

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Lékařská fakulta v Hradci Králové



MUDr. Pavel Měříčka

**CONTRIBUTION TO SAFETY ASSURANCE
IN THE CRYOPRESERVATION OF CELLS AND TISSUES
USED FOR CLINICAL TRANSPLANTATION**

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program: lékařská biologie

Hradec Králové

2006

RNDr. František Skopec, CSc. – Nucleus HK®

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia v doktorském studijním programu lékařská biologie Ústavu lékařské biologie a genetiky, Lékařské fakulty v Hradci Králové

Uchazeč: MUDr. Pavel Měříčka, Tkáňová ústředna Fakultní nemocnice Hradec Králové

Školitel: Prof. MUDr. RNDr. Miroslav Červinka, CSc., Ústav Lékařské biologie a genetiky, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové

Klinický konzultant: Prof. MUDr. Milan Bláha, CSc., II. interní klinika, Fakultní nemocnice Hradec Králové

Stanovisko k disertaci vypracoval Ústav lékařské biologie a genetiky Univerzity Karlovy v Praze, Lékařské fakulty v Hradci Králové

Autoreferát byl rozeslán dne 19. 7. 2006

Obhajoba se koná před komisí pro obhajoby disertačních prací v doktorském studijním programu všeobecné lékařství v oboru lékařská biologie

ve čtvrtek dne 14. září 2006 od 11.00 hodin,

v zasedací místnosti děkanátu Lékařské fakulty UK v Hradci Králové, Šimkova 870.

S obsahem disertační práce je možno se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Šimkova 870

Prof. MUDr. RNDr. Miroslav Červinka, CSc.

Předseda komise pro obhajoby disertačních prací v doktorském studijním programu lékařská biologie

© Text a obrázky: Pavel Měříčka, 2006

© Grafická úprava: Jiří Procházka, 2006

© Vydavatel: RNDr. František Skopec, CSc. – Nucleus HK[®], 2006

ISBN 80-86225-94-1

OBSAH

1. Úvod.....	5
2. Cíle disertační práce a členění do kapitol.....	7
3. Metodika	8
4. Výsledky	12
5. Diskuse	18
6. Závěry	21
7. Summary	22
8. Seznam vybrané literatury	25
9. Seznam publikací autora	29
10. Seznam nejcitovanějších prací autora.....	35

Oponenti:

- 1. Prof. MUDr. Vladislav Třeška, DrSc.,
přednosta chirurgické kliniky LF UK a FN, Plzeň**
- 2. Doc. MUDr. Pavel Veselý, CSc.,
Ústav molekulární genetiky AV ČR, Praha**

1. ÚVOD

Použití buněk a tkání pro klinické transplantace v řadě lékařských oborů nebylo nikdy v minulosti tak časté jako nyní. Autologní i alogenní transplantace kryokonzervovaných buněk a tkání přinesly prospěch tisícům lidí, na druhé straně se však objevily i neúspěchy (Pritchard, 1987, Diringner and Braig, 1989, Tedder et al., 1995, Khuu et al., 2003, Eastlund a Strong, 2003). Některé z neúspěchů byly způsobeny technickými nebo metodickými selháními, postupně se však dostával do popředí problém neexistence právní regulace buněčných a tkáňových transplantací, včetně stanovení pravidel pro zajištění jejich bezpečnosti (Roscam Abbing, 1995, DuPont, 1997). Navíc, rozšiřování informací, které přeceňují možnosti v současnosti dostupných kryokonzervačních technologií ve sdělovacích prostředcích a na internetu nebo zveřejněné případy praxe, která budila podezření z nerespektování etických a právních aspektů transplantací, snížily důvěru veřejnosti v korektnost a transparentnost systému odběrů a transplantací tkání v národním i mezinárodním měřítku (von Versen, 1995, Klement, 2001, Public Citizen, 2001, Šteiner a Špaček, 2002, Ševčík a Fakan, 2002).

Problematika bezpečnosti buněčných a tkáňových transplantací je lékařskou veřejností vnímána především jako prevence přenosu infekce od dárce, problém je však komplexnější a zahrnuje celý systém jistění jakosti známý z farmaceutické výroby (Pospíšilová, 1998). Za bezpečnost buněčných a tkáňových transplantátů odpovídají tkáňové banky. Autor vychází z předpokladu, že podobně jako výrobci léčiv by tkáňové banky měly prokazovat, že jejich produkty jsou:

1. Biologicky, resp. klinicky účinné.
2. Bezpečné.

Oba požadavky jsou v určitém protikladu. Biologicky nejúčinnější preparáty mohou být nejméně bezpečné a naopak nejbezpečnější nejméně účinné. Je uměním tkáňové banky nalézt ve spolupráci s klinickými pracovníky pro obě strany přijatelný kompromis mezi bezpečností a účinností.

Biologická účinnost se standardně prokazuje experimentálními a klinickými studiemi. Příklady těchto studií s použitím buněčných a tkáňových transplantátů zhotovených v Tkáňové ústředně Fakultní nemocnice Hradec Králové jsou uvedeny v seznamu literatury autora. Jde o použití buněčných a tkáňových štěpů v neurochirurgii (Pařízek et al. 1987a,b, 1989, 1994, 1996, 1997, 1999, 2000, Pařízek a Měříčka 1990), popáleninové medicíně (Klein et al. 1989, 1995, 1997, 2000), hematonekologii (Bláha et al. 1990, Filip et al. 1996, 1997, 1999, Vaňásek et al. 1997, 1998), oftalmologii (Rozsival a Měříčka 1998, Rozsival et al. 1997, Krásný a Měříčka 1998) i dalších oborech (Klein et al. 1990, Ferko et al. 2000, Páral et al. 2000, Dřízhal et al. 2001, Pavlata et al. 2002).

Standardní metodou prokazování bezpečnosti je průkaz shody produktu, resp. způsobu jeho zpracování, s národními, resp. mezinárodními standardy. Standardy vznikaly zprvu jako dobrovolná doporučení odborných lékařských společností nebo organizací tkáňových bank (Eastlund a Campagnari, 1992, EATB, 1995). Nevýhodou tohoto postupu je možnost různého nastavení požadavků (přecenění nebo podceňování rizik) i v rámci jedné odborné společnosti. Později, přibližně od roku 1993, se začalo prosazovat stanovení minimálních požadavků na bezpečnost tkáňových transplantátů státem (FDA, 1993, Fragale, 1997). U členských států Evropské unie (EU) je stanovena povinnost věnovat zvýšenou pozornost materiálům biologického původu již v základních dokumentech, tj. Maastrichtské smlouvě z roku 1992, konkrétní směrnice Evropského parlamentu a rady týkající se činnosti tkáňových bank však byla vydána teprve v roce 2004 (European Union, 2004). V této práci se omezujeme na buněčné a tkáňové transplantáty kryokonzervované, vitální, u nichž nelze provést sterilizaci konečného produktu.

V praxi tkáňových bank, včetně pracoviště autora (Měříčka et al. 1989, 1995, 1997, 1999, 2000, 2002, 2003, 2004, 2005, Straková et al. 1994), v současné době převažují metody kryokonzervace založené na rovnovážném zmrazování, resp. Mazurově doufaktorové hypotéze vypracované v 60. letech 20. století (Mazur 1961, 1963, 1966) a použití pronikajících kryoprotektiv (glycerol nebo dimetylsulfoxid). Podstatou těchto metod je prevence vzniku nitrobuněčných krystalů, resp. umožnění adaptace buněk na změněné osmotické poměry při zmrazování pomalou dehydratací, v důsledku které většina vody přítomné ve zmrazovaných buňkách krystalizuje extracelulárně. Obvykle následuje dlouhodobé uložení při teplotách kapalného dusíku. U buněčných a tkáňových transplantátů, u kterých se nepředpokládá dlouhodobé uložení, se uplatňují i mechanická zmrazovací zařízení pracující při teplotách $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a nižších, zajištěná havarijním dochlazováním, nejlépe kapalným dusíkem.

Svoje místo při kryokonzervaci tkání mají i postupy založené na kompletní zábraně krystalizace, resp. vyvolání sklovitého stavu (vitrifikace). Toho lze dosáhnout použitím složitých směsí kryoprotektiv, tzv. vitrifikačních roztoků (Pegg a Diaper 1989, Wusteman et al. 2002, 2003). Tento způsob je obecně považován za perspektivní metodu kryokonzervace orgánů, která je však stále, přes dosažený pokrok, patrně záležitostí vzdálenější budoucnosti (Fahy a Ali 1997, Wowk 2000).

2. CÍLE PRÁCE A ČLENĚNÍ DO KAPITOL

Cílem práce je:

1. Analyzovat trendy vývoje legislativy stanovující požadavky na bezpečnost buněčných a tkáňových transplantací ve světě, Evropské unii a České republice s cílem přizpůsobit metodiky používané na vlastním pracovišti těmto měnícím se nárokům.
2. Vypracovat vhodný systém prevence sekundární a křížové kontaminace během zpracování a skladování buněk a tkání.
3. Analyzovat teplotní podmínky při skladování kryokonzervovaných buněk a tkání s cílem stanovit kritické parametry procesu a nalézt optimální řešení pro klinickou praxi

Aspekty bezpečnosti konzervace buněk a tkání jsou probírány ve třech samostatných kapitolách:

Kapitola 1: Význam porozumění mechanismům poškození zmrazováním a mechanismům kryoprotekce pro praxi buněčných a tkáňových bank.

Kapitola 2: Současná národní transplantační legislativa České republiky a požadavky Směrnice Evropského parlamentu a rady.

Kapitola 3: Buněčná a tkáňová banka jako kombinace kryotechniky a technologie čistých prostor.

3. METODIKA

Metodika kryokonzervace buněčných suspenzí používaná ve Fakultní nemocnici Hradec Králové byla vypracována autorem a jeho spolupracovníky v 80. a 90. letech minulého století a postupně zdokonalována (Měříčka et al. 1987, 1988, 1990, 1991, 1995, 1999, 2003, Bláha et al. 1990). Po řízeném zmrazování v přítomnosti směsi pronikajících a nepronikajících kryoprotektiv je používáno jak skladování při teplotách kapalného dusíku, tak teplota $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Z analýzy vývoje národní, evropské i světové legislativy od 80. let minulého století vyplynula řada změn v požadavcích na standardní postupy používané při organizaci dárcovství provádění odběrů, zpracování konzervací a distribuci buněčných a tkáňových transplantátů.

Transplantační zákon (zákon č. 285/2002 Sb. ze dne 30. 5. 2002 o darování, odběrech a transplantacích tkání a orgánů a o změně některých zákonů) (Ministerstvo zdravotnictví ČR, 2002), který byl přijat po více než 10 let trvající diskusi vzal v úvahu požadavky Evropské konvence o biomedicině (European Treaty Series/164, 1997) a klade velký důraz na respektování autonomie dárce, ať již žijícího nebo zemřelého. To si vynutilo změnu metodiky organizace dárcovství:

1. U žijících dárců nelze ani tzv. chirurgické pozůstatky, např. kůži odebranou při plasticko-chirurgickém zákroku, použít bez informovaného souhlasu dárce.
2. U zemřelých dárců je zachován princip předpokládaného souhlasu s odběrem, je však zaveden registr nesouhlasících osob (Vyhláška č. 434/2004 O podrobnostech, rozsahu, a obsahu povinně uváděných dat do Národního registru osob nesouhlasících s posmrtným odběrem tkání a orgánů) (Ministerstvo zdravotnictví ČR, 2004). Odběrové týmy center pro transplantace orgánů i tkáňových bank jsou povinny ověřit, zda potenciální dárce není zapsán do tohoto registru. V každém případě musí být však rodina informována o předpokládaném odběru. Pokud je potenciální zemřelý dárce nezletilá osoba nebo osoba zbavená svéprávnosti, nelze odběr provést bez souhlasu rodičů nebo zákonných zástupců.
3. Získávání tkání pro experimentální a výukové účely je vždy vázáno na souhlas dárce projevený během života nebo na souhlas pozůstalých.

Transplantační zákon určil i povinnosti tkáňové banky. Ta je v zákoně definována jako zařízení určené k zajišťování odběrů, dalšího zpracování, vyšetřování, konzervace, skladování a distribuce tkáňových štěpů pro transplantace. Tkáňová banka musí být součástí zdravotnického zařízení a lze ji zřídit pouze se souhlasem Ministerstva zdravotnictví. Každá odebraná tkáň musí být zaslána do tkáňové banky s výjimkou případů, kdy odběr i transplantace tkáně probíhají v rámci jednoho operačního výkonu. Směrnice Evropského parlamentu a rady č. 2004/23/EC (European Union, 2004), která platí od 31. 3 2004 předpokládá, že tkáňové a bu-

něčné transplantáty budou poskytovány pouze licencovanými, resp. akreditovanými tkáňovými bankami. Důsledkem těchto ustanovení bylo zahájení procesu licencování tkáňových bank MZ ČR v roce 2004.

Při stanovování požadavků na bezpečnost transplantací se v ČR kromě požadavků uvedených ve výše citované směrnici přihlíželo i k dalšímu dokumentu, který, zpracovala Rada Evropy a má charakter doporučení členským státům této organizace (Rada Evropy, 2002). Všechny uvedené normy respektují Evropskou konvenci o biomedicině (European Treaty Series/164, 1997). Rozsah jejich působnosti je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1: Rozsah působnosti národní normy ČR a nadnárodních norem a doporučení regulujících tkáňové transplantace.

	Transplantační zákon ČR	Doporučení Rady Evropy	Směrnice 2004/23/EC
Orgány	Zahrnuje	Zahrnuje	Nezahrnuje
Autologní buňky a tkáň	Zahrnuje	Zahrnuje	Zahrnuje
Allogenní buňky a tkáň	Zahrnuje	Zahrnuje	Zahrnuje
Gamety	Nezahrnuje	Nezahrnuje	Zahrnuje
Fetalní a embryonální buňky	Nezahrnuje	Nezahrnuje	Zahrnuje

Při vypracovávání specifikací kryokonzervovaných buněčných a tkáňových štěpů, standardních operačních postupů jejich přípravy a propouštění a volbě kontrolních metod splňujících nové požadavky na jejich kvalitu a bezpečnost, jak byly uveřejněny na internetových stránkách MZ ČR (Ministerstvo zdravotnictví ČR, 2004), autor vyšel z analogie přípravy těchto štěpů s výrobou sterilních léčivých přípravků a postupoval podle pravidel Správné výrobní a distribuční praxe uveřejněné ve Věstníku SÚKLu – mimořádné monotematické publikaci z roku 1998 (Pospíšilová 1998).

Problematiku prevence přenosu infekce transplantovanou tkání autor dělí na dva základní okruhy otázek. První okruh se týká dárce, jeho serologické kontroly, archivace séra a dekontaminace, resp. kontroly odebrané tkáně. Tato problematika je již poměrně dobře literárně zpracována (Veen, 1994, Warwick a Kearney, 2002, Eastlund a Strong, 2003, Martinez, 2003). Zkušenosti autora s řešením těchto problémů u dárců solidních tkání, resp. kožních krytů, jsou shrnuty v publikaci New Safety Assurance for Biological Skin Covers (Měřička et al., 2002) i některých dalších pracích (Měřička et al., 1989, Měřička et al., 1996–97). Podmínky zdravotní způsobilosti dárce jsou již i předmětem vyhlášky Ministerstva zdravotnictví (Vyhláška o zdravotní způsobilosti dárce tkání a orgánů pro účely transplantací č. 437/2002 Sb.) (Ministerstvo zdravotnictví ČR, 2002).

Druhý okruh problémů, který je dosud literárně málo zpracován, se týká zpracování odebraných tkání. Jsou to zejména:

1. Prevence křížové kontaminace během odběru, zpracování a skladování tkání.
2. Prevence sekundární kontaminace během odběru, zpracování a skladování tkání.
3. Prevence, resp. minimalizace růstu mikroorganismů během zpracování a skladování, resp. stanovení kritických parametrů procesu skladování tkání.

V řešení těchto otázek je hlavní těžiště metodického příspěvku autora k řešení problému bezpečnosti buněčných a tkáňových transplantací. Zavedení moderních metod prevence sekundární a křížové kontaminace by nebylo možné bez předchozí realizace autorova návrhu na výstavbu nového pracoviště, koncipovaného jako kombinace kryotechniky a technologie čistých prostor, při jehož projekci se postupovalo podle standardů International Society for Pharmaceutical Engineering (ISPE) (The Society for Pharmaceutical and Medical Devices Professionals 1999) (Měříčka et al., 2004). Projekce a realizace stavby proběhla v letech 1998–2003 (Tabulka 4). Finanční podporu poskytlo Ministerstva zdravotnictví ČR a Fakultní nemocnice Hradec Králové.

Tabulka 4: Postup realizace výstavby a uvedení do provozu nového pracoviště.

Projekt	1998–1999	Ateliér H1Hájek, s.r.o. Hradec Králové
		Chironax Projekt, Praha
Posouzení projektu	1999	GM Projekt Opava, SÚKL, MZ ČR
Realizace stavby	2000–2002	Stako, Hradec Králové
Zkušební provoz, validace čistých prostor a technologie	2002–2004	GM Projekt Opava, Labox Praha, ITEST Plus, s. r. o. Hradec Králové
Získání licence MZ ČR	2004	
Trvalý provoz	leden 2005	

Prevence křížové kontaminace se provádí především vyloučením kontaktu tkání odebraných od různých dárců během zpracování a oddělením skladování nepropuštěných a propuštěných produktů. Zvláštní pozornost tomuto problému věnuje autor při řešení systému skladování koncentrátů krvetvorných buněk pro autologní i alogenní transplantace vzhledem k doloženým případům přenosu hepatitidy při skladování kryokonzervované krve pod hladinou kapalného dusíku (Tedder et al 1995, Hawkins et al. 1996).

Hlavní metodou, kterou autor použil při prevenci sekundární kontaminace při přípravě buněčných koncentrátů a solidních tkáňových štěpů určených ke kryokonzervaci je aplikace aseptické technologie s použitím čistých prostor.

Hlavní metodou prevence růstu mikroorganismů během zpracování a skladování tkání je důsledná kontrola chladicího řetězce, resp. stanovení operačních a procesních limitů teploty v souladu se standardy ISPE (The Society for Pharmaceutical and Medical Devices Professionals, 1999).

Specifickým požadavkem národní legislativy i legislativy EU je zajištění vysledovatelnosti cesty od dárce k příjemci při současném zachování anonymity dárce. Autor navrhl a realizoval zajištění tohoto požadavku pomocí štítků, na kterých je uvedeno číslo každého štěpu obsahující jak identifikaci tkáňové banky, charakteristiky štěpu i anonymizovanou identifikaci dárce. Podoba štítku vznikla modifikací systému používaného v transfuzní službě pro štítkování propuštěných přípravků (MZ ČR 1997).

4. VÝSLEDKY

4.1 Důsledky legislativních změn pro metodické postupy při organizaci dárcovství, odběrech a zpracování buněk a tkání

4.1.1 Změny v organizaci dárcovství a provádění odběrů

Důsledky legislativních změn na organizaci dárcovství jsou uvedeny podrobně v kapitole 2 a jejích přílohách. Autor zde uvádí vlastní postupy pro organizaci dárcovství včetně včetně příkladů informovaných souhlasů pro odběr buněk tkání od žijících dárců a pro odběry buněk a tkání pro experimentální účely i příklady písemných informací pro rodinu zemřelých dárců. Tyto postupy byly vypracovány ve spolupráci s odběrovými centry uvnitř nemocnice (Regionální transplantační centrum při urologické klinice, Transplantační centrum oddělení klinické hematologie II. Interní kliniky, Porodnická a gynekologická klinika, Ortopedická klinika) i mimo ni (Ortopedická oddělení nemocnic v Náchodě, Rychnově nad Kněžnou a České Lípě). V přílohách kapitoly 2 jsou uvedeny rovněž příklady specifikací odebraných buněk a tkání i finálních produktů, kryokonzervovaných buněčných a tkáňových štěpů a standardní operační postupy pro odběry i zpracování buněk a tkání před kryokonzervací včetně jednoznačného definování používaných metod kontroly a dlouhodobé archivace séra dárců.

Etická a právní problematika odběru a konzervace tkání je dále rozvedena v příložených publikacích Úvod do transplantace tkání (Měříčka 2002) a Etické zásady při využívání lidských tkání pro vědecké účely (Červinka a Měříčka 2001) i v publikacích uvedených v seznamu literatury autora (Měříčka 1991, Hanuš a Měříčka 1994). V kapitole 2 autor rovněž uvádí příklady vlastního přínosu k vypracování národní legislativy a svoje návrhy, které vedly k ustavení první komise pro odběry a transplantace tkání v roce 1996, na jejíž činnost navázala komise pro buněčné a tkáňové transplantáty založená při MZČR v roce 2004 (Měříčka, 1996, 1997, Měříčka et al. 2004).

4.1.2 Výsledky procesu licencování tkáňových bank v ČR

Tkáňové banky byly na základě licenčního řízení rozděleny do kategorií podle spektra připravovaných štěpů. Kategorie bank a počty vydaných licencí pro jednotlivé kategorie k 31. 12. 2004 (Ministerstvo zdravotnictví ČR 2004 b) jsou uvedeny v tabulce 2. Platnost všech udělených licencí je 2 roky. Odběrové týmy licencovaných bank získaly oprávnění nahlížet do registru osob nesouhlasících s posmrtným odběrem tkání a orgánů.

Tabulka 2: Počty licencovaných tkáňových bank v ČR k 31. 12. 2004.

Kategorie tkáňové banky	Zkratka	Počet
Oční tkáňová banka	OTB	2
Kostní tkáňová banka	KTB	12
Specializovaná tkáňová banka	STB	1
Buněčná tkáňová banka	BTB	2
Multifunkční tkáňová banka	MTB	2
Celkový počet licencovaných bank		19

Získání licence bylo i podmínkou hrazení produktů příslušné tkáňové banky pojišťovnou na základě její vlastní kalkulace zpracované na neziskovém principu a osvobozené od daně z přidané hodnoty. Číslo licence musí být uvedeno na štítku označujícím každý produkt tkáňové banky (Obr. 4). Na neziskovém principu je postavena i úhrada nákladů jednotlivých odběrových center mimo fakultní nemocnici, s nimiž má Fakultní nemocnice uzavřeny smlouvy. Počet bank, jejichž produkty hradí pojišťovny, je uveden v tabulce 3.

Tabulka 3: Změny počtu tkáňových bank uvedených na seznamu VZP v letech 1993–2005.

Rok	Monobanky	Multifunkční banky	Celkem
1993	4	2	6
2004	6	3	9
2005	5	2	7

4.2 Prevence sekundární a křížové kontaminace a kontrola chladicího řetězce

4.2.1 Prevence sekundární kontaminace

Autorovým přínosem k prevenci sekundární kontaminace podrobně rozvedným v kapitole 3 je v ČR prioritní použití aseptické technologie čistých prostor pro přípravu buněčných a tkáňových transplatátů určených ke kryokonzervaci. Ukázka práce v čistých prostorech při mísení kryoprotektivního roztoku pro konzervaci tkáňového štěpu je uvedena na obr. 1. Operátor čistých prostor je oblečen do antiemisní kombinézy pro pobyt ve třídě čistoty B. Vlastní práce je prováděna na ploše pod laminárním stropem zajišťujícím třídu čistoty A.

4.2.2 Prevence křížové kontaminace

Důležitým preventivním opatřením je již stavební oddělení vlastní tkáňové banky od odběrového centra v němž probíhá i první karanténní skladování odebra-



Obr. 1: Činnost operátora v čistém prostoru.



Obr. 2: Průběh validace 2 nízkoteplotných zařízení, levé slouží pro skladování nepropuštěných, pravé pro skladování propuštěných produktů.

ných tkání do doby než jsou známy výsledky všech testů dokumentujících zdravotní způsobilost dárce. Dalším opatřením je oddělení skladování nepropuštěných a propuštěných tkání (Obr. 2).

Vlastní přístup k řešení prevence křížové kontaminace při skladování buněčných štěpů při teplotách kapalného dusíku založený na pečlivém vyhodnocení serologické kontroly dárců, resp. pacientů je uveden v příložených publikacích: The risk of infection transmission from blood progenitor cell concentrates (Bláha et al 2003) a Our system of cross-contamination prevention during storage of haematopoietic progenitor cells (Měřička et al. 2003). Koncentráty od dárců nebo pacientů s markery aktivní infekce nejsou skladovány pod hladinou dusíku ale v jeho parách, v případě nálezu markerů hepatitidy je voleno výhradně skladování při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Tabulka 5).

Tabulka 5. Systém prevence křížové kontaminace volbou optimálního způsobu skladování koncentrátů krvetvorných buněk (Měřička et al. 2003).

Způsob skladování	Procento vzorků
Kapalný dusík kapalná fáze	60
Kapalný dusík plynná fáze	33
Mechanické zmrazovací zařízení $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$	7

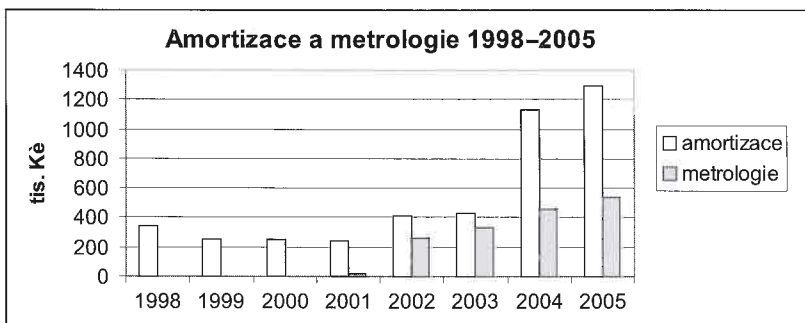
4.3 Stanovení kritických parametrů procesu skladování

V kapitole 3 jsou uvedeny výsledky analýzy kritických parametrů procesu skladování buněk při nadnulových teplotách (skladování meziproductů před kryokonzervací) i podnulových teplotách (páry i kapalná fáze dusíku, mechanické zmrazovací zařízení).

Operační a procesní limity teplotních poměrů (The Society for Pharmaceutical and Medical Devices Professionals, 1999) ve zmrazovacích a chladicích zařízeních, které představují kritické parametry procesu skladování kryokonzervovaných buněk a tkání, byly stanoveny na základě validace nezávislou osobou a jsou uvedeny v tabulce 6. Snímání dat přenosným validátorem pomocí multikanálových čidel je znázorněno na obr. 2.

Tabulka 6: Operační a procesní limity teplot ve zmrazovacích a chladicích zařízeních.

	Operační limity teplot ($^{\circ}\text{C}$)	Procesní limity teplot ($^{\circ}\text{C}$)
kapalný dusík – plynná fáze	-195.8 až -167.3	-195 až -130
kapalný dusík – kapalná fáze	-197.7 až -186.7	-199 až -150
mechanické zmrazovací zařízení $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$	-88.5 až -74.3	-90 až -70
farmaceutická chladicí skříň $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$	+0.2 až +9.2	+0.1 až +9.5



Obr. 3: Vzrůst nákladů na amortizaci základních prostředků a metrologii.

Tkářová ústředna Fakultní nemocnice v Hradci Králové
 ČLEN EVROPSKÉ ASOCIACE TKÁŘOVÝCH BANK, SOKOLSKÁ 534, 500 05 HRADEC KRÁLOVÉ

Č.LICENCE MZČR – MTB006

**ALOGENNÍ DERMOEPIDERMÁLNÍ
 KRYOKONZEROVANÝ ŠTĚP**
230 04 KU 005 08 280 CM²

KÓD VZP: 43106

DÁRCE VYHOVUJE V PŘEDEPSANÝCH TESTECH

DIAGNÓZA DÁRCE I 60.2

DEKONTAMINOVÁNO 5% BETADINEM

KONZERVOVÁNO 10% DMSO

SKLADOVAT PŘI TEPLOTĚ –80°C A NIŽŠÍ

SPOTŘEBOVAT DO 5.8.2005

BAKTERIOLOGICKÝ NÁLEZ: NEGATIVNÍ

**UPOZORNĚNÍ: ZE VNÍ OBAL NENÍ STERILIZOVÁN. ASEPTICKY
 MANIPULUJTE POUZE S OBSAHEM VNITŘNÍHO
 ZATAVENÉHO SÁČKU**

Obr. 4: Štítek pro označení propuštěného kryokonzervovaného alogenního dermoepidermálního transplantátu. Každý štěp je označen unikátním číslem, které začíná kódem 230 přiděleným tkáňové bance Všeobecnou zdravotní pojišťovnou a rokem přípravy (2004). Dále je uvedena zkratka druhu tkáně (Ku) pořadové číslo štěpu v roce (5) a pořadové číslo dárce v roce (8). Štítek též obsahuje identifikační kód druhu štěpu přidělený pojišťovnou (431 06), údaje o jeho rozměrech, metodice zpracování, instrukci pro skladování a expirační dobu a instrukci pro manipulaci se štěpem před použitím. Po použití štěpu se štítek vlepi do dokumentace příjemce.

Nezbytné kalibrace a validace techniky i čistých prostor vedly ke značnému zvýšení nákladů na metrologii v rámci celého pracoviště, (obr. 3). Zvyšující se náklady na amortizaci od roku 2001 odrážejí postupné vybavování pracoviště novou technikou.

4.4 Zajištění výsledovatelnosti

Řešení problému výsledovatelnosti při zachování anonymity dárce pomocí štítků je uvedeno na obrázku 4.

5. DISKUSE

Legislativní změny, které probíhají od roku 2002 a dosud nebyly ukončeny, znamenají nejradikálnější změnu v postavení tkáňových bank a nárocích na jejich činnost v jejich více než 50leté historii (Klen 1952, 1954, 1957, Měřička, 2000, Plášilová, 2001) V roce 2002 došlo poprvé k regulaci jejich činnosti na úrovni zákona, přestože první návrh příslušného zákona byl publikován již v 50. letech (Dostál, 1954, Klen, 1957). Již na počátku 90. let bylo zřejmé, že je třeba nahradit tehdy existující regulaci transplantační problematiky pomocí podzákonných norem speciálním zákonem. Autor aktivně prosazoval zařazení regulace činnosti tkáňových bank do tohoto zákona publikacemi (Měřička, 1991, Hanuš a Měřička, 1994 a,b), činností v komisích pro odběry a transplantace tkání, během přípravy zákona i v rámci připomínkového řízení. Přijetím transplantačního zákona se značně zpřísnily podmínky získávání tkání od žijících a zejména zemřelých dárců i nároky na technické vybavení a personál tkáňových bank. To ve svých důsledcích vedlo ke snížení počtu bank s oprávněním k distribuci, tedy těch, jejichž produkty hradí pojišťovna (Tab. 3). Změny zákonů, přijaté současně s transplantačním zákonem, upravily i tak citlivé otázky, jako jsou úhrady nákladů spojených s odběry, zpracováním a vyšetřováním a skladováním tkání zdravotními pojišťovnami, a to v plném souladu s konvencí o biomedicině (European Treaty Series/164/1997) a jejím doplňkovým protokolem (Council of Europe, 2002). Následně bylo zákonem vyřešeno i osvobození těchto činností od DPH (Zákon č.235/2004 Sb.). Tím byly vytvořeny podmínky, aby tkáňovým bankám byly uhrazeny náklady, jejichž výše v důsledku zvýšených nároků na kvalitu a bezpečnost v posledních letech rostla (Obr. 3). Spolu s pravidelným sledováním dat o provedených odběrech a transplantacích tkání, prováděných Komisí pro buněčné a tkáňové transplantáty při Ministerstvu zdravotnictví ČR (Měřička et al., 2004) a Koordinačním střediskem transplantací, tak byly vytvořeny podmínky pro plnou transparentnost činnosti tkáňových bank.

Zavedení systému jistění jakosti si vyžádalo přesné definování kvalitativních parametrů každého druhu štetu ve specifikacích, což umožňuje průběžné vyhodnocování shody a provedení nápravných opatření, včetně případných změn standardních operačních postupů.

Odběry pro experimentální účely zůstávají součástí činnosti tkáňových bank, samozřejmě po schválení experimentálního projektu příslušnou etickou komisí. I tato činnost tkáňových bank je centrálně evidována. Jednoznačnou tendencí je náhrada experimentálního použití tkání odebraných od zemřelých dárců tkáněmi odebranými od žijících dárců nebo tkáněmi xenogenními.

Z hlediska bezpečnosti řeší národní legislativa pouze první okruh problémů, týkající se posouzení zdravotní způsobilosti dárce. Stanovení podmínek pro druhý

okruh problémů spojený se zpracováním tkání se očekává teprve po přijetí zvláštní národní normy vycházející ze Směrnice Evropského parlamentu a rady z roku 2004. Tato národní norma by měla upravit i podmínky licencování tkáňových bank.

Výrazný vzrůst nároků na bezpečnost buněčných a tkáňových transplantací potvrdil správnost dlouhodobé orientace autora na postupné zavádění aseptické technologie přípravy vitálních transplantátů při splnění technických požadavků platných ve farmaceutické výrobě. Tento postup výrazně usnadnil získání licence MZ ČR v roce 2004 a dává předpoklady pro její obhájení po přijetí výše uvedené národní normy.

Kryokonzervované tkáňové a buněčné štěpy připravované za těchto podmínek představují přijatelný kompromis mezi biologickou účinností a bezpečností produktu. Na jedné straně sice dochází při kryokonzervaci přibližně 30 % ztrátě živých buněk (Měřička et al. 1995, 1999), na druhé straně kryokonzervace umožňuje dokonalé vyhodnocení všech parametrů dárce i vlastního štěpu, které nejsou v době odběru známy, resp. kdy provedení kontrolních testů vyžaduje delší dobu, obvykle 14 až 21 dnů (kapitola 2, příloha). Při dodržení operačních a procesních limitů při skladování v podnulových teplotách (Tab. 5) zcela odpadá problém možného růstu mikroorganismů. To je nesporná výhoda před konzervací prostou hypotermií, kde maximální doba skladování je prakticky totožná s dobou nutnou pro provedení mikrobiologických kontrolních testů. I při dodržení limitů teploty uvedených v tabulce (Tab. 5), mikrobiologický nález zjištěný v době zpracování štěpu nemusí odpovídat skutečnosti při jeho výdeji pro klinické použití. Toto nebezpečí při hypotermní konzervaci alogenních dermoepidermálních štěpů a rohovky bylo známo již z publikace Klena a Hegera z 60. let (Klen a Heger 1969) a je stále aktuální i při použití chladicích aparatur předních světových výrobců. Aplikace současných metodických postupů predikce růstu mikrobu známých z potravinářské výroby (Měřička et al. 2003, 2005, Landfeld et al. 2005 a,b) na tento problém by umožnila toto nebezpečí kvantifikovat. Zavádění těchto metod na pracovišti autora je v současné době podporováno grantem a výzkumným záměrem Ministerstva zemědělství a výživy č 1B44040, VÚPP Mze 0002702201. Ještě větší význam přikládá autor pespektivnímu použití prediktivní mikrobiologie v případech, kdy po nezbytné úpravě buněčného štěpu následuje jeho kultivace za normotermních podmínek, jak je tomu při použití metod buněčného a tkáňového inženýrství v tzv. buněčných továrnách (Giordano et al. 2004).

Analýza rizika křížové kontaminace provedená na souboru dárců, resp. pacientů u nichž byly odebrány a konzervovány krvetvorné buňky, ukázala, že hlavním potenciálním zdrojem je výskyt aktivní virové infekce u dárce nebo pacienta. Pod hladinou kapalného dusíku, tj. za nestabilnějších teplotních podmínek je podle zkušeností autora možno skladovat koncentráty od více než 50 % pacientů, resp. dárců (Měřička et al. 2003, Bláha et al. 2003). U solidních štěpů u nichž je vyšší výskyt bakteriální kontaminace (např. dermoepidermální štěpy) je volen výhradně způsob

skladování v mechanickém zmrazovacím zařízení jištěném havarijním dochlazením kapalným dusíkem (Měříčka et al. 2002).

Řešení problému vysledovatelnosti pomocí štítků se plně osvědčilo. Obsažené údaje patrně vyhoví i novým požadavkům jednotného systému značení produktů tkáňových bank členských států EU. Podoba štítku se od dříve publikované verze, (Měříčka et al. 2002), změnila minimálně. Po proběhlém licenčním řízení, byl pouze doplněn povinný údaj, číslo licence MZ ČR. Štítek tak obsahuje dvojí identifikaci producenta: Číslo licence MZ ČR a číslo přidělené Všeobecnou zdravotní pojišťovnou. Tato dvojí identifikace není samoučelná, neboť identifikační číslo přidělené tkáňové bance pojišťovnou, spolu s identifikačním kódem druhu štěpu, jednoznačně dokumentuje, že jde o pojišťovnou hrazený produkt.

CÍLE PRÁCE byly splněny, výsledky byly předneseny na konferencích v ČR i v zahraničí a publikovány. Praktickým výstupem práce bylo získání nejširšího typu licence MZ ČR a vytvoření předpokladů pro její obhájení po přijetí národní normy pro bezpečnost buněčných a tkáňových transplantátů.

6. ZÁVĚRY

Legislativní změny, které nyní probíhají v ČR představují největší změnu v nárocích na činnost tkáňových a buněčných bank v jejich více než 50leté historii.

Národní legislativa ČR představovaná Transplantačním zákonem a doprovodnými vyhláškami řeší otázky související s ochranou autonomie žijícího a zemřelého dárce a definuje povinnosti tkáňových bank, které odpovídají za kvalitu a bezpečnost připravených buněčných a tkáňových transplantátů lidského původu.

Z otázek bezpečnosti řeší národní legislativa pouze okruh problémů spojených s posouzením zdravotní způsobilosti dárce, další otázky, které se týkají zajištění bezpečnosti při zpracování, konzervaci skladování a distribuci tkání, včetně stanovení podmínek pro licencování tkáňových bank, budou řešeny zvláštní normou, která vychází z požadavků Směrnice Evropského parlamentu a rady ze dne 31. 3. 2004.

Hlavní přínos práce je v aplikaci současných metod prevence sekundární kontaminace použitím technologie čistých prostor pro zpracování buněk a tkání před kryokonzervací, která je v ČR prioritní a vypracování postupu prevence křížové kontaminace při skladování kryokonzervovaných buněk a tkání. Aplikace těchto metod byla umožněna realizací návrhu autora, koncipovat moderní tkáňovou banku orientovanou na přípravu kryokonzervovaných buněčných a tkáňových transplantátů jako kombinaci kryotechniky a technologie čistých prostor.

Kryokonzervované solidní tkáňové štěpy podle zkušeností pracoviště autora představují akceptabilní kompromis mezi klinickou účinností a bezpečností, u štěpů chlazených by bylo možno ke kvantifikaci rizika využít metod prediktivní mikrobiologie.

Z hlediska dodržení stability fyzikálních parametrů při skladování kryokonzervovaných štěpů krvetvorných buněk se jeví jako optimální skladování pod hladinou kapalného dusíku. Tento způsob lze s ohledem na prevenci křížové kontaminace použít u koncentrátů krvetvorných buněk, které pocházejí od dárců nebo pacientů s negativním nálezem markerů aktivní infekce, tj. v souboru osob sledovaných autorem u více než poloviny skladovaných koncentrátů.

Koncentráty pocházející od osob s pozitivními markery aktivní infekce jsou skladovány v parách dusíku, v případě těžkých infekcí (hepatitida) výhradně v mechanickém zmrazovacím zařízení.

U solidních tkáňových štěpů, u nichž je pravidlem výskyt bakteriální kontaminace, např. dermoepidermálních, dává autor z důvodů prevence křížové kontaminace rovněž přednost skladování v mechanických zmrazovacích zařízeních.

7. SUMMARY

CONTRIBUTION TO SAFETY ASSURANCE IN THE CRYOPRESERVATION OF CELLS AND TISSUES FOR CLINICAL TRANSPLANTATION

Aim of the study: The aim of the study was to analyse and to meet in practice current requirements on the safety and quality assurance in collection, processing and cryopreservation of cells and tissues. The new high requirements were set by recent changes in the national legislation of the Czech Republic (Act No. 285/2002) and especially by coming into force of the new legislation of the European Union (Directive 2004/23/EC). It is required, now that a system of safety and quality assurance known from pharmaceutical industry be established in the tissue banks and that the tissue banks be licensed or accredited by a national authority. The study was limited to safety assurance in manufacturing cryopreserved, ie viable cell and tissues grafts that cannot be terminally sterilized.

Methods: The cryopreservation methodology used in the Tissue Bank of the University Hospital Hradec Králové was elaborated by the author and his co-workers in the 80s and 90s and regularly upgraded. The controlled-rate freezing in presence of a mixture of penetrating and non-penetrating cryoprotectants is followed by storage at liquid nitrogen temperatures or in mechanical freezers operating at temperature of -85°C . The Transplantation Act (Act No. 285/2002) regulates cell, tissue and organ transplantations and defines the duties of tissue banks. The safety aspects covered by this act are oriented only to defining the contraindications of the cell, tissue and organ donation and assuring the traceability. For this reason the issue of the possibility of infection transmission by transplanted tissue was divided into 2 major groups of tasks. The first one deals with the donor suitability including the serological testing of the donor and long-term archivation of the donor serum as well as with decontamination of the collected tissue. There have been already many publications dealing with this issue and criteria of the suitability of the donor were settled by the Decree of the Ministry of Health of the Czech Republic No 437/2002 Sb. The references dealing with the second issue, the safety assurance in tissue processing preservation and storage, are sparse. As there was not any specific national regulation of these issues the author used the principles of Good Manufacturing Practice of sterile drugs published by the State Institute of Drug Control in Prague in 1998 to elaborate specifications of cell and tissue grafts, to establish or change existing standard operation procedures for processing and cryopreservation, storage and releasing the grafts for clinical application as well as to select appropriate control methods. A special attention was

paid to elaboration special rules for storage at liquid nitrogen temperatures as the cases of cross contamination by hepatitis B virus were described by Tedder in storage of red blood cells in the liquid phase of nitrogen in 1995.

Results: Examples of specifications of collected tissues and manufactured cryopreserved cell and solid tissue grafts are included in the appendix of this thesis. Examples of standard operating procedures for donation, processing and preservation of cells and tissues collected both in living and deceased donors are included as well. The appendix includes also template forms of labels designed by author and used for traceability assurance. These labels are used exclusively for labeling grafts released for clinical application that are stored separately from grafts that did not undergo the output control. The labels contain a unique graft identification number consisting of the code of the producer, the type of tissue preserved, the tissue split number, the donor identification number and the year of manufacturing.

The system of prevention of secondary contamination is based on using clean-room technology for processing of viable cells and tissues before cryopreservation. Processing of cell concentrates or solid tissue samples is performed in the environment of the grade A with the background B, regularly validated by an authorized company. The system of cross contamination prevention during long-term storage of cells is based on meticulous evaluation of the results of serological testing of the donor and/or patient and decision on the optimal storage conditions according to the results of this evaluation. The cell or tissue samples originating from donors or patients free of any markers of active infection can be stored in the liquid phase of liquid nitrogen, the samples originating from donors or patients with markers of active severe infection, such as hepatitis, are stored in the mechanical freezers exclusively. The rest of samples is stored in the vapour phase of liquid nitrogen. The analysis of stability of physical parameters during storage confirmed that temperature stability is achieved best in storage in the liquid phase of the liquid nitrogen. With regard to the possibility of cross contamination prevention described above this way of long-term storage can be used in more than 50% of stored concentrates in the investigated group of persons. In solid tissue grafts with regular findings of bacterial contamination, such as skin, storage in mechanical freezer is preferred.

Discussion and conclusions: The Transplantation Act that was approved by the Parliament and Senate of the Czech Republic after a long-time lasting discussions in 2002 implements into the national legislation high standards of protection of the autonomy of the cell, tissue or organ donor set by the The European Convention on Human Rights and Biomedicine. The author contributed to covering both tissue and organ transplantation by a single act by his publications, active participation in committees of experts in the field of cell and tissue banking and transplantation as well as during preparation of drafts of the Act. The Act contains an important safety

requirement, traceability of the way from the donor to the host of the transplanted tissue and back together with strict keeping of anonymity of the donor. The labeling system used by author since 1998 meets this requirement. The safety aspects of cell and tissue banking in general are expected to be a subject of the future special national legal norm. Application of methods of prevention of secondary and cross contamination was possible because of acceptance of the author's proposal to design and to build a new cell and tissue establishment as a combination of cryogenic and clean-room technology. The proposal was submitted in 1998 and the facility was built in the years 2000–2002 with the financial support of the Ministry of Health of the Czech Republic and University Hospital Hradec Králové.

The aim of the study was achieved and the results were published; full texts of publications are attached. The practical result was receiving a licence of the Ministry of Health of Czech Republic to operate a multifunctional cell and tissue establishment in the University Hospital Hradec Králové.

8. SEZNAM VYBRANÉ LITERATURY

1. Bláha, M. et al.: Transplantace buněk krvetvorby z periferní krve – první zkušenosti. *Vojenské zdravotnické listy*, LIX, 1990, p. 218–223.
2. Bláha, M. et al.: The risk of infection transmission from blood progenitor cell concentrates. *Journal of Hemotherapy and Stem Cell Research*, 12, 2003, p. 161–164.
3. Červinka, M., Měřička, P.: Etické zásady při využívání lidských tkání pro vědecké účely. In: Veselská, R., Kuře, J. (eds.): *Sborník k interdisciplinární konferenci*, 1. vyd. Brno, Institut pro bioetiku, 2001, p. 21–27.
4. Convention for Protection of Human Rights and Dignity of the Human Being with Regard to the Application of Biology and Medicine: *Convention on Human Rights and Biomedicine* – Oviedo, 4.IV.1997 – *European Treaty Series/164*.
5. Council of Europe: *Additional Protocol to the Convention on Human Rights and Biomedicine, on Transplantation of Organs and Tissues of Human Origin*. In: *Council of Europe: Guide to safety and quality assurance for organs, tissues and cells*. 1st edition. Council of Europe Publishing, Strasbourg, 2002, p.79–87.
6. Council of Europe: *Guide to safety and quality assurance for organs, tissues and cells*. 1st edition. Council of Europe Publishing, Strasbourg, 2002, p. 5–78.
7. Diringer, H., Braig, H.R.: Infectivity of Unconventional Viruses in Dura Mater. *Lancet I*, 1989, p. 439–440.
8. Dostál, F.: Návrh zákona o činnosti tkáňových ústředí. In: *Kolektiv autorů: Transplantace tkání. Státní zdravotnické nakladatelství*, Praha, 1954, p. 92–95.
9. Dřížhal, I. et al.: Guided tissue regeneration in dentistry-clinical and biological aspects. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 44, 2001, p.48–48
10. Eastlund, T.D., Campagnari, K.D.: *Standards of the American Red Cross Tissue Services*, Fourth Edition. The American Red Cross Tissue Services, Washington, 1992, 109 p.
11. Eastlund, T, Strong, M.D.: Infectious disease transmission through tissue transplantation. In: *Advances in Tissue Banking 7*, World Scientific Publishing, Singapore, New Jersey, London, Honk Kong, 2003, p. 51–131.
12. European Association of Tissue Banks: *General Standards for Tissue Banking*. 'OBIG-Transplant, Vienna 1995.
13. European Union, The European Parliament and The Council: *Directive 2000/43/EC of the European Parliament and of the Council on setting standards of the quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells*. Strasbourg, 2004, 41 p.
14. Fahy, G.M., Ali, S.E., Levy, D.I.: Physiology of Rabbit Kidneys After Perfusion with VS 4, *Cryobiology*, 31, 1994, p. 573.
15. Food and Drug Administration: *FDA Interim Rule for Human Tissue Intended for Transplantation*, December 14, 1993, *Federal Register*, Vol.58, No238, p.65514
16. Fragale, D.A.: Regulatory models for safety and quality of allografts: USA (heart valves). In: *Advances in Tissue Banking*, vol. 1, Phillips, G.O., Von Versen, R., Strong, D.M., Nather, A. (Eds.), World Scientific, Singapore, New Jersey, London, Hong Kong, 1997, p. 13–21.
17. Giordano, R. et al.: Clinical grade cell manipulation. *Vox Sanguinis* 87, 2004, p. 65–72.
18. Hanuš, H. et al.: *Vybrané kapitoly z lékařské psychologie*. Karolinum, Praha, 1994 1. vydání, 125 p.
19. Hanuš, H., Měřička, P.: O posledních věcech člověka. *Lék. Zpr. LFUK, Hradec Králové*, 39, 1994, p. 113–122.

20. Hawkins, A.E. et al.: Hepatitis B nucleotide sequence analysis: linking an outbreak of acute hepatitis B to contamination of a cryopreservation tank. *J. Virol. Methods*, 1996, Vol. 60b, p. 81–88.
21. J. S. Du Pont: Regulatory models for safety and quality of allografts: Europe. In: *Advances in Tissue Banking*, vol. 1, World Scientific Singapore, New Jersey, London, Hong Kong, 1997, p. 3–12.
22. Khuu, H.M. et al.: Catastrophic failures of freezing bags for cellular therapy products: description, cause, and consequences. *Cytherapy* 4, 2002, p. 539–549.
23. Klement, N.: Czechs exporting body parts? Newsview, Friday December 21st, 2001. Czech Radio, English section file://A:/pa.
24. Klen, R.: Tkáňová ústředna (TÚ). *Čs nemocnice* 20, 1952, p. 120–121
25. Klen, R.: Odběr a přechovávání štěpů k transplantacím. In: *Kolektiv autorů: Transplantace tkání. Státní zdravotnické nakladatelství, Praha, 1954, p.13–21.*
26. Klen, R.: Odběr a konzervace tkání – biologické základy. *Státní zdravotnické nakladatelství, Praha, 1957, 275 p.*
27. Klen, R., Heger, J.: A contribution to degradation of skin and cornea preserved hemibiotically in the temperature near 0°C. *Acta Chirurgiae Plasticae*. 11, 1969, p.47–55
28. Landfeld, A. et al.: Termoinaktivace a baroinaktivace vybraných mikroorganismů a růstový model *E. faecium*. *Výzkumná zpráva VÚPP č. 9/360/2005, Mze 1B44040, p.28*
29. Landfeld, A., Houška, M., Měříčka, P.: Matematické modelování růstu patogenních mikroorganismů v mateřském mléce – odhad rizika. *Výzkumný záměr VÚPP, Mze 0002702201, 2005*
30. Martinez, O.V. et al.: Blood and marrow cultures as indicators of bone contamination in cadaver donors. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 409, 2003, p. 317–324
31. Mazur, P.: Physical and Temporal Factors Involved in the Death of Yeast at Subzero Temperatures, *Biophys. J.*, 1, 1961: p. 247–264.
32. Mazur, P., Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing, *J. Gen. Physiol.*, 47, 1963, p. 347–369.
33. Mazur, P.: Theoretical and Experimental Effects of Cooling and Warming Velocity on the Survival of Frozen and Thawed Cells, *Cryobiology*, 2, 1966, p. 181–192.
34. Mazur, P.: Physical and Chemical Basis of Injury in Single-celled Micro-organisms Subjected to Freezing and Thawing, In: *Meryman, H.T., Cryobiology. Academic Press, London and New York 1966, p. 214–315.*
35. Měříčka, P. et al.: Problems encountered in banking biological coverings for treatment of burns. In: *W.Boecks, J. Moserová (eds.) Progress in Burn-Injury Treatment, Proceedings of the Third Congress of the European Burns Association, Prague, October 4–7, 1989. Aco Leuven, Amersfoort, 1990, p.85–87*
36. Měříčka, P., Klein, L., Levínská, M.: Activity of Tissue Bank in Treatment of Burns. *Roczniki Oparzen/ Annals of Burns*, vol. 2, 1991, p.134–137
37. Měříčka, P.: Etické otázky odběru a transplantace tkání. *SCAN* 1, 1991, p. 8–9.
38. Měříčka, P. et al.: Cryopreservation of peripheral blood stem cells. In: *Proceedings of the XIXth International Congress of Refrigeration, the Hague, vol.I, Theme: Health, Food and Drinks, Flowers. International Institute of Refrigeration, Paris, France, 1995, p. 60–67.*
39. Měříčka, P.: Tissue Banking in the Czech Republic. Current Status. In: *Jr.Chr. Byk, A. Lechat, R. von Versen (eds.): 4th International Conference European Association of Tissue Banks Leuven (Belgium), October 15–18, 1995. Monduzzi Editore, International Proceedings Division, Bologna, Italy, 1996, p. 47–50.*
40. Měříčka, P. et al.: Cryopreservation of peripheral blood progenitor cells in supportive care of advanced breast carcinoma. *Infusionstherapie und Transfusionsmedizin* 24, 1997, p. 373.
41. Měříčka, P.: Establishing and Duties of the Commission for Tissue Transplantation Attached to the Czech Transplant. In: *Cryoprotectant in Medical Practice – Long Abstracts. Refrigeration Science nad Technology 1997–1, International Institute of Refrigeration, Paris, 1997, p. 42.*

42. Měříčka, P. et al.: Cryopreservation of Haematopoietic Progenitor Cells for Autologous and Allogeneic Transplantation. Proc. 20th Int. Congr. Refrigeration, vol. 1., IIR Sydney, 1999, paper 773.
43. Měříčka, P.: Brief History of the Tissue Bank, Charles University Hospital, Hradec Králové, Czech Republic, Cell and Tissue Banking, 1,2000, p. 17–25.
44. Měříčka, P. et al.: Prevention of infection transmission in low-temperature preservation and storage of biological materials below –80°C. In: The Seventh CRYOGENICS 2002, IIR International Conference, Refrigeration Science and Technology Proceedings, International Institute of Refrigeration, Paris,2002, p. 165–168.
45. Měříčka, P., Straková, H., Čermák, P. et al: New Safety Assurance for Biological Skin Covers. Acta Chirurgiae Plasticae, 42, 2002, p. 23–29.
46. Měříčka, P.: Brief introduction to application of low temperatures in biology and medicine. In: The Seventh CRYOGENICS 2002 IIR International Conference, Refrigeration Science and Technology Proceedings, International Institute of Refrigeration, Paris 2002, p. 139–142.
47. Měříčka, P.: Úvod do transplantace tkání. In.: Třeška, V. et al.: Transplantologie pro mediky. Karolinum, Praha, 2002, p. 112–122.
48. Měříčka, P. et al: Our system of cross-contamination prevention during storage of haematopoietic progenitor cells – paper ICR 0302. In: Grof, G., Menzer, M. (eds): 21st IIR International Congress of Refrigeration, Washington, 2003.
49. Měříčka, P. et al: The importance of oxygen level monitoring in the cryostorage facilities In: Chrz, V. (ed.):The Eighth Cryogenics 2004. IIR International Conference: Refrigeration Science and Technology. International Institute of Refrigeration, Paris, 2004. Paper C 04–08.
50. Měříčka, P., Stárková, D., Langer, J.: The Czech Republic to Harmonize Tissue Transplant Legislation with the Requirements of the EU Directive, Impact of Commissions for Tissue Harvest and Transplantation on the Legislative Process. In: Programme and Abstracts International Congress of the European Association of Tissue Banks, October 13–16, 2004, p.36.
51. Měříčka, P. et al.: Kryokonzervace pupečnickové krve pro transplantáční účely: Vlastní zkušenosti. In: 1. Morfologický postgraduální kurz, program a sborník abstrakt, Hradec Králové, 15.února 2005. Lékařská fakulta v Hradci Králové, 2005, p.21.
52. Ministerstvo zdravotnictví ČR. Metodický návod Ministerstva zdravotnictví. Standard značení transfuzních přípravků (štitky propuštěných přípravků). Věstník MZ ČR,1997, částka 9, p.38–48
53. Ministerstvo zdravotnictví ČR, Vyhláška č. 434/2004 Sb. ze dne 12. července 2004 O podrobnostech, rozsahu a obsahu povinně uváděných dat do Národního registru osob, nesouhlasících s posmrtným odběrem tkání a orgánů. Sběrka zákonů,částka 186/20004.
54. Ministerstvo zdravotnictví ČR, Vyhláška č. 437/2002 Sb. ze dne 3. října 2002, kterou se stanoví bližší podmínky posuzování zdravotní způsobilosti a rozsah vyšetření žijícího nebo zemřelého dárce tkání nebo orgánů pro účely transplantací. (Vyhláška o zdravotní způsobilosti dárce tkání a orgánů pro účely transplantací). Sběrka zákonů č.437/2002 Part 153, p. 8221–8223.
55. Ministerstvo zdravotnictví ČR. Zákon č. 285/2002 Sb. ze dne 30. května 2002 o darování, odběrech a transplantacích tkání a orgánů a o změně některých zákonů (Transplantační zákon). Sběrka zákonů ČR No. 285/2002 Částka 103, p. 6050.
56. Ministerstvo zdravotnictví ČR: Požadavky MZ na zdravotnická zařízení, která žádají o souhlas Ministerstva zdravotnictví se zřízením tkáňové banky 26. 3. 04. <http://www.mzcr.cz/data/c971/lib/Tkanbanka.rtf>.
57. Ministerstvo zdravotnictví ČR: Zdravotnická zařízení, kterým byl vydán souhlas MZ ke zřízení tkáňové banky 11.10 2004.<http://www.mzcr.cz/data/c1177/lib/SeznamTB.rtf>
58. Pegg, D.E., Diapper, N.P.: Freezing versus vitrification: Basic principles. In: Smit Sibinga, C.Th., Das, P.C., Meryman, H.T. (eds): Cryopreservation and Low Temperature in Blood Transfusion. Kluwer Academic Publishers, Boston, 1989, p. 55–69.
59. Pavlata, J. et al.: Reconstruction of the joint surface. Acta Medica (Hradec Králové), 2002,45, p. 64–65.

60. Plášilová, L.: První tkáňová banka a prof. MUDr Rudolf Klen, Dr.Sc. *Acta Medica (Hradec Králové) (Suppl)*, 44 2001, p 91–92.
61. Pospíšilová, B. (ed.): Doporučené postupy uplatňování správné výrobní a správné distribuční praxe. Mimořádná monotematická publikace. *Věstník SÚKL* 1998, 80 p.
62. Pritchard, J.: Rapidly progressive dementia in a patient who received a cadaveric dura mater graft. *MMWR* 1987, 36, p. 49–50.
63. Public Citizen/Publications: Petition to the FDA asking them to ban the use of cadaveric dura mater because it risks exposing neurosurgery patients to Creutzfeld-Jakob Disease. Publication 1587. <http://www.citizen.org/publications/release.cfm?ID=7050.2001,7p>.
64. Roscam Abbing, H.D.C.: Human tissue and clinical medicine: an European regulatory perspective. In: Jr.Chr.Byk, A.Lechat, R. von Versen (eds.): 4th International Conference European Association of Tissue Banks Leuven (Belgium), October 15–18, 1995. Monduzzi Editore, International Proceedings Division, Bologna, Italy, 1995, p. 3–9.
65. Ševčík, P., Fakan, F.: Návrh stanoviska Vědecké rady Ministerstva zdravotnictví ČR k odběru orgánů při pitvě za účelem jejich prodeje. *Česko-slovenská patologie*, 38, 2002, p. 100.
66. Šteiner, I, Špaček, J.: Úvodník. *Česko-slovenská patologie* 38, 2002, p. 99.
67. Straková, H., Měřička, P., Červinka, M., Šubrtová, D., 1995. Cultivation of Epithelial Sheets from Cryopreserved Keratinocyte Primocultures, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, Suppl. 14: p. 99–101.
68. Tedder, R.S. et al.: Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet*, 346, 1995, p.137–140
69. The Society for Pharmaceutical and Medical Device Professionals – ISPE: Baseline. *Pharmaceutical Engineering Guide. Pharmaceutical Engineering Guides for New and Renovated Facilities. Volume 3. Sterile Manufacturing Facilities, First Edition/January 1999. ISPE Headquarters, ISPE European Branch Office, 1999, 162 p.*
70. Veen, M.R.: Bone allografts. A study into bacterial contamination, sensitivity of cultures, decontamination and contribution to postoperative infection. *Drukkerij Albedon/klop bv*, 1994, 128 p.
71. Von Versen, R.: Transplantation of cells, tissues and organs. Ethical, legal and religious aspects. In: Jr.Chr.Byk, A. Lechat, R. von Versen (eds.): 4th International Conference European Association of Tissue Banks Leuven (Belgium), October 15–18, 1995.Monduzzi Editore, International Proceedings Division, Bologna, Italy, 1995 p.11–17.
72. Warwick, R.M., Kearney, J.N.: Safety in Human Tissues and Cells for Transplantation In: Polak, J.M et al.: *Future Strategies for Tissue and Organ Replacement*. Imperial College Press, London,2002, p.381–419
73. Wowk, B.et al.: Vitrification Enhancement by Synthetic Ice Blocking Agent, *Cryobiology*, 40,2000, p. 228–236.
74. Wusteman, M.C., et al., 2002, *Vitrification Media: Toxicity, Permeability and Dielectric Properties*, *Cryobiology*, 44: p.
75. Wusteman, M.C., et al.: Vitrification of ECV 304 Cell Suspensions using Solutions Containing Propane-1,2 diol and Trehalose, *Cryobiology*, 46,2003, p. 135–145.

9. SEZNAM LITERATURY AUTORA

Původní práce

1. Měříčka, P., Vít, P.: První zkušenosti s použitím audiovizuálního programu na praktických cvičeních z anatomie. Sbor. věd. Prací LFKU v Hradci Králové, Suppl. 17, 1974, p. 207–216.
2. Měříčka, P., Klen, R.: Krátkodobé klinické výsledky s použitím dlouhodobě skladovaných lyofilizovaných kostních a chrupavkových štěpů. Sbor. věd. prací LFKU v Hradci Králové, Suppl. 22, 1979, p. 29–42.
3. Klen, R., Balíček, P., Heger, J., Bukač, P., Měříčka, P.: Chromozomální změny u osob s transplantovanou ledvinou. I. Stav při vstupu do chronického intermitentního dialyzačního programu. Sborník lékařský 82, 1980, p. 138–145.
4. Jílková, V., Vávra, L., Měříčka, P.: Diagnostic significance of acidity determination in expressed human milk. In: Les Banques de lait humain/Human Milk Banking, International Institute of Refrigeration. Commission C-1 Meeting, Hradec Králové, Czechoslovakia 1981–2, p. 55–59.
5. Měříčka, P.: 30 let Tkáňové ústředny Fakultní nemocnice KÚNZ v Hradci Králové. Lékařské zprávy (Hradec Králové) 27, 1982, p. 195–206.
6. Měříčka, P.: Quality control of freeze-dried tissue grafts. In: Proc. 16th Int. Congr. Refrig., Paris 1983, Fr., 3, 1984, p. 161–165.
7. Klen, R., Heger, J., Měříčka, P., Skalská, H.: Porovnání působení Collinsova roztoku a tzv. Eurcollinse na buňky in vitro. Čas. Lék. Čes. 122, 1983, p. 584–586.
8. Měříčka, P., Hušek, Z., Straková, H., Pařízek, J., Rozsival, P., Randa, M., Špaček, J., Svoboda, T., Němeček, S., Vávra, L., Pozlerová, E.: Vorbereitung und klinische Anwendung von xenogenen durch Glutaraldehyd fixierten lyophilisierten Pericardium Transplantaten. Probleme der Hämatologie Transfusion und Transplantation, 13, 1986, p. 345–358.
9. Měříčka, P., Levínská, M., Kerekeš, Z., Pozlerová, E., Dvořáček, I., Vávra, L., Straková, H., Hušek, Z.: Unsere Erfahrungen mit Anwendung von abiotisch konservierten dermo-epidermalen und Chorion-Amnion Transplantaten bei Heilung von Verbrennungen. Probleme der Hämatologie Transfusion und Transplantation 13, 1986, p. 361–369.
10. Pařízek, J., Měříčka, P., Špaček, J., Hušek, Z., Straková, H.: Plastika tvrdé pleny – fyzikální vlastnosti některých materiálů v experimentu. Čs. Neurol. Neurochir. 50/83, 1987, p. 73–82.
11. Měříčka, P., Hušek, Z., Straková, H., Vávra, L., Vinš, P., Schuster, P., Dudek, A., Kerekeš, Z.: Cryopreservation of dermoepidermal grafts for treatment of burns. Proceedings of the XVIIIth International Congress of Refrigeration, Commission C-1, Vienna 24.–29.8.1987, p. 1–8.
12. Měříčka, P., Straková, H., Hušek, Z., Vávra, L., Špaček, J., Pařízek, J., Rozsival, P.: Low temperature preservation of collagenic tissues for transplantation purposes and their possible use. Proceedings of the XVIIIth International Congress of Refrigeration, Commission C-1, Vienna, 24.–29.8.1987, p. 9–15.
13. Měříčka, P., Klein, L., Levínská, M.: Role of the Tissue Bank in Treatment of Burns. II. Congress on Burn Treatment with International Participation, Košice, May 28–29, 1987, Squibb Europe Inc., p. 77–82.
14. Pařízek, J., Měříčka, P., Špaček, J., Vítek, J., Eliáš, P., Šercl, M., Němeček, S.: Význam plastyky tvrdé pleny a zajištění likvorové cirkulace po operacích v zadní jámě lební u dětí. Čs. Neurol. Neurochir., 50/83, 1987, p. 370–379
15. Rozsival, P., Měříčka, P.: Unsere Erfahrungen bei Operationen mit Skleroplastiken nach Pivovarov. Folia Ophthalmol. 13, 1988, p. 121–123.

16. Klein, L., Konečný, B., Měříčka, P.: Vlastní zkušenosti s léčbou popálenin. *Voj. zdrav listy* 57, 1988, p. 205–209.
17. Měříčka, P., Malec, R., Herout, V., Konečný, B., Motyčka, V.: Nizkotéperaturnoje konservirovanije tkaněvych transplantatov dlja kliničeskogo primeněnija. *Kriobiologija* 3, 1988, p. 15–17.
18. Pařízek, J., Měříčka, P., Špaček, J., Němeček, S., Eliáš, P., Šercl, M.: Xenogeneic Pericardium as a Dural Substitute in Reconstruction in Suboccipital Dura Mater in Children. *J. Neurosurg.* 70, 1989, p. 905–909.
19. Klein, L., Měříčka, P., Preis, J., Pintér, L., Talábová, Z.: Xenotransplantace v léčbě popálenin. *Vojenské zdravotnické listy LVIII*, 1989, p. 196–198.
20. Měříčka, P., Vávra, L., Hušek, Z., Špaček, J., Pařízek, J.: Harvesting and Banking of Allogeneic Soft Connective Tissues. In: *Cryobiology and Freeze-Drying. Proceedings of the IVth International School „Cryobiology and Freeze-Drying“*. Central Problem Laboratory for Cryobiology and Freeze-Drying, Sofia 1989, p. 165–197.
21. Pařízek, J., Šercl, M., Eliáš, P., Němeček, S., Měříčka, P., Němečková, J.: Vývojové cysty v oblasti čtverohrbolí u dětí. *Čs. Neurol. Neurochir.* 3, 1989, p. 212–217.
22. Pařízek, J., Měříčka, P., Špaček, J., Šercl, M., Eliáš, P., Němečková, J., Lichý, J., Němeček, S.: Plastika tvrdé pleny mozkové xenogenním perikardem u dětí. *Čas. Lék. čes.* 128, 1989, p. 682–684.
23. Pařízek, J., Němečková, J., Měříčka, P., Eliáš, P., Šercl, M., Lichý, J.: Zevní lumbální likvorová drenáž s regulovaným průtokem – její využití v dětské neurochirurgii. *Čas. Lék. čes.* 129, 1990, p. 1138–1140.
24. Měříčka, P., Vávra, L., Hušek, Z., Straková, H., Špaček, J., Pařízek, J., Klein, L., Levínská, M.: Low temperature preservation of tissues for clinical use. In: *Bose, A., Sengupta, P.: Advances in cryogenics. Proceedings of the International Conference on Cryogenics, Calcutta, India, December 6–10, 1988 (INCONCRYO-88). VII. Cryogenics in Life Sciences and Medicine, Surgery, Agriculture. McMillan, India Ltd., New Delhi 1990, p. 625–644.*
25. Klein, L., Měříčka, P., Pintér, L.: Use of dura mater allografts in operations of abdominal wall hernias. *Beitr. Orthop. Traumatol.* 37, 1990, p. 499–503.
26. Bláha, M., Maisnar, V., Jebavý, L., Měříčka, P., Rondiak, J., Šulc, K., Vaňásek, J. jr.: Transplantace kmenových buněk krvinek z periferní krve – první zkušenosti. *Vojenské zdravotnické listy LIX*, 1990, p. 218–223.
27. Pařízek, J., Měříčka, P.: Duraplasty with pretreated freeze-dried sterilized human dura mater. *Sbor. věd. Prací LF UK, Hradec Králové*, 33, 1990, p. 135–143.
28. Měříčka, P., Klein, L., Preis, J., Straková, H., Hušek, Z., Pozlerová, E., Morávková, M., Štěpánová, V., Achová, P.: Problems encountered in banking biological coverings for treatment of burns. In: *W. Boecks, J. Moserová (eds): Progress in Burn-Injury Treatment, Proceedings of the Third Congress of the European Burns Association, Prague, October 4–7, 1989. Acco Leuven, Amersfoort, 1990, p. 85–87.*
29. Rozsival, P., Měříčka, P., Zaydlar, K.: Results of Scleroplasty Operations in Children. *Fourth International Conference on Myopia, March 14–16, 1990. ICO XXVI, Singapore 1990, p. 402–420.*
30. Pařízek, J., Němeček, S., Špaček, J., Němečková, J., Lízler, J., Šercl, M., Vokurka, J., Měříčka, P., Vaňásková, Z.: Benign cyst of the paramedian pontine tegmentum. *Child's Nerv. Syst.*, 7, 1991, p. 347–352.
31. Měříčka, P.: Speciálně upravená lyofilizovaná tvrdá plena mozková – perspektivní materiál k durálním plastikám. *Lék. Zpr. LFUK, Hradec Králové*, 36, 1991, p. 49–59.
32. Straková, H., Měříčka, P.: K otázce spotřeby tkáňových štěpů k plastice tvrdé pleny mozkové v ČSFR. *Lék. Zpr. LFUK Hradec Králové*, 36, 1991, p. 177–186.
33. Měříčka, P., Klein, L., Levínská, M.: Activity of Tissue Bank in Treatment of Burns. *Roczniki Oparzeń, Annals of Burns*, 2, 1991, p. 134–137.

34. Měřička, P., Schustr, P., Vinš, M., Dudek, A., Vávra, L., Červinka, M., Rondiak, J.: Containers for Freezing and Storage of Bone Marrow Cells. *Sbor. Věd. Prací LF UK, Hradec Králové*, 34, 1991, p. 367–387.
35. Měřička, P.: Etické otázky odběru a konzervace tkání a orgánů. *SCAN 1*, 1991, p. 8–9.
36. Hanuš, H., Měřička, P.: O posledních věcech člověka. *Lék. Zpr. LFUK, Hradec Králové* 1994, 39,(3–4), p. 113–122.
37. Pařízek, J., Šercl, M., Michl, A., Měřička, P., Němeček, S., Němečková, J., Jakubec, J.: Posterior fossa duraplasty in children: remarks on surgery and clinical and CT follow-up. *Child's Nerv. Syst.*, 10, 1994, p. 444–449.
38. Měřička, P., Straková, H., Filip, S., Bláha, M., Vávra, L., Ondráček, J., Ettlrová, E., Rondiak, J., Jilková, B., Pecka, M.: Cryopreservation of peripheral blood stem cells. – In: *Proceedings I, Theme 1: Health, Food and Drinks Flowers*. Paris, France, International Institute of Refrigeration, 1995, p. 60–67.
39. Straková, H., Měřička, P., Červinka, M., Kerekes, Z., Šubrtová, D.: Cultivation of epithelial sheets from cryopreserved keratinocyte primocultures. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 14, 1995, (Suppl. 1), p. 99–101.
40. Klein, L., Měřička, P., Preis, J.: Clinical experience with skin xenografts in burned patients. In: Masellis, M., Gunn, S. W. A. (ed.): *Proceedings of the Second International Conference on Burns and Fire Disasters. The Management of Burns and Fire Disasters: Perspectives 2000*. – 1. vyd. Palermo, Kluwer Academic Publishers, 1995, p. 343–345.
41. Klein, L., Měřička, P., Hošek, F.: Zajištění péče o termické úrazy na našem pracovišti. *Vojenské zdravotnické listy* 64, 1995, p. 147–149.
42. Měřička, P., Klein, L., Straková, H., Šorma, M., Pintér, L., Talábová, Z., Vávra, L.: Biologické kryty pro léčbu popálených – vlastní zkušenosti. *Vojenské zdravotnické listy*, 64, 1995, p. 150–153.
43. Měřička, P., Klein, L., Preis, J., Ettlrová, E.: The role of a tissue bank in disaster planning. In: Masellis, M., Gunn, S. W. A. (ed.): *Proceedings of the Second International Conference on Burns and Fire Disasters. The Management of Burns and Fire Disasters: Perspectives 2000*. – 1. vyd. Palermo, Kluwer Academic Publishers, 1995, p. 75–83.
44. Měřička, P.: Tissue banking in the Czech Republic. Current status. – In: Byk, JR. Chr, Lechat, A., Von Versen, R. (eds.): *4th International Conference European Association of Tissue Banks*, Bologna, Monduzzi Editore, 1996, p. 47–50.
45. Pařízek, J., Hušek, Z., Měřička, P., Těra, J., Němeček, S., Špaček, J., Němečková, J., Šuba, P.: Ovine pericardium: a new material for duraplasty. *J. Neurosurg.*, 84, 1996, p. 508–513.
46. Pařízek, J., Měřička, P., Němeček, S., Němečková, J., Zemánková, M., Šercl, M., Haringová, M.: Allogeneic cartilage used for skull base plasty in children with primary intranasal encephalomeningocele associated with cerebrospinal fluid rhinorrhea. *Child's Nerv. Syst.*, 12, 1996, p. 136–141.
47. Pařízek, J., Měřička, P., Hušek, Z., Šuba, P., Špaček, J., Němeček, S., Němečková, J., Šercl, M., Eliáš, P.: Detailed evaluation of 2959 allogeneic and xenogeneic dense connective tissue grafts (fascia lata, pericardium, and dura mater) used in the course of 20 years for duraplasty in neurosurgery. *Acta Neurochir.* 139, 1997, p. 827–838.
48. Klein, L., Měřička, P., Straková, H., Jebavý, L., Nožičková, M., Bláha, M., Talábová, Z., Hošek, F.: Biological skin covers in treatment of two cases of the Lyell's syndrome. *Annals of Transplantation* 2, 1997, p. 45–48.
49. Pařízek, J., Měřička, P., Šercl, M., Hobza, V., Látr, I., Němečková, J.: Oddálená kranioplastika vlastní zmrazenou lebeční ploténkou po dekompresivní kraniektomii kombinované s plastikou dury. *Čes. a Slov. Neurol. Neurochir.* 60/93, 1997, p. 152–157.
50. Rozsíval, P., Zaydlar, K., Měřička, P.: Long term results of scleral reinforcement in children. In: Süveges, I., Follmann, P. (ed.): *SOE'97*. – 1. vyd. Bologna, Monduzzi editore, 1997, p. 957–961.

51. Vaňásek, J., Filip, S., Medková, V., Bláha, M., Měříčka, P.: Mobilization of peripheral blood progenitor cells by administration of chemotherapy and G-CSF in breast carcinoma patients. *Acta Chemotherapeutica*, 6, 1997, p. 61–65.
52. Měříčka, P., Straková, H., Klein, L., Šubrtová D.: Practical Aspects of Establishing a Keratinocyte Bank. *Roczniki oparzeń, Annals of Burns*, 7–8, 1996–97, p. 105–109.
53. Pařízek, J., Měříčka, P., Němeček, S., Němečková, J., Špaček, J., Šuba, P., Šercl, M.: Posterior cranial fossa surgery in 454 children. Comparison of results obtained in pre-CT and CT era and after various types of management of dura mater. *Child's Nerv. Syst.* 14, 1998, p. 426–439.
54. Vaňásek, J., Filip, S., Medková, V., Bláha, M., Měříčka, P., Volenec, K.: Mobilization of peripheral blood progenitor cells (PBPC) through a combination of chemotherapy and G-CSF in breast cancer patients and a possibility of unprocessed whole blood collection. *Bone Marrow Transplantation* 21, 1998, p. 123–126.
55. Filip, S., Vaňásek, J., Bláha, M., Měříčka, P., Vávrová, J., Podzimek, K.: The increase of the rate of hemopoietic recovery and clinical benefit of the erythropoietin (EPO) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) with peripheral blood progenitor cells (PBPC) after intensive cyclic chemotherapy in high-risk breast cancer patients. *Neoplasma*, 46, 1999, p. 166–172.
56. Klein, L., Měříčka, P.: Vaseline salicylate for chemical necrolysis – our experience. *Roczniki Oparzen/ Annals of Burns* 7–8, 1996, p. 223–225.
57. Měříčka, P., Straková, H., Šubrtová, D., Mokry, J., Klein, L., Červinka, M.: Composite dermoepidermal graft for burn treatment. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 41, 1998, p. 58.
58. Krásný, J., Měříčka, P.: Možnosti řešení ptózy v dětství a v dospělosti. *Česká a slovenská oftalmologie*, 55, 1999, p. 145–154.
59. Medková, V., Filip, S., Vaňásek, J., Bláha, M., Měříčka, P., Stránský, P.: Použití progenitorových buněk z periferní krve k podpoře intenzivní cyklické chemoterapie u pokročilého karcinomu prsu. *Klinická onkologie*, 12, 1999, p. 128–132.
60. Měříčka, P., Šubrtová, D., Straková, H., Klein, L., Preis, J., Dočekalová, Š., Mokry, J.: Náš příspěvek k přípravě a použití kompozitních dermoepidermálních štěpů. *Lék. Zpr.LFUK Hradec Králové*, 44, 1999, p. 157–159.
61. Pařízek, J., Němeček, S., Němečková, J., Černoch, Z., Měříčka, P., Špaček, J., Šuba, P.: Zhodnocení výsledků u 458 dětí operovaných v zadní jámě lebeční za 50 let (1948–1997). *Čes. a Slov. Neurol. Neurochir.* 62/95 1999, p. 17–28.
62. Ferko, A., Páral, J., Raupach, J., Chovanec, V., Krajina, A., Měříčka, P., Pavčnik, D., Uchida, B., Slížová, D., Krs, O., Nožička, J.: Autologous Vein Stent-Graft: Feasibility Study. *JVIR*, 11, 2000, p. 111–114.
63. Filip, S., Bláha, M., Odrážka, K., Měříčka, P., Vávrová, J.: Application of whole blood and peripheral blood progenitor cells (PBPC) and new strategies for rescue after intensive cyclic chemotherapy in high-risk breast cancer. *Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research*, 9, 2000, p. 31–38.
64. Páral, J., Ferko, A., Měříčka, P., Slížová, D., Nožička, J., Chovanec, V., Raupach, J.: Příspěvek ke konzervaci žilních štěpů. *Rozhledy v chirurgii*, 79, 2000, p. 244–249.
65. Pařízek, J., Němeček, S., Němečková, J., Šuba, P., Jakubec, J., Hobza, V., Černoch, Z., Šercl, M., Špaček, J., Měříčka, P.: Zhodnocení výsledků u 363 dětí operovaných pro nitrolebeční supratentoriální nádory za 50 let (1948–1997). *Acta Medica (Hradec Králové) Suppl*, 2000, p. 13–27.
66. Červinka, M., Měříčka, P.: Etické zásady při využívání lidských tkání pro vědecké účely. In: Veselská, R., Kuře J. (eds): *Sborník k interdisciplinární konferenci*, 1. vyd., Brno, Institut pro bioetiku, 2001, p. 21–27.
67. Měříčka, P., Straková, H., Bláha, M., Vávra, L., Filip, S., Pecka, M., Toušková, M., Krejsek, J., Hodík, K., Vávrová, I.: Cryopreservation of haematopoietic progenitor cells for autologous and allogeneic transplantation. In: *20th International Congress of Refrigeration. Refrigeration into the Third Millennium*, Sydney, Australia, 19–24 September, 1999. Volume I: Cryophysics, cryo-

- genic engineering and cryobiology, Melbourne, International Institute of Refrigeration, 2001, p. 3689–3695.
68. Měříčka, P., Hošek, F.: The importance of stored supplies of biological skin covers in territorial management of mass burn casualties. *Acta Chirurgiae Plasticae*, 44, 3, 2002, p. 90–96.
 69. Měříčka, P., Štěpánová, V., Bláha, M., Vávra, L., Čermáková, Z., Drahošová, M., Toušovská, K.: Prevention of infection transmission in low-temperature preservation and storage of biological material below -80°C . Editor: V. Chrz, In: *The Seventh CRYOGENICS 2002 IIR International Conference Proceedings*, 1. vyd. Refrigeration, Science and Technology Proceedings 2002–1, Praha, ICARIS Ltd., Conference Management, Praha, 2002, p. 165–168.
 70. Měříčka, P., Straková, H., Čermák, P., Štěpánová, V., Hradecký, Z., Drahošová, M.: New safety assurance for biological skin covers. *Acta Chirurgiae Plasticae*, 44 (1), 2002, p. 23–29.
 71. Bláha, M., Měříčka, P., Žák, P., Štěpánová, V., Vávra, L., Malý, J., Toušovská, K.: The risk of infection transmission from blood progenitor cell concentrates. *Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research*, 12, 2003, p. 161–164.
 72. Bláha, M., Měříčka, P., Štěpánová, V., Malý, J., Vávra, L., Jebavý, L.: Potential risk of infection transmission during storage and transplantation of hematological progenitor cells. Safety assurance. *Folia Microbiol.*, 48, 2003, p. 399–402.
 73. Měříčka, P., Bláha, M., Vávra, L., Štěpánová, V. Our system of cross-contamination prevention during storage of haematopoietic progenitor cells – paper ICR0302. Editor: Groff, G., Menzer, M. In: *CD: 21st IIR International Congress of Refrigeration*, 1. vyd., Washington, International Institute of Refrigeration, 2003, p. 1–8.
 74. Měříčka, P., Houška, M., Landfeld, A., Čermák, P.: Quantitative assessment of microbiological risk in processing and application of the pasteurised frozen human milk – paper ICR0645. Editor: Groff, G., Menzer, M. In: *CD: 21st IIR International Congress of Refrigeration*, 1. vyd., Washington, International Institute of Refrigeration, 2003, p. 1–9.
 75. Měříčka, P., Vávra, L., Vinš, M., Schustr, P.: The importance of oxygen level monitoring in the cryostorage facilities (C04-08). In: *The Eighth Cryogenics 2004 IIR International Conference*, 1. vyd., Refrigeration Science and Technology Proceedings, Paris, International Institute of Refrigeration, 2004, p. 242–247.

Přehledné články

1. Měříčka, P.: Mechanismy účinku nízkých teplot na živou tkáň. In: Říha, J., Rousek, F., Grunt, J., Otavová, A.: *Kryochirurgie jako aplikace nízkých teplot*. Spolek lékařů v Benešově, 1982, p. 55–57.
2. Měříčka, P.: Mechanismy zmrazování v biologických systémech. In: *Kurz Lyofilizácia*, Dom Techniky, Bratislava, 1982, p. 32–38.
3. Měříčka, P.: Mechanismy zmrazování v biologických systémech. In: *Kryokonzervácia pohlavných buniek a včasných embryí*. Dom techniky ČSVTS Bratislava, 1983, p. 11–20.
4. Srbová, H., Měříčka, P.: Kryoprotektiva. In: *Kryokonzervácia pohlavných buniek a včasných embryí*. Dom techniky ČSVTS Bratislava, 1983, p. 21–31.
5. Měříčka, P.: Současné možnosti kryokonzervace kostní dřevě pro léčebné účely. *Vojenské zdravotnické listy-Sborník*, 1983, p. 32–36.
6. Měříčka, P.: Použití kapalného dusíku v biologii a medicíně. In: *Kryogenika 1984*, Dom techniky ČSVTS Bratislava, 1984, p. 95–99.
7. Kusyn, A., Měříčka, P.: Kryochirurgie v gynekologii. *Česká a slovenská gynekologie*, 55, 1990, p. 680–684.
8. Hanuš, H., Měříčka, P.: O posledních věcech člověka. *Lék. Zpr. LFUK Hradec Králové* 39, 1994, p. 113–122.

9. Měříčka, P., Klein, L., Straková, H., Šubrtová, D.: Biological skin cover: Banking and application. In: Phillips, G.O., Strong, D.M., von Versen, R., Nather, A.(eds): *Advances in Tissue Banking* (Vol. 2), World Scientific Publishing Co. Singapore, New Jersey, London, Hong Kong, 1998, p. 323–341.
10. Měříčka, P.: Mechanizmy poškození zmrazováním a mechanismy kryoprotekce v biologických systémech. In: P. Tomlein (ed): *Domáce a komerčné chladienie 98*, Slovenský zväz pre chladiacu a klimatizačnú techniku, Rovinka, 1998, p. 15–22.
11. Měříčka, P.: Brief history of the tissue bank, Charles University Hospital, Hradec Králové, Czech Republic. *Cell and Tissue Banking*, 1, 2000, p. 17–25.
12. Měříčka, P.: Brief introduction to application of low temperatures in biology and medicine. Editor: V. Chrz, In: *The Seventh CRYOGENICS 2002 IIR International Conference Proceedings*, 1. vyd., Refrigeration, Science and Technology Proceedings 2002–1, Praha, ICARIS Ltd. Conference Management Praha, 2002, p. 139–142.
13. Měříčka, P.: Brief introduction to mechanisms of freezing injury and cryoprotection (C04-07). In: *The Eighth Cryogenics 2004 IIR International Conference*, 1. vyd., Refrigeration Science and Technology Proceedings, Paris, International Institute of Refrigeration, 2004, p. 223–231.

Kapitoly v monografiích a učebnicích

1. Hanuš, H., Bedrna, J., Čápková, E., Hubert, J., Chrobák, L., Mareš, J., Měříčka, P., Nesvadba, P., Panoušek, V., Zbytovský, J.: *Vybrané kapitoly z lékařské psychologie*. – 1. vyd., Praha, Karolinum, 1994, 125 p.
2. Hanuš, H., Měříčka, P.: Umírání a smrt. In: Hanuš, H. et al. (ed.): *Vybrané kapitoly z lékařské psychologie*. – 1. vyd., Praha, Karolinum, 1994, p. 60–70.
3. Klein, L., Měříčka, P.: Příprava a využití biologických krytů v léčbě popálených z pohledu válečné chirurgie a medicíny katastrof. *Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové*, 2000, učebnice VŠ, 84 p.
4. Měříčka, P., Klein, L.: Možnosti použití biologických krytů při hromadném výskytu popálených. (In: *Příprava a využití biologických krytů v léčbě popálených z pohledu válečné chirurgie a medicíny katastrof*), *Vojenská lékařská akademie JEP Hradec Králové, Hradec Králové*, 2000, p. 17–44, učebnice VŠ.
5. Měříčka, P., Straková, H., Klein, L., Šubrtová, D., Janeček, V., Preis, J., Hošek, F., Dočekalová, Š.: Možnosti kultivace lidských epidermálních keratinocytů a jejich použití při léčbě popálených. (In: *Příprava a využití biologických krytů v léčbě popálených z pohledu válečné chirurgie a medicíny katastrof*), *Vojenská lékařská akademie JEP Hradec Králové, Hradec Králové*, 2000, p. 45–70, učebnice VŠ.
6. Měříčka, P., Straková, H., Klein, L., Šubrtová, D., Janeček, V., Preis, J., Hošek, F., Dočekalová, Š.: Možnosti kultivace lidských epidermálních keratinocytů a jejich použití při léčbě popálených. (In: *Příprava a využití biologických krytů v léčbě popálených z pohledu válečné chirurgie a medicíny katastrof*), *Vojenská lékařská akademie JEP Hradec Králové, Hradec Králové*, 2000, p. 45–70, učebnice VŠ.
7. Třeška, V., Adamec, M., Bachleda, P., Černý, J., Hasman, D., Lischke, R., Martínek, V., Měříčka, P., Navrátil, P., Pafko, P., Ryska, M., Špatenka, J., Třeška, V., Veselský, Z., Vítko, Š.: *Transplantologie pro mediky*. Editor: Třeška, V., 1. vyd. *Učební texty Univerzity Karlovy v Praze, Praha, Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum*, 2002, 125 p.
8. Měříčka, P.: Úvod do transplantace tkání. In: Třeška, V.(ed): *Transplantologie pro mediky*, 1. vyd. *Učební texty Univerzity Karlovy v Praze, Praha, Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum*, 2002, p. 112–122.

10. SEZNAM NEJCITOVANĚJŠÍCH PRACÍ AUTORA

10.1 Práce s 5 a více záznamy v SCI

1. Pařízek, J., Měříčka, P., Špaček, J., Němeček, S., Eliáš, P., Šercl, M.: Xenogeneic Pericardium as a Dural Substitute in Reconstruction in Suboccipital dura Mater in Children. *J. Neurosurg.* 70, 1989, p. 905–909.
2. Pařízek, J., Hušek, Z., Měříčka, P., Téra, J., Němeček, S., Špaček, J., Němečková, J., Šuba, P.: Ovine pericardium: a new material for duraplasty. *J. Neurosurg.* -84, 1996, p. 508–513.
3. Pařízek, J., Šercl, M., Michl, A., Měříčka, P., Němeček, S., Němečková, J., Jakubec, J.: Posterior fossa duraplasty in children: remarks on surgery and clinical and CT follow-up. *Child's Nerv. Syst.* 10, 1994, p. 444–449.
4. Měříčka, P., Hušek, Z., Straková, H., Pařízek, J., Rozsival, P., Randa, M., Špaček, J., Svoboda, T., Němeček, S., Vávra, L., Pozlerová, E.: Vorbereitung und klinische Anwendung von xenogenen durch Glutaraldehyd fixierten lyophilisierten Pericardium Transplantaten. *Probleme der Hämatologie Transfusion und Transplantation*, 13, 1986, p. 345–358.

10.2 Citovanost prací souvisejících s tématem disertační práce

1. Měříčka P., Straková, H., Čermák, P., Štěpánová, V., Hradecký, Z., Drahošová, M.: New safety assurance for biological skin covers. *Acta Chirurgiae Plasticae*, 44, 2002, p. 23–29. Počet záznamů 3
2. Měříčka, P., Bláha, M., Vávra, L., Štěpánová, V. Our system of cross-contamination prevention during storage of haematopoietic progenitor cells – paper ICR0302. Editor: Groff, G., Menzer, M. In: CD: 21st IIR International Congress of Refrigeration, 1. vyd., Washington, International Institute of Refrigeration, 2003, p. 1–8. Počet záznamů 1

Adresa pro korespondenci:

MUDr. Pavel Měříčka

Tkáňová ústředna

Fakultní nemocnice

50005 Hradec Králové

**CONTRIBUTION TO SAFETY ASSURANCE
IN THE CRYOPRESERVATION OF CELLS AND TISSUES USED
FOR CLINICAL TRANSPLANTATION**

MUDr. Pavel Měříčka

Vydavatel: RNDr. František Skopec, CSc. – Nucleus HK®
Divišova 882, 500 03 Hradec Králové, tel./fax: 495 217 146, 495 211 630

e-mail: info@nucleus.cz

<http://www.nucleus.cz>

Grafická úprava: Jiří Procházka, Hradec Králové

Tisk: Libor Dvořák, Hradec Králové

1. vydání, 2006

Počet stran: 36

Náklad: 300 kusů

ISBN 80-86225-94-1