 months due to chronic rejection. Ureteral stenosis of transplanted kidney was observed in two patients (14%) during the first 6 months postoperatively. They were both successfully treated by short-term percutaneous nephrostomy.

### Discussion

The most suitable timing for vascular reconstruction of aortoiliac vessels in renal recipients has been controversial since the first successful renal artery anastomosis to a vascular prosthesis was published by Sterioff *et al.* in 1974.<sup>11</sup> The first successful simultaneous aortoiliac prosthetic reconstruction and renal transplantation was published in 1977 by Cerilli *et al.*<sup>3</sup> The main advantages of this one-stage procedure summarised by Wright are: (1) there are no technical difficulties in the dissection due to reoperation; (2) the cost and hospitalisation time are significantly

decreased; (3) the patient incurs only one anaesthetic risk.<sup>5</sup>

However, the risk of prosthesis infection in immunosuppressed patients is still present. The largest series of patients with aortoiliac prosthetic reconstruction and renal transplantation performed as one-stage procedure was recently published.<sup>9</sup> During the four years period a vascular graft was implanted in 11 renal recipients. No infectious complications of the vascular graft were noticed during this follow up period. On the other hand Gouny *et al.*<sup>6</sup> described one patient's death due to prosthetic graft infection secondary to a urinary tract fistula in a group of two patients with implanted bifurcated prosthetic grafts during renal transplantation. A two-stage procedure with intervals from 6 weeks to 3 months was recommended by these authors. A vascular prosthesis infection was described in the work of Pittaluga *et al.* as well.<sup>8</sup> In addition, van der Vliet *et al.*,<sup>7</sup> who evaluated the outcome of renal transplantation with an arterial anastomosis to a vascular prosthesis in 13 patients, regards simultaneous renal transplant and arterial reconstruction as hazardous with relatively poor short- and long term results.

Arterial allografts have been successfully used in the treatment of mycotic aneurysms and infected vascular prostheses for last 20 years.<sup>12,13</sup> Their good resistance to infection was documented in the experimental setting as well.<sup>14,15</sup> No patient in our study develop signs of arterial grafts infection. This finding was despite one patient developing ischemic colitis and colon perforation during the early postoperative period.<sup>16</sup>

The immune response of recipient against antigens in the arterial wall was confirmed in animals as well as in humans studies.<sup>17,18</sup> Aneurysm formation, mural thrombosis, degenerative changes and occlusions have been reported in the intermediate and long term follow up of many patients after early clinical experience with aortic allografts in the 1950s and 1960s.<sup>19–23</sup> No immunosuppression was used in these patients. Kieffer *et al.*<sup>12</sup> published in 2004 the study of fresh and cryopreserved arterial implantation for infrarenal aortic graft infection in 179 patients. There were three allograft-related late deaths from rupture of the allograft and late nonlethal aortic events (occlusion, dilatation, aneurysm) in 10 patients, respectively. The only significant risk factor for late aortic events was use of a thoracic aorta allograft. In addition, there were 63 late, mostly occlusive, iliofemoral events. No immunosuppression was used in these patients. None of late aortic or iliofemoral events mentioned above occurred in our patients. In all cases immunosuppressive therapy was prescribed during the follow up period.

Important factors influencing the quality of fresh arterial allografts are duration of conservation and the type of conservation solution.<sup>24</sup> In the study of Szilagy *et al.* published in 1957<sup>25</sup> the allograft were harvested during donor autopsy with mean time elapsed from death to autopsy of 10.1 hours. The grafts were then stored in Hank's solution for the mean time of 25.8 days. Fresh arterial allografts used by Kieffer *et al.*<sup>12</sup> were obtained from brain dead donors as part of a program to retrieve multiorgan transplant tissue. The grafts were then stored in modified RPMI 1640 Medium with addition of antibiotics and heparin for the mean time of 13.0 days. In our study all arterial allografts were stored in modern conservation solutions (Custodiol, University of Wisconsin, Euro-Collins) used routinely in transplant medicine with no addition of antibiotics and all were transplanted within 24 hours (mean 12.7 hours).

We conclude that renal transplantation and aortoiliac reconstruction with fresh arterial allografts can be undertaken simultaneously as a one stage procedure with satisfactory long term results of both renal and arterial allografts. The good long term patency rates of arterial allografts can be attributed to modern conservative solutions, short cold ischaemic times and particularly the use of effective immunosuppression.

#### Acknowledgement

The work was supported by Grant No. NR/9371 – 3/2007 awarded by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic.

#### References

- 1 PFEIFFER T, SANDMANN W, LUTHER B, BÖHNER H, VOICULESCU A, GRABENSEE B *et al.* Vascular surgery for recipient preparation, improvement of graft quality and acceptability, and therapy of ischemic graft damage in kidney transplantation. *Transplant Proc* 2002;**34**:2219–2221.
- 2 LACOUR B, ROULLET JB, BEYNE P, KRIS H, THEVENIN M, DRÜEKE T. Comparison of several atherogenicity indices by the analysis of serum lipoprotein composition in patients with chronic renal failure with or without haemodialysis, and in renal transplant patients. *J Clin Chem Clin Biochem* 1985;**23**:805–810.
- 3 CERILLI J, EVANS WE, VACCARO PS. Successful simultaneous renal transplantation and abdominal aortic aneurysmectomy. *Arch Surg* 1977;**112**:1218–1219.
- 4 PIQUET P, BERLAND Y, COULANGE C, OLMER M, MERCIER C, RAMPAL M. Aortoiliac reconstruction and renal transplantation: staged or simultaneous. *Ann Vasc Surg* 1989;**3**:251–256.
- 5 WRIGHT JG, TESI RJ, MASSOP DW, HENRY ML, DURHAM JR, FERGUSON RM *et al.* Safety of simultaneous aortic reconstruction and renal transplantation. *Am J Surg* 1991;**162**:126–130.
- 6 GOUNY P, LENOT B, DECAIX B, RONDEAU E, KITZIS M, LACAVE R *et al.* Aortoiliac surgery and kidney transplantation. *Ann Vasc Surg* 1991;**5**:26–31.

- 7 VAN DER VLIET JA, NAAFS DB, VAN BOCKEL JH, KOOTSTRA G, BOLL AP, BARENDREGT WB *et al.* Fate of renal allografts connected to vascular prostheses. *Clin Transplant* 1996;10:199–202.
- 8 PITALUGA P, HASSEN-KHODJA R, CASSUTO-VIGUIER E, BATT M, DECLEMY S, BARSEEL H *et al.* Aortoiliac reconstruction and kidney transplantation: a multicenter study. *Ann Vasc Surg* 1998;12:529–536.
- 9 OZÇELİK A, TRECKMANN J, PAUL A, WITZKE O, SOTIROPOULOS G, NADALIN S *et al.* Results of kidney transplantation with simultaneous implantation of vascular graft. *Transplant Proc* 2007;39:509–510.
- 10 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;32:549–556.
- 11 STERKOFF Jr S, ZACHARY JB, WILLIAMS GM. Dacron vascular grafts in renal transplant patients. *Am J Surg* 1974;127:525–528.
- 12 KIEFFER E, GOMES D, CHICHE L, FLERON MH, KOSKAS F, BAHNIN A. Allograft replacement for infrarenal aortic graft infection: early and late results in 179 patients. *J Vasc Surg* 2004;39:1009–1017.
- 13 CHIESA R, ASTORE D, PICCOLO G, MELISSANO G, JANNELLO A, FRIGERIO D *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;12:457–462.
- 14 LITZLER PY, THOMAS P, DANIELOU E, LUCQ J, JACQUES B, FREBOURG N *et al.* Bacterial resistance of refrigerated and cryopreserved aortic allografts in an experimental virulent infection model. *J Vasc Surg* 1999;29:1090–1096.
- 15 KOSKAS F, GOEAO-BRESSONNIERE O, NICOLAS MH, BACOURT F, KIEFFER E. Arteries from human beings are less infectible by *Staphylococcus aureus* than polytetrafluoroethylene in an aortic dog model. *J Vasc Surg* 1996;23:472–476.
- 16 MATIA I, ADAMEC M, FRONEK J, TOSENOVSKY P, JANOUSEK L, BALAZ P *et al.* Ischaemia of the large intestine following parallel kidney transplantation and the abdominal aortic aneurysm replacement using a fresh arterial graft implant. *Rozhl Chir* 2004;83:121–127.
- 17 PUISSENIER D, NOCHY D, PONCET P, MANDET C, HINGLAIS N, BARETY J *et al.* Sequential immunological targeting of chronic experimental arterial allograft. *Transplantation* 1995;60:414–424.
- 18 MIRELLI M, STELLA A, FAGGIOLI GL, SCOLARI MP, IANNELLI S, FREYRE A *et al.* Immune response following fresh arterial homograft replacement for aortoiliac graft infection. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1999;18:424–429.
- 19 MEADE JW, LINTON RR, DARLING RC, MENENDEZ CV. Arterial homografts. A long-term clinical follow-up. *Arch Surg* 1966;93:392–399.
- 20 TYCE DA, ZERBINO V. Clinical experience with preserved human allografts for vascular reconstruction. *Surgery* 1972;72:260–267.
- 21 KNOX WG, MILLER RE. Long-term appraisal of aortic and arterial homografts implanted in years 1954–1957. *Ann Surg* 1970;172:1076–1078.
- 22 HALPERT B, DEBAKEY ME, JORDAN GL, HENLY WS. The fate of homografts and prostheses of the human aorta. *Surg Gynecol Obstet* 1960;111:659–674.
- 23 SZLAGYI DE, RODRIGUEZ FJ, SMITH RF, ELLIOTT JP. Late fate of arterial allografts. Observations 6 to 15 years after implantation. *Arch Surg* 1970;101:721–733.
- 24 VISCHJAGER M, VAN GULIK TM, PFAFFENDORF M, VAN ZWIETEN PA, VAN MARLE J, KROMHOUT JG *et al.* Morphology and function of dog arterial grafts preserved in UW-solution. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1995;10:431–439.
- 25 SZLAGYI DE, McDONALD RT, SMITH RF, WHITCOMB JG. Biologic fate of human arterial homografts. *Arch Surg* 1957;75:506–529.

Accepted 20 September 2007

Available online 11 December 2007

**KLINICKÉ ZKUŠENOSTI S POUŽITÍM CHLADEM  
KONZERVOVANÝCH ŽILNÍCH A TEPENNÝCH ALLOŠTĚPŮ:  
DLOUHODOBÉ VÝSLEDKY**

*Matia, I., Adamec, M., Janoušek, L., Lipár, K., Marada, T., Klein, D., Baláž, P.,  
Varga, M., Chlupáč, J., Rokošný, S.*

**ROZHLEDY V CHIRURGII**

2010, vol. 89, no. 1, p. 45-54. ISSN 0035-9351.

# Klinické zkušenosti s použitím chladem konzervovaných žilních a tepenných alloštěpů: dlouhodobé výsledky

Matia I., Adamec M., Janoušek L., Lipár K., Marada T., Klein D., Baláž P., Varga M., Chlupáč J., Rokošný S.

Klinika transplantační chirurgie, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha,  
přednosta: prof. MUDr. Miloš Adamec, CSc.

Práce řešena grantem MZO 00023001.

## Souhrn

**Matia I., Adamec M., Janoušek L., Lipár K., Marada T., Klein D., Baláž P., Varga M., Chlupáč J., Rokošný S.: Klinické zkušenosti s použitím chladem konzervovaných žilních a tepenných alloštěpů: dlouhodobé výsledky**

*Úvod:* Cévní alloštěpy rozšiřují možnosti léčby aterosklerotického postižení dolních končetin i možnosti řešení infekcí cévních protéz v cévní chirurgii.

*Cíl:* Zhodnocení výsledků použití cévních alloštěpů v Institutu klinické a experimentální medicíny.

*Materiál a metodika:* V období 10/1997–1/2009 jsme použili 112 cévních alloštěpů (30 tepen, 82 žil) u 104 pacientů. Žilní alloštěpy jsme použili při nepřítomnosti autologního materiálu v léčbě kritické ischemie dolních končetin u 75 pacientů (M/Ž 41/34, věk od 41 do 85 let, medián 66 let), u kterých jsme uskutečnili 82 cévních rekonstrukcí. Tepenné štěpy jsme použili v léčbě infekce aortoiliacích protéz nebo mykotických výdutí břišní aorty u 9 pacientů (M/Ž 8/1, věk od 56 do 77 let, medián 63 let) a v rekonstrukční chirurgii aortoiliacích oblasti u 20 pacientů po orgánové transplantaci (M/Ž 11/9, věk od 32 do 67 let, medián 56 let).

*Výsledky:* Přežívání pacientů po transplantaci žil bylo 92 % a 78 % v 1. resp. 3. roce sledování. Zachráněných končetin bylo 67 % a 53 % v 1. resp. 3. roce sledování. Sekundární průchodnost allovenózních rekonstrukcí byla 48 % a 27 % v 1. resp. 3. roce sledování. Přežívání pacientů po transplantaci tepen bylo 86 % a 69 % v 1. resp. 3. roce sledování. V průběhu sledování jsme nepozorovali uzávěr ani dilataci žádné transplantované tepny.

*Závěr:* Použití žilních a tepenných alloštěpů je v indikovaných případech metoda rozšiřující možnosti cévní chirurgie v oblasti léčby kritické ischemie dolních končetin, závažných infekcí cévních protéz jako i v oblasti transplantací parenchymatozních orgánů.

*Klíčová slova:* žilní allograft – tepenný allograft – imunosuprese – transplantace – infekce protéz

## Summary

**Matia I., Adamec M., Janoušek L., Lipár K., Marada T., Klein D., Baláž P., Varga M., Chlupáč J., Rokošný S.: Clinical Experience with Cold-Preservation of Venous and Arterial Allografts. Long-Term Outcomes**

*Introduction:* Venous and arterial allografts extend the possibilities of peripheral arterial disease as well as vascular prosthesis infections treatment.

*Material and methods:* Between 10/1997 and 1/2009 we used 112 allogeneic vessels (30 arteries, 82 veins) in 104 patients. Venous allografts were used for 82 reconstructions in 75 patients (M/F 41/34, aged 41–85 years, median 66 years) with critical limb ischemia and no suitable autogenous venous material.

Arterial allografts were used in 9 patients (M/F 8/1, aged 56–77 years, median 63 years) with aortoiliac prosthetic infections or mycotic abdominal aortic aneurysms and in 20 transplanted patients (M/F 11/9, aged 32–67 years, median 56 years) with aortoiliac atherosclerotic disease.

*Results:* Patients survival rate after allovenous bypasses was 92% at 1 year and 78% at 3 years. Limb salvage rate was 67% at 1 year and 53% at 3 years. Secondary patency rate was 48% at 1 year and 27% at 3 years.

Patient survival rate after alloarterial bypasses was 86% at 1 year and 69% at 3 years. No signs of arterial grafts aneurysmal formation and no need for secondary intervention of any arterial reconstruction was observed during the follow up period in any patient after alloarterial transplantation.

*Conclusions:* Cold-stored venous and arterial allografts are suitable alternative conduits for limb salvage procedures, vascular prosthesis infections as well as for arterial reconstructions in transplanted patients.

*Key words:* venous allograft – arterial allograft – immunosuppression – transplantation – prosthetic infection

*Rozhl. Chir., 2010, roč. 89, č. 1, s. 45–54.*

## ÚVOD

Propojení cévního a transplantačního programu v Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze umožňuje použití chladem konzervovaných tepenných i žilních alloštěpů ve specifických indikacích rekonstrukční cévní chirurgie.

V prezentované práci jsou hodnoceny výsledky použití žilních alloštěpů k infrainguinální cévní rekonstrukci u pacientů s kritickou ischemií dolních končetin bez vhodného autologního materiálu. Dále jsou prezentovány výsledky použití tepenných alloštěpů při tepenné rekonstrukci v aortoilické oblasti u transplantovaných pacientů a v léčbě infekcí cévních protéz.

Soubor z období od října 1997 do ledna 2009 se skládal ze 112 cévních alloštěpů (30 tepen, 82 žil) použitých u 104 pacientů. Všechny cévní štěpy byly odebrány v průběhu multiorgánového odběru a konzervovány v běžně užívaných roztocích při 4 °C.

## ŽILNÍ ALLOŠTĚPY A INFRAINGUINÁLNÍ REKONSTRUKCE

### Pacienti a metody

Chladem konzervované žilní alloštěpy (N = 82) jsme použili jako materiál k infrainguinální cévní rekonstrukci u 76 kriticky ischemických končetin u 75 pacientů (M/Ž 41/34, věk od 46 do 85 let, medián 66 let). Demografické údaje pacientů uvádíme v tabulce 1.

Indikací k cévní rekonstrukci žilním alloštěpem byly klidové bolesti (23 pacientů, 30 %) nebo tkáňové defekty (52 pacientů, 70 %). Cévní rekonstrukci allogenní ži-

**Tab. 1. Charakteristika skupiny 75 pacientů s kritickou ischemií dolní končetiny řešenou cévní rekonstrukcí s použitím žilních alloštěpů**

**Tab. 1. Characteristics of a group of 75 patients with critical, lower extremity ischemia, managed using vascular reconstruction with venous allografts**

	N	%
Muži	41	55
Ženy	34	45
Medián věku (rozmezí)	66 let (46–85)	
ICHS	40	53
Stav po aortokoronárním BP	22	29
Diabetes mellitus	44	59
Nikotinizmus	42	56
Hypertenze	57	76
Hyperlipidemie	44	59
CHRI	12	16
Cévní rekonstrukce na straně BP	52	70
PTA na straně BP	31	41

**Tab. 2. Místo umístění proximální a distální anastomózy u 82 infrainguinálních rekonstrukcí žilním alloštěpem**

**Tab. 2. The sites of proximal and distal anastomoses in 82 infrainguinal reconstructions using venous allografts**

		%
Přítoková tepna	<i>Arteria iliaca externa</i>	6
	<i>Arteria femoralis communis</i>	73
	<i>Arteria femoralis superficialis</i>	7
	<i>Arteria poplitea proximalis</i>	1
	Protéza – aortofemorální	5
	Protéza – iliofemorální	2,5
	Protéza/VSM – femoropopliteální	5
Výtoková tepna	<i>Arteria profunda femoris</i>	1,2
	<i>Arteria poplitea proximalis</i>	15
	<i>Arteria poplitea distalis</i>	30,4
	<i>Truncus tibiofibularis</i>	2,3
	<i>Arteria tibialis anterior</i>	16
	<i>Arteria tibialis posterior</i>	16
	<i>Arteria fibularis</i>	8,4
	<i>Arteria dorsalis pedis</i>	8,4
	VSM předchozího bypasu	2,3

VSM – vena saphena magna

lou jsme indikovali jako poslední možnost záchrany končetiny u pacientů, kde nebylo možné použít jejich vlastní ipsilaterální věnu safénu magnu (VSM). Nejčastějším důvodem nepřítomnosti VSM bylo její použití k předchozím cévním rekonstrukcím (46 % pacientů).

Nejčastějším typem infrainguinální cévní rekonstrukce v této skupině 82 rekonstrukcí byl femorokrurální bypas (42,7 %). Podrobné charakteristiky jednotlivých typů allovenózních cévních rekonstrukcí uvádíme v tabulce 2.

Pacienty indikované k transplantaci žíly jsme zařadili na čekací listinu. Vyžadovali jsme shodu v krevní skupině ABO systému mezi dárce a příjemcem. HLA typizaci ani cross match jsme u těchto pacientů neprováděli. Žíly jsme získávali v průběhu multiorgánového odběru a uchovávali je v standardních konzervačních roztocích bez antibiotik. Medián věku dárce byl v této skupině pacientů 50 let (rozmezí 18–70 let). Medián času studené ischemie byl v této skupině pacientů 66 hodin (rozmezí 5–312 hodin). Medián času příjemce čekajícího na allogenní žílu po zařazení na čekací listinu byl 13 dní (rozmezí 1–137 dní).

Imunosupresivní terapie nebyla u cévních rekonstrukcí provedených v období do září 2004 (25 rekonstrukcí, 31%) standardizována. Pacienti užívali prednison, azatioprin, cyklosporin A, nebo byli bez imunosuprese.

Od září 2004 jsme začali jako imunosupresi používat takrolimus (57 rekonstrukcí, 69 %). Medián koncentrace takrolimu v době dimise po transplantaci byl 5,5 µg/l (rozmezí 2,0–11,0 µg/l). Imunosuprese byla podávána po celou dobu průchodnosti rekonstrukce.

Typy antiagregační a/nebo antikoagulační léčby u průchodných rekonstrukcí v době dimise (75 z 82 rekonstrukcí, 91,5 %) uvádíme v tabulce 3.

Pacienty v této skupině jsme sledovali v rozsahu 2 týdnů až 74 měsíců (medián 19 měsíců). Doba sledování by-

**Tab. 3. Typy antiagregační nebo/a antikoagulační léčby u 75 infrainguinálních rekonstrukcí žilním alloštěpem průchodných v době dimise**

**Tab. 3. Types of antiaggregation or/and anticoagulation therapy in 75 infrainguinal reconstructions using venous allografts, patent at hospital discharge**

	N	%
Kyselina acetylsalicylová	23	30,6
Ticlopidin	36	48,0
LMWH	3	4,0
Warfarin	6	8,0
Warfarin + kyselina acetylsalicylová	2	2,7
Warfarin + ticlopidin	1	1,3
Clopidogrel	2	2,7
Clopidogrel+ kyselina acetylsalicylová	2	2,7

*LMWH, low molecular weight of heparin*

la vymezená datem operace a datem úmrtí, nebo datem poslední zaručené informace o stavu pacienta. V průběhu sledování jsme u pacientů kontrolovali klinický stav, průchodnost rekonstrukcí (klinicky, ultrasonograficky (USG), počítačovou angiografií (CTA), dále sérové koncentrace imunoprese a renální funkce.

## VÝSLEDKY

### Úmrtí, morbidita a přežívání pacientů

Přežívání pacientů, zachráněné končetiny i průchodnosti rekonstrukcí jsme analyzovali Kaplanovou-Maierovou metodou ( $\pm$  SE).

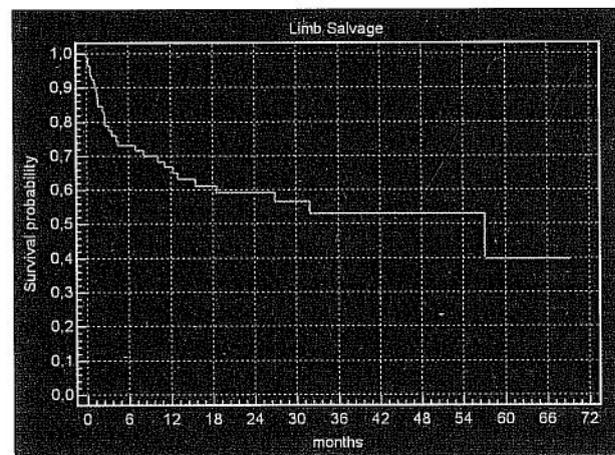
V průběhu hospitalizace došlo k úmrtí jednoho pacienta (1,3 %) v důsledku srdečné zástavy při hyperkalemii. U tří pacientů (4,0 %) došlo k manifestaci ischemic-

ké choroby srdce (akutní infarkt myokardu u 2 pacientů, angina pectoris u 1 pacienta). U všech proběhla intervence (aortokoronární bypas u jednoho pacienta a koronaro-plastika u 2 pacientů). U jednoho pacienta (1,3 %) došlo k akutnímu krvácení z vředu žaludku, který byl řešen konzervativně.

Přežívání pacientů 6 měsíců po operaci bylo  $93,6 \pm 3,3$  %, 12 měsíců po operaci  $91,5 \pm 4,0$  %, 24 měsíců po operaci  $82,9 \pm 6,5$  % a 36 měsíců po operaci  $78,0 \pm 8,9$  %. Křivku přežití pacientů uvádíme v grafu 1.

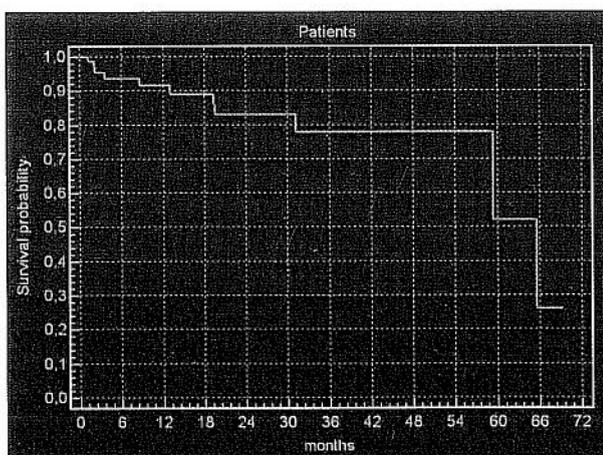
### Chirurgické komplikace

Po 18 rekonstrukcích (22 %) z této skupiny pacientů došlo ke chirurgickým komplikacím v období do 30 dnů po operaci. Infekci rány v třísle s jeho dehiscencí jsme po-



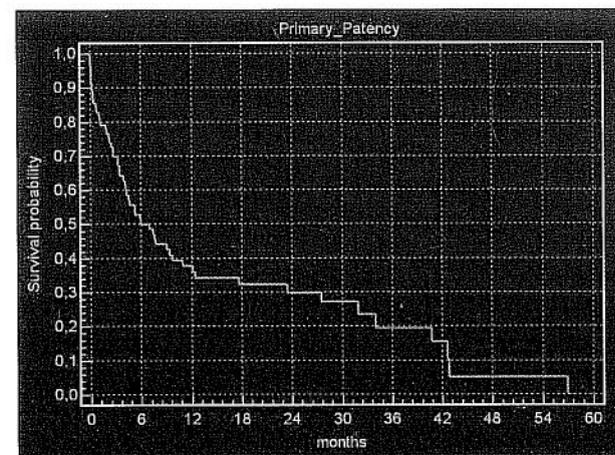
**Graf 2. Křivka zachráněných končetin po tepenné rekonstrukci chladem konzervovanými žilními alloštěpy. Metoda Kaplan-Maier**

**Graph 2. A curve depicting rates of saved extremities following arterial reconstructions using cold-stored venous allografts. The Kaplan-Maier method**



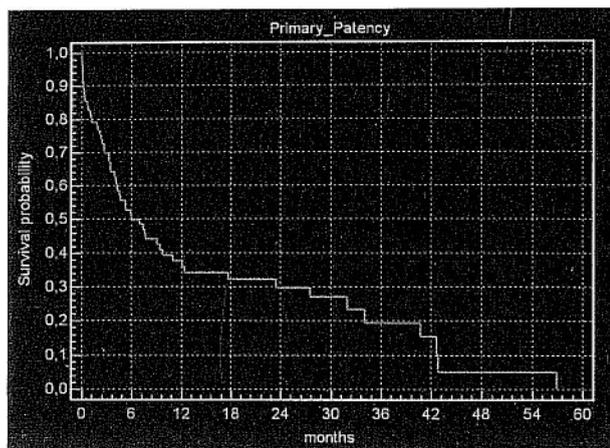
**Graf 1. Křivka přežití pacientů po tepenné rekonstrukci chladem konzervovanými žilními alloštěpy. Metoda Kaplan-Maier**

**Graph 1. The patients survival curve, following arterial reconstructions using cold-preserved venous allografts. The Kaplan-Maier method**



**Graf 3. Primární průchodnost infrainguinálních tepenných rekonstrukcí pomocí chladem konzervovaných žilních alloštěpů. Metoda Kaplan-Maier**

**Graph 3. Primary patency of infrainguinal arterial reconstructions using cold-preserved venous allografts. The Kaplan-Maier method**



**Graf 4. Sekundární průchodnost infrainguinálních tepenných rekonstrukcí pomocí chladem konzervovanými žilními alloštěpů. Metoda Kaplan-Maier**

**Graph 4. Secondary patency of infrainguinal arterial reconstructions using cold-preserved venous allografts. The Kaplan-Maier method**

zorovali u 5 rekonstrukcí (6,1 %), krvácení v ráně bez nutnosti chirurgické revize u 2 rekonstrukcí (2,4 %), krvácení s nutností chirurgické revize u 2 rekonstrukcí (2,4 %), infekci žilního bypasu s rupturou nebo pseudovýdutí u 2 rekonstrukcí (2,4 %), časný uzávěr rekonstrukce u 6 rekonstrukcí (7,3 %), uzávěr výtokové tepny s nutností prodloužení bypasu u jedné rekonstrukce (1,2 %).

#### *Záchrana končetiny a průchodnost žilních rekonstrukcí*

Zachráněných končetin bylo po 1 měsíci  $92,4 \pm 3,0$  %, po 6 měsících  $73,0 \pm 5,4$  %, po 12 měsících  $66,6 \pm 6,0$  %, po 24 měsících  $59,2 \pm 6,8$  % a po 36 měsících  $52,9 \pm 9,1$  %. Grafickou podobu záchrany končetiny uvádíme v grafu 2.

Primární průchodnost rekonstrukcí byla po 1 měsíci  $82,9 \pm 4,2$  %, po 6 měsících  $49,9 \pm 5,8$  %, po 12 měsících  $37,6 \pm 5,8$  %, po 24 měsících  $29,9 \pm 5,8$  % a po 36 měsících  $19,4 \pm 6,3$  %. Grafickou podobu primární průchodnosti allovenózních rekonstrukcí uvádíme v grafu 3.

Sekundární průchodnost rekonstrukcí byla po 1 měsíci  $82,9 \pm 4,2$  %, po 6 měsících  $59,8 \pm 5,8$  %, po 12 měsících  $47,5 \pm 6,3$  %, po 24 měsících  $36,2 \pm 7,0$  % a po 36 měsících  $26,9 \pm 7,7$  %. Grafickou podobu sekundární průchodnosti allovenózních rekonstrukcí uvádíme v grafu 4.

## TEPENNÉ ALLOŠTĚPŮ V LÉČBĚ PROTETICKÝCH INFEKČÍ A MYKOTICKÝCH VÝDUTÍ

### Pacienti a metody

Tepenné štěpy (N = 10) jsme použili v léčbě infekcí aortoilických protéz nebo mykotických výdutí břišní aor-

ty u 9 pacientů (M/Ž 8/1, věk od 56 do 77 let, medián 63 let). Indikací k cévní rekonstrukci tepenným štěpem byla infekce cévní protézy (N = 6), infekce stentgraftu (N = 1) nebo mykotická výduť břišní aorty (N = 3). Podrobné charakteristiky jednotlivých pacientů, operačních výkonů, transplantovaných tepen a doby sledování uvádíme v tabulce 4 a 5.

Pacienty indikované k transplantaci tepny jsme zařadili na čekací listinu. Vyžadovali jsme shodu v krevní skupině ABO systému mezi dárce a příjemcem. HLA typizaci ani cross match jsme u těchto pacientů neprováděli. Tepny jsme získávali v průběhu multiorgánového odběru a uchovávali v standardních konzervačních roztocích bez antibiotik. Medián věku dárce byl v této skupině pacientů 30 let (rozmezí 18–48 let). Medián času studené ischemie byl v této skupině pacientů 15,5 hodiny (rozmezí 12–36 hodin).

V pooperačním období jsme pacientům podávali imunosupresivní léčbu. Do září 2004 jsme používali cyklosporin A, který užívalo 5 pacientů (včetně pacientky po transplantaci srdce (pacient 8), která byla suprimována ještě prednisonem a mykofenolát mofetilem). Medián koncentrace cyklosporinu A v prvním roce po transplantaci byl 102 ng/ml (rozmezí 73–189 ng/ml). U dvou pacientů (pacient 2, pacient 10) jsme v 13. resp. 15. měsíci nahradili cyklosporin A, vzhledem k jeho nefrotoickým účinkům, sirolimem.

Od září 2004 jsme začali jako imunosupresi používat takrolimus. Takto jsme léčili 3 pacienty propuštěné po operaci do domácí péče. Medián koncentrace takrolimu v prvním roce po transplantaci byl 6,0 µg/l (rozmezí 2,2–16,6 µg/l).

Jako antitrombotickou léčbu u pacientů propuštěných do domácí péče (N = 8) jsme použili kyselinu acetylsalicylovou (N = 5), tiklopidin (N = 2), nebo indobufen (N = 1).

Pacienty v této skupině jsme sledovali v rozsahu 6 týdnů až 104 měsíců (medián 27 měsíců). Doba sledování byla vymezená datem operace a datem úmrtí, nebo datem poslední zaručené informace o stavu pacienta. V průběhu sledování jsme u pacientů kontrolovali klinický stav, průchodnost rekonstrukcí (klinicky, ultrasonograficky (USG), počítačovou angiografií (CTA), dále sérové koncentrace imunosuprese a renální funkce.

## VÝSLEDKY

### Úmrtí

V průběhu sledování zemřelo do ledna 2009 6 pacientů (66 %).

Pacient u kterého jsme použili 2 tepenné allografty s odstupem 103 měsíců (pacient 1 i 7), zemřel 3 týdny po druhé transplantaci na multiorgánové selhání při protražovaném septickém stavu. V období mezi transplantacemi se u něho 2x objevily abscesy v levém třísele. Důvodem byla ponechaná malá část původního protetického bypasu v oblasti proximální anastomózy, na které docházelo k opakovaným exacerbacím infekce. Původní te-

Tab. 4. Charakteristika pacientů s infekcí cévní protězy nebo stentgraftu léčených transplantací tepny  
 Tab. 4. Characteristics of patients with vascular prosthesis or stentgraft infections, managed by arterial transplantation

ČP	M/Ž	Věk	Typ původní rekonstrukce protězou	Klinické příznaky infekce	Kultivační nález	Interval mezi původní operací a transplantací tepny (měsíce)	Pohlaví dárce	Věk dárce	Typ tepenného šlepu	Délka SI (hodiny)	Typ nové cévní rekonstrukce tepnou	Doba sledování (měsíce)
1	M	58	BP aortofemorální	Paraproctická tekutina	?	84	?	?	Aortobiiliikofemorální	16	BP aortobifemorální	104
2	M	56	BP aortobiiliický	Sekrece z ran	Proth. mirab, Ps. aerug., Staph koag.neg., Staph epid.	0,75	M	21	Aortobiiliikofemorální	15	BP aortobifemorální	76
3	M	63	BP axilofemorální	Absces v třísle	Ent. faecalis, Staph koag neg., MSSA	3	M	30	Aortobiiliikofemorální	24	BP aortobifemorální	35
4	M	63	BP aortobifemorální	Absces v třísle	Ent. faecalis, E. coli, MSSA	1	M	48	Aortobiiliikofemorální	24	BP aortobifemorální	14
5	M	77	BP aortobifemorální + BP femoropopliteální	Absces v třísle + PSA dist. anast + aortoenter. píštěl	MRSA	?	M	46	Aortobiiliikofe moropopliteální	36	BP aortobifemorální + femoropoplitealis bilat.	1,5
6	M	61	SG unilat. do AAA + náhrada AFC + BP femorofemorální cross-over	Absces v třísle + PSA dist. anast.	MSSA	6	M	37	Aortobiiliikofemorální	12	BP aortobifemorální + implantace AFC	6
7=1	M	67	1. BP aortofemorální proth. 2. BP aortobifemorální alloarterialis	Absces v třísle + PSA prox. anast.	Negat.	1. 192* 2. 104**	M	34	Aortobiiliikofemorální	12	BP aortolický + aortofemorální	0,75***

ČP – číslo pacienta, M - muž, Ž - žena, SI - studená ischemie, BP - bypas, ? - neznámý údaj, Proth. mirab - *Protheus mirabilis*, Ps. aerug. - *Pseudomonas aeruginosa*, Staph koag.neg. - *Staphylococcus koaguláza negativní*, Staph epid. - *Staphylococcus epidermidis*, Ent. Faecalis - *Enterococcus faecalis*, MSSA - *meicilin senzitivní Staphylococcus aureus*, E. Coli - *Escherichia Coli*, MRSA - *meicilin rezistentní Staphylococcus aureus*, PSA - *pseudoaneuryzma*, dist. - *distální*, anast. - *anastomóza*, AFC - *arteria femoralis communis*, bilat. - *bilaterální*, proth. - *protetický*, negat. - *negativní*.

\* - doba od původního protetického bypasu

\*\* - doba od prvního alloarteriálního bypasu

\*\*\* - doba od druhého alloarteriálního bypasu

Tab. 5. Charakteristika pacientů s mykotickou výdutí břišní aorty léčených transplantací tepny  
 Tab. 5. Characteristics of patients with mycotic AAA, treated with arterial transplantation

ČP	M/Ž	Věk	Pozn.	Klinické příznaky mykotické AAA	Kultivační nález	Velikost AAA v čase OP (mm)	Pohlaví dárce	Věk dárce	Typ tepenného štěpu	Délka SI (hodiny)	Typ nové cévní rekonstrukce tepnou	Doba sledování (měsíce)
8	Ž	66	Stav po TX srdce	Bolesti břicha + febrilie + pozitivní HK	<i>Salm. enteritidis</i>	50	Ž	26	Hrudní aorta	12	Resekce a náhrada AAA	60
9	M	67		Bolesti břicha + febrilie + disekce podle USG	<i>Ps. aeruginosa</i>	50	M	18	Hrudní aorta	15	Resekce a náhrada AAA	1
10	M	62		Bolesti břicha + febrilie + pozitivní HK	<i>Ps. aeruginosa</i> + MSSA	70	M	21	Hrudní aorta	18	Resekce a náhrada AAA	27

ČP – číslo pacienta, M – muž, Ž – žena, Pozn. – poznámka, AAA – výdut' břišní aorty, SI – studená ischemie, TX – transplantace, HK – hemokultura, Salm. – *Salmonella*, USG – ultrasonografie, Ps. – *Pseudomonas*, MSSA – *meticilin* senzitivní *Staphylococcus aureus*

penný štěp byl při jeho explantaci rovněž se známkami infekce.

Jeden pacient po resekci a náhradě mykotické AAA s disekcí (pacient 9) s komplikovaným pooperačním průběhem ve smyslu opakovaných revizí pro krvácení a močové píštěle, zemřel při šesté revizi pro chirurgicky neošetřitelné krvácení při ruptuře tepenného štěpu 6 týdnů po primární operaci.

Jeden pacient po našíti aortobifemoropopliteálního bypasu pro infekci původního aortobifemorálního a femoropopliteálního bypasu (pacient 5) s rozvojem aortoduodenální píštěle spolu s pozitivním nálezem *meticilin* rezistentního *Stafylokokka aurea* (MRSA) v ranách a s opakovanými revizemi pro krvácení po transplantaci tepny zemřel na multiorgánové selhání při protražovaném septickém stavu 6 týdnů po transplanataci.

Jeden pacient po extrakci infikované protězy a její náhradě aortobifemorálním tepenným štěpem (pacient 4) zemřel na následky cévní mozkové příhody 14 měsíců po transplantaci.

Jeden pacient po náhradě mykotické AAA hrudní aortou dárce (pacient 10) zemřel pro tumor pankreatu 27 měsíců po operaci.

Pacientka po transplantaci srdce a následné náhradě mykotické AAA (pacient 8) zemřela na bronchopneumonii 60 měsíců po tepenné transplantaci.

#### Chirurgické komplikace

U jednoho pacienta (pacient 2) se po náhradě infikovaného aortobifemorálního protetikého bypasu tepenným štěpem rozvinula v časném pooperačním období výrazná lymfatická sekrece z drénů s hypoalbuminemií a otoky, která byla léčená konzervativně. V dalším průběhu došlo k rozvoji kýly v jizvě po retroperitoneotomii, kterou jsme ošetřili plastikou sítkou 16 měsíců po transplantaci tepny.

U pacienta s infekcí axilofemorálního protetikého bypasu (pacient 3) se po transplantaci aortobifemorálního tepenného štěpu rozvinula lymfatická sekrece v tříslech, která si vynutila chirurgickou revizi 2 týdny po transplantaci.

U dalšího pacienta po transplantaci aortobiilikofemorálního štěpu pro infekci původního protetikého bypasu (pacient 4) došlo peroperačně k poranění močovodu s nutností jeho rekonstrukce na JJ stentu s dobrým klinickým efektem.

Pacient s infekcí unilaterálního stentgraftu implantovaného do AAA s jeho následnou extrakcí a našitím tepenného aortobifemorálního bypasu spolu s implantací pravé renální tepny (pacient 6) byl revidován časně po transplantaci pro krvácení z oblasti proximální anastomózy a levé renální tepny. V dalším průběhu došlo k dehiscenci rány v třísle s nutností transpozice *musculus sartorius* a resutury rány.

#### Průchodnost tepenných rekonstrukcí

V průběhu sledování byla primární průchodnost rekonstrukcí 100%. Ani u jedné transplantované tepny jsme nepozorovali její aneurymatickou dilataci známou z historie použití tepen v této indikaci.

## TEPENNÉ ALLOŠTĚPY A AORTOILICKÉ REKONSTRUKCE U TRANSPLANTOVANÝCH PACIENTŮ

### Pacienti a metody

Chladem konzervované tepenné alloštěpy (N = 20) jsme použili jako materiál k cévní rekonstrukci v aortoilické oblasti u 20 transplantovaných pacientů (M/Ž 11/9, věk od 32 do 67 let, medián 56 let).

Indikací k cévní rekonstrukci byla klinicky manifestní aortoilická stenóza resp. okluze (14 pacientů) nebo výduť břišní aorty (6 pacientů).

U 13 pacientů z této skupiny jsme provedli aortoilickou rekonstrukci současně s transplantací kadaverózní ledviny. U zbylých 7 pacientů jsme uskutečnili aortoilickou rekonstrukci až s určitým časovým odstupem po orgánové transplantaci.

Podrobné charakteristiky jednotlivých skupin pacientů, operačních výkonů a transplantovaných tepen uvádíme v tabulce 6 a 7.

Pacienty indikované k současné transplantaci tepny a ledviny jsme zařadili na čekací listinu do zvláštního pořadí. Ledvinu i tepnu k transplantaci jsme použili od stejného dárce. Mezi dárce a příjemcem jsme vyžadovali shodu v krevní skupině ABO systému. HLA typizace dárce a cross match mezi příjemcem a dárce jsme prováděli až po transplantaci. U pacientů s již transplantovaným srdcem nebo ledvinou jsme HLA typizaci ani cross match nevyžadovali.

Tepny i ledviny jsme získávali v průběhu multiorgánového odběru, uchovávali je v standardních konzervačních roztocích bez antibiotik. Medián věku dárce byl v této skupině pacientů 35 let (rozmezí 15–45 let). Medián času studené ischemie tepny byl v této skupině pacientů 12 hodin (rozmezí 5–24 hodin). Medián studené ischemie ledvin u pacientů se současnou transplantací tepny a ledviny byl 14 hodin (rozmezí 7–26 hodin).

Imunosupresivní schemata se u těchto pacientů řídila podle druhu transplantovaného orgánu (ledvina, srdce). Transplantace tepny neměla na výběr imunosuprese vliv. Typy imunosupresivních protokolů u všech 20 pacientů v čase propuštění do domácí péče uvádíme v tabulce 8.

V antitrombotické léčbě u pacientů propuštěných do domácí péče z této skupiny (N = 20) jsme použili kyselinu acetylsalicylovou (N = 12), tiklopidin (N = 1), indobufen (N = 2), warfarin (N = 1), sulodoxid (N = 1). Tři pacienti byli při propuštění bez antiagregační terapie.

Tab. 6. Charakteristika pacientů s výduť břišní aorty řešené její resekci a náhradou tepenným alloštěpem  
Tab. 6. Characteristics of patients with AAA, managed by resection and arterial allograft implantation

ČP	M/Ž	Věk	Typ výduť	Velikost (mm)	Přidružená onemocnění	Pohlaví dárce	Věk dárce	Typ tepenného šěpu	Délka SI (hodiny)	Typ nové cévní rekonstrukce tepnou	Doba sledování (měsíce)
11	Ž	63	Asymptomatická AAA + AAIC oboustranně	60	CHRI/HD, ICHS, HT	M	19	Aortobililkofermorální	11	Resekce AAA + BP aortobililialis + BP ilicofemorialis + TX ledviny na allotepnu	110
12	M		Asymptomatická AAA	65	CHRI/HD, ICHS, HT, nikotinismus	M	44	Hrudní aorta	12	Resekce a náhrada AAA + TX ledviny na allotepnu	102
13	Ž	55	Asymptomatická AAA	45	CHRI/HD, ICHS, HT, nikotinismus	M	35	Hrudní aorta	12	Resekce a náhrada AAA + TX ledviny na nativní AIE	1
14	M	51	Asymptomatická AAA	50	CHRI/HD, HT, nikotinismus	M	42	Hrudní aorta	24	Resekce a náhrada AAA + TX ledviny na nativní AIE	76
15	M	57	Asymptomatická AAA	50	CHRI/HD, HT, nikotinismus	M	43	Hrudní aorta	11	Resekce a náhrada AAA + TX ledviny na nativní AIE	72
16	M	57	Asymptomatická AAA	56	CHRI/HD, ICHS/IM/CABG, TAAA, DM, HT, nikotinismus	M	43	Aortobililkofermorální	18,5	Resekce AAA + BP aortobilialis + BP aortofemorialis + TX ledviny na allotepnu	24

ČP – číslo pacienta, M – muž, Ž – žena, SI – studená ischemie, BP – bypas, AAA – výduť břišní aorty, CHRI/HD – chronická renální insuficience v hemodialyzačním stadiu, ICHS – ischemická choroba srdce, IM – infarkt myokardu, CABG – aortokoronární bypas, TAAA – výduť hrudní aorty, HT – hypertenze, TX – transplantace, AIE – arteria iliaca externa

**Tab. 7. Charakteristika skupiny 14 pacientů se stenózou nebo okluzí pánevních tepen řešených cévní rekonstrukcí s použitím tepenných alloštěpů**

**Tab. 7. Characteristics of a group of 14 patients with stenosis or occlusion of pelvic arteries, managed by vascular reconstructions with arterial allografts**

Charakteristika pacientů		
Muži	7	50 %
Ženy	7	50 %
Medián věku (rozmezí)	56 let (32–67)	
ICHS	9	64 %
ICHS/TX srdce	4	29 %
Medián času od TX srdce (rozmezí)	47 měsíců (14–99)	
Diabetes mellitus	5	36 %
Nikotinismus	12	86 %
Hypertenze	11	79 %
CHRI	11	79 %
CHRI/hemodialýza	7	50 %
CHRI/TX ledvina	3	21 %
Medián času od TX ledviny (rozmezí)	19 měsíců (0,25–91)	
Charakteristika cévního postižení		
Stenóza/okluze AIC/AIE jednostranná	7	50 %
Stenóza/okluze AIC/AIE oboustranná	6	43 %
Okluze aortofemorálního BP	1	7 %
Chronická končetinová ischemie	13	93 %
Klaudikace	10	71 %
Klidové bolesti	1	7 %
Trofické defekty	2	14 %
Akutní končetinová ischemie	1	7 %
Charakteristika dárců a tepenných štěpů		
Medián věku dárce (rozmezí)	29 let (15–45)	
Aortobiilikofemorální štěp	5	36 %
Ilikofemorální štěp	9	64 %
Medián studené ischemie (rozmezí)	12 hodin (5–24)	
Charakteristika cévních rekonstrukcí		
BP aortobifemorális		
+ TX ledviny na allotepnu	2	14 %
BP aortobiprofundalis		
+ TX ledviny na allotepnu	1	7 %
BP aortofemorális		
+ TX ledviny na allotepnu	3	21 %
BP ilicofemorális		
+ TX ledviny na allotepnu	1	7 %
BP aortobifemorális	1	7 %
BP aortobiiliacalis	1	7 %
BP ilicobiprofundalis	2	14 %
BP ilicofemorális	2	14 %
BP ilicoprofundalis cross-over	1	7 %
Charakteristika doby sledování		
Medián doby sledování (rozmezí)	39 měsíců (8–135)	

ICHS – ischemická choroba srdce, TX – transplantace, ICHS/TX srdce – stav po transplantaci srdce pro ischemickou chorobu srdce, CHRI – chronická renální insuficience, CHRI/hemodialýza – chronická renální insuficience v hemodialyzačním stadiu, CHRI/TX ledvina – stav po transplantaci ledviny pro chronickou renální insuficenci, AIC – arteria iliaca communis, AIE – arteria iliaca externa, BP – bypas

**Tab. 8. Typy imunosupresivní terapie u 20 pacientů s transplantovaným orgánem (ledvina, srdce) a cévní rekonstrukcí tepenným alloštěpem**

**Tab. 8. Types of immunosuppression therapy in 20 patients with organ transplants (kidney, lungs) and vascular reconstructions with arterial allografts**

	N	%
Cyklosporin A + azatioprin + prednison	6	30%
Cyklosporin A + mykofenolát mofetil + prednison	6	30%
Cyklosporin A + prednison	1	5%
Takrolimus + mykofenolát mofetil + prednison	4	20%
Takrolimus + sirolimus + prednison	1	5%
Takrolimus + mykofenolát mofetil	1	5%
Mykofenolát mofetil + prednison	1	5%

Pacienty v této skupině jsme sledovali v rozsahu 1 týdne až 135 měsíců (medián 47,5 měsíce). Doba sledování byla vymezená datem operace a datem úmrtí, nebo datem poslední zaručené informace o stavu pacienta. V průběhu sledování jsme u pacientů kontrolovali klinický stav a průchodnost rekonstrukcí (klinicky, ultrasonograficky (USG), počítačovou angiografií (CTA)).

## VÝSLEDKY

### Úmrtí

V průběhu sledování zemřelo do ledna 2009 10 pacientů (50 %).

Pět pacientů (3 s transplantovanou ledvinou, 2 s transplantovaným srdcem) zemřeli na maligní novotvar 8, 26, 37, 63 a 103 měsíců po cévní rekonstrukci tepenným alloštěpem.

Dva pacienti po současné cévní rekonstrukci a transplantaci ledviny zemřeli v důsledku perforovaného nebo krvácejícího gastroduodenálního vředu 1 a 32 měsíců po operaci.

Jeden pacient po současném aortofemorálním bypasu a transplantaci ledviny zemřel 27 měsíců po operaci na následky cévní mozkové příhody

Jedna pacientka po ilikoprofundálním BP zemřela na multiorganové selhání při septickém stavu v důsledku infekce amputačního pahýlu 19 měsíců po tepenné transplantaci.

U jedny pacientky po transplantaci srdce s následným ilikofemorálním bypasem došlo k náhlému úmrtí 67 měsíců po srdeční a 53 měsíců po tepenné transplantaci. Přesnou příčinu smrti se nám nepodařilo zjistit.

### Chirurgické komplikace

U 6 pacientů (30 %) z této skupiny došlo ke chirurgickým komplikacím v časném pooperačním průběhu.

U 3 pacientů po současné pánevní rekonstrukci a transplantaci ledviny se rozvinula porucha hojení rány (2x de-

hiscence s nutností revize a resutury, IX lymfatická sekrece řešená konzervativně).

U 2 pacientů po primární cévní rekonstrukci v oblasti pánve došlo k rozvoji akutní ischemie končetin s nutností periferní rekonstrukce. U jednoho pacienta po simultánním aortofemorálním allotepenném bypasu a transplantaci ledviny spolu s kontralaterální plastikou arteria profunda femoris allotepennou záplatou došlo k uzávěru v místě plastiky s nutností provedení femoropopliteálního protetického bypasu 10 dní po primární operaci. U jedné pacientky s ilikobifundálním allotepenným bypase provedeným akutně týden po transplantaci ledviny došlo k prohlubování ischemie dolní končetiny ve včasném období po allotepenné rekonstrukci. Tu jsme řešili novým krurálním bypase allovenozním štěpem s dobrým efektem.

U jednoho pacienta po resekci a náhradě AAA tepenným štěpem a současně transplantaci ledviny došlo k rozvoji ischemické kolitidy. Komplikaci jsme řešili subtotální kolektomií s přechodnou ileostomií. I přes závažný peroperační nález sterkorální peritonitidy se nám podařilo zachránit nejen pacienta, ale i tepenný a ledvinový štěp. Tuto kazuistiku jsme v minulosti již publikovali [1].

Pozdní chirurgické komplikace jsme pozorovali u 4 pacientů (20 %).

Kýla v ráně po laparo- nebo retroperitoneotomii se rozvinula u 3 pacientů (z toho u dvou, kteří měli pooperační poruchu hojení rány).

U jedné pacientky po ilikoprofundálním allotepenném bypasu pro gangrénu palce došlo i přes cévní rekonstrukci ke zhoršování ischemie s nutností amputace ve stehně 4 měsíce po pánevní rekonstrukci.

#### *Průchodnost tepenných rekonstrukcí*

V průběhu sledování byla primární průchodnost rekonstrukcí 100%. Ani u jedné transplantované tepny jsme opět nepozorovali její dilataci.

## **DISKUSE**

V prezentované práci hodnotíme naše zkušenosti s chladem konzervovanými tepennými a žilními alloštěpy v cévní chirurgii. Tyto štěpy znamenaly nové možnosti v léčbě aterosklerotického postižení dolních končetin i řešení infekčních komplikací po použití klasických umělých protéz.

Využití cévních alloštěpů není v chirurgii novinkou. Cévní alloštěpy vlastně stály při zrodu rekonstrukční chirurgie tepen na začátku 20. století [2, 3, 4]. Špatné dlouhodobé výsledky z 50. a 60. let minulého století ale vedly ke ztrátě zájmu o tuto náhradu a cévní chirurgii ovládly umělé cévní protézy [5, 6]. V 80. letech minulého století ale život ohrožující infekce právě umělých cévních protéz znamenaly renesanci zájmu o allogenní cévní materiál [7, 8].

V současnosti se na žilní i tepenné alloštěpy již hledí jako na tkáň vyvolávající imunitní odpověď podobnou re-

jekčním procesům vznikajícím u pacientů po transplantaci parenchymatózních orgánů [9, 10]. Jejich imunogenicita je podmíněná zejména expresí HLA antigenů třídy I i II v jejich stěně [11]. I přesto není použitím imunosuprese po jejich transplantaci ve světě všeobecně běžné a přístup jednotlivých center se pohybuje od jejího absolutního odmítnutí [8] až po použití v trojkombinaci obdobně jako je tomu po orgánové transplantaci [12].

Naše pracoviště se vzhledem ke klinickým [1, 13–17] i experimentálním zkušenostem s tepennými [18] i žilními štěpy (zatím nepublikovaná studie) jednoznačně kloní k použití imunosuprese po transplantaci chladem konzervovaných cév. Podrobně o této problematice i o výhodách použití imunosupresiva takrolimu (FK506) v cévní chirurgii diskutujeme v našich předchozích publikacích [18, 15].

Na celkový výsledek transplantace cévních alloštěpů má kromě imunosuprese vliv také kvalita štěpů v době transplantace. Ta je ovlivněná zejména časem studené ischemie [19]. V našem souboru byl medián času studené ischemie tepen 15 hodin. Tato doba je bezpečná i pro transplantaci ledviny. Proto nepředpokládáme, že by měla významně ovlivnit výsledky transplantace tepen. U žilních alloštěpů byl medián času studené ischemie podstatně vyšší, a to 66 hodin. Tento fakt je způsoben organizací odběrů a transplantací orgánů, kdy transplantace parenchymatózních orgánů je nutné provést co nejdříve v přesně definovaných časových intervalech. Žilní transplantace je tak prováděná jako poslední. Délka studené ischemie je proto určitě jeden z faktorů, který negativně ovlivňuje celkové výsledky cévních rekonstrukcí žilními alloštěpy. Podrobně o této problematice diskutujeme v naší předchozí publikaci [15].

Pacienti po transplantaci životně důležitých orgánů jsou vzhledem k doživotnímu podávání imunosuprese vhodnými příjemci allogenních cév. V současnosti dáváme přednost použití tepenných allograftů v aortoiliacké oblasti a použití žilních allograftů v oblasti infrainguinální. Tuto problematiku podrobně diskutujeme v našich předchozích publikacích [13, 14, 17].

## **ZÁVĚR**

Závěrem lze konstatovat, že použití chladem konzervovaných tepen a žil má pevné místo v našich současných léčebných metodách. Při použití imunosupresivní terapie po těchto výkonech se opíráme o vlastní klinické i experimentální zkušenosti.

#### **Seznam zkratk**

AAA – výduť břišní aorty  
 AFC – arteria femoralis communis  
 AIC – arteria iliaca communis  
 AIE – arteria iliaca externa  
 anast. – anastomóza  
 bilat. – bilateralis

BP – bypas  
 CABG – aortokoronární bypas  
 dist. – distální  
 E. Coli – *Escherichia Coli*  
 Ent. Faecalis – *Enterococcus faecalis*  
 HK – hemokultura  
 HT – hypertenze  
 CHRI – chronická renální insuficience  
 CHRI/HD – chronická renální insuficience v hemodialyzačním stadiu  
 CHRI/TX ledvina – stav po transplantaci ledviny pro chronickou renální insuficenci, ICHS – ischemická choroba srdce  
 ICHS/TX srdce – stav po transplantaci srdce pro ischemickou chorobu srdce  
 IM – infarkt myokardu  
 LMWH - low molecular weight of heparin – nízkomolekulární heparin  
 MRSA – meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus*  
 MSSA – meticilin senzitivní *Staphylococcus aureus*  
 negat. – negativní  
 proth. – protetický  
 Proth. mirab – *Protheus mirabilis*  
 Ps. – *Pseudomonas*  
 Ps. aerug. – *Pseudomonas aeruginosa*  
 PSA – pseudoaneuryzma  
 PTA – perkutánní transluminální angioplastika  
 Salm. – Salmonella  
 SE – standard error  
 SI – studená ischemie  
 Staph epid. – *Staphylococcus epidermidis*  
 Staph koag.neg. – *Staphylococcus koaguláza negativní*  
 TAAA – výduť hrudní aorty  
 TX – transplantace  
 USG – ultrasonografie  
 VSM – vena saphena magna

## LITERATURA

1. **Matia, I., Adamec, M., Fronek, J., et al.** Ischemia of the large intestine after simultaneous kidney transplantation and aortic replacement with a fresh graft in an abdominal aortic aneurysm. *Rozhl. Chir.*, 2004; 83: 121–127.
2. **Carrel, A.** Ultimate results of aortic transplantation. *J. Exp. Med.*, 1912; 15: 389–398.
3. **Gross, R. E., Bill, A. H., Jr., Peirce, E. C., Jr.** Methods for pre-

- servation and transplantation of arterial grafts; observations on arterial grafts in dogs; report of transplantation of preserved arterial grafts in nine human cases. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 1949; 88: 689–701.
4. **Dubost, C., Allary, M., Oeconomos, N.** Resection of an aneurysm of the abdominal aorta: Reestablishment of the continuity by a preserved human arterial graft, with result after five months. *AMA Arch. Surg.*, 1952; 64: 405–408.
  5. **Szilagy, D. E., Rodriguez, F. J., Smith, R. F. et al.** Late fate of arterial allografts. Observations 6 to 15 years after implantation. *Arch. Surg.*, 1970; 101: 721–733.
  6. **Meade, J. W., Linton, R. R., Darling, R. C., et al.** Arterial homografts. A long-term clinical follow-up. *Arch. Surg.*, 1966; 93: 392–399.
  7. **Bahni, A., Ruotolo, C., Koskas, F., et al.** In situ fresh allograft replacement of an infected aortic prosthetic graft: Eighteen months follow-up. *J. Vasc. Surg.*, 1991; 14: 98–102.
  8. **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: 1009–1017.
  9. **Carpenter, J. P., Tomaszewski, J. E.** Human saphenous vein allograft bypass grafts: Immune response. *J. Vasc. Surg.*, 1998; 27: 492–499.
  10. **Mirelli, M., Stella, A., Faggioli, G. L., et al.** Immune response following fresh arterial homograft replacement for aortoiliac graft infection. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 1999; 18: 424–429.
  11. **Lopez-Cepero, M., Sanders, C. E., Buggs, J. et al.** Sensitization of renal transplant candidates by cryopreserved cadaveric venous or arterial allografts. *Transplantation*, 2002; 73: 817–819.
  12. **Prager, M., Holzenbein, T., Aslim, E., et al.** Fresh arterial homograft transplantation: A novel concept for critical limb ischaemia. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 2002; 24: 314–321.
  13. **Adamec, M., Matia, I., Janousek, L., et al.** Renal transplantation in patients with abdominal aortic aneurysm – a new surgical approach. *Transpl. Int.*, 2004; 17: 647–650.
  14. **Matia, I., Adamec, M., Janousek, L., et al.** Fresh arterial grafts as conduits for vascular reconstructions in transplanted patients. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 2006; 32: 549–556.
  15. **Matia, I., Janousek, L., Marada, T., et al.** Cold-stored venous allografts in the treatment of critical limb ischaemia. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 2007; 34: 424–431.
  16. **Matia, I., Adamec, M., Varga, M., et al.** Aortoiliac reconstruction with allograft and kidney transplantation as a one-stage procedure: Long term results. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 2008; 35: 353–357.
  17. **Matia, I., Pirk, J., Lipar, K., et al.** Successful surgical treatment of multilevel aortic aneurysms combined with renal transplantation. *J. Vasc. Surg.*, 2009; 50: 198–201.
  18. **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.
  19. **Stadler, P., Sebesta, P., Klika, T., et al.** Allografts in the vascular surgery. *Rozhl. Chir.*, 2005; 84: 350–355.

MUDr. Ivan Matia, Ph.D.  
 U Kamýku 284/11  
 142 00 Praha 4  
 e-mail: ivmi@ikem.cz