

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

**MORFOLOGICKÁ STUDIE ČERSTVÝCH
CÉVNÍCH A LOGENNÍCH ŠTĚPŮ
PRO KLINICKÉ VYUŽITÍ**

DOKTORSKÁ DISERTAČNÍ PRÁCE

MUDr. Petr Štádler
Nemocnice Na Homolce
Oddělení cévní chirurgie
Praha

Školitel:
doc. MUDr. Dáša Slížová, CSc.
Anatomický ústav Lékařské fakulty Univerzity Karlovy
Hradec Králové

Hradec Králové

2007

OBSAH

- I. Souhrn
 - 1. Strukturovaný souhrn
 - 2. Structured summary
- II. Úvod
- III. Cíle práce
- IV. Přehled o současném stavu problematiky
 - 1 Historie a současnost cévních náhrad
 - 2 Stavba cévní stěny
 - 3 Funkce a vlastnosti cévní stěny
 - 4 Transplantace
 - 4.1 Antigenita
 - 4.2 Fyziologie a patofyziologie
 - 4.3 Biochemické aspekty ischemicko-reperfúzního poškození
 - 4.4 Média pro tkáňové kultury
 - 4.4.1 Syntetická média
 - 4.4.2 Komplexní média
 - 4.4.3 Laktalbuminhydrolyzátová média
 - 4.4.4 Perfúzní roztoky
 - 4.5 Současný stav transplantačního programu
 - 4.5.1 Odběr cévních alograftů
 - 4.5.2 Miniinvazivní odběry
 - 4.5.3 Cévní endotel
 - 4.5.3.1 Viabilita endotelu
 - 4.5.3.2 Dysfunkce endotelu alograftů
 - 4.5.3.3 Vliv inkubačního média na endotel
 - 4.5.4 Intimální hyperplazie a možnosti jejího ovlivnění
 - 4.5.4.1 Myointimální hyperplazie a růstový faktor
 - 4.5.4.2 Endotelizace
 - 4.5.4.3 Efekt prostaglandinu
 - 4.5.4.4 Ozáření
 - 4.5.4.5 Efekt kryoprezervace

- 4.5.5 Vasa vasorum, angiogeneze
 - 4.5.5.1 Vasa vasorum
 - 4.5.5.2 Angiogeneze
- 4.5.6 Uchovávání cévních štěpů před transplantací
 - 4.5.6.1 Čerstvý štěp
 - 4.5.6.2 Kryoprezervovaný štěp
- 4.5.7 Transplantační vaskulopatie
 - 4.5.7.1 Antigenita alograftů a možnosti jejího ovlivnění
- 4.6 Imunosuprese
 - 4.6.1 Základní přehled imunosupresiv
 - 4.6.1.1 Azathioprin
 - 4.6.1.2 Kortikosteroidy
 - 4.6.1.3 FK-506 (tacrolimus)
 - 4.6.1.4 Cyklosporin A
- 4.7 Odolnost alograftů k infekci
- 4.8 Současné možnosti použití cévních alograftů
 - 4.8.1 Infekce cévních protéz
 - 4.8.2 Aortitidy
 - 4.8.3 Endovaskulární léčba
 - 4.8.4 Kritická končetinová ischemie
 - 4.8.5 Dialýza
 - 4.8.6 Chronická končetinová ischemie
 - 4.8.7 Revaskularizace myokardu
- 4.9 Tkáňové banky

V. Zvolené metody zpracování, materiál a metodika experimentů

- 1 Výsledky – experimentální část
 - 1.1 Světelná mikroskopie E-199, Custodiol®
 - 1.2 Rastrovací elektronová mikroskopie E-199, Custodiol®
 - 1.3 Stádia společných patomorfologických změn na cévách
- 2 Diskuze – experimentální část

VI. Klinická aplikace

- 1 Výsledky – klinická aplikace
- 2 Diskuze – klinická aplikace

VII.	Závěr
VIII.	Poděkování
IX.	Seznam použité literatury
X.	Seznam publikací a vybraných přednášek autora

VYSVĚTLIVKY A POUŽITÉ ZKRATKY

AAA	Abdominal Aortic Aneurysm, výduť břišní aorty
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ATB	Antibiotika
ATP	Adenosintrifosfát
AV	Arteriovenózní
BM	Bazální membrána
BME	Bazální médium dle Eaglea
CO ₂	Oxid uhličitý
CNS	Centrální nervová soustava
D-MEM	Modifikované esenciální médium dle Dulbecca
DMSO	Dimetylsulfoxid
EC	Roztok Euro-Collins
EGF	Epidermal Growth Factor, epidermální růstový faktor
EHB	European Homograft Bank
E-MEM	Minimální esenciální médium dle Eaglea s obsahem Earlových solí
E-199	Parkerovo médium se solemi dle Earlea
FGF	Fibroblast Growth Factor, fibroblastový růstový faktor
g	Gram
GaP-MEM	Modifikované minimální esenciální médium dle Eaglea
GPBoS	Growth Protein of Bovine Serum
Gy	Gray
HIF	Hypoxia-Inductible Factor
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leukocytes Antigens
HMDS	Hexamethyldisilazan
H-MEM	Minimální esenciální médium dle Eaglea s obsahem Hanksových solí

HTK	Histidin-tryptofan-ketoglutarátový roztok
H-199	Parkerovo médium se solemi dle Hankse
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
ICHS	Ischemická choroba srdeční
IH	Intimální hyperplazie
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
INR	International Normalized Ratio, mezinárodní normalizovaný poměr (protrombinový čas)
IRP	Ischemicko-reperfúzní poškození
KS	Krevní skupina
KST	Koordinační středisko transplantací
kV	Kilovolt
mg	Miligram
NAD	Nikotinamid adenin dinukleotid
NaHCO ₃	Hydrogenuhlíčan sodný
ng	Nanogram
NHBD	Non Heart Beating Donor, dárce s nebijícím srdcem
NO	Oxid dusnatý
PAI	Plasminogen Activator Inhibitor
PDGF	Platelet Derived Growth Factor, destičkový růstový faktor
PG	Prostaglandin
PRA	Panel reaktivních protilátek
PTA	Percutaneous Transluminal Angioplasty
PTFE	Polytetrafluoroethylen
REM	Rastrovací elektronové mikroskopie
RPMI-1640	Médium RPMI – 1640
TBT	Triple bag technika
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
um	Mikrometr
umol	Mikromol
UW	Roztok University of Wisconsin
VSM	Vena saphena magna

I. SOUHRN

1 Strukturovaný souhrn

Úvod

V důsledku mohutného rozvoje použití protéz v cévní chirurgii narůstá i počet komplikací včetně infekcí cévních protéz. Právě v této souvislosti se objevuje i určitá renesance zájmu o cévní alografty, která byla jistě podložena i úspěchy v transplantační chirurgii. Nízké počty cévních komplikací při transplantaci ledvin a jater vedly k opětovnému používání cévních alograftů při řešení infekce umělých cévních náhrad. Zdá se, že jedním z důvodů výskytu komplikací při používání cévních alograftů byly nedokonalé postupy při jejich odběru a skladování před implantací. Po odběru orgánu k transplantaci dochází k jeho ischemii. Jako základ pro uchování transplantátů je využívána hypotermie, která oddaluje nástup irreverzibilního poškození tkání zpomalením buněčného metabolismu.

Soubor a metodika

V rámci multiorgánového odběru byly získány tepenné a žilní vzorky alograftů, které byly konzervovány a ve stanovených časových intervalech vyšetřeny. Tyto série vzorků lidských tepen a žil byly uloženy v hypotermních nebo kombinovaných podmínkách po dobu 1 - 30 dnů v nutritivním médiu E-199 a Custodiol® suplementovaných antibiotiky. První skupina tepenných a žilních vzorků byla vložena do konzervačního roztoku o teplotě +4 °C a v těchto hypotermních podmínkách byla uchovávána po celou dobu experimentu. Druhá skupina vzorků obou cév byla vystavena kombinaci normo- a hypotermních podmínek. Vzorky byly nejprve po dobu 24 hodin konzervovány při teplotě +37 °C. Následně byl roztok rychle ochlazen na +4 °C a tato teplota byla udržována do konce experimentu. Vzorky obou experimentálních skupin byly uchovávány v konzervačním médiu po dobu minimálně 12 hodin a maximálně 30 dnů.

Na základě výsledků experimentu byly následně v rámci multiorgánového odběru získány tepenné nebo žilní alografty, zchlazené na +4 °C a uloženy v konzervačním roztoku (Custodiol® nebo E-199) s antibiotiky. Takto uložené cévní štěpy byly v přísně určených indikacích co nejrychleji implantovány, nejpozději však do 72 hodin.

Výsledky

Vývoj morfoloických změn lidských tepen a žil po hypotermní a kombinované normo/hypotermní konzervaci v roztoku E-199 a Custodiol[®] suplementovaných antibiotiky byl sledován v obou případech po dobu 30 dnů. Nálezy v rastrovacím elektronovém mikroskopu i ve světelném mikroskopu ukázaly, že tepenné štěpy jsou v prvních dnech odolnější vůči změnám než žilní štěpy při obou teplotních režimech, výrazněji při hypotermii +4 °C. Při porovnávání s kontrolními vzorky cév, odebraných a fixovaných bez konzervace byly v roztoku s kombinovaným teplotním režimem +37° C / +4 °C nalezeny první změny ve formě porušení souvislosti endotelové vrstvy u tepen i žil již po 2-3 dnech konzervace. U druhé skupiny vzorků v hypotermním režimu +4°C se tyto iniciační dystrofické změny endoteliocytů objevily se zpožděním, na žilách 4.-5. den a na tepnách od 5.-6. dne.

Diskuze a závěr

Standardní metoda léčby infekce cévní protézy spočívá v odstranění infikovaného materiálu a v náhradě novou extraanatomickou rekonstrukcí nebo v použití autologního materiálu. Použití cévních alograftů přináší další možnost řešení infekce cévní protézy či pokus o záchranu končetiny při těžce postiženém tepenném řečišti a nemožnosti použít vlastní či protetický materiál. Dobré výsledky při použití alograftů kořene aorty u pacientů s infekční endokarditidou nebo kombinované výkony transplantace ledviny a alogenní cévní rekonstrukce dávají určitou naději pro jejich použití i v dalších oblastech. Možnost in situ rekonstrukce a relativní rezistence alograftu k infekci ve srovnání s umělým materiálem představují hlavní výhody a přinášejí nové možnosti pro řešení infekce cévní náhrady. Zcela nevyřešenými otázkami jsou preference použití čerstvého nebo kryoprezervovaného štěpu, nutnost krevní kompatibility krevních skupin dárce a příjemce a nastavení imunosupresivní léčby. V současné době se ukazuje, že mnohé případy řešení infekcí cévních protéz s použitím alograftů přinášejí velmi dobré výsledky, které přináší i druhá klinická část práce. Další možností je jejich využití pro dialyzační přístupy. Naopak některé klinické experimenty z kardiochirurgie zatím použití cévních alograftů v této oblasti neumožňují.

Dilatace nebo ruptury štěpů se nevyskytují často a jsou spíše zaznamenány podle některých autorů při použití čerstvých alograftů. Na základě těchto výsledků se nabízí úvaha, že moderní kryoprezervace by mohla snižovat imunologickou odpověď a tím redukovat degeneraci štěpů a následně i jejich selhání. V literatuře se vyskytují i experimentální práce, kdy po ozáření žilních alograftů a po jejich implantaci dochází k menšímu poškození

endotelových buněk i bazální membrány a tím i k udržení jejich průchodnosti bez imunosupresivní léčby.

Cévní alografty dnes mají díky některým specifickým indikacím své jisté místo v klinické cévní chirurgii. Podmínkou jejich širšího uplatnění je především další snížení četnosti komplikací vázaných na implantaci cizorodého biologického materiálu. Slibné výsledky lze očekávat od zlepšování technologických postupů konzervace štěpů i od vývoje moderních imunosupresiv. Nejdůležitější podmínkou úspěchu a profitu pro nemocného však zůstává správná indikační rozvaha s precizním provedením operačního výkonu.

Klíčová slova: infekce cévní protézy, cévní alograft, normo/hypotermní konzervace, roztok E-199, Custodiol®

2 Structured summary

Introduction

The massive development in the use of prostheses in vascular surgery has resulted in a rise in the number of associated complications, including infections of the vascular prostheses. This situation has now given rise to a certain revival of interest in vascular allografts, which has certainly been supported by recent successes in transplant surgery. The low numbers of vascular complications during kidney and liver transplants has led to the frequent use of vascular allografts as means of dealing with infections from artificial vascular prostheses. It would appear that one of the reasons for the complications accompanying the use of vascular allografts involved procedural errors in their treatment and storage prior to implantation. Ischemia occurs in organs that have been removed for transplant. Hypothermia is used as the basis for storing transplant organs as this delays the onset of irreversible tissue damage by slowing down cell metabolism.

Materials and Methods

Samples of arterial and venous allografts were removed from a number of organs and were preserved and then treated at set intervals of time. This series of human arteries and veins were stored in hypothermal or combined conditions for a period of 1 - 30 days in a nutritive medium of E-199 and Custodiol® supplemented with antibiotics. The first group of artery and vein samples was placed in the preserving solution at a temperature of +4 °C and was stored

in these hypothermal conditions for the entire period of the experiment. The second group of samples of both types of vessel was placed in a combination of normal and hypothermal conditions. The samples were first preserved at a temperature of +37 °C for a period of 24 hours. The solution was then rapidly chilled to +4 °C and this temperature was maintained until the end of the experiment. The samples of both experimental groups were kept in the preserving solution for at least 12 hours and a maximum of 30 days.

Based on the results of the experiment, the multi-organ samples produced arterial or venous allografts, which were cooled to +4 °C and stored in a preserving solution (Custodiol® or E-199) with antibiotics. These stored vascular grafts were implanted as rapidly as possible for strictly defined indications, at the latest within 72 hours.

Results

The progress of morphological changes to human arteries and veins during hypothermal and combined normal/hypothermal preservation in a solution of E-199 and Custodiol® supplemented by antibiotics was followed in both cases for a period of 30 days. The findings by scanning electron microscope and light microscope showed that the arterial grafts treated in both heat regimes were more resistant to change than the venous grafts during the first few days, although those kept in hypothermic +4 °C conditions were more so. In comparison with the control vessel samples, which were extracted and fixated without preservation, the first changes, in the form of a break in the coherency of the endothelial layers of both arteries and veins, were found in the solution which underwent a combined heat regime of +37 °C and +4 °C, after a mere 2-3 days of preservation. In the second group of samples kept under hypothermal conditions at +4 °C, these initial dystrophic changes in the endotheliocytes appeared later, in the veins after 4.-5. days and in the arteries after 5.-6. days.

Discussion and Conclusion

The standard method of treatment for infected vascular prostheses consists of removing the infected material and replacing it with a new extra-anatomical reconstruction, or using autologous materials. The use of vascular allografts offers an alternative solution to dealing with infected vascular prostheses or an attempt to save the limbs when the arterial system has been badly affected and own or prosthetic material cannot be used. The excellent results achieved when using allografts for the root of the aorta in patients with infectious endocarditis or combined procedures with kidney transplants and allogeneous vascular reconstructions provide encouraging signs that they can be applied in other areas. The option

of in situ reconstruction and the relative resistance of allografts to infection as compared to artificial material are the primary advantages and offer additional possibilities for resolving infected vascular prostheses. Problems concerning a preference for the use of fresh or cryopreserved grafts, the need for compatibility between the blood groups of donor and recipient and the need for immunosuppressive treatment cannot be avoided. It can now be seen that many cases where infections in vascular prostheses have been dealt with by using allografts, the outcomes have been extremely positive, and this has been confirmed by the other, clinical, area of this work. Another option involves their use for dialysis procedures. However, certain clinical experiments in cardiac surgery do not allow for the use of vascular allografts in this area.

Dilation or rupture of the grafts occurs rarely and when these are recorded, the author has generally used fresh allografts. These findings have given rise to the notion that modern cryopreservation might reduce the immunological response, thereby reducing the degeneration of the grafts and, subsequently, their failure. The literature also contains an experimental work, where radiating venous allografts and then implanting them resulted in less damage to the endothelial cells and the basal membrane, thereby maintaining their permeability without the application of immunosuppressive treatment.

For certain specific indications, vascular allografts still maintain a place in clinical vascular surgery. Their increased application is primarily dependent on further reduction in the number of complications associated with the implantation of foreign biological material. Promising results can be expected from improvements in technical procedures for preserving grafts and developments in modern immunosuppressive drugs. However, the most important conditions for success and benefits for patients remain accurate indications and the precise performance of the surgical procedure.

Key words: infection of the vascular prosthesis, vascular allograft, normal/hypothermal preservation, solution of E-199, Custodiol®

II. ÚVOD

Tato práce byla zahájena v roce 2004 ve spolupráci oddělení cévní chirurgie Nemocnice Na Homolce v Praze a Anatomického ústavu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Rozvoj cévní chirurgie přináší ruku v ruce i narůstající počet komplikací. Infekce cévních protéz, zvláště v aortoiliacké oblasti, pak představují velmi závažné a někdy i život ohrožující stavy. Použití lidských cévních transplantátů může v cévní chirurgii výrazně zlepšit jinak velmi nepříznivé výsledky při řešení těchto komplikací. Nevyřešenou otázkou zůstává použití čerstvého nebo kryoprezervovaného cévního štěpu. V případě čerstvého transplantátu není dosud pevně stanovený algoritmus odběru a podmínek jeho skladování před vlastní transplantací.

Autoři se v této experimentální práci právě zabývají těmito nevyřešenými otázkami a dále i vlastními klinickými výsledky transplantace čerstvých cévních alograftů.

III. CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem práce bylo stanovení optimálního postupu odběru a bezpečného skladování čerstvých cévních transplantátů před jejich transplantací. V České republice probíhají orgánové transplantace za přesně stanovených podmínek v několika transplantčních centrech. Transplantace samostatných cévních štěpů nejsou zatím běžně používány a nejsou ani stanovena pevná kritéria pro jejich odběr, skladování a klinické využití. V této práci byl kladen hlavní důraz na sledování morfologických změn endotelu.

1. Cílem první fáze projektu bylo vytvoření optimálního protokolu pro zpracování a uchování čerstvých cévních transplantátů s ohledem na délku studené ischemie. Vzhledem k tomu, že endotel představuje velice citlivou část cévní stěny, zaměřil se autor právě na morfologické sledování cévního endotelu. Vedle endotelu byly hodnoceny i ostatních částí stěny tepen a žil.

2. Cílem druhé fáze bylo ověření experimentálních výsledků v klinické praxi a stanovení přesných indikačních kritérií pro použití těchto štěpů v cévní chirurgii. Podle vytvořeného protokolu byly odebrány a následně transplantovány cévní štěpy v určených indikacích a sledována jejich funkčnost v pravidelných kontrolách. V několika případech se v důsledku reoperace podařilo odebrat několik kontrolních vzorků z transplantovaných alograftů, které byly dále vyšetřeny elektronmikroskopicky.

3. Ve třetí závěrečné fázi následovalo vyhodnocení klinických výsledků a jejich konfrontace s výstupy morfologické experimentální práce a závěrečné zhodnocení významu těchto operací pro pacienty.

IV. PŘEHLED O SOUČASNÉM STAVU PROBLEMATIKY

Mezi jednu z nejzávažnějších komplikací v cévní chirurgii patří infekce cévních protéz, která se vyskytuje v 1-5 % operovaných cévních pacientů (1). Někteří autoři uvádějí souvislost mezi infekcí a narůstajícím trendem multirezistentních nosokomiálních kmenů. Mortalita při léčení infekce cévních protéz v aortoiliacké oblasti je na renomovaných pracovištích 20-50 % (2, 3). Na základě dosud získaných zkušeností je zcela zásadním krokem kompletní odstranění infikovaného materiálu a podávání antibiotik (ATB). Na druhé straně jsou ale publikovány i úspěšné konzervativní způsoby léčby s drenáží infekčního ložiska a překrytím protézy svalovým lalokem (4). Tento postup je vhodný jen ve velmi omezené míře. Po odstranění infikované cévní protézy je možné provedení extraanatomické rekonstrukce protézou (5). Tato revaskularizace však má tři základní nevýhody: 1. nízkou střední dobu průchodnosti s relativně vysokým výskytem amputací, 2. extraanatomická cesta bývá obtížná v tříselné oblasti a 3. ruptura aortálního uzávěru představuje významné riziko s vysokou mortalitou.

Výjimečně lze pomocí endarterektomie zprůchodnit původního řečiště (6). Dále pak lze použít autologní žílu nebo novou cévní protézu in situ a v poslední době stále častěji i alogenní cévní štěp. Autologní náhrada bývá v aortoiliackém povodí limitována většinou nedostatečným průměrem vena saphena magna, která by měla být alespoň 4mm. Po odběru autologní femorální žíly dochází v poměrně vysokém procentu k velkému pooperačnímu otoku dárcovské končetiny (7). Na druhou stranu však tyto žilní náhrady vykazují dobrou dlouhodobou průchodnost i dobrou adaptaci v aorto-iliako-femorálním umístění (8). Při implantaci nové cévní protézy in situ je poměrně vysoké riziko její reinfekce, a proto je možné zvolit protézu sycenou solemi stříbra nebo rifampicinem (9). Při sledování efektu rezistence k infekci se zdá, že protézy s rifampicinem jsou významněji odolnější než protézy se stříbrem (10).

1 Historie a současnost cévních náhrad

Zájem o hledání vhodné cévní náhrady se projevil ve větší míře v důsledku rozvoje cévní chirurgie na rozhraní 19. a 20. století. V klinice bylo cévní transplantace poprvé použito v roce 1906 (Goyanes), kdy po náhradě výdutě podkolenní tepny byl resekovaný úsek nahrazen žilou, ponechanou in situ. Ve stejné době byly zkoušeny i čerstvé tepenné alografty, ale nedosáhly širšího klinického využití. K opětovnému klinickému zkoušení tepenných alograftů dochází po druhé světové válce. V roce 1948 publikoval Gross použití lidského tepenného štěpu v cévní chirurgii (11) a za další tři roky provedl Dubost první úspěšnou náhradu aneuryzmatu abdominální aorty (AAA) pomocí arteriálního homograftu (12). Po prvních úspěšných pokusech se indikace k rekonstrukčním výkonům s použitím tepenných alograftů stále rozšiřovaly (13, 14). Vrcholem se pak stala resekce oblouku aorty a jeho náhrada tepenným štěpem (15). Souběžně s alogenními tepennými transplantáty se začínají objevovat i pokusy o náhrady tepen cizorodým materiálem. V roce 1952 byla představena první cévní protéza a v dalším období pak došlo k intenzivnímu vývoji cévních protéz a k jejich masivnímu rozšíření v cévní chirurgii. Tak začala nová a zásadní etapa v rozvoji rekonstrukční cévní chirurgie (16, 17, 18). Cévní protézy se staly významným materiálem, hlavně ve vysokoprůtokové aortoiliacké oblasti. Zcela bezkonkurenční cévní náhradou pro nízký průtok ve femoro-popliteo-krurální oblasti však zůstává vlastní čerstvá žíla minimálně o průměru 4 mm vena saphena magna (VSM). Při srovnání výsledků tepenných alograftů a cévních protéz se zvýraznily četné nevýhody alograftů ve smyslu jejich pořizování, skladování a výskytu pozdních degeneračních změn (19), i když experimentální výsledky při použití tepenných autograftů byly výborné (20). Z těchto důvodů bylo jejich používání v rutinní cévní chirurgii nadále prakticky opuštěno.

V důsledku mohutného rozvoje použití protéz v cévní chirurgii dochází i k nárůstu komplikací včetně infekcí cévních protéz (21, 22, 23). Právě v této souvislosti se objevuje i určitá renesance cévních alograftů, která byla jistě podložena i úspěchy v transplantační chirurgii. Nízké počty cévních komplikací při transplantaci ledvin a jater (24, 25, 26) vedly k opětovnému používání cévních štěpů při řešení infekce cévních protéz. Zdá se, že jedním z důvodů výskytu komplikací při používání cévních alograftů byly nedokonalé postupy při jejich odběru, nevhodné skladování před implantací a nedostatečná nebo žádná imunosupresivní léčba.

2 Stavba cévní stěny

Stěna tepen i žil se skládá ze tří stavebně odlišných vrstev, které jsou označovány jako tunica interna (intima), tunica media a tunica externa (adventitia).

Tunica interna (intima) je vnitřní vrstva vystavená přímému mechanickému působení krevního proudu. Je kryta vrstvou endotelových buněk, umožňuje plynulé proudění krve a působí antitrombogenně. Součástí intimy je tenká vrstva subendotelového vaziva s podélně orientovanými kolagenními a retikulárními vlákny, která zabraňuje jejímu odtržení vlivem nárazů krevního proudu.

Tunica media je složena z cirkulárně uspořádaných hladkých svalových buněk s příměsí elastických vláken. Tato vrstva redukuje šířku lumina cévy, působí proti účinku krevního tlaku a udržuje stálou průchodnost cévy.

Tunica externa (adventitia) je tvořena řídkým kolagenním vazivem. Spojuje cévu s okolím, vyrovnává účinek zevních sil z okolí a chrání cévu před nepřiměřeným protahováním do délky.

Arterie

Podle průměru, stavby, tloušťky jednotlivých vrstev a zastoupení svalové a elastické složky lze rozlišit tři hlavní typy arterií: arterioly, arterie malého a středního kalibru (svalové) a arterie velkého kalibru (elastické).

Arterioly jsou cévy, jejichž lumen je menší než 0,5 mm. Tunica intima je tvořena endotelem, který nasedá na subendotelové vazivo. V cytoplazmě endotelových buněk se nacházejí protáhlá granula, která obsahují faktor VIII (Weibel-Paladeho granula). Tunica intima je od tunica media oddělena pomocí membrana elastica interna. Vlastní tunica media je tvořena asi 5 vrstvami cirkulárně uspořádaných hladkých svalových buněk. Tunica adventitia je u tenkých arterií tvořena pouze fibrocyty a retikulárními vlákny, u arterií většího kalibru i vlákny kolagenními.

Arterie malého a středního kalibru jsou tepny svalového typu, v jejichž stěně je zřetelně vyznačena stavební trojvrstevnost. Tunica interna je tvořena endotelem, který nasedá na vrstvu subendotelového vaziva. V této vrstvě se zvláště v místech větvení arterií vyskytují podélně orientované hladké svalové buňky. Další vrstvou je membrana elastica interna složená ze zahuštěné sítě elastických vláken, tvořící hranici mezi intimou a médií. Tunica media je nejnápadnější vrstvou stěny svalových artérií, je tvořena až 40 vrstvami hladkých svalových buněk cirkulárně orientovaných, mezi nimiž jsou uloženy četné kolagenní

a elastické fibrily. Tunica externa (adventitia) je tvořena řídkým kolagenním vazivem, jehož vlákna probíhají téměř longitudinálně. Na hranici mezi médií a adventicií jsou elastická vlákna zahuštěna v membrana elastica externa.

Arterie velkého kalibru jsou převážně elastického typu. Jejich charakteristickým znakem je zmnožení elastických vláken ve stěně cévní, makroskopicky mají nažloutlý vzhled. Kromě aorty patří do této skupiny i tepny z ní odstupující. Tunica intima je u elastických tepen nápadně mohutná, lumen je vystláno endotelem se silnou subendotelovou vrstvou tvořenou rosolovitým vazivem. Na ni navazuje vrstva z longitudinálně probíhajících elastických a kolagenních vláken i ojedinělých hladkých svalových buněk a bez ostré hranice přechází v tunica media. Zřetelná membrana elastica interna zde chybí. Tunica media je nejmohutnější vrstvou stěny elastických arterií. Je poměrně chudá na hladké svalové buňky, ale bohatá na elastická vlákna. Kromě elastických vláken obsahuje tunica media i vlákna retikulární. Membrana elastica externa není vytvořena. Tunica externa je tenká, složená z longitudinálně orientovaných kolagenních a elastických vláken. Probíhají v ní vasa vasorum, nervi vasorum a ojedinělá vegetativní ganglia i corpuscula lamellosa.

Vény

Vény se podobně jako arterie dělí na venuly, vény malého a středního kalibru a velké vény. V jejich stavbě jsou značné individuální a regionální rozdíly. Trojvrstevnost není zde tak nápadná jako u artérií, protože kromě adventicie jsou intima a média znatelně tenčí a nejsou ostře ohraničeny. Stěna vén obsahuje větší množství kolagenních vláken, zatímco svalová a elastická složka je redukována.

Venuly jsou žíly malého kalibru do 1 mm. Tunica intima je tvořena pouze endotelem, tunica media se skládá z 1-3 vrstev svalových buněk. Tunica adventitia je tvořena řídkým kolagenním vazivem a je nejmohutnější.

Malé a střední vény měří v průměru 1-9 mm. Jejich tunica intima je tvořena endotelem s nepravidelně vytvořenou subendotelovou vrstvou. Derivátem intimy jsou žilní chlopně, které se vyskytují ve vénách dolní poloviny těla. Jsou tvořeny endotelovou řasou, vyztuženou elastickým vazivem. Tunica media je tenká a je tvořena plochými hladkými svalovými buňkami, které nevytvářejí souvislou vrstvu. Mezi nimi probíhají snopce kolagenních a retikulárních vláken. Tunica externa (adventicia) je nejtlustší vrstvou a skládá se z kolagenních a elastických vláken s ojedinělými longitudinálními hladkými svalovými buňkami.

Stavba velkých vén se liší v závislosti na lokalizaci a funkci. Tunica intima je tvořena endotelem, který nasedá na subendotelovou vrstvu, v níž lze pozorovat i ojedinělé hladké svalové buňky. Tunica media je tenká, tvořená pouze několika vrstvičkami hladkých svalových buněk. V této vrstvě je ve srovnání s arteriemi svalovina značně redukována, převládají vazivová vlákna. Tunica adventitia je nejtlustší vrstvou tohoto typu vén a obsahuje svazky longitudinálně probíhajících hladkých svalových vláken, které zpevňují stěnu a brání jejímu rozepnutí a kolapsu. V těsné blízkosti srdce lze v této vrstvě pozorovat malé množství kardiomyocytů. U větších cév nad 1 mm (arterií i vén) se vyskytují vasa vasorum, které zásobují jejich stěnu. U arterií pronikají adventicií do média, u vén až k intimě. Inervaci stěny cévní zabezpečují vlákna vazomotorická a senzitivní. Vlákna vazomotorická se dělí na vazokonstrikční (většinou sympatická), způsobující smrštění hladké svaloviny, a vazodilatační (parasympatická nebo sympatická). Vlákna senzitivní jsou myelinizovaná vlákna vytvářející ve stěně cév několik nervových pletení. Kromě těchto vláken se v adventicii velkých cév vyskytují lamelózní tělíska, fungující pravděpodobně jako baroreceptory.

3 Funkce a vlastnosti cévní stěny

Endotel kontroluje permeabilitu pro buněčné i nebuněčné složky krve, reguluje optimální průtok (tj. napětí hladké svaloviny stěny cévní), tvoří nesmáčivý povrch zabraňující adhezi a agregaci destiček, zajišťuje aktivaci koagulačního systému, dále kontrolu fibrinolýzy, reparačních pochodů a angiogeneze. K reologicky výhodnému toku krve v cévách přispívá i lamelovité uspořádání endotelu. V endoteliích je syntetizována řada vazoaktivních a hemokoagulačních působků, které jsou uvolňovány jak intraluminálně, tak do stěny cévní. Nejvýznamnějšími vazodilatačními faktory jsou oxid dusnatý (NO) a některé prostaglandiny (PG), zejména prostacyklin PGI₂ a prostaglandin E₂. V regulaci bazálního tonu i vazodilatace hraje klíčovou úlohu NO neboli endoteliální relaxační faktor. Tento krátkodobě působící a volně difundující lipofilní plyn vzniká v endoteliích z L-argininu působením NO syntázy. Syntéza NO je tlumena řadou rizikových faktorů aterogeneze. Také mechanicky poškozený či regenerovaný endotel má menší schopnost uvolňovat NO. V organismu má NO nezastupitelnou úlohu. Difúzí do lumina inhibuje adhezi trombocytů na endotel, jejich aktivaci a agregaci, a brání nadměrnému nahromadění leukocytů v subendoteliálních prostorách. Dále NO difunduje do subendoteliálních prostor, kde působí na buňky hladké svaloviny stěny cévní, udržuje bazální relaxaci cév a podle aktuálních potřeb jejich tonus dále

modifikuje. Endotelie neustále monitorují tzv. shear stress (střížné napětí), což jsou třecí síly působící na povrch endotelu, které vznikají tokem viskózní kapaliny. Shear stress je považován za důležitý faktor, jenž ovlivňuje funkci endotelu a jenž se může uplatnit v rozvoji endoteliální dysfunkce. Jde o sílu způsobenou pulzovou vlnou, která působí na endotel kolmo ke směru toku krve. Tato síla má přerušovaný charakter v souladu s pulzovou vlnou a je jedním z hlavních stimulů pro syntézu NO v endoteliálních buňkách. Zvýšený shear stress indukuje zvýšenou syntézu NO, která vede k relaxaci cévní stěny a přizpůsobení objemu protékané krve. Plynulá pulzová vlna je přerušována v místech větvení arterií, kde shear stress klesá. Tím klesá i syntéza NO se všemi jeho metabolickými důsledky. Není zatím jasné, co zprostředkovává biochemickou odpověď na shear stress. Za přenašeče informace jsou považovány integriny, iontové kanály a receptory G-proteinu. Shear stress také reguluje expresi některých genů, které se uplatňují v rozvoji aterosklerózy [gen pro NO syntázu, ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) a chemotaktický protein monocytů] a trombomodulin (membránový glykoprotein vázající trombin). Shear stress může mít i antitrombotický efekt, protože ovlivňuje regulaci tvorby aktivátoru tkáňového plazminogenu (PAI-1) v endoteliálních buňkách. Nepřímo také snižuje agregabilitu trombocytů zvýšením syntézy NO. Studium systémových endotelií in vitro bylo ukázáno, že zvýšení střížného napětí stimuluje jejich metabolickou aktivitu (27), zvyšuje propustnost pro proteiny (28) a mění charakter endoteliálního cytoskeletu (29). Četné studie ukazují, že u pacientů po cévních autovenózních rekonstrukcích dochází po zařazení žíly do tepenného řečiště ke změnám žilního průměru a stavby tzv. „arterializace implantovaných žil“. Lidská VSM je schopná určité adaptace po zařazení do tepenného řečiště. Větší žíly se po implantaci do arteriálního řečiště zužují, malé se rozšiřují, aby normalizovaly tzv. shear stress (30).

Dojde-li akutně k porušení endotelu, uplatní se v reparačním pochodu krevní destičky. Na obnažené subendoteliální komponenty (zejména kolagen) se okamžitě váže von Willebrandův faktor. Tento váže destičkový glykoprotein, a tak stimuluje adhezi trombocytů.

Hladká svalovina tvoří střední vrstvu stěny cévní, nebuněčná matrix váže jednotlivá vlákna do snopců a umožňuje správnou, převážně cirkulární orientaci vláken. Úlohou hladké svaloviny je regulace tonu tepny, zásadní význam pak mají drobné muskulární arterioly kontrolující periferní rezistenci a krevní tlak. Ve velkých tepnách hraje tonus hladké svaloviny významnou úlohu zejména při postižení tepny stenozujícím procesem.

4 Transplantace

Transplantace je léčebná metoda přenosu orgánů nebo tkání, které nahradí nemocí nebo úrazem zničený orgán nebo tkáň. Součástí transplantačního programu jsou nejen dárce a příjemci neboli čekatelé, ale i transplantační týmy a koordinátoři orgánových a tkáňových transplantací.

Za začátek transplantací v České republice lze považovat rok 1961, kdy byla v tehdejší Československu provedena první transplantace ledviny ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové (23. listopadu). Štěp sice obnovil svou funkci, nemocná však po 16 dnech zemřela na infekci. S dalšími transplantacemi začalo toto pracoviště v roce 1969. Systematický program transplantací ledvin v Československu zahájili a první úspěšnou transplantaci ledvin provedli 21. března 1966 v Ústavu klinické a experimentální chirurgie (IKEM) v Praze-Krči. Štěp fungoval 3 roky, nemocný zemřel v roce 1969 na krvácení do mozku.

V současné době se v České republice kromě ledvin transplantují srdce, plíce, játra a slinivka břišní včetně izolovaných Langerhansových ostrůvků. V případě tkání jde zejména o transplantaci oční rohovky, která je nejstarší v klinice prováděnou alotransplantací. První úspěšnou transplantaci rohovky provedl Zirm v Olomouci v roce 1905. Zvláštní kapitolou zůstává transplantace krvetvorných buněk.

K zajišťování koordinační a metodické činnosti v systému transplantačních center v České republice je zřízeno Koordinační středisko transplantací (KST). K hlavním úkolům KST patří vedení registrů, koordinace odběrů a transplantací, informační činnost a mezinárodní spolupráce.

Čekatelem na transplantaci orgánů se může stát jenom pacient, který je zařazen na čekací listině jednotné pro celou Českou republiku. Jde o pacienta, který trpí nezvratným selháváním funkce určitého orgánu, který nereaguje na medikamentózní léčbu, a situaci nelze řešit jiným způsobem. V neposlední řadě je to čekatel schopný transplantace a užívání dlouhodobé imunosupresivní léčby s výhledem na dlouhodobé přežití.

Dárce se může stát pacient, u kterého byla stanovena smrt mozku. Smrt mozku je stav, kdy není pochybnosti o strukturálním poškození mozku ani o jeho nevratnosti a pacient-dárce je v hlubokém bezvědomí, na umělé plicní ventilaci. Dále je vyloučeno, že se na bezvědomí v okamžiku vyšetření podílí intoxikace, tlumivé relaxační účinky léčiv, metabolický nebo endokrinní rozvrat či primární podchlazení. Smrt mozku se potvrzuje na základě klinických známek smrti mozku a vyšetření potvrzujících nevratnost mozkové smrti. Mezi ně patří angiografie mozkových tepen nebo mozková perfúzní scintigrafie a u dětí do jednoho roku

života mozková perfúzní scintigrafie a transkraniální dopplerovská sonografie. U pacientů se ztrátovým poraněním kalvy nebo po kraniektomii, u nichž nelze z medicínských důvodů vyšetřeními angiografie nebo mozkové perfúzní scintigrafie potvrdit mozkovou smrt, se nevratnost mozkové smrti potvrzuje vyšetřením kmenových sluchových evokovaných potenciálů.

Kadaverózní dárce je dárce s prokázanou smrtí mozku nebo nezvratnou zástavou krevního oběhu. Rozlišujeme dárce s „bijícím“ a „nebijícím“ srdcem (tzv. NHBD – non heart beating donor). Ve většině případů bývá potvrzena mozková smrt při zachovaném krevním oběhu. Orgány se odebírají zejména od kadaverózních dárců. V případě ledvin a části jater lze použít orgán od žijícího dárce – příbuzenská nebo nepříbuzenská transplantace. Podmínkou je, že odběr orgánů nesmí způsobit zhoršení či ohrožení zdravotního stavu nebo ohrozit život dárce. Žijícím dárce orgánů se může stát osoba v příbuzenském nebo nepříbuzenském vztahu k příjemci, která se dobrovolně rozhodla darovat párový orgán (ledvinu) nebo část orgánu (část jater, plic, slinivky), a dále tkáň, která regeneruje (kostní dřeň). Pro dárcovství platí přísná etická pravidla.

Existuje několik výhod odběru orgánu od živého dárce. Jednou z nich je předpokládaná krátká doba studené ischemie = doba od počátku proplachu orgánu konzervačním roztokem do doby obnovení průtoku krve v orgánu po transplantaci. Další výhodou je dokonalá příprava a vyšetření dárce i příjemce s možností naplánovat operaci kdykoliv podle potřeby pacienta. Předpokladem je tedy zdravý dárce, pro něhož při dobrém zdravotním stavu nepředstavuje darování orgánu riziko.

4. 1 Antigenita

V transplantační chirurgii je prováděna HLA (human leukocytes antigens) typizace. Buňky všech orgánů těla a zvláště pak imunitního systému nesou na svém povrchu látky – antigeny, které podmiňují tkáňovou neslučitelnost mezi nepříbuznými jedinci téhož živočišného druhu, případně brání přenosu tkání z jednoho živočišného druhu na druhý. Každý člověk má svoje typy HLA antigenů (membránových znaků, molekul účastnících se na imunitních reakcích), které jsou rozhodující pro imunitní reakce organismu na cizí orgán. Pro transplantace orgánů jsou významné HLA antigeny A, B (patří do I. třídy) a DR (II. třída), téměř každý jedinec má 2 antigeny – jeden od matky a druhý od otce (tj. 2 antigeny HLA - A, 2 antigeny HLA - B atd.). Při transplantaci orgánů se porovnávají HLA antigeny dárce a příjemce (tedy max. 6

shodných/neshodných znaků). Shoda v HLA má i přes velký pokrok v imunosupresivní léčbě velký význam pro přežití transplantovaného štěpu.

Výběr příjemce na transplantaci orgánu je řešen pomocí počítačového programu, který v sobě obsahuje alokační algoritmy. První podmínkou je kompatibilita v krevní skupině (KS) dárce a příjemce (např. dárce s KS A bude vhodným pro příjemce v KS A, AB). Dalšími jsou stupeň HLA shody a výskyt speciálně vyšetřovaných protilátek. Zohledňuje se i délka dialyzačního léčení. Dětem čekajícím na transplantaci se při výběru příjemců dává přednost. Výběr čekatelů probíhá na základě shody v krevní skupině, váhového poměru dárce s čekatelem a naléhavosti zdravotního stavu.

Procento protilátek, tj. PRA (panel reaktivních protilátek) vyjadřuje stupeň senzibilizace. Je používán k posouzení rizika, že transplantovaný orgán bude příjemcem odmítnut.

Cross – match je křížová zkouška = reakce mezi lymfocyty dárce a sérem příjemce. Je-li pozitivní, nelze provést transplantaci orgánů, protože je prakticky jisté, že by nastala rejekce.

Úspěšná transplantace přináší obvykle zásadní zlepšení kvality života. I transplantovaný pacient má však v životě určitá omezení: například nutnost trvalého užívání imunosupresivních léků a opakované návštěvy a kontroly na specializovaných lékařských pracovištích. I přes tyto výhody hodnotí většina pacientů kvalitu života jako velmi dobrou.

Čekací doba výrazně závisí na tom, zda je k dispozici vhodný dárce. U žijících dárců lze transplantaci časově uzpůsobit. U kadaverózních dárců je doba čekání různá, v případě ledvin se u transplantovaných osob v České republice pohybuje v průměru kolem 12 měsíců.

4. 2 Fyziologie a patofyziologie

Po odběru orgánu k transplantaci dochází k jeho ischemii. Buňky v normálních poměrech získávají energii k udržení své integrity oxidativní fosforylací, redukcí kyslíku na vodu v mitochondriích, při které je tvořen adenosintrifosfát (ATP). Při nedostatku kyslíku je limitována oxidativní fosforylace a dochází k rychlé depleci ATP a vzniká porucha na ATP závislých homeostatických intracelulárních mechanismů až letální poškození buněk. Jako základ pro uchování transplantátů je využívána hypotermie, která oddaluje nástup irreverzibilního poškození tkání zpomalením buněčného metabolismu, který při teplotě +4 °C klesá pod 5 % původní aktivity (31). Při zmrazení orgánu dochází k přeměně vody na krystaly ledu, které působí poškození tkání (32). Samotná hypotermie má na buňky též negativní vliv. Jedním z hlavních následků je porucha iontové rovnováhy. Zpomalení funkce Na^+ / K^+ - ATPázy vede ke snížení membránového potenciálu a vstupu Cl^- do buňky podle

koncentračního gradientu. Ionty Cl^- jsou následovány kationty a H_2O a vznikající intracelulární edém může vést až k destrukci buňky (33). Řada studií spojuje změny v intracelulární koncentraci Ca^{2+} s biochemickými změnami a histologickým poškozením vedoucím až k buněčné smrti. Deplece ATP inhibuje ATP - dependentní pumpy přenášející Ca^{2+} z buňky a do buněčných organel. Hypotermie mění propustnost membrán, která spolu s edémem přispívá k abnormálnímu pohybu Ca^{2+} iontů (34). Při studené ischemii štěpu se uplatňují i další děje. Anaerobní glykolýza, jako jediná možnost obnovy ATP, s následnou akumulací laktátu přispívá ke vzniku intracelulární acidózy. Při ischemii dochází ke konverzi xantindehydrogenázy na xantinoxidázu. Při degradaci ATP nahromaděný hypoxantin je za normálních podmínek metabolizován xantindehydrogenázou na xantin s využitím nikotinamid adenin dinukleotidu (NAD^+) (35). Xantinoxidáza využívá při metabolizaci hypoxantinu jako substrát místo NAD^+ kyslík za tvorby velkého množství superoxidového aniontu.

4.3 Biochemické aspekty ischemicko-reperfúzního poškození

Reperfúze ischemické tkáně kyslíkem bohatou krví spouští kaskádu chemických a buněčných reakcí, které mohou vést k orgánové dysfunkci. Ačkoli okysličená krev je životně důležitá pro udržení normální funkce tkání a buněk, reoxygenace ischemických tkání poškozuje endotelové buňky. Základem chemických reakcí v postischemických tkáních se zdá být redukce molekulárního kyslíku na toxické metabolity (superoxid, peroxid vodíku a hydroxylový radikál). Z dalších reakcí spjatých s ischemicko-reperfúzním poškozením (IRP) můžeme jmenovat vznik a uvolnění lipidových mediátorů a cytokinů a dále uvolnění endoteliálních adhesivních molekul. Poruchy mikrocirkulace, zvláště postkapilárních venul, jsou charakterizovány edémem endoteliálních buněk a jejich oddálením od bazální membrány, což zhoršuje její funkci jako bariéry, způsobuje únik proteinů a intersticiální edém. Ischemie vede k vytvoření hypoxantinu a xantinoxidázy uvnitř endoteliálních buněk. Při repfúzi přístup kyslíku umožní vznik superoxidového aniontu O_2^- . Hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$) vzniká reakcí superoxidu a H_2O_2 (Haber-Weisova reakce). Volné kyslíkové radikály způsobují poškození oxidací nukleových kyselin, enzymů, receptorů a membránových lipidů. Výsledkem je zvýšená membránová propustnost, poruchy mikrocirkulace, které vedou ke zvýšené filtraci proteinů a následnému intersticiálnímu edému. Přidání vycytávačů superoxidového radikálu - superoxidodismutasy před repfúzí snižuje hromadění oxidantů a poskytuje ochranu tkáním. Kataláza (enzym katalyzující přeměnu H_2O_2 na H_2O a kyslík)

také chrání před IRP. Vychytávače vysoce reaktivních hydroxylových radikálů, jako je dimethyl sulfoxid, dimethyl thiourea a manitol, se ukázaly jako účinná ochrana v několika modelech IRP. Inhibitory xantin oxidázy (alopurinol, oxypurinol, pterin aldehyd) nejen zmírňují nekrózu epitelu, ale zlepšují i mikrocirkulaci. Prvním krokem je úbytek ATP, který je přeměněn na hypoxantin [normálně je hypoxantin oxidován na xantin za účasti xantin dehydrogenázy za přítomnosti NAD v reakci, která konvertuje NAD^+ na $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$]. Během ischemie je xantin dehydrogenáza konvertována na xantin oxidázu. Po reoxigenaci xantin oxidáza konvertuje hypoxantin na xantin za vzniku velkého množství superoxidového aniontu. Toto spouští kaskádu reakcí, při kterých vznikají další kyslíkové radikály a H_2O_2 uvnitř endoteliálních buněk (36).

Reperfúze ischemických tkání je také úzce spjata s uvolněním velkého množství zánětlivých buněk. Pokusy ukázaly, že neutrofily hrají v reperfúzi klíčovou roli, přilnou k postkapilárním endoteliálním buňkám a pak dále pronikají do intersticia. Zvýšený počet neutrofilů je přičítán aktivaci a zvýšené expresi adhesivních glykoproteinů na povrchu neutrofilů (CD 11 / CD 18, L-selektin) a endoteliálních buněk (ICAM-1, a E-selektin). Další významnou roli v patofyziologii IRP hraje NO, který ovlivňuje cévní tonus, inhibuje adhezi leukocytů k endotelu a zamezuje agregaci destiček. Fyziologicky se tvoří v buňkách endotelu, v makrofázích a v dalších buňkách oxidací L-argininu (za účasti NO syntázy). Po reperfúzi dochází k inhibici syntézy NO (37).

4. 4 Média pro tkáňové kultury

Ke kultivaci živočišných buněk in vitro se používají média složená ze základního roztoku, tj. souboru základních složek potřebných pro výživu buňky a souboru doplňků, které zabezpečují další požadavky buněk a umožňují jejich růst i proliferaci v základním médiu.

Základní médium

Základní médium představuje balancované chemické prostředí, ze kterého buňky čerpají složky pro biosyntézy a zabezpečují svůj energetický metabolismus. Pro úspěšné pěstování buněk se musí k syntetickým médiím přidávat vhodné doplňky, které podmiňují buněčnou proliferaci a schopnost přilnout k podkladu. Tato skupina látek zahrnuje jednak nedefinované složky médií (zvířecí séra, živočišné a rostlinné extrakty), jednak složky definované (růstové faktory, hormony aj.).

Typy buněčných kultur

Z hlediska populační charakteristiky rozlišujeme buněčné kultury primární a buněčné linie. Primokultury vycházejí z buněk získaných přímo z živočišných tkání. Pasážováním a dalšími adaptacemi těchto buněk na růst *in vitro* vznikají buněčné linie, které mohou být nesmrtelné. Buněčné linie lze rozlišit na diploidní, jež jsou charakterizovány karyotypem identickým s živočišným druhem, z něhož byly izolovány, a na heteroploidní, jež jsou karyotypicky a často i morfologicky odlišné od buněk původního živočišného druhu, popřípadě tkáně, z níž byly izolovány. Kultury můžeme dělit i z jiného hlediska, podle způsobu růstu, na tzv. adherentní, kdy buňky rostou jen po přichycení na pevném podkladu (na stěně kultivační nádoby či na mikronosiči), a na kultury suspenzní, kdy buňky nevyžadují pevný podklad. Vzhledem k odlišným růstovým nárokům různých typů živočišných buněk bylo v průběhu let vyvinuto mnoho variant kultivačních médií a doplňků, respektujících odlišné metabolické potřeby buněk a jejich odlišné nároky na různé růstové faktory. Velký význam má proto nejen volba typu média, ale i jeho kombinace s vhodnými doplňky a následné dodržení potřebných kultivačních podmínek.

Kvalita vody

Pitná voda se před použitím podrobuje dvojí demineralizaci, odstranění organických látek a sterilizaci filtrací. V případě použití koncentrátů médií je třeba mít na zřeteli, že až 90 % pracovní koncentrace objemu média představuje voda. Použití vody nevhodné kvality může velmi negativně ovlivnit vlastnosti média nebo je znehodnotit.

Kvalita chemikálií

K výrobě médií jsou používány jen chemikálie nejvyšší čistoty. Zvláštní pozornost je věnována toxickým prvkům. Jejich obsah nesmí překročit přísně stanovený limit. Anorganické složky médií jsou vesměs velmi stálé, některé vitamíny mají naopak stabilitu nízkou. Hormony, antibiotika a růstové faktory se většinou musí skladovat při teplotách 0 °C až +4 °C a vhodném rozsahu pH. Tato teplota se doporučuje pro skladování médií. Zmrazování se nedoporučuje, protože hrozí nebezpečí prasknutí obalu pnutím ledu. Některé obtížně rozpustné složky mohou zejména z koncentrovaného roztoku vypadnout a nerozpouštějí se ani po zahřátí. Jakmile se média naředí do pracovní koncentrace, doplní dalšími složkami a upraví se pH, musí se co nejdříve spotřebovat. K práci se doporučují nádoby s minimem prostoru mezi hladinou připraveného roztoku a uzávěrem.

Základní složky médií

Glukóza je jedním z nejdůležitějších zdrojů energie a uhlíku pro buňky. Pokud je přítomna ve vyšší koncentraci, může se metabolickou činností buněk rychle přeměnit na kyselinu mléčnou s následným poklesem pH média až k inhibující hodnotě. Dalším významným zdrojem energie a uhlíku je glutamin. Při jeho nepřítomnosti v médiu a současným snížením koncentrace séra nebo růstových proteinů bovinního séra lze médium používat jako „udržovací“. Glukóza se často nahrazuje galaktózou, což umožňuje lepší kontrolu produkce kyseliny mléčné a změn pH i při delších intervalech mezi výměnami média. Dalšími zdroji energie mohou být některé aminokyseliny nebo pyruvát, třebaže cukry plně nahradit nemohou.

Zdrojem dusíku jsou aminokyseliny, stavební kameny bílkovin. V některých médiích jsou obsaženy v relativně vysoké koncentraci. Dalším zdrojem dusíku mohou být též hydrolyzáty určitých bílkovin živočišného nebo rostlinného původu, což jsou vlastně nedefinované směsi aminokyselin a oligopeptidů.

Vitamíny jsou obsaženy ve všech médiích a slouží většinou jako kofaktory v enzymatických reakcích. Někdy je jejich spektrum velmi široké, jindy jsou obsaženy v relativně vysokých koncentracích.

Svůj význam mají lipidy a složky médií rozpustné v tucích. Pro některé buňky jsou esenciální kyseliny linolová, olejová, cholesterol, etanolamin a další. Uplatňují se významně při kultivaci hybridomů pro produkci monoklonálních protilátek. Tyto složky představují nutnou součást bezsérových médií.

Prekurzory nukleových kyselin naopak nejsou nezbytnou součástí médií, protože je buňky vesměs dokáží syntetizovat. Některá bohatší média je však obsahují.

Hormony a růstové faktory jsou velmi diskutovanou a velmi důležitou složkou všech kultivačních roztoků. Jejich význam enormně vzrostl zejména v souvislosti s konstrukcí bezsérových médií. Hormony a růstové faktory jsou běžně obsaženy ve zvířecích i lidských sérech a tkáňových tekutinách. Aby bylo možno vyloučit nedefinované složky z kultivačních médií, musely se tyto faktory izolovat a purifikovat. Tyto snahy byly mnohdy úspěšné, dosud se však nepodařilo a asi se ani v dohledné době nepodaří zkonstruovat univerzální doplněk nahrazující sérum v plné šíři. Každý buněčný typ má totiž specifické požadavky na spektrum a koncentraci těchto látek. Z hormonů jsou to například inzulin a hydrokortizon, z růstových faktorů fibroblastový růstový faktor (FGF), epidermální růstový faktor (EGF), destičkový růstový faktor (PDGF), transferin, interleukiny a další.

Podstatnou součástí médií jsou anorganické soli, které zajišťují potřebnou osmolalitu v systému buňka-roztok. Některé z nich regulují svou tlumivou schopností aktuální aciditu systému během kultivace a též se zapojují jako nutriční faktory do metabolického cyklu.

Složení většiny médií je v zásadě založeno na dvou typech pufracích solných směsí:

1. Earleův roztok – základní izotonický roztok, jehož pufrací schopnost je založena na relativně vysokém obsahu NaHCO_3 (hydrogenuhličitan sodný). Přírozenému rozpadu NaHCO_3 a následné alkalizaci roztoku je však třeba bránit zvýšením obsahu CO_2 (oxid uhličitý) v ovzduší inkubátoru, kde se buňky pěstují v otevřených kultivačních nádobách.

2. Hanksův roztok – základní izotonický roztok s minimálním obsahem NaHCO_3 , který má převážně nutriční význam. Pufrací schopnost média je podmíněna obsahem fosfátů, a proto se kultivace provádí v normální atmosféře v uzavřených nádobách.

Znalost pufracích systémů i funkce pH je při práci s buněčnými kulturami velmi důležitá. Většina živočišných buněk roste dobře v rozmezí pH 7,2 - 7,4 a některé fibroblasty při pH 7,4 - 7,7. Určité epidermální buňky však rostou už při pH 5,5.

Živočišná séra

Živočišná séra stále zůstávají obtížně nahraditelnou složkou médií pro kultivace mnohých druhů buněk. Séra tvoří nejdražší součást média, a pokud nejsou zmrazena, jejich kvalita se zhoršuje a jednotlivé šarže jsou relativně nestandardní. Rovněž narušené životní prostředí se negativně projevuje v jejich jakosti.

Použití antibiotik

Do médií pro kultivaci buněk se často přidávají antibiotika, třebaže jsou s tím spojeny některé problémy. Antibiotika mají někdy nepříznivý vliv na růst a proliferaci buněk. Jejich toxicita narůstá v médiích s nízkým obsahem proteinů. Dbá-li se na maximální čistotu práce i prostředí a pracuje-li se v laminárních boxech, může se pracovat též bez antibiotik. Pro likvidaci mykoplazmatické kontaminace jsou antibiotika vesměs nedostatečně účinná. Stabilita antibiotik je většinou závislá na pH. Mezi nejstabilnější patří gentamycin působící i na (extracelulární) mykoplazmata.

4. 4. 1. Syntetická média

Tato média jsou sterilní a jsou dostupná většinou ve dvou koncentracích: 10x koncentrovaná a v pracovní koncentraci, tj. pro přímé použití. Média se sterilizují filtrací. Obsahují

fenolčerveň i glutamin a neobsahují NaHCO_3 , HEPES (pufrační systém, N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) ani antibiotika.

Bazální médium dle Eaglea (BME)

Pokrývá esenciální nutriční požadavky a obsahuje další faktory nutné pro růst buněk v kultuře. Po doplnění sérem je použitelné pro kultivaci velké řady normálních a transformovaných buněk. Svou jednoduchostí se hodí zejména ke sledování nutričních požadavků buněk.

Minimální esenciální médium dle Eaglea s obsahem Earlových solí (E-MEM)

Je nejpoužívanějším médiem ve světě i u nás pro kultivaci širokého spektra buněk. Oproti médiu BME obsahuje větší koncentrace aminokyselin. Ke kultivaci zvláště náročných buněk se doporučuje přidat směs neesenciálních aminokyselin, popřípadě zvýšit koncentraci vitamínů. Médium je vhodné hlavně ke kultivaci v atmosféře s 5 % CO_2 (otevřený kultivační systém).

Minimální esenciální médium dle Eaglea s obsahem Hankových solí (H-MEM)

Na rozdíl od média E-MEM obsahuje Hankovy soli, a je proto určeno spíše ke kultivaci buněk v uzavřeném kultivačním systému v normálním termostatu.

Modifikované minimální esenciální médium dle Eaglea (GaP-MEM)

Náhrada glukózy galaktózou činí z tohoto média vhodné udržovací médium užívané zejména pro virologické účely.

Modifikované esenciální médium dle Dulbecca (D-MEM)

Médium je určeno pro růst vysoce náročných buněk. Obsahuje výrazně zvýšené koncentrace aminokyselin, vitamínů i glukózy a další komponenty podporující růst. Hodí se pro kultivaci velmi širokého spektra různých buněčných kultur včetně netransformovaných buněk, diploidních buněk a primárních myších i kuřecích buněk. Osvědčuje se též při kultivaci hybridomů.

Parkerovo médium se solemi dle Hankse (H-199)

Médium obsahuje Hanksovy soli, a proto je vhodné zejména ke kultivaci v uzavřených systémech. Lze použít ke kultivaci explantátových kultur a pro široké spektrum různých buněčných linií.

Parkerovo médium se solemi dle Earlea (E-199)

Na rozdíl od média H-199 obsahuje Earleovy soli, a používá se proto ke kultivaci v atmosféře s 5 % CO₂.

Médium RPMI – 1640 (RPMI-1640)

Relativně bohaté médium, které se uplatňuje při kultivaci lymfoblastoidních buněk a pro plastické transformace. Lze použít i pro pěstování dalších typů buněčných kultur.

E – 199 složení roztoku (mg / 1 000 ml)			
NaCl	6800	L-Histidin . HCl . H ₂ O	20
KCl	400	L-Hydroxyprolin	10
CaCl ₂ . H ₂ O	185,5	L-Isoleucin	20
MgSO ₄ . 7H ₂ O	200	L-Leucin	60
Fe(NO ₃) ₃ . 9H ₂ O	0,1	L-Lysin . HCl	70
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	140	L-Methionin	15
L-Alanin	25	L-Prolin	40
L-Arginin . HCl	70	L-Serin	25
L-Asparagová kyselina	30	L-Threonin	30
L-Cystein . HCl	0,1	L-Tryptophan	10
L-Cystin	20	L-Tyrosin	40
L-Phenylalanin	25	L-Valin	25
L-Glutamin	100	Glycin	50
L-Glutamová kyselina	75		

4. 4. 2 Komplexní média

Obsahují růstové proteiny bovinního séra (GPBoS) a další látky. Syntetické základy těchto médií a použité růstové proteiny se předem testují podle předpisu pro syntetická média a GPBoS.

Médium s růstovými proteiny bovinního séra pro tkáňové kultury (EPL)

Toto médium je 4x koncentrované, obsahuje GPBoS, laktalbuminohydrolyzát a syntetický základ média E-MEM. Nevyžaduje přídavek séra. Jeho růstové vlastnosti jsou velmi dobré. Obsahuje fenolčerveň a L-glutamin, neobsahuje NaHCO₃, HEPES ani antibiotika a nemůže se sterilizovat v autoklávu. Zmrazování média se nedoporučuje.

Komplexní médium GPM 1 (GPM-1)

Média řady GPM se dodávají v pracovní koncentraci, obsahují GPBoS, fenolčerveň, L-glutamin a NaHCO₃ a vzájemně se liší rozdílnými syntetickými základy.

Syntetickou složku GPM 1 tvoří médium E-MEM. Je určeno ke kultivaci různých typů buněk. Umožňuje volbu vlastního pufrčního systému.

Komplexní médium GPM 3 (GPM-3)

Médium je určeno ke kultivaci živočišných buněk. Syntetickou složku tvoří médium E-199. Umožňuje volbu vlastního pufrčního systému.

4. 4. 3 Laktalbuminohydrolyzátová média

Média jsou vhodná pro přípravu primárních kultur živočišných buněk a kultivaci buněk plodové vody. Ředí se a používají podobně jako média syntetická. Obsahují fenolčerveň, neobsahují HEPES, nelze je autoklávkovat, sterilizují se filtrací.

Médium s laktalbuminohydrolyzátem a vitamíny, sterilní (VEL)

Je určeno k přípravě primárních kultur živočišných buněk a též ke kultivaci buněk plodové vody.

Médium pro kultivaci buněk plodové vody (M-AC)

Obsahuje anorganické soli, vitamíny, laktalbuminohydrolyzát, cukry, antibiotika, fenolčerveň a další složky vhodné pro růst živočišných buněk.

4. 4. 4 Perfúzní roztoky

Metodika perfúze a složení perfúzního roztoku ze značné míry ovlivňují úspěch orgánových transplantací. Cílem perfúze a následného uložení štěpu je zajistit obnovení jeho funkce po

implantaci u příjemce okamžitě a v původní kvalitě. Ke změnám způsobeným ischemií - hypotermií se při nevhodném výběru perfúzního roztoku (nízká onkotická nálož) přidává i edém intersticiálního prostoru, který způsobuje kompresi kapilárního systému a tím nedokonalou distribuci tohoto perfúzního roztoku (38). Mnoho změn vzniklých v době studené ischemie štěpu se manifestuje časně po reperfúzi během implantace. Metabolické účinky xantinoxidázy, která pro svoji činnost potřebuje kyslík a kterého je po reperfúzi opět dostatek, se projeví zvýšenou tvorbou volných kyslíkových radikálů. Tyto velmi reaktivní molekuly poškozují buňky zejména denaturací enzymatických a strukturálních proteinů, destrukcí nukleových kyselin a peroxidací polynenasycených mastných kyselin buněčných membrán (39).

Při orgánových odběrech je prováděna perfúze chladným konzervačním roztokem s následným uskladněním orgánu v témže roztoku. Během vývoje byla testována řada perfúzních roztoků. V klinické praxi jsou nejčastěji používány Euro-Collins, roztok University of Wisconsin (UW), histidin-tryptofan-ketoglutarátový roztok Bretschneiderův a nejnověji vyvinutý roztok Celsior.

Experimentálně jsou zkoušeny různé obměny metod perfúze. Zejména se týkají oxigenace štěpu během konzervace. Redukce orgánové hypoxie před transplantací je stále diskutována včetně mechanické hypotermické orgánové perfúze. V poslední době se ale objevují i práce, které k orgánové ochraně používají mechanickou normotermickou perfúzi (40).

Podrobnější poznání poškození spojeného s reperfúzí vedlo k myšlence "vypláchnutí" štěpu těsně před ní s cílem odplavení nahromaděných toxických metabolitů a substrátů. Byl vytvořen speciální roztok (Carolina rinse solution), který obsahuje antioxidanty, scavengery volných kyslíkových radikálů, kalciové blokátory a fruktózu s glukózou a inzulinem pro zlepšení postischemického energetického stavu buněk. Experimenty na krysách a prasatech prokázaly určité výhody tohoto roztoku (41).

Roztok Euro-Collins (EC)

Jako první roztok umožňující uchovat ledviny v dostatečné kvalitě po 20 hodin byl roztok vyvinutý Collinsem na konci 60. let (31). Hlavní součástí je koncentrovaná glukóza bránící vzniku buněčného edému, fosfátový a bikarbonátový pufr. Iontové složení je přizpůsobeno intracelulárnímu prostředí za účelem zabránění úniku K^+ z buňky během konzervace. Pro transplantaci jater použil tento roztok poprvé Starzl v roce 1977 s uspokojivými výsledky po 6 až 9 hodinách studené ischemie. Do konce 80. let došlo pouze k malým změnám ve složení. Eurotransplant odstranil ionty Mg^{2+} bez negativního vlivu na výsledky - roztok Euro-Collins

(42). EC byl poměrně levný a jednoduchý roztok, který se stal standardem pro 70. a 80. léta. Nevýhodou bylo jednak nutnost sterilizovat roztok glukózy odděleně od elektrolytové části a jejich smíchání těsně před použitím, hlavně však užití této hypertonické glukózy jako nositele osmotické nálože. V jaterních buňkách, které jsou oproti ledvinám pro glukózu volně dostupné, je za hypotermických podmínek glukóza metabolizována na laktát, a tak přispívá ke zvětšení počtu intracelulárních molekul a tím ke vzniku buněčného edému. Proto byla vyvíjena řada roztoků, kde glukóza byla nahrazována manitolem (Sacksův roztok), citrátem (Marshallův roztok) a dalšími komponentami. Žádný z nich však nedospěl k širšímu klinickému použití.

Roztok University of Wisconsin (UW)

Z výsledků výzkumu ischemického a perfúzně-reperfúzního poškození jaterního štěpu popsal Belzer základní vlastnosti složek konzervačních roztoků (38). Měly by minimalizovat buněčný edém, účinně zamezovat vzniku intracelulární acidózy, bránit expanzi intersticiálního prostoru, poškození volnými kyslíkovými radikály (hlavně během reperfúze štěpu) a poskytovat substráty pro regeneraci vysokoenergetických fosfátů. Výsledkem byl vývoj nového konzervačního roztoku - University of Wisconsin, který byl původně zamýšlen pro uchování pankreatu (31). Zásadní změnou bylo užití inertních substrátů laktobionátu a rafinózy k udržení osmotické koncentrace místo metabolicky aktivní glukózy a přidání ještě dalšího koloidu hydroxyetylškrobu. Jako scavenger volných kyslíkových radikálů byl přidán glutathion. Alopurinol jako inhibitor xantinoxidázy snižuje jejich tvorbu. Byly popsány i další vlastnosti jednotlivých složek. Adenosin kromě stimulace syntézy ATP působí jako inhibitor trombocytů, inhibuje tvorbu O_2^- neutrofilů receptorovým mechanismem a působí vasodilatačně (33). Manitol a hydroxyetylškrob mohou působit jako scavengery O_2^- (34). Fosfát jako pufr a stimulant ATP syntézy a Mg^{2+} jako kofaktor enzymů a membránový stabilizátor (43). V experimentech na zvířatech bylo dosaženo lepších výsledků oproti EC při studené ischemii přesahující 2 hodiny (44). Na krysím modelu bylo jasně prokázáno snížení hladin ALT, AST a bilirubinu při zvýšení produkce žluči po transplantaci při perfúzi a uložení jaterního štěpu v UW roztoku (44, 45, 46). Prokázáno bylo též zlepšení procenta přežívání při srovnatelných časech ischemie i značné prodloužení její maximální doby, kdy je možné játra ještě úspěšně transplantovat, i nižší poškození hodnocené histologicky (45, 47, 48). Bylo dosaženo lepších výsledků při uchování jater do 24 hodin v UW než po 5 hodinách v EC (49). Nicméně i při konzervaci UW roztokem byly prokázány rozdíly v pooperační funkci štěpu s délkou studené ischemie pod a nad 12 hodin (50). Celkově proti Euro-Collinsu

nastalo zlepšení jak v pooperačních hladinách jaterních enzymů, tak ve snížení množství aplikovaných krevních derivátů, snížení četnosti primární afunkce i dysfunkce štěpu, výskytu trombózy arteria hepatica, počtu retransplantací, kratším pobytem na jednotkách intenzivní péče i kratší celkové době hospitalizace a tím i snížení nákladů (51, 52). Nevýhod UW je několik. Především je to vysoký obsah K^+ , který při reperfúzi může způsobit bradykardii až asystolii příjemce, a proto je nutné před revaskularizací štěpu provést jeho výplach roztokem například Ringer-laktátu nebo je nutné prvních asi 200 - 300 ml reperfundované krve vypustit přes infrahepatickou kavální anastomózu před otevřením suprahepatické vena cava inferior. Další nevýhodou UW roztoku je jeho poměrně vysoká viskozita, která při velkém odporu jaterních arterií může způsobit nedostatečnou perfúzi sinusoid a kapilár žlučových cest (může být důvodem zdánlivě vyššího výskytu biliárních komplikací po skladování jater déle než 12 hodin (31). Vzhledem k vysoké ceně UW se řada experimentů zaměřovala též na možnost perfúze jater dárce jeho kombinací s jiným známým levnějším roztokem. Přes špatné výsledky pokusů na zvířatech byla v Dallasu provedena studie s kombinací perfúze EC in situ před explantací a UW roztokem po explantaci, která ukázala srovnatelnou funkci štěpu po transplantaci s případem, kdy obě perfúze byly provedeny UW, nicméně s odhadovaným snížením nákladů na jeden odběr asi o 400 - 1200 amerických dolarů (53). Další studie ukázala zmenšení intraoperačních krevních ztrát a zlepšení histologického nálezu implantátu po perfúzi EC přes aortu a UW přes vena portae (54). Přesto se UW roztok sám o sobě stal novým standardem pro ukládání nejen jater, ale i ostatních abdominálních orgánů. Experimentálně byla zkoušena řada modifikací UW roztoku, které však přinesly pouze jednotlivé pozitivní výsledky a eventuální uvedení do klinické praxe vyžaduje další výzkumy. Příkladem může být přidání kalciového blokátoru (34) či dodání redukovaného glutathionu těsně před perfúzí (32). Otočení poměru Na^+/K^+ nemá na výslednou funkci štěpu vliv (55).

Histidin-tryptofan-ketoglutarátový roztok (HTK), Custodiol®

HTK roztok byl původně vyvinutý H. J. Bretschneiderem v Göttingenu (Německo) jako fyziologický kardioplegický roztok (38). Základními vlastnostmi jsou nízký obsah K^+ umožňující relativně bezpečnou reperfúzi a užití vysoce účinného histidinového pufru a manitolu jako osmoticky aktivní látky. Výhodou oproti UW roztoku je jeho velmi nízká viskozita, která umožňuje optimální rozdělení účinných látek mezi různé orgánové kompartmenty (Bretschneiderův "equilibration" princip). Custodiol® je organoprotektivní roztok, který působí dvěma účinnými principy: 1. minimalizací potřeby energie orgánu během doby ischemie inaktivací buňky a 2. optimalizací anerobního (glykolického)

získávání energie po dobu ischemie umělou puferizací orgánu. Aktivace různých buněk organismu vzniká depolarizací zevní membrány a nárůstem koncentrace Ca^{2+} v cytoplazmě. Tento intracelulární vzestup hladiny Ca^{2+} je alespoň částečně způsoben vzestupem Ca^{2+} z extracelulárního prostoru. Custodiol® ovlivňuje inaktivaci srdce, ledvin a jater především svým elektrolytickým složením. Snížením koncentrace natria na zhruba cytoplazmatické hodnoty (asi 15 mmol) a současné snížení koncentrace kalcia na hodnoty v cytoplazmě klidové buňky (< 10 umol/l) stabilizuje membránový potenciál buňky na hodnoty blízké normálnímu klidovému potenciálu a zabraňuje intracelulárnímu vstupu natria a kalcia, které aktivují buněčnou činnost. Přidáním manitolu, který je metabolicky inertní, není transportován do intracelulárního prostoru a působí jako antioxidant se zásadně zvyšuje orgánová protekce. Typický pokles pH v tkáních, který je spojen s orgánovou ischemií se výrazně zpomaluje. Zbrzdění poklesu pH zlepšuje a zvyšuje účinek anaerobní glykolitické tvorby energie za ischemických podmínek z 50-60 % na 90 % energetického obratu. Protože na počátku orgánové konzervace perfúze Custodiolem® klesá hladina natria v tkáni rychleji než kalcia a vzniká přechodně nepatrná relativní hyperkalcemie, je roztok kromě toho lehce hyperkaliemický (kalium 10mmol/l) a hypermagnesiemický (magnézium 4mmol/l). Pro snadné zajištění energie efektivním substrátem pro časnou postischemickou reperfuční fázi obsahuje roztok dále 1 mmol/l 2-oxoglutarové kyseliny. Ochrana orgánů perfúzním roztokem Custodiol spočívá ve třech principech: 1. fixace klidového potenciálu buňky v polarizovaném stavu snížením extracelulární koncentrace natria na intracelulární hodnoty a současné snížení extracelulární koncentrace kalcia na hodnoty cytosolu. 2. nejkvalitnější puferizace. 3. zohlednění rozdílné kinetiky natriové a kalciové ekvilibrizace při přechodu z normální intravazální a intersticiální iontové úrovně na elektrolytové složení protektivního roztoku.

Custodiol® - složení roztoku (1 000 ml)

	g	mmol
natriumchlorid	0,8766	15
kaliumchlorid	0,671	9
magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	0,8132	4
histidinhydrochlorid x H ₂ O	3,7733	18
histidin	27,9289	180
tryptofan	0,4085	2
manitol	5,4651	30
kaliumhydrogen-2-oxopentandionat	0,1842	1
kalciumchlorid x 2 H ₂ O	0,0022	0,015

Roztok Celsior

Tento poměrně nový roztok vyvinul Menasché a spolupracovníci v roce 1994 původně pro konzervaci myokardu (56). Spojuje v sobě výhody UW - obsahuje inertní nosiče osmotické nálože (laktobionát a manitol) - s výhodami HTK - nízká viskozita, nízká kalémie a silná puřovací kapacita (histidin). Dále je přidán glutamát jako substrát k regeneraci ATP a scavenger volných kyslíkových radikálů. Iontové složení připomíná extracelulární prostředí. Pokusy s perfúzí jater na zvířatech nyní probíhají v řadě transplantačních center. Poslední dobou bylo publikováno několik prací, které ukázaly minimálně stejnou schopnost konzervace a uchování štěpu ve srovnání s UW i HTK (31, 56, 57, 58). Výsledky prvních klinických testů z Itálie, zatím pouze na malých souborech a pouze v třicetidenním pooperačním sledování, neprokázaly oproti UW statisticky významné změny v klinických známkách i laboratorních údajích (59). Tyto údaje však mohou být modifikovány i tím, že zatím není známo ideální množství roztoku pro jaterní perfúzi.

4. 5 Současný stav transplantačního programu

Přes všechny úspěchy však stále platí, že studená ischemie představuje možnost potenciálního poškození orgánové funkce a v případě přítomnosti různých rizikových faktorů ze strany dárce či příjemce je třeba usilovat o její co největší zkrácení. Prodloužení ischemické doby mělo též značný vliv na průběh transplantace jako celku. Zlepšil se výběr vhodného příjemce s možností transportu štěpu na dlouhé vzdálenosti. Usnadnila se i organizace, kdy častěji lze operaci na příjemci posunout z nočních hodin na ráno a tím do doby normálního provozu na odděleních i operačních sálech. K výběru určitého konzervačního roztoku přispívá jistě též jeho cena. UW roztok je značně dražší než HTK. Při dodržení objemů HTK původně publikovaných Bretschneiderem, které je asi 4 až 5x větší než u UW (přibližně 4 litry oproti 16 až 20 litrům), rozdíl v ceně není až tak zřejmý. Jiní ukazují, že toto množství HTK není vždy nutné, a použití kolem 10 litrů na multiorgánový odběr znamená již významné snížení nákladů (60). Pro Celsior, který je též cenově výhodnější než UW roztok, zatím ideální perfúzní objemy nejsou známy. Při multiorgánových odběrech zatím dle literárních údajů převládá používání UW. Jednak při transplantaci odebraných orgánů na jednom pracovišti lze předpokládat delší dobu ischemie a též jsou zatím menší zkušenosti s používáním HTK k uchování pankreatu a eventuálně i tenkého střeva. Je zde rozdíl i mezi USA, kde je tradičně používán UW, a Evropou s celou řadou center používajících již HTK. Podle doposud provedených experimentů na zvířatech a prvních klinických prací se výsledky při použití

Celsioru jeví jako nadějně u orgánů břišních i hrudních (56-59, 61, 62). Pro jeho využití při multiorgánových odběrech je však třeba dalších studií.

4. 5. 1 Odběr cévních alograftů

Tepny jsou klasifikovány do dvou kategorií v závislosti na okolnostech úmrtí. **A) tepny z multiorgánových odběrů**, které jsou odebrány na závěr po orgánových odběrech **B) tepny od NHBD**, kteří zemřeli v důsledku traumatu (autonehody atd.). Věk dárců není obecně pevně stanoven, pohybuje se mezi 15 a 55 lety, i když v posledních letech s narůstajícími požadavky cévních alograftů dále stoupá. Odběry cévních štěpů probíhají za sterilních podmínek. V případě NHBD je stanoven čas teplé ischemie (čas mezi smrtí a zchlazením odebraného štěpu) do 6 hodin. Dárci jsou vyšetřeni na přenosné choroby (AIDS, hepatitis, syphilis, TBC, Creutzfeld-Jakobovu chorobu, HIV rizikové skupiny jsou vyloučeny), dále jsou vyloučeni dárci s aktivní infekcí, sepsí, maligním onemocněním (s výjimkou primárních nádorů CNS), postižením imunitního systému nebo léčených kortikoidy a též všichni potenciální dárci, u nichž není známa příčina úmrtí.

Při přípravě je z cévního alograftu odstraňována adventicie s okolní tkání a je prováděno první makroskopické hodnocení. Malé ateromové pláty a tukové proužky na cévní stěně jsou tolerovány, kalcifikace, exulcerované ateromové pláty a tromby jsou důvodem k vyřazení cévního štěpu. Jednotlivé větve jsou odštíženy asi 0,5-1 cm od hlavního kmene a nejsou podvazovány. Cévní alografty, které splňují makroskopické podmínky odběru, jsou změřeny (průměr v mm, délka v cm) a údaje následně zaznamenány. Všechny akceptovatelné štěpy jsou vyšetřeny histologicky. Další fází je dekontaminace štěpů v kultivačním médiu s antibiotiky, která trvá obvykle 48 hod., při řízené teplotě +4 °C (63).

4. 5. 2 Miniinvazivní odběry

První úspěšné použití autologní žíly k arteriální rekonstrukci provedl Gluck v roce 1898 a dále v roce 1900 Carrell a Guthrie vědecky potvrdili vhodnost tohoto typu rekonstrukce, který se následně rychle rozšířil. Optimální technika odběru VSM, která spočívá v atraumatické preparaci, kontrolované dilataci žíly a uložení štěpu ve studené heparinované krvi s papaverinem, může zlepšit ochranu endotelu a zlepšit průchodnost těchto štěpů (64). Šetrná technika odběru štěpu má podle některých autorů zásadní vliv na

výskyt časného nebo pozdního poškození endotelu a média, což může mít vliv na omezení výskytu časně trombotické žilní štěpu po operaci nebo na snížení výskytu pozdní intimální hyperplazie (65). Minimálně invazivní odběr VSM zajišťuje redukci pooperační morbidit (hojení ran), i když nebyly pozorovány rozdíly v morfologii ani funkci stěny VSM při klasickém nebo miniinvazivním odběru (66). Endoskopický odběr VSM má též výhody ve zlepšeném hojení operačních ran a při srovnání vlastního poškození štěpů během odběru, které mohou vést k jejich stenózám u cévních rekonstrukcí, nebyl zjištěn rozdíl mezi klasickou a endoskopickou technikou (67). Na druhé straně ale může morfologický stav štěpu před implantací ukazovat histologické změny (intimální fibróza, hypertofie svalových buněk), které mohou být důvodem selhání štěpu po rekonstrukci (68). Kvalita žilního štěpu je významným faktorem při výskytu pooperačních stenóz (69). Preexistující patologické změny VSM mají vztah k výskytu těchto stenóz a k průchodnosti rekonstrukce v důsledku vyšší citlivosti k intimální hyperplazii (70). Vlastní tloušťka intimy a média pravděpodobně nemá vztah k výskytu stenóz žilních rekonstrukcí (71). Cévní poškození může vznikat i v důsledku intervenčních metod (katetrizace atd.).

4. 5. 3 Cévní endotel

Cévní endotel slouží jako funkční bariéra mezi cirkulující krví a stěnou cévy, je základním prvkem pro udržení homeostatických mechanismů. Porušení integrity endotelu je významným faktorem pro proliferaci hladkých svalových buněk a nezbytnou podmínkou pro následný rozvoj neointimální hyperplazie. Poškození endotelu je patrné i u autologních žilních štěpů, hlavně první tři dny po implantaci nebo po intravaskulární intervencích (72). In vitro na bovinních krčních tepnách bylo prokázáno, že po perkutánní angioplastice (PTA) dochází k poškození endotelu. Elektronmikroskopicky byla nalezena políčka oloupání endotelu i v nepoškozených tepnách. Na druhé straně ale zůstává zachována schopnost endotelu vytvářet NO dependetní vasorelaxaci a regulaci vasomotorického tonu (73).

4. 5. 3. 1 Viabilita endotelu

Buněčnou viabilitu určuje řada faktorů. Endoteliální buňky hrají důležitou roli při hodnocení viability alograftů. Viabilita alograftů výrazně klesá v důsledku odběru, sterilizačního procesu i během jejich uskladnění v konzervačním médiu. Ochrana endoteliální buněčné viability je velmi důležitá, i když endotelové buňky zvyšují antigenitu alograftu. K lepší ochraně

endoteliální buněčné viability je potřeba zredukovat čas odběru, teplé ischemie a optimalizovat sterilizační protokol (74). Nicméně je třeba zdůraznit, že viabilita endotelu je možným faktorem pro sledování stavu aortálních alograftů při dlouhodobém uskladnění při teplotě +4 °C (75).

4. 5. 3. 2 Dysfunkce endotelu alograftů

Transplantované aortální alografty u krys mají během prvního týdne patrnou dysfunkci endotelu (acetylcholinem indukovaná vasorelaxace) a objevuje se i masivní leukocytární infiltrace endotelu. Tento náález předchází dalším morfologickým i funkčním poruchám, které vyúsťují až v denudaci endotelu. Tyto změny jsou obdobné tomu, jak jsou popisovány v klinickém sledování, a je tedy možné použít tento model k dalšímu výzkumu a použití lidských alograftů (76).

4. 5. 3. 3 Vliv inkubačního média na endotel

Inkubační médium může významně ovlivnit integritu endotelu u odebraných cévních štěpů. Při krátkodobém uložení VSM ve fyziologickém roztoku před koronární rekonstrukcí již záhy dochází k destrukci významného počtu endotelových buněk (77). Při sledování vlivu různých inkubačních médií na morfologii endotelu VSM je podle některých autorů zřejmé, že heparinovaná krev je nejvhodnějším inkubačním médiem pro uložení těchto žilních štěpů před koronární rekonstrukcí (78). Na druhé straně jsou v literatuře známé i práce, kde s ohledem na morfologickou a funkční integritu hladké svaloviny a endotelu je pro 24 hodinové uložení žilních autovenózních štěpů u psů před transplantací nejvhodnější UW roztok ve srovnání s krví a fyziologickým roztokem (79). Obdobný závěr byl publikován i při sledování morfologických a funkčních vlastností lidských autologních VSM, které byly krátkodobě (do 24 hod.) uloženy v UW roztoku (80). Z fyziologického hlediska mění UW roztok relaxační odpověď endotelu na acetylcholin a zároveň i reaktivitu hladkých svalových buněk u lidských VSM (81).

4. 5. 4 Intimální hyperplazie a možnosti jejího ovlivnění

Intimální hyperplazie (IH) představuje odpověď na různé formy cévního poškození, včetně autovenózních rekonstrukcí koronárních i periferních tepen, angioplastik nebo implantací

stentů. Jejím důsledkem jsou stenózy, které ve 20-50 % případů způsobují selhání rekonstrukce. Proces IH je způsoben proliferací a migrací hladkých svalových buněk do subintimálního prostoru a je přímo úměrný času od operace. Začíná asi po 2 týdnech a objevuje se v délce celého štěpu (82).

Při proliferaci a transformaci hladkých svalových buněk je u IH patrné zrnění mitochondrií, drsné endoplazmatické retikulum a hojná fibrózní matrix. V experimentálních modelech na psech bylo pozorováno, že u autologních graftů v arteriálním řečišti dochází k IH při abnormálním průtoku štěpem, který je způsoben například špatným odtokem. Po reimplantaci štěpu s IH do normálních průtokových poměrů pak dochází k významné redukci této IH (83). Obdobné změny byly pozorovány u žilních štěpů, které byly v experimentu odstraněny z arteriální cirkulace a umístěny zpět do cirkulace venózní, kdy následně demonstrovaly regresi IH a ztlustění média. Tato regrese byla spojena s apoptózou hladkých svalových buněk v důsledku redukce tlaku nebo průtoku či obou těchto faktorů s následným uložením kolagenu (84).

Při sledování autologních žil implantovaných do tepenného řečiště u potkanů bylo popsáno, že v oblasti proximální části štěpů je IH výrazně silnější proti distální části. Hladké svalové buňky v centrální části štěpů rychleji proliferují a po 6 měsících pak byla tloušťka IH stejná jako intima a média příslušné tepny (85). Ovlivnění IH může představovat významný krok pro zlepšení průchodnosti cévních rekonstrukcí.

4. 5. 4. 1 Myointimální hyperplazie a růstový faktor

Mezi patologické změny, které se vyskytují po implantaci alograftů, patří jejich dilatace a ruptury, které jsou způsobeny destrukcí média. Dalším problémem bývají stenózy alograftů v důsledku myointimální hyperplazie, které mohou vést k uzavěru štěpu. Faktory vedoucí k myointimální hyperplazii arteriálních alograftů nejsou bezpečně známy. Růstové faktory vyvolávají a regulují buněčné funkce během intimální hyperplazie a aterosklerózy a mohou hrát roli ve vychytávání a migraci buněk, jejich proliferaci a kontrole syntézy proteinů včetně proteinů extracelulární matrix. Destičkový růstový faktor (PDGF) a růstový faktor fibroblastů (FGF) jsou dva základní mitogeny endotelových a hladkých svalových buněk. (Mitogeny jsou obecně látky, které stimulují mitózu a tím také buněčné dělení, a patří sem mimo jiné i hormony a růstové faktory.) PDGF a FGF jsou dávány do souvislosti s výskytem aterosklerózy i stenóz autologních i protetických cévních štěpů.

Zrychlená myointimální hyperplazie a ateroskleróza jsou hlavní faktory, které ovlivňují úspěch orgánových transplantací. Použití arteriálních alograftů v cévní chirurgii ukazuje sled změn, mezi které patří ztlustění média, přestavění laminy elastiky, invazi zánětlivých buněk do adventicie a IH. Faktory vedoucí k IH jsou pravděpodobně druhotné v důsledku imunologické reakce. Experimentální výsledky ukazují, že mechanismus vedoucí k IH a pravděpodobně i ateroskleróze je rozdílný u alograftů a v přirozeném řečišti. U alograftů nejsou vyvolávacími faktory intimální hyperplazie PDGF a FGF, ale dochází k infiltraci intimy a adventicie CD4 a CD8 lymfocyty. Tyto buňky pak mohou produkovat řadu růstových faktorů (IL-1, IL-2 atd.) (86).

4. 5. 4. 2 Endotelizace

VSM představuje standardní metodu pro koronární i končetinové cévní rekonstrukce. Asi ve 30 % nelze VSM k rekonstrukci použít z důvodu její nízké kvality nebo pro její použití při předcházející operaci. V těchto případech jsou k provedení končetinových rekonstrukcí využívány cévní protézy, které však mají ve srovnání s autologní žilou podstatně horší výsledky. V cévních protézech nejsou přítomny na vnitřní ploše endoteliální buňky, což způsobuje jejich vyšší trombogenitu a v kombinaci s nesouladem mezi rigidní stěnou protézy a elasticou stěnou tepny vyúsťuje ve stenózy štěpů v důsledku IH. Ke snížení trombogenity vnitřní plochy cévních protézy může být použito osídlení endoteliálními buňkami, které bývají extrahovány z několika zdrojů. Pro použití cévních protézy s nanesenými endoteliálními buňkami je třeba několik měsíců před plánovanou cévní rekonstrukcí odebrat endoteliální buňky od pacienta a zajistit jejich pomnožení in vitro na vnitřní straně protézy. Při urgentní cévní rekonstrukci nebo požadavku cévní protézy delší než 1 metr nemůže být tato technologie použita. Zdrojem pro odběr endoteliálních buněk jsou žíly, tepny a tuk z omenta nebo podkoží. Perikardiální tuk je používán v experimentu u zvířat. Základní metody extrakce buněk z těchto tkání představují jednak enzymatické uvolnění endoteliálních buněk z tkání, a jejich oddělení od ostatní tkáně. Mezi enzymy, které se používají, patří nezralá kolagenáza a trypsin (87). In vitro bylo zjištěno, že autologně endotelizované cévní protézy mají významně zlepšenou průchodnost, hlavně u malých průměrů (88).

Nabízí se otázka, zda endoluminální osídlení cévních buněk hostitele u alograftů může omezit intimální hyperplazii, která je vyvolána mechanickou deendotelizací nebo chronickou rejekcí cévních štěpů. Experimentální práce na aortálních alograftech u krys naznačuje, že endoluminální rozsev hladkých svalových buněk hostitele může být efektivní v redukcii

intimální hyperplazie v deendotelizovaném modelu i v arteriálních alografech. Endoluminálně rozesety hladké svalové buňky a fibroblasty vedly k významně rozdílné akumulaci extracelulární matrix v intimně (89).

Používání arteriálních alograftů se stává v cévní chirurgii stále častějším. Kryoprezervované štěpy mohou pak být použity v urgentních případech, kdy není čas na čekání vhodného dárce. Kryoprezervace velmi dobře ochraňuje strukturu stěny štěpu, i když se po kryoprezervaci objevují určitá ložiska denudace endotelu. Tato porušená integrita endotelu způsobuje kontakt mezi extracelulární matrix a krví, což zvyšuje riziko trombózy nebo stenózy alograftu. Osídlení lumina kryoprezervované tepny autologními žilními buňkami může zajistit obnovení integrity endotelové vrstvy (90).

4. 5. 4. 3 Efekt prostaglandinu

V experimentu na psech byla sledována účinnost prostaglandinu 1 (PG1) na IH autologních žil, které byly implantovány do tepenného řečiště s nedostatečnou kapacitou. Po čtyřech týdnech bylo pozorováno, že stupeň intimální proliferace je významně nižší než u kontrolní skupiny bez PG1. Zároveň byl sledován účinek PG1 na PDGF, který stimuluje lidské aortální hladké svalové buňky v buněčných kulturách. PG1 významně inhibuje proliferaci PDGF.

To znamená, že PG1 významně redukuje stupeň intimální hyperplazie autologních žil implantovaných do redukovaného tepenného řečiště. Mechanismus účinku je pravděpodobně v inhibici PDGF, který stimuluje hladké svalové buňky. PG1 může být prospěšný i u pacientů, kteří podstupují cévní rekonstrukce (91).

4. 5. 4. 4 Ozáření

Restenózy komplikují významnou část (8-20 %) endovaskulárních nebo klasických cévních výkonů. Zevní nebo intravaskulární ozáření po cévní rekonstrukci redukuje intimální hyperplazii. V porovnání s primárním ateromem je restenóza charakterizována IH hladkých svalových buněk cévní stěny.

Zevní ozáření

V experimentu bylo zjištěno, že jednorázové zevní ozáření příslušného místa po angioplastice nebo endarterektomii restenózy může významně redukovat výskyt těchto restenóz (92). Stejně tak i jednorázové ozáření žilních štěpů gama zářením cobaltem-60 v dávce 14 Gy před

implantací do tepenného řečiště redukuje IH u zvířecího modelu. Navíc místní ozáření štěpů může předcházet nežádoucím účinkům, které mohou vznikat v důsledku zevního ozáření štěpů po implantaci (93). Obdobný efekt lze pozorovat i při zevním ozáření po rekonstrukci cévní protézou. IH v anastomóze end-to-side protetiké PTFE (polytetrafluoroethylene) rekonstrukce u ovcí může být významně inhibována mírnou jednou dávkou radiace (15-30 Gy) bez patrné toxicity, což může mít potenciální význam u cévních rekonstrukcí (94).

Intravaskulární ozáření

Myofibroblasty v adventicii přispívají po PTA k problému restenózy proliferací, migrací do neointimy a vytvářením jizvy v místě poškození. Fibróza adventicie, která se vytváří na postiženém místě tepny, negativně přispívá k cévní remodelaci a vyúsťuje v restenózu. V experimentu bylo pozorováno, že intravaskulární ozáření bezprostředně po PTA významně redukuje výskyt restenózy. V důsledku ozáření je inhibována časná buněčná proliferace v medii a adventicii a preventivně působí na fibrotické změny v adventicii bez souvislosti se zvýšením buněčné smrti nebo apoptózy v těchto tkáních (95). Endovaskulární aplikace nízké dávky beta radiace do místa poškození po PTA mezi 7-56 Gy způsobuje v experimentální práci na prasatech inhibici tvoření neointimy (96).

Vedlejší účinky ozáření

Jedna z velkých nevýhod, která se může vyskytnout po ozáření z důvodu ovlivnění neointimální hyperplazie, je výskyt postradiačních vedlejších účinků. Arteritis, stenózy koronárních tepen, pericarditis nebo výskyt zhoubného onemocnění představují nežádoucí účinky, které se mohou vyskytnout z důvodu pronikání radiace do okolních struktur. Dalším důležitým problémem v delším časovém období po ozáření může být též výskyt aneurysmat, i když ten je dáván do spojitosti s podstatně vyššími dávkami ozáření, než které jsou použity k ovlivnění neointimální hyperplazie (97, 98).

4. 5. 4. 5 Efekt kryoprezervace

Kryoprezervace brání výskytu intimální hyperplazie a akceleruje úbytek buněk v tunica media. Oba tyto procesy vedou k podstatné redukci tloušťky arteriální stěny ve srovnání s autologními štěpy. Toto zeslabení nevede v krátkodobém sledování (90 dní) k aneurysmatické dilataci kryoprezervovaných štěpů (99).

4. 5. 5 Vasa vasorum, angiogeneze

4. 5. 5. 1 Vasa vasorum

Vasa vasorum periferních cév vznikají z ústí arteriálních větví, dále se šíří do adventicie a zevní třetiny média a nevyskytují se ve vnitřní třetině média a intimě. Mimo to není komunikace mezi vasa vasorum adventicie a lumen tepny. V případě autovenózních rekonstrukcí se začíná vasa vasorum vytvářet v perivaskulární tkáni od 7. dne a dále v adventicii a médii od 14. dne po rekonstrukci. V místech s významnou intimální hyperplazií byla ale pozorována hojná cévní síť v oblasti anastomóz. Řada vasa vasorum se pravidelně vyvíjí v proliferující se neointimě (nad 250 μm tloušťky). Šíře neointimy 250 μm je kritická hranice, kdy se vasa vasorum vyvíjí i mimo anastomózy v celém štěpu. Mechanismus vzniku vasa vasorum v žilním štěpu není zcela objasněn, objevují se názory, že v důsledku ischemie mohou mít význam pro rozvoj angiogeneze hladké svalové buňky nebo mikrořady (100). Oxigenace stěny tepny je zajištěna jednak difúzně z lumen tepny, a jednak pomocí vasa vasorum. Hypoxie arteriální stěny se může účastnit na rozvoji intimální hyperplazie. Lidská ateroskleróza může být spuštěna uzávěrem vasa vasorum a doprovodnou hypoxie (101). Přerušení průtoku ve vasa vasorum může vést k nekróze média a následnému výskytu aneurymatické dilatace (102). deendotelizace štěpů v experimentu na psech závisí nejen na přítomnosti vasa vasorum, ale i na jejich počtu (103).

4. 5. 5. 2 Angiogeneze

Mikrocévy tvoří nedílnou součást neointimy, která se vyvíjí na základě cévního poškození například po PTA. Jednou z možných cest, jak potlačit restenózy, je redukce mikrovaskularizace, která se rozvíjí jako reakce cévní stěny na poškození. Nové kapiláry začínají z vasa vasorum adventicie a jsou pozorovány jak v aterosklerotických plátech, tak ve vrstvě hyperplastické neointimy. Zdá se, že angiogenní faktory produkované lokálně přímo či nepřímo indukují také proliferaci hladkých svalových buněk a esenciálních komponent rozvíjející se neointimy. Bylo prokázáno, že jde především o angiopoetin 1 a faktor indukovaný hypoxií – HIF 1 (hypoxia-inductible factor) (104).

Oblasti s výskytem aterosklerózy u alograftů i v nativním řečišti jsou protkány mikroskopickými cévami. Množství mikroskopických cév v těchto místech má vztah k rozvoji potransplantační aterosklerózy. Bylo prokázáno, že buňky kostní dřeně u dospělých

se mohou diferencovat v cévní endoteliální buňky. Oba typy buněk, endoteliální i hladké svalové buňky, mohou být diferencovány ze stejných kmenových buněk. Progenitorové buňky kostní dřeně se účastní při vytváření mikroskopických cév nebo angiogeneze v ischemicky postižené tkáni. V časné fázi po transplantaci cévních alograftů dochází k významnému poškození endotelových buněk v důsledku imunologické reakce. Regenerace endotelu v arteriálních alograftech pochází z cirkulující krve příjemce a nikoliv ze zbylých endoteliálních buněk alograftů. Mikroskopické cévy se v alograftech objevují dříve než neointimální formace a hojně se vyskytují v místech neointimálních změn. Angiogeneze v intimě je spjata s rozvojem aterosklerotického postižení. Ovlivnění angiogeneze tedy může limitovat aterogenezi v alograftech (105).

Významné stenózy žilních štěpů jsou spojeny s mediální a adventiciální neovaskularizací. Existuje přímá souvislost mezi stupněm IH a počtem mikrocév, které jsou zde obsaženy. Neointimální ztluštění a neovaskularizace jsou nedílnou součástí patologie kritické stenózy lidských žilních štěpů. Zda neovaskularizace podporuje růst neointimy nebo představuje jen adaptivní odpověď stenózy žilního štěpu na změněnou metabolickou potřebu, zůstává nejasné. Ovlivnění této neovaskularizace by se mohlo stát základem v prevenci restenóz cévních rekonstrukcí (106).

4. 5. 6 Uchovávání cévních štěpů před transplantací

Jako základ pro uchovávání cévních transplantátů je využívána hypotermie, která oddaluje nástup irreverzibilního poškození tkání zpomalením buněčného metabolismu. Další možností je pak kryoprezervace, ale při zmrazení tkáně dochází k přeměně vody na krystaly ledu, které mohou způsobit její poškození.

Zcela nedorušenými otázkami jsou preference použití čerstvého nebo kryoprezervovaného štěpu, nutnost krevní kompatibility krevních skupin dárce a příjemce a nastavení imunopresivní léčby.

4. 5. 6. 1 Čerstvý štěp

Hlavní výhodou při použití čerstvého cévního štěpu je absence jeho poškození během kryoprezervace, ale na druhé straně má vyšší antigenitu. Čerstvý cévní štěp často zůstává jedinou možností pro určité indikace v případech nemožnosti použití kryoprezervovaných cév, jak je tomu dosud v ČR.

Protrahovaná studená ischemie způsobuje významné poškození arteriální stěny, které bývá dále potencováno například kryoprezervací (107). Progrese buněčného poškození je dávana i do souvislosti s narůstající teplou ischemií. Při sledování efektu teplé ischemie u lidských chlopní, které byly následně kryoprezervovány, bylo zjištěno, že do 2 hodin nejsou známky morfologického poškození a do 12 hodin se vyskytují jen minimální buněčné změny (108). Při sledování optimální teploty pro ochranu funkce endotelu a hladkých svalových buněk jsou udávány rozdílné teploty. Optimální ochrana funkce endotelu je při +4 až +8 °C a optimální teplota pro ochranu funkce hladkých svalových buněk je kolem +0,5 °C (109).

4. 5. 6. 2 Kryoprezervovaný štěp

Kryoprezervovaný cévní štěp může představovat ideální náhradu při řešení určitých urgentních stavů v cévní chirurgii. Hlavní jeho výhodou je okamžitá dostupnost a dokonalé vyšetření dárce. K používání kryoprezervovaných cévních štěpů je zapotřebí kvalitní tkáňová banka s dostatečnou nabídkou těchto štěpů.

Kryoprezervace je metoda, která slouží ke konzervaci a udržení tkání v životaschopném stavu. Velmi dobré výsledky jsou zaznamenávány na buněčné úrovni (110). Při kryoprezervaci orgánů však dochází k irreverzibilním změnám navzdory zlepšující se technice kryoprezervace. Ruptury a degenerace kryoprezervovaných arteriálních alograftů jsou možnou příčinou jejich selhání (111).

Při mrazení a rozmrazování může docházet k značnému poškození buněk a tkání. Rychlost chlazení a zahřátí, použití kryoprotektivních látek a způsob jejich přidávání a odstraňování z tkání mohou zásadně ovlivnit stupeň poškození tkáně. Při vysoké rychlosti ochlazování tkáně je poškození způsobováno vznikem ledových krystalů uvnitř buněk. Při pomalé rychlosti chlazení pak tvoření extracelulárního ledu vystavuje buňky vysoké elektrolytové koncentraci a následné výrazné buněčné dehydrataci.

Jako kryoprotektivní látka je často používán dimetylsulfoxid (DMSO). Jeho role spočívá v omezení zvýšení elektrolytové koncentrace během procesu chlazení. Kryoprotektivní látka však může sama způsobit chemické nebo osmotické poškození buněk. DMSO snadno prostupuje přes buněčnou membránu a jeho náhlý ústup z tkání po rozmrazení způsobuje osmotické poškození buněk. Postupná redukce kryoprotektivní látky v několika krocích významně omezuje tento osmotický stres a snižuje riziko poškození buněk.

V některých případech je však uváděno, že úspěšná kryoprezervace žilní tkáně může být uskutečněna i v jednodušších podmínkách. Rychlé tavení žilní tkáně nepůsobí zásadní

buněčné poškození, dokonce i bez DMSO a bez ohledu na rychlost chlazení. Když je ale tato tkáň bez DMSO tavena pomalu, objevuje významný nárůst buněčného poškození. Naopak rychlost tavení má malý vliv na buněčné poškození při použití DMSO v průběhu mrazení. V těchto případech pak jednoduché vymývání DMSO z žilní tkáně nepůsobí zvýšení buněčného postižení (112).

Všeobecně je přijata taktika pomalé kryoprezervace $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ za minutu do teploty -70 až $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Další postup je již sporný, někteří autoři uvádějí nejlepší výsledky uchování tkání při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, jiní doporučují pokračující zchlazení na teplotu -160 až $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$ a uchovávání tkání v tekutém dusíku. DMSO je jako kryoprotektivní roztok používán nejčastěji, ale vzhledem k jeho tkáňové toxicitě jsou hledány další alternativy, například ethylenglykol.

Kryoprezervace sama o sobě vyvolává poškození endotelu arteriálních štěpů i matrix a dále vede k progresivní degradaci arteriální stěny (113). Programovaná kryoprezervace s kryoprotektivním roztokem ale nemění strukturu kolagenu nebo elastických vláken arteriálních alograftů (114).

Kryoprezervované žíly

Nevhodná manipulace při zpracování nebo kryoprezervace žil může způsobit poškození jejich endotelu, které se pak stává důvodem trombózy. Mrazení žilních štěpů bez kryoprotektivního roztoku a jejich uložení při teplotě -50 až $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ bývají doprovázeny destrukcí všech buněčných komponent žilní stěny. Naproti tomu kryoprezervace při teplotě $-135\text{ }^{\circ}\text{C}$ způsobuje ochranu těchto buněk (115).

Kryoprezervované tepny

V experimentu byl prokázán častý výskyt velkých obvodových fraktur stěny kryoprezervovaných arterií. Jednalo se o malé elastické tepny, které byly pomalu kryoprezervovány za použití DMSO na hodnotu pod $-160\text{ }^{\circ}\text{C}$ a rychle rozmrazeny. Při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebyly větší fraktury zaznamenány. Fraktury jsou zřejmě způsobeny mechanickým stresem, kdy dochází k oddělování ledových krystalů, které vedou ke strukturálním poruchám (116). Někteří autoři popisují časná ruptury kryoprezervovaných arteriálních alograftů (Lehalle and al.). Jiní však tyto komplikace nepozorovali a považují použití kryoprezervovaných arteriálních alograftů za bezpečné. Objevuje se domněnka, že kryoprezervované arteriální alografty podléhají omezené buněčné a humorální rejekci, ale na

rozdíl od čerstvých alograftů nedochází k progresivní degeneraci elastických vláken a kolagenu a nakonec i nekróze (117).

Mechanické vlastnosti čerstvých a kryoprezervovaných arteriálních alograftů

Zlepšování orgánových odběrů i techniky kryoprezervace vytváří možnosti pro skladování arteriálních a venózních alograftů s možností jejich dalšího využití jako alternativních cévních náhrad. Skladování štěpů při velmi nízké teplotě může vést k významnému poškození buněk i extracelulární matrix, zvláště v průběhu mrazení nebo tání. Důležité jsou i změny elastických vlastností, které mají vztah k průchodnosti štěpů. K ochraně viability buněk bývají používány různé kryoprotektivní techniky s použitím glycerolu, chondroitinsulfátu nebo DMSO. Kryoprezervace udržuje důležité elastické vlastnosti arteriálních i venózních alograftů v rámci krátkodobého skladování do 22 dní (118).

Studená ischemie a kryoprezervace mají vliv na metabolickou funkci a kontraktilitu lidské mamární tepny. Kontraktilní odpověď je u kryoprezervovaných mamárních arterií výrazně snižena, zatímco enzymatická aktivita zůstává zachována a 24hodinová studená ischemie nevyvolává metabolické ani funkční změny těchto tepen (119).

V experimentu u prasečích aort byla kryoprezervace spjata se sníženou kontraktilitou těchto štěpů i se sníženou na endotelu nezávislou relaxační odpovědí vyvolanou nitroprusidem sodným. Identická kryoprezervace použitá u psích a lidských koronárních tepen ukazuje větší snížení kontraktility u lidských cév (120).

Při srovnání elastických vlastností lidských tepen kryoprezervovaných, čerstvých a PTFE protéz bylo konstatováno, že kryoprezervované tepny mají podobné elastické vlastnosti, které jsou pozorovány in vivo u tepen při normálním systémovém tlaku a in vitro u čerstvých štěpů. Kryoprezervace tedy zásadně nemění mechanické vlastnosti tepenné stěny (121).

Ve srovnávací studii mechanických vlastností čerstvých a kryoprezervovaných lidských sestupných hrudních aort, které byly odebrány v rámci multiorgánových odběrů, nebyly pozorovány zásadní změny mezi čerstvými a kryoprezervovanými štěpy (122). Kryoprezervace nemá ani vliv na viskoelastické vlastnosti muskulárních tepen (arteria femoralis), ale ovlivňuje tyto vlastnosti u elastických tepen (arteria carotis communis) (123).

Rozmrazování

Pomalé rozmrazování kryoprezervovaných cév před jejich klinickým použitím se zdá být nejlepší metodou k ochraně morfologických a funkčních vlastností buněk těchto štěpů (124).

Rychlé rozmrazování (v lázni +37 °C) zvyšuje fragilitu kryoprezervované arteriální stěny. Vysoký výskyt spontánních fraktur je spjat s termálním stresem, který právě vyvolává rychlé rozmrazování kryoprezervovaných štěpů. Někteří autoři doporučují pro ochranu endotelu dodržet rychlost rozmrazování +10 °C za 10 minut (125). V experimentální práci s elastickými tepnami králíka bylo sledováno, že v případě kontrolovaného mrazení na hodnotu skladování -180 °C vede následné rychlé rozmrazování až v 75 % k výskytu velkých fraktur těchto štěpů. Fraktury vznikají pravděpodobně v důsledku termálního stresu, který se vyskytuje při rychlém rozmrazování. Kontrolované tavení redukuje tento termální stres a následně i fraktury štěpů (124). Obecně je právě maximum výskytu termálního stresu dáváno do souvislosti s procesem tání (126).

Trhliny aortálních alograftů, které se objevují v důsledku rozmrazování kryoprezervované tkáně se mohou stát závažným problémem v dalším použití těchto alograftů. Trhliny se průměrně vyskytují ve 3 % u kryoprezervovaných lidských tkání a byly dávány do souvislosti s transportem těchto tkání. Zdá se, že na výskyt trhlin kryoprezervovaných štěpů má zásadní vliv hlavně rychlost tavení. Při rychlém tavení se trhliny vyskytují až v 66 % (127).

V důsledku kryoprezervace a následného rozmrazování dochází k denudaci endotelu, která je vystupňována v důsledku rychlého rozmrazování kryoprezervovaného štěpu. Pomalé rozmrazování zlepšuje buněčnou viabilitu a uspořádání cévní stěny (128).

Podle některých autorů vykazují arteriální vzorky kryoprezervované na teplotu -196 °C vysoký výskyt spontánních fraktur v případě rychlého rozmrazování štěpů. Tyto fraktury se ale nevyskytují při teplotě kryoprezervace -80 °C. Kryopoškození může být dáváno do souvislosti mechanického stresu, který se vyskytuje během tavení od -150 do -100 °C. V průběhu rychlého tavení se vyskytují kapsy s tekutinou v elastických oblastech arteriální stěny. Rychlé i pomalé rozmrazování vede k poškození stěny kryoprezervovaných tepen. Toto poškození je v souvislosti s vytvořením intracelulárních krystalů v případě rychlého mrazení a zvětšenou koncentrací elektrolytu s extrémní buněčnou dehydratací u pomalého mrazení. Při pomalém rozmrazování je minimální výskyt jak fraktur tak nahromadění tekutiny uvnitř arteriální stěny. Pomalé kontrolované rozmrazování kryoprezervovaných arteriálních štěpů významně omezuje tvoření spontánních fraktur, mikrofraktur i akumulaci kapaliny uvnitř arteriální stěny (129).

Zlepšení konzervačních technik vedlo k rozšíření cévních bank, které slouží k uchování cévních štěpů pro jejich použití v různých indikacích. Kryoprezervace přes veškerá svoje vylepšení vyvolává strukturální změny cév, které mohou vést k selhání nebo rupturám štěpů

po implantaci. Dochází nejen k poškození endotelu, ale i elastické vrstvy cévy. Tyto změny se vyskytují v důsledku kryoprezervace i procesu tání. Při pomalém tání dochází k minimálnímu poškození endotelu na rozdíl od rychlého tání, při kterém je významné poškození endotelu i elastických vláken (130).

Zdá se, že skladovací teplota -145 °C a následující automaticky kontrolovaný rozmrazovací proces vytvářejí zatím nejlepší podmínky pro ochranu endotelu kryoprezervovaných arteriálních štěpů (131).

4. 5. 7 Transplantační vaskulopatie

Navzdory pokroku v imunosupresivní léčbě je transplantační vaskulopatie významným faktorem selhání transplantovaných orgánů. Patogeneze potransplantační vaskulopatie zahrnuje chronickou imunitní odpověď příjemce, kdy imunitní buňky poškozují endotel a cytokiny aktivují hladké svalové buňky, které migrují z média do lumen, dochází k redukcí lumen i cévní kontraktility. Protože aktivace hladkých svalových buněk cév je odpovědná za ztlustění intimy u transplantovaných orgánů, může ovlivnění této proliferace představovat významný krok pro léčbu transplantovaných pacientů (132).

V autologních a alogenních žilních štěpech se vyskytují dva různé typy vaskulopatie. Intimální hyperplazie je rozhodující u autologních žilních náhrad, zatímco časný edém cévní stěny je pak u alograftů. Strukturální a přidružené funkční změny alograftů jsou pak akcelerovány imunologickými stimuly (133). U kryoprezervovaných žilních alograftů se transplantační vaskulopatie projevuje v rozvoji IH ve větší míře než u čerstvých alograftů. Přidání polyethylenu a glutathionu do transportního média před kryoprezervací rozvoj IH u těchto žilních alograftů významně redukuje (134).

4. 5. 7. 1 Antigenita alograftů a možnosti jejího ovlivnění

Arteriální i žilní alografty vyvolávají u příjemce určitou antigenní reakci. Názory na tuto problematiku nejsou jednotné a některé práce ukazují zásadně rozdílné výsledky.

Lidské čerstvé arteriální alografty vyvolávají imunitní reakci a spouští významnou specifickou anti HLA odpověď. Buněčná i humorální imunitní reakce byla zaznamenána i po implantaci alogenních srdečních chlopní (135). Buněčné komponenty, endotel a buňky hladké svaloviny mohou představovat významný antigenní problém. Odstraněním těchto antigenních

komponent dochází sice ke snížení zánětlivé infiltrace adventicie, ale i k vyšší tendenci k trombózám štěpů (136).

Žilní alografty podléhají transplantační rejekci jako jiné orgány. Velice brzy po implantaci dochází k destrukci endotelu i médiu. Poškození alograftů s imunitní reakcí je doprovodným jevem obnovy buněk endotelu i cévní stěny. Dochází k obnově endotelu a buněk médiu buňkami příjemce, ale cesta migrace těchto buněk není zcela jasná. Toto obnovení hostitelskými buňkami může snižovat antigenitu štěpu (137).

Některá sdělení uvádějí nízkou antigenní odpověď po implantaci čerstvých nebo kryoprezervovaných arteriálních alograftů při řešení infekce cévních protéz, která nemá vliv na klinické výsledky. Z těchto důvodů byly tyto alografty často používány bez ohledu na skupinovou krevní ABO či HLA kompatibilitu i používání imunosupresivní léčby, která nebyla vzhledem k infekci považována za bezpečnou. Následné studie však ukázaly časté pozdní komplikace těchto štěpů v důsledku jejich rejekce. Použití čerstvých arteriálních štěpů k řešení infekce cévních protéz, které byly maximálně několik dní konzervovány při +4 °C s ATB a následné imunosupresivní léčbě cyklosporinem v dávce 1-3 mg/kg/24 hod. (hladina v krvi 100-200 ug/ml) ukazuje slibné výsledky. Při dlouhodobém sledování nebyla zaznamenána recidiva infekce, degenerace štěpu, uzávěr štěpu a ani komplikace v důsledku imunosupresivní léčby. Typickým morfoloogickým nálezem bylo časně ztlustění arteriální stěny. Významným nálezem bylo zachování biologické aktivity v dlouhém časovém intervalu po operaci. Aktivita anti HLA protilátek naznačuje specifickou rejekci. Potvrzení vztahu mezi produkcí protilátek a pozdních komplikací alograftů vyžaduje další výzkum. Určitá možnost pro další ovlivnění imunitní odpovědi vyžaduje křížovou zkoušku, imunosupresivní léčbu a předoperační přípravu alograftů k redukci jejich antigenity (138).

Vliv kryoprezervace na antigenní odpověď cévního štěpu

Kryoprezervace může omezit cévní poškození. Ve srovnání s čerstvými štěpy mají štěpy kryoprezervované přibližně o 50 % sníženou kontraktilitu. Ochrana endotelu je důležitá k udržení cévního napětí a zachování antitrombogenních vlastností cévy. Časně selhání kryoprezervovaných žilních alograftů v důsledku imunologické odpovědi a místnímu poškození po vystavení arteriálnímu tlaku bylo v literatuře publikováno, i když imunologická aktivita kryoprezervovaných tepenných štěpů o malém průměru (<6mm) zůstává sporná. Některé práce ukazují redukci v antigenní odpovědi u kryoprezervovaných tepenných štěpů (139) a naopak jiné publikace nezaznamenaly rozdíly v imunologické odpovědi čerstvých a kryoprezervovaných arteriálních štěpů.

Kryoprezervace redukuje počet T lymfocytů v intimě a působí jako prevence aneuryzmatické dilatace, která byla pozorována u čerstvých alograftů. Navíc léčba cyklosporinem A významně zlepšuje průchodnost čerstvých i kryoprezervovaných alograftů (140).

Několik dalších experimentálních studií ale potvrzuje, že kryoprezervované alografty vykazují významný stupeň antigenní odpovědi (141,142).

Otázka imunologické aktivity kryoprezervovaných cévních štěpů však není stále jednoznačně vyřešena. Imunologická reakce kryoprezervovaných alograftů včetně HLA protilátek se může stát zásadním problémem pro potenciální transplantaci a podílet se na selhání transplantovaného orgánu (143). Bylo pozorováno, že kryoprezervované alogenní žíly mohou způsobit senzibilizaci příjemce, která může zamezit transplantaci ledvin, ale zdá se, že při decelularizaci těchto štěpů dochází k odstranění tohoto rizika (144).

Vlastní kryoprezervace vede ke kompletní ztrátě funkce arteriálních štěpů a těžké destrukci endoteliální vrstvy. Nicméně kryoprezervované arteriální autografty i alografty s imunosupresivní léčbou cyklosporinem A vykazují obnovení funkčních a morfologických parametrů. Tento fenomén je zřejmě v důsledku repopulace buněk od příjemce (145).

Při sledování průchodnosti alograftů se zjišťuje, že ne všechny mají stejnou dlouhodobou průchodnost. Oblast femoropopliteálních tepen má větší podíl složky hladké svaloviny ve srovnání s větším podílem elastických vláken u aorty a pánevních tepen. Tato skutečnost může vysvětlovat horší výsledky při použití alograftů s větším podílem hladké svaloviny, která vyvolává větší antigenní odpověď (146).

Kryoprezervované alografty mohou představovat životaschopnou alternativu pro cévní rekonstrukce, ale jejich imunologická reakce, jak už bylo uvedeno, zůstává kontroverzní. V experimentu na prasatech čerstvé alografty ukazují při srovnání s čerstvými alografty zánětlivou infiltraci již třetí den po implantaci a 30. den již chybí u těchto štěpů endotel, objevují se intraluminální tromby a aneuryzmatické dilatace. Kryoprezervace tedy podle této práce nijak neredukuje imunogenicitu alograftů, která se nachází u čerstvých štěpů (147).

Na druhé straně je zajímavá nepřítomnost rejekce u kryoprezervovaných VSM používaných k hemodialýze. Při použití kryoprezervovaných VSM pro dialýzu nebyla shledána rejekce jako hlavní příčina selhání štěpů, i když nebyla zachována shoda v krevních skupinách mezi dárce a příjemcem. Štěpy vykazovaly jen mírnou infiltraci adventicie makrofágy a ojedinělé T lymfocyty (148).

Shoda ABO, HLA

Při použití žilních alograftů bývá dodržována kompatibilita krevních skupin, ale vzhledem k omezeným počtům alograftů není dodržována HLA shoda. Rejekce tedy může být ovlivněna nejen imunosupresivními léky, ale i snahou o dodržování shody nejen krevních skupin mezi dárcem a příjemcem, ale i v HLA (149). Vhodnou alternativou k redukcí imunologické aktivity cévních alograftů může být i kombinace kryoprezervace a zachování kompatibility krevních skupin ABO a Rh faktoru (150). Na druhé straně nemohou být arteriální alografty alternativou konvenčních náhrad v běžné cévní chirurgii. Při řešení infekcí cévních protéz se však mohou podle některých autorů stát za určitých okolností v úzce vymezených indikacích vhodnou alternativou i bez imunosupresivní léčby a bez ohledu na kompatibilitu ABO a HLA (151).

4. 6 Imunosuprese

Imunosuprese je stav snížené imunity v důsledku léčby nebo vlivem některých nemocí. Imunosuprese může být spojena i se vznikem některých infekcí a nádorů.

Cílem imunosupresivní léčby je omezení nežádoucí imunitní aktivity . Především je nutné selektivním způsobem zamezit aktivaci T a B lymfocytů, které jsou hlavními nositeli imunitní odpovědi na cizí antigeny. Imunosupresivní léčba by měla zamezit rejekci transplantátu, na druhé straně by neměla oslabit protiinfekční imunitu.

4. 6. 1 Základní přehled imunosupresiv

Kortikosteroidy: mechanismem jejich účinku je inhibice rozpoznání antigenu (mají vliv na antigen prezentující buňky). Mají však mnoho nežádoucích účinků, Cushingoidní habitus, vyvolávají hypertenzi, hyperlipidémii, jsou diabetogenní, dále může v souvislosti s jejich užitím vzniknout avaskulární kostní nekróza, katarakta, akné, osteoporóza.

Antiproliferativní látky (azathioprin, mykofenolát mofetil) inhibují syntézu purinových bází, přičemž mykofenolát je výrazně účinnější. Mezi nežádoucí účinky patří myelotoxicita, hepatotoxicita (azathioprin), GIT toxicita (mykofenolát).

Kalcineurinové inhibitory (cyklosporin A, tacrolimus = FK506) inhibují tvorbu IL-2 tím, že blokují kalcineurin. Dnes jsou základem imunosuprese po transplantaci. Mají také své

nežádoucí účinky - jsou nefrotoxické, způsobují hypertenzi a hyperlipidémii (více cyklosporin), hyperplazii dásní. Dále jsou diabetogenní a neurotoxické (více tacrolimus). Je nutná monitorace jejich hladin díky úzkému terapeutickému rozmezí a variabilní farmakokinetice.

Inhibitory mTOR - mammalian target of rapamycin (sirolimus = rapamycin, SDZ RAD - everolimus) – inhibují transdukcí signálů navozených vazbou IL-2,4,7,15 na T lymfocyty, zabraňují tedy transkripci genu IL-2, čímž brání jeho produkci. Nežádoucí účinky – myelotoxicita, hyperlipidémie, toxicita v zažívacím traktu, pomalé hojení ran, lymfokély, akné. Nejsou nefrotoxické a vykazují výraznou synergii s cyklosporinem.

Cyklosporin, FK-506 a rapamycin inhibují cytotoxickou a zánětlivou odpověď makrofágů a mají silné imunopresivní vlastnosti, kdy dochází k inhibici aktivace T lymfocytů, které zprostředkují poškození alograftů. Imunosupresivní léky (cyklosporin A a rapamycin) inhibují aktivitu dvou prozánětlivých mediátorů (NO a PGE2). Efekt těchto imunopresiv je komplexní a uplatňuje se v různých tkáních (152). Potlačení ztlustění intimy arteriálních alograftů je závislé na hladině rapamycinu, na rozdíl od cyklosporinu (153).

4. 6. 1. 1 Azathioprin

Azathioprin patří mezi nejdéle a nejčastěji užívané imunopresivum. In vivo je metabolizován na vlastní účinnou látku **6-merkaptopurin** výrazně potlačující humorální i buněčnou imunitu. Jde o antimetabolit purinů, který po inkorporaci do nukleových kyselin brání proliferaci rychle se dělících buněk, tedy i T a B lymfocytů. Jeho účinek nastává až po řadě měsíců (2-6) a po vysazení přetrvává několik týdnů.

Azathioprin významně snižuje imunitní odpověď k HLA antigenům a neovlivňuje funkci kryoprezervovaných chlopenních alograftů u dětí (154).

Některé práce ukazují imunologickou aktivitu kryoprezervovaných VSM, kdy se po jejich použití objevuje jak humorální, tak buněčná reakce, které nejsou ovlivnitelné nízkými dávkami azathioprinu. Tato imunologická reakce se podílí na selhávání těchto štěpů. Zlepšení průchodnosti se dá očekávat při použití silnějších imunopresivních léků a dodržení kompatibility ABO i HLA (155).

4. 6. 1. 2 Kortikosteroidy

Nejdéle jsou v terapii pro své silné protizánětlivé účinky používány **kortikosteroidy**. Jejich imunosupresivní účinky se projevují až u vyšších dávek (nad 2 mg/kg/den), a to v důsledku inhibice tvorby prostaglandinů a interleukinů. Limitujícím faktorem jejich podávání jsou vedlejší účinky, které ve svých důsledcích mohou být pro nemocného závažnější než sama základní choroba (osteoporóza, hypertenze, hyperglykémie, psychické poruchy aj.). Při jejich podávání mohou nastat dvě situace. Pokud po snížení dávky následuje zhoršení klinického stavu, jde o nemocné tzv. **kortikodependentní**. Naopak průběh choroby, který zůstává léčbou neovlivněn, nebo se dále zhoršuje, je označován jako **kortikorezistentní**. Metodou volby se pak stávají imunosupresiva vyvinutá původně v 60. letech pro potřeby imunosuprese po transplantacích (156).

4. 6. 1. 3 FK- 506 (tacrolimus)

Denudace a regenerace endotelu může hrát důležitou roli v rámci rejekce alograftů. Morfologické změny intimy alograftů bez imunosupresivní léčby ukazují dva procesy v denudaci a regeneraci. První denudace a reendotelizace se objevuje během 7 dnů po transplantaci, zatímco další se pak vyskytuje mezi 14. a 21. dnem po transplantaci. První denudace je spojena s ischemickým a mechanickým poškozením spojeným s vlastní transplantací. K druhému denudačnímu procesu pak dochází v důsledku masivní leukocytární infiltrace při imunologické reakci. FK 506 v nízké dávce 0,05 mg/kg dokáže úspěšně ovlivnit přežití endotelu alograftů, snížit leukocytární infiltraci a tím se významně podílet na jejich dlouhodobé průchodnosti. Při vysazení FK 506 dochází k těžké destrukci intimy (157). FK 506 se používá nejčastěji například při transplantaci jater (158).

4. 6. 1. 4 Cyklosporin A

Cyklosporin A je cyklický polypeptid s výrazně inhibičním vlivem na buněčnou imunitu. Po intravenózním podání má rychlý nástup účinku (1-2 dny). Jde o látku toxickou s možnými závažnými komplikacemi, nutností je sledování stavu pacienta a sérových hladin. Závažné jsou účinky nefrotoxické a kancerogenní. Během terapie se může objevit hypertenze, neuropatie, 1/3 pacientů udává parestázie (159). Cyklosporin inhibuje migraci endoteliálních buněk a angiogenezi, která je indukována endoteliálním růstovým faktorem (160).

V experimentu na psech redukuje perorální léčba cyklosporinem aneurymatickou dilataci, lymfocytární infiltraci a imunologickou odpověď u čerstvých žilních alograftů. Dále podporuje i tvorbu neoendotelu a chrání i jednotlivé vrstvy žilní stěny (161). Dlouhodobou průchodnost žilních alograftů u psů lze docílit při použití kombinace kryoprezervace a cyklosporinu A (v dávce 15 mg/kg) (162).

4. 7 Odolnost alograftů k infekci

Použití žilních alograftů v koronární nebo cévní chirurgii ukazuje z historického hlediska průměrnou dlouhodobou průchodnost s náchylností k pozdní aneurymatické dilataci štěpů. Lepší výsledky byly prezentovány při použití těchto štěpů pro hemodialýzu. U většiny žilních štěpů byla provedena sterilizace antibiotiky před jejich použitím. V důsledku této sterilizace je redukována viabilita endotelu a fibroblastů, jak bylo zjištěno v experimentálních pracích na psím a prasečím modelu. Je možné, že výsledky použití žilních alograftů mohou být zlepšeny při dostatečné buněčné ochraně. Zvláště vystripované žilní štěpy jsou často kontaminované kožními bakteriemi. Proto je sterilizace antibiotiky nutná, jestliže jsou tyto štěpy dále plánovány k dalšímu využití. Prolongovaná sterilizace koncentrovaným roztokem s ATB vede ke snížení buněčné viability a tím k nižší antigenicitě, ale na druhé straně s tendencí k aneurymatické dilataci. Nízké dávky ATB efektivně sterilizují vystripované VSM, ale významně neovlivňují buněčnou viabilitu. Kryoprezervace žilní tkáně sice buněčnou viabilitu redukuje, ale nízká koncentrace ATB dále tento efekt nepotencuje (163).

Čerstvé aortální alografty, které byly úspěšně použity pro léčbu infekce cévních protéz, mají omezené použití vzhledem ke krátkodobé možnosti jejich uskladnění. Kryoprezervace je optimální metoda pro dlouhodobé skladování těchto štěpů. Kryoprezervované aortální alografty jsou rezistentní k bakteriální infekci. Mechanismus této rezistence není zcela objasněn, i když antibiotika, která jsou používána k bakteriální sterilizaci štěpů při jejich přípravě mohou hrát významnou roli. K další výhodě patří i možnost urgentního použití kryoprezervovaných alograftů (164). In situ použití kryoprezervovaných arteriálních alograftů při léčbě aortální infekce ukazuje též výborné časné i pozdní výsledky. Dokonce obtížně léčitelné infekce způsobené multirezistentními bakteriemi jsou spolehlivě eradikovány při použití kryoprezervovaných alograftů (165). Na druhé straně ale arteriální alograft bez ATB léčby zvyšuje jeho citlivost k infekci. Antibiotická léčba tedy snižuje riziko infekce alograftu (166).

4. 8 Současné možnosti použití cévních alograftů

Podle literárních údajů jsou uváděny různé možnosti použití cévních alograftů jak čerstvých, tak i kryoprezervovaných.

4. 8. 1 Infekce cévních protéz

Čerstvé cévní transplantáty představují jednu z možností řešení infekce cévních protéz (167). Kryoprezervované aortální alografty jsou v experimentu více rezistentní k infekci ve srovnání s in situ umístěnými protézami při řešení infekce cévních protéz. Základní podmínkou zůstává samozřejmě souběžná antibiotická léčba (168). Někteří autoři vykazují srovnatelné výsledky při použití čerstvých a kryoprezervovaných arteriálních alograftů (169). Vzhledem k redukované citlivosti alogenních tepen vůči infekci lze řešit infekci cévní protézy po její explantaci pomocí alograftu umístěného do infekčního pole (170). I když rezistence alograftů vůči infekci není úplná a vyskytují se též i jejich pozdní degenerace, zdá se, že jejich použití k řešení těchto závažných cévních komplikací má příznivější výsledky než implantace nové protézy (171). Za určitých okolností lze cévní transplantát použít i při částečném odstranění protézy a to v případě omezení infekce jen na určitou část cévní protézy (172).

V určitých případech je možné použít k léčbě infekce cévních protéz kryoprezervované alografty, ačkoliv nejsou zcela odolné k infekci. Tyto alografty jsou považovány za méně antigenní než štěpy čerstvé. I při použití kryoprezervovaných štěpů je vhodné provést testy krevní a tkáňové shody, aby se snížil výskyt pozdní degradace štěpu (173). Použití kryoprezervovaných arteriálních alograftů při léčbě mykotických výdutí aorty a infekcí cévních protéz je efektivnější, bezpečnější a levnější než klasická chirurgická léčba. Zdá se, že kryoprezervované štěpy jsou vůči infekci odolné. Rozdíly mezi čerstvými a kryoprezervovanými arteriálními štěpy jsou vysvětlovány několika mechanismy. Selhání čerstvých štěpů je spojováno s významnou imunologickou reakcí s infiltrací plazmatických buněk a makrofágů. Tato reakce vede k degeneraci elastických vláken a kolagenu, což vede až k nekróze. Výsledkem je pak ztráta mechanické pružnosti spojená s aneuryzmatickou dilatací a možností ruptury. V protikladu kryoprezervované štěpy ukazují nižší infiltraci imunokompetentních buněk a kromě toho DMSO jako kryoprotektivní látka dále redukuje antigenicitu alograftů (174).

Použití in situ arteriálního alograftu má své významné místo a přijatelné výsledky i pro léčbu infekce protézy po operaci výdutě hrudní nebo torakoabdominální aorty (175). Infekce cévní

protézy může být komplikována aortoenterickou píštělí. Při srovnání klasické léčby infekce cévních protéz a použití kryoprezervovaných alograftů je příznivější u alograftů. V případě aortoenterické píštěle jsou ale naopak podle některých autorů lepší výsledky s uzávěrem aorty a extraanatomickým bypassesem (176).

Určitou další možností použití kryoprezervovaného štěpu je jeho dočasné použití v infekčním terénu při ohrožení končetiny a nepřítomnosti vhodného autologního materiálu jako dočasný konduit do doby vyhojení infekce (177).

4. 8. 2 Aortitidy

Aortitidy představují velmi vážné onemocnění v cévní chirurgii, kdy dochází k destrukci tepenné stěny. Důsledkem toho je většinou vznik nepravé výdutě, která může být příčinou krvácení s fatálními následky. Na rozdíl od pravého aneuryzmatu ohrožuje infekční aortitida svého nositele nejen možnou časnou rupturou, ale i sepsí (178).

Kryoprezervovaný aortální alograft může představovat slibný a efektivní způsob léčby mykotické výdutě břišní aorty (179,180).

Také náhrada kořene aorty kryoprezervovaným alograftem má velmi dobré dlouhodobé výsledky a používá se hlavně při endokarditidě, degenerativních nebo vrozených onemocněních (181).

Výborné dlouhodobé výsledky použití kryoprezervovaných arteriálních alograftů při léčbě infekce cévních protéz a zánětlivých postižení břišní aorty uvádí Leseche, kdy tříletá primární a sekundární průchodnost byla 81 a 96 % (182).

4. 8. 3 Endovaskulární léčba

Stentgraft může být použit pro urgentní a dočasnou léčbu píštěle mezi falešnou výdutí cévní náhrady při infekci protézy spojené s krvácením jako překlenovací most. Po zajištění vhodného dárce může následně v další době dojít k implantaci vhodného alograftu (183).

Další možnost endovaskulární léčby připadá v úvahu při řešení komplikací po implantaci alograftů. Aneuryzmatická dilatace arteriálních alograftů je projevem pozdní komplikace, která bývá dávána do souvislosti s chronickou rejekcí. Implantace stentgraftu pak může představovat možnost při této pozdní komplikaci (184). Obdobnou možností je i řešení pooperačních stenóz alograftů pomocí PTA a stentu (185).

4. 8. 4 Kritická končetinová ischemie

Homografty, které byly v minulosti používány v cévní chirurgii, podléhaly často biodegradaci, ale na druhou stranu byly tyto změny pozorovány jen zřídka u tepen transplantovaných orgánů. V literatuře jsou uváděny slibné výsledky při použití čerstvých arteriálních alograftů, které byly zajištěny v rámci multiorgánových odběrů, následně uloženy v konzervačním roztoku Custodiol® a ihned transplantovány u pacientů s kritickou končetinovou ischemií. Tito pacienti měli po celou dobu funkce štěpu imunosupresivní léčbu a záchrana končetiny byla až 75 % v průběhu 12 měsíců (186).

4. 8. 5 Dialýza

Kryoprezervované femorální žíly mají při použití k dialýze obdobnou průchodnost jako polytetrafluoroethylenové (PTFE) grafty. Vzhledem k jejich relativní rezistenci k infekci jsou vhodným materiálem u pacientů s opakovaným selháním arteriovenózního (AV) štěpu, zvláště po vyčerpání klasických míst pro založení AV píštělí nebo při infekci AV shuntu (187). Na druhé straně je ale uváděno, že použití kryoprezervovaných žilních štěpů pro dialýzu u pacientů s vysokým rizikem infekce je spojeno s vyšším výskytem infekce a ruptury štěpu, zvláště při umístění štěpu na stehno. Použití kryoprezervovaných žilních štěpů pro dialýzu je doporučováno jen v případě, že není možné použít jinou alternativu (188).

4. 8. 6 Chronická končetinová ischemie

Otázka použití cévních alograftů při chronické končetinové ischemii je velice sporná. V experimentu na psech je uváděno, že čerstvé žilní alografty mohou být alternativou VSM za předpokladu potlačení imunologické reakce cyklosporinem (189). Výsledky použití žilních alograftů u pacientů s chronickým obliterujícím tepenným postižením byly ale zatím zklamáním navzdory moderní kryoprezervaci (190).

4. 8. 7 Revaskularizace myokardu

Chirurgická revaskularizace myokardu je zavedenou a dostupnou metodou léčby pro nemocné s ischemickou chorobou srdeční (ICHS), kteří nejsou vhodní pro perkutánní koronární intervenci, ale morfologické postižení tepen chirurgickou revaskularizací dovoluje.

Protože indikace k chirurgické revaskularizaci se stále rozšiřují, přicházejí k operaci nemocní s takovým onemocněním žil či tepen na dolních končetinách, které použití povrchních žil dolních končetin pro koronární bypass vylučují. Mezi ně patří varikózní postižení, stav po extirpaci povrchního systému pro varixy, potrombotický syndrom nebo ischemická choroba dolních končetin ve stadiu III a IV podle Fontaina.

Koronární bypassy pomocí VSM nebo mamární tepnou patří mezi běžné techniky v kardiochirurgii. Určité procento pacientů však nemá vhodnou VSM, která má nedostatečný kalibr anebo byla spotřebována při cévní rekonstrukci. Arteriální tlak akceleruje ve VSM aterosklerotické změny, které jsou během prvního roku po koronární rekonstrukci ve 12-27 % příčinou uzávěru a 50 % těchto uzávěrů vzniká během prvního měsíce. Mamární tepna je sice více odolnější vůči těmto aterosklerotickým změnám, ale u pacientů, kteří jsou indikováni k několikanásobné koronární rekonstrukci, chybí dostatečný počet těchto arteriálních konduktů. Přestože arteriální alografty mohou představovat vhodnou alternativu, objevují se určité obtíže při jejich ochraně mezi odběrem a implantací, což omezuje jejich použití (191).

4. 9 Tkáňové banky

Současný rozvoj kryobiologie zajišťuje dlouhodobou konzervaci tkání a umožňuje zachování jejich morfologických a funkčních vlastností (192).

Vzrůstající nárok na cévní alografty způsobil rozvoj cévních tkáňových bank. Na rozdíl od krátkodobě konzervovaných čerstvých cévních štěpů mají kryoprezervované štěpy výhodu v možnosti akutního použití (193). Další výhodou je používání kryoprezervovaných cévních štěpů, které jsou bezpečnější ve srovnání s čerstvými štěpy z hlediska virologického a mikrobiologického vyšetření, a možnost vybrat odpovídající velikost štěpu. Cévní alografty bývají odebrány cévními chirurgy v rámci multiorgánových odběrů. Tyto štěpy jsou ihned uloženy do ledového konzervačního roztoku a v termoboxech s ledem jsou dopraveny do tkáňové banky. Příprava cévních alograftů probíhá v boxech s laminárním prouděním, kdy jsou po preparaci a měření umístěny do konzervačního roztoku s antibiotiky, kde probíhá dekontaminace. Po dekontaminaci jsou alografty přemístěny do konzervačního roztoku s lidským albuminem a 10% DMSO a v označených skladovacích boxech jsou poslány k řízenému zmrazení, které probíhá v předem určeném rychlostním režimu. Zmrazené cévní štěpy jsou pak dále skladovány při teplotě $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mikrobiologické vyšetření je provedeno před a po dekontaminaci antibiotiky. Pozitivní serologické vyšetření a pozitivní mikrobiologické vyšetření po dekontaminaci je důvodem k vyřazení štěpu z kryoprezervace.

Kryoprezervované cévní štěpy jsou k příjemci za stanovených indikačních kritérií posílány v termoboxech s ledem. Obvyklý věk dárce bývá v rozmezí 15-55 let (194).

V rámci Evropy působí Evropská tkáňová banka (European homograft bank – EHB), kde jsou skladovány k dalšímu použití velké tepny (hrudní aorty, aortální bifurkace s pánevními tepnami a ponechaným tělem aorty a stehenní tepny). V EHB jsou stanovena základní kritéria pro dárce i příjemce. Věk dárce je zde omezen na věk mezi 18 a 45 lety. Dekontaminované cévní štěpy jsou umístěny do ledového tkáňového roztoku, kam je přidán kryoprotektivní 10% DMSO. Takto připravené cévní štěpy jsou utěsněny ve dvojitéch vacích a ponechány při +4 °C 40-60 minut, aby DMSO dostatečně proniknul do tkáně. V další fázi již probíhá elektronicky řízené mražení -1°C/min. a při dosažení hodnoty -40 °C dále -5 °C/min do hodnoty -100 °C. Kryoprezervované štěpy jsou skladovány v prostředí tekutého dusíku při teplotě -150 °C až do jejich využití (59).

V. ZVOLENÉ METODY, ZPRACOVÁNÍ, MATERIÁL A METODIKA EXPERIMENTŮ

Ve spolupráci s KST v Praze byly v rámci multiorgánových odběrů získány žilní (vena saphena magna) a tepenné (arteria femoralis) vzorky, které byly konzervovány a ve stanovených časových intervalech vyšetřeny. Tyto série vzorků lidských tepen a žil byly uloženy v hypotermních podmínkách po dobu 1-30 dnů v nutritivním médiu E-199 a Custodiol® suplementovaných ATB.

Konzervační médium E-199 je běžně používáno v České republice pro uchovávání srdečních chlopní v období mezi odběrem od zemřelého dárce a transplantací. Custodiol® patří k obvyklým perfúzním roztokům při multiorgánových odběrech. Obě média byla metodou rastrovací elektronové mikroskopie (REM) uchovávaných tkání hodnocena poprvé a nálezy byly vzájemně porovnány.

Kombinace histologických metod a REM umožňují detailně zhodnotit stav tepen a žil.

Experimentální vzorky

Celkem bylo v experimentu použito 48 vzorků lidské tepny a žíly získaných při multiorgánovém odběru od zemřelého dárce. Lidské cévy byly ostře rozděleny na úseky o délce přibližně 10 mm, rozděleny do dvou skupin a okamžitě vloženy do konzervačního média.

První skupina tepenných a žilních vzorků byla vložena do konzervačního roztoku o teplotě +4 °C a v těchto hypotermních podmínkách byla uchovávána po celou dobu experimentu.

Druhá skupina vzorků obou cév byla vystavena kombinaci normo- a hypotermních podmínek. Vzorky byly nejprve po dobu 24 hodin konzervovány při teplotě +37 °C. Následně byl roztok rychle ochlazen na +4 °C a tato teplota byla udržována do konce experimentu.

Jako kontrola byly použity vzorky těchto cév odebrané bez konzervace přímo do fixačního roztoku (Obr. č. 1, 2). Podmínky konzervace byly modelovány v souladu s běžně klinicky užívaným postupem, včetně obohacení roztoku ATB.

Vzorky obou experimentálních skupin byly uchovávány v konzervačním médiu po dobu minimálně 12 hodin a maximálně 30 dnů.

Doba konzervace a počet vzorků

Doba konzervace byla stanovena na 12 a 24 hodin, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 21 a 30 dní, vždy vzorek jedné tepny a jedné žíly, celkem 48 vzorků.

Zpracování vzorků

Ihned po vynětí z konzervačního média byly vzorky přeneseny do fixačního Bakerova roztoku (3,6% roztok formaldehydu stabilizovaný CaCl_2) a fixovány po dobu jednoho týdne. Po fixaci byl každý vzorek rozdělen na dvě části, z nichž jedna byla upravena pro prohlížení v REM a druhá byla zpracována histologickými metodami pro prohlížení ve světelném mikroskopu.

Histologická metodika. Fixované vzorky byly 24 hodin vypírány pod tekoucí vodou, odvodněny ve vzestupné etanolové řadě a zality do parafínu. Z parafinových bloků byly na sáňkovém mikrotomu krájeny řezy o tloušťce 7-8 μm , které byly dále barveny histologickými metodami (hematoxylin-eosin, trichrom, resorcin-fuchsin, orcein-indigokarmín) a montovány na podložní skla. Zhotovené preparáty byly prohlíženy a fotografovány ve světelném mikroskopu Olympus BH-2 kombinovaném s digitálním mikrofotozařízením Olympus Camedia 3030ZOOM.

Metodika REM. Po imerzní fixaci v Bakerově roztoku po dobu jednoho týdne byly vzorky cév podélně rozstříženy tak, aby bylo možno prohlížet lumen i průřez celou cévní stěnou. Dále byly vzorky přikrojeny na bločky o velikosti maximálně 3 x 5 x 10 mm.

K rychlému vysušení vzorků bez smrštění a poškození tkáně jsme použili nově vypracovanou a standardizovanou chemickou metodu využívající vlastností hexamethyldisilazanu (HMDS).

Postup vysoušení:

Po vyprání vzorků v destilované vodě po dobu 5 minut následovalo odvodnění ve vzestupné etanolové řadě 70%, 85%, 95% a 100%, vždy po 5 minutách. Dalším krokem bylo ponoření vzorků do směsi 100% etanolu a 100% HMDS v poměru 1:1 na dobu 10 minut a následně ponoření do 100% HMDS (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland) na dobu 30 minut.

Vysušení vzorků proběhlo poté na vzduchu v digestoři při pokojové teplotě během 30 minut (zbělání vzorků). Vysušené vzorky se přechovávají v exsikátoru nad silikagelem.

Dehydratované tkáňové bločky byly montovány na kovové podložní destičky, pokoveny napařením zlata ve vakuu a prohlíženy v rastrovacím elektronovém mikroskopu Tesla BS 301 při urychlovacím napětí 25 kV. Dokumentační fotografie zhotovené klasickým fotografickým procesem byly naskenovány a počítačově upraveny pro editaci a tisk.

1 Výsledky – experimentální část

1.1 Světelná mikroskopie E-199, Custodiol®

Na parafinových příčných řezech tepen a žil barvených histologickými technikami byla hodnocena tloušťka jednotlivých vrstev stěny, stav hladké svaloviny a vazivových složek tunica media a tunica adventitia. Ani v jedné skupině vzorků jsme nenalezli významné změny ve stavbě cévní stěny. Poměr tloušťky tunica media k tunica adventitia zůstal zachován, nenalezli jsme známky zánětlivé infiltrace ani nekrózy tunica media.

Endotelová vrstva lumenálního povrchu vzorků byla často poškozena nebo odloučena, ale tyto nálezy jsme nehodnotili jako směrodatné vzhledem k možnosti arteficiálního poškození křehké a tenké endoteliální linie při krájení řezů mikrotomovým nožem. Endotelová vrstva byla podrobně studována v rastrovacím elektronovém mikroskopu.

1.2 Rastrovací elektronová mikroskopie E-199, Custodiol®

V REM jsme se zaměřili především na studium lumenální plochy vzorků, sledovali jsme strukturu endotelu a jeho morfologické změny v závislosti na době konzervace a na druhu konzervačního roztoku. Při porovnávání s kontrolními vzorky cév odebraných a fixovaných bez konzervace jsme v roztoku s kombinovaným teplotním režimem +37 °C / +4 °C našli první změny ve formě porušení souvislosti endotelové vrstvy u tepen i žil již po 2-3 dnech konzervace.

Ve druhé skupině vzorků v hypotermním režimu +4 °C se tyto iniciační dystrofické změny endoteliocytů objevily se zpožděním, na žilách 4.-5.den a na tepnách od 5.-6. dne.

Strukturální změny cév pozorované v REM lze orientačně rozdělit do čtyř fází, které po sobě následují ve všech případech, pouze s časovým posunem závislejícím na druhu roztoku, teplotních podmínkách a na druhu cévy (Tab. č. 1, 2).

1.3 Stádia společných patomorfologických změn na cévách

1. Po určitém časovém intervalu se na lumenálním povrchu objevují dystrofické změny membrány endotelií ve formě poměrně homogenní vrstvy mikrověsikul a krátkého vláknění. I když nemáme korelaci v transmisní elektronové mikroskopii (TEM), půjde patrně o tzv. „endothelial blebs and spikes“ („bublíny a hroty“) popisované při degeneraci endotelových buněk (Obr. č. 3, 4). Tyto změny jsou nejzřetelnější při zvětšení 1500x a při bedlivém prohlédnutí snímků se zvětšením kolem 300-400x lze najít tato ložiska „sametového“ vzhledu na povrchu endotelu (Obr. č. 5, 6, 13, 14).

2. Na tuto iniciační dystrofii bezprostředně navazuje uvolňování mezibuněčných kontaktů a postupné rozvláknění endotelové vrstvy (Obr. č. 7, 8, 15, 16).

3. Postupně dochází k nabobtnávání a odlupování endotelových buněk a k obnažování lamina elastica interna (Obr. č. 9, 10, 17, 18).

4. Proces patomorfologických změn ve sledovaném intervalu 30 dní je zakončen kompletní denudací endotelové vrstvy a úplným obnažením povrchu lamina elastica interna pokrytým vláknitým debrisi pravděpodobně ze subendotelové vrstvičky vaziva (Obr. č. 11,12, 19, 20).

V nejdelších sledovaných intervalech pak dochází u některých štěpů až k devastaci lamina elastica interna a k odchlípení zbytků intimy od tunica media.

Tab. č. 1: Přehled patomorfologických změn tepenné a žilní stěny – roztok E - 199

Cévy/Stádium	1. Iniciální dystrofie	2. Rozvláknění endotelu	3. Počínající denudace	4. Kompletní odloučení endotelu
T-4	6. den	od 7. dne	po 10. dnu	od 22. dne
T-37/4	2. – 3. den	od 4. dne	po 10. dnu	od 18. dne
Ž-4	4. – 5. den	od 7. dne	po 8. dnu	od 18. dne
Ž-37/4	2. den	od 3. dne	5. - 7. den	od 16. dne

Tab. č. 2: Přehled patomorfologických změn tepenné a žilní stěny – roztok Custodiol®

Cévy/Stádium	1. Iniciální dystrofie	2. Rozvláknění endotelu	3. Počínající denudace	4. Kompletní odloučení endotelu
T-4	5. den	od 7. dne	12 – 13. den	20. - 30. den
T-37/4	3. den	od 5. dne	Od 7. dne	Od 15. dne
Ž-4	4. - 5. den	od 6. dne	8. den	Od 15. dne
Ž-37/4	2. den	3. den	5. den	Od 15. dne

(T-4: vzorky tepen konzervované při teplotě +4 °C, T-37/4: vzorky tepen konzervované v kombinovaném teplotním režimu +4 °C/+37 °C, Ž-4: vzorky žil konzervované při teplotě +4 °C, Ž-37/4: vzorky žil konzervované v kombinovaném teplotním režimu +4 °C/+37 °C)

Z tabelovaných údajů mimo jiné vyplývá, že na tepenných štěpech nastupují změny později, jsou odolnější než žilní, a to při obou teplotních režimech. Počáteční vystavení tkání fyziologické teplotě urychluje nástup dystrofických změn u tepen i žil, patrně zde dochází k aktivaci autolytických procesů nebo snad k období reperfučního syndromu.

2 Diskuze – experimentální část

Při výběru metodiky pro tento experiment jsme vycházeli z literárních údajů a z předchozích prací i současných možností Anatomického ústavu Lékařské fakulty v Hradci Králové. Kombinace světelné a rastrovací elektronové mikroskopie při vyšetřování vzorků cévní stěny umožňuje komplexnější zmapování probíhajících změn a jejich dokumentaci. Rastrovací

elektronová mikroskopie nabízí, na rozdíl od klasických histologických technik, možnost prohlížení větší plochy (až do 1 cm²) a porovnání morfologického vzhledu endoteliální výstelky cévního lumina. Výťažnost této metody je tedy pro naše účely poměrně vysoká a také v literatuře je rastrovací elektronový mikroskop využíván ke studiu cévních vzorků stále častěji (Cavallari, Yoder, Hickethier, Solberg).

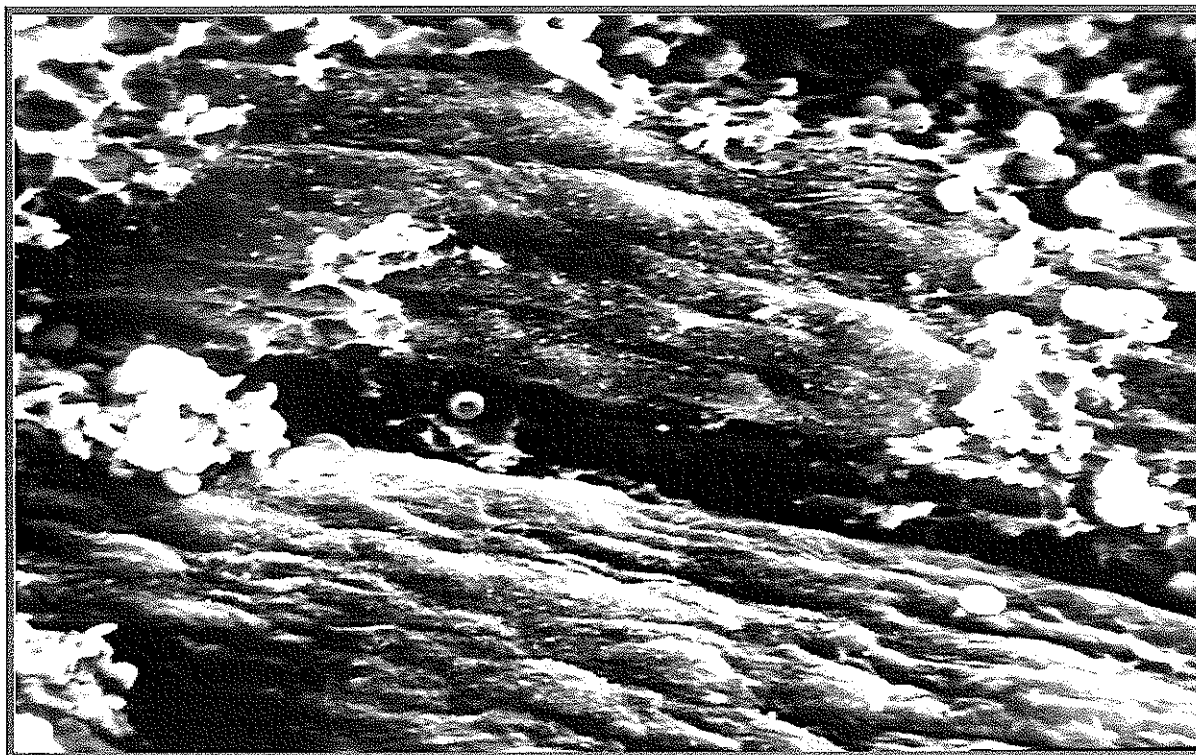
Vývoj morfologických změn lidských tepen a žil po hypotermní a kombinované normo-/hypotermní konzervaci v roztoku E-199 a Custodiol[®] suplementovaných antibiotiky byl sledován v obou případech po dobu 30 dnů. Nálezy v REM i ve světelném mikroskopu ukázaly, že tepenné štěpy jsou v prvních dnech odolnější vůči změnám než žilní při obou teplotních režimech, výrazněji při hypotermii +4 °C. První dystrofické změny endotelových buněk při použití konzervačního roztoku E-199 a Custodiol[®] se na tepnách objevují 2.-3. den, zatímco v žilách už po 48 hodinách v kombinovaném teplotním režimu. V hypotermním režimu jsou iniciální dystrofické změny patrné 5.-6. den u tepen a 4.-5. den u žil. Subendotelové vrstvy se odhalují v tepnách po 10. dnu při obou teplotních režimech, v žilách je deendotelizace patrná již od 5. dne v kombinovaném teplotním režimu a od 7. dne při 4 °C.

Vystavení cévních vzorků iniciální normotermii (+37 °C po dobu 24 hodin) v obou konzervačních médiích přináší vždy zhoršení efektu prezervace, tepny i žíly podléhají patologickým procesům rychleji. Důvodem je pravděpodobně to, že při rychlejším buněčném metabolismu za fyziologické teploty jsou energetické zásoby buněk rychle vyčerpány, dochází k aktivaci autolytických procesů anebo snad obdobě reperfúzního syndromu s rychlým nástupem dystrofických změn.

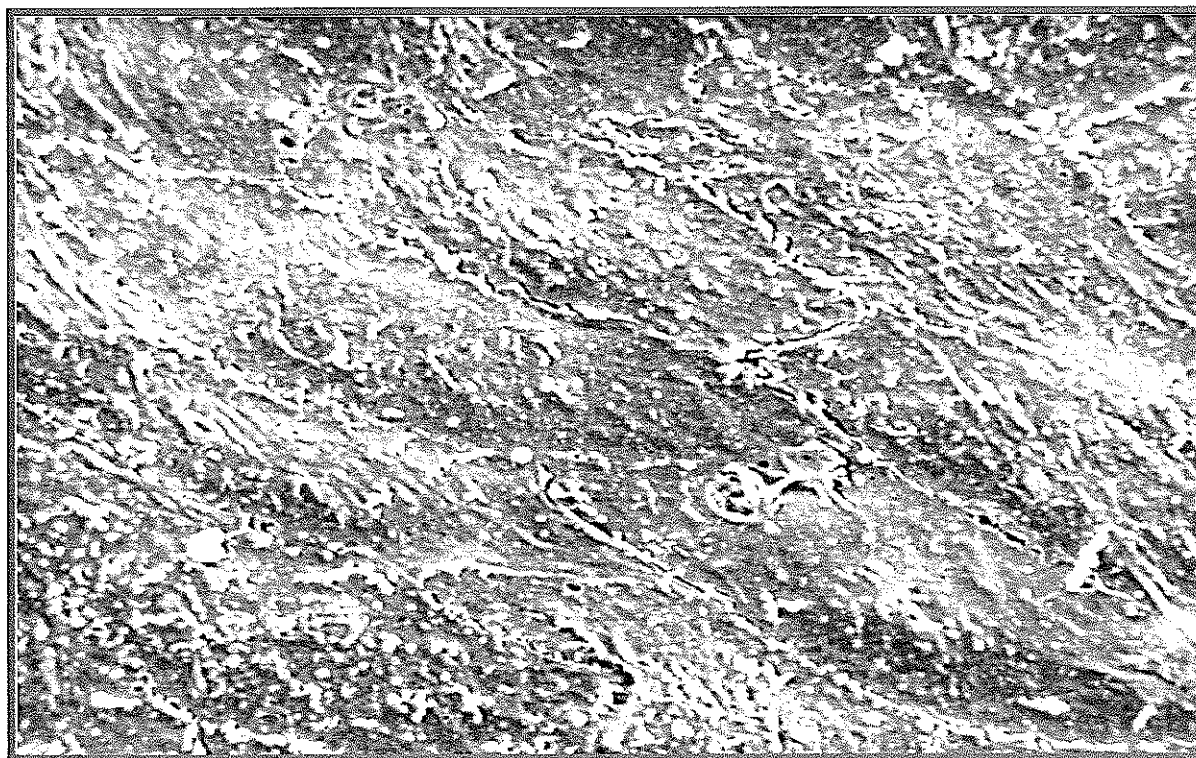
Tyto nálezy nepotvrzují literární údaje o výhodách normotermní konzervace, pokud je jako kritérium použito posuzování morfologických změn endotelové vrstvy cév. Při normotermní konzervaci je sice uváděna hypotermie jako nezbytná podmínka ochrany buněčné viability, ale zároveň se může také podílet na morfologickém poškození endotelu. Ochrana endotelu je zde způsobena metabolickým markerem, prostacyklinem. Optimální produkce prostacyklinu byla například sledována u žilních štěpů, které byly skladovány v tkáňovém médiu právě při normotermii (195). Naše práce se přiklání spíše k literárním údajům, které uvádějí, že krátkodobá týdenní konzervace tepenného alograftu v konzervačním roztoku s ATB a heparinem nemá zásadní vliv na stav těchto štěpů po 6 měsících od implantace. Čerstvé i konzervované arteriální štěpy zde vykazovaly degenerativní změny média, intimální hyperplazii i imunologickou reakci, která bývá spojována s trombózou štěpu (196).

Na příčných řezech cévní stěnou ve světelném mikroskopu ani v REM jsme v našich vzorcích nenalezli změny ve výšce jednotlivých vrstev, na vzorcích konzervovaných po dobu 30 dnů jsme však pozorovali separaci tunica intima od tunica media, která signalizuje počátek destrukčních změn postupujících do hlubších vrstev cévy.

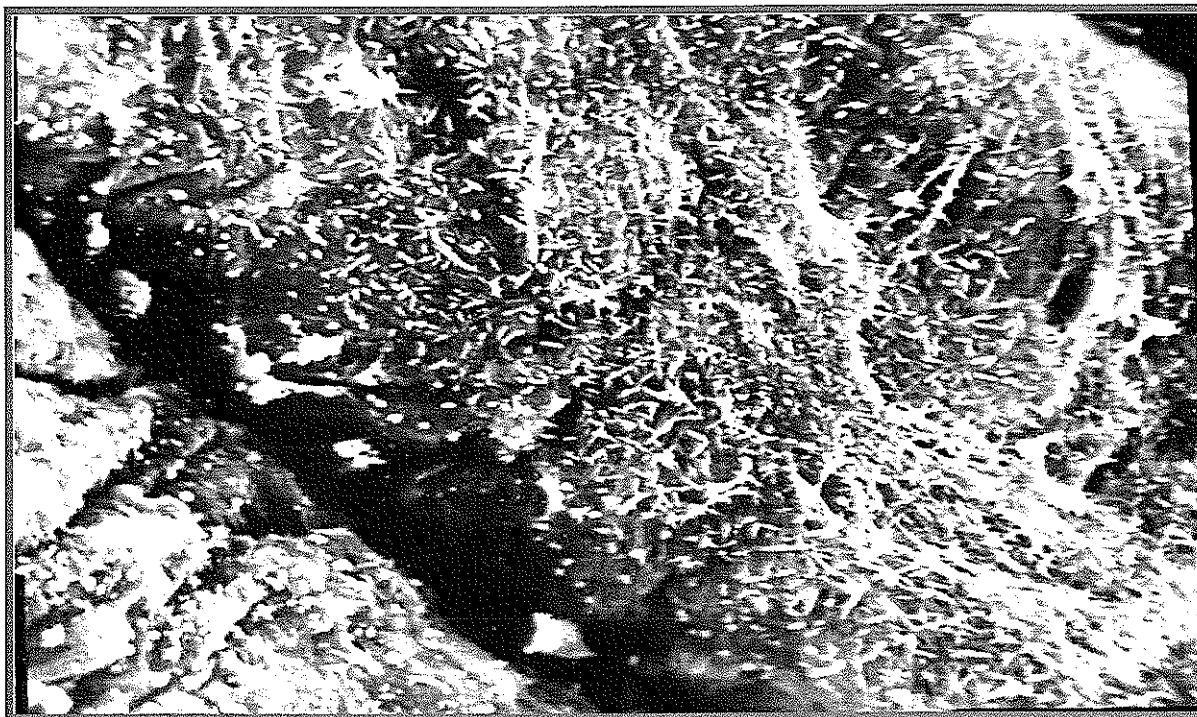
Na základě morfologického zhodnocení kvality prezervace cév v roztoku E-199 i v Custodiolu[®] se domníváme, že ani tato média nechrání lidské cévní štěpy před poškozením dostatečně a měla by být používána pouze ke krátkodobým konzervacím. Přidání ATB zřejmě dostatečně chrání cévy před zánětlivými změnami, ale z hlediska alespoň částečného zachování endotelové vrstvy v okamžiku transplantace či implantace jsou tepenné štěpy uchovávané v obou sledovaných roztocích za daných podmínek bezpečně použitelné asi po dobu 10 dnů, zatímco žíly pouze 5-7 dnů. Tyto údaje jsou zcela v rozporu s některými pracemi, které ukazují možnost několikaměsíčního sledování čerstvých VSM při +4° C v heparinizovaném solném roztoku s ATB (197). Do budoucna bude proto nezbytné konzervační roztoky upravovat na základě nejnovějších poznatků a optimalizovat jejich prezervační vlastnosti. Za důležité považujeme také sledování funkčního stavu konzervovaných cévních štěpů, především endotel-dependentní a svalovou relaxační odpověď cévy na acetylcholin, nebo papaverin, jak je to již v některých pracích popisováno (198). Potom teprve bude možné vyvodit přesné závěry o vztahu morfologického stavu cévy, především její endoteliální výstelky, k zachování funkcí nezbytných k úspěšnému vhojení po transplantaci štěpu.



Obr. č. 1 arteria femoralis – kontrolní vzorek. Souvislá hladká plocha endotelu, neporušené intercelulární kontakty. Perinukleární zóna endoteliocytů lehce prominuje do lumina. Na povrchu místy ulpívají erythrocyty a trombocyty. Typické zvlnění arteriální luminální plochy je v důsledku kontrahované lamina elastica interna (zvětšení 1500 x).



Obr. č. 2 VSM – detail žilního endotelu. Ploché a protáhlé endoteliocyty s úzkými pevnými intercelulárními kontakty (zvětšení 3000 x).



Změny na buněčných membránách endoteliocytů (E-199)

Obr. č. 3 arteria femoralis. Povrch endotelových buněk je pokryt hustými jemnými vlákny a mikrovesikulami. V levém dolním rohu jsou viditelné mezibuněčné ruptury (zvětšení 1500 x).



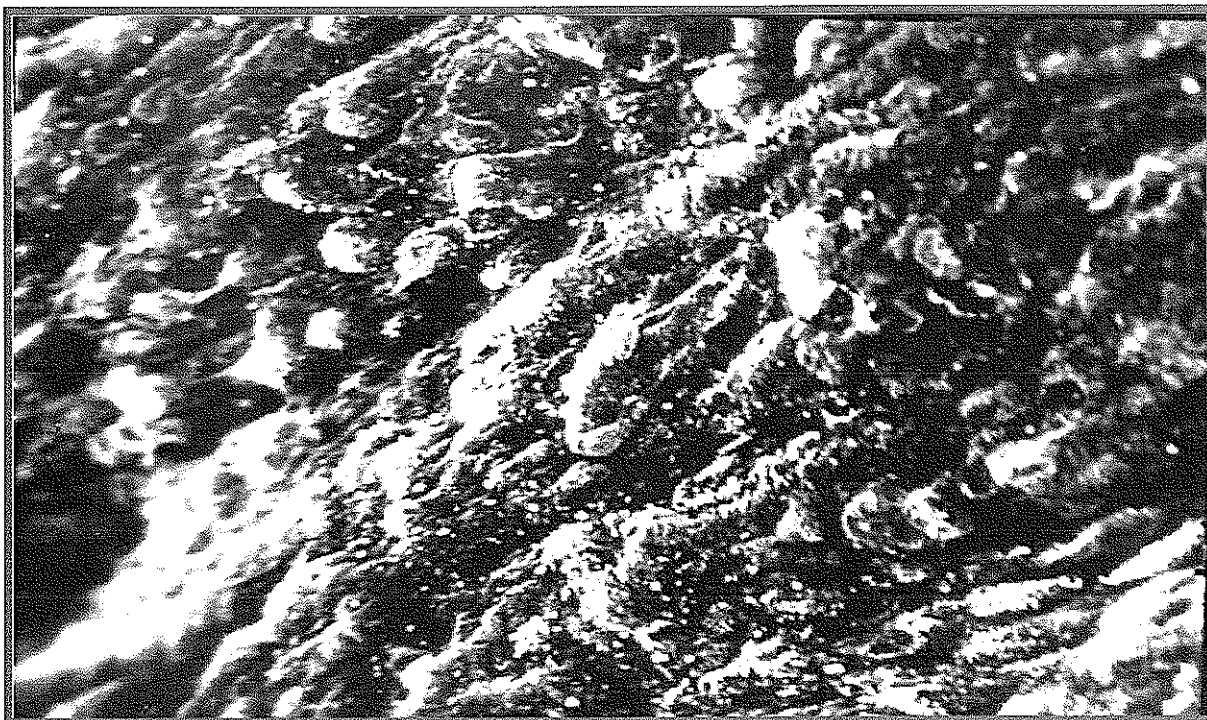
Změny na buněčných membránách endoteliocytů (E-199)

Obr. č. 4 VSM. Zduřelé protáhlé endotelové buňky s ostrými hranami, hustě pokryté mikrovesikulami, místy splývajícími do větších měchýřků (↓↑). Široké trhliny mezi buňkami, počínající deskvamace (zvětšení 1510 x).



1. stádium změn – iniciální dystrofie endotelových buněk (E-199)

Obr. č. 5 arteria femoralis. Zduřelé endoteliocyty se „sametovým“ povrchem signalizujícím nástup změn v buněčných membránách. Rozvolněné mezibuněčné kontakty, některé buňky jsou již separovány (zvětšení 1500 x).



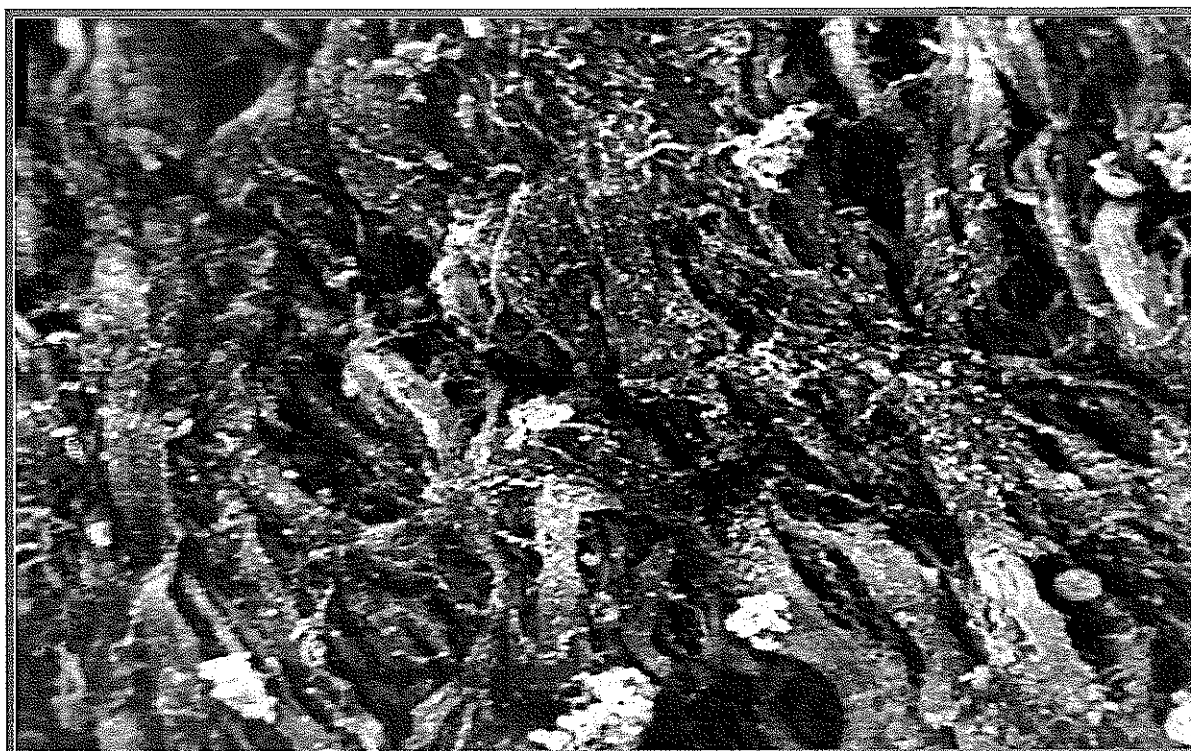
1. stádium změn – iniciální dystrofie endotelových buněk (E-199)

Obr. č. 6 VSM. Výrazně zduřelé endotelové buňky částečně uvolněné od bazální membrány, ojediněle viditelné drobné mikrověsiky jako bílé tečkování (zvětšení 1500 x).



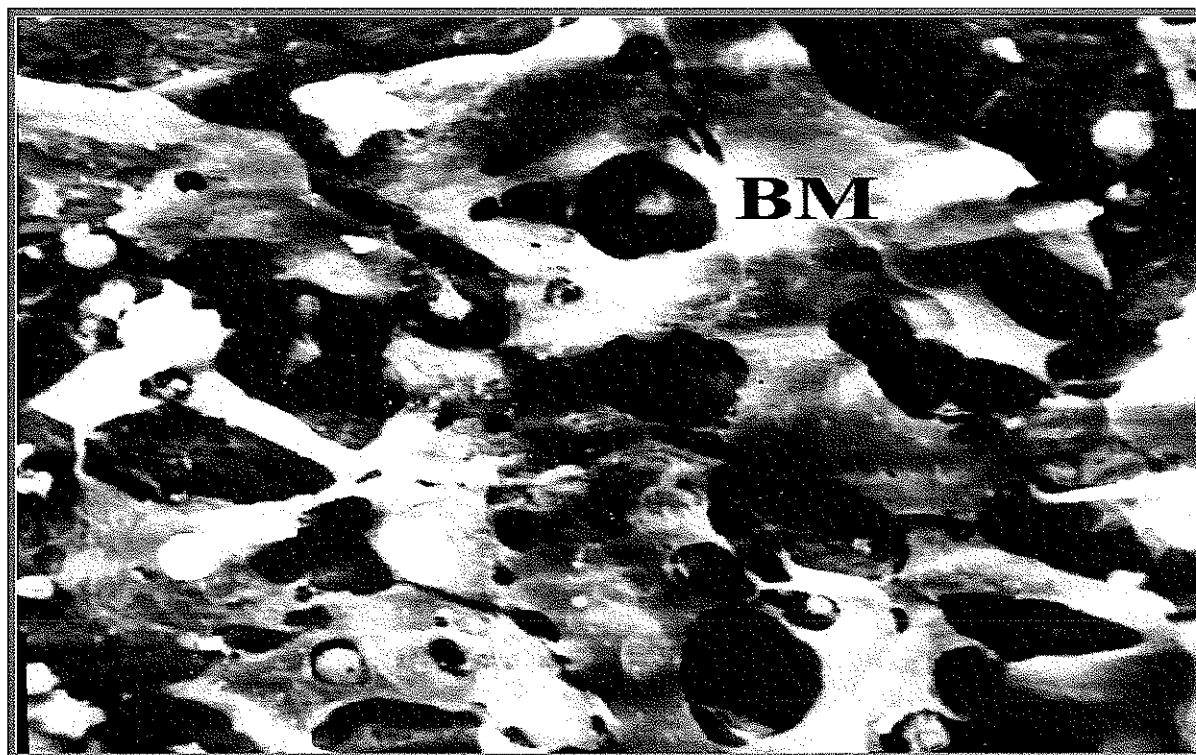
2. stádium změn – rozvláknění endotelové vrstvy (E-199)

Obr. č. 7 arteria femoralis. Mezi poškozenými deformovanými endotelovými buňkami prosvítá porušená bazální membrána (←) endotelu (zvětšení 1510 x).



2. stádium změn – rozvláknění endotelové vrstvy (E-199)

Obr. 8 VSM. Destrukce endotelové vrstvy, výraznější rozvláknění (zvětšení 1510 x).



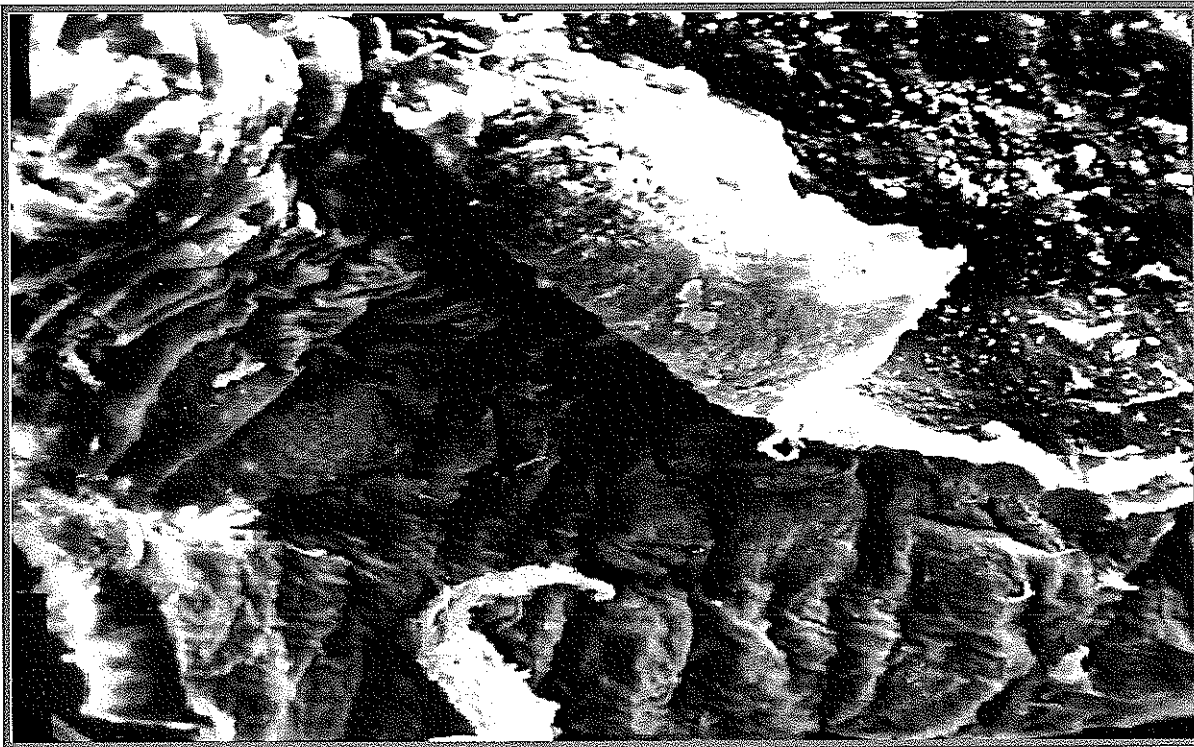
3. stádium změn – denudace endotelu, rozpad bazální membrány (E-199)

Obr. č. 9 arteria femoralis. Poškozené zbytky bazální membrány (zvětšení 1500 x).

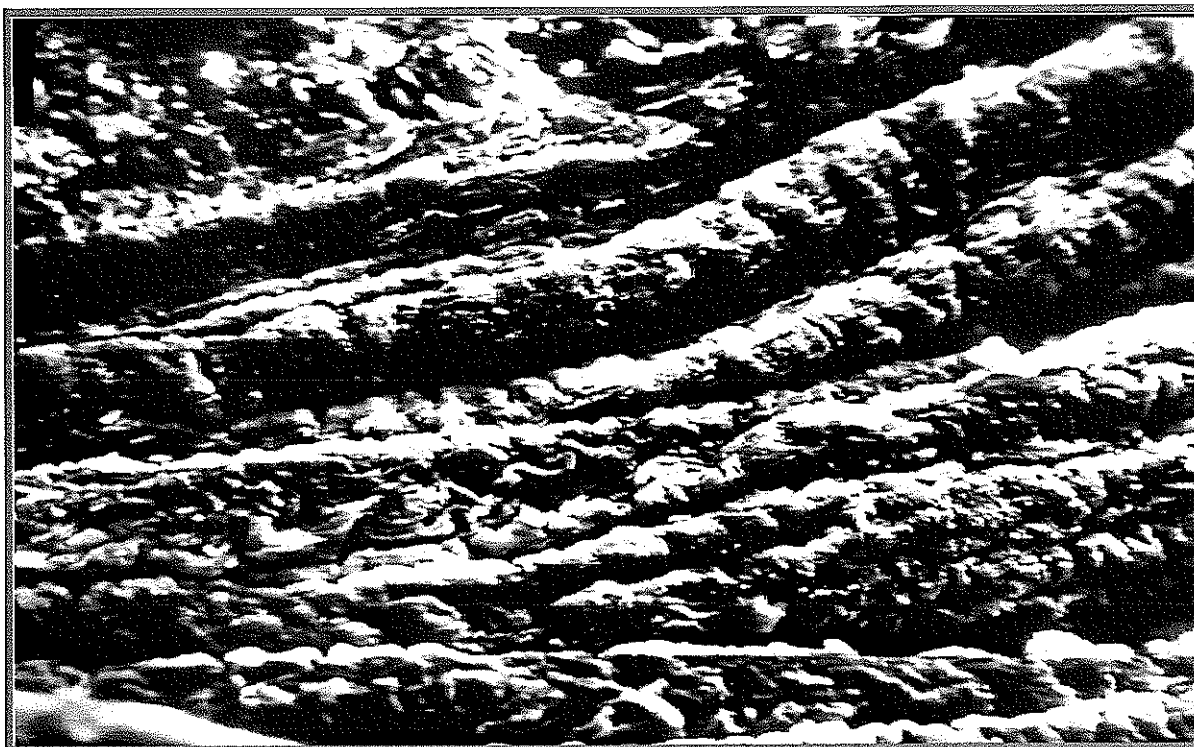


3. stádium změn – denudace endotelu, rozpad bazální membrány (E-199)

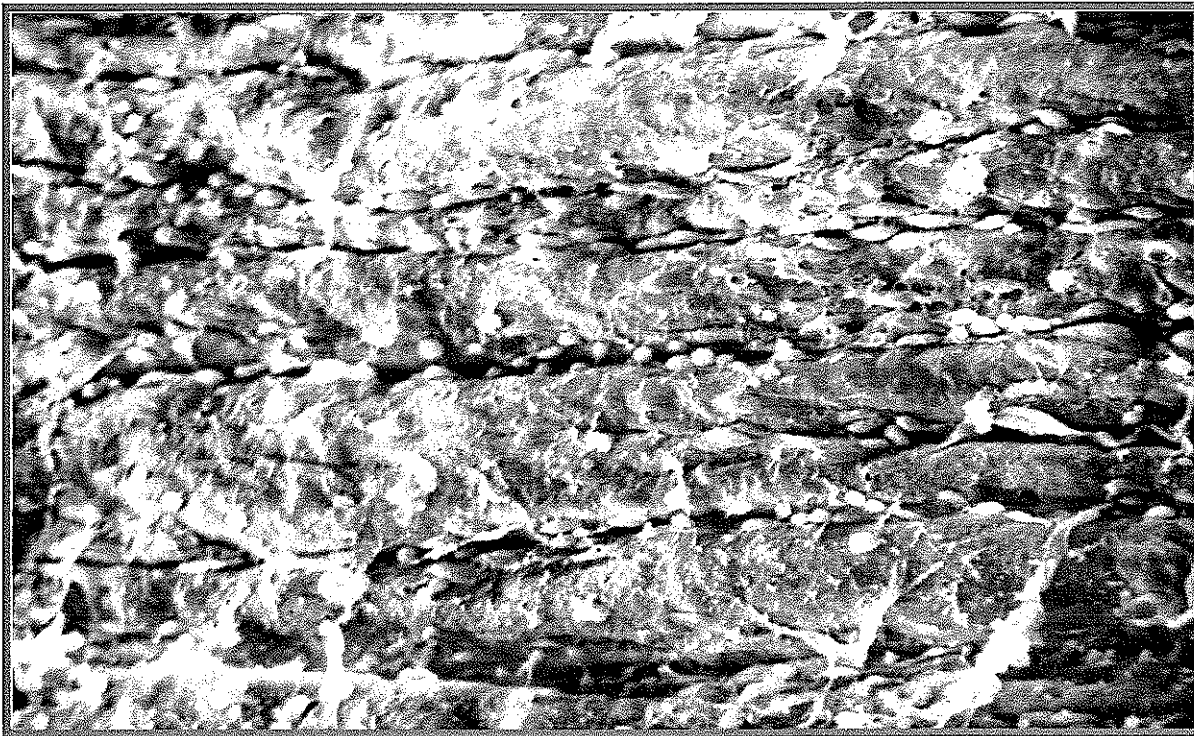
Obr. č. 10 VSM. Deformované odlučující se endoteliocyty (dolní část snímku), v horní polovině endotel již chybí, obnažená bazální membrána (zvětšení 1510 x).



4. stádium změn – kompletní denudace endotelu, obnažení lamina elastica interna (E-199)
Obr. č. 11 arteria femoralis. Odlupující se část deendotelizované tunica intima, pod ní je zvlněná lamina elastica interna (zvětšení 160 x).

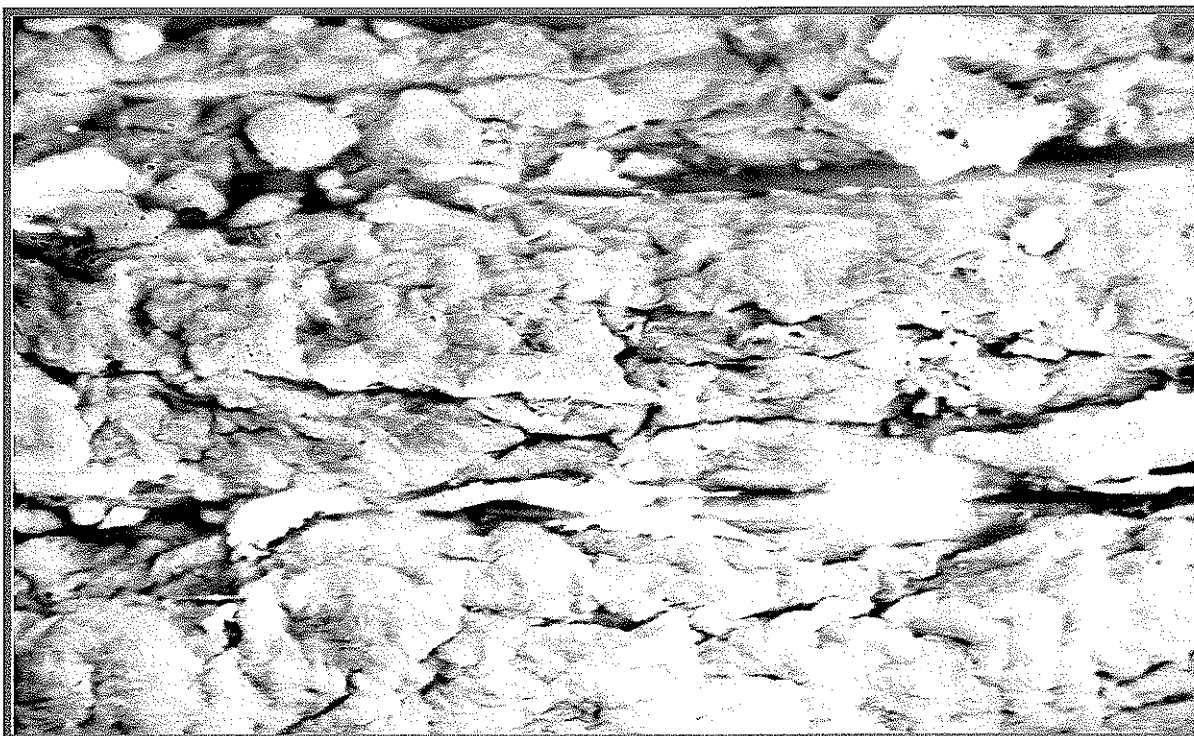


4. stádium změn – kompletní denudace endotelu, obnažení lamina elastica interna (E-199)
Obr. č. 12 VSM. Vzorek bez endotelové vrstvy, zcela obnažená, silně kontrahovaná lamina elastica interna s drobnými příčnými zářezy (zvětšení 350 x).



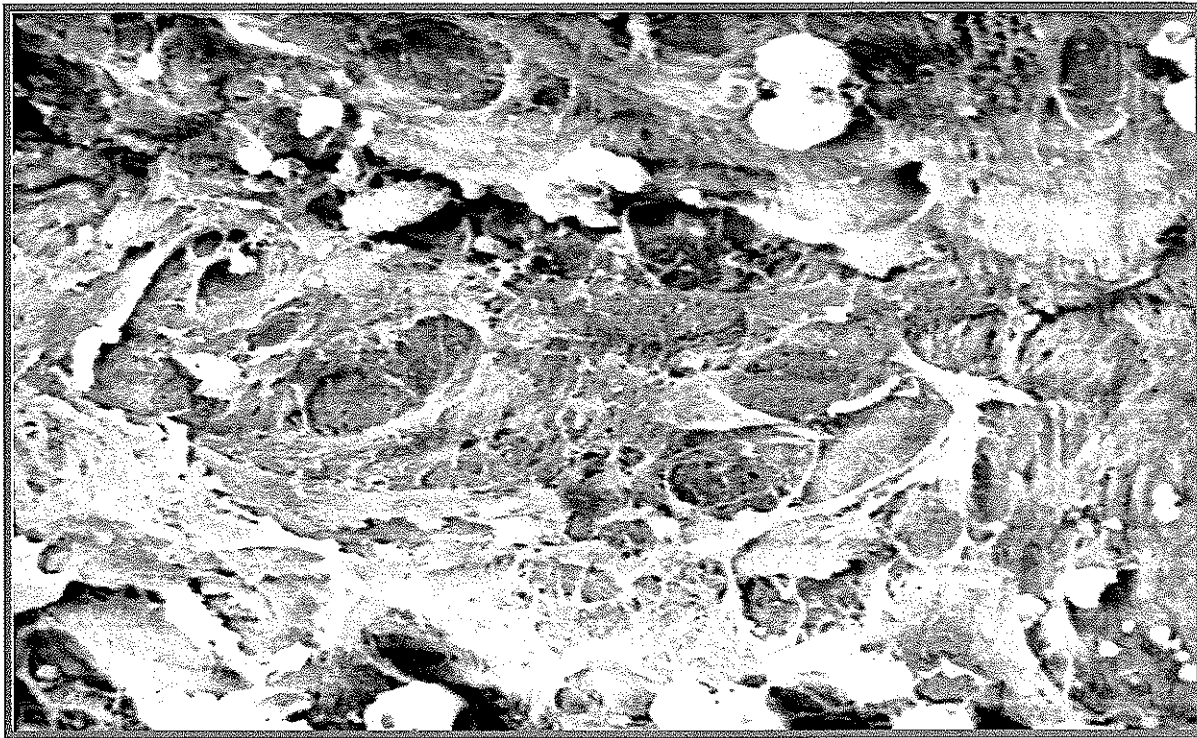
1. stádium změn – iniciální dystrofie endotelu (Custodiol®)

Obr. č. 13 arteria femoralis. Zvýrazněné a rozvolněné mezibuněčné kontakty, zduřelé endotelové buňky (zvětšení 510 x).



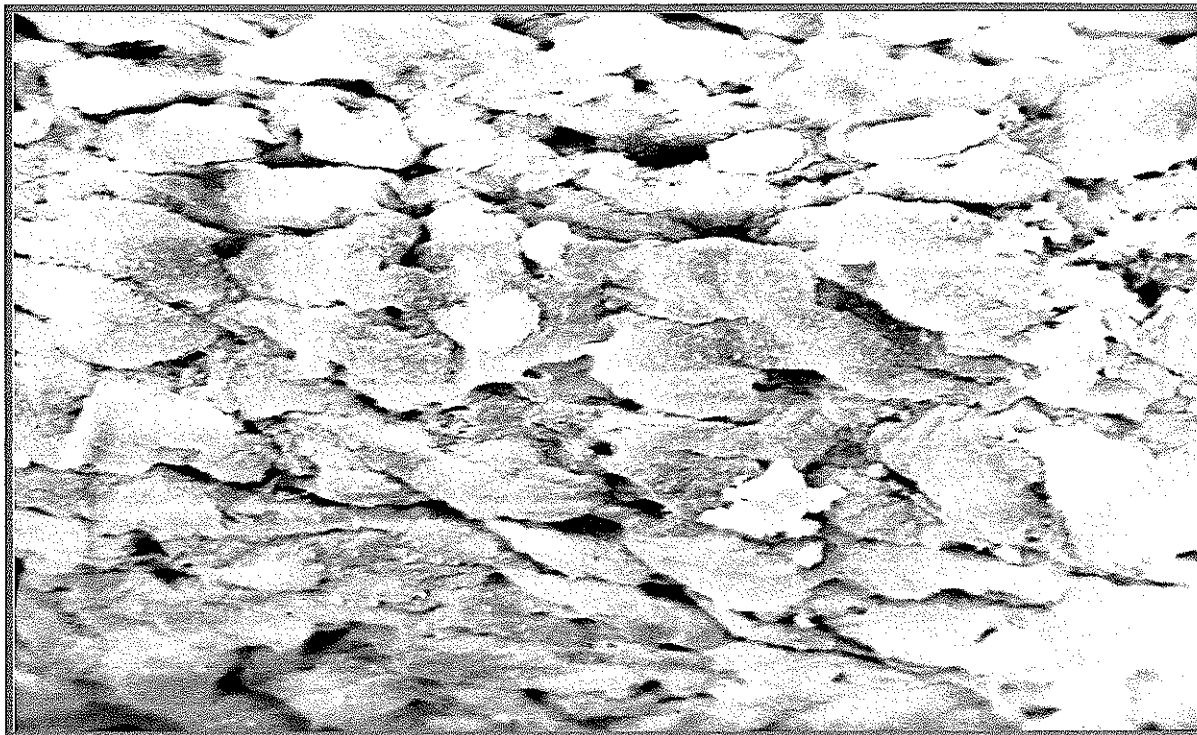
1. stádium změn – iniciální dystrofie endotelu (Custodiol®)

Obr. č. 14 VSM. Iniciální dystrofické změny žilního endotelu, zvýrazněné a rozvolněné mezibuněčné kontakty, zduřelé endotelové buňky (zvětšení 1100 x).



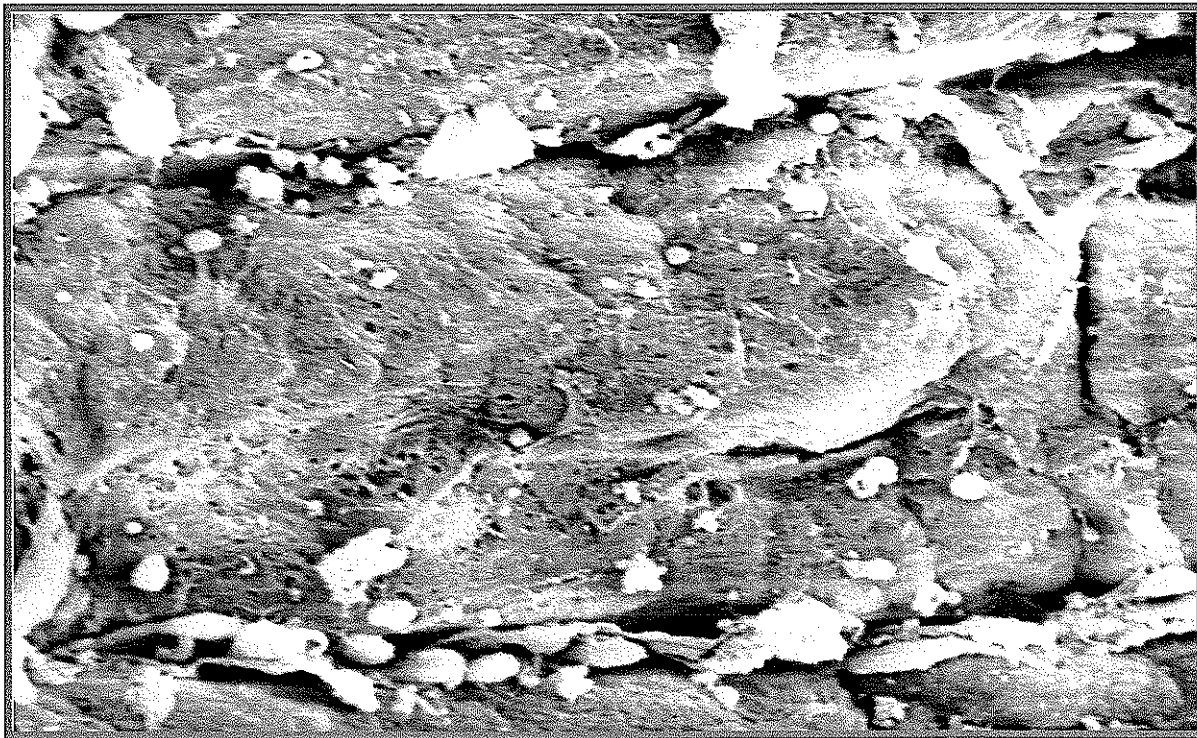
2. stádium změn – rozvláknění endotelu (Custodiol®)

Obr. č. 15 arteria femoralis. Zvýrazněné a rozvolněné mezibuněčné kontakty, zduřelé endotelové buňky, ojediněle chybí endotelie (zvětšení 1510 x).



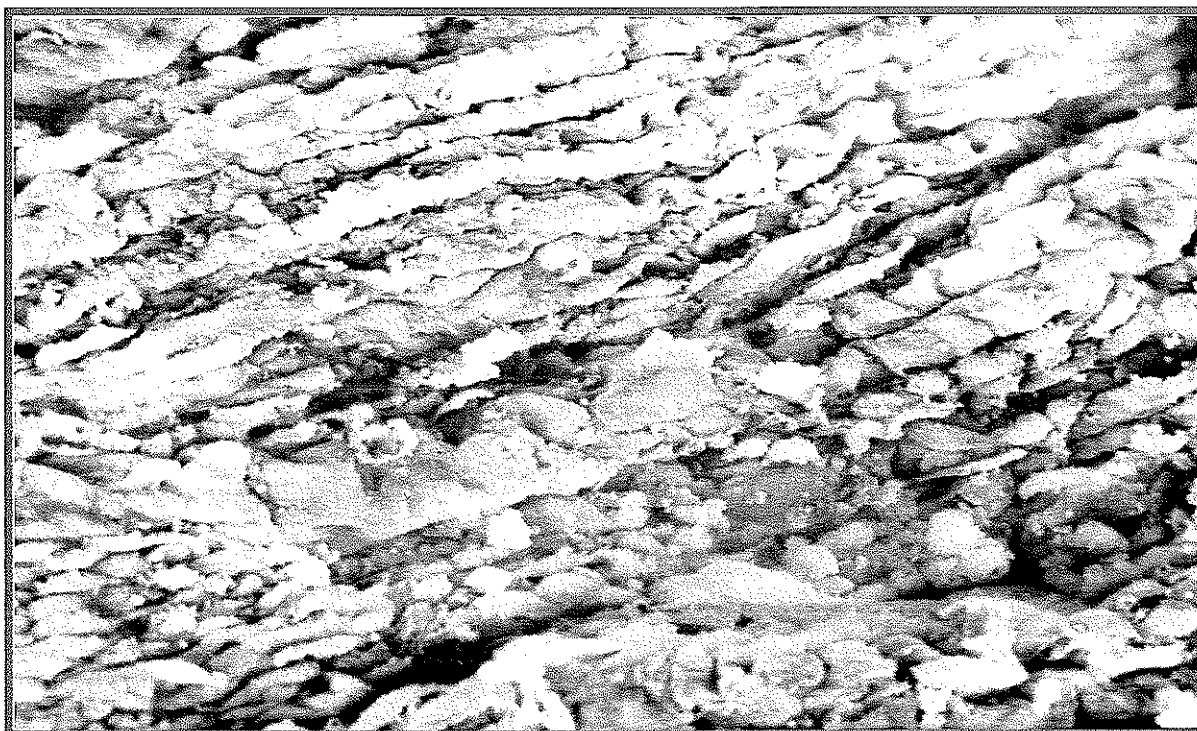
2. stádium změn – rozvláknění endotelu (Custodiol®)

Obr. č. 16 VSM. Zvýrazněné a rozvolněné mezibuněčné kontakty, zduřelé endotelové buňky (zvětšení 1600 x).



3. stádium změn – počínající denudace endotelu (Custodiol®)

Obr. č. 17 arteria femoralis. Zachycena plocha odloučeného endotelu krytá pouze bazální membránou se stopami původních kontaktů s endoteliocyty (zvětšení 1470 x).



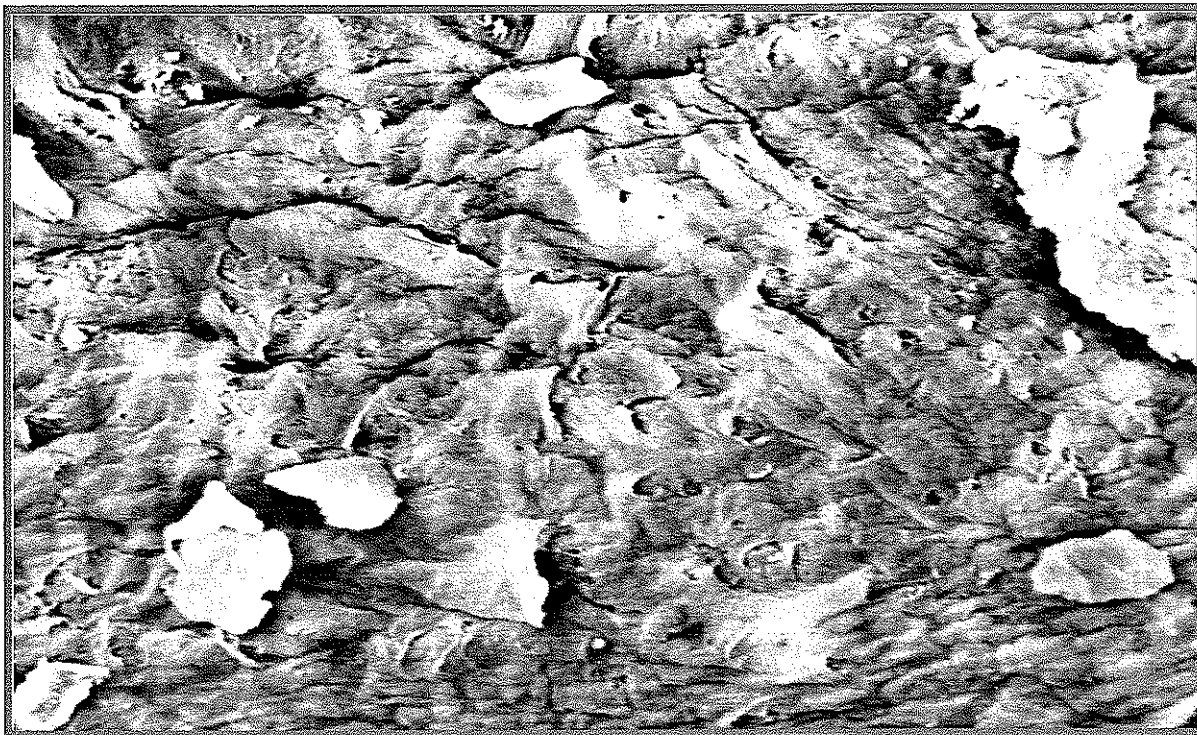
3. stádium změn – rozvláknění endotelu (Custodiol®)

Obr. č. 18 VSM. Viditelné proužkovité rozvláknění endotelu, místy jsou již endotelie odloučeny od bazální membrány (zvětšení 710 x).



4. stádium změn – (Custodiol®)

Obr. č. 19 arteria femoralis. Ojedinéle endotelové buňky, zbytky bazální membrány, obnažená lamina elastica interna (zvětšení 1500 x).



4. stádium změn – (Custodiol®)

Obr. č. 20 VSM. Kompletně odloučený endotel, poškozená bazální membrána se stopami původních kontaktů (zvětšení 870 x).

VI. KLINICKÁ APLIKACE

Od října 2001 do července 2006 byl čerstvý cévní aloštěp implantován v 28 případech. Z chirurgického hlediska lze pacienty rozdělit do dvou skupin. V první skupině se jednalo o transplantaci cévního štěpu ve vysokoprůtokové aortoiliacké oblasti a do druhé skupiny byli zařazeni pacienti nízkoprůtokovou periferní rekonstrukcí. U první skupiny byl ve všech případech implantován čerstvý arteriální alograft, ve druhé skupině se pak jednalo o arteriální nebo žilní štěp.

Odběr cévních štěpů byl uskutečněn v rámci multiorgánových odběrů za spolupráce s KST. Transport cév určených k transplantaci probíhal za hypotermních podmínek při použití „triple bag“ techniky (TBT). TBT představuje uložení cévního štěpu do sáčku s ledovým konzervačním roztokem (+2 až +4 °C) a antibiotiky. Alograft musí být v celém rozsahu roztokem překryt. Tento sáček je následně pevně uzavřen a vložen do další nádoby (sáčku), která je také naplněna konzervačním roztokem o teplotě +2 až +4°C. Takto dvakrát zajištěný cévní štěp se vloží do sterilního boxu z umělé hmoty (nebo dalšího sáčku) a uzavře se. Takto připravený štěp je umístěn do pečlivě označeného transportního kontejneru s datem, hodinou odběru a krevní skupinou (Obr. č. 21). Kontejner obsahující ledovou tříšť je urychleně dopraven do kalibrovaného chladicího zařízení, které udržuje stálou teplotu +4 °C a zde je alograft uložen do doby jeho transplantace. Přílohu cévního štěpu tvoří informace o dárci s kopií jeho laboratorních výsledků. Jako konzervační roztok byl volen E 199 nebo Custodiol®. Po dohodě s mikrobiologickým střediskem jsme volili kombinaci antibiotik piperacilin, amikacin, fluconazol a cefuroxim nebo gentamycin a amfotericin B. Takto uložené cévní štěpy byly následně co nejrychleji transplantovány (Obr. č. 22).

Skladování čerstvých cévních alograftů bylo modifikováno podle vlastních experimentálních výsledků. Cévní štěpy byly uchovávány v hypotermních podmínkách +4 °C v konzervačním roztoku E-199 nebo Custodiol®. Vzhledem k tomu, že iniciální dystrofie endotelu byla v experimentální práci zaznamenána v hypotermním prostředí 5.-6. den u tepen a 4.-5. den u žil, stanovili jsme dobu uchovávání cévních štěpů v konzervačním roztoku při +4 °C maximálně 72 hodin do doby transplantace. U všech našich pacientů indikujeme imunosupresivní léčbu cyklosporinem v dávce 2x25-50 mg. Při tomto dávkování se plazmatická hladina cyklosporinu pohybovala v rozmezí 0-66 ng/ml. Zdá se, že tato poměrně nízká dávka imunosupresivní terapie, která nedosahuje kurativní plazmatické koncentrace cyklosporinu v běžné transplantační chirurgii (100-500 ng/ml), je dostatečná pro použití

cévních alograftů. Výhodou této snížené dávky je redukce nefrotoxicity cyklosporinu i nutnost pravidelného sledování jeho plazmatické hladiny.

Aortoiliacké rekonstrukce

V této vysokopřítokové oblasti byl arteriální alograft transplantován u 16 pacientů. V patnácti případech se jednalo o infekci cévní protézy (10x aortobifemorální, 3x aortofemorální a 2x iliakofemorální rekonstrukce). Jednou byla důvodem pro použití cévního štěpu primární infekce v oblasti bifurkace aorty, která si vynutila transplantaci bifurkačního štěpu (Obr. č. 23). Hlavní strategií léčby bylo odstranění infikovaného materiálu, důkladný débridement, zajištění náhradní revaskularizace arteriálním alograftem a ve většině případů byla připojena omentoplastika.

Periferní rekonstrukce

V periferní nízkopřítokové oblasti byl cévní alograft použit 12x a ve všech případech chyběl použitelný autologní žilní štěp (1x femoropopliteální proximální, 3x femoropopliteální distální, 4x femoropopliteální přední a 4x femoropopliteální zadní bypass). Ve třech případech se jednalo o infekci cévní protézy, 8x hrozila amputace končetiny v důsledku ischemie při významném postižení bércevého řečiště a jednou byl aloštěp použit při léčbě nepravé výdutě stehenní tepny infikované meticilin-rezistentním zlatým stafylokokem (MRSA) po předcházejícím angiografickém vyšetření (Obr. č. 24). V případě infekce cévní protézy a infikované falešné výdutě předcházelo revaskularizaci alograftem důkladné odstranění infikovaného materiálu.

1 Výsledky – klinická aplikace

Aortoiliacké rekonstrukce

V tomto souboru byla nulová perioperační mortalita. Z časných komplikací bylo zaznamenáno 1x poranění ureteru, které bylo ošetřeno primární suturou, 1x distální embolizace a 1x uzávěr raménka bifurkačního alograftu si vynutily promptní embolektomií a trombektomií. Z pozdních komplikací se vyskytla dvakrát stenóza štěpu po třech a 6 měsících od operace, které byly ošetřeny PTA s implantací stentu (Obr. č. 25, 26). V další době pak proběhl asymptotický uzávěr raménka bifurkačního alograftu 28 měsíců po PTA. V jednom případě si uzávěr alograftu vynutil amputaci končetiny ve stehně. Dvakrát byla zaznamenána pozdní mortalita bez souvislosti s transplantací cévního štěpu.

Periferní rekonstrukce

V případě periferních rekonstrukcí došlo 6x k uzávěru rekonstrukce, ve dvou případech byl štěp úspěšně trombektomován, v ostatních případech nebyla trombektomie dlouhodobě úspěšná. U jednoho pacienta byla provedena nová rekonstrukce PTFE cévní protézou a dvakrát se přechodná kritická končetinová ischemie v důsledku uzávěru zvládla aplikací alprostadilu. Příčinou těchto uzávěrů byla třikrát aneuryzmatická degenerace štěpu 1, 2 a 7 měsíců po jeho implantaci (Obr. č. 27). V jednom případě, u nepravé výdutě stehenní tepny v třísele, infikované MRSA po předcházející katetrizaci, byl alograft použit k femoropopliteální distální rekonstrukci. V pooperačním období došlo k opakovanému krvácení z arodované centrální anastomózy, které bylo úspěšně chirurgicky vyřešeno. Po zvládnutí těchto komplikací i MRSA infekce se objevilo v dalším pooperačním období masivní krvácení do zažívacího traktu ze stresového žaludečního vředu s hemoragickým šokem. Po endoskopické a razantní konzervativní léčbě hemostyptiky se rekonstrukce uzavřela. Po stabilizaci zprvu kritického stavu pacienta bylo ve druhé etapě přistoupeno v důsledku těžké končetinové ischemie k amputaci ve stehně.

V naší klinické praxi jsme zaznamenali ojedinělou kožní reakci příjemce na transplantovaný arteriální alograft v důsledku mylného vysazení imunosupresiva pacientem (Obr. č. 28). Po opětovném nasazení cyklosporinu v dávce 2x25 mg došlo ve velmi krátké době k vymizení lokální kožní reakce a tepenný štěp zůstává i nadále průchodný, tj. dva roky od této příhody. Pravidelná vyšetření ultrazvukem neprokazují žádné degenerativní změny tohoto štěpu.

Několikrát se nám podařilo odebrat biopsii vhojeného alograftu jeden a několik měsíců po jeho implantaci. Vzorek byl vyšetřen elektronmikroskopicky a shledali jsme hladkou plochu endotelu s neporušenými intercelulárními kontakty (Obr. č. 29).

2 Diskuze – klinická aplikace

V uvedené klinické sestavě jsme postupovali podle vlastních experimentálních výsledků, které jsou v rozporu s některými zahraničními pracemi, které uvádějí časový limit pro použití čerstvých arteriálních štěpů až 30 dní (169).

Stanovili jsme si základní pravidla pro transplantaci cévních štěpů, ve kterých jsme přijali na základě literárních údajů uváděné indikace, kam patří infekce cévních protéz, mykotická aneuryzmata, aortitidy, periferní rekonstrukce u hrozících amputací v případě nevhodné VSM a nemožnosti použití cévní protézy, dále použití cévních alograftů v obecné transplantační chirurgii, v dialyzačním programu a ojediněle i například z důvodu maligní infiltrace aorty

nebo dolní duté žíly. V našem klinickém souboru se nám podařilo použít cévní alograft jen při léčbě infekce cévní protézy, dále primární infekci nativní tepny a při hrozící amputaci dolní končetiny u významném postižení bércevého řečiště (Obr. č. 30).

Jak už bylo zmíněno, lze čerstvé tepenné alografty použít v urgentních případech k záchraně končetiny při absenci autologní VSM. Krátkodobé výsledky (do 2 let) jsou v těchto případech povzbudivé i při striktním nedodržení ABO kompatibility. Primární průchodnost je zde uváděna 76 %, sekundární 64 % a dvouletá záchrana končetiny pak kolem 82 %. Tyto výsledky jsou výrazně lepší než u PTFE protéz. U takto použitých cévních štěpů při skladování 2-25 dní a 4 °C se podle některých literárních údajů nevyskytlo jejich poškození ani rejekce (199).

Uvádí se, že chronická rejekce arteriálních alograftů, ale i xenograftů vede k dilataci a následné ruptuře, což bývá uváděno jako hlavní příčina špatných dlouhodobých výsledků při použití alograftů v cévní chirurgii. Buňky stěny tepen vyvolávají antigenní reakci. Odstranění těchto buněk pomocí dodecyl sulfátu sodného ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$) neovlivňuje aneuryzmatickou dilataci u xenograftů, ale působí preventivně na dilataci alograftů, redukuje zánětlivou infiltraci v adventicii a ochraňuje elastin v médiu (200).

Pro použití čerstvého nebo kryoprezervovaného štěpu hraje kromě jiného i otázka imunologická, i když byla zaznamenána imunogenní aktivita i u kryoprezervovaných cévních alograftů. Přetrvávání imunogenní aktivity u kryoprezervovaných VSM může vést spolu s porušením endotelové vrstvy k selhání tohoto štěpu. V literatuře byla k odstranění buněk vyvolávající antigenní odpověď použita lyofilizace. Lyofilizované VSM jsou bez buněčných elementů a představují kolagenní neimunogenní kondukt. V experimentálních pracích byla demonstrována průchodnost a strukturální integrita těchto štěpů. Navzdory akceptovatelným výsledkům v experimentu ukazují klinické studie velmi špatné výsledky. Ve většině případů došlo k časnému uzávěru těchto štěpů bez předcházejících známek nepravidelností či poškození graftu. Objevily se fibrózní změny, těžká intimální hyperplazie a trombózy, které mohou naznačovat přetrvávající imunogenitu těchto štěpů u lidské populace a ani antikoagulační léčba nezlepšila jejich průchodnost. Buněčná ochrana bude zřejmě hrát významnou roli pro průchodnost a strukturální integritu těchto štěpů a absence životaschopných endoteliálních a hladkých svalových buněk může dále přispět k selhání štěpů. Lyofilizované žilní alografty tedy nejsou vhodnou alternativou ani pro pacienty s kritickou končetinovou ischemií (201).

Lepší výsledky byly popisovány při použití denaturovaných VSM. Vystripované VSM bez známek varikózního postižení byly denaturovány 6 týdnů při teplotě +4 °C a dále umístěny

do izotonického roztoku s ATB. Podle autorů mohou být takto upravené štěpy použity v přísně určených indikacích i při nedodržení kompatibility ABO, HLA a bez imunosupresivní léčby (202).

Na druhé straně ale mohou být kryoprezervované žilní štěpy použity urgentně v případě nepřítomnosti autologního materiálu a hrozící ztrátě končetiny. Krátkodobé výsledky (do 3 let) jsou velmi dobré, i když v dlouhodobém sledování zůstávají špatné s průchodností kolem 24 % (203).

V případě pokusu o záchranu končetiny lze průchodnost kryoprezervovaných žilních štěpů zlepšit použitím kombinace nízké dávky aspirinu (81 mg/den), dypiridamolu (2x75 mg/den) a warfarinu (INR 2-2,5) při zachování kompatibility krevních skupin a Rh faktoru i při vyloučení imunosupresivní léčby. Autoři udávají dvouletou primární průchodnost 82 % a dvouletou záchranu končetiny 80 % ve srovnání s autologní VSM (204).

Přípustné je i použití arteriálních alograftů v podkolenní lokalizaci pro záchranu dolní končetiny. Při srovnání PTFE protéz a arteriálních alograftů je časná průchodnost příznivější u alograftů a důvod selhání jak alograftů, tak PTFE protéz bývá v důsledku neointimální hyperplazie. Dlouhodobé výsledky jsou pak obdobné. Samozřejmě že autologní VSM přináší jasně nejlepší výsledky. ABO kompatibility podle autorů pravděpodobně nehraje významnou roli v udržení průchodnosti těchto rekonstrukcí a omezení degradace štěpu. Mikroskopické vyšetření těchto štěpů ukazuje lymfocytární infiltraci média i adventicie a dále je častá nepřítomnost endotelu a fibrózní změny média (205).

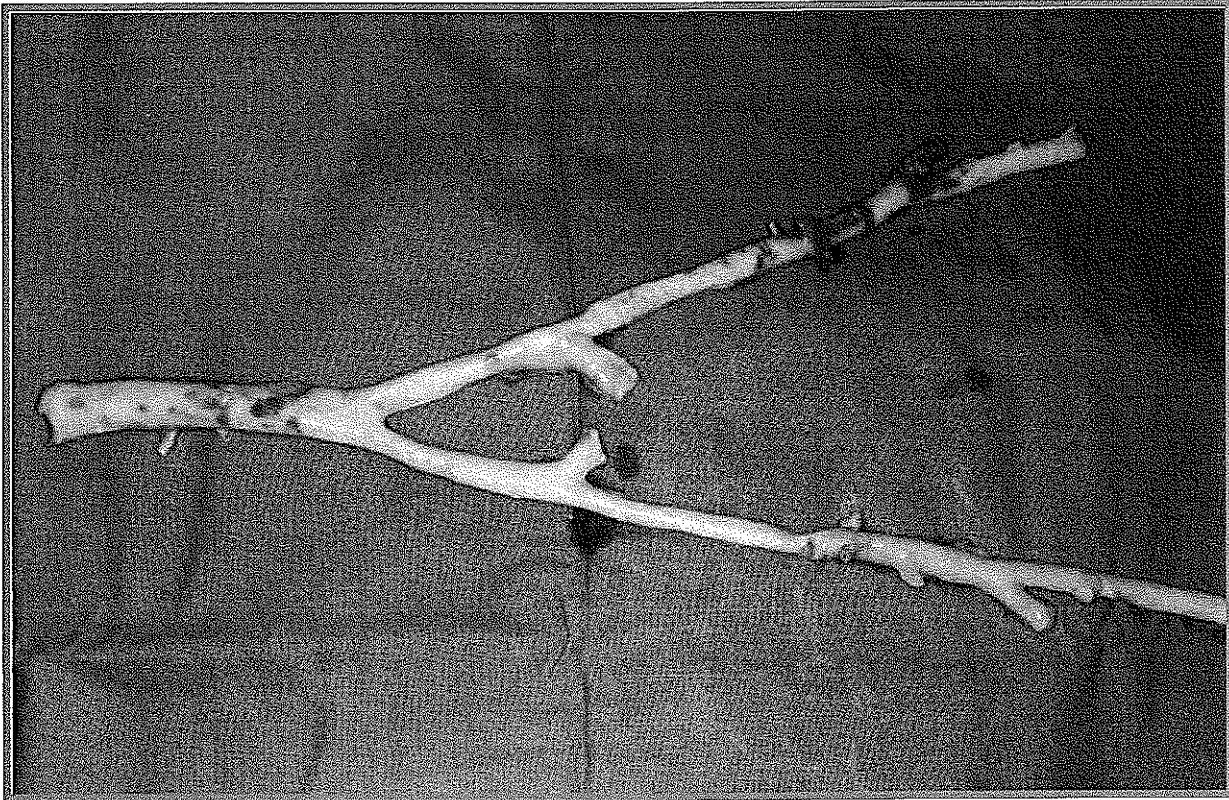
Kryoprezervované arteriální alografty mohou být slibnou alternativou i pro bércevé rekonstrukce v případě nepřítomnosti vhodné VSM na obou končetinách, zvláště u pacientů s limitovanou životní prognózou. Navzdory dobrým časným výsledkům u těchto rekonstrukcí, zůstává mnoho aspektů, které musí být objasněny v dalších klinických experimentech (206). I když literární údaje udávají snížení imunitní odpovědi a ovlivnění pozdní degenerace štěpů při použití cyklosporinu, je vhodné použití této imunosupresivní léčby zvážit. Zvláště u starých pacientů s krátkodobou životní prognózou. Podkožní uložení alograftu může usnadnit včasné odhalení aneurysmatické degenerace a včasný zákrok zabránit ruptuře štěpu (207).

Obecně lze říci, že použití cévních alograftů bez imunosuprese je možné při těžkých ischemiích (hrozící amputaci), traumatech, cévních náhradách při odstranění rozsáhlých tumorů nebo při infekci. Alografty se nedoporučují používat při primárních klaudikacích a všude tam, kde je možnost použití cévní protézy (208).

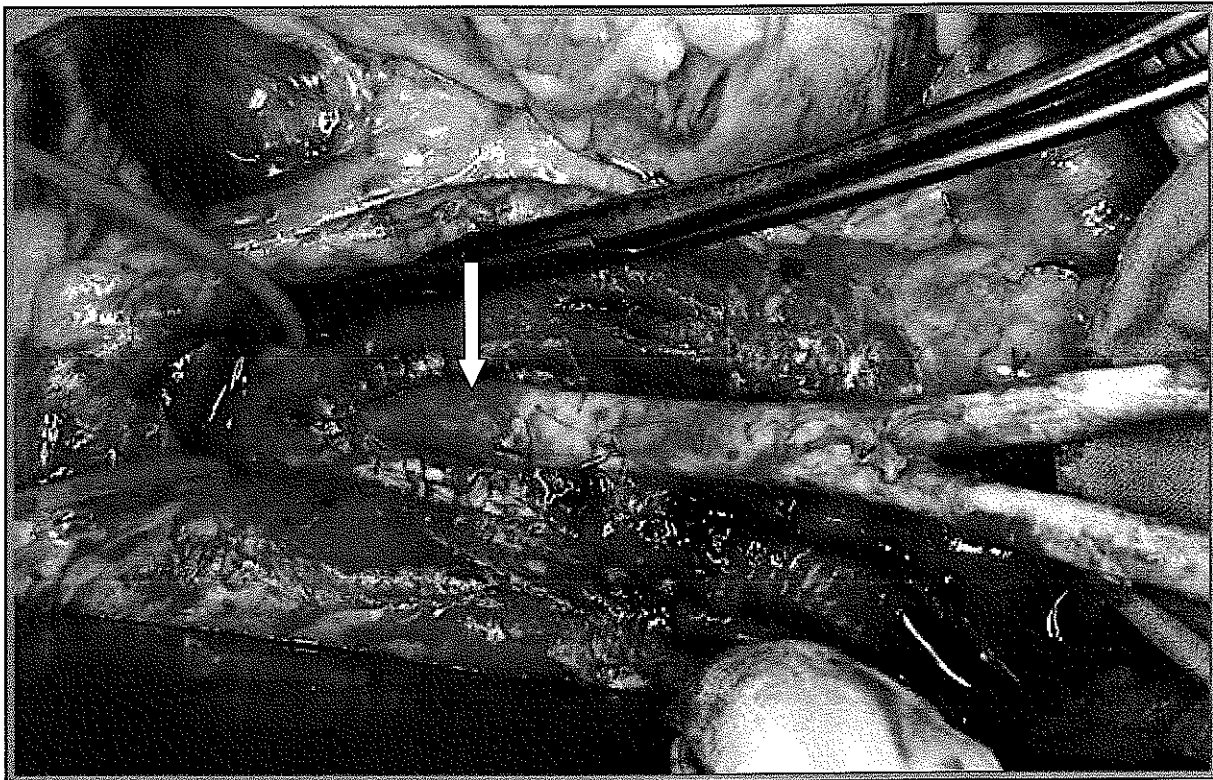
Řada experimentálních studií dokazuje účinnost cyklosporinu při použití žilních i tepenných alograftů. Proces denudace a regenerace endotelu arteriálních alograftů je spjat s absencí nebo přítomností imunosupresivní léčby (209). Imunosuprese u pacientů po transplantaci je velkou výhodou pro použití arteriálních alograftů (210).

Další oblastí, která se pravděpodobně nabízí pro potenciální využití cévních alograftů, je kardiokirurgie. I když jsou v posledních letech stále častěji zdůrazňovány výhody arteriálních štěpů při revaskularizaci myokardu, zůstává zejména u starších nemocných nebo nemocných s kratší životní prognózou základním materiálem pro koronární bypass žilní štěp. Nejčastěji používaná VSM však není vždy dostupná v odpovídající kvalitě nebo délce. Určitou další možností je použití tepen pro chirurgickou revaskularizaci, zejména arteria radialis nebo arteria thoracica interna. Při absenci autologního materiálu by se mohly cévní alografty stát další alternativou, ale dosavadní experimentální práce zatím nepřinesly očekávaný výsledek. Kryoprezervované VSM použité pro koronární chirurgii mají sníženou kontraktilní schopnost a vedou k vysokému počtu časných uzávěrů (211). Průchodnost kryoprezervovaných žilních alograftů (VSM) je významně horší než autologní VSM a arteria mammaia. Z tohoto důvodu lze tedy zatím uvažovat jen o zcela výjimečném použití kryoprezervované VSM v koronární chirurgii při nedostupnosti autologního materiálu (212). Určitou nadějí by se snad v kardiokirurgii mohly stát autologní endotelizace kryoprezervovaných deendotelizovaných žilních štěpů jako další možnost použití alograftů o malém průměru při nedostupnosti autologní žíly (213).

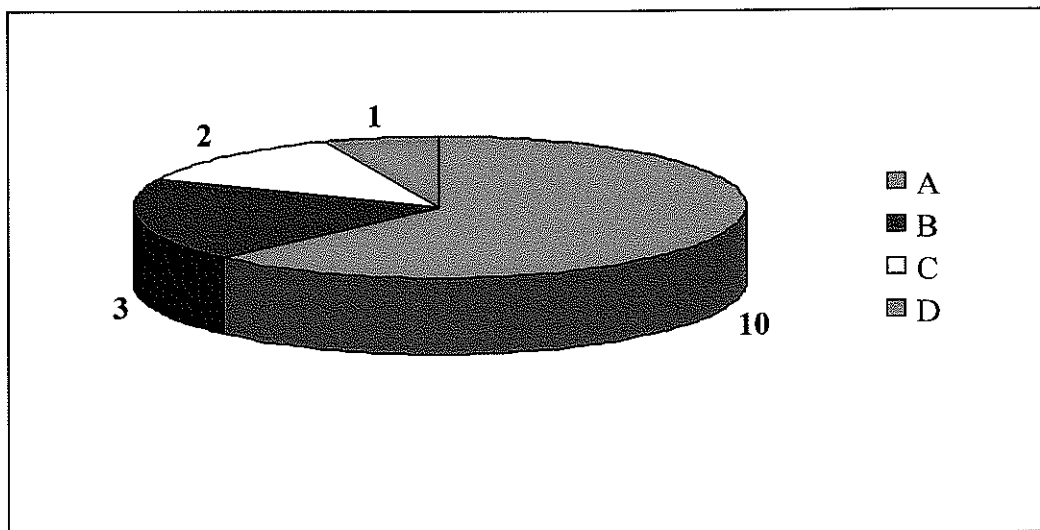
Správný směr léčby některých cévních postižení či řešení komplikací v cévní chirurgii pomocí cévních alograftů naznačuje i úspěšné použití aortálního alograftu při řešení koarktace aorty, který ukazoval známky dilatace až po 30 letech od implantace (214).



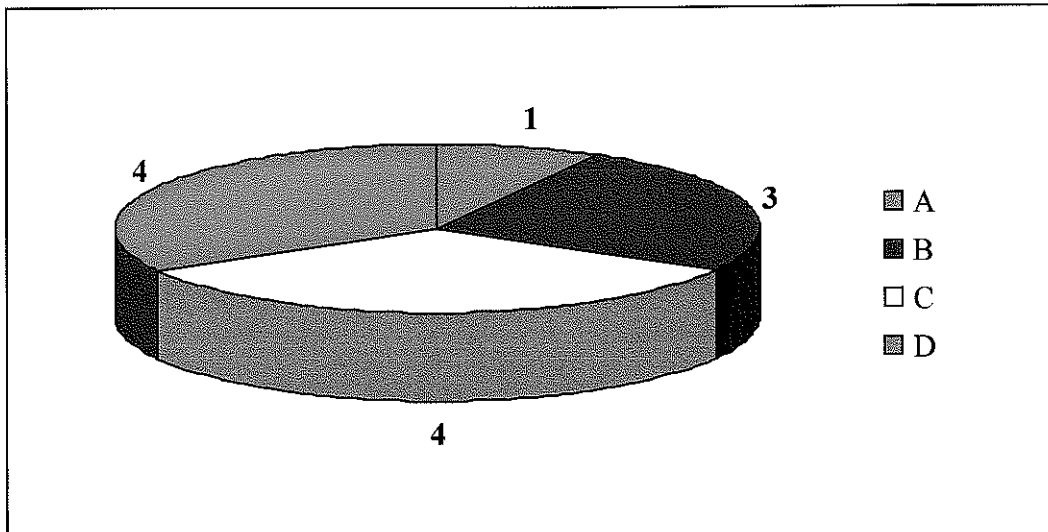
Obr. č. 21 Bifurkační tepenný alograft připravený k transplantaci.



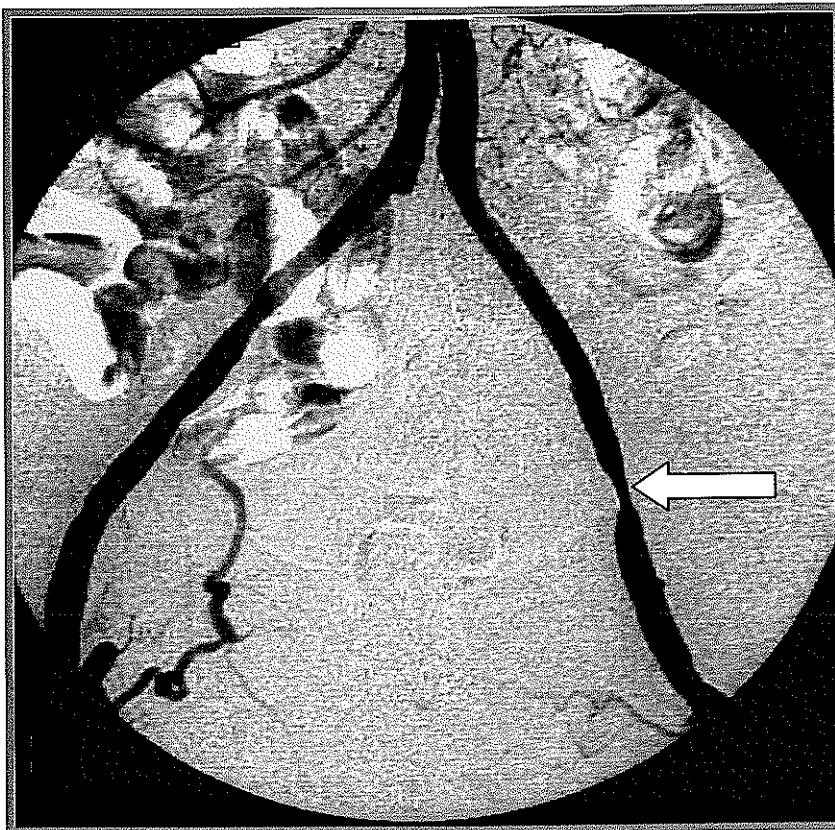
Obr. č. 22 Centrální anastomóza bifurkačního alograftu.



Obr. č. 23 Cévní alografty v aortoiliackém řečišti
 (A. aortobifemorální, B. aortofemorální, C. iliakofemorální, D. bifurkace aorty)



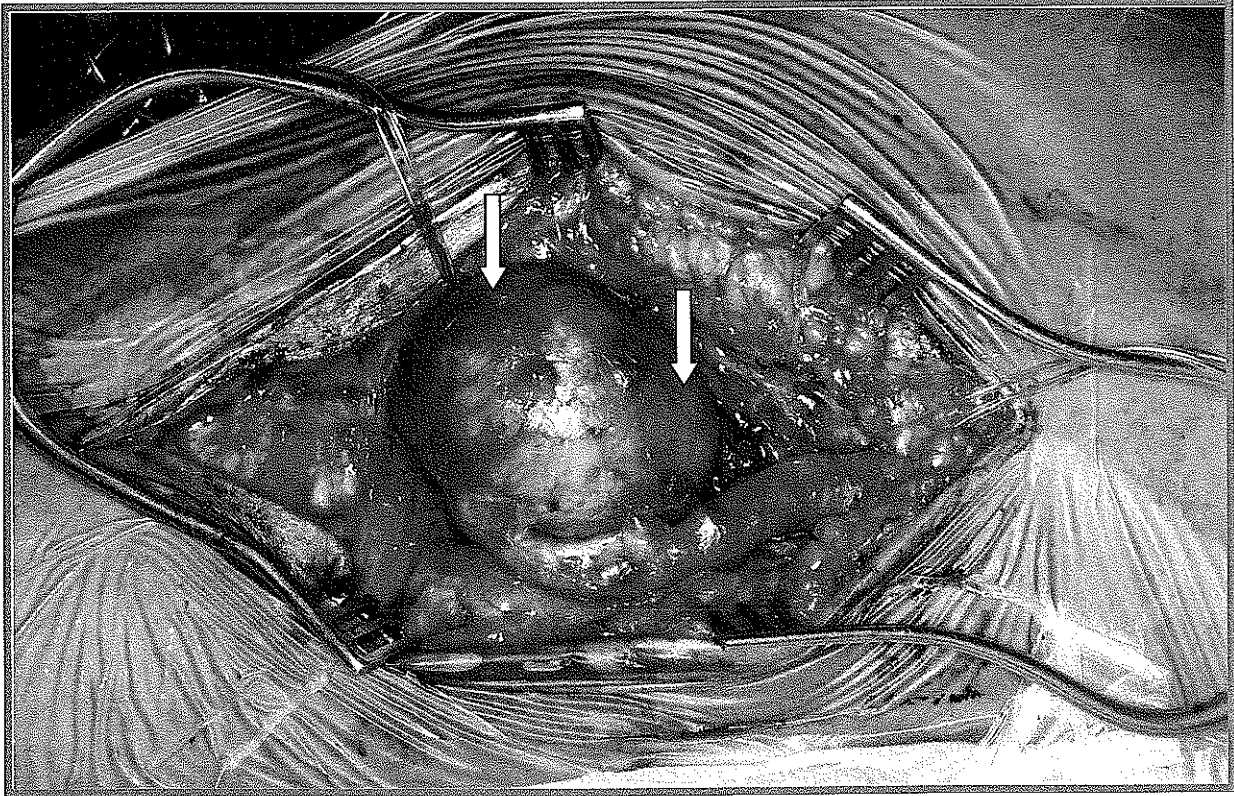
Obr. č. 24. Cévní alografty v periferním řečišti
 (A. femoropopliteální proximální, B. femoropopliteální distální, C. femorotibiální přední, D. femorotibiální zadní)



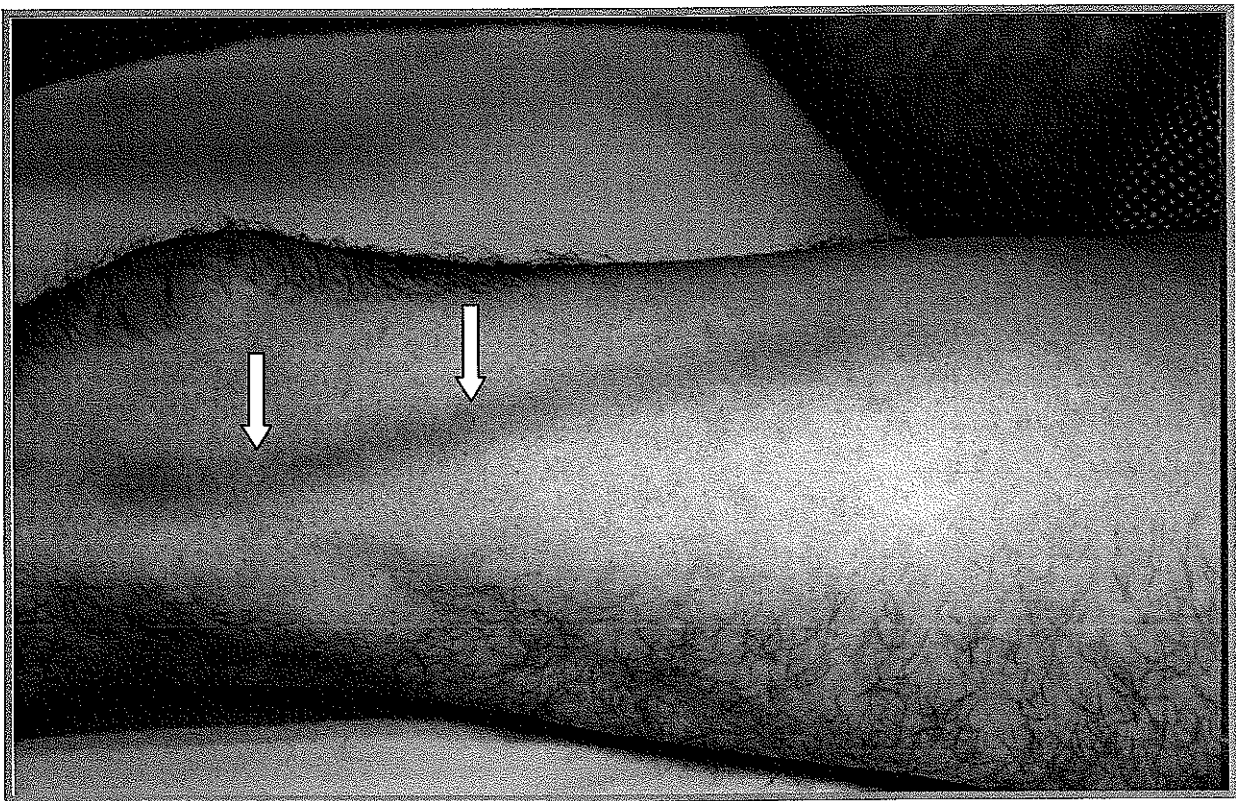
Obr. č. 25 Stenóza levého raménka tepenného bifurkačního alograftu



Obr. č. 26 Stav po úspěšné PTA



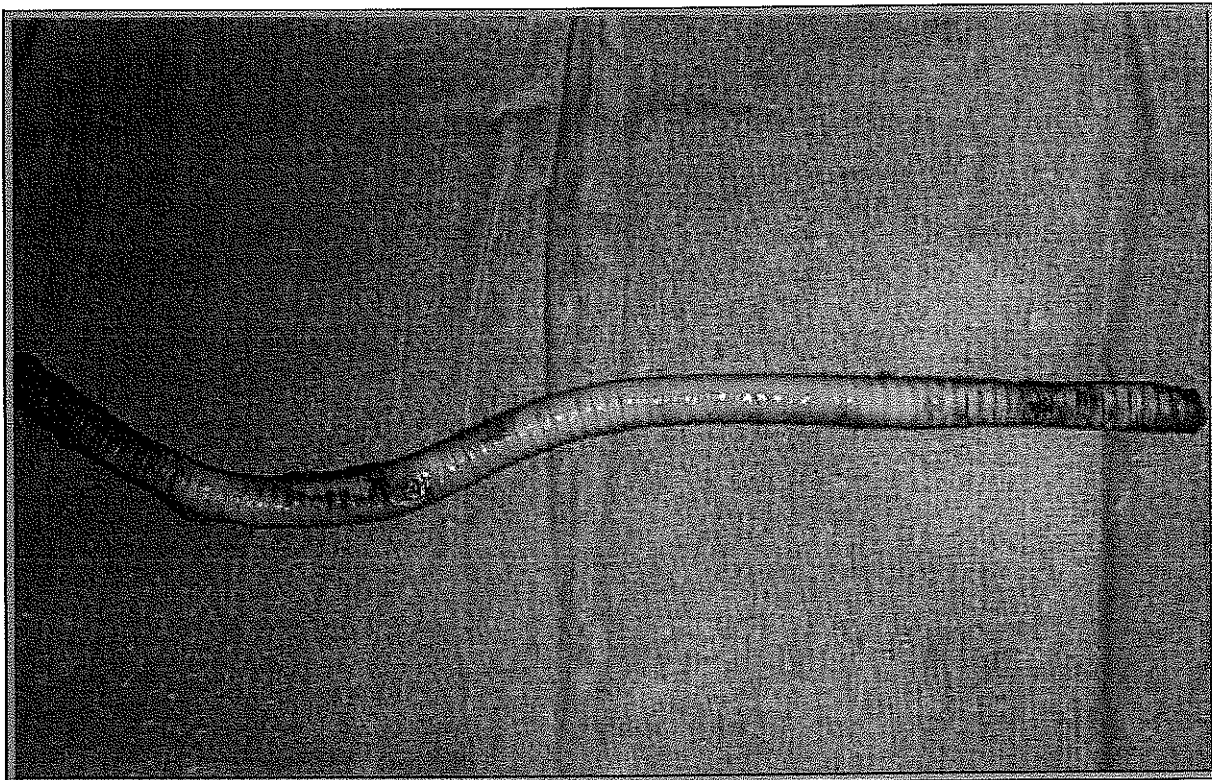
Obr. č. 27 Aneurymatická dilatace cévního alograftu.



Obr. č. 28 Kožní reakce po vysazení imunosupresivní léčby.



Obr. č. 29 Kontrolní biopsie transplantovaného tepenného alograftu ukazuje neporušený zvlněný endotel a četné erythrocyty (zvětšení 1500x).



Obr. č. 30 Infikovaná explantovaná cévní protéza

VII. ZÁVĚR

Závěrem lze konstatovat, že cíle stanovené v této disertační práci byly splněny.

1. V první fázi projektu byl vytvořen optimální protokol pro zpracování a uchování čerstvých cévních transplantátů s ohledem na délku studené ischemie. Vzhledem k tomu, že endotel představuje velice citlivou část cévní stěny, byl prostudován právě stav cévního endotelu v REM a provedena kontrola cévní stěny tepen a žil ve světelném mikroskopu. Z obou částí experimentu při srovnání uváděných teplotních režimů je jednoznačné, že normotermie výrazně urychluje nástup iniciálních dystrofických změn endotelu tepen i žil. Podle závěrečných výsledků experimentální práce je zřejmé, že tepenné i žilní alografty jsou odolnější při uložení v konzervačním roztoku E-199 a Custodiol[®] za hypotermních podmínek +4 °C. Naše práce nebyla zaměřena na zkoumání různých typů konzervačních médií, použili jsme jen dva základní typy. I v tomto případě se však zdá, že konzervační roztok nehraje zásadní roli pro uchovávání čerstvých cévních aloštěpů, ale rozhodující je délka studené ischemie. V obou experimentech bylo též patrné, že tepenné alografty jsou odolnější než alografty žilní a hypotermie tento nástup dystrofických změn oddaluje. Iniciální dystrofické změny byly patrné v hypotermním režimu u žil 4.-5. den a u tepen 5.-6. den. Na základě těchto experimentálních závěrů byla stanovena doba konzervace štěpů před jejich transplantací maximálně 72 hodin. Odběr cévních alograftů podléhal režimu multiorgánových odběrů a cévní štěpy byly okamžitě zchlazeny ponořením do studeného konzervačního média. Za hypotermních podmínek pak byly štěpy transportovány do kalibrovaného chladicího zařízení, kde byly při +4 °C uchovány do doby transplantace.

2. V druhé fázi bylo provedeno ověření experimentálních výsledků v klinické praxi a stanovena indikační kritéria pro použití těchto štěpů v cévní chirurgii. Podle stanovených kritérií byly odebrány a následně transplantovány cévní štěpy v určených indikacích a sledována jejich funkčnost v pravidelných kontrolách. V několika případech se v důsledku reoperace podařilo odebrat několik kontrolních vzorků z transplantovaných alograftů, které byly dále vyšetřeny elektronmikroskopicky. U všech těchto vzorků byla shledána hladká plocha endotelu s neporušenými intercelulárními kontakty.

3. Ve třetí fázi byly zhodnoceny klinické závěry v závislosti na klinickém experimentu. Je třeba zdůraznit, že výsledky uváděné klinické sestavy 28 pacientů jsou velice povzbudivé. Nebyla zaznamenána mortalita v souvislosti s transplantací cévního štěpu a amputace končetiny byla nutná jen ve dvou případech.

Při použití cévních štěpů v aortoiliackém řečišti byla dvakrát řešena stenóza štěpu pomocí PTA a ve dvou případech byl zaznamenán uzávěr alograftu, který byl v jednom případě asymptomatický (po předcházející PTA) a jednou si vynutil amputaci končetiny.

U periferních rekonstrukcí byl zaznamenán 6x uzávěr rekonstrukce, který byl dvakrát úspěšně trombektomován a ve čtyřech případech zůstala rekonstrukce trvale uzavřena, ale jen v jednom případě bylo nutno amputovat končetinu. U třech periferních rekonstrukcí došlo k uzávěru v důsledku aneurymatické degenerace štěpu.

Jedenkrát jsme měli možnost pozorovat kožní imunologickou reakci při vysazení cyklosporinu, která byla úspěšně zvládnuta opětovným nasazením imunosupresiva.

Nárůst počtu i spektra cévních operací přináší komplikace, kterými se musejí cévní chirurgové také zabývat a řešit je. Zdá se, že cévní alografty mohou být v přísně stanovených indikacích vhodnou alternativou léčby, hlavně při řešení infekce cévních protéz nebo u pacientů s hrozcí amputací, kteří nemají vhodný autologní materiál i přes známá negativa používání cévních transplantátů. Ovlivnění těchto negativ a další rozvoj konzervačních roztoků by mohl v budoucnu přispět k dalšímu nárůstu uplatnění cévních alograftů.

Nízké dávky moderních imunosupresivních léků (Cyklosporin A nebo FK506) mohou významně snížit komplikace alograftů ve smyslu lokální imunologické reakce, aneurymatické dilatace nebo ruptury jejich stěny. Krevní kompatibilita nebývá obecně striktně respektována, ale dilatace, ruptury nebo trombózy štěpu se vyskytují častěji právě při jejím nedodržení.

VIII. PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěl obzvláště poděkovat své školitelce přednostce Anatomického ústavu Lékařské fakulty UK v Hradci Králové doc. MUDr. Dáše Slížové, CSc. za cenné připomínky, náměty i korekturu této práce. Můj dík patří také i MUDr. Otakaru Krsovi, CSc. z téhož pracoviště za velice kvalitní fotografickou dokumentaci a dále i primáři oddělení cévní chirurgie doc. MUDr. Pavlu Šebestovi, CSc. a vedení Nemocnice Na Homolce za podporu při vzniku této disertační práce.

Závěrem bych chtěl poděkovat všem spolupracovníkům, kteří se podíleli na transplantaci cévních štěpů u našich pacientů a následné pooperační péči. V neposlední řadě patří moje poděkování Aleně Veselé z gymnázia v Třeboni za jazykovou korekturu.

IX. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Wilson S E. New alternatives in management of the infected vascular prosthesis. *Surg Infect.* 2001, 2, 171-175.
2. Young R M, Cherry K J Jr, Davis P M, Gloviczki P, Bower T C, Panneton J M, Hallett J W Jr. The results of in situ prosthetic replacement for infected aortic grafts. *Am J Surg.* 1999, 178, 136-140.
3. Mingoli A, Sapienza P, di Marzo L, Sgarzini G, Burchi C, Modini C, Cavallaro A. Management of abdominal aortic prosthetic graft infection requiring emergent treatment. *Angiology.* 1997, 48, 491-495.
4. Williams I M, Milling M A, Shandall A A. Vascularised muscular flaps and arterial graft infection in the groin. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2003, 25, 390-395.
5. Martin D, Katz S G. Axillofemoral bypass for aortoiliac occlusive disease. *Am J Surg.* 2000, 180, 100-103.
6. Rutherford R B. Options in the surgical management of aorto-iliac occlusive disease: A changing perspective. *Cardiovasc Surg.* 1999, 7, 5-12.
7. Dorweiler B, Neufang A, Schmiedt W, Oelert H. Autogenous reconstruction of infected arterial prosthetic grafts utilizing the superficial femoral vein. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2001, 49, 107-111.
8. Cardozo M A, Frankini A D, Bonamigo T P. Use of superficial femoral vein in the treatment of infected aortoiliofemoral prosthetic grafts. *Cardiovasc Surg.* 2002, 10, 304-310.
9. Hardman S, Cope A, Swann A, Bell P R, Naylor A R, Hayes P D. An in vitro model to compare the antimicrobial activity of silver coated versus rifampicin-soaked vascular grafts. *Ann Vasc Surg.* 2004, 18, 308-313.
10. Hernandez-Richter T, Schardey H M, Wittmann F, Mayr S, Schmitt-Sody M, Blasenbren S, Heiss M M, Gabka C, Angele M K. Rifampin and Triclosan but not silver is effective in preventing bacterial infection of vascular dacron graft material. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2003, 26, 550-557.
11. Gross R E, Hurwitt E S, Bill A H Jr, Peirce E C. Preliminary observations on the use of human arterial grafts in the treatment of certain cardiovascular defects. *N Engl J Med.* 1948, 239, 578-579.

12. Dubost C, Allary M, Oeconomos N. Resection of an aneurysm of the abdominal aorta: Reestablishment of the continuity by a preserved human arterial graft, with result after five months. *AMA Arch Surg.* 1952, 64, 405-408.
13. De Bakey M E, Cooley D A. Successful resection of aneurysm of thoracic aorta and replacement by graft. *J Am Med Assoc.* 1953, 20, 673-676.
14. Creech O Jr, De Bakey M E, Cooley D A, Self M M. Preparation and use of freeze-dried arterial homografts. *Ann Surg.* 1954, 140, 35-43.
15. De Bakey M E, Crawford E S, Cooley D A, Morris G C Jr. Successful resection of fusiform aneurysm of aortic arch with replacement by homograft. *Surg Gynecol Obstet.* 1957, 105, 657-664.
16. De Bakey M E, Stanley E, Crawford E S. Vascular prostheses. *Transplant Bull.* 1957, 4, 2-4.
17. De Bakey M E, Cooley D A, Crawford E S, Morris G C Jr. Clinical application of a new flexible knitted dacron arterial substitute. *AMA Arch Surg.* 1958, 77, 713-724.
18. Crawford E S, De Bakey M E, Cooley D A. Clinical use of synthetic arterial substitutes in three hundred seventeen patients. *AMA Arch Surg.* 1958, 76, 261-270.
19. Barner H B, DeWeese J A. Aneurysmal degeneration of arterial homografts. *Am Heart J.* 1967, 73, 289-291.
20. Chopra P S, Bass J Jr, Dacumos G C, Dufek J H, Rawlings C A, Kahn D R. Long term comparison of fresh arterial allografts and autografts for coronary artery bypass in dogs. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 1977, 18, 519-522.
21. Liekweg W G Jr, Greenfield L J. Vascular prosthetic infections: Collected experience and results of treatment. *Surgery.* 1977, 81, 335-342.
22. Schellack J, Stewart M T, Smith R B 3rd, Perdue G D, Salam A. Infected aortobifemoral prosthesis: A dreaded complication. *Am Surg.* 1988, 54, 137-141.
23. Adamson A S. Prosthetic graft infection after aortofemoral grafting for peripheral limb ischaemia. *J R Coll Surg Edinb.* 1988, 33, 342.
24. Burkey S H, Vazquez M A, Valentine R J. De novo renal artery aneurysm presenting 6 years after transplantation: A complication of recurrent arterial stenosis? *J Vasc Surg.* 2000, 32, 388-391.
25. Katyal S, Oliver J H 3rd, Buck D G, Federle M P. Detection of vascular complications after liver transplantation: Early experience in multislice CT angiography with volume rendering. *AJR Am J Roentgenol.* 2000, 175, 1735-1739.

26. Cavallari A, Vivarelli M, Bellusci R, Jovine E, Mazziotti A, Rossi C. Treatment of vascular complications following liver transplantation: Multidisciplinary approach. *Hepatogastroenterology*. 2001, 48, 179-83.
27. Ando J, Nomura H, Kamiya A. The effect of fluid shear stress on the migration and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc Res*. 1987, 33, 62-70.
28. Fry D L. Certain histological and chemical responses of the vascular interface to acutely induced mechanical stress in the aorta of the dog. *Circ Res*. 1969, 24, 93-108.
29. Herman I M, Brant A M, Warty V S, Bonaccorso J, Klein E C, Kormos R L, Borovetz H S. Hemodynamics and the vascular endothelial cytoskeleton. *J Cell Biol*. 1987, 105, 291-302.
30. Fillinger M F, Cronenwett J L, Besso S, Walsh D B, Zwolak R M. Vein adaptation to the hemodynamic environment of infrainguinal grafts. *J Vasc Surg*. 1994, 19, 970-978.
31. Drews G, Spiegel H U. Leberkonservierung-Ruckblick und aktueller Stand. *Jahrbuch der Chirurgie*. 1999, 143-157.
32. Jamieson N V. An overview of abdominal organ preservation for transplantation. Organ preservation with HTK and UW solution, Pabst Science Publishers, Lengerich. 1999, 19-36.
33. Clavien P A, Harvey P R C, Strasberg S M. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. *Transplantation*. 1992, 53, 957-978.
34. Blankensteijn, J D, Terpstra O T. Liver Preservation: The Past and the Future. *Hepatology*. 1991, 13, 1235-1250.
35. Hotter G, Glosa D, Gelpi E, Prats N, Rosello-Catafau J. Role of xanthine oxidase and eicosanoids in development of pancreatic ischemia-reperfusion injury. *Inflammation*. 1995, 19, 469-478.
36. Welbourn C R, Goldman G, Paterson I S, Valeri C R, Shepro D, Hechtman H B. Pathophysiology of ischemia reperfusion injury: Central role of the neutrophil. *Br J Surg*. 1991, 78, 651-655.
37. Banda M A, Granger D N. Mechanism and protection from ischemic intestinal injury. *Transplant Proc*. 1996, 28, 2595-2597.
38. Belzer F O, Southard J H. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*. 1988, 45, 673-676.

39. Risby T H, Maley W, Scott R P, Bulkley G B, Kazui M, Sehnert S S, Schwarz K B, Potter J, Mezey E, Klein A S et al. Evidence for free radical-mediated lipid peroxidation at reperfusion of human orthotopic liver transplants. *Surgery*. 1994, 115, 94-101.
40. Maathuis M H, Leuvenink H G, Ploeg R J. Perspectives in organ preservation. *Transplantation*. 2007, 83, 1289-1298.
41. Gao W S, Takei Y, Marzi I, Lindert K A, Caldwell-Kenkel J C, Currin R T, Tanaka Y, Lemasters J J, Thurman R G. Carolina rinse solution - a new strategy to increase survival time after orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation*. 1991, 52, 417-424.
42. Mühlbacher F, Langer F, Mittermayer C. Preservation Solutions for Transplantation. *Transplant Proc*. 1999, 31, 2069-2070.
43. Southard J H. Advances in organ preservation. *Transpl Proc*. 1989, 21, 1195-1196.
44. Sankary H N, Foster P, Brown E, Hart M, Williams J W. A comparison of Collins and UW solutions for cold ischemic preservation of the rat liver. *J Surg Res*. 1991, 51, 87-91.
45. Adam R, Settaf A, Fabiani B, Bonhomme L, Astarcioglu I, Lahlou N K, Bismuth H. Comparative evaluation of Euro-Collins, UW solution, and UW solution without hydroxyethyl starch in orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplant Proc*. 1990, 22, 499-502.
46. Spiegel H U, Schleimer K, Kranz D, Oldhafer K J. Organ preservation with EC, HTK, and UW solutions in orthotopic liver transplantation in syngeneic rats. Part I: Functional parameters. *J Invest Surg*. 1998, 11, 49-56.
47. Spiegel H U, Schleimer K, Freise H, Diller R, Drews G, Kranz D. Organ preservation with EC, HTK, and UW solutions in orthotopic liver transplantation. Part II. Morphological study. *J Invest Surg*. 1999, 12, 195-203.
48. Liu T, Walsh T R, Nalesnik M, Makowka L. Improved preservation of the rat liver for orthotopic liver transplantation: Use of University of Wisconsin-lactobionate solution and retrograde flushing. *Surgery*. 1990, 108, 890-897.
49. Todo S, Nery J, Yanaga K, Podesta L, Gordon R D, Starzl T E. Extended preservation of human liver grafts with UW solution. *JAMA* 261, 1989, 711-714.

50. Adam R, Bismuth H, Diamond T, Ducot B, Morino M, Astarcioglu I, Johann M, Azoulay D, Chiche L, Bao Y M, Castaing D. Effect of extended cold ischemia with UW solution on graft function after liver transplantation. *Lancet* 340, 1992, 1373-1376.
51. Cofer J B, Klintmalm G B, Howard T K, Morris C V, Husberg B S, Goldstein R M, Gonwa T A. A comparison of UW with Eurocollins preservation solution in liver transplantation. *Transplantation*. 1990, 46, 1088-1093.
52. D'Alessandro A M, Kalayoglu M, Hoffmann R M, Pirsch J D, Lorentzen D F, Melzer J S, Belzer F O. Experience with Belzer UW cold storage solution in human liver transplantation. *Transplant Proc*. 1990, 22, 474-476.
53. Cofer J B, Klintmalm G B, Morris C V, Solomon H, Watemberg I A, Husberg B O, Jennings L W. A prospective randomized trial between Euro-Collins and University of Wisconsin solutions as the initial flush in hepatic allograft procurement. *Transplantation*. 1992, 53, 995-998.
54. Adam R, Astarcioglu I, Raccula J S, Ducot B, Reynes M, Bismuth H. Beneficial effects of Eurocollins as aortic flush for the procurement of human livers. *Transplantation*. 1996, 61, 705-709.
55. Abdennebi H B. High - Na⁺ low - K⁺ UW cold storage solution reduces reperfusion injuries of the rat liver graft. *Transpl Int*. 1998, 11, 223-230.
56. Cascales P, Fernandez-Cornejo V, Sanchez-Del Campo F, de Torre M, Sanchez-Eixeres M R, Soriano N, Gonzalez F. Evaluation of Celsior solution in experimental liver preservation using ex situ isolated rat liver perfusion. *Transplant Proc*. 1999, 31, 2437-2438.
57. Valero R, Almenara R, Garcia-Valdecasas J C, Beltran J, Net M, Capdevila L, Lopez Boado M A, Gonzalez F X, Taura P, Visa J, Manyalich M. Usefulness of Celsior in graft preservation of livers obtained from non heart beating donors in experimental (pigs) liver transplantation: Comparative study with University of Wisconsin solution. *Transplant Proc*. 1999, 31, 2433-2434.
58. Tolba R H, Akbar S, Müller A, Glatzel U, Minor T. Experimental liver preservation with Celsior: A novel alternative to University of Wisconsin and histidine-tryptophan-alpha-ketoglutarate solutions? *Eur Surg Res*. 2000, 32, 142-147.
59. Maggi U, Caccamo L, Gatti S, Paone G, Reggiani P, Rossi G, Latham L, Vannelli A, Melada E, Brambilla R, Damilano I, Trezza P, Fassati L R. Celsior solution and clinical liver transplantation. *Transplant Proc*. 2000, 32, 36-37.

60. Mühlbacher F, Langer F, Mittermayer C. Preservation solutions for transplantation. *Transplant Proc.* 1999, 31, 2069-2070.
61. Baldan N, Toffano M, Cadrobbi R, Codello L, Calabrese F, Bacelle L, Rigotti P. Kidney preservation in pigs using Celsior, a new organ preservation solution. *Transplant Proc.* 1997, 29, 3539-3540.
62. Barr M L, Nishanian G P, Sakamaki Y, Carey J N, Chang J, Starnes V A. A new organ preservation solution, Celsior, is superior to Euro-Collins and University of Wisconsin solutions in decreasing lung reperfusion injury. *Transplant Proc.* 1997, 29, 1357-1358.
63. Goffin Y A, Grandmougin D, Wozniak G, Keppenne V, Nevelsteen A, Vogt P, Van Damme H, Stankowiak C, Dapper F, De Geest R, Deuvaert F, Van Hoeck B. Banking and distribution of large cryopreserved arterial homografts in Brussels: Assessment of 4 yaers of activity by the European homograft bank with reference to implantation results in reconstruction of infected infrarenal arterial prostheses and mycotic aneurysm. *Vasc Surg.* 1998, 32, 19-32.
64. Adcock O T Jr, Adcock G L, Wheeler J R, Gregory R T, Snyder S O Jr, Gayle R G. Optimal techniques for harvesting and preparation of reversed autogenous vein grafts for use as arterial substitutes: A review. *Surgery.* 1984, 96, 886-894.
65. Lo Gerfo F W, Quist W C, Cantelmo N L, Haudenschild C C. Integrity of vein grafts as a function of initial intimal and medial preservation. *Circulation.* 1983, 68, 117-124.
66. Fabricius A M, Diegeler A, Gerber W, Mohr F W. Functional and morphologic assessment of saphenous veins harvested with minimally invasive techniques using a modified laryngoscope. *Heart Surg Forum.* 2000, 3, 32-35.
67. Lancey R A, Cuenoud H, Nunnari J J. Scanning electron microscopic analysis of endoscopic versus open vein harvesting techniques. *J Cardiovasc Surg.* 2001, 42, 297-301.
68. Milroy C M, Scott D J, Beard J D, Horrocks M, Bradfield J W. Histological appearances of the long saphenous vein. *J Pathol.* 1989, 159, 311-316.
69. Davies A H, Magee T R, Sheffield E, Baird R N, Horrocks M. The aetiology of vein graft stenoses. *Eur J Vasc Surg.* 1994, 8, 389-394.
70. Wilson Y G, Davies A H, Southgate K, Currie I C, Sheffield E, Baird R N, Lamont P M, Angelini G D. Vein quality influences neointimal hyperplasia in an organ culture model of human saphenous vein. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1997, 13, 557-562.
71. Varty K, Porter K, Bell P R, London N J. Vein morphology and bypass graft stenosis. *Br J Surg.* 1996, 83, 1375-1379.

72. Davies M G, Klyachkin M L, Dalen H, Massey M F, Svendsen E, Hagen P O. The integrity of experimental vein graft endothelium-implications on the etiology of early graft failure. *Eur J Vasc Surg.* 1993, 7, 156-165.
73. Jerius H, Bagwell D, Beall A, Brophy C. The impact of balloon embolectomy on the function and morphology of the endothelium. *J Surg Res.* 1997, 67, 9-13.
74. Lim Ch Y, Hong E K. Flow cytometric analysis of endothelial cell viability in arterial allograft. *Int J Angio.* 1998, 7, 6-9.
75. Christy J P, Lupinetti F M, Mardan A H, Thompson S A. Endothelial cell viability in the rat aortic wall. *Ann Thorac Surg.* 1991, 51, 204-207.
76. Andriambelason E, Bigaud M, Schraa E O, Kobel T, Lobstein V, Pally C, Zerwes H G. Endothelial dysfunction and denudation in rat aortic allografts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001, 21, 67-73.
77. Hickethier T, Dammrich J, Silber R E, Finster S, Elert O. Ultrastructural investigations for reducing endothelial cell damage of vein grafts during CABG-operation and practical consequences. *J Cardiovasc Surg.* 1999, 40, 71-76.
78. Konerding M A, Knocks M, Zerkowski H R. Impact of the incubation medium on the endothelium of autologous vein grafts: Damage scoring by scanning electron microscopy. *Scanning Microscopy.* 1996, 10, 841-849.
79. Cavallari N, Abebe W, Hunter W J 3rd, Agrawal D K, Sapienza P, Mingoli A, Cavallaro A, Edwards J D. University of Wisconsin solution effects on intimal proliferation in canine autogenous vein grafts. *J Surg Res.* 1995, 59, 433-440.
80. Mingoli A, Sapienza P, Edwards J D. Regarding „Altered endothelial and smooth muscle cell reactivity caused by University of Wisconsin preservation solution in human saphenous vein“. *J Vasc Surg.* 1998, 27, 385-386.
81. Anastasiou N, Allen S, Paniagua R, Chester A, Yacoub M. Altered endothelial and smooth muscle cell reactivity caused by University of Wisconsin preservation solution in human saphenous vein. *J Vasc Surg* 1997, 25, 713-721.
82. Yamada T, Itoh T, Nakano S, Tokuaga O. Time-dependent thickening of the intima in aortocoronary saphenous vein grafts: Clinicopathological analysis of 24 patients. *Heart Vessels.* 1995, 10, 41-45.
83. Morinaga K, Eguchi H, Miyazaki T, Okadome K, Sugimachi K. Development and regression of intimal thickening of arterially transplanted autologous vein grafts in dog. *J Vasc Surg.* 1987, 5, 719-730.

84. Davies M G, Fulton G J, Svendsen E, Hagen P-O. Time course of the regression of intimal hyperplasia in experimental vein grafts. *Cardiovasc Pathol.* 1999, 8, 161-168.
85. Tennant M, McGeachie J K. Adaptive remodelling of smooth muscle in the neo-intima of vein-to-artery grafts in rats: A detailed morphometric analysis. *Anat Embryol. (Berl)* 1993, 187, 161-166.
86. Randone B, Sterpetti A V, Stipa F, Proietti P, Aromatario C, Guglielmi M B, Palestini M, Santoro-D'Angelo L, Cavallaro A, Cucina A. Growth factors and myointimal hyperplasia in experimental aortic allografts. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1997, 13, 66-71.
87. Tiwari A, Salacinski H J, Hamilton G, Seifalian A M. Tissue engineering of vascular bypass grafts: Role of endothelial cell extraction. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2001, 21, 193-201.
88. Zilla P, Deutsch M, Fischlein T, Hofmann G. Long-term effects of clinical in vitro endothelialization on grafts. *J Vasc Surg.* 1997, 25, 1110-1112.
89. Gomes D, Louedec L, Plissonnier D, Dauge M Ch, Henin D, Osborne-Pellegrin M, Michel J B. Endoluminal smooth muscle cell seeding limits intimal hyperplasia. *J Vasc Surg.* 2001, 34, 707-715.
90. Pascual G, Escudero C, Rodriguez M, Corrales C, Serrano N, Bellon J M, Bujan J. Restoring the endothelium of cryopreserved arterial grafts: Co-culture of venous and arterial endothelial cells. *Cryobiology.* 2004, 49, 272-285.
91. Komori K, Furuyama T, Shoji T, Kume M, Mori E, Yamaoka T, Sugimachi K. Inhibitory effect of prostaglandine 1 on intimal thickening caused by poor runoff conditions in the canine autologous vein grafts. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001, 38, 686-692.
92. Shimotakahara S, Mayberg M R. Gamma irradiation inhibits neointimal hyperplasia in rats after arterial injury. *Stroke.* 1994, 25, 424-428.
93. Ulus A T, Tütün U, Zorlu F, Can C, Apaydin N, Karacagil S, Katircioglu S F, Bayazit M. Prevention of intimal hyperplasia by single-dose pre-insertion external radiation in canine-vein interposition grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000, 19, 456-460.
94. Illig K A, Williams J P, Lyden S P, Hernady E, Soni A, Davies M G, Schell M, Okunieff P, Rubin P, Green R M. External beam irradiation for inhibition of intimal hyperplasia following prosthetic bypass: Preliminary results. *Ann Vasc Surg.* 2001, 15, 533-538.

95. Wilcox J N, Waksman R, King S B, Scott N A. The role of the adventitia in the arterial response to angioplasty: The effect of intravascular radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1996, 36, 789-796.
96. Waksman R, Robinson K A, Crocker I R, Wang Ch, Gravanis M B, Cipolla G D, Hillstead R A, King S B. Intracoronary low-dose beta-irradiation inhibits neointima formation after coronary artery balloon injury in the swine restenosis model. *Circulation.* 1995, 92, 3025-3031.
97. Ross H B, Sales H E. Post-irradiation femoral aneurysm treated by iliopopliteal by-pass via the obturator foramen. *Br J Surg.* 1972, 59, 400-405.
98. Bole P V, Hintz G, Chander P, Chan Y S, Clauss R H. Bilateral carotid aneurysms secondary to radiation therapy. *Ann Surg.* 1975, 181, 888-892.
99. Pascual G, Martinez S, Rodriguez M, Serrano N, Bellon J M, Bujan J. Patency and structural changes in cryopreserved arterial grafts used as vessel substitutes in the rat. *J Surg Res.* 2005, 124, 297-304.
100. Ohta O, Kusaba A. Development of vasa vasorum in the arterially implanted autoveinbypass graft and its anastomosis in the dog. *Int Angiol.* 1997, 16, 197-203.
101. Barker S G, Talbert A, Cottam S, Baskerville P A, Martin J F. Arterial intimal hyperplasia after occlusion of the adventitial vasa vasorum in the pig. *J Vasc Biol.* 1993, 13, 70-77.
102. Cragg A H, Einzig S, Rysavy J A, Castaneda-Zuniga W R, Borgwardt B, Amplatz K. The vasa vasorum and angioplasty. *Radiology.* 1983, 148, 75-80.
103. Shi Q, Wu H D, Sauvage L R, Durante K R, Patel M, Wechezak A R, Kaplan S, Walker S. Reendothelialization of isolated segments of the canine carotid artery with reference to the possible role of the adventitial vasa vasorum. *J Vasc Surg.* 1990, 12, 476-487.
104. Fuchs S, Kornowski R, Leon M B, Epstein S E. Anti-angiogenesis: A new potential strategy to inhibit restenosis. *Int J Cardiovasc Intervent.* 2001, 4, 3-6.
105. Yanhua Hu, Fergus D, Zhongyi Z, Qingbo Xu. Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells. *Circulation.* 2003, 108, 3122-3127.
106. Westerband A, Gentile A T, Hunter G C, Gooden M A, Aguirre M L, Berman S S, Mills J L. Intimal growth and neovascularization in human stenotic vein grafts. *J Am Coll Surg.* 2000, 191, 264-271.

107. Pascual G, Jurado F, Rodriguez M, Corrales C, Lopez-Hervas P, Bellon J M, Bujan J. The use of ischaemic vessels as prostheses or tissue engineering scaffolds after cryopreservation. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2002, 24, 23-30.
108. Crescenzo D G, Hilbert S L, Messier Jr. R H, Domkowski P W, Barrick M K, Lange P L, Ferrans V J, Wallace R B, Hopkins R A. Human cryopreserved homografts: Electron microscopic analysis of cellular injury. *Ann Thorac Surg.* 1993, 55, 25-30.
109. Ingemansson R, Budrikis A, Bolys R, Sjöberg T, Steen S. Effect of temperature in long term preservation of vascular endothelial and smooth muscle function. *Ann Thorac Surg.* 1996, 61, 1413-1417.
110. Bellon J M, Bujan J, Honduvilla N G, Hernando A, Navlet J. Behavior of cryopreserved endothelial cells in different phases: Their application in the seeding of vascular prostheses. *Ann Vasc Surg.* 1995, 9, 266-273.
111. Lehalle B, Geschier C, Fieve G., Stoltz J F. Early rupture and degeneration of cryopreserved arterial allografts. *J Vasc Surg.* 1997, 25, 751-752.
112. Ruddle A C, George S J, Armitage W J, Alexander E L, Mitchell D C. A simplified technique for the cryopreservation of vein allografts. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000, 19, 233-237.
113. Bellon J M, Gimeno M J, Pascual G, Garcia-Honduvilla N, Dominguez B, Bujan J. Arterial damage induced by cryopreservation is irreversible following organ culture. *Eur J Endovasc Surg.* 1999, 17, 136-143.
114. Gournier J P, Adham M, Favre J P, Raba M, Bancel B, Lepetit J C, Barral X. Cryopreserved arterial homografts: Preliminary study. *Ann Vasc Surg.* 1993, 7, 503-511.
115. Brockbank K G M, McNally R T, Walsh K A. Cryopreserved vein transplantation. *J Card Surg.* 1992, 7, 170-176.
116. Hunt C J, Song Y C, Bateson E A J, Pegg D E. Fractures in cryopreserved arteries. *Cryobiology.* 1994, 31, 506-515.
117. Vogt P R, Zünd G, Lachat M, Turina M I. Regarding „Early rupture and degeneration of cryopreserved arterial allografts“. *J Vasc Surg.* 1998, 27, 189-190.
118. Pukacki F, Jankowski T, Gabriel M, Oszkinis G, Krasinski Z, Zapalski S. The mechanical properties of fresh and cryopreserved arterial homografts. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000, 20, 21-24.

119. Nataf P, Hadjiisky P, Lechat P, Mougenot N, Peuchmaurd M, Gouezo R, Gerora J, Cabrol C, Gandjbakhch I. Effect of cold anoxia and cryopreservation on metabolic and contractile functions of human mammary artery. *Cryobiology*. 1995, 32, 327-333.
120. Rendal E, Rodriguez M, Martinez M V, Fernandez R O, Sanchez J, Segura R, Bermudez T, Matheu G, Filgueira P, Pertega S, Andion C. Function of cryopreserved pig aortas. *J Surg Res*. 2004, 120, 304-311.
121. Armentano R L, Santana D B, Fischer E I C, Graf S, Campos H P, German Y Z, Saldias M C, Alvarez I. An in vitro study of cryopreserved and fresh human arteries: A comparison with ePTFE prostheses and human arteries studied non-invasively in vivo. *Cryobiology*. 2006, 52, 17-26.
122. Adham M, Gournier J P, Favre J P, De La Roche E, Ducerf CH, Baulieux J, Barral X, Pouyet M. Mechanical characteristics of fresh and frozen human descending thoracic aorta. *J Surg Res*. 1996, 64, 32-34.
123. Rosset E, Friggi A, Novakovitch G, Rolland P H, Pellissier J F, Magnan P E, Branchereau A. Effects of cryopreservation on the viscoelastic properties of human arteries. *Ann Vasc Surg*. 1996, 10, 262-272.
124. Pegg D E, Wusteman M C, Boylan S. Fractures in cryopreserved elastic arteries. *Cryobiology*. 1997, 34, 182-192.
125. Bujan J, Pascual G, García-Honduvilla N, Gimeno M J, Jurado F, Carrera-San Martin A, Bellon J M. Rapid thawing increases the fragility of the cryopreserved arterial wall. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2000, 20, 13-20.
126. Zhang A, Cheng S, Gao D, Xu LX. Thermal stress study of two different artery cryopreservation methods. *Cryo Letters*. 2005, 26, 113-120.
127. Wassenaar C, Wijsmuller E G, Van Herwerden L A, Aghai Z, Van Tricht C L, Bos E. Cracks in cryopreserved aortic allografts and rapid thawing. *Ann Thorac Surg*. 1995, 60, 165-167.
128. Pascual G, Garcia-Honduvilla N, Rodriguez M, Turegano F, Bujan J. Effect of the thawing process on cryopreserved arteries. *Ann Vasc Surg*. 2001, 10, 1007.
129. Bujan J, Pascual G, Lopez R, Corrales C, Rodriguez M, Turegano F, Bellon J M. Gradual thawing improves the preservation of cryopreserved arteries. *Cryobiology*. 2001, 42, 256-265.
130. Rendal E, Santos M V, Rodriguez M, Sanchez J, Segura R, Matheu G, Filgueira P, Pertega S, Andion C. Effects of cryopreservation and thawing on the structure of vascular segment. *Transplant Proc*. 2004, 36, 3283-3287.

131. Pascual G, Rodriguez M, Corrales C, Turegano F, Garcia-Honduvilla N, Bellon J M, Bujan J. New approach to improving endothelial preservation in cryopreserved arterial substitutes. *Cryobiology*. 2004, 48, 62-71.
132. Autieri M V. Allograft-induced proliferation of vascular smooth muscle cells: Potential targets for treating transplant vasculopathy. *Curr Vasc Pharmacol*. 2003, 1, 1-9.
133. Davies M G, Dalen H, Svendsen E, Hagen P O. Functional and histological differences in autogenous and allogenic vein grafts: Two different vasculopathies? *J Surg Res*. 1997, 69, 14-22.
134. Davies M G, Huynh T T, Fulton G J, Svendsen E, Brockbank F G M, Hagen P O. Controlling transplant vasculopathy in cryopreserved vein grafts with polyethylene glycol and glutathione during transport. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1999, 17, 493-500.
135. Mirelli M, Nanni-Costa A, Scolari M P, Iannelli S, Buscaroli A, Ridolfi L, Petrini F, Stella A, De Sanctis L, Borgnino L C, Stefoni S, D'Addato M, Bonomini V. Mismatch-specific anti HLA antibody production following aorta transplants. *Transpl Int*. 1998, 11, 444-447.
136. Nataf P, Guettier C, Bourbon A et al. Influence of arterial allograft preparation techniques on chronic vascular rejection: A histological study. *Transplant Proc*. 1996, 28, 2890-2892.
137. Johnson T R, Tomaszewski J E, Carpenter P. Cellular repopulation of human vein allograft bypass grafts. *J Vasc Surg*. 2000, 31, 994-1002.
138. Mirelli M, Stella A, Faggioli G L, Scolari M P, Iannelli S, Freyrie A, Buscaroli A, De Sanctis 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, 424-429.
139. Tice DA, Zerbino V. Clinical experience with preserved human allografts for vascular reconstruction. *Surgery*. 1972, 72, 260-267.
140. Solanes N, Rigol M, Castella M, Khabiri E, Ramirez J, Segales J, Agusti E, Perez-Villa F, Roid E, Pomar J L, Sanz G, Heras M. Cryopreservation alters antigenicity of allografts in a porcine model of transplant vasculopathy. *Transplant Proc*. 2004, 36, 3288-3294.
141. Cochran R P, Kunzelman K S, Cryopreservation does not alter antigenic expression of aortic allografts. *J Surg Res*. 1989, 46, 597-599.

142. Salomon R N, Friedman G B, Callow A D, Payne D D, Libby P. Cryopreserved aortic homografts contain viable smooth muscle cells capable of expressing transplantation antigens. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993, 106, 1173-1180.
143. Hawkins J A, Breinholt J P, Lambert L M, Fuller T C, Profaizer T, McGough E C, Shaddy R E. Class I and class II anti-HLA antibodies after implantation of cryopreserved allograft material in pediatric patients. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000, 119, 324-330.
144. Madden R, Lipkowitz G, Benedetto B, Kurbanov A, Miller M, Bow L. Decellularized cadaver vein allografts used for hemodialysis access do not cause allosensitization or preclude kidney transplantation. *Am J Kidney.* 2002, 40, 1240-1243.
145. Vischjager M, Van Gulik T M, Marle J V, Pfaffendorf M, Jacobs M J H M. Function of cryopreserved arterial allografts under immunosuppressive protection with cyclosporine A. *J Vasc Surg.* 1996, 24, 876-882.
146. Callow A D. Arterial homografts. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1996, 12, 272-281.
147. Solanes N, Rigol M, Khabiri E, Castella M, Ramirez J, Roque M, Agusti E, Roig E, Perez-Villa F, Segales J, Pomar J L, Engel P, Massaguer A, Martorell J, Rodriguez J A, Sanz G, Heras M. Effects of cryopreservation on the immunogenicity of porcine arterial allografts in early stages of transplant vasculopathy. *Cryobiology.* 2005, 51, 130-141.
148. Baraldi A, Manenti A, Di Felice A, Grosoli M, Furci L, Leonelli M, Manca V, Roncaglia R, Lusvardi E. Absence of rejection in cryopreserved saphenous vein allografts for hemodialysis. *ASAIO Trans* 1989, 35, 196-199.
149. Carpenter J P, Tomaszewski J E. Human saphenous vein allograft bypass grafts: Immune response. *J Vasc Surg.* 1998, 27, 492-499.
150. Ochsner J L, Lawson J D, Eskin S J, Mills N L, De Camp P T. Homologous vein as an arterial substitute: Long-term results. *J Vasc Surg.* 1984, 1, 306-313.
151. Wagstaff S A, Grigg M J. Arterial homografts – A possible solution to an infective dilemma. *Cardiovasc Surg.* 1996, 4, 796-800.
152. Attur M G, Patel R, Thakker G, Vyas P, Levartovsky D, Patel P, Naqvi S, Raza R, Patel K, Abramson D, Bruno G, Abramson S B, Amin A R. Differential anti-inflammatory effects of immunosuppressive drugs: Cyclosporin, rapamycin and FK-506 on inducible nitric oxide synthase, nitric oxide, cyclooxygenase-2 and PGE2 production. *Inflamm Res.* 2000, 49, 20-26.

153. Ikonen T S, Gummert J F, Serkova N, Hayase M, Honda Y, Kobayase Y, Hausen B, Yock P G, Christians U, Morris R E. Efficacies of sirolimus (rapamycin) and cyclosporine in allograft vascular disease in nonhuman primates: Trough levels of sirolimus correlate with inhibition of progression of arterial intimal thickening. *Transpl Int.* 2000, 13, 314-320.
154. Shaddy R E, Lambert L M, Fuller T C, Profzaizer T, Thompson D D, Baker S I, Osborne K A, Hawkins J A. Prospective randomized trial of azathioprine in cryopreserved valved allografts in children. *Ann Thorac Surg.* 2001, 71, 43-47.
155. Carpenter J P, Tomaszewski J E. Immunosuppression for human saphenous vein allograft bypass surgery: A prospective randomized trial. *J Vasc Surg.* 1997, 26, 32-42.
156. Murray K F, Leichtner A M. Inflammatory Bowel Disease: Therapy. *International Seminars in Paediatric Gastroenterology and Nutrition* 6, 1997, 2, 6-14.
157. Azuma N, Sasajima T, Kubo Y. Immunosuppression with FK 506 in rat arterial allografts fate of allogeneic endothelial cells. *J Vasc Surg.* 1999, 29, 694-702.
158. Bachinger A, Kirchhoff D, Rychlik R. Immunosuppression with tacrolimus (FK 506) and cyclosporin A for preventing graft rejection after liver transplantation. Retrospective evaluation of medical costs based on the FG-O157 Study in 224 patients. *Chirurg.* 1998, 69, 957-962.
159. Issenman R M. Inflammatory bowel disease: Presentation and Clinical Features. *International Seminars in Paediatric Gastroenterology and Nutrition*, 6, 1997, 2, 2-5.
160. Hernandez G L, Volpert O V, Iniguez M A, Lorenzo E, Martinez-Martinez S, Grau R, Fresno M, Redondo J M. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: Roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *J Exp Med.* 2001, 193, 607-620.
161. Mingoli A, Edwards J D, Feldhaus R J, Hunter W J, Naspetti R, Cavallari N, Sapienza P, Kretchmar D H, Cavallaro A. Fresh vein allograft survival in dogs after cyclosporine treatment. *J Surg Res.* 1996, 62, 95-102.
162. Augelli N V, Lupinetti F M, el Khatib H, Sanofsky S J, Rossi N P. Allograft vein patency in a canine model. Additive effects of cryopreservation and cyclosporine. *Transplantation.* 1991, 52, 466-470.
163. Ruddle A C, George S J, Armitage W J, MacGovan A, McCulloch S, Brookes S T, Mitchell D C. Venous allografts prepared from stripped long saphenous vein. Is there a need for antibiotic sterilisation? *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1998, 15, 444-448.

164. Eugene M, Gerota J. Cryopreserved aortic allograft replacement of infected prosthetic grafts in man: Processing and clinical results. *Transpl Int.* 1998, 11, 452-454.
165. Vogt P R, Brunner-La Rocca H-P, Lachat M, Ruef Ch, Turina M I. Technical details with the use of cryopreserved arterial allografts for aortic infection: Influence on early and midterm mortality. *J Vasc Surg.* 2002, 35, 80-86.
166. Camiade Ch, Goldschmidt P, Koskas F, Ricco J B, 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, 186-196.
167. Bahnini A, Ruotolo C, Kieffer E. In situ fresh allograft replacement of an infected aortic prosthetic graft: Eighteen months follow-up. *J Vasc Surg.* 1991, 14, 98-102.
168. Knosalla Ch, Goëau-Brissonnière O, Leflon V, Bruneval P, Eugene M, Pechere J C, Koskas F, Nicolas M H, Leschi J P, Gerota J, Kieffer E. Treatment of vascular graft infection by in situ replacement with cryopreserved aortic allografts: An experimental study. *J Vasc Surg.* 1998, 27, 689-698.
169. Chiesa R, Astore D, Piccolo G, Melissano G, Jannello A, Frigerio D, Agrifoglio G, Bonalumi F, Corsi G, Brancadoro S C, Novali C, Locati P, Odero A, Pirreli S, Cugnasca M, Biglioli P, Sala A, Polvani G, Guarino A, Biasi G M, Mingazzini P, Scalamogna M, Mantero S, Spina G, Prestipino F, Sirchia G. Fresh and cryopreserved arterial homografts in the treatment of prosthetic grafts infections: Experience of the Italian collaborative vascular homograft group. *Ann Vasc Surg.* 1998, 12, 457-462.
170. Koskas F, Goeau-Brissonniere O, Nicolas M H, Kieffer E. Arteries from human beings are less infectible by staphylococcus aureus than polytetrafluorethylene in an aortic dog model. *J Vasc Surg.* 1996, 23, 472-476.
171. 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, 349-356.
172. Vogt P R, Turina M I. Management of infected aortic grafts: Development of less invasive surgery using cryopreserved homografts. *Ann Thorac Surg.* 1999, 67, 1986-1989.
173. Desgranges P, Beaujan F, Brunet S, Cavillon A, Qvarfordt P, Melliere D, Besquemin J-P. Cryopreserved arterial allografts used for the treatment of infected vascular grafts. *Ann Vasc Surg.* 1998, 12, 583-588.

174. Vogt P R, Brunner-La Rocca H P, Carrel T, von Segesser L K, Ruef Ch, Debatin J, Seifert B, Kiowski W, Turina M I. Cryopreserved arterial allografts in the treatment of major vascular infection: A comparison with conventional surgical techniques. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998, 116, 965-972.
175. Kieffer E, Sabatier J, Plissonnier D, Knosalla Ch. Prosthetic graft infection after descending thoracic / thoracoabdominal aortic aneurysmectomy: Management with in situ arterial allografts. *J Vasc Surg.* 2001, 33, 671-678.
176. Lavigne J P, Postal A, Kolh, Limet R. Prosthetic vascular infection complicated or not by aortoenteric fistula: Comparison of treatment with and without cryopreserved allograft (homograft). *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2003, 25, 416-423.
177. Fujitani R M, Bassiouny H S, Gewertz B L, Glagov S, Zarins C K. Cryopreserved saphenous vein allogenic homografts: An alternative conduit in lower extremity arterial reconstruction in infected fields. *J Vasc Surg.* 1992, 15, 519-526.
178. Šebesta P, Klika T, Mach T, Šedivý P, Czinner P, Zdráhal P, Kořínková Z, Michálek P, Vitásek P, Jindrák V, Marek J. Aortitis bacterialis. *Rozhl Chir.* 2004, 83, 209-216.
179. Knosalla Ch, Weng Y, Yankah Ch, Hofmeister J, Hetzer R. Using aortic allograft material to treat mycotic aneurysms of the thoracic aorta. *Ann Thorac Surg.* 1996, 61, 1146-1152.
180. Knosalla Ch, Bauer M, Weng Y, Weidemann H, Hetzer R. Complicated chronic pancreatitis causing mycotic aortic aneurysm: In situ replacement with a cryopreserved aortic allograft. *J Vasc Surg.* 2000, 32, 1034-1037.
181. Dossche K M, de la Riviere A B, Morshuis W J, Schepens M A A M, Defauw J A M, Ernst S M. Cryopreserved aortic allografts for aortic root reconstruction: A single institution's experience. *Ann Thorac Surg.* 1999, 67, 1617-1622.
182. Leseche G, Castier Y, Petit M D, Bertrand P, Kitzis M, Mussot S, Besnard M, Cerceau O. Long-term results of cryopreserved arterial allograft reconstruction in infected prosthetic grafts and mycotic aneurysm of the abdominal aorta. *J Vasc Surg.* 2001, 34, 616-622.
183. Curti T, Freyrie A, Mirelli M, Rossi C, Paragona O, Resta F, Stella A, Addato M D. Endovascular treatment of an ilio-enteric fistula: A „bridge“ to aortic homograft. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000, 20, 204-206.
184. Julia P L, Sapoval M, Diemont F, Chemla E, Gaux J C, Fabiani J N. Endovascular repair of aortic allograft aneurysmal degeneration: A case report. *J Vasc Surg.* 2000, 32, 1222-1224.

185. Štádler P, Šebesta P, Klika T, Šedivý P, Slížová D, Krs O. Alografty v cévní chirurgii. *Rozhl Chir.* 2005, 84, 350-355.
186. 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.
187. Matsuura J H, Johansen K H, Rosenthal D, Clark M D, Clarke K A, Kirby L B. Cryopreserved femoral vein grafts for difficult hemodialysis access. *Ann Vasc Surg.* 2000, 14, 50-55.
188. Bolton W D, Cull D L, Taylor S M, Carsten Ch G, Snyder B A, Sullivan T M, Youkey J R, Langan E M, Gray B H. The use of cryopreserved femoral vein grafts for hemodialysis access in patients at high risk for infection: A word of caution. *J Vasc Surg.* 2002, 36, 464-468.
189. 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, 1732-1742.
190. Harris R W, Schneider P A, Andros G, Oblath R W, Salles-Cunha S, Dulawa L. Allograft vein bypass: Is it an acceptable alternative for infrapopliteal revascularisation? *J Vasc Surg.* 1993, 18, 553-560.
191. Solanes N, Rigol M, Castella M, Khabiri E, Ramirez J, Segales J, Agusti E, Perez-Villa F, Roid E, Pomar J L, Sanz G, Heras M. Cryopreservation alters antigenicity of allografts in a porcine model of transplant vasculopathy. *Transplant Proc.* 2004, 36, 3288-3294.
192. Měříčka P. Brief history of the tissue bank, Charles University hospital, Hradec Králové, Czech Republic. *Cell and Tissue Banking.* 2000, 1, 17-25.
193. Desgranges P, Beaujan F, Brunet S, Cavillon A, Qvarfordt P, Melliere D, Besquemin J P. Cryopreserved arterial allografts used for the treatment of infected vascular grafts. *Ann Vasc Surg.* 1998, 12, 583-588.
194. Buzzi M, Mirelli M, Vaselli C, Tazzari P L, Terzi A, Stella A, Conte R. Vascular tissue banking: State of the art. *Transplant Proc.* 2005, 37, 2428-2429.
195. Bush H L Jr, McCabe M E, Nabseth D C. Functional injury of vein graft endothelium. Role of hypothermia and distention. *Arch Surg.* 1984, 119, 770-774.
196. Marois Y, Wagner E, Pâris E, Roy R, Douville Y, Guidon R. Comparison of healing in fresh and preserved arterial allografts in the dog. *Ann Vasc Surg.* 1999, 13, 130-140.

197. Van Damme H, Creemers E, Limet R. Venous allografts for critical limb ischaemia. *Acta Chir Belg.* 1995, 95, 14-20.
198. Zhang D X, Gauthier K M, Chawengsub Y, Campbell W B. Acetylcholine-induced relaxations of rabbit small mesenteric arteries: Role of arachidonic acid metabolites and K⁺. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007, doi: 10.1152/ajpheart.00268.2006, on line.
199. Magne J L, Farah I, Roux J J, Voirin L, Badra A, Durand M, Chichignoud B, Guidicelli. Below-knee bypass using fresh arterial allografts for limb salvage: Early results. *Ann Vasc Surg.* 1997, 11, 237-241.
200. Allaire E, Guettier C, Bruneval P, Plissonnier D, Michel J B. Cell-free arterial grafts: Morphologic characteristics of aortic isografts, allografts, and xenografts. *J Vasc Surg.* 1994, 19, 446-456.
201. Timaran C H, Stevens S L, Freeman M B, Goldman M H. Infrainguinal bypass grafting using lyophilized saphenous vein allografts for limb salvage. *Cardiovasc Surg.* 2002, 10, 315-319.
202. La Barbera G, Pumilia G, La Marca G, Martino A. Denatured venous homograft as an arterial substitute in civilian vascular injuries. Thirty months' experience. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1998, 15, 467-471.
203. Harris L, O'Brien-Irr M, Ricotta J J. Long-term assessment of cryopreserved vein bypass grafting success. *J Vasc Surg.* 2001, 33, 528-532.
204. Buckley C J, Abernathy S, Lee S D, Arko F R, Patterson D E, Manning L G. Suggested treatment protocol for improving patency of femoral-infrapopliteal cryopreserved saphenous vein allografts. *J Vasc Surg.* 2000, 32, 731-738.
205. Albertini J N, Barral X, Branchereau A, Favre J P, Guidicelli H, Magne J L, Magnan P E. Long-term results of arterial allograft below-knee bypass grafts for limb salvage: A retrospective multicenter study. *J Vasc Surg.* 2000, 31, 426-435.
206. Alonso M, Segura R J, Prada C, Caeiro S, Cachaldora J A, Diaz E, Lujan S, Cal L, Vidal J. Cryopreserved arterial homografts: Preliminary results in infrageniculate arterial reconstruction. *Ann Vasc Surg.* 1999, 13, 261-267.
207. Castier Y, Leseche G, Palombi T, Petit M D, Cerceau O. Early experience with cryopreserved arterial allografts in below-knee revascularisation for limb salvage. *Am J Surg.* 1999, 177, 197-202.
208. Callow A D. Arterial homografts. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1996, 12, 272-281.

209. Schmitz-Rixen T, Megerman J, Colvin R B, Williams A M, Abbott W M. Immunosuppressive treatment of aortic allografts. *J Vasc Surg.* 1988, 7, 82-92.
210. Da Gama A D, Sarmiento C, Vieira T, Carmo G X do. The use of arterial allografts for vascular reconstruction in patients receiving immunosuppression for organ transplantation. *J Vasc Surg.* 1994, 20, 271-278.
211. Bilfinger T V, Hartman A R, Liu Y, Magazine H I, Stefano G B. Cryopreserved veins in myocardial revascularization: Possible mechanism for their increased failure. *Ann Thorac Surg.* 1997, 63, 1063-1069.
212. Laub G W, Muralidharan S, Clancy R, Eldredge W J, Chen C, Adkins M S, Fernandez J, Anderson W A, McGrath L B. Cryopreserved allograft veins as alternative coronary artery bypass conduits: Early phase results. *Ann Thorac Surg.* 1992, 54, 826-831.
213. Lamm P, Juchem G, Milz S, Schuffenhauer M, Reichart B. Autologous endothelialized vein allograft. *Circulation.* 2001, 104, 108.
214. Cornelissen P H J, Hamerlijnck R P, Vermeulen F E. Aneurysmatic dilatation of an aortic homograft more than 30 years after implantation into the thoracic aorta. *Eur J Cardio-thorac Surg.* 1994, 8, 447-448.

X. SEZNAM PUBLIKACÍ A VYBRANÝCH PŘEDNÁŠEK AUTORA

Kapitoly v monografiích

1. Štádler P. Miniinvasivní výkony v cévní chirurgii. In: Krajíček M, Peregrin J H, Roček M, Šebesta P a kol. Chirurgická a intervenční léčba cévních onemocnění. Praha, Grada, 2007, 335-358.

Původní články a statě ve sbornících

1. Štádler P, Netuka I, Šebesta P. Komplexní chirurgická léčba smíšeného bércevého vředu femoropopliteálním distálním bypasselem s endoskopickým zrušením Cockettových perforátorů. Rozhl Chir. 1998, 8, 367-369.
2. Štádler P, Šebesta P, Klika T, Dvořáček M. Torakoskopická hrudní sympatektomie jako metoda volby reoperace na hrudním sympatiku. Rozhl Chir. 1999, 9, 448-450.
3. Štádler P, Šebesta P, Netuka I. Torakoskopické hrudní sympatektomie – naše zkušenosti. Rozhl Chir. 2001, 3, 107-109.
4. Štádler P, Šebesta P, Hoffmann R, Balazs J, Janoušková L. Neobvyklý výskyt široce nasedajícího trombu v břišní aortě u mladé pacientky po opakované embolizaci do pánevního řečiště a dolní končetiny. Rozhl Chir. 2001, 6, 294-296.
5. Štádler P, Šebesta P. Torakoskopická hrudní resympatektomie s výrazným klinickým efektem za několik let po operaci hrudního sympatiku. Slov Chir. 2003, 1, 4-6.
6. Štádler P, Koříšková Z, Vitásek P. Komplexní léčba symptomatické nepravé výdutě distální anastomózy aorto-aortální náhrady a karcinomu pravé ledviny. Rozhl Chir. 2004, 4, 168-170.
7. Štádler P, Špaček M, Matouš P, Koříšková Z. Laparoskopicky vedený iliofemorální bypass. Kazuistika. Rozhl Chir. 2004, 7, 308-310.
8. Štádler P, Vitásek P, Špaček M. Unusual treatment of bleeding from an injured common iliac vein. Cor Vasa, 2004, 10, 503-504.
9. Štádler P, Špaček M, Matouš P, Vitásek P, Koříšková Z, Michálek P. Laparoskopické cévní rekonstrukce – úvodní zkušenosti. Rozhl Chir. 2004, 11, 549-553.
10. Štádler P, Šebesta P, Klika T, Šedivý P, Michálek P. Minilaparotomie jako přístup k cévním rekonstrukcím v aorto-ilické oblasti. Rozhl Chir. 2004, 11, 545-548.
11. Štádler P, Špaček M, Bělohávek O, Michálek P. Diagnosing vascular prosthesis infection by means of the FDG-PET/CT scan. J Vasc Surg. 2004, 6, 1246-1247, (IF 3,173).

12. Štádlér P, Slížová D, Krs O, Zdráhal P, Vojáček J. Microscopic study of vascular allografts. *Cor Vasa*, 2005, 1, 10-13.
13. Štádlér P, Šebesta P, Klika T, Šedivý P, Slížová D, Krs O. Alografty v cévní chirurgii. *Rozhl Chir.* 2005, 7, 350-355.
14. Štádlér P, Vitásek P, Matouš P, Špaček M. Laparoskopická resekce výdutě břišní aorty. *Rozhl Chir.* 2005, 9, 443-447.
15. Štádlér P, Matouš P, Špaček M, Doleček L. Resekce výdutě břišní aorty s aorto-aortální náhradou, vedená plně laparoskopicky. *Cor Vasa* 2005, 11, 441-444.
16. Štádlér P, Matouš P, Vitásek P. Roboticky asistovaný aortobifemorální bypass – systém da Vinci 1200. *Cor Vasa*, 2006, 4, 155-158.
17. Štádlér P, Vitásek P, Matouš P. Úvodní zkušenosti s robotickým systémem da Vinci v cévní chirurgii. *Rozhl Chir.* 2006, 5, 228-232.
18. Štádlér P, Šebesta P, Vitásek P, Matouš P, El Samman K. A modified technique of transperitoneal direct approach for totally laparoscopic aortoiliac surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2006, 3, 266-269, (IF 2,026).
19. Štádlér P, Matouš P, Vitásek P, Špaček M. Robot-assisted aortoiliac reconstruction: A review of 30 cases. *J Vasc Surg.* 2006, 5, 915-919, (IF 3,173).
20. Štádlér P, Vitásek P, Matouš P. Současné možnosti uplatnění robotického systému v cévní chirurgii. *Cor Vasa*, 2007, 2, 71-73.
21. Štádlér P. Robotika pronikla do cévní chirurgie. *Lék listy, ZN*, 2007, 7, 18-19.

Abstrakta

1. Štádlér P, Matouš P, Vitásek P, Špaček M. Robot-assisted aortoiliac reconstruction: A review of 30 cases. *Selected Abstracts. Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2006, 5, 600-602, (IF 3,173).
2. Štádlér P. Laparoscopic transperitoneal approach and treatment of occlusive and aneurysm disease of the aorta. *Abstract. Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* 2007, v tisku, (IF 1,086)
3. Štádlér P. The robotic anastomosis in laparoscopic vascular surgery. *Abstract. Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* 2007, v tisku, (IF 1,086)

Vybrané přednášky

1. Štádl P, Šebesta P, Klika T, Dvořáček M. Torakoskopická hrudní sympatektomie jako metoda volby reoperace na hrudním sympatiku. Praha, Angiologické dny s mezin. účastí, 1999.
2. Štádl P, Slížová D, Šebesta P, Krs O, Zdráhal P. Vliv časového intervalu a teploty na poškození stěny čerstvého tepenného a žilního homograftu. Plzeň, Hejhalův den, 2002.
3. Štádl P, Šebesta P, Zdráhal P, Vitásek P. Použití čerstvých tepenných alograftů při řešení infekce cévních protéz. Liberec, Inter-angio, 2003.
4. Štádl P, Špaček M, Matouš P, Koříšková Z, Šedivý P, Šebesta P. The short-term experience in the use of new technique: Total Laparoscopic Bypass Surgery and Minimal Incision Aortic Surgery. Québec City, Kanada, International Endovascular Laparoscopy Congress, 2004, (vyzvaná přednáška).
5. Štádl P, Slížová D, Krs O, Michálek P. Impact of storage conditions on structure of vascular allografts: Scanning electron microscopic study. Prague, 13th International Congress of EATB, 2004, (poster).
6. Štádl P, Dion Y M, Thaveau F, Ben El Kadi. History of laparoscopy. Québec City, Kanada, International Laparoscopic Vascular Course, 2004, (vyzvaná přednáška).
7. Štádl P, Dion Y M, Thaveau F, Ben El Kadi. The pneumoperitoneum. Québec City, Kanada, International Laparoscopic Vascular Course, 2004, (vyzvaná přednáška).
8. Štádl P, Špaček M, Matouš P, Vitásek P, Koříšková Z. Laparoscopic vascular reconstruction. Initial experience. Québec City, Kanada, International Laparoscopic Vascular Course, 2004, (vyzvaná přednáška).
9. Štádl P, Slížová D, Krs O, Šebesta P, Šedivý P. Použití čerstvých tepenných alograftů. Brno, I. sjezd České společnosti kardiovaskulární chirurgie, 2004.
10. Štádl P, Špaček M, Matouš P, Vitásek P, Michálek P, Stern M. Roční zkušenosti s laparoskopickými rekonstrukcemi v aortoilické oblasti. Brno, I. sjezd České společnosti kardiovaskulární chirurgie, 2004.
11. Štádl P, Slížová D, Krs O, Michálek P. Scanning electron microscopic study of vascular allografts. Brno, 43th Congress of the Czech Anatomical Society, 2005, (poster).
12. Štádl P, Špaček M, Vitásek P, Matouš P. Experience in the use of total laparoscopic vascular surgery. Sydney, Australia, Vascular, 2005, (poster).

13. Štádler P, Vitásek P, Matouš P, El Samman K. 52 laparoskopických výkonů v aortoiliacké oblasti, výsledky a komplikace. Liberec, Inter-angio, 2005.
14. Štádler P. Robot-assisted laparoscopic aortoiliac reconstruction: A review of 25 cases. Cairns, Australia, Vascular, 2006.
15. Štádler P. Robot and vascular surgery. Praha, XX. Annual meeting of the European Society for Vascular Surgery, 2006.
16. Štádler P. Roboticky asistované cévní rekonstrukce – výsledky a komplikace u 40 pacientů. Brno, I. kongres robotické chirurgie s mezinárodní účastí, 2006.
17. Štádler P. Laparoscopic transperitoneal approach and treatment of occlusive and aneurysm disease of the aorta. New York, USA, The third International Endovascular and Laparoscopic Congress (IELC) and Veith Symposium, 2006, (vyzvaná přednáška).
18. Štádler P. The robotic anastomosis in laparoscopic vascular surgery. New York, USA, The third International Endovascular and Laparoscopic Congress (IELC) and Veith Symposium, 2006, (vyzvaná přednáška).
19. Štádler P, Slížová D, Krs O. Optimální postup přípravy cévního transplantátu. Brno, II.sjezd České společnosti kardiiovaskulární chirurgie, 2006.
20. Štádler P, Vitásek P, Matouš P. Roboticky asistované cévní rekonstrukce – soubor 45 pacientů. Brno, II.sjezd České společnosti kardiiovaskulární chirurgie, 2006.
21. Štádler P. Robot-assisted laparoscopic aortoiliac reconstruction: Initial experience. Puerto Rico, USA, 31st Annual meeting (SAVS), 2007.
22. Štádler P, Vitásek P, Matouš P. Robot and vascular surgery. New York, USA, MIRA, 2007.
23. Štádler P. The da Vinci robotic system, advantages and disadvantages in vascular surgery. Memphis, University of Tennessee, USA, 2007, (vyzvaná přednáška).
24. Štádler P. Nástup robotů v cévní chirurgii. Praha, XXXII. Angiologické dny s mezinárodní účastí, 2007, (vyzvaná přednáška).
25. Štádler P. Advantages and complications of using the da Vinci robotic system for vascular surgery. Orlando, USA, 35th Annual Symposium (SCVS), 2007.
26. Štádler P. Robotic in laparoscopic vascular surgery. London, UK, Charing Cross Symposium, 2007, (vyzvaná přednáška).
27. Štádler P. Laparoscopic and robotic procedures. London, UK, Charing Cross Symposium, 2007, (vyzvaná přednáška).