

# Univerzita Karlova

## 1. lékařská fakulta

Postgraduální doktorské studium v biomedicině

Oborová rada: Experimentální chirurgie

předseda: prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.



UNIVERZITA KARLOVA  
1. lékařská fakulta

**MUDr. Rudolf Špunda**

## **Imunosuprese po transplantaci kryokonzervovaných tepenných alloštěpů v experimentu**

**Immunosuppressive therapy after transplantation of  
cryopreserved arterial allografts in rats**

Dizertační práce

Školitel: MUDr. Miroslav Špaček, PhD.

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

Praha, 2019

### **Čestné prohlášení**

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

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

V Praze dne

---

MUDr. Rudolf Špunda

ŠPUNDA, Rudolf. *Imunosuprese po transplantaci kryokonzervovaných tepenných alloštěpů v experimentu. [Immunosuppressive therapy after transplantation of cryopreserved arterial allografts in rats]*. Praha, 2019. 117 s., 6 příl. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, II. chirurgická klinika kardiovaskulární chirurgie. Vedoucí práce Špaček, Miroslav.

## SOUHRN

Cílem experimentální práce bylo zhodnocení vlivu imunosuprese pomocí takrolimu na rejekci kryokonzervovaných aortálních alloštěpů na potkaním modelu, který byl nastaven tak, aby simuloval techniky a postupy používané v klinickém programu transplantace kryokonzervovaných tepenných alloštěpů.

Kryokonzervované alloštěpy abdominální aorty jsme transplantovali mezi kmeny potkanů Brown-Norway a Lewis. Imunosupresi pomocí takrolimu v dávce 0,2 mg/kg/den jsme podávali intramuskulárně od 1. (skupina TAC1), respektive od 7. (skupina TAC7) do 30. pooperačního dne. Neimunosuprimované skupiny po isogenní (ISO) a allogenní (ALO) transplantaci sloužily jako kontrola. Třicátý den po transplantaci jsme štěpy explantovali, histologicky a imunohistochemicky jsme zhodnotili destrukci cévní stěny a infiltraci imunokompetentními buňkami. Dále jsme hodnotili koncentraci donor specifických anti-MHC protilátek v periferní krvi.

Cévní stěny alloštěpů v obou imunosuprimovaných skupinách nejevily 30. pooperační den žádné známky destrukce a nebyla v nich zaznamenána žádná depozita imunoglobulinu G. Adventiciální infiltrace MHC II pozitivními buňkami byla ve skupině ALO signifikantně vyšší než u obou imunosuprimovaných skupin (ALO 20,7±6,7, TAC1 5,9±5,5, TAC7 6,1±5,1,  $P < 0,001$ ). Koncentrace anti-MHC protilátek I. a II. třídy byla v allogenní skupině signifikantně vyšší, než v obou imunosuprimovaných skupinách (ALO - anti-MHC I 46,9±19,4 %, anti-MHC II 65,8±11,9 %, TAC1 - anti-MHC I 102,4±4,2 %,  $p < 0,001$ , anti-MHC II 102,6±6,0 %, TAC7 - anti-MHC I 79,9±3,3 %,  $p < 0,001$ , anti-MHC II 80,9±2,7 %).

Imunosuprese pomocí takrolimu zabránila akutní buňkami i protilátkami zprostředkované rejekci kryokonzervovaných aortálních alloštěpů, nehledě na to, zda byla podávána od 1. pooperačního dne nebo s odstupem 7 dnů.

Klíčová slova: arteriální alloštěp, kryokonzervace, protilátková imunitní odpověď, buněčná imunitní odpověď, takrolimus, protilátky anti-MHC I. třídy, protilátky anti-MHC II. třídy



## SUMMARY

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

Cryopreserved abdominal aortic grafts were transplanted between Brown-Norway and Lewis rats. Tacrolimus (0,2 mg/kg daily) was administered from day 1 to day 30 (TAC1) or from day 7 to day 30 (TAC7), respectively. No immunosuppressed isogeneic (ISO) and allogeneic (ALO) rats combination served as control. Aortal wall destruction and infiltration by immunocompetent cells (MHC II+ cells of recipient origin) was studied on day 30 after transplantation. Flow cytometry was used for the analysis of day 30 sera for the presence of donor specific anti-MHC class I and II antibodies.

The aortal allografts in both immunosuppressed groups showed regular morphology of aortal wall with no depositions of immunoglobulin G on day 30. The adventitial infiltration of non-immunosuppressed aortal allografts by MHC class II positive cells of recipient origin was significantly higher (ALO 20,7±6,7 cells,  $P < 0,001$ ) compared to both immunosuppressed groups (TAC1 5,9±5,5 cells, TAC7 6,1±5,1 cells). Anti-MHC antibodies class I and II level in peripheral blood was significantly higher in group ALO compared to both immunosuppressed groups on day 30. after transplantation (ALO - anti-MHC I 46,9±19,4 %, anti-MHC II 65,8±11,9 %, TAC1 - anti-MHC I 102,4±4,2 %,  $p < 0,001$ , anti-MHC II 102,6±6,0 %, TAC7 - anti-MHC I 79,9±3,3 %,  $p < 0,001$ , anti-MHC II 80,9±2,7 %).

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

Key words: arterial allograft, cryoconservation, antibody-mediated rejection, cell-mediated rejection, tacrolimus, anti-MHC class I antibody, anti-MHC class II antibody

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

|              |  |
|--------------|--|
| AB0          | - AB0 systém krevních skupin   |
| ALO          | - allogenní experimentální skupina   |
| BN           | - potkani kmene Brown-Norway   |
| CD4+         | - clusters of differentiation 4+ buňky (pomocné T-lymfocyty)                                   |
| CD8+         | - clusters of differentiation 8+ buňky (cytotoxické T-lymfocyty)                               |
| ISO          | - isogenní experimentální skupina  |
| TAC1         | - od 1. dne imunosuprimovaná experimentální skupina  |
| TAC7         | - od 7. dne imunosuprimovaná experimentální skupina  |
| anti-MHC     | -anti-major histocompatibility complex (protilátky proti hlavnímu histokompatibilnímu systému) |
| MHC          | - major histocompatibility complex (hlavní histokompatibilní systém)                           |
| FTY720       | - fingolimod (sphingosine-1-phosphate receptor modulator)                                      |
| FR260330     | - inhibitor NO syntázy   |
| anti-HLA     | - protilátky proti hlavnímu histokompatibilnímu systému  |
| IgG          | - imunoglobuliny G   |
| IL-2         | - interleukin 2  |
| TGF- $\beta$ | - transforming growth faktor beta  |
| LEW          | - potkani kmene Lewis  |
| KST          | - Koordinační středisko transplantací  |
| SÚKL         | - Státní ústav pro kontrolu léčiv  |
| EU           | - Evropská unie  |
| 1. LF UK     | - 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy   |
| IU           | - mezinárodní jednotka (international unit)  |
| CIT          | - čas studené ischemie (cold ischemic time)  |
| DMSO         | - dimethyl sulfoxid  |
| SRN          | - Spolková republika Německo   |
| UK           | - United Kingdom   |
| PBS          | - fosfátový pufr   |
| FBS          | - fetální bovinní sérum  |
| POD          | - pooperační den   |

## **PODĚKOVÁNÍ**

Poděkovat bych chtěl především mému školiteli MUDr. Miroslavu Špačkovi, PhD., který mne po celou dobu studia provázel a podporoval. Hlavně díky němu mohla tato práce vzniknout. Dále poděkování náleží mému konzultantovi Priv.-Doz. MUDr. habil. Ivanu Matioví, Ph.D. Na jeho původní experiment tato práce navazuje a bez jeho vedení a pomoci by náš experiment jen těžko mohl být uskutečněn. MUDr. Mikuláši Mlčkovi, PhD. bych rád poděkoval za zásadní pomoc při realizaci operačního sálu na Fyziologickém ústavu 1. LF UK a při práci s laboratorními zvířaty. Dále bych chtěl poděkovat MUDr. Pavlu Měříčkovi, Ph.D., který prováděl a odborně garantoval celý proces kryokonzervace. MUDr. Petru Kobytkovi, CSc. patří velký dík za uložení kryoštěpů v kryokonzervačním skladu tkáňového zařízení Ústavu hematologie a krevní transfúze v Praze. V neposlední řadě bych rád poděkoval prof. MUDr. Jaroslavu Lindnerovi, CSc., který mne v průběhu celého studia nemalou měrou podporoval a pomohl sloučit odbornou práci s výzkumem a studiem.

|   |    |
|---|----|
| <b>OBSAH</b>  |    |
| <b>1. ÚVOD</b>  | 10 |
| 1.1. Historie allotransplantace tepenných štěpů   | 10 |
| 1.2. Imunogenicita tepenných štěpů  | 12 |
| 1.3. Imunosuprese po transplantacích tepenných štěpů v experimentu                            | 14 |
| 1.4. Imunosuprese v klinické praxi  | 15 |
| 1.5. Imunosupresivum takrolimus   | 18 |
| 1.6. Allotransplantace chladem konzervovaných tepenných štěpů                                 | 19 |
| 1.7. Allotransplantace kryokonzervovaných tepenných štěpů                                     | 21 |
| 1.8. Současný stav klinického použití kryokonzervovaných tepenných štěpů<br>v České republice | 22 |
| <b>2. HYPOTÉZA</b>  | 23 |
| 2.1. Cíle dizertační práce  | 24 |
| <b>3. MATERIÁL A METODY</b>   | 24 |
| 3.1. Rozvržení experimentu  | 24 |
| 3.2. Zvířata a experimentální skupiny   | 27 |
| 3.3. Odběr štěpů  | 28 |
| 3.4. Kryokonzervace štěpů   | 31 |
| 3.5. Uskladnění štěpů   | 34 |
| 3.6. Rozmrazení štěpů   | 34 |
| 3.7. Transplantace štěpů  | 35 |
| 3.8. Protokol imunosuprese  | 38 |
| 3.9. Pooperační péče a farmakoterapie   | 39 |
| 3.10. Explantace štěpů  | 40 |
| <b>4. SLEDOVANÉ PARAMETRY</b>   | 41 |

|   |    |
|---|----|
| 4.1. Hmotnost zvířat  | 41 |
| 4.2. Koncentrace takrolimu v periferní krvi příjemců  | 41 |
| 4.3. Histologické vyšetření aortálních štěpů  | 42 |
| 4.3.1. Imunohistochemické vyšetření   | 43 |
| 4.3.2. Detekce CD4+, CD8+ pozitivních buněk a buněk<br>s von Willebrandovým faktorem            | 45 |
| 4.3.3. Detekce Lewis MHC buněk II třídy   | 46 |
| 4.3.4. Detekce imunoglobulinů   | 46 |
| 4.4. Detekce donor specifických anti-MHC protilátek I. a II. třídy<br>v periferní krvi příjemců | 47 |
| 4.4.1. Získání splenocytů k vyšetření periferní krve příjemců<br>průtokovou cytometrií          | 47 |
| 4.4.2. Vyšetření periferní krve příjemců průtokovou cytometrií                                  | 48 |
| 4.5. Statistické metody   | 49 |
| <b>5. VÝSLEDKY</b>  | 50 |
| 5.1. Hmotnost zvířat  | 50 |
| 5.2. Koncentrace takrolimu v periferní krvi příjemců  | 51 |
| 5.3. Histologické vyšetření   | 52 |
| 5.4. Infiltrace adventicie imunokompetentními buňkami   | 56 |
| 5.5. Donor specifické protilátky anti-MHC I. třídy v periferní krvi příjemců                    | 58 |
| 5.6. Donor specifické protilátky anti-MHC II. třídy v periferní krvi příjemců                   | 60 |
| <b>6. DISKUZE</b>   | 61 |
| <b>7. ZÁVĚR</b>   | 68 |
| <b>8. LITERATURA</b>  | 69 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>9. VLASTNÍ PUBLIKAČNÍ AKTIVITA</b>  | 76  |
| <b>10. SEZNAM TABULEK</b>  | 80  |
| <b>11. SEZNAM OBRÁZKŮ</b>  | 81  |
| <b>12. PŘÍLOHY</b>   | 82  |
| 12.1. Příloha A  | 82  |
| <p>Spunda R, Hruby J, Mericka P, Mlcek M, Pecha O, Splith K, Schmelzle M, Krenzien F, Lindner J, Matia I, Spacek M. Immunosuppressive protocols with tacrolimus after cryopreserved aortal allotransplantation in rats. <i>PLoS One</i> 2018; 13(8):e0201984. doi: 10.1371/journal.pone.0201984. eCollection 2018; IF 2.766</p>    |     |
| 12.2. Příloha B  | 100 |
| <p>Spunda R., Hruby J., Adamec M., Matia I., Spacek M. Cold-stored arterial allografts for in situ reconstruction of infected prosthetic grafts: Review of immunosuppressive protocols used in clinical practice. <i>European Surgery - Acta Chirurgica Austriaca</i> 2016;48:166-168; IF 0.503</p>                                |     |
| 12.3. Příloha C  | 103 |
| <p>Špaček M, Měříčka P, Janoušek L, Štádl P, Adamec M, Vlachovský R, Guňka I, Navrátil P, Thieme F, Špunda R, Burkert J, Staffa R, Němec P, Lindner J Current vascular allograft procurement, cryopreservation and transplantation techniques in the Czech Republic. <i>Adv Clin Exp Med.</i> 2019 Apr;28(4):529-534; IF 1.179</p> |     |
| 12.4. Příloha D  | 109 |
| <p>Špaček M, Měříčka P, Janoušek L, Štádl P, Adamec M, Vlachovský R, Guňka I, Navrátil P, Thieme F, Mitáš P, Špunda R, Špatenka J, Staffa R, Němec P, Lindner J. Organization model for allotransplantations of cryopreserved vascular grafts in Czech Republic. <i>Cell Tissue Bank.</i> 2018 Sep;19(3):437-445; IF 1.527</p>     |     |

## 1. ÚVOD

### 1.1. Historie allotransplantace tepenných štěpů

S tepennými štěpy se v cévní chirurgii setkáváme již od jejích raných počátků. Ve svých experimentálních pracích je popsal jeden ze zakladatelů cévní chirurgie Alexis Carrel, který je používal při pokusech s cévním stehem (Carrel A, 1912) a později za svou práci v roce 1912 získal Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu. Po druhé světové válce pak byly tepenné štěpy využívány v klinické praxi jako náhrady cévního řečiště. Byly zároveň zkoumány způsoby odběru, uchovávání a vlastních transplantací (Gross RE et al., 1949). V roce 1951 pak Charles Dubost ve Francii provedl první úspěšnou resekci a náhradu výdutě břišní aorty allogenní tepnou a popsal výsledky po pětíměsíčním sledování (Dubost C. et al., 1952).

Postupem času se použití tepenných štěpů rozšířilo v Evropě i ve Spojených státech amerických a zdálo se, že zastupují optimální biologickou cévní náhradu (Szilagyí DE et al., 1957). Po tomto prvotním rozmachu s uspokojivými krátkodobými výsledky však vyšlo najevo, že použití tepenných štěpů má svá specifika včetně komplikací, které se začaly objevovat později ve střednědobém a dlouhodobém sledování. Právě po delší době od transplantace začala stěna štěpů degenerovat a u většiny z nich došlo k uzávěru nebo dilataci s následnou rupturou. Takové komplikace často vedly ke ztrátě končetiny nebo dokonce k úmrtí pacienta. Na konci šedesátých let byly publikovány výsledky studií na větších souborech pacientů, kde byla uváděna pětiletá průchodnost aortoilických rekonstrukcí 40% až 56% v případě femoropopliteální oblasti pouze 7% až 26%. V některých případech musela být rekonstrukce částečně nebo zcela nahrazena cévní protézou právě pro její dilataci, která s sebou přinášela riziko ruptury s možnými fatálními následky (Meade JW et al., 1966; Szilagyí DE et al. 1970). Tyto neuspokojivé výsledky byly i tehdy spojovány s imunologickou reakcí. Degenerativní změny štěpů byly přičítány

rejekci štěpu způsobené imunogenicitou tepenných alloštěpů a jejich používání bylo na ústupu.

Tento trend podpořil další vývoj a četnost používání cévních protéz. Jedná se o cévní náhrady, které jsou z cizorodého materiálu jako je dakron nebo polytetrafluoretylen. Umělé cévní protézy měly ve srovnání se špatnou dlouhodobou průchodností tepenných štěpů výsledky podstatně lepší. Jejich dostupnost navíc nebyla závislá na vhodném dárci, tak jak tomu je u aloštěpů.

Pětiletá průchodnost se u cévních protéz odvíjí převážně od hemodynamických a anatomických poměrů v cévním řečišti. V případě aortoilických rekonstrukcí (Prager M. et al., 2001) se pohybuje mezi 89% až 92%, v případě femoropopliteálních rekonstrukcí (AbuRahma AF et al., 1999; Johnson WC, Lee KK, 2000; Klinkert P. et al., 2003) je mezi 38% až 68%. Výsledky používání alloštěpů tak nemohly konkurovat cévním protézám a téměř se přestaly používat.

Paradoxně rychlý rozmach používání cévních protéz však vedl opět k znovuzavedení tepenných štěpů do klinické praxe. V případě infekčních komplikací cévních protéz, které patří mezi velmi závažné a vyžadují specifickou léčbu, se totiž ukázalo, že při jejich řešení mají alloštěpy nezastupitelné místo (Camiade C. et al., 2001; Hannon RJ et al., 1996).

Další významnou roli si alloštěpy vydobyly na poli chirurgické revaskularizace bérceových tepen v případě nedostatku autologních štěpů. Žilní alloštěpy ať již chladem konzervované nebo kryokonzervované jsou v těchto situacích vhodným štěpem volby.



## 1.2. Imunogenicita tepenných štěpů

Z řady experimentálních prací i klinických studií je zřejmé, že alloštěpy vykazují silný imunogenní potenciál (Matia I. et al., 2007; Mirelli M. et al., 1999). Hlavní podstatou této imunogenicity je exprese antigenů hlavního histokompatibilního systému I. třídy (MHC I), ke které dochází na buňkách hladkých svalů v cévní stěně tepenných štěpů. Imunitní reakce je patrná ve všech vrstvách cévní stěny. Prvotní změny lze pozorovat v intimální vrstvě, která je tvořena endotelovými buňkami. Původní dárcovské endotelové buňky jsou v prvních dnech po transplantaci poškozeny vlivem ischemie a reperfuze, mechanicky při odběru štěpu, jeho konzervaci a následnou transplantací. Toto poškození tedy není způsobené imunitní reakcí a dárcovské endotelové buňky v prvním týdnu po transplantaci regenerují. Po této fázi následuje další nekróza endotelových buněk, tentokrát již na podkladě celulární imunitní odpovědi organismu. Mikroskopicky lze pozorovat nekrózu buněk s adhezí makrofágů. Dárcovské endotelové buňky jsou imunitním systémem příjemce zničeny koncem třetího týdne po transplantaci. V tomto období se také začínají na vnitřním povrchu štěpu objevovat endotelové buňky hostitele, které následně pokryjí souvislou vrstvou celou plochu vnitřní stěny alloštěpu (Plissonnier D. et al., 1995; Azuma N. et al., 1999).

V případě podávání imunosuprese v dostatečných dávkách bylo pozorováno, že dárcovské endotelové buňky po prvotním neimunologickém poškození dále regenerují a re-endotelizace lumina tepny pokračuje až do úplného překrytí vnitřního povrchu štěpu. V tomto případě se však jedná o dárcovské endotelové buňky. Pokud je imunosuprese vysazena dochází k rychlé destrukci endotelových buněk s následnou intimální proliferací (Azuma N. et al., 1999).

Imunitní reakce postihuje také svalové buňky v tunica media. Na rozdíl od intimální vrstvy a adventicie je v mediální vrstvě přítomno jen minimální množství invadujících imunokompetentních buněk. V prvním až druhém týdnu se však v této vrstvě objevují četná deposita imunoglobulinů. Svalové buňky jsou poškozeny a nakonec nekrotizují a koncem třetího týdne po transplantaci z mediální vrstvy úplně vymizí (Plissonnier D. et al., 1995).

V kontrastu s malou infiltrací mediální vrstvy cévní stěny štěpu je v tunica adventitia podobně jako v tunica intima přítomno velké množství imunokompetentních buněk. Tato intersticiální infiltrace mononukleárními buňkami vytváří charakteristické prstence v okolí adventiciálních vasa vasorum a je patrná v prvních dvou týdnech od transplantace. V dalším průběhu tato infiltrace ustává a je v korelaci s nekrózou a vymizením svalových buněk a tím i antigenů hlavního histokompatibilního systému I. třídy (MHC I). Tato korelace je analogická též s poklesem zánětlivé infiltrace v tunica intima (Plissonnier D. et al., 1995).

Výsledkem imunologické reakce je po šesti měsících fibrotizace tunica adventitia, tunica media je bez svalových buněk a neointima je tvořená endotelovými buňkami příjemcovského původu.

Dalším projevem imunitní reakce proti antigenům transplantovaného štěpu je vzestup protilátek proti hlavnímu histokompatibilnímu systému (anti-MHC), které lze detekovat v periferní krvi příjemce. Bylo zjištěno, že měřením koncentrace těchto protilátek lze posuzovat intenzitu reakce (Mirelli M. et al., 1999; Costa AN et al., 1997).

### 1.3. Imunosuprese po transplantaci tepenných štěpů v experimentu

Současně se studiem imunogenicity alloštěpů jako takové, byl v experimentech zjišťován i vliv imunosupresivní terapie na jejich destrukci imunitními procesy. Na zvířecích modelech byly k potlačení imunitní odpovědi příjemců použity různé imunosupresivní léky. Jejich použití bylo úzce spjato s vývojem nových imunosupresivních preparátů používaných v transplantační medicíně. Imunosupresivní protokoly s azathioprinem (Vickery CM et al., 1965), azathioprinem a prednisonem (Todd IA, Boctor ZN 1966), 6-merkaptopurinem (Williams GM et al., 1975), cyklosporinem A (Schmitz-Rixen T. et al., 1988), sirolimem (Gregory CR et al., 1993), cyklosporinem s methylprednisolonem a azathioprinem (Lemstrom K. et al., 1994), mykofenolát mofetilem (Hullett DA et al., 1996), takrolimem (Azuma N. et al., 1999) 15-deoxyspergualinem (Lacha J. et al., 2000), cyklosporin A a FTY720 (Nikolova Z. et al., 2000), takrolimem a FR260330 (Ouyang J. et al., 2005) byly experimentálně používány ve studiích od šedesátých let.

Nejlepší výsledky byly pozorovány při použití kombinace cyklosporinu A a mykofenolát mofetilu. Wagner et al. (Wagner E. et al., 1995) zjistil 100% průchodnost femorálních aloštěpů 20 týdnů po jejich transplantaci do femorální tepny u psů. Imunitní reakce byla výrazně snížena použitím této imunosupresivní kombinace a aloštěpy tak nebyly imunitním systémem příjemců destruovány. Avšak samotný cyklosporin A v dávce 10 mg/kg/den nebo samotný mykofenolát mofetil v dávce 20 mg/kg/den nezlepšily celkovou průchodnost alloštěpů.

I přes prokázanou imunogenicitu tepenných alloštěpů, její ovlivnění podáváním imunosuprese se zlepšením průchodnosti rekonstrukcí však nedošlo k většímu rozmachu používání imunosupresivních léků po transplantaci alloštěpů. Vedlejší účinky

imunopresivních léčiv a vysoké riziko podávání imunoprese pacientům s aktivní infekcí v případě implantace alloštěpu při infekci cévní protězy tak vedly k provedení dalších studií, tentokrát s opožděným podáváním imunoprese. Podstata tohoto opožděného podávání imunoprese tkví v tom, že několik dní po transplantaci, kdy imunoprese není podávána, imunitní systém nestihne štěp destruovat a zároveň není omezena jeho funkce v době, kdy je potřeba, aby napomohl v léčbě aktivní infekce.

Matia et al. (Matia I. et al., 2007) provedl experimentální studii, ve které byly transplantovány chladem konzervované štěpy abdominální aorty z potkanů kmene Brown-Norway potkanům kmene Lewis. Takrolimus byl podáván intramuskulárně v denní dávce 0,2 mg/kg od 7. do 30. dne po transplantaci (koncentrace takrolimu v periferní krvi příjemců byla  $4,9 \pm 0,6 \mu\text{g/l}$ ). Tento imunopresivní protokol vedl k inhibici infiltrace stěny alloštěpu imunokompetentními buňkami hostitelského původu, inhibici nekrózy buněk hladkého svalstva v tunica media a v neposlední řadě vedl i k inhibici adventiciální infiltrace CD4 a CD8 pozitivními buňkami. Navíc byla prokázána inhibice produkce protilátek proti hlavnímu histokompatibilnímu systému (anti-MHC I třídy a anti-MHC II třídy). Zásadním konečným výsledkem použití tohoto protokolu pak bylo zabránění destrukce cévní stěny alloštěpu imunitní reakcí příjemce.

#### **1.4. Imunosuprese v klinické praxi**

Navzdory experimentálně prokázané imunogenicitě cévních štěpů a pozitivnímu vlivu imunopresivní léčby na rejekční změny, není podávání imunoprese po transplantaci alloštěpů cévními chirurgy všeobecně akceptována. Obzvláště u pacientů s infekcí cévní protězy je podávání imunoprese po transplantaci cévního štěpu ať již chladem konzervovaného nebo kryokonzervovaného spojeno s rizikem závažných

komplikací způsobených aktivní infekcí a současně podávanou imunosupresí. Na druhé straně rizika vzniklá rejekční reakcí jako jsou ruptura štěpu s krvácením nebo trombotický uzávěr s kritickou končetinovou ischemií jsou silným argumentem podporující podávání imunosuprese.

Pupka et al. v roce 2011 publikoval komplexní práci, kde popisuje použití imunosuprese u pacientů po náhradě infikované cévní protězy v aortální pozici alloštěpem (Pupka A. et al., 2011). V této prospektivní srovnávací studii z jednoho pracoviště byla jedna skupina pacientů (24 pacientů) léčena imunosupresivou, konkrétně cyklosporinem A. Druhá skupina pacientů (26 pacientů) neměla kvůli vlastnímu rozhodnutí žádnou imunosupresi. Třetí skupina (27 pacientů) zahrnovala pacienty, u nichž nebyl chladem konzervovaný tepenný alloštěp k dispozici (žádný dárce) nebo pacienti s transplantací štěpu od mrtvého dárce nesouhlasili. Tito pacienti byli léčeni implantací protězy potažené stříbrem, která má ve srovnání s protézou bez stříbra antibakteriální účinky. Imunosupresivní protokol byl založen na podávání cyklosporinu A v denních dávkách 1-3 mg na kg tělesné hmotnosti. Cílová koncentrace v séru se v této studii pohybovala mezi 140-150 mg/l. Lék byl podán až do konce studie s tím, že průměrná doba sledování byla 22,8 měsíce. Výše popisované závažné komplikace jako trombóza štěpu (12%), ruptura štěpu (12%), ruptura štěpu se smrtí pacienta (8%) a aneuryzmatické změny štěpu (8%) byly pozorovány pouze u skupiny pacientů, která nebyla léčena imunosupresivou. V této studii nebyly popsány žádné nežádoucí účinky imunosuprese.

Mirelli et al. prezentoval v roce 2005 studii se třiceti pacienty, kteří podstoupili ABO-kompatibilní transplantaci tepenného alloštěpu. Devět pacientů po transplantaci užívalo imunosupresivní léčbu cyklosporinem A v denní dávce 1-3 mg/kg, ostatní pacienti imunosupresi nedostávali (Mirelli M. et al., 2005). Autoři popisují překvapivě imunitní

odpověď u obou skupin pacientů a to navzdory imunosupresivní léčbě. Ve srovnání s 21 neimunosupresivními pacienty však byla imunitní odpověď u pacientů léčených cyklosporinem A méně výrazná a opožděná. Klinicky nebyly zaznamenány žádné rozdíly mezi pacienty léčenými cyklosporinem nebo bez něj a žádný pacient neměl známky rekurentní infekce v pozdním sledování.

Šebesta a kol. popsal v roce 2011 dobré klinické výsledky u 23 pacientů, kterým byla alloštěpem nahrazena infikovaná aorto-femorální protetická rekonstrukce a následně byli léčeni imunosupresí cyklosporinem A. V tomto souboru byla výsledná koncentrace imunosupresiva v séru 50-150 mg/l (Sebesta P. et al., 2011). U sledovaných pacientů byly popsány dobré střednědobé výsledky provedených rekonstrukcí.

Mirelli et. al. také v roce 1999 popsal imunitní odpověď na tepenné alloštěpy použité u deseti pacientů s infekcí rekonstrukcí v aortoilické oblasti. Ve studii popisuje silnou anti-HLA protilátkami zprostředkovanou odpověď, kterou shledal podobnou chronické rejekci. Tato reakce byla pozorována i přes imunosupresi za použití cyklosporinu A v denní dávce 1-3 mg/kg (Mirelli M. et al., 1999). Stejný tým pak na základě o rok starší studie vydal doporučení, že by pacienti po aortální allotransplantace měli mít indukovanou imunologickou toleranci podáváním imunosupresivních léků (Scolari MP et al., 1998). Toto doporučení bylo podloženo zjištěním nesouladu indukce tvorby specifických IgG protilátek proti HLA I. třídě a HLA II. třídě 1, 3, 6, a 12 měsíců po transplantaci.

Z provedených experimentů a studií je zřejmé, že časné podávání imunosupresivních léků po transplantaci alloštěpů s sebou nese rizika ze zhoršení probíhající infekce a zároveň absence této léčby zvyšuje rizika z časné degenerace rekonstrukce. Na základě zkušeností s opožděným podáváním imunosuprese tak začala některá evropská centra používat

imunosupresivní protokol skládající se z perorálně podávaného takrolimu od 7. dne po transplantaci. Podává se po celou dobu, po kterou je alloštěp průchodný a pravidelně se kontroluje jeho koncentrace v krvi, která je udržována v rozmezí od 4 do 7  $\mu\text{g/l}$ . Průměrná počáteční denní dávka je 6 mg/den podávaná perorálně, udržovací denní dávka je 2 mg za den (Špaček M. et al., 2018).

### **1.5. Imunosupresivum takrolimus**

Jako vhodná alternativa běžně používaných imunosupresiv se v transplantaci cévních alloštěpů jeví takrolimus. Tento moderní imunosupresivní preparát je odvozen od makrolidových antibiotik. Byl objeven a izolován v roce 1984 z hub rodu *Streptomyces tsukubaensis*. V dnešní době je běžně používán k imunosupresivní terapii po transplantaci jater a ledvin. Stejně jako cyklosporin A patří do skupiny kalcineurínových inhibitorů, které zabraňují aktivaci imunitního systému tím, že inhibují aktivitu enzymu kalcineurínu (Dumont FJ, 2000). Má selektivní účinek na T lymfocyty založený na inhibici aktivace T lymfocytů cestou růstového faktoru IL-2 (interleukin 2) (Faivre L et al., 2001). Dalším důležitým účinkem je také interference s TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta) v cévní stěně štěpů, čímž zabraňuje akceleraci fibrotizace transplantovaných štěpů, což je v případě cévních alloštěpů zásadní (Wang T. et al., 1994). Je 10-100krát účinnější než cyklosporin A (Goto T. et al., 1991). V klinické praxi po transplantaci ledvin vedlo používání takrolimu k signifikantnímu snížení rizika selhání štěpu bez zvýšení incidence nežádoucích účinků v souvislosti s dlouhodobou imunosupresivní terapií ve srovnání s cyklosporinem A (Vincenti F. et al., 2002). Navíc bylo potvrzeno, že takrolimus, intramuskulárně podávaný v denní dávce 5 mg/kg/den (cílové koncentrace nebyly ve studii sledovány), dokáže vylepšit viabilitu dárcovských buněk i cévní integritu v

kryokonzervovaných aortálních hrudních štěpech transplantovaných mezi potkany kmenů Brown-Norway a Lewis (Kiji T. et al., 2003).

### **1.6. Allotransplantace chladem konzervovaných tepenných štěpů**

Rozmach používání cévních protéz v 80. a 90. letech minulého století s sebou přinesl některé specifické komplikace, mezi které patří infekce. Ty se sice vyskytují pouze v 1% až 6% případů, jejich následky jsou však spojeny až s 50% rizikem amputace končetiny a v případě aortoilických rekonstrukcí až se 70% rizikem úmrtí (Hannon RJ et al., 1996). Léčba těchto infekčních komplikací spočívá v cílené antibiotické terapii, odstranění infikované protézy a zajištění krevního zásobení novou rekonstrukcí. To lze realizovat novou, extraanatomickou rekonstrukcí, kdy je bypass veden mimo anatomický průběh cév. Může tak být uložen ve zdravé, infekcí nedotčené tkáni, kdy je riziko opětovné infekce cévní protézy relativně malé. Tento typ rekonstrukce však není u velké části nemocných možný a nová rekonstrukce musí probíhat anatomicky, v místech, kde byla uložena infikovaná protéza. I přes důkladné odstranění infikované protézy a okolních tkání je nová rekonstrukce uložena v infikovaném terénu a je vystavena vysokému riziku reinfekce. V takovém případě je nutné k rekonstrukci použít odolný materiál, který se i v podmínkách infikovaného terénu může vhojit. V současnosti mají takové vlastnosti biologické náhrady buď autogenní (pacientovy vlastní) nebo od dárce, tzv. alloštěpy. Biologické náhrady umožňují fyziologický průběh obranných mechanismů organismu i prostup antibiotik do okolních tkání s reálnou možností vyhojení infekce. Tepenné štěpy se ukázaly v tomto případě jako vhodné řešení (Camiade C. et al., 2001; Chiesa R. et al. 1998) a další experimentální práce potvrdily odolnost tepenných alloštěpů vůči infekci



(Knosalla C. et al., 1998; Litzler PY et al., 1999), která je vysvětlována právě biologickou povahou těchto štěpů.

V otázce řešení infekcí cévních protéz mají tepenné štěpy nezastupitelnou pozici a v mnoha případech lze s jejich použitím provést končetinu nebo život zachraňující rekonstrukci cévního řečiště. I přes stále probíhající výzkum a nezodpovězené otázky týkající se imunogenicity tepenných štěpů a jejím případným ovlivněním imunosupresivními léky jsou v současnosti alloštěpy v indikaci infekce cévních protéz používány na většině pracovišť cévní chirurgie.

Další skupinou pacientů, u kterých je indikované použití tepenných štěpů tvoří nemocní, kteří potřebují chirurgický revaskularizační výkon dolních končetin a zároveň již mají spotřebované vlastní žilní štěpy po předchozích operacích (Prager M. et al., 2002). Cévní protézy mají v případě distálních bypassů na bérkové tepny příliš malý krevní průtok a dochází v nich často k trombóze. Průsvit periferních tepen v těchto lokalizacích je navíc často příliš malý a je tak ve velkém nepoměru s cévní protézou. Chladem konzervované tepenné alloštěpy byly pro infrainguinální rekonstrukce používány již od počátků cévní rekonstrukční chirurgie v 50. letech minulého století, nicméně byly později opouštěny z důvodů aneurysmatických degenerativních změn a uzávěrů (Barner HB et al., 1966). Znovuzavedení do klinické praxe začalo v některých cévně – chirurgických centrech ve Francii v devadesátých letech minulého století. Jedna z nejobsáhlejších studií publikovaná v roce 2000 Albertinim et al. popisuje skupinu 148 pacientů s kritickou končetinovou ischemií, kteří byli léčeni implantací chladem konzervovaného tepenného alloštěpu. Tito nemocní ovšem nebyli pooperačně léčeni žádnými imunosupresivními léky a zároveň u nich byla popsána špatná dlouhodobá průchodnost rekonstrukcí s degenerativními změnami štěpů (Albertini JN et al., 2000).

## 1.7. Allotransplantace kryokonzervovaných tepenných štěpů

Jednou z hlavních nevýhod chladem konzervovaných tepenných alloštěpů je jejich omezená dostupnost. V případě, že je pacient ať již z důvodu infekce cévní protézy nebo z důvodu kritické končetinové ischemie indikován k výkonu s použitím chladem konzervovaného alloštěpu, je zařazen na čekací listinu a operace je provedena až když se naskytne vhodný dárcce ve smyslu ABO kompatibility a anatomicky vyhovujícího štěpu ve smyslu délky a průsvitu.

Štěpy určené ke kryokonzervaci jsou odebírány v rámci multiorgánových odběrů. Dále jsou pak uloženy do transportního média a odeslány do kryobanky, hluboce zamrazeny a uloženy v parách tekutého dusíku. Takto uložené kryokonzervované alloštěpy lze dlouhodobě skladovat, kdykoliv rozmrazit a použít, což je v porovnání s chladem konzervovanými alloštěpy jejich hlavní výhoda. Jejich relativní nevýhodou je vyšší cena, která se odvíjí od procesu odběru a dalšího zpracování.

Využití kryokonzervovaných alloštěpů je stejně jako u chladem konzervovaných alloštěpů indikováno převážně u infekčních komplikací cévních protéz a u pacientů s kritickou končetinovou ischemií, kteří nemají vlastní resp. autologní štěp (Matia I. et al., 2010) Hartranft v práci publikované v roce 2014 popisuje smíšený soubor 53 pacientů s kritickou končetinovou ischemií, periferními defekty, infekcí cévní protézy a klaudikacemi, kteří byli léčeni transplantací kryokonzervované velké safény od dárce (Hartranft CA et al., 2014). Obdobně jako v Albertiniho souboru (Albertini JN et al., 2000) ani tito pacienti nebyli pooperačně léčeni imunosupresivními léky a zároveň u nich byla popsána špatná dlouhodobá průchodnost bypassů s degenerativními změnami štěpů.

## **1.8. Současný stav klinického použití kryokonzervovaných tepenných štěpů v České republice**

Program využívání kryokonzervovaných cévních alloštěpů byl v České Republice zahájen v roce 2011. Mezi důvody, které zvýšení zájmu o kryokonzervované alloštěpy v této době zapříčinily, patří nepochybně rozmach používání cévních protéz a tím pádem i nárůst počtu pacientů s infekčními komplikacemi. Zároveň se zvýšil počet pacientů s kritickou končetinovou ischemií, kteří již mají spotřebovány autologní štěpy a zároveň u nich nelze použít cévní protéza z důvodu vysokého rizika infekce, špatného výtokového traktu nebo kombinace obou těchto důvodů.

Pro obě tyto skupiny pacientů je řešením implantace alloštěpu, který musí splňovat několik kritérií a to ABO kompatibilitu, anatomicky vhodné rozměry a bezprostřední dostupnost. V případě chladem konzervovaných štěpů jsou pacienti indikovaní k implantaci zařazeni na celorepublikový waiting list, který je uložen a aktualizován v Koordinačním středisku transplantací (KST) v Praze. Čekací doba na chladem konzervovaný alloštěp je průměrně 2-3 týdny, což pro některé pacienty může znamenat ztrátu končetiny nebo vznik komplikací bezprostředně ohrožujících jejich život.

Právě čekací doba byla hlavním impulzem pro vznik programu "Kryokonzervovaných cévních alloštěpů", do kterého jsou zapojena velká cévně-chirurgická a transplantační centra v Praze, Brně a tkáňová banka v Hradci Králové. Cévní štěpy jsou odebírány v rámci multiorgánových odběrů, následně jsou v konzervačním roztoku transportovány do kryobanky, kde jsou uloženy v parách tekutého dusíku. V případě potřeby jsou pak uvolněny a převezeny v transportním boxu do příslušného centra. Během celého procesu musí být dodržovány přísné zákonné směrnice a normy, které jsou

pravidelně kontrolovány Státním ústavem pro kontrolu léčiv (SÚKL) (Špaček M. et al., 2019).

Dalším z důvodů zavedení programu kryokonzervovaných alloštěpů byly změny v legislativě. V roce 2004 vstoupila v platnost Směrnice Evropského parlamentu a Rady (EU Directive 2004/23/EC), která má zajišťovat vysokou kvalitu a bezpečnost tkání a buněk, používaných pro transplantace u lidí. Tato změna zákona vedla k zastavení používání alloštěpů v mnoha evropských zemích včetně Francie i Německa (Fellmer P. et al., 2011; Kieffer E. et al. 2004). V České republice upravuje nakládání s tkáněmi a tudíž i cévními štěpy zákon č. 285/2002 Sb. který umožňuje použití čerstvých štěpů v režimu transplantace orgánů do 48 hodin od odběru (Špaček M. et al., 2018).

Po transplantacích jak chladem konzervovaných, tak i kryokonzervovaných alloštěpů je na většině pracovišť v České republice používána imunosupresivní terapie a dosavadní výsledky ve smyslu střednědobé průchodnosti a záchrany končetin jsou příznivé.

## **2. HYPOTÉZA**

Imunosupresivní terapie po transplantaci alloštěpů není i přes řadu experimentálních a klinických studií na řadě pracovišť stále akceptována. Obzvláště pacienti s infekcí cévní protézy jsou často ve velmi vážném stavu se septickými projevy. Je pochopitelné, že podávání imunosuprese v takové chvíli může celkový stav i prognózu pacientů ještě zhoršit. Řada pracovišť z těchto důvodů imunosupresi po transplantaci tepenných alloštěpů vůbec nepodává. Moderní imunosupresivní protokoly s opožděným podáváním imunosupresivních léků však dávají možnost razantní léčby infekce v bezprostředním pooperačním období bez alterace vlastních imunitních procesů organismu

a zároveň zabraňují rejekčním pochodům po transplantaci, které později vedou k destrukci štěpu. Předpokládáme, že imunosupresivní protokol s takrolimem v monoterapii podávaným příjemcům kryokonzervovaných tepených alloštěpů od prvního i sedmého pooperačního dne v denní dávce 0,2 mg/kg/den zabrání aktivaci imunitního systému příjemce a rejekci dárcovské tepny 30 dnů po její transplantaci.

## **2.1. Cíle dizertační práce**

Cílem naší experimentální práce je zjistit efekt podávání imunosuprese pomocí takrolimu na buněčnou a protilátkami zprostředkovanou imunitní reakci po transplantaci kryokonzervovaných tepenných štěpů u potkanů. Odebrané štěpy břišní aorty od dárců potkanů kmene Brown – Norway budou transplantovány potkanům kmene Lewis. Imunosuprese bude následně podávána ve dvou rozdílných protokolech:

1. jedné skupině potkanů kmene Lewis bude takrolimus aplikován intramuskulárně v dávce 0,2 mg/kg od 1. do 30. dne po transplantaci
2. druhé skupině bude takrolimus aplikován také intramuskulárně ve stejné dávce od 7. do 30. dne po transplantaci

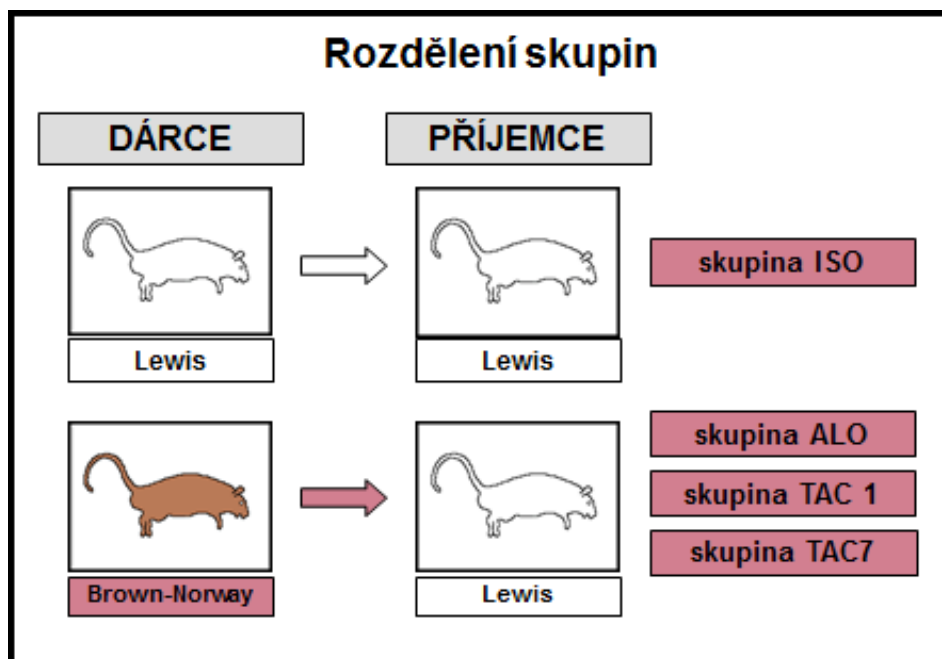
## **3. MATERIÁL A METODY**

### **3.1. Rozvržení experimentu**

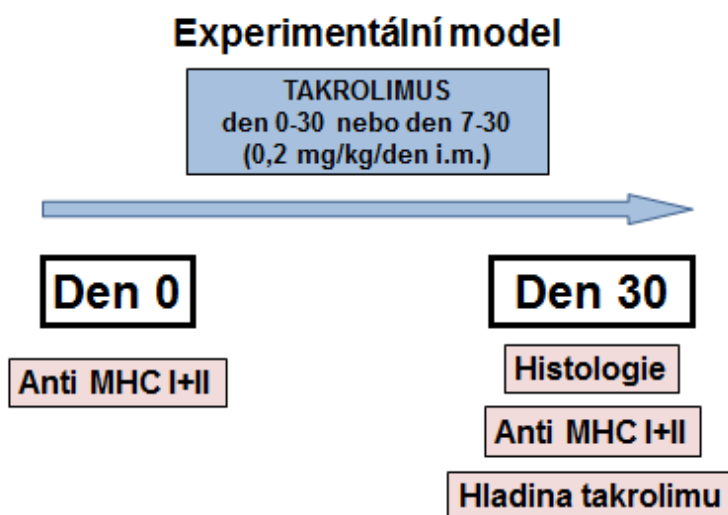
V experimentu jsme použili samce potkanů kmene Brown-Norway a Lewis. Všechny výkony jsme prováděli v celkové intramuskulární anestezii s použitím operačního mikroskopu s 10násobným zvětšením. Aortální štěpy jsme odebrali od potkanů kmene Brown-Norway i Lewis a bezprostředně po odběru je vložili do konzervačního roztoku Celsior (Genzyme, Holandsko) o teplotě 4 st. Celsia. Doba studené ischemie aortálního

štěpu (měřená od naložení aortální svorky v těle dárce až po začátek procesu kryokonzervace) byla průměrně 180 minut. Následně jsme aortální štěpy zamrazili metodou používanou licencovaným tkáňovým zařízením (Tkáňová ústředna Fakultní nemocnice Hradec Králové). Štěpy jsme poté skladovali v tekutém dusíku po dobu 6 měsíců. Před transplantací jsme štěpy pomalu kontrolovaně rozmrazili při teplotě 4 st. Celsia. Doba studené ischemie od rozmrazení do transplantace byla průměrně 3,5 hodiny. Po rozmrazení jsme štěpy transplantovali syngenně od zvířat kmene Lewis potkanům kmene Lewis (skupina ISO) a allogenně mezi kmeny Brown – Norway (dárce) a Lewis (příjemci, skupina ALO). Skupině ALO jsme nepodávali v pooperačním období žádnou imunosupresi. V dalších dvou allogenních skupinách (TAC1 a TAC7) jsme stejně jako ve skupině ALO provedli allogenní transplantaci aortálních štěpů od zvířat kmene Brown-Norway příjemcům kmene Lewis. Ve skupině TAC1 jsme však podávali intramuskulárně takrolimus v dávce 0,2 mg/kg/den od 1. pooperačního dne po dobu 30 dnů a v allogenní skupině TAC7 jsme aplikovali takrolimus v dávce 0.2 mg/kg/den od 7. pooperačního dne po dobu 30 dnů. Štěpy jsme ve všech čtyřech skupinách 30. pooperační den explantovali a připravili k histologickému a imunohistochemickému zpracování. Třicátý pooperační den jsme také odebrali vzorky periferní krve příjemců aortálních štěpů ve všech skupinách.

V odebraných biologických vzorcích příjemců jsme hodnotili následující parametry: 1 -celkový histologický obraz štěpu, 2 - šířku tunica intima a media, 3 - přítomnost a počet příjemcovských CD4, CD8 a MHC II+ pozitivních buněk 4 - přítomnost endotelových buněk, 5 - přítomnost IgG v tunica media, 6 - koncentraci protilátek proti MHC I+ a II+ antigenům dárce v periferní krvi příjemců, 7 - koncentraci takrolimu v periferní krvi příjemců (obrázek 1, 2)



Obrázek 1 - Rozdělení experimentálních skupin podle typu transplantace.



Obrázek 2 - Experimentální model.

### 3.2. Zvířata a experimentální skupiny

V průběhu experimentu byly kontrolovány a dodržovány principy práce s laboratorními zvířaty (Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes). Experiment byl také projednán a schválen Etickou komisí 1. lékařské fakulty University Karlovy (č.: UK 1. LF 563/13, MSMT-14808/2014-6). (příloha 1) V experimentu jsme použili samce potkanů pocházející z chovné stanice Charles River v Německu. Potkanům kmene Lewis (LEW; MHC haplotyp RT1<sup>l</sup>) o váze 191 až 250 g (n = 24) jsme implantovali allogenní nebo syngenní štěpy břišní aorty. Syngenní štěpy jsme odebrali od samců kmene Lewis (LEW; MHC haplotyp RT1<sup>l</sup>) o váze 248 až 254 g (n=3), allogenní štěpy byly odebrány od potkanů kmene Brown-Norway (BN; MHC haplotyp RT1<sup>n</sup>) o váze 191 až 254 g (n = 9).

Příjemce jsme rozdělili do 4 skupin. (tabulka 1) Do skupiny ISO byla zařazena zvířata, u kterých jsme provedli isogenní transplantaci, během které byl aortální štěp odebrán zvířatům z kmene Lewis a implantován zvířatům kmene Lewis. U zbylých příjemců jsme provedli allogenní transplantaci štěpu. Při této transplantaci byly štěpy odebrané zvířatům z kmene Brown-Norway transplantovány zvířatům kmene Lewis. Zvířata po allogenní transplantaci buď nedostávala imunosupresi vůbec a byla zařazena do skupiny ALO, nebo imunosupresi dostávala intramuskulárně v dávce 0,2 mg/kg/den. Ve skupině TAC1 jsme imunosupresi podávali od prvního pooperačního dne a ve skupině TAC7 jsme imunosupresi podávali s odstupem 7 dnů po transplantaci.

Pro vyšetření koncentrace donor specifických anti-MHC protilátek I. a II. třídy 30. den po transplantaci v periferní krvi příjemců kmene Lewis bylo nutné získat splenocyty darcovského kmene Brown-Norway. Jako zdroj splenocytů jsme použili sleziny od dalších jiných 10 samců kmene Brown-Norway (BN; MHC haplotyp RT1<sup>n</sup>, váha 200 až 250 g,



n=10), pocházejících také z chovné stanice Charles River (Würzburg, Německo). Proces odběru slezin a vlastního získávání splenocytů je podrobně popsán níže v kapitole o sledovaných parametrech.

| Skupina | Charakteristika skupiny | Medián kryokonzervace (dny) | Imunosuprese               | Počet hodnocených zvířat |
|---------|-------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| ISO     | LEW - LEW               | 171                         | bez                        | 6                        |
| ALO     | BN - LEW                | 181                         | bez                        | 6                        |
| TAC1    | BN - LEW                | 181                         | takrolimus<br>1. - 30. den | 6                        |
| TAC7    | BN - LEW                | 180                         | takrolimus<br>7. - 30. den | 6                        |

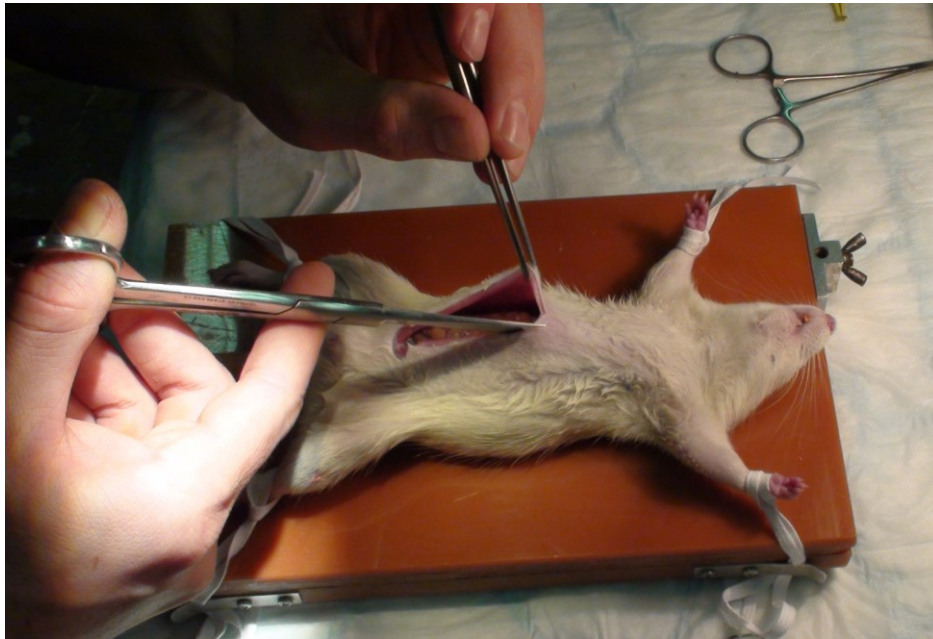
**Tabulka 1 - Charakteristika skupin.** LEW - kmen Lewis, BN - kmen Brown-Norway

### 3.3. Odběr štěpů

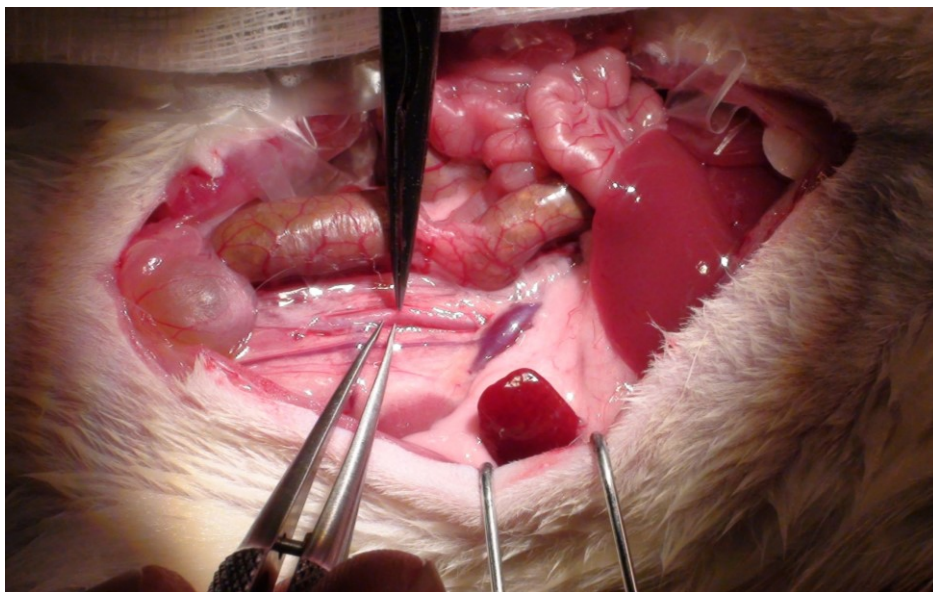
V experimentu jsme prováděli allogenní i syngenní transplantace, bylo tedy potřeba odebrat štěpy od obou kmenů potkanů. Syngenní štěpy jsme odebrali od samců kmene Lewis (LEW; MHC haplotyp RT1<sup>l</sup>) o váze 248 až 254 g (n=3), allogenní štěpy jsme odebrali od potkanů kmene Brown-Norway (BN; MHC haplotyp RT1<sup>n</sup>) o váze 191 až 254 g (n = 9). Od každého zvířete jsme odebrali dostatečně dlouhý úsek břišní aorty na to, abychom ho po rozmrazení, před vlastní transplantací, rozdělili na dvě části a získali tak dva plnohodnotně implantabilní štěpy pro dva příjemce.

Dárce štěpů aorty jsme před výkonem zvlášť a uvedli do celkové anestézie pomocí intramuskulárně aplikované směsi ketaminu v dávce 100 mg/kg (Narkamon®, Spofa) a

xylazinu v dávce 10 mg/kg (Rometar®, Spofa). Léky jsme aplikovali do stehenního svalu. Zvíře jsme pak umístili do chovné klece a počkali, až začnou působit anestetika a potkan usne. Po uspání jsme v místě plánované laparotomie oholili srst a následně jsme provedli přípravu a dezinfekci operačního pole. Dárce jsme za končetiny připevnili k operační desce a opatrně, abychom neporanili břišní orgány, provedli střední laparotomii nůžkami. Břišní stěnu jsme pomocí rozvěráčků odhrnuli do stran a získali tak přístup do břišní dutiny. Po odpreparování a odsunutí břišních orgánů jsme s použitím operačního mikroskopu s 10-ti násobným zvětšením provedli incizi zadního listu peritonea. Subrenálně jsme poté vypreparovali aortu a dolní dutou žílu. Do dolní duté žíly jsme následně aplikovali heparin v dávce 100 IU/kg aby při odběru nedošlo k trombóze krve v aortě. Po distribuci heparinu v krevním oběhu zvířete jsme naložili na břišní aortu svorku a odstříhli její cca 1 cm dlouhý segment. Štěp jsme bezprostředně po odběru propláchli dvěma mililitry konzervačního roztoku s obsahem heparinu (100 IU/ml). Štěpy jsme při procesu kryokonzervace plánovali ukládat po dvou, polovinu z nich jsme proto označili stehem, založeným do okraje a odlišili tak sudé a liché. Štěpy byly v dalším průběhu uloženy do roztoku Celsioru (Genzyme, Holandsko) a ve sterilním obalu kryokonzervovány řízenou kryokonzervací. Průměrný čas studené ischemie štěpů (CIT) před kryokonzervací byl 180 minut. Po ukončení odběru jsme provedli eutanasií dárce injekčním podáním letální dávky tiopentalu (Thiopental®, Spofa Czech Rep) do dolní duté žíly. (obrázek 3, 4, 5)



**Obrázek 3 - Odběr štěpů I.** Dárce jsme za končetiny připevnili k operační desce a opatrně, abychom neporanili břišní orgány, provedli střední laparotomii nůžkami. Břišní stěnu jsme pomocí rozvěráčků odhrnuli do stran a získali tak přístup do břišní dutiny.



**Obrázek 4 - Odběr štěpů II.** Preparace subrenálního úseku břišní aorty. Břišní orgány jsou odsunuty doleva a uloženy do navlhčeného, teplého mulového čtverce



**Obrázek 5 - Odběr štěpů III.** Štěp jsme bezprostředně po odběru propláchli dvěma mililitry konzervačního roztoku s obsahem heparinu (100 IU/ml). I tato fáze experimentu byla prováděna s použitím operačního mikroskopu s desetinásobným zvětšením. Zároveň jsme stehem, založeným za okraj označili polovinu štěpů.

### **3.4. Kryokonzervace štěpů**

Kryokonzervaci odebraných alloštěpů jsme prováděli bezprostředně po odebrání všech aortálních štěpů v daný operační den. Celková průměrná doba studené ischemie od odběru štěpu do jeho kryokonzervace byla 180 minut. Z důvodu minimalizace časových rozdílů i vlastní studené ischemie u jednotlivých štěpů jsme prováděli odběr štěpů, popsaný v předchozí kapitole, šesti až osmi dárčům v jedné době. Konzervace cév byla provedena metodou používanou tkáňovým zařízením (Tkáňová ústředna Fakultní nemocnice Hradec Králové) licencovaným národní kompetentní autoritou (Měřička P. et al., 2011; Měřička P. et al., 2014) s modifikacemi vynucenými podmínkami práce na experimentálním operačním sále, kam jsme dovezli veškerou potřebnou techniku a materiál a následně jsme provedli všechny níže popsané postupy. Při odběru a zpracování

cév jsme použili pouze vysoce kvalitní materiál a léčiva pro humánní použití splňující podmínky směrnice Evropského parlamentu a Rady č. 23/2004/ES.

Odebrané štěpy jsme po proplachu uložili do předchlazeného konzervačního roztoku Celsioru (Genzyme, Holandsko) a uzavřeli do certifikovaných kelímků (Medfor 250 ml, Farnborough, Velká Británie). Kelímky se vzorky v Celsioru jsme následně uchovávali v boxu se suchým ledem do doby ukončení všech odběrů. Poté, co byly odběry ukončeny, jsme cévy vždy po dvou přendali do sterilních, dvojitých plastických vaků na jedno použití (CryoMACS Freezing Bag 500, Miltenyi, Biotec, GmbH, SRN) obsahujících 25 ml vychlazeného 6% roztoku hydroxyetylškrobu, molekulové hmotnosti 130 000 Da (Voluven 6%, Fresenius Kabi, SRN). Vaky jsme označili štítky s datem odběru a číslem štěpu. Všechny štěpy jsme zaevidovali tak, aby nedošlo k jejich záměně. Zamražen byl vždy jeden označený a jeden neoznačený štěp, aby bylo možné identifikovat po rozmrazení každý jednotlivý štěp. Obsah vaku jsme poté smísili se stejným objemem předchlazeného kryoprotektivního roztoku, který obsahoval 20% dimetylsulfoxid (DMSO, WAK Chemie Medical, GmbH, SRN) v 6% roztoku hydroxyetylškrobu (Voluven 6%, Fresenius Kabi, SRN). Po zatavení vaků na svářečce (STERISEAL B 83-R, Čevor, s.r.o., ČR) jsme vaky vložili do kovových kazet (ST – 100, Consarctic, GmbH, Schölkrippen, SRN) a uchovávali v boxu se suchým ledem až do vlastního zmrazování. Zmrazování rychlostí -1K/min do -90°C, následně -5K/min do -150°C jsme provedli v programovatelném zmrazovacím zařízení Kryo-10 (Planer, Biomed, Sunburry on Thames, Anglie). Bezprostředně po zamrazení jsme kazety s konzervovanými cévami převezli v transportním boxu se suchým ledem do kryokonzervačního skladu tkáňového zařízení Ústavu hematologie a krevní transfúze v Praze, kde byly skladovány v tekutém dusíku při teplotě -190°C až do doby implantace. (obrázek 6, 7, 8)



**Obrázek 6 - Kryokonzervace štěpů I.** Vaky se štěpy uloženými v předchlazeném kryoprotektivním roztoku, který obsahoval 20% dimetylsulfoxid (DMSO) a 6% roztok hydroxyetylškrobu (Voluven), jsme zatavili na svářečce a následně vložili do kovových kazet, ve kterých se dále zamrazovaly.



**Obrázek 7 - Kryokonzervace štěpů II.** Vaky se štěpy v kryoprotektivním roztoku jsme vložili do kovových kazet, ve kterých byly následně zamrazeny. Vaky jsme označili štítky s datem odběru, číslem štěpu a všechny štěpy jsme zaevidovali.





**Obrázek 8 - Kryokonzervace štěpů III.** Svářečka certifikovaných, plastových vaků (vlevo) a programovatelné zmrazovací zařízení Kryo - 10, ve kterém jsme štěpy zamrazovali rychlostí 1K/min do  $-90^{\circ}\text{C}$ , následně 5K/min do  $-150^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5. Uskladnění štěpů

Po procesu zmrazování byly kovové kazety s konzervovanými cévami převezeny z operačního sálu Fyziologického ústavu 1. LF UK v transportním boxu se suchým ledem do kryokonzervačního skladu tkáňového zařízení Ústavu hematologie a krevní transfúze v Praze. V tomto zařízení byly za stálých podmínek při teplotě  $-190$  st. Celsia skladovány v parách kapalného dusíku až do doby implantace, kdy byly převezeny zpět na operační sál, kontrolovaně rozmrazeny a následně transplantovány. Průměrná doba kryokonzervace byla 176 dní.

### 3.6. Rozmrazení štěpů

V den transplantace jsme kazety se štěpy převezli v transportním boxu s kapalným dusíkem ze skladu tkáňového zařízení Ústavu hematologie a krevní transfúze v Praze na

operační sál Fyziologického ústavu 1. LF UK. Vaky se štěpy jsme vyndali z kazet a uložili k rozmrazení na 60 minut do lednice při teplotě 4°C. Dalších 60 minut jsme štěpy rozmrazovali při pokojové teplotě. Následně jsme štěpy z vaků vyjmuli a každý štěp rozdělili na dvě stejně dlouhé části. Každou část jsme následně vložili zvlášť do kelímku s 10 ml studeného konzervačního roztoku Celsior (Genzyme, Holandsko). V konzervačním roztoku byly štěpy uloženy při teplotě 4 st. Celsia do doby začátku první anastomózy v těle příjemce. Celková průměrná doba studené ischemie štěpů po rozmrazení byla 210 minut.

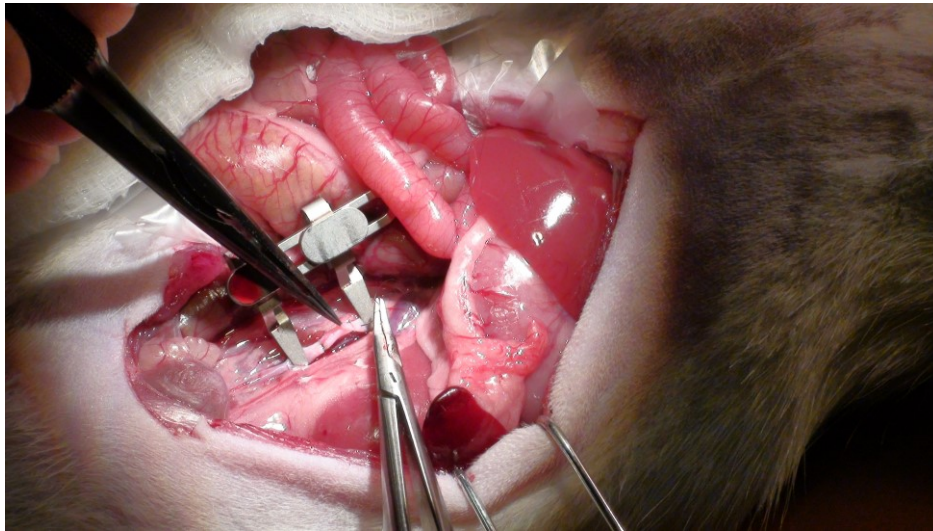
### **3.7. Transplantace štěpů**

Transplantace štěpů byla jedna z nejnáročnějších fází experimentu. Operace vyžadovaly jemnou, přesnou a důslednou operační techniku za použití operačního mikroskopu s 10-ti násobným zvětšením a mikrochirurgických nástrojů a materiálů. Pro našívání anastomóz jsme použili nevstřebatelné monofilní vlákno Prolene 10/0, přičemž jsme použili techniku jednotlivě uzlených stehů. Na jednu anastomózu jsme tak museli založit a zauzlit cca 12 stehů. Na těsnosti a pooperační průchodnosti anastomóz byl závislý celý experiment a fáze našívání štěpu tak někdy trvala i několik desítek minut. Ve vodní lázni jsme na 37 stupňů Celsia ohřívali nádobu s fyziologickým roztokem, kterým jsme v pravidelných intervalech polévali mulové čtverce, do kterých jsme odhrnuli a uložili střeva zvířat. Tak jsme zajistili minimální traumatizaci tkání, dobrou funkci gastrointestinálního a dobré prospívání potkanů po operaci. Celé operační pole jsme navíc ohřívali lampou (tepelným zářičem), abychom minimalizovali operační stres zvířat.

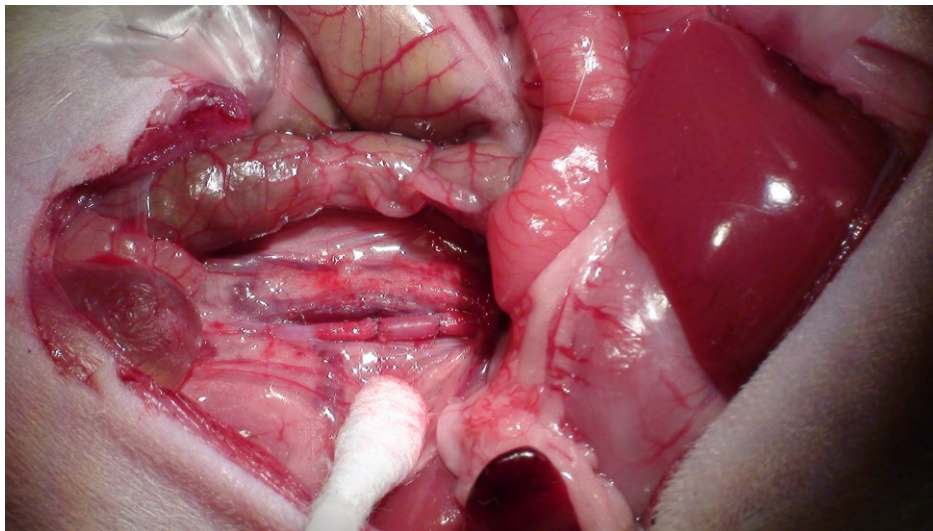
Příjemce štěpů aorty jsme před výkonem zvážili a uvedli do celkové anestezie pomocí intramuskulárně aplikované směsi sufentanilu v dávce 20 µg/kg (Sufenta®, Janssen Pharmaceutica Inc.) a azaperonu v dávce 1 mg/kg (Stresnil®, Janssen



Pharmaceutica Inc.). Při transplantacích jsme použili jinou kombinaci anestetik než při odběrech štěpů k zajištění lepšího buzení zvířat po operaci. Po podání anestetik bylo zvíře uloženo do klece, kde začala působit anestetika. V celkové anestezii jsme pak provedli, stejně jako u odběru štěpů, přípravu operačního pole, potkana jsme připevnili za končetiny na operační desku a oholili srst v místě plánované laparotomie. Po provedení laparotomie a nasazení rozvěráčků do rány jsme odhrnuli břišní orgány a uložili je do čtverců, které jsme polévali ohřátým fyziologickým roztokem. Po prnutí parietálního peritonea a preparaci retroperitoneálně uložených velkých cév jsme uvolnili subrenální úsek břišní aorty. Následně jsme za použití aproximátoru provedli ortotopickou transplantaci břišní aorty rozmrazeným štěpemse dvěma anastomózami koncem ke konci jako interpozit do subrenální břišní aorty příjemce. Pro našívání anastomóz jsme použili nevstřebatelné monofilní vlákno Prolene 10/0 kterým jsme vytvářeli cévní anastomózy technikou jednotlivě uzlených stehů. Po našítí štěpu, povolení aproximátoru a kontrole hemostázy jsme břišní orgány uložili zpět do břišní dutiny a provedli suturu břišní stěny a kůže pokračovacím, vstřebatelným stehem. (obrázek 9,10,11) Příjemci byli následně označeni na ocasu nesmývatelnou, netoxickou barvou a uloženi do klecí připravených ve vyhřívaném prostoru, kde se probouzeli. Peroperačně, po uspání, ale před vlastní operací jsme také provedli odběr krve ke stanovení koncentrace a dynamiky donor specifických anti MHC protilátek I. a II. třídy. Odběr byl proveden punkcí očního sinu podle van Hercka (van Herck H. et al., 1998) pomocí heparinizované skleněné kapiláry. Krev byla následně odstředěna a separované krevní sérum odesláno v Eppendorfových mikroskopických kádličkách k dalšímu vyšetření.



**Obrázek 9 - Transplantace štěpů I.** Anastomózy jsme zhotovovali po naložení aproximátoru (speciální cévní svorka) na subrenální úsek břišní aorty. Při operacích byla použita mikrochirurgická technika včetně operačního mikroskopu s desetinásobným zvětšením.



**Obrázek 10 - Transplantace štěpů II.** Kryokonzervovaný alloštěp našitý jako interpozit do subrenálního úseku břišní aorty. Perioperačně bylo nutné dbát na těsnost anastomóz a hemostázu, aby nedocházelo ke zbytečným pooperačním komplikacím, které by mohly zapříčinit znehodnocení celého experimentu.



**Obrázek 11 - Transplantace štěpů III.** Po dokončení rekonstrukčního výkonu na abdominální aortě byla provedena sutura operační rány na břiše.

### **3.8. Protokol imunosuprese**

Imunosupresivum takrolimus (Prograf®, Astellas Pharma Inc.) jsme podávali intramuskulárně, rozpuštěné ve fyziologickém roztoku v dávce 0,2 mg/kg/den. Lék jsme aplikovali do stehenního svalu, přičemž místa aplikací jsme každý den stranově střídali a čas aplikace jsme každý den dodržovali stejný. Zvířatům ze skupiny TAC1 jsme tuto dávku aplikovali od 1. pooperačního dne. Zvířatům ze skupiny TAC7 jsme imunosupresi ve stejných dávkách podávali s odstupem sedmi dnů od transplantace. Prvních šest pooperačních dní jsme zvířatům ve skupině TAC7 a v kontrolních skupinách ISO a ALO aplikovali placebo ve formě fyziologického roztoku. Placebo jsme aplikovali intramuskulárně ve stejném objemu i čase jako dávky léků imunosuprimovaných zvířat. Dávky imunosupresiv i placebo včetně strany aplikace jsme po každé dávce zaznamenávali do denního záznamu pro každé zvíře zvlášť. Podle protokolu podávání imunosuprese tak byli příjemci rozděleni do čtyř experimentálních skupin - ISO, ALO, TAC1, TAC7. (tabulka 1)

### 3.9. Pooperační péče a farmakoterapie

V pooperačním a celém sledovaném období jsme příjemcům nepodávali žádné antiagregační ani antikoagulační přípravky. Zvířata jsme po dobu experimentu barevně označili nezávadnou barvou na ocasu a jednotlivě chovali v klecích s originálními denními záznamy o celkovém stavu, váze, hybnosti, aplikaci léků a odběrech vzorků. V místnosti s klecemi byla zajištěna stálá teplota, byly minimalizovány stresující faktory prostředí a zvířatům byl zajištěn dostatečný přísun potravy a tekutin. Každý den jsme zvířata ve stejnou dobu zvážili, zkontrolovali jejich celkový stav včetně hybnosti a aplikovali jim léky. (obrázek 12)



**Obrázek 12 - Pooperační péče.** Chovná klec s označením, do které jsme uložili potkana po transplantaci. Pro každé zvíře byl zároveň veden denní záznam s údaji o pooperačním stavu, aplikaci léků a hmotnosti. Aby nedošlo k záměně záznamů a zvířat, označili jsme potkany na ocasu netoxickou, nesmyvatelnou barvou.

### 3.10. Explantace štěpů

Třicátý pooperační den jsme provedli explantaci štěpů. Před operací jsme provedli poslední kontrolu celkového stavu potkanů včetně kontroly váhy. Poté jsme zvířata uvedli do celkové anestezie pomocí intramuskulárně aplikované směsi ketaminu (Narkamon®, Spofa) v dávce 100 mg/kg a xylazinu (Rometar®, Spofa) v dávce 10 mg/kg. Po uspání jsme potkany upevnili na operační desku a provedli střední relaparotomii. Přes volnou dutinu břišní jsme vypreparovali retroperitoneálně našitý aortální štěp. Při preparaci jsme hodnotili případné aneurysmatické či jiné makroskopicky hodnotitelné známky rejekce nebo obliterace štěpu. Po dostatečném uvolnění celého štěpu jsme do dolní duté žíly aplikovali heparin v dávce 100IU/kg a po naložení cévních svorek jsme štěp explantovali společně s oběma anastomózami a částmi aorty příjemce. Štěpy jsme následně připravili na další histologické a imunohistochemické vyšetření. Při přípravě jsme za použití operačního mikroskopu spolehlivě odstranili oblasti cévních anastomóz, abychom z dalšího hodnocení vyloučili části vzorků ovlivněné přítomností cizorodého materiálu ve formě stehů a tkáňové reakce na ně. V průběhu explantace jsme zvířatům provedli také odběr krevních vzorků do Eppendorfových mikrozkušavek ke stanovení koncentrace a dynamiky donor specifických anti MHC protilátek I. a II. třídy a u imunosuprimovaných zvířat koncentrace takrolimu. Zvířata jsme nakonec usmrtili letální dávkou tiopentalu (Thiopental®, Spofa Czech Rep) aplikovaného injekčně do dolní duté žíly. Operační výkon explantace štěpů jsme stejně jako odběr a implantaci štěpů prováděli s použitím operačního mikroskopu s 10-ti násobným zvětšením.

## **4. SLEDOVANÉ PARAMETRY**

### **4.1. Hmotnost zvířat**

Po transplantaci štěpů jsme denně prováděli kontrolu hmotnosti zvířat, která sloužila jako indikátor dobrého pooperačního stavu a funkce vnitřních orgánů. Hodnoty jsme zaznamenávali do originálních tabulek pro každé zvíře zvlášť, které jsme označili stejnou značkou jako zvíře a uložili u jednotlivých klecí. Zvířatům byl zajištěn dostatečný přísun potravy a tekutin. V chovné místnosti jsme udržovali stabilní teplotu a zároveň jsme eliminovali rušivé vlivy z okolí. Při vážení jsme u zvířat kontrolovali také celkový stav a hybnost zadních končetin, jejíž porucha nepřímo vypovídá o poruchách prokrvení a uzávěru rekonstrukce. Do zhojení jsme také kontrolovali stav operační rány. Na konci kontroly jsme zvířatům ze skupin TAC1 a TAC7 aplikovali imunosupresi intramuskulární injekcí. V případě skupin ALO, ISO a prvních 6 dní u skupiny TAC7 jsme aplikovali čistý fyziologický roztok ve stejném objemu, jaký by byl použit při podávání imunosuprese.

### **4.2. Koncentrace takrolimu v periferní krvi příjemců**

Koncentraci takrolimu jsme stanovovali 30. den po transplantaci z krve odebrané z dolní duté žíly před explantací štěpů. K vyšetření jsme použili soupravu pro homogenní enzymovou imunoanalýzu Emit® 2000 Tacrolimus assai (Dade Behring). Vyšetření koncentrace imunosupresiva jsme prováděli z důvodu kontroly v obou imunosuprimovaných skupinách. Ve skupině TAC1 byl takrolimus podáván od 1. pooperačního dne, ve skupině TAC7 byl takrolimus podáván až od 7. dne. Pro porovnání případných rejekčních změn bylo tedy zásadní, aby imunosuprese byla na konci experimentu v obou skupinách srovnatelná. V případě, že by se koncentrace v obou

imunosuprimovaných skupinách významně lišila, nebylo by možné výsledky experimentu správně interpretovat.

### **4.3. Histologické vyšetření aortálních štěpů**

Všechny explantované štěpy jsme histologicky vyšetřili. K vlastní analýze jsme odebrali střední úseky štěpů fixované v 10 % formolu, aby vyšetření nebyla ovlivněna hojivými procesy v oblastech anastomóz a reakcí tkání na šicí materiál. Štěpy jsme po explantaci za použití operačního mikroskopu očistili od přiložených okolních tkání, odstranili jsme obě anastomózy a po konečné kontrole explantátů jsme přistoupili k další přípravě na histologické vyšetření. Části očištěných alloštěpů jsme uložili do speciálních plastových boxů Sakura Finetek Tissue Tek© Cryomold holders (Sakura Finetek, Tokyo, Japonsko) a zalili je gelovým fixačním roztokem Sakura Finetek Tissue Tek© O.C.T. compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japonsko). Preparáty jsme ve vaničkách zamrazili v lázni s 2-methylbutanem (Fluka Chemika, Buchs, Švýcarsko) pomocí tekutého dusíku a následně jsme vaničky s preparáty uložili při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$  do dalšího zpracování. Histologické vyšetření jsme provedli po definitivním zpracování a zalití do parafínu z 5  $\mu\text{m}$  tlustých parafinových řezů za použití barvení hematoxylin-eosinem a barvením podle Van-Giesona na elastická vlákna. Hodnotili jsme tloušťku a kontinuitu intimy, rozsah intimální proliferace eventuálně destrukce a tloušťku mediální vrstvy. Tunica intima od povrchu intimálních buněk k vnitřní hranici tunica media, mediální vrstvu pak mezi vnitřní a vnější elastickou membránou. Měření jsme prováděli v náhodných lokalizacích na 10 místech v každém řezu. Průměrnou hodnotu se standardní odchylkou jsme stanovili pro každou aortu i skupinu zvlášť. Preparáty jsme hodnotili naslepo tak, aby nebylo známo, ke které skupině



vyšetřovaný vzorek patří a byla tak zajištěna nestrannost experimentu. Při histologickém vyšetřování jsme z preparátů pořizovali fotodokumentaci.

#### 4.3.1. Imunohistochemické vyšetření

Vzorky pro imunohistochemické vyšetření jsme zpracovávali podobně jako u prostého histologického vyšetření také ze střední části štěpů, které jsme v plastových boxech (Tissue Tek©, Cryomold, Sakura, Japonsko) zalili gelovým fixačním roztokem (Tissue Tek©, Cryomold, Sakura, Japonsko). Boxy jsme následně vložili do lázně s 2-methylbutanem (Fluka, Chemika, Švýcarsko) a zamrazili pomocí tekutého dusíku. Po dobu, než jsme provedli imunohistochemické vyšetření, byly boxy skladovány při teplotě -80°C. V tabulce 3 jsou uvedeny protilátky, které jsme k imunohistochemické detekci antigenů použili.

|                    |   |
|--------------------|---|
| CD4+ buňky         | Primární protilátka: anti-CD4<br>(W3/25, Cymbus Biotechnology LTD, Hampshire, UK)<br>Sekundární protilátka: Histofine® Simple Stain Rat<br>MAX PO (Nichirei Biosciences Inc., Japonsko)<br>Detekční systém: Dako Liquid DAB+ Substrate-<br>Chromogen System (Dako Denmark A/S, Glostrup,<br>Dánsko) |
| CD8+ buňky         | Primární protilátka: anti-CD8<br>(OX-8, Cymbus Biotechnology LTD, Hampshire, UK)<br>Detekční systém: Histofine® Simple Stain Rat MAX<br>PO (Nichirei Biosciences Inc., Japonsko)<br>Detekční systém: Dako Liquid DAB+ Substrate-<br>Chromogen System (Dako Denmark A/S, Glostrup,<br>Dánsko)        |
| Endoteliální buňky | Primární protilátka: anti-Von Willebrand factor   |



|                              |  |
|------------------------------|--|
|                              | <p>(Dako Denmark A/S, Glostrup, Dánsko)</p> <p>Sekundární protilátka: Histofine® Simple Stain Rat MAX PO (Nichirei Biosciences Inc., Japonsko)</p> <p>Detekční systém: Dako Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dánsko)</p>  |
| Lewis MHC II pozitivní buňky | <p>Primární protilátka: anti RT1.B<sup>u</sup><br/>(MRC-OX3, Cedarlane Laboratories Ltd., Burlington, Kanada)</p> <p>Sekundární protilátka: horse anti mouse antibody<br/>(Vector Lab, Burlingame, USA)</p> <p>Detekční systém: R.T.U. Vectastain Elite ABC, Reagent<br/>(Vector Lab, Burlingame, USA)</p> |
| Imunoglobuliny G             | <p>Primární protilátka: anti rat IgG conjugated with<br/>fluorescein isothianate (Chemicon International Inc., Temecula, USA)</p>  |
| MHC I třídy                  | <p>Primární protilátka: anti-RT1.Ac<br/>(OX-27, Acris Antibodies GmbH, Herford, Německo)</p> <p>Sekundární protilátka: PE-Cy7-Streptavidin (BD Biosciences, Heidelberg, Německo)</p>   |
| MHC II třídy                 | <p>Primární protilátka: anti-RT1.D<br/>(OX-17, BD Biosciences, Heidelberg, Německo)</p> <p>Sekundární protilátka: PE-Cy7-Streptavidin (BD Biosciences, Heidelberg, Německo)</p>  |

**Tabulka 3 - Specifikace monoklonálních a polyklonálních protilátek použitých při imunohistochemickém vyšetření a při průtokové cytometrii.**

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

Detekce imunokompetentních buněk byla provedena dvojstupňovou nepřímou metodou, při které jsme použili imunoenzymový polymer.

Pro vyšetření přítomnosti a množství imunokompetentních buněk jsme použili 8 µm silné řezy, které jsme nejprve 10 minut fixovali chlazeným acetonem. Následně jsme preparáty osušili a opláchli v 0,2 % roztoku Triton X 100 a ve fosfátovém pufru. Takto připravené vzorky jsme 60 minut inkubovali v roztoku s primární protilátkou (anti-CD4, (W3/25, Cymbus Biotechnology LTD, Hampshire, UK), anti-CD8 (OX-8, Cymbus Biotechnology LTD, Hampshire, UK), anti-Von Willebrand factor (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark)). V dalším kroku jsme inhibovali endogenní peroxidázu v 0,3 % peroxidu vodíku a v 70% metanolu. Tato fáze probíhala 30 minut. Následně jsme vzorky dalších 30 minut inkubovali v roztoku se sekundární protilátkou (imunoenzymový polymer Histofine® Simple Stain Rat MAX PO, Nichirei, Japonsko). Před finálním obarvením Harrisovým hematoxylinem a fixací v Entellanu (Merck KGaA, Darmstadt, Německo) jsme na vzorky 5 minut aplikovali 3,3 diaminobenzidin (Dako Liquid DAB + Substrate-Chromogen System, Dako, Glostrup, Dánsko).

Preparáty jsme hodnotili naslepo tak, aby nebylo známo, ke které skupině vyšetřovaný vzorek patří a byla tak zajištěna nestrannost experimentu. Na vyšetření jsme použili mikroskop s 1000násobným zvětšením. Počet buněk jsme stanovovali v pěti zorných polích, ze kterých jsme spočetli průměrnou hodnotu. Specifikace protilátek použitých při vyšetření je uveden v tabulce 3.

#### 4.3.3. Detekce Lewis MHC II pozitivních buněk

Obdobně jako u detekce CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> buněk jsme toto imunohistochemické vyšetření prováděli na 8 µm silných řezech. Pro vyšetření jsme ovšem použili třístupňovou nepřímou techniku. Vzorky jsme nejprve 10 minut fixovali v chlazeném acetonu, osušili a následně opláchli v 0.2 % roztoku Triton X 100 a fosfátovém pufru. Dále jsme za použití setu Biotin blocking system (Dako, Dánsko) zablokovali endogenní biotin. Po inkubaci s 10 % koňským sérem jsme vzorky 60 minut inkubovali s primární protilátkou. Dalším krokem byla inhibice endogenní peroxidázy v 0,3 % peroxidu vodíku a v 70 % metanolu. Poté proběhla třicetiminutová expozice biotinylovanou koňskou anti-myší protilátkou (Vector Lab, Burlingame, UK). V posledních fázích celého procesu jsme preparáty inkubovali s R.T.U. Vectastain Elite ABC Reagent (Vector Lab, Burlingame, UK) a poté jsme na vzorky na 5 minut aplikovali 3,3 diaminobenzidin (Dako Liquid DAB + Substrate-Chromogen, Dako, Dánsko). Po kontrastním dobarvení jsme vzorky zalili do Entellanu (Merck, Německo). V tabulce 3 jsou uvedeny základní specifikace protilátek použitých při tomto vyšetření. Preparáty jsme následně "slepě" hodnotili tak, aby výsledky vyšetření nemohly být ovlivněny. Buňky jsme sčítali v pěti náhodně vybraných zorných polích při použití vyšetřovacího mikroskopu s 1000násobným zvětšením. Z výsledků jsme nakonec spočetli průměrnou hodnotu.

#### 4.3.4. Detekce imunoglobulinů

Přítomnost imunoglobulinů ve stěně štěpů jsme zjišťovali přímou imunofluorescenční technikou. Řezy 8 µm silné jsme oplachovali ve fosfátovém pufru a dále sušili na vzduchu. Dalších třicet minut jsme vzorky inkubovali s fluorescein isothiocyanátem (Chemicon International Inc, Temecula, California, USA) konjugovanou

primární protilátkou (FITC), uvedenou v přehledu protilátek použitých při imunohistochemických vyšetření v tabulce 3. Vzorky jsme následně opět opláchli, fixovali v glycerinu a bezprostředně poté hodnotili za požití fluorescenčního mikroskopu.

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

Krevní vzorky jsme odebrali zvířatům ve všech skupinách 0. a 30. den po transplantaci. Před transplantací jsme odběr prováděli punkcí očního sinu podle van Hercka (van Herck H. et al., 1998) v celkové anestezii, třicátý pooperační den jsme krevní vzorky odebrali při explantaci štěpů punkcí dolní duté žíly. Vzorky jsme následně odstředili v Eppendorfových mikrozkuvkách a separovali tak krevní sérum, ve kterém jsme koncentraci protilátek dále stanovovali. K vlastnímu vyšetření bylo jako první krok nutné získat splenocyty ze slezin zvířat. Odběr slezin jsme provedli na začátku experimentu a mohli jsme tak zároveň získat základní dovednosti s celkovou anestézií, laparotomií a operační technikou u laboratorních zvířat s použitím operačního mikroskopu. Tyto dovednosti byly důležité pro pozdější vlastní našívání aortálních alloštěpů.

##### **4.4.1. Získání splenocytů k vyšetření periferní krve příjemců průtokovou cytometrií**

Jako zdroj splenocytů jsme použili sleziny od samců potkanů Brown-Norway (n = 10, váha 200-250 g) pocházejících z chovné stanice Charles River (Würzburg, Německo). Zvířata jsme před výkonem zvážili a uvedli do celkové anestézie pomocí intramuskulárně aplikované směsi ketaminu v dávce 100 mg/kg (Narkamon®, Spofa) a xylazinu v dávce 10 mg/kg (Rometa®, Spofa) do stehenního svalu. Po uspání zvířete jsme v místě plánované laparotomie oholili srst a následně provedli přípravu a dezinfekci operačního pole. Po

napolohování a připevnění zvířete k operační desce jsme provedli střední laparotomií nůžkami. Břišní stěnu jsme pomocí rozvěráčků odhrnuli do stran a získali tak přístup do břišní dutiny, ze které jsme vyjmuli slezinu. Po odebrání slezin jsme provedli eutanasií dárce injekčním podáním letální dávky tiopentalu (Thiopental®, Spofa Czech Rep.) do dolní duté žíly. Odebrané sleziny jsme následně zpracovali podle protokolu pro přípravu splenocytů. Krátce po odběru jsme sleziny rozdělili na menší kousky a propasírovali sítkem pomocí pístu injekční stříkačky. Drť jsme poté promyli ve fosfátovém pufru (PBS – Phosphate buffered saline) a vzniklou buněčnou suspenzi jsme dále smíchali s Biocoll separačním roztokem (BioScience, Nottingham, UK). Směs jsme 20 minut odstředovali při 2000 ot./min. a vzniklý supernatant jsme smíchali s 10% fetálním telecím sérem (FCS) a RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs SG, Švýcarsko). Následně jsme směs odstředili v Eppendorfových mikrozkušavkách při 1200 ot. /min. po dobu 10 minut. Tento krok jsme prováděli dvakrát, poté následovalo sečtení a kontrola viability buněk pomocí barvení tryptanovou modří. Buňky pak byly uloženy v nádobkách s kryokonzervačním roztokem (Iscove's Modified Dulbecco's Medium + 20 % FCS) v tekutém dusíku do dalšího zpracování.

#### 4.4.2. Vyšetření periferní krve příjemců průtokovou cytometrií

Vazbu protilátek v příjemcovských potkaních sérech na klidové Brown-Norway splenocyty jsme zjišťovali průtokovou cytometrií. Splenocyty jsme rozmrazili, promyli ve fosfátovém pufru (PBS) a suspendovali v roztoku PBS s 1 % fetálním bovinním sérem (FBS). 100000 buněk jsme pak po dobu 30 minut inkubovali při 4 st. Celsia s 10 µL příjemcovského potkaního séra. Buňky jsme poté dvakrát promyli v roztoku PBS s 1 % FBS a inkubovali s originálními protilátkami ke zjištění exprese MHC. Jako primární

protilátky jsme použili Biotin-MHC I. třídy (anti-RT1.Ac, OX-27, Acris Antibodies GmbH, Herford, Německo) nebo Biotin-MHC II. třídy (anti-RT1.D, OX-17, BD Biosciences, Heidelberg, Německo) a jako sekundární protilátky PE-Cy7-Streptavidin (BD Biosciences, Heidelberg, Německo). FACSCanto II flow cytometrem (BD Biosciences, Heidelberg, Německo) jsme získali 10000 buněk a následně analyzovali pomocí FACSDiva™ programu (BD Biosciences, Heidelberg, Německo). Grafické zpracování nám umožnilo převedení a zhodnocení intenzity fluorescence. Vazba MHC protilátek I. nebo II. třídy na splenocyty, které nebyly inkubovány s potkaním sérem jsme nastavili jako 100 %. Protilátky přítomné v sérech transplantovaných potkanů Lewis se kompetitivně navázaly na molekuly MHC I. a II. třídy exprimovaných na splenocytech z potkanů Brown-Norway. Kompetitivní inhibice vazby fluoresceinem označených protilátek MHC I. a II. třídy tak ve výsledku snížila naměřený fluorescenční signál.

#### **4.5. Statistické metody**

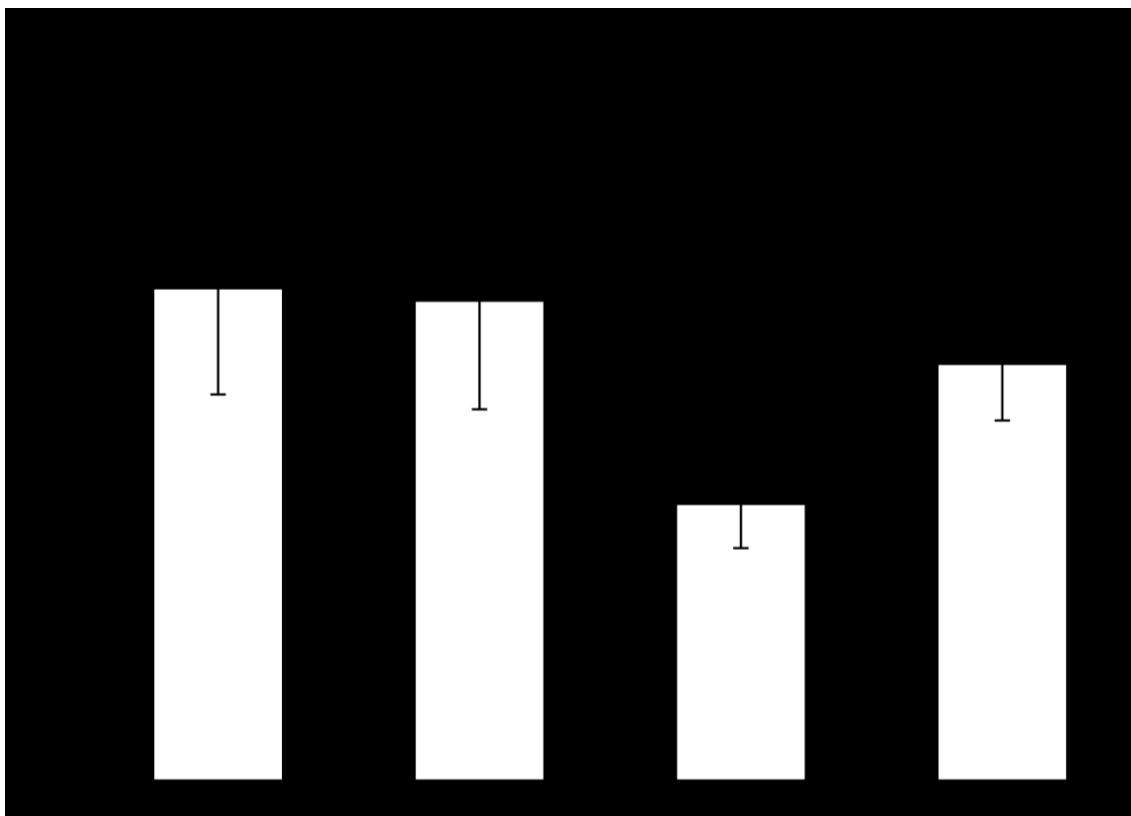
Nashromážděná data z experimentu jsme statisticky zpracovali ve spolupráci s profesionálním statistikem z technologického centra Akademie věd České Republiky. Data jsme nejprve otestovali pomocí testů normality. Jako test normality jsme zvolili Kolmogorovův-Smirnovův test a dále testy šikmosti a špičatosti rozdělení dat. Jelikož data vykazovala jen nevýznamné odchylky od normality, zvolili jsme pro jejich popis a testování parametrické metody. Jako popisný ukazatel polohy souboru jsme zvolili aritmetický průměr a jako ukazatel variability jsme použili směrodatnou odchylku. Výšky sloupců u sloupcových grafů reprezentují průměry a chybové úsečky symbolizují 95 % konfidenční interval. Vzhledem k vyváženému typu designu jsme průměry všech sledovaných parametrů (nárůst hmotnosti, CD4+ buňky, CD8+ buňky, MHC II+ buňky,

anti MHC I a anti MHC II protilátky) mezi skupinami globálně porovnávali pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA). V případě významnosti hlavního efektu ( $p < 0,05$ ) jsme následně provedli párové porovnávání dvojic skupin. K párovému porovnávání jsme použili Tukeyův post-hoc test, který v sobě zahrnuje korekci p-hodnoty vzhledem k mnohočetnému porovnávání. Veškeré výpočty a testování dat jsme provedli ve statistickém programu STATA (verze 12.1). Všechny grafy jsme pak byly vytvořili pomocí škálovatelné vektorové grafiky řízené daty v rámci knihovny D3.js (verze 3.0) v JavaScriptu.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. Hmotnost zvířat

U všech hodnocených zvířat došlo ve sledovaném třicetidenním období k nárůstu hmotnosti. Procentuální nárůst hmotnosti vztažený k předoperační váze byl signifikantně vyšší ( $P < 0,05$ ) u obou skupin bez imunosuprese (skupina ISO +  $47,1 \pm 10,5$  %, skupina ALO +  $46,1 \pm 10,8$  %) ve srovnání se skupinou TAC1 (+  $29,7 \pm 4,4$ %), ve které zvířata dostávala imunosupresi od prvního pooperačního dne. Nárůst hmotnosti u zvířat ve skupině TAC7, která imunosupresi dostávala od sedmého pooperačního dne (+  $41,0 \pm 5,6$  %) však byla srovnatelná s oběma skupinami zvířat bez imunosuprese. Grafické znázornění přírůstku hmotnosti u všech sledovaných skupin je uvedeno níže. (obrázek 13, tabulka 4)



**Obrázek 13 - Procentuální nárůst hmotnosti 30. pooperační den vztažený k předoperační váze.** Zvířata bez imunosuprese (skupina ISO a ALO) měla 30. pooperační den větší nárůst hmotnosti ve srovnání se skupinou TAC1, kde byla imunosuprese podávána od 1. pooperačního dne. Ve skupině TAC7 s imunosupresivní terapií od 7. pooperačního dne byl přírůstek hmotnosti srovnatelný s oběma neimunosuprimovanými skupinami (ISO, ALO).

## 5.2. Koncentrace takrolimu v periferní krvi příjemců

Měření koncentrace takrolimu v periferní krvi jsme prováděli za účelem zjištění adekvátních koncentrací imunosupresiva 3-7 ng/ml při denních dávkách 0,2 mg/kg podávaných v intramuskulárních injekcích. Průměrná koncentrace imunosupresiva třicátý pooperační den byla ve skupině TAC1, ve které zvířata dostávala imunosupresi od 1.



pooperačního dne mírně vyšší ( $4.6 \pm 0.7$  ng/ml) v porovnání se zvířaty, která dostávala takrolimus až od 7. pooperačního dne ve skupině TAC7 ( $4.0 \pm 0.2$  ng/ml) ( $P=0.035$ ) (tabulka 4). Během experimentu jsme nezaznamenali žádné vedlejší účinky podávání takrolimu, jako diarrheu nebo přetrvávající úbytek na váze.

| Skupina | Charakteristika skupiny | Imunosuprese            | Kryokonzervace štěpů (dny) | Nárůst hmotnosti 30. pooperační den (%) | Koncentrace takrolimu 30. pooperační den (ng/ml) |
|---------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|---|--|
| ISO     | LEW – LEW               | ne                      | $172.7 \pm 2.6$            | $47.1 \pm 10.5$                         | ne   |
| ALO     | BN – LEW                | ne                      | $179.3 \pm 2.6$            | $46.1 \pm 10.8$                         | ne   |
| TAC1    | BN – LEW                | takrolimus 1. - 30. den | $180.2 \pm 6.9$            | $29.6 \pm 4.4$                          | $4.6 \pm 0.7$                                    |
| TAC7    | BN – LEW                | takrolimus 7. - 30. den | $180.3 \pm 0.5$            | $40.1 \pm 5.6$                          | $4.0 \pm 0.2$                                    |

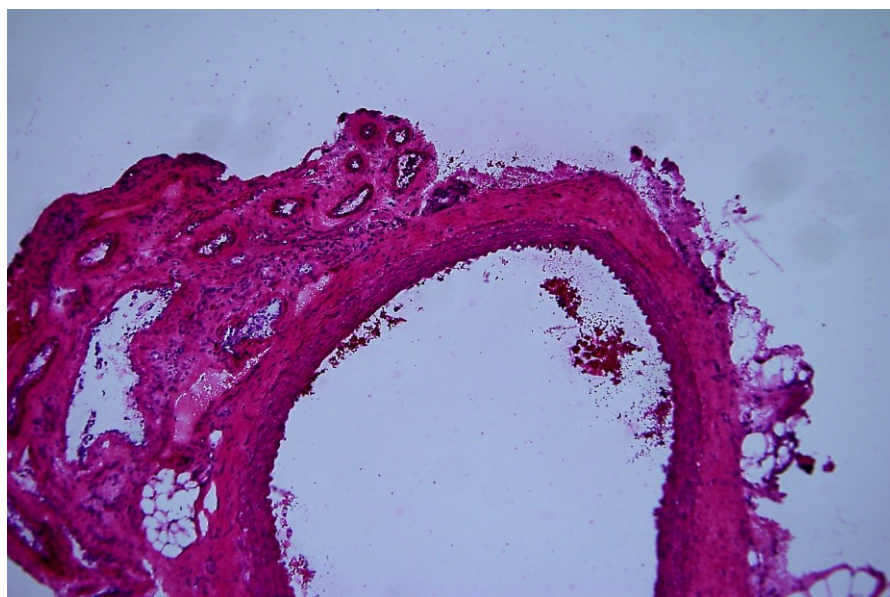
**Tabulka 4 - Základní charakteristika skupin s pooperačním nárůstem hmotnosti a koncentrací takrolimu 30. pooperační den.** LEW – samci kmene Lewis, BN – samci kmene Brown-Norway

### 5.3. Histologické vyšetření

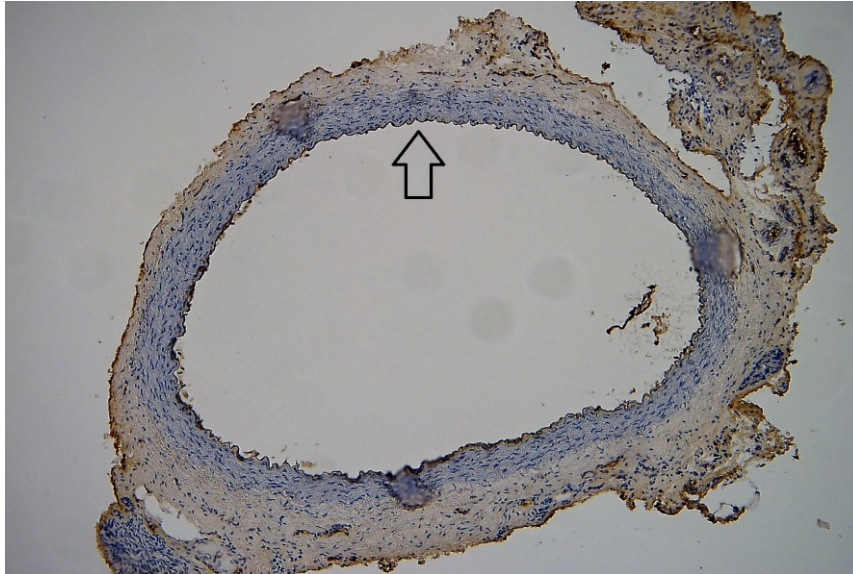
Při histologickém vyšetření jsme zjistili, že aortální štěpy z obou imunosuprimovaných skupin (TAC1, TAC7) mají 30. den po transplantaci fyziologickou stavbu cévní stěny s diferencovatelnými všemi třemi základními vrstvami – tunica intima, tunica media i tunica adventitia. Intraluminální povrch tunica intima byl pokrytý jednou souvislou vrstvou endotelových buněk bez zjevných trhlin, či jiných projevů poškození. V

celém rozsahu tunica media jsme nezaznamenali žádné známky destrukce ani nekrózy buněk. Při imunohistochemickém vyšetření na ukládání imunoglobulinů v tunica media jsme nedetkovali žádná depozita IgG. Infiltrace tunica adventitia mononukleáry byla u obou skupin TAC1 i TAC7 srovnatelná s isogenní skupinou ISO. (obrázek 14 a, b, c). Alloštěpy měly normální histologickou stavbu abdominální aorty se všemi třemi základními anatomickými vrstvami, bez známek intimální hyperplazie, nekrózy buněk hladkých svalů v mediální vrstvě a bez větší adventiciální infiltrace imunokompetentními buňkami.

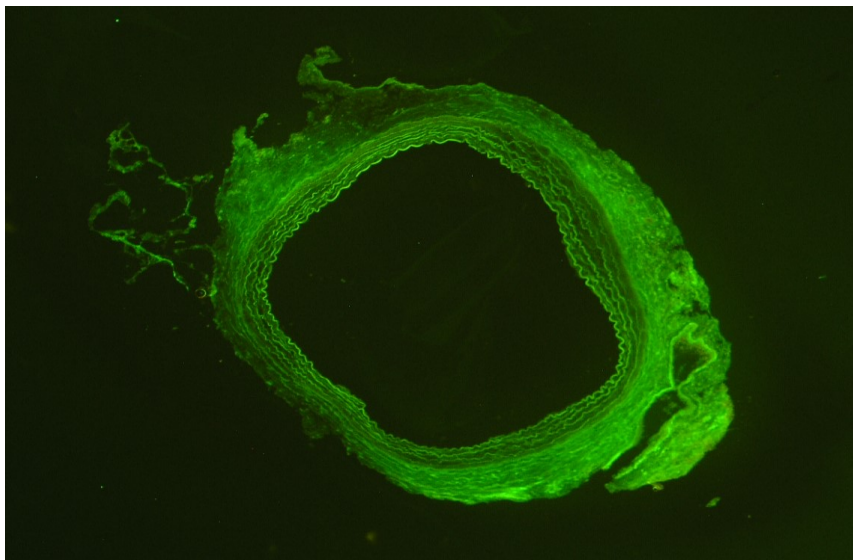
**Obrázek 14 a, b, c – Fotografie z histologického a imunohistochemického vyšetření kryokonzervovaných aortálních alloštěpů 30. pooperační den.**



**Obr. 14 a – Histologické vyšetření kryokonzervovaného aortálního alloštěpu s použitím imunoprese, barvení hematoxilin-eosin. Zvětšení 100x. Alloštěpy měly normální histologickou stavbu abdominální aorty se všemi třemi základními anatomickými vrstvami, bez známek intimální hyperplazie, nekrózy buněk hladkých svalů v mediální vrstvě a bez větší adventiciální infiltrace.**



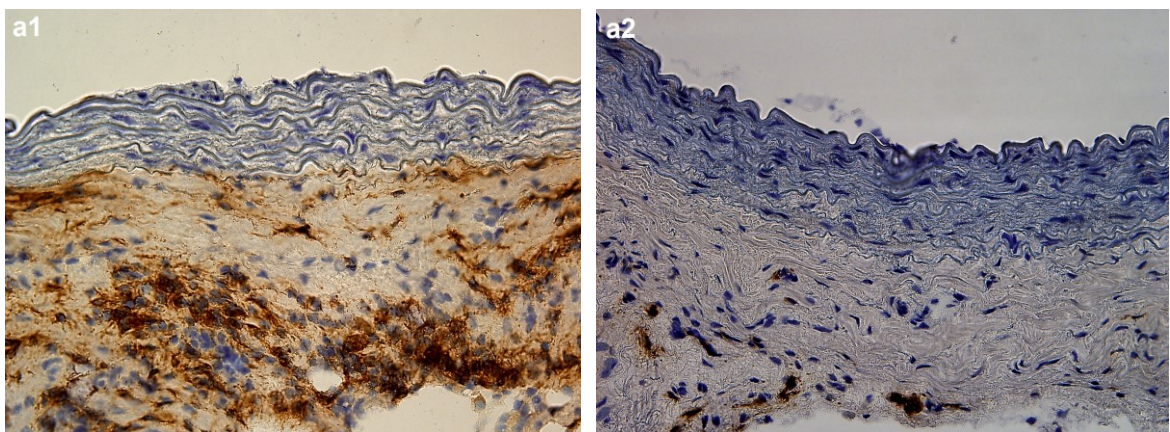
**Obr. 14 b – Immunohistochemické vyšetření kryokonzervovaného aortálního alloštěpu s použitím imunosuprese, barvení protilátkou proti von-Willebrandovému faktoru. Zvětšení 100x. Intraluminální povrch alloštěpů (šipka) byl pokrytý jednou vrstvou endotelových buněk (obarvené na hnědo).**



**Obr. 14 c – Immunohistochemické vyšetření kryokonzervovaného aortálního alloštěpu s použitím imunosuprese, barvení fluorescein isothiocyánát konjugovanou primární protilátkou. Zvětšení 40x, fluorescenční mikroskopie). V celém rozsahu tunica media a intima jsme u alloštěpů nedetkovali žádná depozita imunoglobulinu G**

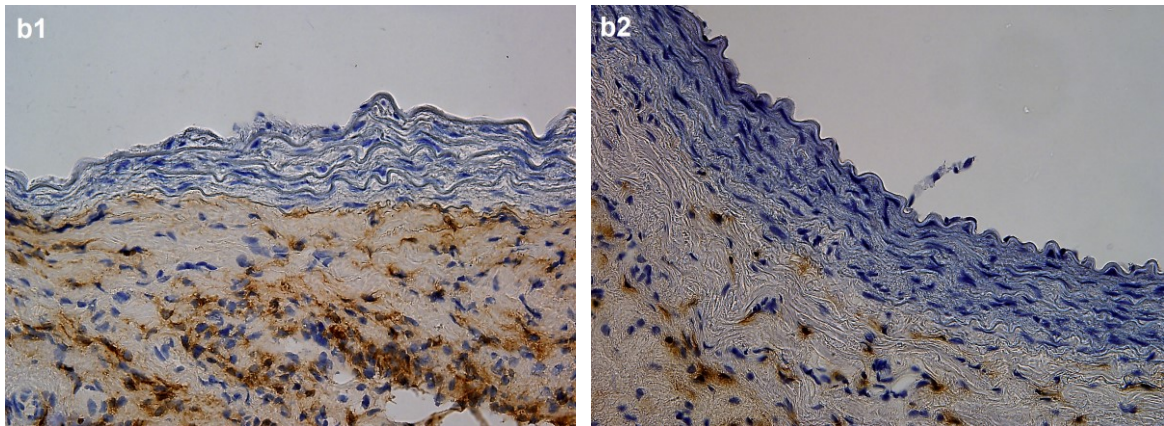
Překvapivé výsledky přineslo histologické a imunohistochemické vyšetření v případě zvířat ze skupiny ALO, kde jsme provedli allogenní transplantaci a nepodávali jsme imunosupresi. Allogenní štěpy z této skupiny totiž měly také normální morfologii aortální stěny. Pozorovali jsme všechny 3 základní vrstvy cévní stěny, tunica intima nejevila žádné známky desintegrace. Ve svalových buňkách tunica media jsme nezaznamenali žádná IgG depozita. V tunica adventitia byla nicméně výrazně větší infiltrace mononukleárními buňkami v porovnání s isogenní skupinou ISO a oběma imunosuprimovanými skupinami TAC1 i TAC7. (obrázek 15)

**Obrázek 15 a1, a2, b1, b2. Fotografie z imunohistochemického vyšetření kryokonzervovaných aortálních alloštěpů 30. pooperační den.**



**Obr. 15 a1, a2 – Imunohistochemické vyšetření na přítomnost Lewis MHC II pozitivních buněk u kryokonzervovaného alloštěpu. Zvětšení 400x. Adventiciální infiltrace alloštěpu kmene Brown-norway MHC II pozitivními buňkami kmene Lewis (obr. a1) byla významně redukována podáváním imunosuprese ať byla započata již od 1. pooperačního dne nebo s odstupem 7 dnů. (obr. a2).**





**Obr. 15 b1, b2 – Imunohistochemické vyšetření na přítomnost CD4 pozitivních buněk u kryokonzervovaného štěpu.** Zvětšení 400x. Adventiciální infiltrace alloštěpů kmene Lewis Brown-norway CD4 pozitivními buňkami kmene Lewis (obr. b1) byla významně redukována podáváním imunosuprese ať byla započata již od 1. pooperačního dne nebo s odstupem 7 dnů (obr. b2).

#### **5.4. Infiltrace adventicie imunokompetentními buňkami**

Adventiciální infiltrace CD4+, CD8+ a MHC II pozitivními buňkami kmene Lewis v obou imunosuprimovaných skupinách (TAC1 a TAC7) byla 30. den po transplantaci srovnatelná s adventiciální infiltrací v isogenní skupině ISO.

Průměrný počet MHC II pozitivních buněk kmene Lewis, CD8 a CD4 pozitivních buněk v tunica adventitia ve skupině ALO, kde jsme provedli allogenní transplantaci bez podávání imunosuprese, byl signifikantně vyšší ( $P < 0.001$ ) než v ostatních skupinách (ISO, TAC1, TAC7) (tabulka 5, obrázek 15)

| Skupina | Intima  |                       | Media        |                         | Adventicie*           |                      |                      |
|---------|---------|-----------------------|--------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
|         | endotel | Intimální hyperplazie | IgG depozita | Nekróza svalových buněk | LEW MHC II+ buňky**   | CD8+                 | CD4+                 |
| ISO     | +       | -                     | -            | -                       | 6.3±4.4               | 2.2±2.7              | 3.9±2.6              |
| ALO     | +       | -                     | -            | -                       | 20.7±6.7 <sup>1</sup> | 6.9±5.4 <sup>1</sup> | 9.6±6.5 <sup>1</sup> |
| TAC1    | +       | -                     | -            | -                       | 5.9±5.5               | 3.5±3.3              | 2.3±1.6              |
| TAC7    | +       | -                     | -            | -                       | 6.1±5.1               | 3.1±3.8              | 2.0±1.5              |

**Tabulka 5 - Hodnocení histologického obrazu a známek rejekce u kryokonzervovaných aortálních alloštěpů 30. den po transplantaci.**

<sup>1</sup> průměrný počet MHC II pozitivních buněk kmene Lewis, CD8 pozitivních a CD4 pozitivních buněk v tunica adventitia ve skupině ALO byl signifikantně vyšší (P<0.001) než v ostatních skupinách (ISO, TAC1, TAC7)

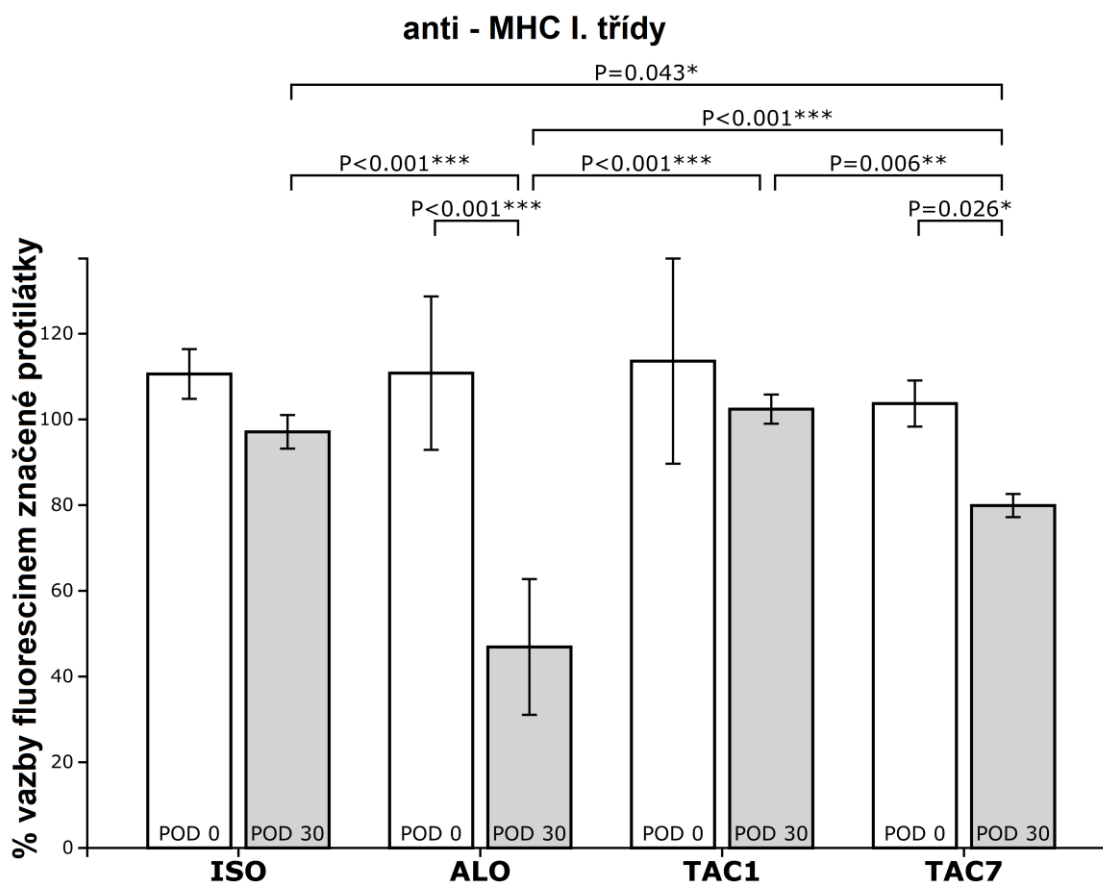
+ pozitivní nález, - negativní nález

\* průměrný počet MHC II pozitivních buněk kmene Lewis, CD8 pozitivních a CD4 pozitivních buněk v tunica adventitia v jednom vyšetřovaném poli při 1000násobném zvětšení

\*\* Buňky kmene Lewis s pozitivním barvením na hlavní histokompatibilní komplex II třídy

### 5.5. Donor specifické protilátky anti-MHC I. třídy v periferní krvi příjemců

V sérech zvířat, u kterých jsme provedli isogenní transplantace (skupina ISO,  $97.1 \pm 4.7$  %) a ve skupině zvířat, která dostávala imunosupresi od 1. pooperačního dne (skupina TAC1,  $102.4 \pm 4.2$  %) nebyla 30. den po transplantaci detekována změna v inhibici vazby fluorescinem označené protilátky proti MHC I. třídy na splenocyty kmene Brown-Norway ve srovnání se séry odebranými před transplantací (skupina ISO,  $110.6 \pm 7.1$  %, skupina TAC1,  $113.6 \pm 29.3$  %) (obrázek 16).



Obrázek 16 - Srovnání koncentrace protilátek proti MHC I. třídy v séru 0. a 30. den po transplantaci. Procentuální vyjádření vazby fluorescinem značených protilátek proti

MHC I. třídy (anti-RT1.Ac, OX-27) na klidové splenocyty potkanů Brown-Norway po přidání sér získaných od příjemců před transplantací (POD 0) a 30. den po transplantaci (POD 30).

ISO – isogenní skupina bez imunosuprese, ALO – allogenní skupina bez imunosuprese, TAC1 - allogenní skupina imunosuprimovaná od 1. pooperačního dne, TAC7 - allogenní skupina imunosuprimovaná od 7. pooperačního dne.

Ve vyšetřovaných sérech odebraných 30. pooperační den u skupiny TAC7, ve které jsme imunosupresi pomocí takrolimu podávali od 7. pooperačního dne, jsme zjistili vyšší inhibici vazby fluoresceinem označené protilátky proti MHC I. třídy na splenocyty kmene Brown-Norway ( $79.9 \pm 3.3$  %) ve srovnání se séry odebranými před transplantací ( $103.7 \pm 6.6$  %,  $p = 0.026$ ). (obrázek 16)

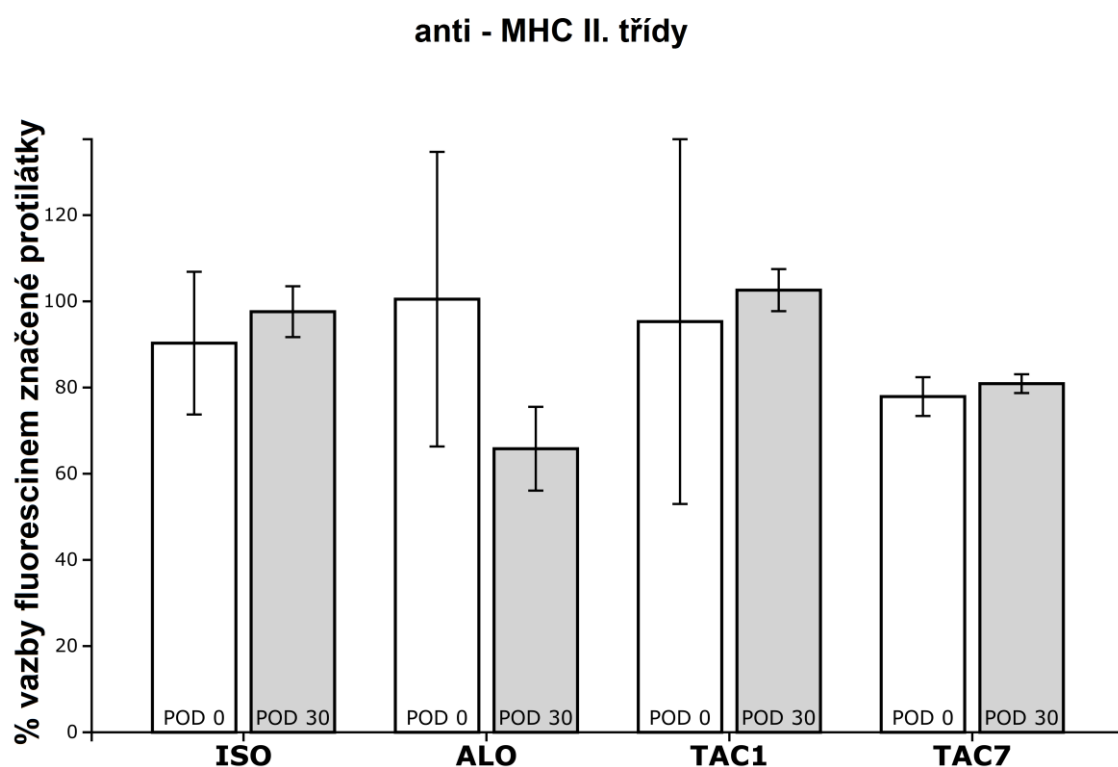
Séra odebraná od allogenních neimunosuprimovaných zvířat skupiny ALO 30 dní po transplantaci statisticky významně snížila vazbu fluoresceinem označené protilátky proti MHC I. třídy na splenocyty kmene Brown-Norway ( $46.9 \pm 19.4$  %), v porovnání se séry, odebranými před transplantací ( $110.8 \pm 21.9$  %,  $p < 0.001$ ). (obrázek 16)

Při celkovém zhodnocení, séra allogenní neimunosuprimované skupiny (skupina ALO), odebraná 30. pooperační den, vykazala signifikantně vyšší inhibici vazby fluoresceinem označené protilátky proti MHC I. třídy na splenocyty kmene Brown-Norway ( $46.9 \pm 19.4$  %), v porovnání se séry, odebraných 30. pooperační den, v isogenní skupině (skupina ISO,  $97.1 \pm 4.7$  %,  $p < 0.001$ ), stejně tak, jako v případě obou imunosuprimovaných skupin (skupina TAC1,  $102.4 \pm 4.2$  %,  $p < 0.001$ ), (skupina TAC7,  $79.9 \pm 3.3$  %,  $p < 0.001$ ). (obrázek 16)



## 5.6. Donor specifické protilátky anti-MHC II. třídy v periferní krvi příjemců

Séra isogenní skupiny (ISO), stejně jako séra odebraná od obou imunosuprimovaných skupin (skupiny TAC1 a TAC7) nevykazovala žádnou inhibici vazby v průběhu sledovaného období. V kontrastu s tímto zjištěním, pouze séra, získaná od allogenní, neimunosuprimované skupiny (ALO) 30. pooperační den, inhibovala vazbu fluorescínem označené protilátky proti MHC II. třídy na splenocyty kmene Brown-Norway ( $65.8 \pm 11.9$  %). Tato inhibice však nebyla statisticky významná v porovnání s výsledky vzorků sér odebraných stejné skupině před transplantací ( $100.5 \pm 41.9$  %). (obrázek 17)



**Obrázek 17 - Povní koncentrace protilátek proti MHC II. třídy v séru 0. a 30. den po transplantaci.** Procentuální vyjádření vazby fluorescínem značených protilátek proti MHC II. třídy (anti-RT1.D, OX-17) na klidové splenocyty potkanů kmene Brown-norway

po přidání sér získaných od příjemců před transplantací (POD 0) a 30. den po transplantaci (POD 30).

ISO – isogenní skupina bez imunosuprese, ALO - allogenní skupina bez imunosuprese, TAC1 - allogenní skupina imunosuprimovaná od 1. pooperačního dne, TAC7 - allogenní skupina imunosuprimovaná od 7. pooperačního dne

## **6. DISKUZE**

V prezentované studii hodnotíme efekt dvou imunosupresivních protokolů s použitím imunosupresiva takrolimu v monoterapii na rejekci kryokonzervovaných tepenných alloštěpů abdominální aorty u potkanů. Zvířecí alloštěpy byly zpracovány v souladu s odběrovými, kryokonzervačními a implantačními protokoly rutinně používanými v klinickém prostředí v České Republice od roku 2011. Použití obou imunosupresivních protokolů pomocí nízkých dávek takrolimu (podávaných od 1. nebo od 7. dne po transplantaci) zabránilo buněčné i humorálně zprostředkované rejekci kryokonzervovaných aortálních alloštěpů v třicetidenním sledovaném období.

Zvířecí model myších nebo potkaních aortálních allotransplantací je rutinně používán v experimentální transplantační medicíně a je úzce spojen s vývojem nových imunosupresivních léků od roku 1960. Na základě experimentálních modelů vznikaly další, nové imunosupresivní protokoly s azathioprinem (Vickery CM et al., 1965), azathioprinem a prednisonem (Todd IA, Boctor Z., 1966), 6-mercaptopurinem (Williams GM et al., 1975), cyclosporinem A (Schmitz-Rixen T et al., 1988), sirolimem (Gregory CR et al., 1993), cyclosporinem kombinovaným s methylprednisolonem a azathioprinem (Lemstrom K. et al., 1994), s mycophenolat mofetilem (Hullett DA, et al., 1996), takrolimem (Azuma N. et al., 1999), 15-deoxyspergualinem (Lacha J. et al., 2000),

cyklosporinem A a FTY720 (Nikolova Z. et al., (2000), takrolimem kombinovaným s FR260330 (Ouyang J. et al., 2005), everolimem (Eckl S. et al., 2010), everolimem s clopidogrelem (Heim Ch. et al., 2015). U všech imunosupresivních protokolů byla potvrzena schopnost do určité míry zabránit imunitní reakci způsobenou destrukcí cévní stěny alloštěpů.

Navzdory přesvědčivým experimentálním výsledkům není imunosupresivní terapie v klinické praxi cévními chirurgy všeobecně akceptována (Kieffer E. et al., 2004). Tato skutečnost je pravděpodobně způsobena tím, že antigenicita arteriálních alloštěpů není všeobecně uznávaným faktem (Konrad H et al., 2017) a/nebo tím, že se lékaři obávají podávat imunosupresi u pacientů s aktivní infekcí a tím omezení fyziologických obranných mechanismů lidského organismu (Harlander-Locke MP et al., 2014). V případě, že je již imunosuprese podávána, nejvíce používaným lékem je cyclosporin A (Spunda R. et al., 2016).

Aktuálně, nejvíce komplexní pohled na použití a účinek cyclosporinu A podávaným po in-situ revaskularizaci chladem konzervovanými alloštěpy při léčbě infekce cévních protéz použitých v aortální pozici, reprezentuje prospektivní, porovnávací, studie z jednoho cévně-chirurgického centra, kterou v roce 2011 publikoval Pupka et al. (Pupka A et al., 2011). Jedna skupina pacientů byla pooperačně imunosuprimována pomocí cyclosporinu A. Druhá skupina pacientů nebyla z důvodu vlastního rozhodnutí imunosuprimována vůbec. Imunosupresivní protokol byl v této studii založen na podávání cyclosporinu A v denních dávkách 1-3 mg na kilogram hmotnosti pacienta. Cílové koncentrace v periferní krvi byly 140-150 mg/l. Imunosuprese byla podávána po celou dobu sledování, která v průměru trvala 22,8 měsíců. Veškeré komplikace jako trombóza štěpu (12 %), ruptura štěpu (12 %), ruptura štěpu s následným úmrtím pacienta (8%) a aneurysmatické změny

štěpu (8%) byly v této studii pozorovány pouze u skupiny pacientů, kteří imunosupresi neužívali. Z výsledků této práce je navíc patrné, že nebyly pozorovány žádné vedlejší nežádoucí účinky imunosuprese (Spunda R. et al., 2016).

S těmito výsledky se však neshodují další publikované práce, které naopak potvrzují značné vedlejší účinky při používání cyklosporinu A. Tyto nežádoucí účinky jsou jednak vaskulární (Freguin-Bouilland C. et al., 2011) a jednak metabolické (Tepperman E et al., 2010). Skutečně tak bylo prokázáno na modelu potkaních srdečních alloštěpů, že podávání cyklosporinu A vedlo k progresi aterosklerotických změn ve štěpu. Tento jev byl objasněn zvýšenou expresí růstového faktoru TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta) (Khanna AK et al., 2002). V případě aortálních alloštěpů bylo v další práci na potkanech zjištěno, že podávání cyklosporinu A vede k poškození endotelu a akceleraci aterosklerotického procesu (Mennander A. et al., 1992). Eckl et al. ve své experimentální práci na myších, kdy prováděl také implantace aortálních alloštěpů, potvrdil, že terapie s použitím cyklosporinu A v monoterapii není dostatečná k prevenci vzniku aterosklerotických změn ve štěpu (Eckl S. et al., 2010). Otázkou zůstává, zda byly aterosklerotické změny způsobeny nedostatečnou imunosupresí nebo nežádoucími účinky cyklosporinu A.

Všechna uvedená fakta ohledně imunogenicity tepenných alloštěpů, imunosuprese pomocí protokolů s takrolimem, dobrých klinických výsledků při imunosupresivní terapii při simultánních transplantacích orgánů a cév (Adamec M. et al., 2004), vedla v roce 2002 k provedení experimentální studie, ve které se sledoval účinek imunosupresivního protokolu pomocí takrolimu po transplantaci chladem konzervovaných aortálních alloštěpů na potkaním modelu (Matia et al., 2007). V návaznosti na to se v roce 2004 začal standardizovaný protokol s takrolimem používat v klinické praxi u pacientů po náhradách infikovaných cévních protéz nebo stentgraftů chladem konzervovaným alloštěpem (Matia

et al., 2010). Pacienti začínají imunosupresi pomocí takrolimu užívat od sedmého dne po transplantaci a lék užívají po celou dobu, po kterou je rekonstrukce alloštěpem průchodná. Sedmidenní doba, po kterou není imunosuprese podávána, je důležitá zejména pro umožnění neomezené funkce imunitního systému příjemce v situaci, kdy se jeho organismus potýká s bojem s reziduální infekcí po explantované, infikované cévní protěze. Imunosupresivum takrolimus je podáváno v počáteční dávce 6 mg/den, s tím že obvyklá udržovací denní dávka je 2 mg/den. Pravidelně kontrolovaná cílová koncentrace takrolimu v krvi je 4–7 ng/ml. U pacientů, kteří byli takto léčeni, nebyly zaznamenány žádné vedlejší nežádoucí účinky podávaného imunosupresiva.

V popisovaném experimentu jsme také nepozorovali žádné klinicky významnější vedlejší účinky imunosuprese při podávání takrolimu intramuskulární cestou v dávce 0,2 mg/kg/den. Při hodnocení pooperačního nárůstu váhy zvířat v jednotlivých skupinách jsme nicméně zaznamenali, že zvířata, která dostávala imunosupresi od prvního pooperačního dne, přibyla na váze signifikantně méně než zvířata z ostatních skupin, která dostávala imunosupresi s odstupem 7 dnů nebo nedostávala takrolimus vůbec.

Ve studii, která hodnotila imunosupresivem indukovanou hypertenzi, Takeda et al. podával potkanům takrolimus celkem 4 týdny v dávce 5,0 mg/kg/den. Lék byl aplikován perorálně, cílová koncentrace takrolimu v periferní krvi nebyla v tomto experimentu stanovována. Zvířatům nebyl prováděn žádný operační výkon. Po čtyřech týdnech byla váha imunosuprimovaných a neimunosuprimovaných zvířat srovnatelná, bez významného rozdílu (Takeda Y. et al., 1999). Naproti tomu v jiné toxikologické studii vedlo podávání takrolimu v denní perorální dávce 4 mg/kg/den (koncentrace v periferní krvi nebyla určena) k počáteční ztrátě na tělesné hmotnosti v třicetidenním sledovacím období (Nalesnik et al., 1987).

V práci Azumy et al. vyvolalo podávání takrolimu v denní intramuskulární dávce 1,0 mg/kg/den (koncentrace imunosupresiva v periferní krvi nebyly hodnoceny) u potkanů po aortálních transplantacích nežádoucí účinek ve smyslu diarrhey a úbytku na váze. V dalším pokračování byla denní dávka takrolimu stanovena na 0,2 mg/kg/den. Ani v této studii však nebyla měřena koncentrace imunosupresiva v periferní krvi příjemců (Azuma N. et al., 1999).

V předcházející experimentální studii s imunosupresí pomocí takrolimu u potkanů po transplantaci chladem konzervovaných aortálních alloštěpů, byla denní dávka imunosupresiva stanovena také na 0,2 mg/kg/den. Enzymovou imunoanalýzou měřená koncentrace takrolimu v periferní krvi příjemců třicátý den po transplantaci byla  $5,0 \pm 0,7$  ng/ml. Tento imunosupresivní protokol se ukázal být dostatečně efektivní k zabránění akutní, imunokompetentními buňkami i protilátkami zprostředkované rejekci chladem konzervovaných aortálních alloštěpů. Zároveň nebyly pozorovány žádné nežádoucí účinky této imunosupresivní léčby (Matia et al., 2007; Matia et al., 2014).

Imunosupresivní protokol používaný u pacientů po transplantaci chladem konzervovaných alloštěpů je založen na podávání takrolimu s odstupem sedmi dnů od transplantace. Obvyklá počáteční dávka je 6 mg/den a obvyklá udržovací denní dávka je 2 mg/den. Pravidelně kontrolovaná cílová koncentrace takrolimu v krvi je 4–7 ng/ml. U pacientů, kteří byli takto léčeni, jsme nezaznamenali žádné vedlejší nežádoucí účinky podávané imunosuprese pomocí takrolimu (Matia et al., 2010).

V naší studii jsme potvrdili možnost odložení léčby nízkou dávkou takrolimu po transplantaci kryokonzervovaných potkaních aortálních alloštěpů o sedm dní bez toho, aby byly patrné známky akutní, buňkami a protilátkami zprostředkované rejekce.

Takrolimus podávaný pouze čtvrtý až šestý den po transplantaci potkaních srdečních alloštěpů (denní dávka 1,28 mg/kg, intramuskulární podání, koncentrace v krvi neurčena) statisticky významně prodloužil dobu přežívání srdečních alloštěpů (Murase N. et al., 1987). Obdobně na modelu transplantace chladem konzervovaných karotických alloštěpů dostatovala imunosuprese takrolimem (intramuskulární denní dávka 0,2 mg/kg/den, koncentrace v krvi nestanovována) k potlačení imunitní reakce i když byla započata od třetího dne od transplantace. Přerušování podávání imunosuprese pak vedlo k hyperakutní rejekci transplantovaných karotických štěpů s hustou infiltrací tunica adventitia imunokompetentními buňkami a degenerací tunica media během 14 dnů (Azuma N. et al. 1999).

Možnosti odloženého podávání imunosuprese byly zkoumány také na aortálním modelu, kdy byly transplantovány chladem konzervované myší štěpy hrudní aorty do oblasti aorty břišní. Podávání everolimu v denních dávkách 0,05 mg/kg (intraperitoneální aplikace, koncentrace v periferní krvi  $10 \pm 1.0$  ng/ml) redukovalo aterosklerotické změny v transplantovaných štěpech třicátý den po operaci. Terapie byla započata s odloženým podáváním od sedmého, respektive čtrnáctého pooperačního dne. Navíc byla zjištěna další redukce aterosklerózy štěpů při odložené kombinované terapii s podáváním everolimu ve stejné dávce (0,05 mg/kg/den, intraperitoneální aplikace, koncentrace v periferní krvi  $10 \pm 1.0$  ng/ml) a clopidogrelu (1 mg/kg/den, intraperitoneální aplikace) (Heim Ch et al., 2015).

V našem experimentu jsme příjemcům kryokonzervovaných aortálních alloštěpů žádné antitrombotické léky nepodávali. V klinické praxi však antiagregační léky pacientům po transplantaci alloštěpů

rutinně podáváme. Tento fakt může ve výsledku ještě přispět ke zvýšení imunosupresivního efektu takrolimu u této specifické skupiny pacientů.

Recentně publikovaná klinická práce Konráda et al. prokázala, že kryokonzervované alloštěpy jsou vysoce imunogenní ve smyslu HLA – mířené imunitní reakce. Tato allogenní imunitní reakce však nevede tak jako u transplantací solidních orgánů k akutní rejekci s okamžitým selháním orgánu, nýbrž k pomalému, degenerativnímu procesu následovanému trombózou a obliterací štěpu. Nízké dávky imunosuprese se neukázaly být efektivně účinné na protilátkami zprostředkovanou rejekci těchto kryokonzervovaných alloštěpů (Konrad H et al., 2017).

V naší práci jsme prokázali indukci donor specifických anti MHC I a anti MHC II protilátek u neimunosuprimovaných příjemců kryokonzervovaných aortálních alloštěpů v průběhu třicetidenního sledovacího období. Oba imunosupresivní protokoly s použitím nízké dávky takrolimu byly dostatečně účinné k potlačení produkce těchto protilátek. Obdobně masivní indukce donor specifické protilátkové odpovědi byla pozorována u myších příjemců chladem konzervovaných hrudních aortálních alloštěpů ve třicetidenním sledovacím období Heimem et al. (Heim Ch et al., 2015). Odložená terapie everolimem samotným v dávce 0,05 mg/kg/den (intraperitoneální aplikace, cílová koncentrace v periferní krvi  $10 \pm 1.0$  ng/ml) nebo v kombinaci s clopidogrelem (denní dávka 1 mg/kg, intraperitoneální podání) byla dostatečná k redukci množství donor specifických protilátek nehledě na to, zda byla terapie započata s odstupem sedmi nebo čtrnácti dní od transplantace. V analogickém předchozím experimentu byl navíc prokázán supresivní efekt takrolimu (denní dávka 0,2 mg/kg/den, intramuskulární podávání od 1. pooperačního dne, koncentrace v periferní krvi  $5,57 \pm 0.96$  ng/ml) na produkci donor specifických protilátek u příjemců žilních potkaních alloštěpů (Splith et al., 2014).



## 7. ZÁVĚR

V našem experimentu jsme prokázali, že imunosuprese pomocí takrolimu v monoterapii za použití nízkých dávek 0,2 mg/kg/den je dostatečná k potlačení buněčné i protilátkami zprostředkované rejekce kryokonzervovaných aortálních alloštěpů. Rejekční změny byly suprimovány nehledě na to, jestli byla imunosuprese podávána od prvního pooperačního dne nebo s odstupem sedmi dnů od transplantace. Imunosupresivní protokol s odloženým podáváním takrolimu v nízké dávce byl dostatečný k potlačení akutní rejekce v cévní stěně.

V našem experimentu jsme nepozorovali destrukci cévní stěny ani porušení kontinuity intimy kryokonzervovaných aortálních alloštěpů.

Experimentálně zjištěné skutečnosti jsou inspirací pro klinickou praxi obecně a je tomu tak i v případě předložené disertační práce.

## 8. LITERATURA

- AbuRahma AF, Robinson PA, Holt SM. Prospective controlled study of polytetrafluoroethylene versus saphenous vein in claudicant patients with bilateral above knee femoropopliteal bypasses. *Surgery* 1999; 126(4):594-601; discussion 601-2.
- Adamec M, Matia I, Janousek L, Fronek J, Bachleda P, Lácha J, Viklický O. Renal transplantation in patients with abdominal aortic aneurysm – a new surgical approach. *Transpl Int* 2004; 17: 647
- Albertini JN, Barral X, Branchereau A, Favre JP, Guidicelli H, Magne JL, Magnan PE. Long-term results of arterial allograft below-knee bypass grafts for limb salvage: a retrospective multicenter study. *J Vasc Surg* 2000; 31: 426-435.
- Azuma N, Sasajima T, Kubo Y. Immunosuppression with FK506 in rat arterial allografts: fate of allogeneic endothelial cells. *J Vasc Surg* 1999; 29(4):694-702.
- Bahnini A, Ruotolo C, Koskas F, Kieffer E. In situ fresh allograft replacement of an infected aortic prosthetic graft: eighteen months' follow-up. *J Vasc Surg* 1991; 14(1):98-102.
- Barner HB, DeWeese JA, Dale WA, Mahoney EB. Aneurysmal degeneration of femoropopliteal arterial homografts. *JAMA* 1966; 196: 631-634.
- Camiade C, Goldschmidt P, Koskas F, Ricco JB, Jarraya M, Gerota J, Kieffer E. Optimization of the resistance of arterial allografts to infection: comparative study with synthetic prostheses. *Ann Vasc Surg* 2001; 15(2):186-96.
- Carrel A. Ultimate results of aortic transplantation. *J Exp Med* 1912; 15:389-398.
- Chiesa R, Astore D, Piccolo G, et al. Fresh and cryopreserved arterial homografts in the treatment of prosthetic graft infections: experience of the Italian Collaborative Vascular Homograft Group. *Ann Vasc Surg* 1998; 12(5):457-62.
- Costa AN, Scolari MP, Iannelli S, Buscaroli A, D'Arcangelo GL, Brando B, Indiveri F, Savi M, Borgnino LC, DeSanctis LB, Stefoni S, Bonomini V. The presence of posttransplant HLA-specific IgG antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay correlates with specific rejection pathologies. *Transplantation* 1997; 63(1):167-9.

- 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(3):405-8.
- Dumont FJ. FK506, an immunosuppressant targeting calcineurin function. *Curr Med Chem* 2000; 7(7):731-48.
- Eckl S, Heim C, Abele-Ohl S, Hoffmann J, Ramsperger-Gleixner M, Weyand M, Ensminger SM. Combination of clopidogrel and everolimus dramatically reduced the development of transplant arteriosclerosis in murine aortic allografts. *Transpl Int* 2010; 23: 959-966.
- Faivre L, Saoudi S, Astier A, Hamadas C, Conort O, Boivin H, Sabatier B, Taburet A, Lecointre K, Bellanger A, Radideau E, Thuillier A. FK 506 dose in transplantation: from theory to practice. *Transplant Proc* 2001; 33(4):2594-7.
- Fellmer P, Matia I, Tautenhahn H-M, Jonas S Effect of legal regulations on the use of fresh arterial homografts. Problems in clinical practice *Gefässchirurgie* 2011; 16: 403-406
- Fréguin-Bouilland C, Godin M, Bellien J, Richard V, Remy-Jouet I, Dautreux B, Henry JP, Compagnon P, Thuillez C, Plissonnier D, Joannidès R. Protective effect of mycophenolate mofetil on endothelial function in an aortic allograft model. *Transplantation* 2011; 91: 35-41
- Goto T, Kino T, Hatanaka H, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H. FK 506: historical perspectives. *Transplant Proc* 1991; 23:2713-2717
- Gregory CR, Huie P, Billingham ME, Morris RE. Rapamycin inhibits arterial intimal thickening caused by both alloimmune and mechanical injury. Its effect on cellular, growth factor, and cytokine response in injured vessels. *Transplantation* 1993; 55: 1409-1418.
- Gross RE, Bill AH, Jr., Peirce EC, Jr. Methods for preservation 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(6):689-701.
- Hannon RJ, Wolfe JH, Mansfield AO. Aortic prosthetic infection: 50 patients treated by radical or local surgery. *Br J Surg* 1996; 83(5):654-8.

- Harlander-Locke MP, Harmon LK, Lawrence PF, Oderich GS, McCready RA. The use of cryopreserved aortoiliac allograft for aortic reconstruction in the United States. *J Vasc Surg* 2014; 59: 669-67417
- O'Banion LA, Wu B, Eichler CM, Reilly LM, Conte MS, Hiramoto JS. Cryopreserved saphenous vein graft in infrainguinal bypass. *J Vasc Surg* 2014 Nov; 60(5):1291-6.
- Heim C, Eckl S, Preidl R, Ramsperger-Gleixner M, Koch N, Goldmann K, Spriewald BM, Weyand M, Ensminger SM. Delayed therapy with clopidogrel and everolimus prevents progression of transplant arteriosclerosis and impairs humoral alloimmunity in murine aortic allografts. *EJCTS* 2015;47: 180-187
- van Herck H, Baumans V, Brandt CJ, Hesp AP, Sturkenboom JH, van Lith HA, van Tintelen G, Beynen AC. Orbital sinus blood sampling in rats as performed by different animal technicians: the influence of technique and expertise. *Lab Anim*.1998 Oct; 32(4):377-86
- Hullett DA, Geraghty JG, Stoltenberg RL, Sollinger HW. The impact of acute rejection on the development of intimal hyperplasia associated with chronic rejection. *Transplantation* 1996; 62: 1842-1846.
- Johnson WC, Lee KK. A comparative evaluation of polytetrafluoroethylene, umbilical vein, and saphenous vein bypass grafts for femoral-popliteal above-knee revascularization: a prospective randomized Department of Veterans Affairs cooperative study. *J Vasc Surg* 2000; 32(2):268-77.
- Khanna AK, Hosenpud JS, Plummer MS, Hosenpud JD. Analysis of transforming growth factor-beta and profibrogenic molecules in a rat cardiac allograft model treated with cyclosporine. *Transplantation* 2002; 73: 1543.
- Kieffer E, Bahnini A, Koskas F, Ruotolo C, Le Blevec D, Plissonnier D.. In situ allograft replacement of infected infrarenal aortic prosthetic grafts: results in forty-three patients. *J Vasc Surg* 1993; 17(2):349-55; discussion 355-6.
- Kieffer E, Gomes D, Chiche L, Fléron MH, Koskas F, Bahnini A. Allograft replacement for infrarenalaortic graft infection: early and late results in 179 patients. *J Vasc Surg* 2004; 39(5):1009-17.
- Kiji T, Dohi Y, Nishizaki K, Takasawa S, Okamoto H, Nagasaka S, Naito H, Yonemasu K, Taniguchi S. Enhancement of cell viability in cryopreserved rat vascular grafts by

- administration of regenerating gene (REG) inducers. *J Vasc Res* 2003 Mar-Apr; 40(2):132-9.
- Klinkert P, Schepers A, Burger DH, et al. Vein versus polytetrafluoroethylene in above-knee femoropopliteal bypass grafting: five-year results of a randomized controlled trial. *J Vasc Surg* 2003; 37(1):149-55.
- Knosalla C, Goeau-Brissoniere O, Leflon V, et al. Treatment of vascular graft infection by in situ replacement with cryopreserved aortic allografts: an experimental study. *J Vasc Surg* 1998; 27(4):689-98.
- Konrad H, Wahle A, Altermann W, Schlaf G. Strong humoral anti-HLA Immune Response Upon Arbitrarily Chosen Allogeneic Arterial Vessel Grafts. *J Clin Cell Immunol* 2017; 8:525
- Lacha J, Rossmann P, Lodererova A, Havliekova J, Vitko S. LF 08-0299 in the prophylaxis and treatment of chronic rejection in a rat aortic allograft model. *Transpl Int* 2000; 13 Suppl 1: S565-567.
- Lemstrom K, Bruning J, Koskinen P, Bruggeman C, Lautenschlager I, et al. Triple-drug immunosuppression significantly reduces chronic rejection in noninfected and RCMV-infected rats. *Transplant Proc* 1994; 26: 1727-1728.
- Litzler PY, Thomas P, Danielou E, et al. Bacterial resistance of refrigerated and cryopreserved aortic allografts in an experimental virulent infection model. *J Vasc Surg* 1999; 29(6):1090-6.
- 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: 371-380.
- Matia I, Adamec M, Janousek L, Lipár K, Marada T, Klein D, Baláz P, Varga M, Chlupác J, Rokosný S. Clinical experience with cold-preservation of venous and arterial allografts. long-term outcomes. *Rozhl Chir* 2010 Jan; 89(1):45-54.
- Matia I, Fellmer P, Splith K, Varga M, Adamec M, Kämmerer I, Feldbrügge L, Krenzien F, Hau HM, Atanasov G, Schmelzle M, Jonas S. Immunosuppressive protocol with delayed use of low-dose tacrolimus after aortic transplantation suppresses donor – specific anti-MHC class I and class II antibody production in rats. *Ann Transplant* 2014; 19: 225±232

- Meade JW, Linton RR, Darling RC, Menendez CV. Arterial homografts. A long-term clinical follow-up. *Arch Surg* 1966; 93(3):392-9.
- Mennander A, Paavonen T, Hayry P. Cyclosporine-induced endothelialitis and accelerated arteriosclerosis in chronic allograft rejection. *Transplant Proc* 1992; 24: 341-45
- Měřička P., Špatenka J., Navrátil P.: Organizace a chirurgická technika odběru tkání v rámci multiorganového odběru In: Baláž P., Janek J., Adamec M. (eds.). *Odběry orgánů k transplantaci/ Odbery orgánov na transplantacie*. Karolinum Praha 2011; 240-251.
- Měřička P., Straková H., Štěrba L., Schustr P., Vinš M.: Cryobank of the Tissue Establishment University Hospital Hradec Králové – Design and 10 year Experience of Operation, The thirteen Cryogenics 2014, IIR International Conference Proceedings, Icaris, Ltd. Prague, 2014, p. 177-182.
- Mirelli M, Stella A, Faggioli GL, Scolari MP, Iannelli S, Freyrie A, Buscaroli A, De Santis L, Resta F, Bonomini V, D'Addato M. Immune response following fresh arterial homograft replacement for aortoiliac graft infection. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1999; 18(5):424-9.
- Mirelli M, Buzzi M, Pasquinelli G, Tazzari PL, Testi G, et al. Fresh and cryopreserved arterial homografts: immunological and clinical results. *Transplant Proc* 2005; 37: 2688-2691.
- Murase N, Todo S, Lee PH, Lai HS, Chapman F, Nalesnik MA, Makowka L, Starzl TE Heterotopic heart transplantation in the rat receiving FK-506 alone or with cyclosporine. *Transplant Proc* 1987; 19 (5 Supp). 71–75. ISSN 0041-1345
- Nalesnik MA1, Todo S, Gryzan S, Lee PH, Makowka L, Starzl TE. Toxicology of FK-506 in the Lewis rat. *Transplant proc* 1987; 19 (5 Suppl 6):89-92.
- Nikolova Z, Hof A, Rudin M, Baumlin Y, Kraus G, et al. Prevention of graft vessel disease by combined FTY720/cyclosporine. A treatment in a rat carotid artery transplantation model. *Transplantation* 2000; 69: 2525-2530.
- Ouyang J, Xu D, Zhang X, Qi S, Ma A, et al. Effect of a novel inducible nitric oxide synthase inhibitor in prevention of rat chronic aortic rejections. *Transplantation* 2005; 79: 1386-1392.
- Plissonnier D, Nochy D, Poncet P, et al. Sequential immunological targeting of chronic experimental arterial allograft. *Transplantation* 1995; 60(5):414-24.

- Prager M, Polterauer P, Bohmig HJ, et al. Collagen versus gelatin-coated acron versus stretch polytetrafluoroethylene in abdominal aortic bifurcation graft surgery: results of a seven-year prospective, randomized multicenter trial. *Surgery* 2001; 130(3):408-14.
- Prager M, Hölzenbein T, Aslim E, Domenig Ch, Mühlbacher F, Kretschmer G. Fresh arterial homograft transplantation: a novel concept for critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002; 24: 314-321.
- Pupka A, Skora J, Janczak D, Plonek T, Marczak J, et al. In Situ Revascularisation with Silver-coated Polyester Prostheses and Arterial Homografts in Patients with Aortic Graft Infection - A Prospective, Comparative, Single-centre Study. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 2011; 41: 61-67.
- Schmitz-Rixen T, Megerman J, Colvin RB, Williams AM, Abbott WM. Immunosuppressive treatment of aortic allografts. *J Vasc Surg* 1988; 7: 82-92.
- Scolari MP, De Sanctis LB, Iannelli S, Bonomini V, D'Addato M, Stella A, Mirelli M. Aorta transplantation in man: clinical and immunological studies. *Int J Artif Organs* 1998 Aug; 21(8):483-8.
- Sebesta P, Štádl P, Sedivý P, Zdráhal P, El Samman K, Jindrák V, Syrůček M. Radical operation of infected aortofemoral prosthesis using fresh arterial allograft: our mid-term experience. *Rozhl Chir* 2011; 90: 4-13.
- Splith K, Fellmer P, Matia I, Varga M, Oliverius M, Kuhn S, Feldbrügge L, Krenzien F, Hau HM, Wiltberger G, Schmelzle M, Jonas S. Antibody-mediated rejection of arterialised venous allografts is inhibited by immunosuppression in rats. *PLoS One* 2014; Mar 11;9(3):e91212. doi: 10.1371/journal.pone.0091212. eCollection 2014 Plos one
- Špaček M, Měříčka P, Janoušek L, Štádl P, Adamec M, Vlachovský R, Guňka I, Navrátil P, Thieme F, Mitáš P, Špunda R, Špatenka J, Staffa R, Němec P, Lindner J. Organization model for allotransplantations of cryopreserved vascular grafts in Czech Republic. *Cell Tissue Bank* 2018; Sep;19(3):437-445
- Špaček M, Měříčka P, Janoušek L, Štádl P, Adamec M, Vlachovský R, Guňka I, Navrátil P, Thieme F, Špunda R, Burkert J, Staffa R, Němec P, Lindner J Current vascular allograft procurement, cryopreservation and transplantation techniques in the Czech

- Republic. *Adv Clin Exp Med* 2019 Jan 23. doi: 10.17219/acem/90037. [Epub ahead of print]
- Spunda R., Hruby J., Adamec M., Matia I., Spacek M. Cold-stored arterial allografts for in situ reconstruction of infected prosthetic grafts. Review of immunosuppressive protocols used in clinical practice, *Eur Surg* 2016; 48 (Suppl2):S166-S168
- Szilagyi DE, Mc DR, Smith RF, Whitcomb JG. Biologic fate of human arterial homografts. *AMA Arch Surg* 1957; 75(4):506-27; discussion 527- 9.
- Szilagyi DE, Rodriguez FJ, Smith RF, Elliott JP. Late fate of arterial allografts. Observations 6 to 15 years after implantation. *Arch Surg* 1970; 101(6):721-33.
- Takeda Y. Miyamori I, Furukawa K, Inaba S, Mabuchi H. Mechanism of FK506-Induced Hypertension in the rat, *Hypertension* 1999; 33:130-136.
- Tepperman E, Ramzy D, Prodger J, Sheshgiri R, Badiwala M, Ross H, Rao V. Surgical biology for the clinician: vascular effects of immunosuppression. *Can J Surg* 2010; 53: 57-63
- Todd IA, Boctor ZN Experimental homotransplantation of arteries. *Transplantation* 1966; 4: 123-130.
- Vickery CM, McCombs HL, Warren R. Experimental Small-Artery Grafts in Dogs Treated with Immunosuppressive Drugs. *N Engl J Med* 1965; 272: 325-331.
- 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: 775-782.
- 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: 1732-1744.
- Wang T, Donahoe PK, Zervos AS. Specific interaction of type I receptors of the TGF-beta family with the immunophilin FKBP-12. *Science* 1994; 265(5172):674-6.
- Williams GM, ter Haar A, Krajewski C, Parks LC, Roth J. Rejection and repair of endothelium in major vessel transplants. *Surgery* 1975; 78: 694-706.



## 9. VLASTNÍ PUBLIKAČNÍ AKTIVITA

### Publikace se vztahem k tématu dizertační práce

#### a) impaktované

1. Špaček M, Měříčka P, Janoušek L, Štádl P, Adamec M, Vlachovský R, Guňka I, Navrátil P, Thieme F, **Špunda R**, Burkert J, Staffa R, Němec P, Lindner J Current vascular allograft procurement, cryopreservation and transplantation techniques in the Czech Republic. *Adv Clin Exp Med*. 2019 Apr;28(4):529-534 **IF 1.179**
2. **Spunda R**, Hruby J, Mericka P, Mlcek M, Pecha O, Splith K, Schmelzle M, Krenzien F, Lindner J, Matia I, Spacek M. Immunosuppressive protocols with tacrolimus after cryopreserved aortal allotransplantation in rats. *PLoS One*. 2018 Aug 9;13(8):e 0201984 **IF 2.766**
3. Špaček M, Měříčka P, Janoušek L, Štádl P, Adamec M, Vlachovský R, Guňka I, Navrátil P, Thieme F, Mitáš P, **Špunda R**, Špatenka J, Staffa R, Němec P, Lindner J. Organization model for allotransplantations of cryopreserved vascular grafts in Czech Republic. *Cell Tissue Bank*. 2018 Sep;19(3):437-445 **IF 1.527**
4. **Spunda R.**, Hruby J., Adamec M., Matia I., Spacek M. Cold-stored arterial allografts for in situ reconstruction of infected prosthetic grafts: Review of immunosuppressive protocols used in clinical practice. *European Surgery - Acta Chirurgica Austriaca* 2016;48:166-168 **IF 0.503**

#### b) neimpaktované

1. Matia I., Hruby J., **Spunda R.**, Adamec M., Varga M., Lindner J., Spacek M. Influence of cryoconservation on antigenicity of arterial allografts: A review *Eur Surg* 2016; 48 [3]: S 192-193

### Publikace se vztahem k tématu dizertační práce v recenzním řízení

1. Hrubý J., Měříčka P., Špaček M., **Špunda R.**, Mitáš P., Mlček M., Matia I., Lindner J.: Vliv kryokonzervace na imunogenicitu cévních allograftů – analýza experimentálních dat. *Cor et Vasa*
2. Hruby J, **Spunda R**, Mericka P, Mlcek M, Pecha O, Splith K, Schmelzle M, Krenzien F, Lindner J, Spacek M., Matia I.: Influence of cryoconservation on

antigenicity of arterial allografts, *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*

### **Publikace ostatní**

#### a) impaktované

1. Lambert L, Grus T, **Spunda R**, Balik M, Trca S. Air Embolism into Superior Mesenteric Artery Following Replacement of Ascending Aorta for Aortic Dissection - A Rare and Fatal Case. *J Belg Soc Radiol.* 2018 Oct 18;102(1):68  
**IF 0.27**
2. Rob D, **Špunda R**, Lindner J, Rohn V, Kunstýř J, Balík M, Rulíšek J, Kopecný P, Lipš M, Šmíd O, Kovárník T, Mlejnský F, Linhart A, Bělohávek J. A rationale for early extracorporeal membrane oxygenation in patients with postinfarction ventricular septal rupture complicated by cardiogenic shock. *Eur J Heart Fail.* 2017 May;19 Suppl 2:97-103. **IF 10.683**
3. **Spunda R.**, Valek M., Salmay M., Lindner J., Spacek M. Differential impact on acute kidney injury incidence between on - and off pump coronary artery bypass grafting in octogenarians. 2015, *Biomedical Papers* 2015 Sep;159(3):449-54  
**IF 1.291**
4. Spacek M, Jindrak V, **Spunda R**, Stadler P, Lindner J, Mitas P, Belohlavek O. Current trends in the diagnosis of vascular prosthesis infection. *Acta Chir Belg.* 2012 Nov-Dec;112(6):405-13. **IF 0.44**
5. Mitas P, Vejrazka M, Hruby J, **Spunda R**, Pecha O, Lindner J, Spacek M. Prediction of compartment syndrome based on analysis of biochemical parameters. *Ann Vasc Surg.* 2014 Jan;28(1):170-7. **IF 1.029**

#### b) neimpaktované

1. **Špunda R**, Špaček M, Šachl R, Lambert L, Heller S, Lindner J. Concomitant embolism in the subclavian and pulmonary artery *Rozhl Chir* 2018;97(10):478-481.
2. Špaček M., Mitáš P., Hrubý J., **Špunda R.**, Měříčka P., Lambert L., Lindner J. Composite venous allograft for femoro-pedal bypass grafting in critical limb ischaemia *Cor et vasa* 2018;60(3):317-320

3. Špaček M, Mitáš P, Vočka M, Lacina L, Hodková G, **Špunda R**, Kodet O, Krajsová I, Petruželka L, Trnka J, Kubinyi J, Matějovský Z, Lambert L, Lindner J. Isolated Perfusion of the Upper Extremity with TNF- $\alpha$  - Double Venous Cannulation. *Klin Onkol.* 2017 Summer;30(3):213-219
4. Trnka J, Špaček M, Šírová V, Mitáš P, Hodková G, Kubinyi J, **Špunda R**, Lindner J. Hyperthermic Isolated Limb Perfusion Combined with Tasonermin - a Perfusion Leakage Monitoring Technique. *Klin Onkol.* 2016;29(5):375-379.
5. Špaček M., Mitáš P., Hrubý J., **Špunda R.**, Vejražka M., Lindner J. Lower extremity acute compartment syndrome diagnosis – review *Eur Surg* 2016; 48 [3] :S 188-190
6. Novotný R, Mitáš P, Hlubocký J, Hrubý J, Slautin A, **Špunda R**, Lindner J. Juxtarenal Modular Aortic Stent Graft Infection Caused by Staphylococcus aureus. *Case Rep Vasc Med.* 2016;2016:7597265.
7. Špaček M, Mitáš P, Lacina L, Krajsová I, Hodková G, Salmay M, **Spunda R**, Brlicová L, Lindner J. Cytostatic hyperthermic isolated limb perfusion (HILP) in VFN. *Rozhl Chir.* 2011 Jan;90(1):62-6.
8. **Spunda R**, Urban T, Tosovský J, Táborský J, Semrád M. Postcatheterization pseudoaneurysm of the radial artery. *Rozhl Chir.* 2005 May;84(5):244-5.

### **Přednášky se vztahem k tématu dizertační práce**

1. **Špunda R.**, Hrubý J., Matia I., Měřička P., Mlček M., Splith K., Schmelzle M., Krenzien F., Pecha O., Špaček M., Lindner J. Rejection of transplanted aortic grafts in rats: Comparison of fresh and cryopreserved artery grafts. 8. sjezd České společnosti kardiovaskulární chirurgie, Brno, 25. - 27. 11. 2018
2. M. Špaček, **R. Špunda**, J. Hrubý, I. Matia, P. Měřička, M. Mlček, K. Splith, M. Schmelzle, F. Krenzien, O. Pecha, J. Lindner, Rejekce transplantovaných aortálních štěpů u potkana: porovnání čerstvých a kryoprezervovaných štěpů, Česká transplantační společnost Transplant 2018 Olomouc, 15. - 16. 10. 2018
3. M. Špaček, **R. Špunda**, J. Hrubý, I. Matia, P. Měřička, M. Mlček, K. Splith, M. Schmelzle, F. Krenzien, O. Pecha, J. Lindner, Rejekce transplantovaných aortálních štěpů u potkana: porovnání čerstvých a kryoprezervovaných tepenných štěpů Výroční zasedání Rady programu PROGRES Q38, Plzeň, 2. 11. 2018
4. Matia I, Adamec M, Varga M, Lodererova A, Fellmer P, Splith K, Schmelzle M, Krenzien F, Hruby J, **Spunda R**, Spacek M, Mlcek M, Mericka P, Invited Lecture: No Alloartery – No Vascular Surgery: Our Small Contribution to the Fascinating Story of Arterial Transplantation. 8. sjezd České společnosti kardiovaskulární chirurgie, Brno, 25. - 27. 11. 2018
5. Hruby J, **Spunda R**, Adamec M, Varga M, Lindner J, Matia I, Spacek M, Influence of cryoconservation on antigenicity of arterial allografts. 7. sjezd České společnosti kardiovaskulární chirurgie, Praha, 13. - 15. 11. 2016
6. **Spunda R**, Hruby J, Adamec M, Varga M, Lindner J, Matia I, Spacek M, Cold-stored arterial allografts for in situ reconstruction of infected prosthetic grafts: Review of immunosuppressive protocols used in clinical practice. 29th European Federation Congress of the International College of Surgeons, Pilsen, Czech Republic, 9. - 12. 9. 2015
7. J. Hrubý, **R. Špunda**, P. Měřička, M. Mlček, K. Splith, M. Schmelzle, F. Krenzien, J. Lindner, M. Špaček, I. Matia, Obraz akutní rejekce kryokonzervovaných a chladem konzervovaných aortálních alloštěpů u potkanů. 6. sjezd České společnosti kardiovaskulární chirurgie, Brno, 9. - 11. 11. 2014

8. P. Mitáš, M. Špaček, J. Hrubý, L. Brlicová, **R. Špunda**, T. Klika, J. Lindner, Allotransplantace cévních štěpů ve VFN. 6. sjezd České společnosti kardiovaskulární chirurgie, Brno, 9. - 11. 11. 2014
9. **R. Špunda**, J. Hrubý, P. Měřička, M. Mlček, K. Splith, M. Schmelzle, F. Krenzien, J. Lindner, I. Matia, M. Špaček, Imunosuprese po transplantaci kryokonzervovaných tepenných alloštěpů v experimentu. 6. sjezd České společnosti kardiovaskulární chirurgie, Brno, 9. - 11. 11. 2014
10. **Špunda R**, Hrubý J, Měřička P, Mlček M, Splith K, Schmelzle M, Lindner J, Matia I, Špaček M, Tacrolimus v monoterapii po transplantaci kryoprezervovaných aortálních štěpů u potkanů. 5. česko-slovenský transplantační kongres, Olomouc, 2. - 4. 10 2014
11. Hrubý J, **Špunda R**, Měřička P, Mlček M, Splith K, Schmelzle M, Lindner J, Špaček M, Matia I, Vliv způsobu konzervace na imunogenicitu a rejekci tepenných alloštěpů u potkanů. 5. česko-slovenský transplantační kongres, Olomouc, 2. - 4. 10. 2014

## 10. SEZNAM TABULEK

|           |   |
|-----------|---|
| Tabulka 1 | Charakteristika skupin  |
| Tabulka 2 | Časové údaje procesu kryokonzervace a rozmrazení  |
| Tabulka 3 | Specifikace monoklonálních a polyklonálních protilátek použitých při imunohistochemickém vyšetření a průtokové cytometrii                       |
| Tabulka 4 | Základní charakteristika skupin s pooperačním nárůstem hmotnosti a cílovou hladinou takrolimu 30. pooperační den                                |
| Tabulka 5 | Hodnocení infiltrace imunokompetentními buňkami a histologické známky rejekce u kryoprezervovaných aortálních aloštěpů 30. den po transplantaci |

## 11. SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1 Rozdělení experimentálních skupin podle typu transplantace a podávání imunosuprese
- Obrázek 2 Experimentální model
- Obrázek 3 Odběr štěpů I
- Obrázek 4 Odběr štěpů II
- Obrázek 5 Odběr štěpů III
- Obrázek 6 Kryokonzervace štěpů I
- Obrázek 7 Kryokonzervace štěpů II
- Obrázek 8 Kryokonzervace štěpů III
- Obrázek 9 Transplantace štěpů I
- Obrázek 10 Transplantace štěpů II
- Obrázek 11 Transplantace štěpů III
- Obrázek 12 Pooperační péče
- Obrázek 13 Procentuální nárůst hmotnosti 30. pooperační den vztažený k předoperační váze
- Obrázek 14 Fotografie z histologického a imunohistochemického vyšetření kryokonzervovaných aortálních štěpů 30. pooperační den (a, b, c)
- Obrázek 15 Fotografie z imunohistochemického vyšetření kryokonzervovaných aortálních štěpů 30. pooperační den (a1, a2, b1, b2)
- Obrázek 16 Srovnání hladiny protilátek proti MHC I. třídy v séru 0. a 30. den po transplantaci
- Obrázek 17 Povnání hladiny protilátek proti MHC II. třídy v séru 0. a 30. den po transplantaci

## 12. PŘÍLOHY

### 12.1 Příloha A



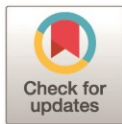
#### RESEARCH ARTICLE

# Immunosuppressive protocols with tacrolimus after cryopreserved aortal allotransplantation in rats

Rudolf Spunda<sup>1</sup>, Jan Hruby<sup>1</sup>, Pavel Mericka<sup>2</sup>, Mikulas Mlcek<sup>3</sup>, Ondrej Pecha<sup>4</sup>, Kathrin Splith<sup>5</sup>, Moritz Schmelzle<sup>5</sup>, Felix Krenzien<sup>5</sup>, Jaroslav Lindner<sup>1</sup>, Ivan Matia<sup>6‡</sup>, Miroslav Spacek<sup>1‡\*</sup>

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

‡ Ivan Matia and Miroslav Spacek are joint senior authors on this work.  
\* [mirekspacek@seznam.cz](mailto:mirekspacek@seznam.cz)



#### OPEN ACCESS

**Citation:** Spunda R, Hruby J, Mericka P, Mlcek M, Pecha O, Splith K, et al. (2018) Immunosuppressive protocols with tacrolimus after cryopreserved aortal allotransplantation in rats. *PLoS ONE* 13(8): e0201984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201984>

**Editor:** Stanislaw Stepkowski, University of Toledo, UNITED STATES

**Received:** March 20, 2018

**Accepted:** July 23, 2018

**Published:** August 9, 2018

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

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

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

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

## Abstract

### Objectives and design

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

### Materials and methods

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

### Results

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

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

## Conclusion

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

## Introduction

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

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

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

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

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

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



## Material and methods

### Ethics statement

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

### Animals

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

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

### Operative procedure of donor animals

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

### Protocol of cryoconservation

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

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

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

### Thawing protocol

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

### Operative procedure of recipient animals

The recipient animals were anaesthetized with intramuscular injection of sufentanil (Sufenta<sup>®</sup>, Janssen Pharmaceutica Inc., Beerse, Belgium) at  $20\ \mu\text{g}/\text{kg}$  and azaperone (Stresnil<sup>®</sup>, Janssen Pharmaceutica Inc., Beerse, Belgium) at  $1\ \text{mg}/\text{kg}$  to ensure more natural awakening.

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

### Animal groups

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

### Immunosuppressive therapy

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

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

### Blood samples

Blood samples for determination of donor specific anti MHC antibodies on day 0, and day 30 in all groups and for determination of tacrolimus concentration on day 30 in immunosuppressed groups TAC1 and TAC7 were collected by orbital sinus puncture as described by van Herck [17]. The animals were anaesthetized by an intramuscular injection of ketamine (Narkamon<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 during this procedure.

### Arterial grafts explantation on day 30

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

### Parameters under study

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

### Concentration of tacrolimus in peripheral blood

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

### Histologic analysis of explanted arterial grafts

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

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

### Immunohistochemical analysis of explanted arterial grafts

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

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



for 60 min. Endogenous peroxidase was blocked by incubating in 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 70% methanol for 30 minutes. 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 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

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

**Detection of Lewis MHC class II positive cells.** Immunohistochemistry was performed on 8 μm thick sections with a three-step indirect method. Briefly, the sections were fixed for 10 minutes in cold acetone. After sections were rinsed in 0.2% Triton X 100 and phosphate-buffered saline, endogenous biotin was blocked with the Biotin blocking system (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark). The tissues were then incubated in 10% horse serum to prevent unspecific binding, and then a primary antibody was applied for 60 min. Then, endogenous peroxidase was blocked in 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 70% methanol for 30 minutes. The specimen was incubated with a secondary biotinylated horse anti-mouse antibody (Vector Lab, Burlingame, California, USA), followed by an incubation with R.T.U. Vectastain Elite ABC Reagent (Vector Lab, Burlingame, California, USA). Finally, specimens were incubated for 5 min with Dako Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark), counterstained, and dipped in Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

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

### Detection of immunoglobulins

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

### Flow cytometry analysis of blood samples

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

## Statistical analysis

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

## Results

### Animals

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

### Immunosuppression with tacrolimus

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

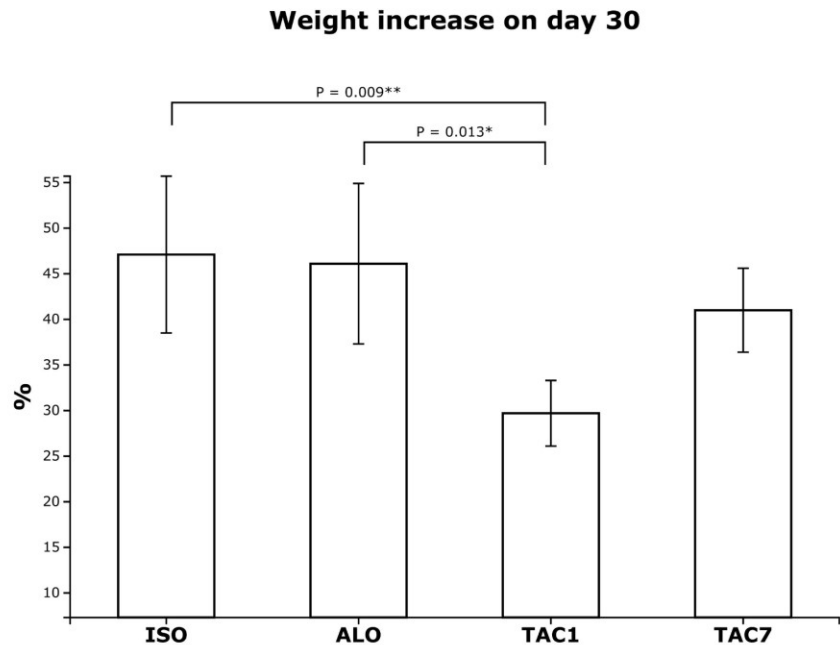
### Histology and immunohistology

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

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

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

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



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

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

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

### Anti MHC class I antibodies in serum

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

**Table 1. Basic characteristics of experimental groups.**

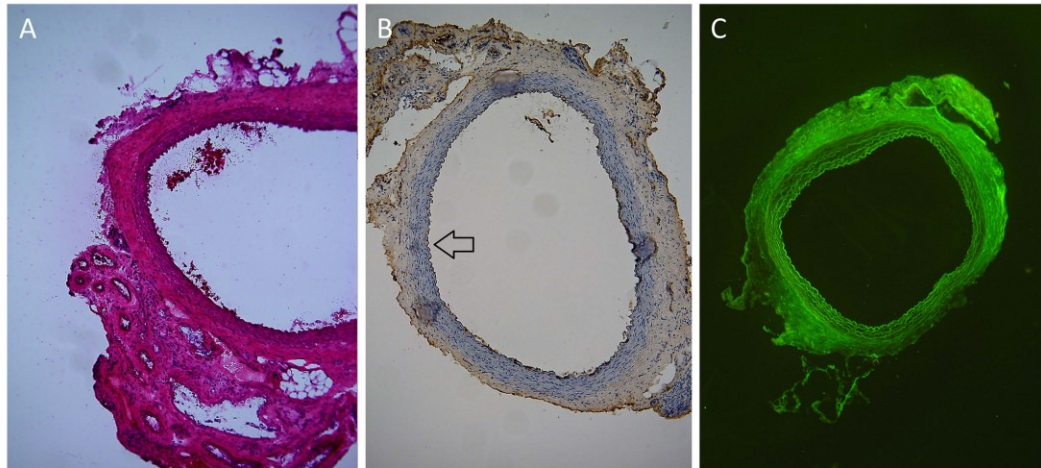
| Group | Characteristic | Immunosuppression   | Cryoconservation (days) | Weight increase on day 30 (%) | Tacrolimus blood level on day 30 (ng/mL) |
|-------|----------------|---------------------|-------------------------|-------------------------------|--|
| ISO   | LEW to LEW     | no           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

LEW—male Lewis rats

BN—male Brown-Norway rats

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





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

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

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

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

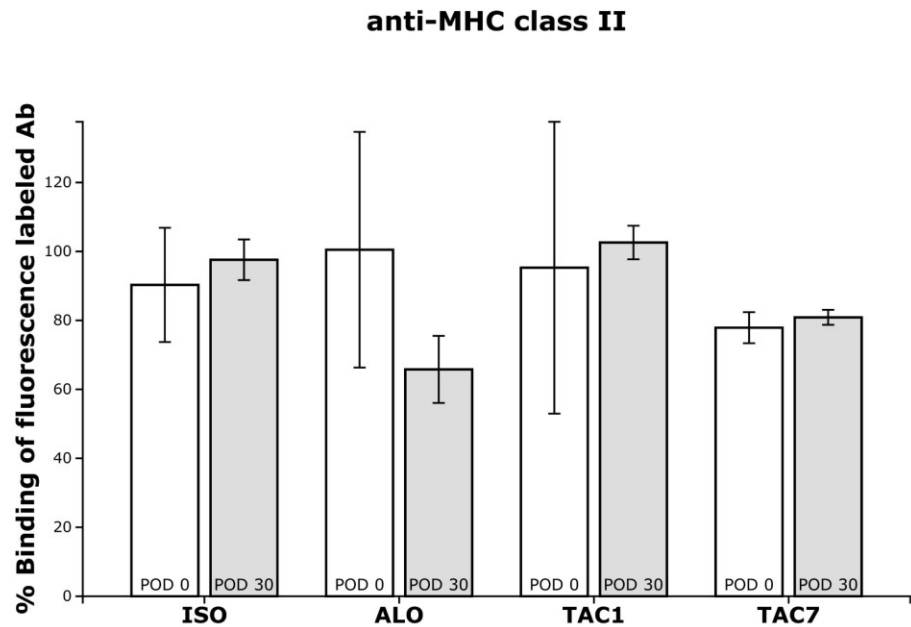
In addition, sera from the allogeneic non-immunosuppressed animals (group ALO) obtained on day 30 showed significant inhibition of fluorescence-labelled MHC class I antibody binding to BN spleen cells ( $46.9 \pm 19.4\%$ ), compared with day 30 sera from the isogenic group (group ISO,  $97.1 \pm 4.7\%$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

#### Anti MHC class II antibodies in serum

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

#### Discussion

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



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

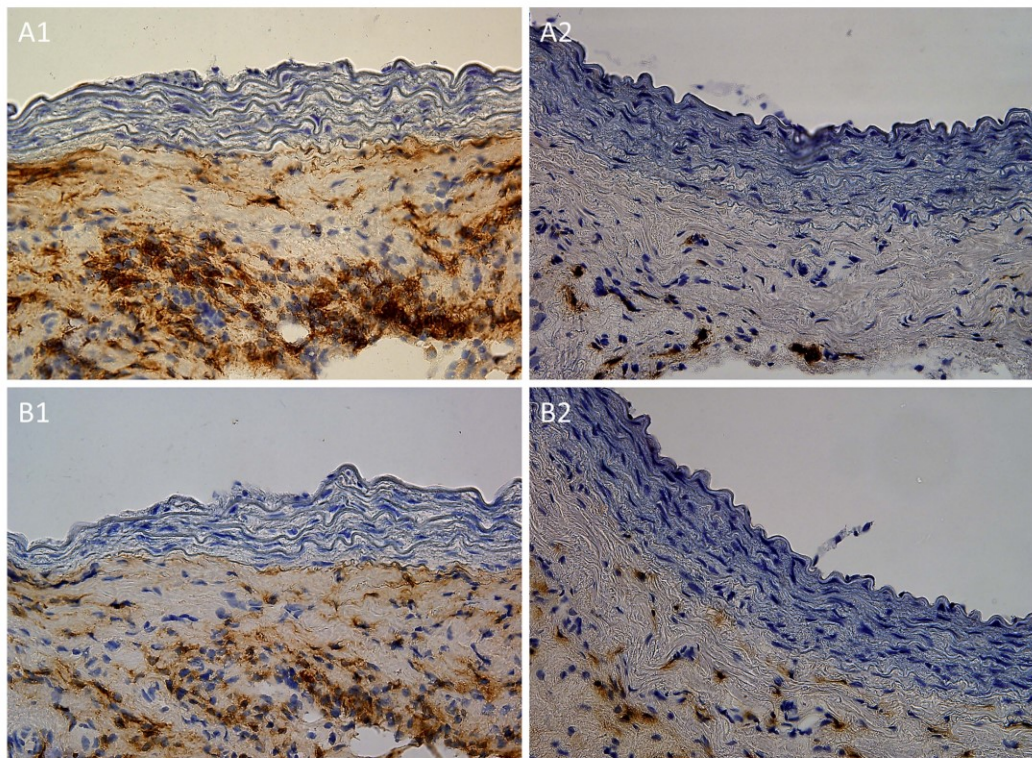
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201984.g005>

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

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

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





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

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

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

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

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

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

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

<sup>1</sup> The total amounts of Lewis MHC class II positive, CD8-positive and CD4-positive cells in tunica adventitia in group ALO were significantly higher (P<0.001) than those observed in all the other groups (ISO, TAC1, TAC7).

+ positive finding, - negative finding

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

\*\* Major histocompatibility complex class II positive cells of Lewis origin

IS—immunosuppression

Tac—tacrolimus

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

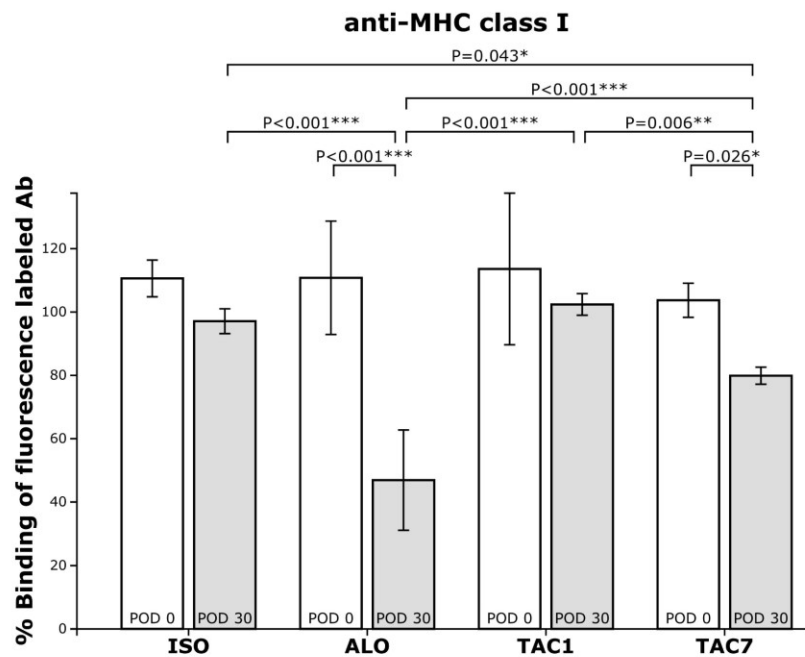
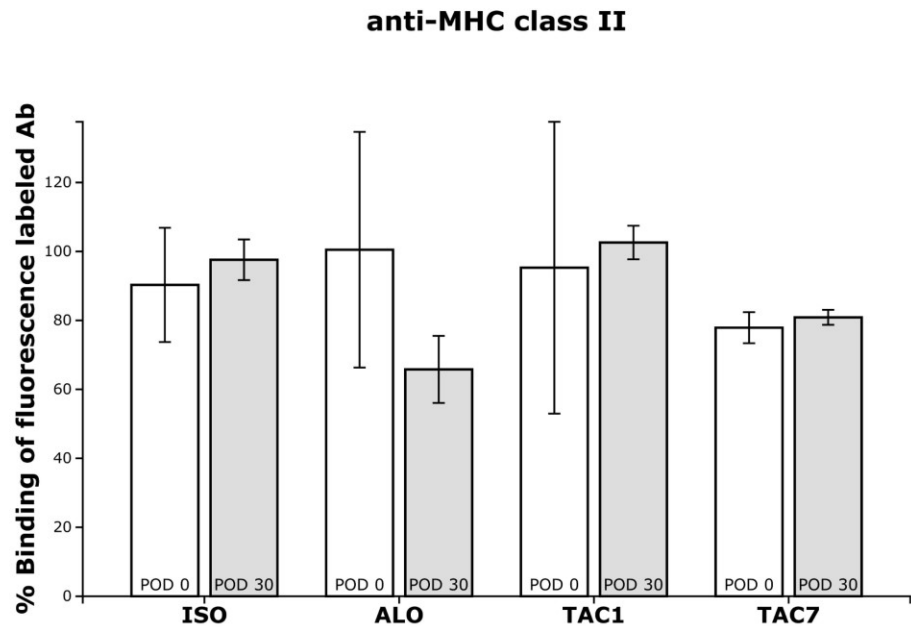


Fig 4. Anti MHC class I antibodies in serum. The percentage of binding of the anti-MHC class I antibody (anti-RT1.Ac, OX-27) to quiescent BN splenocytes in the presence of sera obtained from recipient rats pretransplant (POD 0) and on day 30 after transplantation (POD 30). ISO—isonogenic group with no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

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



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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Supporting information

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

## Author Contributions

**Conceptualization:** Pavel Mericka, Ivan Matia, Miroslav Spacek.

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

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

**Funding acquisition:** Mikulas Mlcek, Miroslav Spacek.

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

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

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

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

**Software:** Ondrej Pecha.

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

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

**Visualization:** Jan Hruby, Kathrin Splith, Felix Krenzien.

**Writing – original draft:** Rudolf Spunda.

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

## References

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



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

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





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

### Review of immunosuppressive protocols used in clinical practice

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

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

#### Abstract

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### Introduction

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

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

#### Immunogenicity of cold-stored allografts

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

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

#### Clinical use of immunosuppression after cold-stored arterial allograft transplantation

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

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

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

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

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

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

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



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

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

### Conclusion

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

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

### Compliance with ethical guidelines

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

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

### References

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

## 12.3 Příloha C

Original papers

### Current vascular allograft procurement, cryopreservation and transplantation techniques in the Czech Republic

Miroslav Špaček<sup>1,A–D,F</sup>, Pavel Měříčka<sup>2,A–F</sup>, Libor Janoušek<sup>3,B,E,F</sup>, Petr Štádl<sup>4,B,E,F</sup>, Miloš Adamec<sup>5,B,E,F</sup>, Robert Vlachovský<sup>6,B,E,F</sup>, Igor Guňka<sup>7,B,E,F</sup>, Pavel Navrátil<sup>8,E,F</sup>, Filip Thieme<sup>3,B,E,F</sup>, Rudolf Špunda<sup>1,B,C,E,F</sup>, Jan Burkert<sup>9,B,E,F</sup>, Robert Staffa<sup>6,C,E,F</sup>, Petr Němec<sup>10,A,E,F</sup>, Jaroslav Lindner<sup>1,A,E,F</sup>

<sup>1</sup> 2<sup>nd</sup> Department of Surgery – Department of Cardiovascular Surgery, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Czech Republic

<sup>2</sup> Tissue Bank, University Hospital Hradec Králové, Czech Republic

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

<sup>4</sup> Department of Vascular Surgery, Na Homolce Hospital, Prague, Czech Republic

<sup>5</sup> Transplants Coordinating Center, Prague, Czech Republic

<sup>6</sup> 2<sup>nd</sup> Department of Surgery, St. Anne's University Hospital, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>7</sup> Department of Surgery, University Hospital and Faculty of Medicine Hradec Kralove, Charles University in Prague, Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>8</sup> Transplant Center, University Hospital and Faculty of Medicine Hradec Kralove, Charles University in Prague, Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>9</sup> Department of Transplantation and Tissue Bank, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

<sup>10</sup> Center of Cardiovascular Surgery and Transplantations Brno, Czech Republic

A – research concept and design; B – collection and/or assembly of data; C – data analysis and interpretation;

D – writing the article; E – critical revision of the article; F – final approval of the article

Advances in Clinical and Experimental Medicine, ISSN 1899-5276 (print), ISSN 2451-2680 (online)

*Adv Clin Exp Med.* 2019;28(4):529–534

#### Address for correspondence

Miroslav Špaček  
E-mail: mirekspacek@seznam.cz

#### Funding sources

None declared

#### Conflict of interest

None declared

Received on November 21, 2017

Reviewed on December 3, 2017

Accepted on April 18, 2018

Published online on January 23, 2019

#### Cite as

Špaček M, Měříčka P, Janoušek L, et al. Current vascular allograft procurement, cryopreservation and transplantation techniques in the Czech Republic. *Adv Clin Exp Med.* 2019;28(4):529–534. doi:10.17219/acem/90037

#### DOI

10.17219/acem/90037

#### Copyright

© 2019 by Wrocław Medical University  
This is an article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

#### Abstract

**Background.** Vascular allotransplantations are performed worldwide in selected patients suffering from vascular prosthesis infection or critical limb ischemia. Either fresh or cryopreserved vascular allograft may be used.

**Objectives.** In various points, we address several aspects (allograft procurement, cryopreservation and transplantation technique) of the program of vascular allotransplantations in the Czech Republic.

**Materials and methods.** Vascular grafts retrieval has been done within multiorgan harvests using no-touch technique. Very short time of cold ischemia is achieved due to close cooperation with Tissue Establishment where the following processing of cryopreservation is performed. Meeting all necessary quality criteria is a prerequisite for releasing grafts for clinical application. Standardized thawing protocol and surgical handling aims to minimize microfractures before implantation.

**Results.** Based on experimental and clinical work, the first validation of cryopreserved arterial and venous grafts for clinical use was performed between 2011 and 2013 in the Czech Republic. The development of storage of vascular tissue in banks was stimulated in 2000–2010 by the issue of EU directives and national harmonized norms, aimed at assurance of high quality and safety of cells and tissues used for transplantations in humans.

**Conclusions.** There are several crucial moments affecting final quality, including graft retrieval within a multiorgan harvest, short ischemic time, cryopreservation, and thawing technique used. The recommended surgical handling during implantation may also affect results and graft-related complications.

**Key words:** tissue banking, cryopreserved vascular allograft transplantation, operative procedures, graft procurement, cryopreservation



## Introduction

Vascular allotransplantations are performed worldwide in selected patients suffering from vascular prosthesis infection or critical limb ischemia. Either fresh or cryopreserved vascular allograft may be used. In this paper, all the aspects and the up-to-date state of the transplantation program of cryopreserved vascular allografts in the Czech Republic introduced in 2011 are presented.

In this country, there is a network of licensed surgical facilities performing vascular graft retrieval as a part of multiorgan recovery. These participating centers – Transplant Centers or Vascular Surgery Centers – were licensed for this activity by the State Institute for Drug Control (SUKL) as Procurement Establishments (PE) tightly connected by agreements with the licensed Tissue Establishment (TE) – Tissue Bank of the University Hospital Hradec Králové, Czech Republic. All the licenses were granted after providing proof of full compliance of practice in these facilities with the strict safety and quality requirements established by the UE Directives 2004/EC, 17/2006/EC and 2006/86/EC, and the national harmonized legal norms: Act No. 296/2008 Coll. (Human Cell and Tissue Act) and Decree of the Ministry of Health No. 422/2008 Coll.<sup>1,2</sup> Cryopreservation of collected grafts, subsequent storage at liquid nitrogen temperatures and quality control until the release of grafts for clinical application are the main duties of the tissue bank. This service is, however, accessible only for transplant centers involved in the program. Distribution of grafts is performed by a licensed company able to perform emergency and rapid transport of cryopreserved grafts in a vapor phase of liquid nitrogen to any destination in the Czech Republic.

## Material and methods

### Vascular graft procurement techniques

To meet the requirements of the SOP (standard operating procedure) provided by the PE with the aim to achieve the quality and safety of cryopreserved grafts, it is necessary to retrieve the blood vessels within multiorgan harvests.<sup>3</sup> The responsible person at each PE, an experienced vascular surgeon, guarantees that all surgical procedures are performed according to accepted SOP and all required documentation is maintained at the PE and/or sent to the TE as well. They are also responsible for the education and training of all surgeons included in the list of persons competent to perform graft recovery, and for reporting on any incidents of SAR (serious adverse reaction) and SAE (serious adverse event) that may occur in connection with the graft retrieval. If possible, it is necessary to perform perfusion through the internal iliac artery. Ideally, the artery is cross-clamped distally from the point of the harvested vessels. During a multiorgan

harvest, a no-touch technique is routinely used when operating on the arterial system – aortic bifurcation ranging from renal arteries to superficial femoral arteries (10 cm) with side branches at least 1 cm long. For the collection of 1-sided arteries, harvest is started from the external iliac artery to the popliteal artery. The saphenous vein is collected in total length (Fig. 1). The spectrum of blood groups is harvested with a preference for type 0. The tissue bank also keeps unusual grafts in limited quantities: carotid bifurcation, the aortic arch with head arteries, inferior vena cava, and iliac vein bifurcation, preferentially of blood type 0. The grafts are replenished as needed. A very short time of cold ischemia (hours) is achieved due to close cooperation with the TE, where grafts are also processed during nights and weekends.

The vessels collected are immediately placed into a pre-cooled Celsior preservation solution (Genzyme, Cambridge, USA) supplemented with gentamicin and stored in sterile certified plastic jars (Medfor 250 mL; Medfor, Farnborough, UK). The jars are transported to the TE at the temperature of melting ice within 12 h after the harvest together with the documentation of the harvest and samples of the donor's blood to perform serology tests in the licensed diagnostic laboratories (Department of Clinical Microbiology and Department of Clinical Immunology of the University Hospital Hradec Králové – UHHK).

### Cryopreservation

Vascular graft cryopreservation is performed using the SOP required by the TE (Tissue Bank of the University Hospital Hradec Králové) fully licensed by a national competent authority.<sup>3,4</sup> In the procurement and processing of vessels, only high-quality materials and drugs with approval for human use and meeting the requirements of the Directive of the European Parliament and Council No. 23/2004/EC are used.

After input control in the TE, the grafts are processed in a grade A clean room (according to the EU GMP classification) with a grade B background (Fig. 2 A,B). After decontamination using a modified van Katz<sup>5</sup> method, the vessels are put into double sterile disposable plastic bags (Eva Bags; Maco Biotech, Eckbolsheim, France) containing 50 mL of a pre-cooled 6% solution of hydroxyethyl starch with molecular weight of 130,000 Da (Voluven 6%; Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe, Germany) and mixed with an equal volume of the pre-cooled cryoprotective solution (20% dimethyl sulphoxide; WAK ChemieMedical GmbH, Steinbach, Germany) (Fig. 2C). The samples of the solution for bacteriological and mycological tests are taken from the collection solution and from the final package. The plastic bags are closed using heat sealing. The bags closed into outer metal cassettes are put into the freezing chamber of the programmable freezer and frozen at a rate of 1 K/min to –90°C

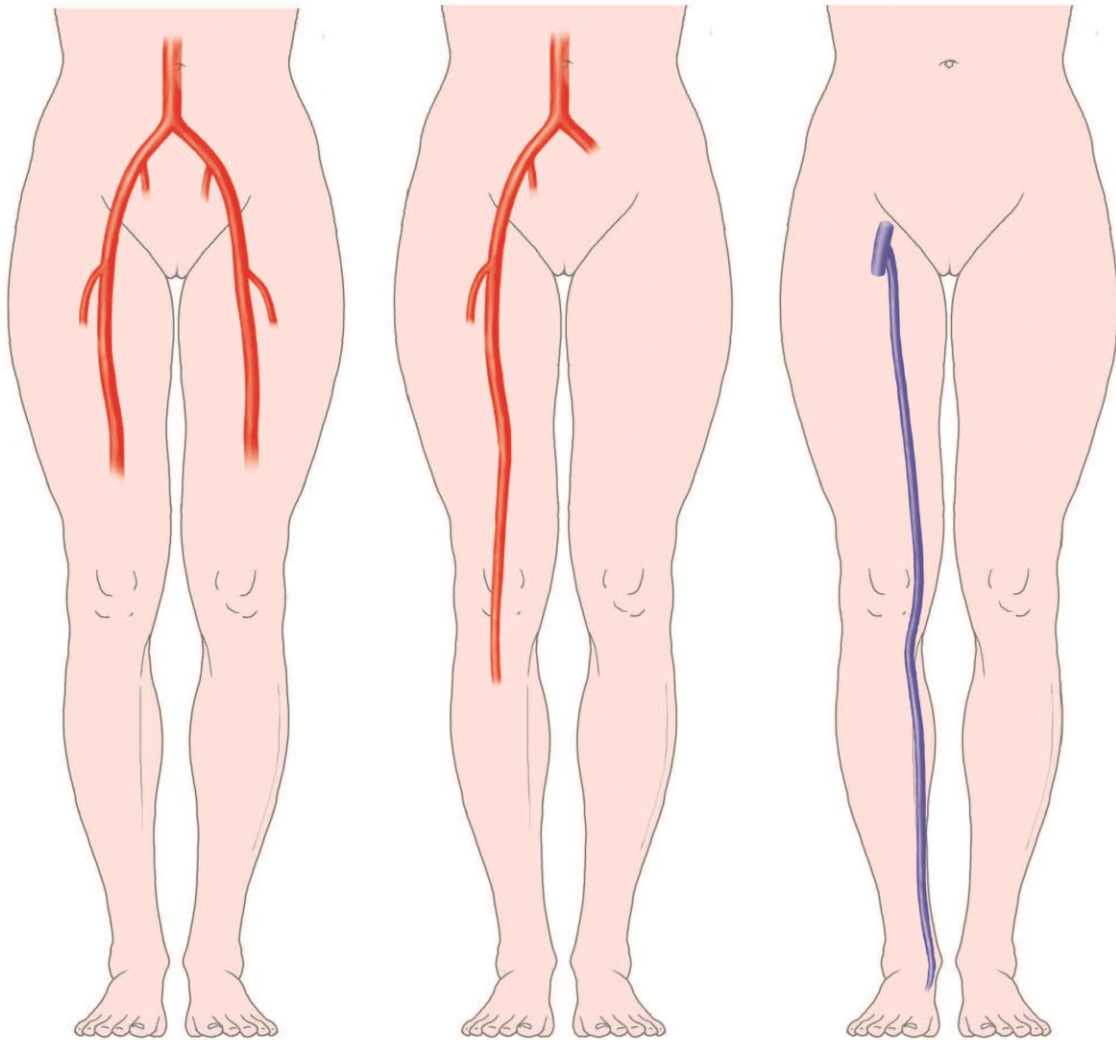


Fig. 1. Types of harvested vessels: There are 3 routinely harvested types of vessels – aortic bifurcation with iliac and femoral arteries, unilateral arterial graft and saphenous vein graft

(5 K/min to  $-150^{\circ}\text{C}$  follows) (Fig. 2D). The grafts are stored until clinical use in the vapor phase of liquid nitrogen in the biological container equipped with an automatic filling system and continuous temperature monitoring (Fig. 2E).

### Quality criteria for release of grafts for clinical application

The grafts can be released for clinical use by the responsible person from the TE only. The criteria for release are listed below:

- absence of contraindication for harvest in the clinical and anatomical diagnoses and patient's medical history;

- good quality of the harvested tissue reported by the responsible person of the PE;
- absence of laboratory signs of infection as determined by the serology tests of the donor;
- absence of contamination of recovered grafts by pathogenic bacteria, molds or fungi;
- proof of sterility at the output control;
- absence of serious deviations from the SOP during retrieval, transportation, processing, and storage of grafts.

Reporting of SAR and SAE is connected with procurement, distribution and transplantation of grafts and is another important feature of the quality assurance system. A register for recording all clinical results achieved in all centers using cryopreserved grafts was established



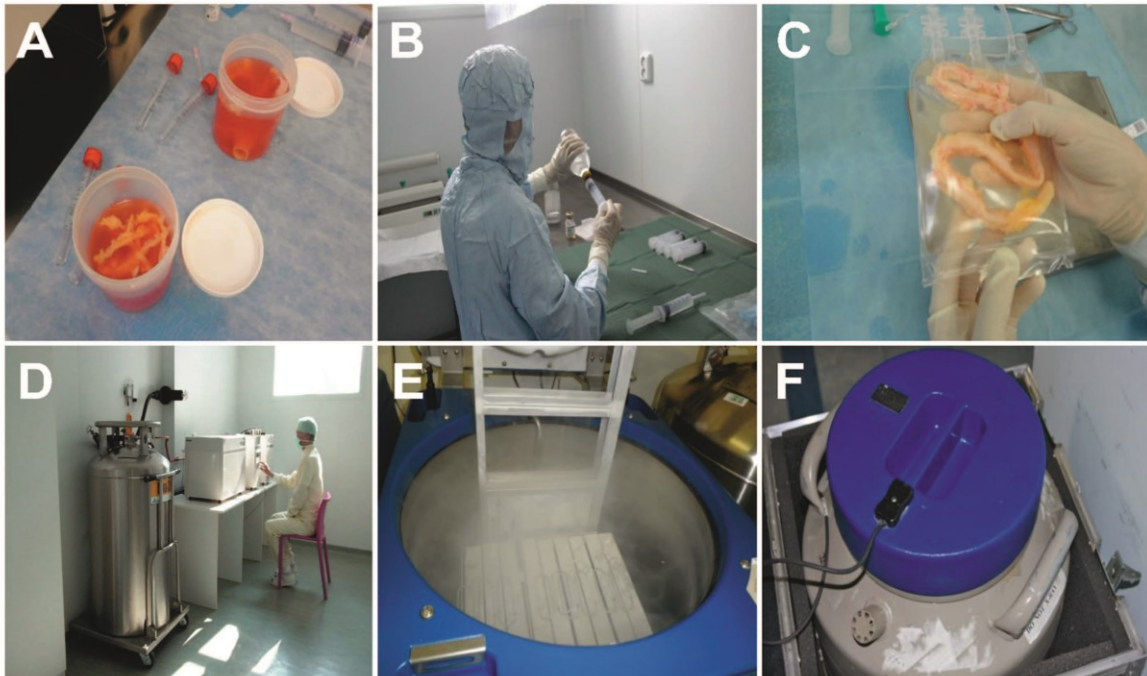


Fig. 2. Vascular allograft cryopreservation, storage and transport process

in the Institute for Clinical and Experimental Medicine in Prague, Czech Republic, as a tool for evaluation of long-term results of vascular transplantation in the Czech Republic.

### Thawing

After removal from the storage container, the cassettes with bags are transported to the operating room in the vapor phase of liquid nitrogen in a special Dewar vessel-dry shipper (Fig. 2F). In the operating room, the cassettes are removed from the shipper and placed into a refrigerator with temperature rising from +2°C to +8°C within 2 h. If some ice is still present after removal from the refrigerator, thawing can be completed at room temperature. Immediately after the ice melts, the vessels are aseptically removed from the bags and stored in the pre-cooled preservation solution (Celsior; Genzyme) until implantation.

### Surgical handling

The surgical technique of vascular transplantation requires that side branches of the grafts be treated with Prolene sutures (Ethicon, Somerville, USA), avoiding any ligation or clipping. Under no circumstances should the allografts be cross-clamped – only the native vascular system of the patient can be cross-clamped during the operation. Proximal anastomosis is performed first. Later, under

arterial pressure, the correction of sutured side branches is performed if needed. Afterwards, the graft is passed through the prepared tunnel, avoiding any rotation. Distal anastomosis of the bypass is performed. The surgical wounds are extensively drained.<sup>6</sup>

## Results

### Clinical application

The first transplantation of a cryopreserved arterial allograft was performed in 2011. Five years of follow-up were uneventful (Fig. 3). A total of 87 cryopreserved vascular allografts were delivered for clinical application between 2011 and 2016 in the Czech Republic. A total of 59 saphenous vein grafts, 12 aortic bifurcations and 16 iliaco-femoro-popliteal (unilateral) grafts were used for bypass grafting. Our aim is to have all anatomical types of grafts in all blood groups (Table 1,2). A preference for grafts retrieved from donors with blood type 0 is evident, as an advantage in the case of a lack of anatomical types in TB stock.

Although the first experimental transplantations of vascular allografts or xenografts were performed more than 100 years ago<sup>7</sup> and the mechanisms of freezing damage and cryoprotection have been known since the middle of the last century,<sup>8</sup> some theoretical and clinical aspects of this surgical procedure still remain unsolved.

Some authors describe good results achieved using transplantation of fresh arterial grafts with immunosuppression.<sup>9,10</sup> Some research groups<sup>11</sup> point out the advantages of transplantation of cryopreserved grafts, such as the low probability of infection transmission and low immunogenicity leading to limited cellular and humoral rejection – in contrast to the acute rejection of fresh grafts which leads to progressive degeneration of elastic fibers and connective tissue and aneurysm formation if immunosuppression is not used. Other authors<sup>12,13</sup> are convinced that certain cryopreservation protocols are responsible for early ruptures of grafts that may occur even intraoperatively and are always associated with life-threatening complications. It seems, however, that such serious adverse

events are less likely to occur if cryopreservation protocols based on equilibrium and slow freezing are used. Such procedures are followed by, e.g., the European Homograft Bank in Brussels (EHB)<sup>14,15</sup> and other centers, including our TE.<sup>16,17</sup>

It must not be forgotten, however, that not only the freezing protocol itself but also the pre-freezing history of the graft may be responsible for such events. Our previous study in dogs<sup>18</sup> showed that hypothermic storage of vessels in physiological saline for several days lead to considerable edema of the vessel wall. This finding shows the enhanced probability of vessel wall injury caused by crystal formation during freezing. For this reason, we consider it very important to use exclusively organ preservation solutions for intermediate hypothermic storage immediately after vascular graft harvest and to strictly control the timespan between the graft harvest in the PE and start of the cryopreservation procedure in the TE.<sup>17</sup>

Achieving relatively stable ice structures by slow freezing does not, however, guarantee complete avoidance of the devitrification phenomena during thawing, as demonstrated by Pegg et al. in experiments in rabbits.<sup>19</sup> They proved that the formation of microfractures in arteries caused by devitrification during fast thawing was responsible for graft rupture. This finding led us to the implementation of a slow-thawing protocol. In addition, injury caused by recrystallization is prevented in our practice by strict use of a cold chain based on the use of liquid nitrogen temperatures for storage and transport of grafts till thawing before use in the operating room. This is in contrast to the practice of some TEs,<sup>14</sup> which use temperatures of  $-80^{\circ}\text{C}$  for transport and even allow intermediate storage of grafts at these temperatures directly in cooperating surgical departments if the graft is not used immediately. In our practice, the graft is always sent back to the TE in the transport cryocontainer if the surgical intervention in the patient must be postponed for unexpected reasons.

Long-term storage of cardiovascular grafts in cryobanks was introduced before 2000.<sup>14,15,20</sup> Development of the storage of vascular tissue in these banks was stimulated in 2000–2010 by the issue of EU Directives and national harmonized norms such as Act No. 296/2008 Coll in the Czech Republic<sup>14</sup> or the Tissue Act in Germany,<sup>2</sup> aimed at the assurance of high quality and safety of cells and tissues used for transplantation in humans. This law caused radical changes in the standard procedures used in the tissue banks, including the recovery and processing of vascular tissue.<sup>1,2,4,13</sup> In contrast to Germany, where the use of fresh grafts was practically stopped, Czech law allows the use of fresh grafts in the regimen of organ transplantation regulated by Act No. 285/2002 Coll. within 48 h after harvest.

There is also a difference between the required purity of the environment in the graft processing areas. While Czech law permits the use of grade A environments (according to the EU GMP classification) with a grade C

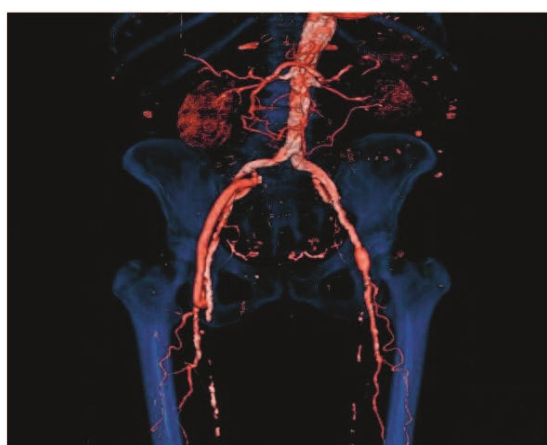


Fig. 3. First transplantation of cryopreserved arterial graft as a validation of the program was performed in 2011 in 81-year-old woman who presented with femorofemoral crossover prosthetic bypass virulent infection. Due to severe calcifications of abdominal aorta and common iliac artery an atypical iliofemoral bypass was performed

Table 1. Distribution of blood groups in venous cryopreserved grafts

| Blood group | 2011–2013 | 2014 | 2015 | 2016 | Total | Rate [%] |
|-------------|-----------|------|------|------|-------|----------|
| O           | 2         | 4    | 6    | 3    | 15    | 54       |
| A           | 0         | 2    | 7    | 0    | 9     | 32       |
| B           | 0         | 1    | 1    | 0    | 2     | 7        |
| AB          | 0         | 2    | 0    | 0    | 2     | 7        |
| Total       | 2         | 9    | 14   | 3    | 28    | 100      |

Table 2. Distribution of blood groups in arterial cryopreserved grafts

| Blood group | 2011–2013 | 2014 | 2015 | 2016 | Total | Rate [%] |
|-------------|-----------|------|------|------|-------|----------|
| O           | 2         | 4    | 6    | 3    | 15    | 54       |
| A           | 0         | 2    | 7    | 0    | 9     | 32       |
| B           | 0         | 1    | 1    | 0    | 2     | 7        |
| AB          | 0         | 2    | 0    | 0    | 2     | 7        |
| Total       | 2         | 9    | 14   | 3    | 28    | 100      |



background, German law requires the same environmental conditions as in manufacturing of sterile medicinal products, i.e., a grade A processing area with a grade B background. As the TE of the UHHK has been retrofitted in compliance with the standards of the International Society for Pharmaceutical Engineering,<sup>21</sup> it is able to assure this high level of quality of the environment that is regarded as standard in other Western European countries.<sup>11</sup> National law may also set some restrictions of the use of grafts. While in some countries, the free sale of grafts to surgical departments is possible, in Germany the use of cryopreserved vascular grafts is strictly limited to clinical trials only.<sup>13</sup> The situation in the Czech Republic is somewhere between these 2 extremes; the use of both fresh and cryopreserved grafts is limited to accredited transplantation or vascular transplantation centers.

## References

- Měříčka P, Straková H, Postupa J, Pospíšil J, Hřivňanský M, Čermák P. The impact of changes of the European Union and national legislation on the practice of a tissue bank. In: Raposio E, ed. *Tissue Engineering and Plastic Surgery*. Parma, Italy: Lulu.com; 2008:57–70.
- Fellmer P, Matia I, Tautenhahn H-M, Jonas S. Effect of legal regulations on the use of fresh arterial homografts. Problems in clinical practice [in German]. *Gefäßchirurgie*. 2011;16:403–406.
- Měříčka P, Špatenka J, Navrátil P. *Organizace a chirurgická technika odběru tkání v rámci multiorganového odběru. Odběry orgánů k transplantaci – Odběry orgánů na transplantaci*. Prague, Czech Republic: Karolinum Press; 2011:240–251.
- Měříčka P, Navrátil P, Špatenka J. *Legislativa dárcovství a odběrů tkání v České republice. Odběry orgánů k transplantaci – Odběry orgánů na transplantaci*. Prague, Czech Republic: Karolinum Press; 2011:223–239.
- Vogt PR, Brunner-La Rocca HP, Carrel T, et al. Cryopreserved arterial allografts in the treatment of major vascular infection: A comparison with conventional surgical techniques. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998;116(6):965–972.
- Vogt PR, Brunner-La Rocca HP, Lachat M, Ruef C, Turina MI. Technical details with the use of cryopreserved arterial allografts for aortic infection: Influence on early and midterm mortality. *J Vasc Surg*. 2002;35(1):80–86.
- Carrel A. Ultimate results of aortic transplantations. *J Exp Med*. 1912; 15(4):389–392.
- Mazur P, Rall WF, Leibo SP. Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova: Influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability. *Cell Biophys*. 1984;6(3):197–213.
- Matia I, Adamec M, Janousek L, Lipar K, Viklicky O. Fresh arterial grafts as conduits for vascular reconstructions in transplanted patients. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2006;32(5):549–556.
- Prager M, Hölzenbein T, Aslim E, Domenig K, Mühlbacher F, Kretschmer G. Fresh arterial homograft transplantation: A novel concept for critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Surg*. 2002;24(4):314–321.
- Vogt PR, Zünd G, Lachat M, Turina MI. Regarding "Early rupture and degeneration of cryopreserved arterial allografts". *J Vasc Surg*. 1998;27(1):189–190.
- Lehalle B, Geschier C, Fiévé G, Stoltz JF. Early rupture and degeneration of cryopreserved arterial allografts. *J Vasc Surg*. 1997;25(4):751–752.
- Fellmer PT, Matia I, Jonas S. Arterial allografts in vascular surgery: Best choice in cases of aortic graft infection? [in German]. *Zentralbl Chir*. 2013;138(5):530–535.
- Jashari R, Van Hoeck B, Ngakam R, Goffin Y, Fan Y. Banking of cryopreserved arterial allografts in Europe: 20 years of operation in the European Homograft Bank (EHB) in Brussels. *Cell Tissue Bank*. 2013;14(4): 589–599.
- Goffin YA, Van Hoeck B, Jashari R, Soots G, Kalmar P. Banking of cryopreserved heart valves in Europe: Assessment of 10 year operation in the European Homograft Bank (EHB). *J Heart Valve Dis*. 2000;9(2): 207–214.
- Müller-Schweinitzer E. Cryopreservation of vascular tissues. *Organogenesis*. 2009;5(3):97–104.
- Měříčka P, Špaček M, Janoušek L, et al. Cryopreservation of vascular grafts for clinical use: Retrospective analysis of pre-freezing factors with potential impact on the quality and safety of vascular transplantations. *Cryobiology*. 2015;71(3):546–547.
- Páral J, Ferko A, Měříčka P, et al. Příspěvek ke konzervaci žilních štěpů. *Rozhl Chirur*. 2000;79(6):244–249.
- Pegg DE, Wusteman MC, Boylan S. Fractures in cryopreserved elastic arteries. *Cryobiology*. 1997;34(2):183–192.
- Song YC, Khirabadi BS, Lightfoot F, Brockbank KG, Taylor MJ. Vitreous cryopreservation maintains the function of vascular grafts. *Nat Biotechnol*. 2000;18(3):296–299.
- van Kats JP, van Tricht C, van Dijk A, et al. Microbiological examination of donated human cardiac tissue in heart valve banking. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2010;37(1):163–169.

# Organization model for allotransplantations of cryopreserved vascular grafts in Czech Republic

Miroslav Špaček · Pavel Měříčka · Libor Janoušek · Petr Štádler · Miloš Adamec · Robert Vlachovský · Igor Guňka · Pavel Navrátil · Filip Thieme · Petr Mitáš · Rudolf Špunda · Jaroslav Špatenka · Robert Staffa · Petr Němec · Jaroslav Lindner

Received: 20 July 2017 / Accepted: 1 March 2018 / Published online: 3 March 2018  
© Springer Science+Business Media B.V., part of Springer Nature 2018

**Abstract** The transplantation of fresh or cryopreserved vascular allografts in patients with a prosthetic graft infection or critical limb ischemia is necessary for their limb salvage and, in many cases, represents a lifesaving procedure. While transplantation of fresh allografts has a long history in the Czech Republic, the standard use of cryopreserved vascular allografts was introduced into the clinical practice in 2011 as a result of the implementation of EU Directive 2004/23/EC into national legislation (Human Cell and Tissue Act

No. 296/2008 Coll.). The authors present an organizational model based on cooperation between the majority of Czech Transplant Centers with a tissue establishment licensed by the national competent authority. In various points, we are addressing individual aspects of experimental and clinical studies which affect clinical practice. Based on experimental and clinical work, the first validation of cryopreserved arterial and venous grafts for clinical use was performed between 2011 and 2013. The growing

---

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

P. Měříčka  
Tissue Bank, University Hospital Hradec Králové, Hradec Králové, Czech Republic

L. Janoušek · F. Thieme  
Department of Transplant Surgery, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

P. Štádler  
Department of Vascular Surgery, Na Homolce Hospital, Prague, Czech Republic

R. Vlachovský · R. Staffa  
2nd Department of Surgery, St. Anne's University Hospital, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

I. Guňka  
Department of Surgery, University Hospital and Faculty of Medicine Hradec Kralove, Charles University in Prague, Hradec Kralove, Czech Republic

I. Guňka · P. Navrátil  
Transplant Center, University Hospital and Faculty of Medicine Hradec Kralove, Charles University in Prague, Hradec Kralove, Czech Republic

P. Němec  
Center of Cardiovascular Surgery and Transplantations Brno, Brno, Czech Republic

J. Špatenka  
Department of Transplantation and Tissue Bank, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

M. Adamec  
Transplants Coordinating Centre, Prague, Czech Republic



number of centers participating in this programme led to a growing number of patients who underwent transplantation of vascular allografts. In 2015 the numbers of transplanted fresh versus cryopreserved allografts in the Czech Republic were almost equal. Cooperation of the participating centers in the Czech Republic with the licensed Tissue Establishment made it possible to achieve a full compliance with the European Union Directives, and harmonized national legal norms and assured a high quality of cryopreserved vascular allografts.

**Keywords** Vascular allograft · Cryopreservation · Tissue transplantation · Organization model

## Introduction

Vascular prosthesis infection is one of the most threatening complications in vascular surgery (Bahini et al. 1991). Adequate treatment, in principle, requires removal of the infected prosthetic graft followed by redo revascularization in majority of cases. In selected patients, the most suitable technique is represented by transplantation of cold-stored or cryopreserved vascular allograft (Kieffer et al. 2004). Based on experimental work of Guthrie and Carrel (1912) cold-stored arterial allografts were extensively used for aortoiliac reconstructions during the 1950s (Dubost and Allary 1951; Gross et al. 1949; Szilagyí et al. 1957). However, this technique was abandoned in the early 1960s because of difficulties with procurement and preservation, rejection with deterioration of the graft followed by ruptures or occlusions (Szilagyí et al. 1970) as well as wide availability of the new prosthetic grafts materials (Szilagyí et al. 1965; Chlupac et al. 2009). Nevertheless, in late 1980s Kieffer et al. (2004) reintroduced the use of arterial allografts for management of aortic prosthetic graft infections. This technique has been established also in other vascular centres (Kniemeyer et al. 1994; Vogt et al. 1996; Chiesa et al. 1998; Teebken et al. 2004; Harlander-Locke et al. 2014; Touma et al. 2014). Another large group of patients indicated for vascular (arterial or venous) allograft transplantation are patients with critical limb ischaemia and lack of autologous conduits, who are unsuitable for prosthetic graft implantation, mostly due to high risk of prosthesis infection

or due to poor outflow tract, or both of these conditions (Adamec et al. 2011; Matia et al. 2006, 2007, 2010; Prager et al. 2002).

Fresh vascular graft transplantation was the only option in previous years in Czech Republic. First transplantation of cryopreserved arterial graft was performed in 2011 within a new project, presented in this paper.

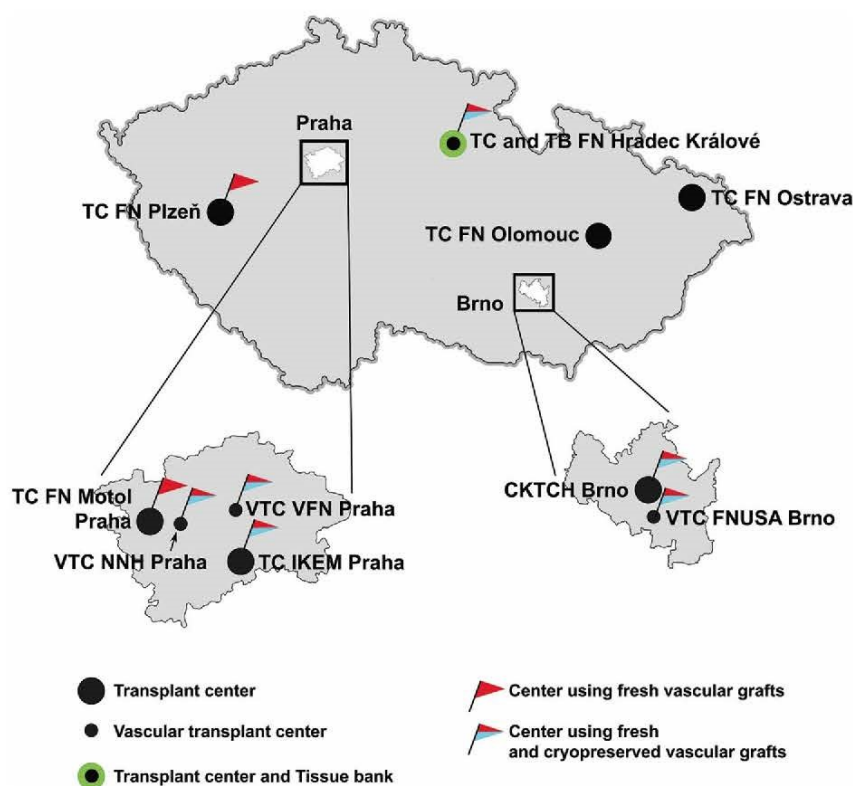
## Methodology

Statutory regulation, participatory model and organization

The allocation of vascular grafts in the Czech Republic is managed by “Transplantation Coordination Centre” (KST) on national basis, authority licensed to coordinate predominantly solid organ transplantations. Organ transplantation and fresh vascular grafts transplantation are governed in the Czech Republic by the same legislation (Měřička et al. 2011). Vascular allograft as such must be used within 48 h after harvest. However, fresh allografts were not in a sufficient abundance for all the patients on the waiting list, thus leading to a higher amputation rate or eventually a death of the patients. Especially in VTCs, the average waiting time for a fresh allograft is 2–3 weeks, and up to 20% of patients from previous years (2010–2013) did not receive graft at all. Currently there are five centres in Czech Republic that actively use fresh vascular allografts (Fig. 1).

For these reasons, we came with the initiative to create a nationwide programme of cryopreserved vascular allograft transplantation in the Czech Republic. The existence of such programme would enable the surgeons to receive vascular grafts of the desired anatomical type, size and blood type for patients indicated for emergency vascular surgery. This programme would also supply vascular allografts for semi-elective patients, where surgical treatment could be integrated into the patient’s treatment plan. All the major organ transplant centres (TC) were addressed by the KST to participate in this programme. The most TCs were in favour of cooperation on a voluntary basis within of the Czech transplant society. The rules of cooperation include the development of indication criteria, the degree of urgency, allocation criteria, and

**Fig. 1** Transplant centres and vascular transplantation centres in Czech Republic



cooperation agreement with multi-organ harvest teams of the regional transplantation centres.

The programme “Cryopreserved vascular grafts” is governed by different rules than the legislation regulating organ transplant. For this reason, the participating centres were licensed for this activity by the State Institute for Drug Control (SUKL) as Procurement Establishments (PE) tightly connected by agreements with the licensed Tissue Establishment (TE)—Tissue Bank of the University Hospital Hradec Králové. All these licences were granted after the proof of full compliance of practice of these facilities with the strict safety and quality requirements settled by the Directives 2004/EC, 17/2006/EC, 2006/86/EC and national harmonized legal norms: Act No 296/2008 Coll. (Human Cell and Tissue Act) and Decree of the Ministry of Health No. 422/2008 Coll. (Měřička et al. 2008; Fellmer et al. 2011). The licensing process included both reviewing the submitted documentation as well as on-site inspections that are repeated in 2 year intervals. Cryopreservation of collected grafts, subsequent storage at liquid nitrogen

temperatures and quality control ended by release for clinical application are the main duties of the tissue bank. This service is, however, accessible only for centres involved in the programme. Distribution of grafts is performed by a licensed company able to perform emergency and rapid transport of cryopreserved grafts in a vapour phase of liquid nitrogen to any place in the Czech Republic.

The described system of cooperation is based on solidarity within the non-profit project, as the grafts are allocated solely to the specialized vascular surgery departments with the highest level of practice, that ensures quality of care and safety of this type of treatment, including the management of complications and long term follow up. VTC surgeons are participating in the collection of vascular grafts for cryopreservation within regional TC. The clinical programme of transplantation of cryopreserved grafts was started in the end of 2013 after completing the validation stage of manufacturing of grafts and the licensing process of the TE and 6 PEs included in the project (2009–2013) (Fig. 1). Currently 3 another



centres are undergoing licensing proces, before they join the programme.

#### Indications for transplantation, criteria of urgency

There was made a consensus inside the working group on indications for vascular allograft transplantation and urgency of patients on waiting list. All existing diagnoses were divided into three groups—I. Life saving procedures, II. Limb saving procedures and III. Chronic disease—other non urgent diagnoses (Table 1). Similarly, for patients scheduled for cold-stored vascular allograft the same criteria of urgency are used. If there is no adequate cryopreserved allograft for patient in the Tissue bank, we schedule him or her for cold-stored graft in urgency depending upon diagnosis. If two patients have the same urgency, there is criterion of time, when he/she was scheduled on waiting list.

#### Waiting list management

The “Transplants Coordinating Centre” maintains a “Waiting List” (WL) for all patients waiting for organ transplants that take place in the Czech Republic. In the same manner, waiting lists for patients who were indicated for transplantation of fresh or cryopreserved vascular graft are maintained—thus currently two vascular waiting lists exist. The patient’s inclusion for one of the waiting lists is the preference of indicating surgeon. The surgeon chooses either fresh or cryopreserved vascular graft. The patient’s position on the WL is determined by the degree of urgency, diagnosis and the date of inclusion. Responsible

person of individual transplantation centres are monthly supplied with updated information regarding the availability of cryopreserved vascular grafts by the tissue bank staff.

#### Working group

The programme committee required that a working group for vascular grafts and allotransplantation be established in the Czech Society of Cardiovascular Surgery (ČSKVCH). Working group approach all heads of the cooperating centres with task of appointing responsible contact person. Most centres have therefore 2 representatives. Furthermore, any member can become a contact personal if he/she is approved by the head of the centre. Inaugural meeting is organized by the elected President who convenes twice year addresses of current problems, and one annual meeting serving for preparation of activity report submitted to the committee of ČSKVCH.

#### Quality control and quality assurance

Our quality control and quality assurance system has been established in accordance with the rules settled by the above mentioned European Union Directives, general Good Manufacturing Practice (GMP) recommendations and national legal norms. Its function is regularly checked by audits organized by the TE and by inspections conducted by State Institute of Drug Control at least once in 2 years.

Serology of the donor includes following tests: anti HIV1,2, HIV 1 Ag, HBsAg, anti HBc total, anti HCV, anti HTLV and syphilis serology (tests RRR and

**Table 1** Criteria of urgency, waiting list for vascular allograft transplantation

| Urgency criteria—the waiting list   |
|---|
| I. Urgent—life saving procedure   |
| Bleeding from vascular anastomosis (infection caused by virulent pathogen)              |
| Soft tissue defect above the vascular anastomosis/visible vascular graft                |
| Vascular graft infection— patient with elevated infection markers on antibiotic therapy |
| II. Urgent—limb saving procedure  |
| Critical limb ischemia- rest pain   |
| Critical limb ischemia- soft tissues defect   |
| III. Normal   |
| Vascular graft infection caused by pathogens with low virulence                         |
| Chronic ischemic defect of soft tissues (PAD)   |
| Vascular access implantation  |

TPHA). These tests can be performed only in the diagnostic laboratories approved by the State Institute for Drug Control. Any positive finding in these tests is indication for discard of collected tissues with exception of positivity of anti HBc total test. In this case the presence of the virus DNA can be verified and/or excluded by use of the PCR test. Verification of the clinical diagnosis by autopsy is an obligatory step of our quality assurance system.

Bacteriology and mycology tests are performed in the specialized control laboratories regularly inspected by the State Institute for Drug Control. The input and output bacteriological control includes taking swabs from collected vessels, quantitative bacteriology and sterility tests from the collection and final preservation solution. In case of positive result tests for assessment of resistance on antibiotics are made. There is a strict requirement of the proof of sterility in the output control. Another indication for tissue discard is a finding of pathogenic bacteria in the input control.

Reporting of SAR and SAE connected both with collection, processing distribution and transplantation of grafts and is another important feature of our quality assurance system. A register for recording all clinical results achieved in all centres using cryopreserved grafts was established in the Institute for Clinical and Experimental Medicine in Prague as a tool for evaluation of long-term results of vascular transplantation in the Czech Republic.

The conditions under which the vascular tissue is harvested are very important. Our recent study (Měříčka et al. 2015) showed the advantages of aseptic harvest that immediately follows organ retrieval in a multiorgan donor and guarantees very low initial bacterial contamination rate. The fact that tissue is harvested exclusively by specially trained surgeons is without any doubt responsible for low discard rate of grafts due to the graft morphology of the graft.

The centres that do not use surgical harvest techniques described high discard rate due to morphology of the graft. The total discard rate in the EHB was reported to be 32% and in more than half of cases the reason for discard was morphology of the graft (Jashari et al. 2013).

In our practice the most frequent cause of graft discard is unsterility detected at the output control. The slightly modified method described by van Kats

(2010) is used for decontamination and the discard rate of 16% found by us (Měříčka et al. 2015) is almost identical with the results published by the author of the method (van Kats et al. 2010). As no contamination by molds or fungi was found supplementation of transport solution with highly cytotoxic Amphotericin B is not used. It is obligatory for grafts harvested at post-mortem facilities.

## Results

In past years, only centres dealing with organ transplants could obtain fresh vascular allografts in Czech Republic. Only 6 transplant centres met these criteria (Fig. 1). Large vascular surgery centres did not have access for this type of treatment. For this reason, Ministry of Health changed formal status for three largest vascular surgical centres to “Vascular transplant centre” (VTC- with a minimum handling of tissues—Fig. 1). These centres were allowed to retrieve fresh vascular grafts within multi-organ procurement (since 2010).

### Implementation of the programme to the clinical practice

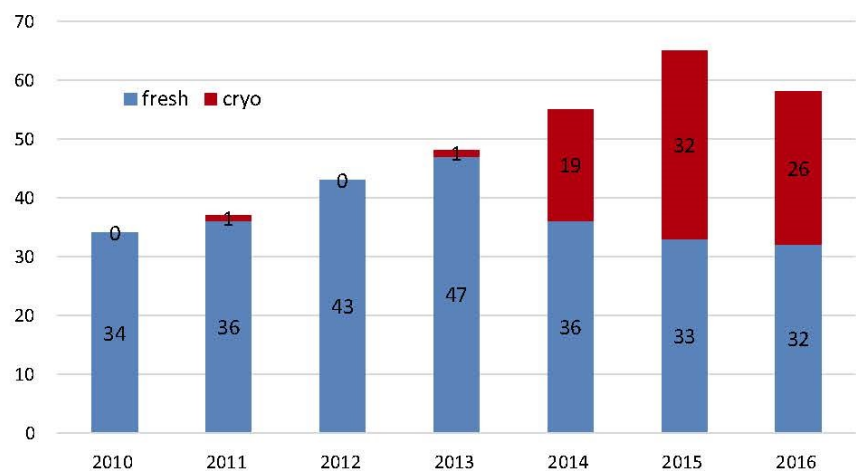
The patients indicated for transplantation of either cold-stored vascular allograft (both arterial or venous) or cryopreserved vascular allograft (both arterial or venous) were integrated into a waiting list similar to that used for potential recipients in solid organ transplantation. The ABO compatibility, but no HLA compatibility, is required between donors and recipients. Similarly, no cross-match is performed. Total of 87 cryopreserved vascular allografts were delivered for clinical application between 2011 and 2016 in Czech Republic (Table 2, Fig. 2).

### Recommendations for immunosuppressive therapy

Despite inhibition of vessel allografts destruction by immunosuppression confirmed experimentally (Hrubý et al. 2015; Matia et al. 2014) the use of immunosuppression in patients after arterial or venous allograft transplantation is not generally accepted by vascular surgeons. Recommendation for the immunosuppressive treatment protocol for all Czech participating

**Table 2** Cryopreserved grafts delivered for clinical application (2011–2016)

|                                | 2011–2013 | 2014 | 2015 | 2016 | Total |
|--------------------------------|-----------|------|------|------|-------|
| Saphenous vein                 | 0         | 16   | 18   | 24   | 58    |
| Vena cava + iliaca             | 0         | 1    | 0    | 0    | 1     |
| Aortic bifurcation             | 2         | 6    | 4    | 0    | 12    |
| Iliaco-femoro-popliteal grafts | 0         | 3    | 10   | 3    | 16    |
| Aortic arch and thoracic aorta | 0         | 0    | 0    | 0    | 0     |
| Total                          | 2         | 26   | 32   | 27   | 87    |

**Fig. 2** Developments in the number of both fresh and cryopreserved vascular grafts transplantations in the Czech Republic (2010–2016)

centres consists of orally administered tacrolimus given from day 7 post-transplant. The drug blood level generally ranging between 4 and 7  $\mu\text{g/L}$  (Matia et al. 2006, 2007, 2010). Tacrolimus is administered throughout the entire period of allograft patency and blood levels are determined periodically (Table 3).

#### Financial challenges

Calculation of reimbursement of expenses connected with harvesting, processing, storage, quality control and distribution of grafts is based on non-profit and tax-free principles. The costs of transporting grafts from the TC to the TE are included as well. The entire project is conceived as a non-profit and covers costs

**Table 3** Protocol for immunosuppressive treatment

#### Protocol for immunosuppressive treatment (Tacrolimus)

1. For grafts implanted for CLI, immunosuppression is given from 1st post-operative day. In patients on antibiotic treatment it is 7th post-operative day
2. Monotherapy of Tacrolimus is used with target levels between 4 and 7 ng/ml
3. The levels of immunosuppression and renal functions are examined in 3 months intervals during the first year, and in 6 months intervals afterwards
4. If there are no clinical or CT signs of graft rejection, the dose is minimalized after 24 months to 0.5 mg a day (at a minimum plasma concentrations)
5. For patients who are not able to control the levels of Tacrolimus, Cyclosporin A ( $2 \times 25$  mg) is an alternative
6. Patients with advanced renal disease are immunosuppressed on a case by case basis



incurred by the graft procurement, its cryopreservation and storage. These items are paid retroactively withdrawing the hospital payment from health insurance companies. For this reason, the start of the project was not possible without financial support of the participating Teaching Hospitals. Standard charge for each graft suitable for clinical use is, in average, 1000 Euro. One-third is a price of retrieval and is paid to a center where the graft was harvested and two-thirds of this price is for cryopreservation, storage and transport.

## Discussion

Long term storage of cardiovascular grafts in cryobanks was started before the end of the last millennium (Jashari et al. 2013; Goffin et al. 2000; Song et al. 2000). Development of storage of vascular tissue in these banks was stimulated in the first decade of the new millennium by the issue of EU Directives and national harmonized norms such as Act. No 296/2008 Coll in the Czech Republic (Měříčka et al. 2008, 2011) or the Tissue Act in FRG, (Fellmer et al. 2011) aimed on assurance of high quality and safety of cells and tissues used for transplantation in man. This law caused radical change in standard procedures used in the tissue banks, including harvest and processing of vascular tissue (Měříčka et al. 2011; Fellmer et al. 2011, 2013) In contrast to FRG, where the use of fresh grafts was practically stopped, the Czech law allows to use fresh grafts in the regimen of organ transplantation regulated by Act No. 285/2002 Coll. within 48 h after harvest. There is also a difference between required purity of the environment in the graft processing areas. While the Czech law permits to use environment of the grade A with the background C the German Law orders the same environmental conditions as in manufacturing sterile medicinal products, processing area of the grade A with the background of the grade B. As the TE of the UHHK was renovated in compliance with standards of the International Society for Pharmaceutical Engineering (van Kats et al. 2010) it is able to assure this high level of quality of the environment that is regarded as standard also in other West European countries (Vogt et al. 1998). The national law may also settle some restrictions of the use of grafts. While in some countries free sale of grafts to surgical departments is possible, in the FRG the use of cryopreserved vascular grafts is strictly

limited to clinical trials only (Fellmer et al. 2013). The Czech position is somewhere between these two extremes; the use of both fresh and cryopreserved grafts is limited to accredited transplantation or vascular transplantation centers approved to use immunosuppressive drugs.

The conditions under which the vascular tissue is harvested are very important. Our recent study (Měříčka et al. 2015) showed the advantages of aseptic harvest that immediately follows organ retrieval in a multiorgan donor and guarantees very low initial bacterial contamination rate. The fact that tissue is harvested exclusively by specially trained surgeons is responsible for low discard rate of grafts due to the graft morphology of the graft.

It is also important that this type of surgical procedures are concentrated in specialized vascular surgery centres, because the operation for vascular infections are among the most difficult, and the results are dependent on the experience of each centre and individual surgeons (Vogt et al. 1998). This also means selecting a solution for each patient, because allograft transplantation is only one of the treatment options for vascular prosthesis infection (Vogt et al. 1998). The same conditions are identical also for patients operated on for critical limb ischemia, or other rare indications. The actual periprocedural handling with vascular allografts can greatly affect subsequent complications that can occur in patients (thawing etc.). For this reason the presented project is strictly limited to centres included, and free sale of cryopreserved grafts to other medical facilities is excluded.

There is a need, however to conduct clinical studies to help answer several questions related to immunosuppressive therapy (Špunda et al. 2016). The questions regarding the necessity of immunosuppression with cryopreserved allogenic vein is still open (Matia et al. 2016). It is also necessary to specify the indication criteria for vascular grafts transplantation in special situations where there is risk of persistent infectious contamination of the surgical field exists (Noel et al. 2002; O'Connor et al. 2006; Minga Lowampa et al. 2016).

Presented programme for transplantation of cryopreserved vascular grafts established a service that did not exist in the Czech Republic earlier. Cooperation of the participating centres in the Czech Republic with the licensed Tissue Establishment made it possible to achieve a full compliance with the European Union



Directives and harmonized national legal norms and assured high quality of cryopreserved vascular allografts, and thus contributed to increased safety of the treated patients.

## References

- Adamec M, Matia I, Janousek L (2011) Immunosuppression following venous allografts transplantations—the authors' experience. *Rozhl Chir* 90(2):130–133
- Bahnini A, Ruotolo C, Koskas F, Kieffer E (1991) In situ fresh allograft replacement of an infected aortic prosthetic graft: eighteen months' follow-up. *J Vasc Surg* 14(1):98–102
- Carrel A (1912) Ultimate results of aortic transplantations. *J Exp Med* 15(4):389–392
- Chiesa R, Astore D, Piccolo G, Melissano G, Jannello A et al (1998) Fresh and cryopreserved arterial homografts in the treatment of prosthetic graft infections: experience of the Italian Collaborative Vascular Homograft Group. *Ann Vasc Surg* 12(5):457–462
- Chlupac J, Filova E, Bacakova L (2009) Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. *Physiol Res* 58(2):119–139
- Dubost C, Allary M (1951) Aneurysm of the abdominal aorta treated by resection and graft. *Arch Mal Coeur Vaiss* 44(9):848–851
- Fellmer P, Matia I, Tautenhahn H-M, Jonas S (2011) Effect of legal regulations on the use of fresh arterial homografts. *Probl Clin Pract. Gefässchirurgie* 16:403–406
- Fellmer PT, Matia I, Jonas S (2013) Arterial allografts in vascular surgery—best choice in cases of aortic graft infection? *Zentralbl Chir* 138(5):530–535
- Goffin YA, Van Hoeck B, Jashari R, Soots G, Kalmar P (2000) Banking of cryopreserved heart valves in Europe: assessment of 10 year operation in the European Homograft Bank (EHB). *J Heart Valve Dis* 9(2):207–214
- Gross RE, Bill AH Jr, Peirce EC Jr (1949) Methods for preservation 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* 88(6):689–701
- Harlander-Locke MP, Harmon LK, Lawrence PF, Oderich GS, McCready RA et al (2014) The use of cryopreserved aortoiliac allograft for aortic reconstruction in the United States. *J Vasc Surg* 59(3):669–674
- Hrubý J, Špunda R, Měříčka P, Miček M, Splith K et al (2015) Influence of cryopreservation on antigenicity of aortal allografts in rats. *Cryobiology* 71(3):543
- Jashari R, Van Hoeck B, Ngakam R, Goffin Y, Fan Y (2013) Banking of cryopreserved arterial allografts in Europe: 20 years of operation in the European Homograft Bank (EHB) in Brussels. *Cell Tissue Bank* 14(4):589–599
- Kieffer E, Gomes D, Chiche L, Fléron MH, Koskas F et al (2004) Allograft replacement for infrarenal aortic graft infection: early and late results in 179 patients. *J Vasc Surg* 39(5):1009–1017
- Kniemeyer HW, Torsello G, Hennes N, Grabitz K, Sandmann W (1994) Fresh homologous arterial transplant as aorto-iliac-femoral vascular replacement in prosthesis infection. *Vasa* 23(3):268–273
- Matia I, Adamec M, Janousek L, Lipar K, Viklicky O (2006) Fresh arterial grafts as conduits for vascular reconstructions in transplanted patients. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 32(5):549–556
- Matia I, Janousek L, Marada T, Adamec M (2007) Cold-stored venous allografts in the treatment of critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 34(4):424–431
- Matia I, Adamec M, Janousek L, Lipár K, Marada T et al (2010) Clinical experience with cold-preservation of venous and arterial allografts. Long-term outcomes. *Rozhl Chir* 89(1):45–54
- Matia I, Fellmer P, Splith K, Varga M, Adamec M et al (2014) Immunosuppressive protocol with delayed use of low-dose tacrolimus after aortic transplantation suppresses donor-specific anti-MHC class I and class II antibody production in rats. *Ann Transplant* 12(19):225–232
- Matia I, Hruby J, Spunda R, Adamec M, Varga M et al (2016) Influence of cryoconservation on antigenicity of arterial allografts: a review. *Eur Surg* 48(3):192–193
- Měříčka P, Straková H, Postupa J, Pospíšil J, Hřivňanský M et al (2008) The impact of changes of the European Union and National legislation on the practice of a tissue bank. In: Raposio E (ed) *Tissue engineering and plastic surgery*, 1 edn. Parma, Lulu.com, pp 57–70
- Měříčka P, Navrátil P, Špatenka J (2011) *Legislativa dárcovství a odběru tkání v České republice. Odběry orgánů k transplantaci*, 1 vyd. Karolinum, Praha, pp 223–239
- Měříčka P, Špaček M, Janoušek L, Dvořáček L, Štádl P et al (2015) Cryopreservation of vascular grafts for clinical use—retrospective analysis of pre-freezing factors with potential impact on the quality and safety of vascular transplantations. *Cryobiology* 71(3):546–547
- Minga Lowampa E, Holemans C, Stiennon L, Van Damme H, Defraigne JO (2016) Late fate of cryopreserved arterial allografts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 52(5):696–702
- Noel AA, Głowiczki P, Cherry KJ Jr, Safi H, Goldstone J et al (2002) United States cryopreserved aortic allograft Registry. Abdominal aortic reconstruction in infected fields: early results of the United States cryopreserved aortic allograft registry. *J Vasc Surg* 35(5):847–852
- O'Connor S, Andrew P, Batt M, Becquemin JP (2006) A systematic review and meta-analysis of treatments for aortic graft infection. *J Vasc Surg* 44(1):38–45
- Prager M, Hölzenbein Th, Aslim E, Domenig K, Mühlbacher F, Kretschmer G (2002) Fresh arterial homograft transplantation: a novel concept for critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Surg* 24(4):314–321
- Song YC, Khirabadi BS, Lightfoot F, Brockbank KGM, Taylor MJ (2000) Vitreous cryopreservation maintains the function of vascular grafts. *Nat Biotechnol* 18(3):296–299
- Špunda R, Hrubý J, Adamec M, Varga M, Lindner J et al (2016) Cold-stored arterial allografts for in situ reconstruction of infected prosthetic grafts. Review of immunosuppressive protocols used in clinical practice. *Eur Surg* 48(Suppl 2):166–168

- Szilagyi DE, Mc DR, Smith RF, Whitcomb JG (1957) Biologic fate of human arterial homografts. *AMA Arch Surg* 75(4):506–527
- Szilagyi DE, Smith RF, Elliott JP, Allen HM (1965) Long-term behavior of a dacron arterial substitute: clinical, roentgenologic and histologic correlations. *Ann Surg* 162(3):453–477
- Szilagyi DE, Rodriguez FJ, Smith RF, Elliott JP (1970) Late fate of arterial allografts. Observations 6 to 15 years after implantation. *Arch Surg* 101(6):721–733
- Teebken OE, Pichlmaier MA, Brand S, Haverich A (2004) Cryopreserved arterial allografts for in situ reconstruction of infected arterial vessels. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 27(6):597–602
- Touma J, Cochenec F, Parisot J, Fialaire Legendre A et al (2014) In situ reconstruction in native and prosthetic aortic infections using cryopreserved arterial allografts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 48(3):292–299
- van Kats JP, van Tricht C, van Dijk A, van der Schans M, van den Bogaardt A et al (2010) Microbiological examination of donated human cardiac tissue in heart valve banking. *Eur J Cardiothorac Surg* 37(1):163–169
- Vogt PR, von Segesser LK, Goffin Y, Niederhauser U, Genoni M et al (1996) Eradication of aortic infections with the use of cryopreserved arterial homografts. *Ann Thorac Surg* 62(3):640–645
- Vogt PR, Brunner-La Rocca HP, Carrel T, von Segesser LK, Ruef C et al (1998) Cryopreserved arterial allografts in the treatment of major vascular infection: a comparison with conventional surgical techniques. *J Thorac Cardiovasc Surg* 116(6):965–972