

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Imunosuprese po transplantaci kryokonzervovaných tepenných alloštěpů v experimentu

MUDr. Rudolf Špunda

Praha 2019

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc

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

Školitel: MUDr. Miroslav Špaček, PhD.

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

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

OBSAH

SOUHRN	str. 4
SUMMARY	str. 5
1. ÚVOD	str. 6
2. HYPOTÉZA	str. 7
2.1 Cíle práce	str. 8
3. MATERIÁL A METODY	str. 8
4. VÝSLEDKY	str. 9
4.1. Hmotnost zvířat	
4.2. Koncentrace takrolimu v periferní krvi příjemců	
4.3. Histologické vyšetření	
4.4. Infiltrace adventicie imunokompetentními buňkami	
4.5. Donor specifické protilátky anti-MHC I. třídy	
4.6. Donor specifické protilátky anti-MHC II. třídy	
5. DISKUZE	str. 13
6. ZÁVĚR	str. 15
7. LITERATURA	str. 16
8. VLASTNÍ PUBLIKAČNÍ AKTIVITA	str. 17

SOUHRN

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

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

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

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

SUMMARY

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

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

The aortal allografts in both immunosuppressed groups showed regular morphology of aortal wall with no depositions of immunoglobulin G on day 30. The adventitial infiltration of non-immunosuppressed aortal allografts by MHC class II positive cells of recipient origin was significantly higher (ALO 20,7±6,7 cells, P <0,001) compared to both immunosuppressed groups (TAC1 5,9±5,5 cells, TAC7 6,1±5,1 cells). Anti-MHC antibodies class I and II level in peripheral blood was significantly higher in group ALO compared to both immunosuppressed groups on day 30. after transplantation (ALO - anti-MHC I 46,9±19,4 %, anti-MHC II 65,8±11,9 %, TAC1 - anti-MHC I 102,4±4,2 %, p <0,001, anti-MHC II 102.6±6,0 %, TAC7 - anti-MHC I 79,9±3,3 %, p < 0,001, anti-MHC II 80,9±2,7 %).

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

1. ÚVOD

Jednou z nezávažnějších komplikací v cévní chirurgii je infekce cévní protézy nebo stentgraftu. V současnosti se tyto život ohrožující stavy řeší reoperací s explantací infikovaného cizorodého materiálu a jeho náhradou alloštěpem. Použití chladem konzervovaných tepenných alloštěpů při léčbě těchto komplikací úspěšně zavedl Kieffer v osmdesátých letech 20. století. O několik let později byly techniky použití alloštěpů zavedeny také v České republice. Dlouhá čekací doba na chladem konzervovaný vhodný alloštěp od dárce a změny v evropské legislativě vedly k zavádění programů kryokonzervace alloštěpů. Mezi jejich zásadní výhodu patří bezprostřední dostupnost.

Z řady experimentálních prací i klinických studií je zřejmé, že alloštěpy vykazují silný imunogenní potenciál (Matia I. et al., 2007; Mirelli M. et al., 1999). Hlavní podstatou této imunogenicity je exprese antigenů hlavního histokompatibilního systému I. třídy (MHC I), ke které dochází na buňkách hladkých svalů v cévní stěně tepenných štěpů. Výsledkem imunologické reakce je po šesti měsících fibrotizace tunica adventitia, tunica media je bez svalových buněk a neointima je tvořená endotelovými buňkami příjemcovského původu.

Dalším projevem imunitní reakce proti antigenům transplantovaného štěpu je vzestup protilátek proti hlavnímu histokompatibilnímu systému (anti-MHC), které lze detekovat v periferní krvi příjemce. Bylo zjištěno, že měřením koncentrace těchto protilátek lze posuzovat intenzitu rejekce.

Současně se studiem imunogenicity alloštěpů jako takové, byl v experimentech zjišťován i vliv imunosupresivní terapie na jejich destrukci imunitními procesy. Na zvířecích modelech byly k potlačení imunitní odpovědi příjemců úspěšně použity různé imunosupresivní léky. Vedlejší účinky imunosupresivních léčiv a vysoké riziko podávání imunosuprese pacientům s aktivní infekcí v případě implantace alloštěpu při infekci cévní protézy vedly k provedení dalších studií, tentokrát s opožděným podáváním imunosuprese. Podstata tohoto opožděného podávání imunosupre-

se tkví v tom, že několik dní po transplantaci, kdy imunosuprese není podávána, imunitní systém nestihne štěp destruovat a zároveň není omezena jeho funkce v době, kdy je potřeba, aby napomohl v léčbě aktivní infekce. V experimentální studii s chladem konzervovanými aortálními alloštěpy provedené na potkaním modelu byla prokázána inhibice imunitní reakce takrolimem, který byl podáván s odstupem 7 dnů od transplantace (Matia I. et al., 2007).

Tato práce navazuje právě na tento na experiment s opožděným podáváním takrolimu po transplantaci chladem konzervovaných alloštěpů a zabývá se imunosupresí po transplantaci kryokonzervovaných alloštěpů.

2. HYPOTÉZA

Imunosupresivní terapie po transplantaci alloštěpů není i přes řadu experimentálních a klinických studií na řadě pracovišť stále akceptována. Obzvlášť pacienti s infekcí cévní protézy jsou často ve velmi vážném stavu se septickými projevy. Je pochopitelné, že podávání imunosuprese v takové chvíli může celkový stav i prognózu pacientů ještě zhoršit. Řada pracovišť z těchto důvodů imunosupresi po transplantaci tepenných alloštěpů vůbec nepodává. Moderní imunosupresivní protokoly s opožděným podáváním imunosupresivních léků však dávají možnost razantní léčby infekce v bezprostředním pooperačním období bez alterace vlastních imunitních procesů organismu a zároveň zabraňují rejekčním pochodům po transplantaci, které později vedou k destrukci štěpu. Předpokládáme, že imunosupresivní protokol s takrolimem v monoterapii podávaným příjemcům kryokonzervovaných tepenných alloštěpů od prvního i sedmého pooperačního dne v denní dávce 0,2 mg/kg/den zabrání aktivaci imunitního systému příjemce a rejekci dárcovské tepny 30 dnů po její transplantaci.

2.1. Cíle práce

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

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

3. MATERIÁL A METODY

V experimentu jsme použili samce potkanů kmene Brown-Norway a Lewis. Všechny výkony jsme prováděli v celkové intramuskulární anestezii s použitím operačního mikroskopu s 10násobným zvětšením. Aortální štěpy jsme odebrali od potkanů kmene Brown-Norway i Lewis a bezprostředně po odběru je vložili do konzervačního roztoku Celsior (Genzyme, Holandsko) o teplotě 4 st. Celsia. Doba studené ischemie aortálního štěpu (měřená od naložení aortální svorky v těle dárce až po začátek procesu kryokonzervace) byla průměrně 180 minut. Následně jsme aortální štěpy zamrazili metodou používanou tkáňovým zařízením (Tkáňová ústředna Fakultní nemocnice Hradec Králové) licencovaným národní kompetentní autoritou (Měřička P. et al., 2011; Měřička P. et al., 2014) s modifikacemi vynucenými podmínkami práce na experimentálním operačním sále, kam jsme dovezli veškerou potřebnou techniku a materiál. Štěpy jsme poté skladovali v tekutém dusíku po dobu 6 měsíců. Před transplantací jsme štěpy pomalu kontrolovaně rozmrazili při teplotě 4 st. Celsia. Doba studené ischemie od rozmrazení do transplantace byla průměrně 3,5 hodiny.

Po rozmražení jsme štěpy transplantovali syngenně od zvířat kmene Lewis potkanům kmene Lewis (skupina ISO) a allogenně mezi kmeny Brown – Norway (dárce) a Lewis (příjemci, skupina ALO). Skupině ALO jsme nepodávali v pooperačním období žádnou imunosupresi. V dalších dvou allogenních skupinách (TAC1 a TAC7) jsme stejně jako ve skupině ALO provedli allogenní transplantaci aortálních štěpů od zvířat kmene Brown-Norway příjemcům kmene Lewis. Ve skupině TAC1 jsme však podávali intramuskulárně takrolimus v dávce 0,2 mg/kg/den od 1. pooperačního dne po dobu 30 dnů a v allogenní skupině TAC7 jsme aplikovali takrolimus v dávce 0.2 mg/kg/den od 7. pooperačního dne do 30. dne. Štěpy jsme ve všech čtyřech skupinách 30. pooperační den explantovali a připravili k histologickému a imunohistochemickému zpracování.

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

4. VÝSLEDKY

4.1. Hmotnost zvířat

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

4.2. Koncentrace takrolimu v periferní krvi příjemců

Měření koncentrace takrolimu v periferní krvi jsme prováděli za účelem zjištění adekvátních koncentrací imunosupresiva 3-7 ng/ml při denních dávkách 0,2 mg/kg podávaných v intramuskulárních injekcích. Průměrná koncentrace imunosupresiva třicátý pooperační den byla ve skupině TAC1, ve které zvířata dostávala imunosupresi od 1. pooperačního dne mírně vyšší (4.6 ± 0.7 ng/ml) v porovnání se zvířaty, která dostávala takrolimus až od 7. pooperačního dne ve skupině TAC7 (4.0 ± 0.2 ng/ml) ($P=0.035$). Během experimentu jsme nezaznamenali žádné vedlejší účinky podávání takrolimu, jako diarrheu nebo přetrvávající úbytek na váze.

4.3. Histologické vyšetření

Při histologickém vyšetření jsme zjistili, že aortální štěpy z obou imunosuprimovaných skupin (TAC1, TAC7) mají 30. den po transplantaci fyziologickou stavbu cévní stěny s diferencovatelnými všemi třemi základními vrstvami – tunica intima, tunica media i tunica adventitia. Intraluminální povrch tunica intima byl pokrytý jednou souvislou vrstvou endotelových buněk bez zjevných trhlin, či jiných projevů poškození. V celém rozsahu tunica media jsme nezaznamenali žádné známky destrukce ani nekrózy buněk. Při imunohistochemickém vyšetření na ukládání imunoglobulinů v tunica media jsme nedetekovali žádná depozita IgG. Infiltrace tunica adventitia mononukleáry byla u obou skupin TAC1 i TAC7 srovnatelná s isogenní skupinou ISO. Alografty měly normální histologickou stavbu abdominální aorty se všemi třemi základními anatomickými vrstvami, bez známek intimální hyperplazie, nekrózy buněk hladkých svalů v mediální vrstvě a bez větší adventiciální infiltrace imunokompetentními buňkami (tabulka 1).

4.4. Infiltrace adventicie imunokompetentními buňkami

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

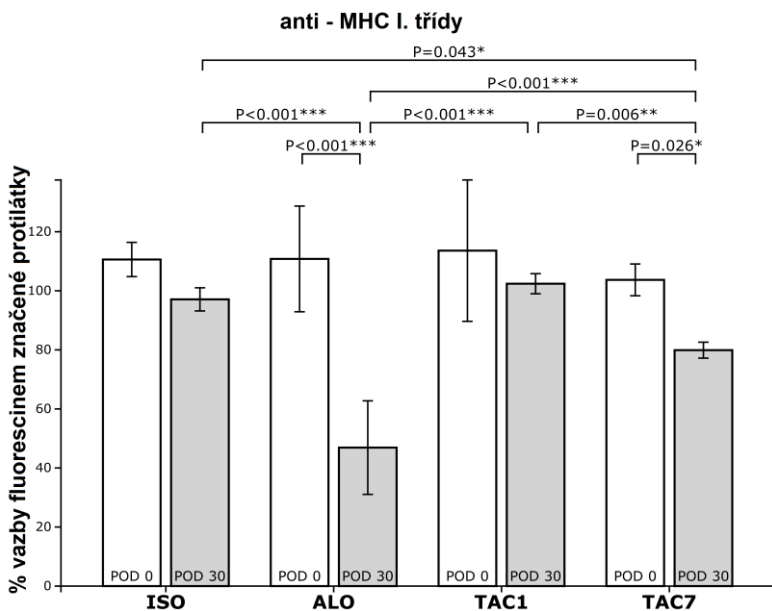
Průměrný počet MHC II pozitivních buněk kmene Lewis, CD8 a CD4 pozitivních buněk v tunica adventitia ve skupině ALO, kde jsme provedli allogenní transplantaci bez podávání imunosuprese, byl signifikantně vyšší ($P < 0.001$) než v ostatních skupinách (ISO, TAC1, TAC7) (tabulka 1).

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

Tabulka 1 - Hodnocení histologického obrazu a známek rejekce u kryokonzervovaných aortálních alloštěpů 30. den po transplantaci.

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

Séra allogenní neimunosuprimované skupiny (skupina ALO), odebraná 30. pooperační den, vykazovala signifikantně vyšší inhibici vazby fluoresceinem označené protilátky proti MHC I. třídy na splenocyty kmene Brown-Norway (46.9 ± 19.4 %), v porovnání se séry, odebraných 30. pooperační den, v isogenní skupině (skupina ISO, 97.1 ± 4.7 %, $p < 0.001$), stejně tak, jako v případě obou imunosuprimovaných skupin (skupina TAC1, 102.4 ± 4.2 %, $p < 0.001$), (skupina TAC7, 79.9 ± 3.3 %, $p < 0.001$). (obrázek 1).



Obrázek 1 - Srovnání koncentrace protilátek proti MHC I. třídy v séru 0. a 30. den po transplantaci.

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

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

5. DISKUZE

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

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

lékem je cyklosporin A. V případě cyklosporinu A však byly prokázány jednak vaskulární a jednak metabolické nežádoucí účinky. Na modelu potkaních srdečních alloštěpů bylo prokázáno, že podávání cyklosporinu A vede k progresi aterosklerotických změn ve štěpu. Tento jev byl objasněn zvýšenou expresí růstového faktoru TGF- β (transforming growth factor beta) (Khanna AK et al., 2002). V případě aortálních alloštěpů bylo v další práci na potkanech zjištěno, že podávání cyklosporinu A vede k poškození endotelu a akceleraci aterosklerotického procesu (Mennander A. et al., 1992). Všechna uvedená fakta ohledně imunogenicity tepených alloštěpů, imunosuprese pomocí protokolů s takrolimem, dobrých klinických výsledků při imunosupresivní terapii při simultánních transplantacích orgánů a cév vedla v roce 2002 k provedení experimentální studie, ve které se sledoval účinek imunosupresivního protokolu pomocí takrolimu po transplantaci chladem konzervovaných aortálních alloštěpů na potkaním modelu (Matia et al., 2007). V návaznosti na to se v roce 2004 začal standardizovaný protokol s takrolimem používat v klinické praxi u pacientů po náhradách infikovaných cévních protéz nebo stent-graftů chladem konzervovaným alloštěpem.

V popisovaném experimentu jsme nepozorovali žádné klinicky významnější vedlejší účinky imunosuprese při podávání takrolimu intramuskulární cestou v dávce 0,2 mg/kg/den. Při hodnocení pooperačního nárůstu váhy zvířat v jednotlivých skupinách jsme nicméně zaznamenali, že zvířata, která dostávala imunosupresi od prvního pooperačního dne, přibývala na váze signifikantně méně než zvířata z ostatních skupin, která dostávala imunosupresi s odstupem 7 dnů nebo nedostávala takrolimus vůbec. Ve studii, která hodnotila imunosupresivem indukovanou hypertenzi, byl potkanům podáván takrolimus celkem 4 týdny v dávce 5,0 mg/kg/den, zvířatům nebyl prováděn žádný operační výkon. Po čtyřech týdnech byla váha imunosuprimovaných a neimunosuprimovaných zvířat srovnatelná, bez významného rozdílu (Takeda Y. et al., 1999).

V naší studii jsme potvrdili možnost odložení léčby nízkou dávkou takrolimu po transplantaci kryokonzervovaných potkaních aortálních alloštěpů o sedm dní bez toho, aby byly patrné známky akutní, buňkami a protilátkami zprostředkované rejekce. Obdobně na modelu transplantace chladem konzervovaných karotických alloštěpů dostatočně imunoprese takrolimem k potlačení imunitní reakce i když byla započata od třetího dne po transplantaci. Přerušení podávání imunoprese pak vedlo k hyperakutní rejekci během 14 dnů (Azuma N. et al. 1999).

V naší práci jsme prokázali indukci donor specifických anti MHC I a anti MHC II protilátek u neimunosuprimovaných příjemců kryokonzervovaných aortálních alloštěpů v průběhu třicetidenního sledovacího období. Oba imunopresivní protokoly s použitím nízké dávky takrolimu byly dostatečně účinné k potlačení produkce těchto protilátek.

6. ZÁVĚR

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

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

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

7. LITERATURA

1. Azuma N, Sasajima T, Kubo Y. Immunosuppression with FK506 in rat arterial allografts: fate of allogeneic endothelial cells. *J Vasc Surg* 1999; 29(4):694-702.
2. Harlander-Locke MP, Harmon LK, Lawrence PF, Ode-
rich GS, McCready RA. The use of cryopreserved aorto-
iliac allograft for aortic reconstruction in the United States. *J Vasc Surg* 2014; 59: 669-67417
3. Khanna AK, Hosenpud JS, Plummer MS, Hosenpud JD. Analysis of transforming growth factor-beta and profibro-
genic molecules in a rat cardiac allograft model treated with cyclosporine. *Transplantation* 2002; 73: 1543.
4. Kieffer E, Gomes D, Chiche L, Fléron MH, Koskas
F, Bahnini A. Allograft replacement for infrarenal aor-
tic graft infection: early and late results in 179 pa-
tients. *J Vasc Surg* 2004; 39(5):1009-17
5. Konrad H, Wahle A, Altermann W, Schlaf G. Strong hu-
moral anti-HLA Immune Response Upon Arbitrarily
Chosen Allogeneic Arterial Vessel Grafts. *J Clin Cell
Immunol* 2017; 8:525
6. Matia I, Lodererova A, Adamec M. Delayed administrati-
on of FK 506 is sufficient to suppress acute rejection
changes after aortal transplantation in rats. *Transpl Int*
2007; 20: 371-380.
7. Mennander A, Paavonen T, Hayry P. Cyclosporinein-
duced endothelialitis and accelerated arteriosclerosis in
chronic allograft rejection. *Transplant Proc* 1992; 24:
341.45

8. Měříčka P., Straková H., Štěřba L., Schustr P., Vinš M.: Cryobank of the Tissue Establishment University Hospital Hradec Králové – Design and 10 year Experience of Operation, The thirteen Cryogenics 2014, IIR International Conference Proceedings, Icaris, Ltd. Prague, 2014, p. 177-182.
9. Mirelli M1, Stella A, Faggioli GL, Scolari MP, Iannelli S, Freyrie A, Buscaroli A, De Santis L, Resta F, Bonomini V, D'Addato M. Immune response following fresh arterial homograft replacement for aortoiliac graft infection. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1999; 18(5):424-9.
10. Takeda Y, Miyamori I, Furukawa K, Inaba S, Mabuchi H. Mechanism of FK506-Induced Hypertension in the rat, *Hypertension* 1999; 33:130-136.

8. VLASTNÍ PUBLIKAČNÍ AKTIVITA

Publikace se vztahem k tématu dizertační práce

a) impaktované

1. Špaček M, Měříčka P, Janoušek L, Štádler P, Adamec M, Vlachovský R, Guňka I, Navrátil P, Thieme F, **Špunda R**, Burkert J, Staffa R, Němec P, Lindner J Current vascular allograft procurement, cryopreservation and transplantation techniques in the Czech Republic. *Adv Clin Exp Med*. 2019 Apr;28(4):529-534 **IF 1.179**
2. **Špunda R**, Hruby J, Mericka P, Mlcek M, Pecha O, Splith K, Schmelzle M, Krenzien F, Lindner J, Matia I, Spacek M. Immunosuppressive protocols with tacrolimus after cryopreserved aortal allotransplantation in rats. *PLoS One*. 2018 Aug 9;13(8):e0201984 **IF 2.766**

3. Špaček M, Měřička P, Janoušek L, Štádler P, Adamec M, Vlachovský R, Guňka I, Navrátil P, Thieme F, Mitáš P, **Špunda R**, Špatenka J, Staffa R, Němec P, Lindner J. Organization model for allotransplantations of cryopreserved vascular grafts in Czech Republic. Cell Tissue Bank. 2018 Sep;19(3):437-445 **IF 1.527**
4. **Spunda R.**, Hruba J., Adamec M., Matia I., Spacek M. Cold-stored arterial allografts for in situ reconstruction of infected prosthetic grafts: Review of immunosuppressive protocols used in clinical practice. European Surgery - Acta Chirurgica Austriaca 2016;48:166-168 **IF 0.503**

b) neimpaktované

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

Publikace se vztahem k tématu dizertační práce v recenzním řízení

1. Hrubý J., Měřička P., Špaček M., **Špunda R.**, Mitáš P., Mlček M., Matia I., Lindner J.: Vliv kryokonzervace na imunogenicitu cévních allograftů – analýza experimentálních dat. Cor et Vasa
2. Hrubý J, **Spunda R**, Mericka P, Mlcek M, Pecha O, Splith K, Schmelzle M, Krenzien F, Lindner J, Spacek M., Matia I.: Influence of cryoconservation on antigenicity of arterial allografts, European Journal of Vascular and Endovascular Surgery

Publikace ostatní

a) impaktované

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

b) neimpaktované

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

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