

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

**Vliv nového kryokonzervačního
prokolu na imunogenicitu a rejekci
tepenných aloštěpů u potkanů**

MUDr. Jan Hrubý

Praha 2021

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Zdeněk Krška, DrSc

Školící pracoviště: II. chirurgická klinika kardiovaskulární chirurgie
VFN a 1. LFUK

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

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

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním
obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na
Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky
Děkanátu 1. lékařské fakulty

OBSAH

SOUHRN	str. 4
SUMMARY	str. 5
1. ÚVOD	str. 6
2. HYPOTÉZA	str. 7
2.1. Cíl práce	str. 7
3. MATERIÁL A METODY	str. 7
3.1. Základní rozvržení experimentu, charakteristika jednotlivých skupin a chirurgická technika odběru a transplantace aortálních štěpů	str. 7
3.2. Protokol kryokonzervace, uchovávání a rozmrazení štěpů břišní aorty	str. 8
3.3. Histologické a imunohistochemické vyšetření štěpů břišní aorty	str. 10
3.4. Detekce donor specifických anti-MHC protilátek I. a II. třídy v periferní krvi příjemců	str. 10
4. VÝSLEDKY	str. 12
5. DISKUZE	str. 15
6. ZÁVĚR	str. 17
7. LITERATURA	str. 17
8. VLASTNÍ PUBLIKAČNÍ AKTIVITA	str. 18

SOUHRN

Hlavním cílem předložené experimentální práce bylo studovat na potkaním modelu akutní buňkami a protilátkami zprostředkovanou imunitní reakci u příjemců štěpů břišní aorty ošetřených novým standardizovaným klinickým kryokonzervačním protokolem s pomalým rozmrazováním používaným v „Programu transplantace cévních štěpů v České republice“. Dalším cílem bylo porovnat tuto imunitní reakci s akutní buňkami a protilátkami zprostředkovanou rejekcí aloštěpů zpracovanými v souladu s protokolem konzervace chladem používaným ve stejném klinickém programu. Kryokonzervované štěpy břišní aorty jsme transplantovali syngenně mezi potkany kmene Lewis (skupina CRYO-ISO, doba kryokonzervace 172,6 dnů) a alogenně mezi potkany kmenů Brown – Norway a Lewis (skupina CRYO-ALO, doba kryokonzervace 179,3 dnů). Štěpy jsme explantovali 30. pooperační den a poté histologicky a imunohistochemicky vyšetřili. Sledovali jsme přítomnost endotelových buněk, známky intimální hyperplázie, šířku tunica media, přítomnost nekróz a ukládání protilátek třídy G v této vrstvě, počet CD4+, CD8+ a LEW MHC II+ imunokompetentních buněk v adventiciální vrstvě a koncentraci donor specifických protilátek proti MHC antigenům I. a II. třídy v periferní krvi předoperačně a na 30. den po transplantaci. Data jsme statisticky porovnali s daty z našeho minulého experimentu s chladem konzervovanými štěpy břišní aorty. Tunica intima kryokonzervovaných aloštěpů nevykazovala na 30. den po transplantaci na rozdíl od chladem konzervovaných žádné nebo jen minimální známky intimální hyperplázie. Luminální povrch byl pokryt endoteliálními buňkami. Tunica media kryokonzervovaných aloštěpů nevykazovala na rozdíl od chladem konzervovaných známky nekróz s ukládáním imunoglobulinů G. Adventiciální infiltrace kryokonzervovaných aloštěpů buňkami CD4+, CD8+ byla desetkrát nižší ve srovnání s chladem konzervovanými aloštěpy. Statisticky vyšší koncentrace ve srovnání s předoperačními hodnotami u příjemců kryokonzervovaných aloštěpů jsme zaznamenali pouze u protilátek proti MHC antigenům I. třídy. U příjemců chladem konzervovaných aloštěpů jsme zaznamenali na 30. den ve srovnání s předoperačními hodnotami statisticky významné zvýšení koncentrace u obou tříd anti MHC protilátek. Závěrem naší experimentální práce je, že studovaný nový kryokonzervační protokol s pomalým rozmrazováním vedl 30 dnů po transplantaci aloštěpů břišní aorty u potkanů ke snížení jejich imunogenicity a výraznému potlačení známek akutní rejekce.

SUMMARY

The aim of the presented experimental work was to study an acute cell and antibody-mediated immune response in recipients of abdominal aortic grafts treated by a new standardized clinical cryopreservation/slow thawing protocol used in the „Vascular graft transplant program of the Czech Republic" in a rat model. In addition, the another aim was to compare the influence of two basic types of conservation protocols used in this program (cryopreservation/slow thawing protocol and cold-storage protocol) on the acute immune response after transplantation of such treated abdominal aortic grafts in rats. Cryopreserved abdominal aortic grafts were transplanted syngeneically between Lewis rats (CRYO-ISO group, cryopreservation period 172.6 days) and allogeneically between Brown-Norway and Lewis rats (CRYO-ALO group, cryopreservation period 179.3 days). The grafts were explanted on day 30 after transplantation and examined by histological and immunohistochemical methods. We monitored the presence of endothelial cells, signs of intimal hyperplasia, tunica media thickness, the presence of necrosis and deposition of immunoglobulin class G in this layer, the number of CD4+, CD8+ and LEW MHC II+ immunocompetent cells in the adventitial layer and concentration of donor-specific anti-MHC class I and II antibodies in peripheral blood preoperatively and on day 30 after transplantation. We compared the obtained data statistically with the basic data of our previous experimental study of acute rejection of cold-stored abdominal aortic grafts on the same animal model. Cryopreserved allografts showed regular aortic wall morphology with well-preserved differentiation of all three anatomical layers. Tunica intima of cryopreserved allografts showed no or only minimal signs of intimal hyperplasia, in contrast to cold-stored allografts. Compared to cold-stored, tunica media of cryopreserved allografts did not show signs of necrosis and immunoglobulin class G deposition, respectively. Statistically higher concentrations compared to preoperative values in recipients of cryopreserved allografts were recorded only by anti-MHC class I antibodies. Day 30 recipient sera of both cryopreserved and cold-stored allografts showed significant higher inhibition of fluorescence-labelled MHC class I antibody binding to donor quiescent splenocytes compared to preoperative values. In conclusion, our new standardized clinical cryopreservation/slow thawing protocol led to a reduction of immunogenicity of cryopreserved aortal allografts when compared to cold-stored aortal allografts.

1. ÚVOD

Infekční komplikace protetických rekonstrukcí břišní aorty prováděných otevřeně jsou v současné literatuře uváděny mezi 0.1-6.0 % (Moher et al., 2009) a jsou vždy zatíženy vysokou morbiditou a mortalitou. Základem léčby je odstranění infikované cévní náhrady a dokonalý debridement infikovaných tkání v okolí s cílenou, dlouhodobou antibiotickou terapií a provedením nové cévní extra-anatomické nebo novější a bezpečnější in-situ rekonstrukce (Chakfé et al., 2020).

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

V roce 2011 byl v České republice zahájen klinický program transplantace kryokonzervovaných cévních štěpů, který rozšířil program transplantace chladem konzervovaných štěpů rozvíjený v našich podmínkách od poloviny 90 let. 20. století (Matia et al., 2007, Špaček et al., 2018). Po dvou letech existence programu kryokonzervace štěpů byl počet transplantovaných kryokonzervovaných a chladem konzervovaných tepen v České republice prakticky stejný (Špaček et al., 2018).

V současné klinické praxi se ve světě používají značně odlišné kryokonzervační protokoly. Ty se navzájem liší ve všech základních bodech jako jsou vlastnosti použitých konzervačních roztoků, čas studené ischemie nebo způsob rozmrazování štěpu před transplantací.

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

Největší otázkou bezpečného použití kryokonzervovaných tepenných aloštěpů v léčbě infekcí je kvalita, resp. stupeň poškození jejich stěny procesem kryokonzervace a následného rozmrazení a též v čase probíhající změny v důsledku rejekce transplantované cévy. Kryokonzervační poškození cévní stěny se může projevit v extrémním případě její časnou rupturou, pozdní trombózou nebo dilatací štěpu (Lejay et al., 2017).

2. HYPOTÉZA

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

2.1. Cíle práce:

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

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Základní rozvržení experimentu, charakteristika jednotlivých skupin a chirurgická technika odběru a transplantace aortálních štěpů

Jako dárce štěpů břišní aorty jsme použili samce potkanů kmene Brown–Norway (N=3, 203-217 g) a Lewis (N=3, 248-254 g). Příjemci štěpů byli potkani kmene Lewis (N=6, 191-250 g). Vlastní odběr infrarenální břišní aorty jsme provedli v celkové intramuskulární anestezii. Po střední laparotomii a preparaci retroperitonea jsme za pomoci operačního mikroskopu odebrali 2-3 cm dlouhý segment břišní aorty. Štěpy jsme

zpracovali podle kryokonzervačního protokolu a následně skladovali v parách kapalného dusíku při teplotě - 180 °C v průměru 176 dnů až do doby jejich implantace. Před transplantací jsme štěpy rozmrazili v souladu s protokolem pomalého rozmrazování (použitý kryokonzervační a rozmrazovací protokol je podrobně uveden níže). K ortotopické transplantaci štěpů u zvířat v celkové intramuskulární anestezii jsme použili optický mikroskop s 10násobným zvětšením, aproximátor a techniku jednotlivě zakládáných stehů. Štěpy jsme explantovali 30. pooperační den v celkové intramuskulární anestezii po provedení střední relaparotomie. Transplantované aorty jsme připravili na histologické a imunohistochemické vyšetření (viz níže).

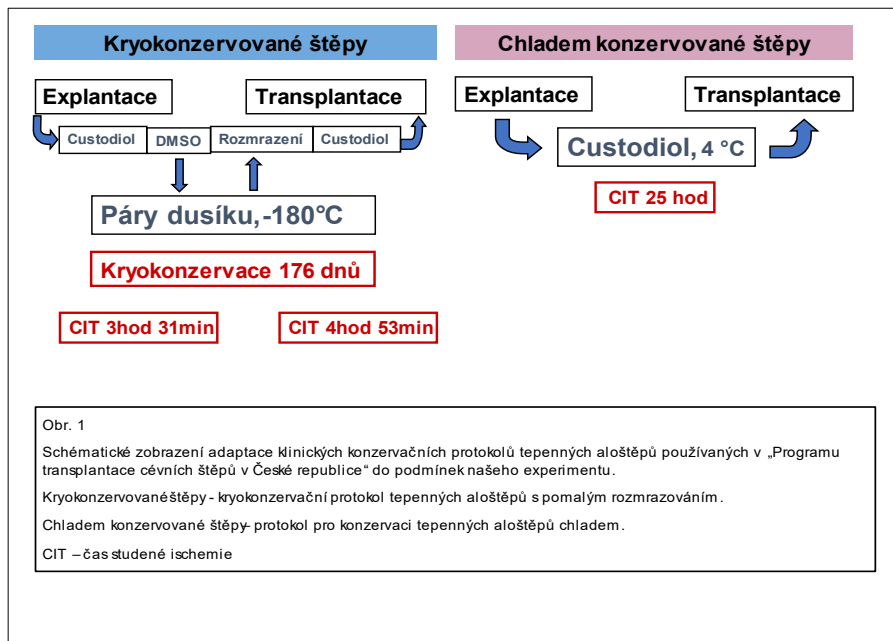
3.2. Protokol kryokonzervace, uchovávání a rozmrazení štěpů břišní aorty

Každý štěp břišní aorty jsme po odběru propláchli 2 ml roztoku Custodiolu obsahující 100 IU/ml heparinu a poté umístili do 10 ml roztoku Custodiolu o teplotě 4 °C. Štěpy jsme následně skladovali při teplotě tajícího ledu v uzavřených sterilních plastových nádobách až do ukončení odběru všech štěpů v daný operační den. Poté jsme je vložili do dvojitých sterilních plastových sáčků obsahující 25 ml vychlazeného 6% roztoku hydroxyethylškrobu o molekulární hmotnosti 130 000 Da doplněného 20% roztokem kryoprotektantu dimethylsulfoxidu (DMSO) a každý vak uzavřeli zatavením ve svářečce. Sáčky jsme poté vložili do speciálních kovových kazet a uložili při teplotě tajícího ledu až do začátku procesu kryokonzervace, který probíhal při kontrolovaném poklesu teploty v programovatelném zamrazovacím zařízení KRYO – 10 rychlostí – 1K/min do -90 °C, a poté -5K/min do -150 °C. Ihned po dokončení kryokonzervace jsme kazety se štěpy převezli v transportním boxu do kryokonzervačního skladu Ústavu hematologie a krevní transfúze v Praze, kde jsme je uchovávali 6 měsíců v parách tekutého dusíku a teplotě -180 °C až do doby jejich implantace. Před vlastní transplantací jsme štěpy po vyjmutí z transportního zařízení umístili do chladničky při teplotě + 4 °C po dobu 60 minut. Následně jsme štěpy ponechali po dobu 30 min při pokojové teplotě. Potom jsme je vyjmuli z plastového vaku a každý štěp rozdělili na dvě stejně dlouhé části, které jsme poté použili k transplantaci u dvou příjemců. Oba transplantáty jsme po rozdělení uchovávali odděleně v 10 ml roztoku

Custodiolu v lednici při teplotě + 4°C až do začátku transplantace.

Celý proces zahrnující odběr aorty, kryokonzervaci, skladování, rozmrazování a transplantaci jsme rozdělili do šesti časových úseků. Délku každého časového období jsme měřili pro každý štěp břišní aorty samostatně (tab. 1).

V naší předchozí experimentální studii jsme zkoumali vliv klinického protokolu používaného při konzervaci tepenných aloštěpů chladem v „Programu transplantace cévních štěpů v České republice“ na imunogenicitu a akutní rejekci takto zpracovaných štěpů břišní aorty na stejném potkaním modelu. (Matia et al., 2007) Původní základní data buňkami a protilátkami zprostředkované rejekce chladem konzervovaných aloštěpů břišní aorty 30 dnů po transplantaci jsme porovnali se základními daty našeho současného experimentu. Na oba experimenty dohlížel stejný hlavní řešitel. (Priv.-Doz. MUDr. habil. Ivan Matia, Ph.D.) Na obr. 1 je zachycené schématické zobrazení adaptace porovnávaných klinických protokolů tepenných aloštěpů používaných v „Programu transplantace cévních štěpů v České republice“ do podmínek našeho experimentu.



3.3. Histologické a imunohistochemické vyšetření štěpů břišní aorty

Kryokonzervované štěpy břišní aorty jsme explantovali 30. pooperační den. Štěpy jsme vyšetřili histologickými a imunohisto-chemickými metodami se zaměřením na typické známky akutní rejekce ve všech základních vrstvách aortální stěny. Sledovali jsme přítomnost endotelových buněk, známky intimální hyperplázie, šířku tunica media, přítomnost nekróz a ukládání protilátek třídy G v této vrstvě, počet CD4+, CD8+ a LEW MHC II+ imunokompetentních buněk v adventiciální vrstvě aortální stěny.

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

Protilátkovou imunitní odpověď u příjemců kryokonzervovaných aloštěpů břišní aorty jsme sledovali vyšetřením koncentrace donor specifických protilátek proti MHC antigenům I. a II. třídy v periferní krvi příjemcovských zvířat předoperačně a na 30. den po transplantaci pomocí průtokové cytometrie.

Tab.1 – Definice a trvání jednotlivých časových úseků procesu kryokonzervace, uskladnění, rozmrazení a transplantace štepů břišní aorty

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

DMSO – dimethylsulfoxid

h – hodina

min – minimum

max – maximum

4. VÝSLEDKY

Kryokonzervované aloštěpy vykazovaly na 30. den po transplantaci normální morfologii aortální stěny se zachovalou diferenciací všech tří základních anatomických vrstev (obr. 2).

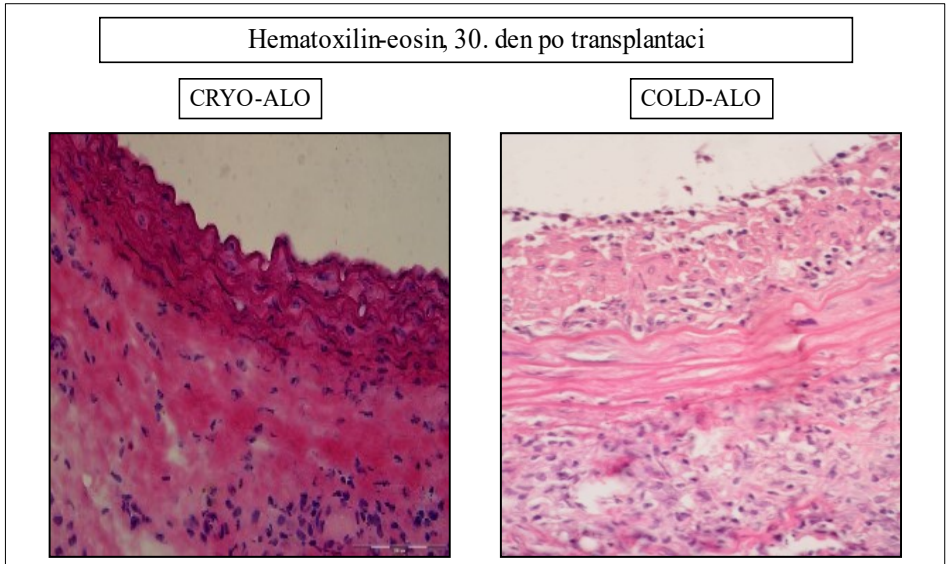
Tunica intima kryokonzervovaných aloštěpů nevykazovala na rozdíl od chladem konzervovaných žádné nebo jen minimální známky intimální hyperplázie. Luminální povrch byl pokryt endoteliálními buňkami.

Tunica media kryokonzervovaných aloštěpů nevykazovala na rozdíl od chladem konzervovaných známky nekróz s ukládáním imunoglobulinů G (obr. 3).

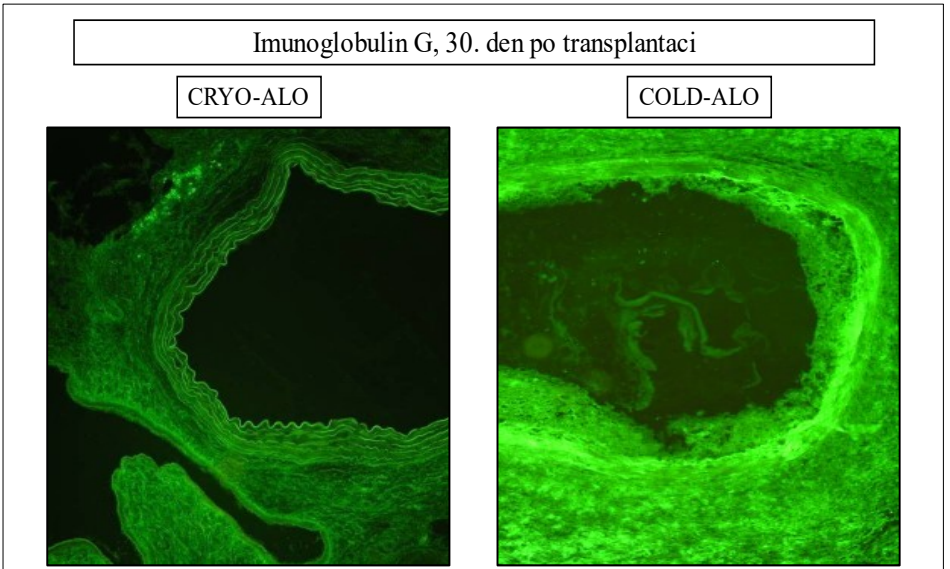
Adventiciální infiltrace kryokonzervovaných aloštěpů buňkami CD4+, CD8+ byla desetkrát nižší ve srovnání s chladem konzervovanými aloštěpy (tab. 2).

Statisticky vyšší koncentrace ve srovnání s předoperačními hodnotami u příjemců kryokonzervovaných aloštěpů jsme zaznamenali pouze u protilátek proti MHC antigenům I. třídy. U příjemců chladem konzervovaných aloštěpů jsme zaznamenali ve srovnání s předoperačními hodnotami statisticky významné zvýšení koncentrace u obou tříd anti MHC protilátek na 30. den po transplantaci (tab. 3).

Obr.2



Obr.3



Tab.2 - Histologické a imunohistologické parametry kryokonzervovaných a chladem konzervovaných aloštěpů břišní aorty 30. den po transplantaci.

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

* P>0.05

Tab.3 - Procento naměřeného fluorescenčního signálu průtokovou cytometrií po smísení klidových splenocytů potkanů kmene Brown-Norway s vyšetřovaným sérem Lewis příjemců kryokonzervovaných (CRYO-ALO) a chladem konzervovaných (COLD-ALO) aloštěpů břišní aorty a s fluoresceinem značenými protilátkami proti Brown-Norway MHC antigenům I. a II. třídy.

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

* P>0.05

5. DISKUSE

V předložené experimentální práci jsme zjistili, že kryokonzervované aloštěpy břišní aorty vykazovaly na 30. den po transplantaci ve srovnání s chladem konzervovanými aloštěpy jen velmi nízké známky imunitně zprostředkované destrukce cévní stěny.

Nejdůležitějšími faktory mající vliv na kvalitu a imunogenicitu tepen v době před začátkem jejich kryokonzervace jsou vlastnosti konzervačního roztoku a doba trvání studené ischemie (Rodríguez et al., 2012). V literatuře bylo popsáno, že dlouhá doba studené ischemie vedla k významnému poškození cévní stěny s tím, že endoteliální buňky jsou nejvíce náchylné na délku jejího trvání (Pascual et al., 2002). V našem experimentu byly časy studené ischemie před zmrazením aloštěpů břišní aorty 3–4 hodiny. Je velmi pravděpodobné, že tato velmi krátká doba studené ischemie vedla k významně nižšímu poškození endotelu kryokonzervovaných štěpů před transplantací s následnou minimální intimální reakcí pozorovanou 30. den po transplantaci.

Rychlé rozmrazení ve vodní lázni o teplotě 37 ° C je zmiňováno ve většině nedávno publikovaných klinických prací jako standartní metoda rozmrazování kryokonzervovaných arteriálních aloštěpů (Antonopoulos et al., 2019). Nedávné experimentální studie však potvrdily vysoký rozsah poškození morfologie stěny takto rozmrazených cévních štěpů (Buján et al., 2001, Novotný et al., 2017). Naopak experimentální protokol, při kterém byly aloštěpy rozmrazovány v pomalém kontrolovaném režimu vedl jen k minimální imunitní odpovědi ve srovnání s imunitní odpovědí, kterou indukovali chladem konzervované aloštěpy břišní aorty (Rodríguez et al., 2012). Uvedený experimentální protokol pomalého kontrolovaného rozmrazování není ale vhodný pro klinické využití na operačním sále během přípravy kryokonzervovaných tepenných aloštěpů k transplantaci. V „Programu transplantace cévních štěpů v České republice“ při použití kryokonzervovaných aloštepů nejprve rozmrazujeme v ledničce během 2hodin a následně je ukládáme do vychlazeného konzervačního roztoku až do doby jejich implantace (Špaček et al., 2018).

Zvýšená regulace a exprese antigenů hlavního histokompatibilního komplexu v důsledku ischemického poškození štěpů nebo vlastním procesem kryokonzervace s rychlým rozmrazením vedoucím ke vzniku mikrofraktur může vést ke zvýšení imunogenicity arteriálních aloštěpů (Buján et al., 2001). Tyto antigeny spouštějí silnou produkci protilátek proti

MHC antigenům I. a II. třídy, která vede k apoptóze hladkých svalových buněk s destrukcí svalové vrstvy (Thaunat et al., 2006). Mediální vrstva aloštěpů břišní aorty ošetřených našim novým kryokonzervačním protokolem s pomalým rozmrazováním nevykazovala 30 dní po transplantaci žádné známky destrukce detekovatelné světelnou mikroskopií, žádné ukládání protilátek třídy G a žádné "svrašnění". Zvýšení imunogenicity s následnou rejekcí vedou v klinické praxi k pozorovaným pozdním komplikacím použití tepenných aloštěpů jako jsou aneurysmata, pseudoaneurysmata a pozdní ruptury cévních alotransplantátů (Rodríguez et al., 2012).

Statisticky vyšší koncentrace donor specifických protilátek ve srovnání s předoperačními hodnotami u příjemců kryokonzervovaných aloštěpů jsme pozorovali pouze u protilátek MHC I. třídy. Antigeny MHC II. třídy jsou exprimovány na imunologicky aktivovaných endoteliálních buňkách a buňkách hladkého svalstva (Lou et al., 1996). Je tedy možné, že náš kryokonzervační protokol s pomalým rozmrazováním inhiboval zvýšenou regulaci a expresi antigenů hlavního histokompatibilního komplexu v buňkách hladkého svalstva v průběhu prvních 30 dnů po transplantaci. Tuto hypotézu podporuje i absence ukládání IgG protilátek ve svalové vrstvě kryoštěpů.

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

6. ZÁVĚR

Naše experimentální studie prokázala, že aloštěpy břišní aorty potkanů zpracované kryokonzervačním protokolem s pomalým rozmrazováním používaným v „Programu transplantace cévních štěpů v České republice“ vykazovaly v průběhu prvního měsíce po transplantaci jen minimální známky akutní rejeckce a ve srovnání s isoštěpy nevykazoval jejich histologický obraz výrazné rozdíly. Navíc, kryokonzervované aloštěpy vykazovaly výrazně nižší imunogenicitu ve srovnání s chladem konzervovanými aloštěpy břišní aorty zpracovanými klinickým protokolem používaným ve stejném programu.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. Antonopoulos CN et al. Cryopreserved Allografts for Arterial Reconstruction after Aorto-Iliac Infection. A Systematic Review and Meta-Analysis. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1 (2019), 120–128.
2. Buján J. et al. Gradual thawing improves the preservation of cryopreserved arteries. *Cryobiology.* 4 (2001), 256–65.
3. Chakfé N. et al. European Society for Vascular Surgery (ESVS) 2020 Clinical Practice Guidelines on the Management of Vascular Graft and Endograft Infections. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 3 (2020), 339-384.
4. Knight RJ et al. Cold ischemic injury, aortic allograft vasculopathy, and proinflammatory cytokine expression. *J Surg Res.* 2 (2003), 201–7.
5. Lejay et al. Cryopreserved Cadaveric Arterial Allograft for Arterial Reconstruction in Patients with Prosthetic Infection. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 5 (2017), 636-644
6. Lou H et al. Inhibition of Transplant Coronary Arteriosclerosis in Rabbits by Chronic Estradiol Treatment Is Associated With Abolition of MHC Class II Antigen Expression. *Circulation.* 12 (1996), 3355–3361.
7. Matia I. et al. Delayed administration of FK 506 is sufficient to suppress acute rejection changes after aortal transplantation in rats. *Transpl. Int.* 4 (2007), 371–80.

8. Moher D. L. A. et al. PRISMA Group Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses. the PRISMA statement Plos Med. 7 (2009).
9. Novotny R. et al. Cryopreserved human aortic root allografts arterial wall: Structural changes occurring during thawing. PLoS One. 12(4) (2017).
10. Pascual G. et al. The use of ischaemic vessels as prostheses or tissue engineering scaffolds after cryopreservation. Eur J Vasc Endovasc Surg. 1 (2002), 23–30.
11. Post Ivo C. J. H. et al. A systematic Review and Meta-Analysis on the Management of Open Abdominal Aortic Graft Infections. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2 (2019), 258-281.
12. Pukacki F. et al. The Mechanical Properties of Fresh and Cryopreserved Arterial Homografts. Eur J Vasc Endovasc Surg. 1 (2000), 21–24.
13. Rodriguez M. et al. Immune response to the long-term grafting of cryopreserved small-diameter arterial allografts. Histol Histopathol. 7 (2012), 873–84.
14. Špaček M. et al. Organization model for allotransplantations of cryopreserved vascular grafts in Czech Republic. Cell Tissue Bank. 3 (2018), 437–445.
15. Thauat O et al. Direct and Indirect Effects of Alloantibodies Link Neointimal and Medial Remodeling in Graft Arteriosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 10 (2006), 2359–2365.
16. Van Herck H. et al. Orbital sinus blood sampling in rats as performed by different animal technicians: the influence of technique and expertise. Lab Anim. 4 (1998), 377-386.

8. VLASTNÍ PUBLIKAČNÍ AKTIVITA AUTORA

Publikace s IF k tématu dizertační práce:

1. **Hruby J**, Spunda R, Mericka P, Mlcek M, Pecha O, Splith K, Schmelzle M, Krenzien F, Lindner J, Spacek M Matia I Influence of the new standardized clinical cryopreservation/slow thawing protocol on immunogenicity of arterial allografts in rats. PLoS One. 3 (2020). **IF 2.776** (2019)
2. **Hrubý J.**, Špunda R., Adamec M., Varga M., Lindner J., Špaček M., Matia I. Influence of cryoconservation on antigenicity of arterial

- allografts – review. European Surgery-Acta Chirurgica Austriaca. 3 (2016), 192-193. **IF 0.287** (2016)
3. Spunda R, **Hrubý 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. 8 (2018). **IF 2.776** (2018)
 4. Špunda R., **Hrubý J.**, Adamec M., Varga M., Lindner J., Špaček M., Matia I. Cold stored arterial allografts for in-situ reconstruction of infected prosthetic grafts: Review of immunosuppressive protocols used in clinical practice. European Surgery-Acta Chirurgica Austriaca. 48 (2016), Supplement 2, 166-168. **IF 0.287** (2016)
 5. Špaček M, Měřička P, Janoušek L, Dalecká M, Benda A, Krs O, Slížová D, Špunda R, **Hrubý J**, Matia I, Honegrová B, Lindner J. Comparison of Different Thawing Protocols in Human Cryopreserved Venous Grafts. Ann Vasc Surg. 4 (2020), 347 -354. **IF 1.179** (2018)

Publikace v časopisech s IF (spoluautor):

1. Mítas P, Vejrazka M, **Hrubý J**, Spunda R, Pecha O, Lindner J, Spacek M. Prediction of compartment syndrome based on analysis of biochemical parameters. Ann Vasc Surg. 1 (2014), 170-7. **IF 1,222**
2. Lewis SC, Warlow CP, Bodenham AR, Colam B, Rothwell PM, Torgerson D, Dellagrammaticas D, Horrocks M, Liapis C, Banning AP, Gough M, Gough MJ. General anaesthesia versus local anaesthesia for carotid surgery (GALA): a multicentre, randomised controlled trial. GALA Trial Collaborative Group, Lancet. 12 (2008), 2132-42. **IF 28.409** (2008)

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

1. **Hrubý J**, Novotný R, Špaček M, Mitáš P, Hlubocký J, Janák D, Povýšil C, Lindner J. Surgical extirpation of glomus tumor from rare localization on the upper extremity. Case Rep Vasc Med. 2013
2. **Hrubý J**, Semrád M, Vidim T, Mitáš P, Dostál O, Skalická L, Lindner J. Outcomes of combined surgical and endovascular

treatment of the venous thoracic outlet syndrome during 2000-2007 in the IInd Surgical Clinic of the VFN (General Faculty Hospital) and I. LF UK (First Medical Faculty, Charles University) in Prague. *Rozhl Chir.* 1 (2010), 69-72

Publikace v recenzovaných časopisech, bez IF (spoluautor):

1. Grus T, Mitáš P, Lukáč P, **Hrubý J**, Lindner J, Grusová G, Lambert L Branched pedal bypass in the treatment of critical limb ischemia - a single center experience. *Rozhl Chir.* 11 (2018), 509-513.
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.* 3 (2018), 317-320.
3. Novotný R., Lesenský J., **Hrubý J.**, Hlubocký J., Mitáš P., Lindner J. Chondrosarcoma resection followed by a branched crural revascularization of the right calf.: Case report. *Case Rep Vasc Med*
4. Rob D, Ručka D, Chochola M, Karetová D, **Hrubý J**, Kusová E, Lubanda JC. A rare case of mobile atherosclerotic plaque with a high embolic potential in the femoral artery. *Vnitr Lek.* 1 (2016), 52-6. Review. Czech.
5. 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.
6. Novotný R, Slavíková M, Hlubocký J, Mitáš P, **Hrubý J**, Lindner J. Basilic Vein Transposition Used as a Tertiary Vascular Access for Hemodialysis: 15 Years of Experience. *Open J Cardiovasc.Surg.* 1 (2016), 1-4
7. Slais M, Mitáš P, Semrád M, **Hrubý J**, Lindner J, Stádler P. Multiple sequence revascularization of infrapopliteal arteries in the management of critically ischemic extremity. *Rozhl Chir.* 1 (2010), 59-63.