

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Postgraduální doktorské studium v biomedicíně

Studijní obor: Experimentální chirurgie



MUDr. Martin OLIVERIUS

Transplantace střeva na experimentálním

modelu.

Intestinal Transplantation on an Experimental

Model.

Disertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Miloš ADAMEC, CSc.

Praha, 2010

Prohlášení:

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

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

V Praze, 28. 10. 2010

MUDr. Martin OLIVERIUS

OLIVERIUS, Martin. *Transplantace střeva na experimentálním modelu [Intestinal Transplantation on an Experimental Model]*. Praha, 2010. 81s., Disertační práce. Klinika transplantační chirurgie IKEM, Praha. Školitel Adamec, Miloš.

OBSAH

Obsah.....	3
Abstrakt	6
Poděkování	8
Zkratky použité v textu	9
1 Úvod do problematiky.....	11
1.1 Úvod.....	11
1.2 Historie transplantace tenkého střeva a multiviscerálních transplantací.....	11
1.3 Indikace k transplantaci tenkého střeva	12
1.4 Kontraindikace k transplantaci tenkého střeva	17
1.5 Čekací listina (waiting list).....	18
1.6 Typy transplantací tenkého střeva.....	18
1.7 Imunosuprese po transplantaci	20
1.8 Komplikace transplantace.....	21
1.8.1 Chirurgické komplikace	22
1.8.2 Rejekce štěpu	22
1.8.3 Infekce po transplantaci.....	24
1.8.4 Nádorová onemocnění a potransplantační lymfoproliferativní onemocnění.....	25
2 Cíle dizertační práce	26
3 Experimentální část.....	27
3.1 Materiál a metody	27
3.1.1 Experimentální zvířata	27
3.1.2 Anestézie, analgezie, pooperační péče a euthanasie pokusných zvířat.....	28

3.1.3	Pooperační sledování	30
3.1.4	Odběr vzorků pro hodnocení	30
3.1.5	Histologická vyšetření	31
3.1.6	Statistika.....	32
3.2	Cíl 1. Zvládnutí a standardizace chirurgické techniky transplantace tenkého střeva na praseti	33
3.2.1	Úvod	33
3.2.2	Metodika	33
3.2.3	Výsledky	41
3.2.4	Diskuze	41
3.2.5	Závěr.....	42
3.3	Cíl 2. Stanovení nejvhodnějšího imunosupresivního režimu po transplantaci	43
3.3.1	Metodika	43
3.3.2	Výsledky	45
3.3.3	Diskuze	50
3.3.4	Závěr.....	52
3.4	Cíl 3. nalezení vhodného humorálního markeru akutní celulární rejekce	53
3.4.1	Citrulinová analýza	53
3.4.2	Cytokinová analýza.....	58
4	Závěry dizertační práce	67
5	Literatura.....	68
6	Publikační aktivita	71
6.1	Grant IGA MZd ČR.....	71
6.2	Články s IF ve vztahu k dizertační práci	71

6.3	Články bez IF ve vztahu k dizertační práci.....	72
6.4	Přednášky a postery ve vztahu k dizertační práci	73
6.4.1	Přednáška s abstraktem	73
6.4.2	Přednášky bez abstraktu	74
6.5	Články s IF bez vztahu k dizertační práci	75
6.6	Články ostatní bez vztahu k dizertační práci	76
6.7	Monografie CZ	80
6.8	Kapitola v monografii CZ	80
6.9	Kapitola ve sborníku CZ.....	80

Abstrakt

Abstrakt

Transplantace tenkého střeva je život zachraňující metoda pro nemocné se selháním střeva. Před zahájením klinického programu v České republice byl proveden experiment na praseti. Cílem práce bylo zvládnutí chirurgické techniky transplantace (odběru střeva, jeho konzervace a následné transplantace). Dalším cílem bylo zvolit optimální imunosupresivní režim. Imunosuprese byla založena na podávání tacrolimu nebo jeho kombinace se sirolimem. Základem diagnostiky akutní celulární rejekce je zhodnocení histopatologických změn biopsie štěpu. Ve snaze najít vhodný neinvazivní humorální marker akutní celulární rejekce byla vyšetřována plasmatická hladina citrulinu a její vztah k akutní celulární rejekci. Jako další humorální marker byly vyšetřeny hladiny prozáněťových a protizáněťových cytokinů a zkoumán jejich vztah k rejekci.

Podařilo se nám zvládnout chirurgickou techniku transplantace. Prokázali jsme, že napojení štěpu na centrální řečiště je bezpečnější než napojení na vlastní portomezenterické cévy. Neprokázali jsme statisticky významný rozdíl mezi zvolenými imunosupresivními režimy na vznik akutní celulární rejekce. Jako zlatý standard diagnostiky nadále zůstává histologické vyšetření biopsie štěpu. Hladina plasmatického citrulinu se jeví jako potenciálně vhodný marker středně těžkého až těžkého stupně rejekce. Nepodařilo se nám prokázat význam stanovení jednotlivých cytokinů pro včasnou neinvazivní diagnostiku akutní celulární rejekce.

Klíčová slova: transplantace tenkého střeva- imunosuprese- akutní celulární rejekce- tacrolimus- sirolimus- citrulin- cytokiny

Abstract

Intestinal transplantation represents a life-saving procedure for patients with an intestinal failure. An experiment on pigs was carried out during the preparation part of a clinical project in the Czech Republic. The main aim of the experiment was to successfully master the transplant surgery technique (i.e. small bowel harvesting, its preservation, followed by the transplantation). Another goal was to decide on the optimal immunosuppressive regime. Immunosuppression was based on tacrolimus monotherapy or its combination with sirolimus. A graft biopsy still remains the most reliable method for the diagnosis of an acute cellular rejection. In an attempt to find a suitable noninvasive humoral marker of the acute cellular rejection, we examined the correlation between plasma citrullin level and the acute rejection. The plasmatic level of proinflammatory and antiinflammatory cytokines was investigated as another potential marker of the rejection.

We succeeded in standardizing the technique of intestinal transplantation. Connecting the graft to aorta and inferior vena cava is simpler and safer than connecting it to the portomesenteric vessel bed due to fewer subsequent complications. Both immunosuppressive regimes seem to be equally effective in preventing the acute cellular rejection. Histopathological examination of the graft biopsy remains indeed the most reliable examination method for the rejection diagnosis. The plasma citrullin level is a marker supporting the diagnosis of moderate and severe rejection after transplantation. The exact role of cytokine examination in detecting the acute rejection was not determined.

Key words: small bowel transplantation – Immunosuppression – acute cellular rejection – tacrolimus – sirolimus – citrullin – cytokines.

Poděkování

Tato práce by nikdy nevznikla bez podpory mých učitelů a kolegů. Všem, kteří se na jejím vzniku podíleli, chci tímto upřímně poděkovat.

Jmenovitě

Svému školiteli **prof. MUDr. M. Adamcovi, CSc.**

Svým kolegům, kteří se mnou prováděli většinu experimentálních prací: **MUDr.E.**

Honsové, PhD; MUDr. P. Balážovi, PhD; MUDr. M. Kudlovi, PhD; MUDr. A. Valsamisovi;

RNDr. A. Lodererové

Ing. I. Šplíchalovi, PhD za spolupráci v oblasti výzkumu cytokinů u prasat

Bc. J. Čápovi a M. Hmirákovi za vedení anestezie a péči o laboratorní zvířata

Z. Šimůnkové a Bc. I. Mrázové za instrumentování při odběrech a transplantacích

Dále bych chtěl vyjádřit dík svým zahraničním kolegům, kteří mě motivovali a pomáhali při tvorbě tohoto projektu.

Prof. Jacques Pirenne, MD, PhD; přednostovi břišní a transplantační chirurgie
v Univerzitní nemocnici Gasthuisberg; Leuven v Belgii

Prof. Kareem Abu- Elmagdovi, MD, PhD, FACS; přednostovi Intestinal Rehabilitation and
Transplantation Center UPMC Hospital v Pittsburghu, USA

V neposlední řadě můj největší dík patří **mé rodině**, bez jejíž podpory bych nemohl tuto práci dokončit.

Zkratky použité v textu

- Ab- antibody- protilátka
- Ag- antigen
- APC- antigen presenting cell- antigen prezentující buňka
- CMV- cytomegalovirus
- EBV- virus Epstein- Barrové
- GVHD- graft versus host disease- reakce štěpu proti hostiteli
- HPN- home parenteral nutrition- domácí parenterální výživa
- IF- intestinal failure- selhání střeva
- IL-2 – interleukin 2
- IL-4 – interleukin 4
- IL-8 – interleukin 8
- IL-10 – interleukin 10
- INF gama – interferon gama
- IRI- ischemic reperfusion injury – ischemicko reperfusní poškození
- IS- imunosuprese, imunosupresivní léčba
- LSBTx- liver and small bowel transplantation- transplantace jater a tenkého střeva
- MMVTx- modified multivisceral transplantation- modifikovaná multiviscerální transplantace
- MVTx – multivisceral transplantation- multiviscerální transplantace
- OKT3- monoklonální protilátka proti anti-CD3
- PCR- polymerase chain reaction
- PTLD- posttransplant lymphoproliferative disease- postrtransplantační lymfoproliferativní onemocnění
- SBS- short bowel syndrom- syndrom krátkého střeva
- SBTx- small bowel transplantation- transplantace tenkého střeva

- TNF α - tumor necrotic factor alfa
- TPN- total parenteral nutrition- úplná parenterální výživa
- WL- waiting list – čekací listina

1 Úvod do problematiky

1.1 Úvod

Transplantace tenkého střeva (small bowel transplantation- SBTx) je život zachraňující metoda pro nemocné se selháním střeva, kteří nemohou být léčeni standardními léčebnými postupy nebo se u nich vyvinou život ohrožující komplikace totální parenterální výživy (TPN). Přesnou definici selhání střeva (intestinal failure- IF) lze obtížně stanovit, ale obecně se mívá stav, kdy střevo z důvodů funkčních nebo morfologických není schopno plnit svou základní funkci, kterou je trávení a vstřebávání potravy.

Metoda patří k nejobtížnějším v transplantologii jak z hlediska technického, tak především imunologického. Střevo představuje největší imunitní orgán v těle a se svou plochou i největší bariérou vůči nepříznivým vlivům zevního prostředí. Porušení této ochrany vede rychle k translokaci mikroorganismů a toxinů do krve s následným rozvojem sepse. Z těchto důvodů jsou úspěchy metody spojeny s rozvojem dokonalé imunosuprese.

Střevo je transplantováno buď jako samotný orgán nebo spolu s dalšími v podobě kombinovaných a multiorgánových transplantací. Nejčastější věkovou skupinou jsou nemocní v dětském věku.

1.2 Historie transplantace tenkého střeva a multiviscerálních transplantací

U základů moderní transplantologie stál bezpochyby Alexis Carrel, který na počátku minulého století definoval základy techniky cévního stehu a zásadně změnil tradiční chirurgické myšlení v tom, že cévy je možno rekonstruovat, nikoli pouze podvazovat (1). Jeho pionýrské práce zabývající se cévní anastomózou mu umožnily jako prvnímu transplantovat

orgány. Jako první transplantoval segment tenkého střeva u psa (2). V roce 1959 americký chirurg Richard Lillehai z Minnesoty spolu se Starzlem provedli první transplantaci tenkého střeva na modelu psa (3). Mochnik s Russellem jako první transplantovali střevo u laboratorního potkana (4). První klinická transplantace střeva je přisuzována Ralphu Deterlingovi z Bostonu, který roku 1964 provedl první transplantaci střeva u člověka. Pacient bohužel krátce po operaci zemřel a Deterling svůj výkon nepublikoval. První tištěná zpráva přichází o pět let později opět z Minnesoty. Tentokrát to byl Lillehai, který v roce 1969 publikoval jako první zprávu o transplantaci tenkého střeva u člověka (5). Bohužel, i tento pacient za krátkou dobu po výkonu zemřel na rejekci orgánu. Tyto neúspěchy vedly postupně k útlumu transplantační aktivity na tomto poli. Zásadní přelomem v transplantační medicíně se stává rok 1980, kdy byl zaveden do léčby Cyklosporin. V roce 1987 provádí Starzl v Pittsburghu první multiviscerální transplantaci obsahující játra, žaludek, duodenum, slinivku, tenké a tlusté střevo u tříleté dívenky. Štěp fungoval půl roku, než dítě zemřelo v důsledku malignity (6). Již o rok později tato metoda přesáhla americký kontinent a německý chirurg Deltz v Kielu provedl první úspěšnou transplantaci tenkého střeva u člověka (7). Pacient přežíval více jak 4 roky na plné perorální dietě s funkčním štěpem. V roce 1992 provedl sir Roy Yorke Calne v Británii první transplantaci tenkého střeva a o dva roky později první „cluster“-transplantaci žaludku, střeva, jater, slinivky a ledvin (8). Další milník představuje zavedení nového kalcineurinového imunosupresiva tacrolimu v roce 1989 (9), který je k léčbě používán dodnes. Na konci minulého tisíciletí se do léčby dostávají monoklonální protilátky. Jejich použití v indukční léčbě a následná minimalizace imunosuprese má za následek dramatické zlepšení výsledků a tím i zvyšující se zájem o tuto život zachraňující metodu.

1.3 Indikace k transplantaci tenkého střeva

Základní funkcí tenkého střeva je zajištění výživy organismu, dále se významně podílí na metabolismu vody a minerálů. Po dutině ústní, jícnu a žaludku představuje důležitou obranou funkci před vstupem infekce požitou stravou. Díky tomu disponuje střevo obrovským

množstvím imunokompetentních buněk a představuje tak nejdůležitější a zároveň největší imunitní orgán v těle.

Ztráta nebo selhání těchto funkcí zejména v oblasti metabolismu je závažným stavem ohrožujícím život jedince. Nejčastěji k tomu dochází z důvodů vlastní ztráty střeva. V této situaci hovoříme o tzv. **syndromu krátkého střeva** (short bowel syndrome - SBS). Příčiny ztráty střeva jsou různé a jejich výskyt je odlišný u dospělých a u dětí (tab. 1).

Dospělí	%	Děti	%
Mezenteriální trombózy a embolie	23	Gastroschisis	21
Crohnova choroba	17	Volvulus a malrotace	17
Břišní trauma; iradiační poškození; adheze	10	Nekrotizující enterokolitis	12
Intraabdominální desmoidní nádor	9	Pseudoobstrukce	9
Poruchy motility	8	Intestinální atrezie	8
Volvulus	7	Aganglióza/ Hirschsprungova choroba	7
Jiné příčiny SBS	6	Microvilus inclusion	6

Tab. 1. Nejčastější příčiny ztráty střeva u dospělých a dětí a jejich procentuální výskyt.

Vlastní chybění střeva ale není jedinou příčinou jeho selhání. Dalším důvodem může být porucha funkce jak ve smyslu motility, tak z hlediska absorpce. Nejčastějšími **poruchami střevní motility** jsou chronická střevní pseudoobstrukce, viscerální myopatie a neuropatie, Hirschsprungova choroba. Vyskytují se i vzácná onemocnění, u kterých je **porušena střevní funkce** jako je microvillus inclusion disease.

Ztrátu střeva nebo selhání jeho funkce lze v první fázi kompenzovat zajištěním parenterální výživy, hrazením ztrát vody a minerálů včetně stopových prvků. Po stabilizaci pacienta je zajištěn cévní přístup tunelizovaným katétrem do některé velké žíly s převedením pacienta na dlouhodobou domácí parenterální výživu. Moderní formule a způsoby podávání této výživy jsou velmi významným způsobem léčby těchto nemocných při zachování přijatelné

kvality života. Dlouhodobá parenterální výživa však vede postupně k vzniku život ohrožujících komplikací, kterými jsou infekce nebo trombóza katétru s následnou ztrátou cévního přístupu a nebezpečím embolie. Další závažnou komplikací je poškození jaterního parenchymu. To limituje možnost trvalého používání tohoto způsobu léčby. Transplantace střeva v této situaci představuje jedinou léčebnou modalitu.

Transplanace by u těchto nemocných měla být zvažována včas, dokud je pacient výkonu schopen. Jako jednoznačně prokázané negativní prognostické faktory ovlivňující přežívání jsou SBS na podkladě mezenterálního infarktu, zbývající délka tenkého střeva pod 50cm (u dětí pod 25cm), ztráta střevní kontinuity s jejunostomií, věk nad 60 roků. Při přítomnosti těchto negativních prognostických faktorů je pětileté přežívání na TPN pouze kolem 40% (10, 11).

Indikační kritéria k transplantaci jsou pevně stanovená. (tab. 2). Tvoří je především **život ohrožující komplikace parenterální výživy**. Dále **excesivní ztráty tekutin a minerálů** u nemocných s ultrakrátkým střevem, které nelze adekvátně hradit, a které vedou k poškození dalších orgánů. Některé **nádory dutiny břišní** klasickými chirurgickými metodami neřešitelné. Díky zlepšujícím se výsledkům transplantace tenkého střeva se do popředí dostává i otázka **kvality života pacientů** na TPN ve srovnání s SBTx (12, 13).

Poškození jater v důsledku TPV
Recidivující katérové infekce (více jak dvě do roka nebo jedna infekce mykotická nebo infekce spojená s SIRS)
Ztráta více jak dvou hlavních žilních přístupů v důsledku trombózy
Časté a závažné dehydratace a minerálové rozvraty v důsledku excesivních ztrát stomíí
Nádory (např. desmoidní nádory, familiární polypóza, Gardnerův syndrom apod.)

Tab. 2. Indikace k transplantaci tenkého střeva.

Hlavními komplikacemi TPN jsou jaterní poškození, trombóza cévních přístupů a katérové sepse. Jaterní poškození navozené TPN je dáno především chyběním enterohepatálního oběhu a poruchou trávení tuků. Ten se hromadí v jaterních buňkách. Vzniklá steatóza postupně přechází v zánětlivou formu v podobě steatohepatitidy s postupnou fibrotizací až přechodem do obrazu plně rozvinuté cirhózy (14). K tomuto obrazu by v optimálním případě vůbec nemělo dojít a pacient, který je na domácí parenterální výživě, sledovaný svým lékařem by měl být včas odeslán ke konzultaci do transplantačního centra. Při posuzování jaterního onemocnění je nutno zmínit, že typické známky pokročilé jaterní léze nemusí být vyjádřeny. Pacienti se zaniklou dutinou břišní po opakovaných operacích nemají prostor pro rozvoj ascitu, krátké mezenterikoportální řečiště neumožní vznik větších jícnových varixů apod.

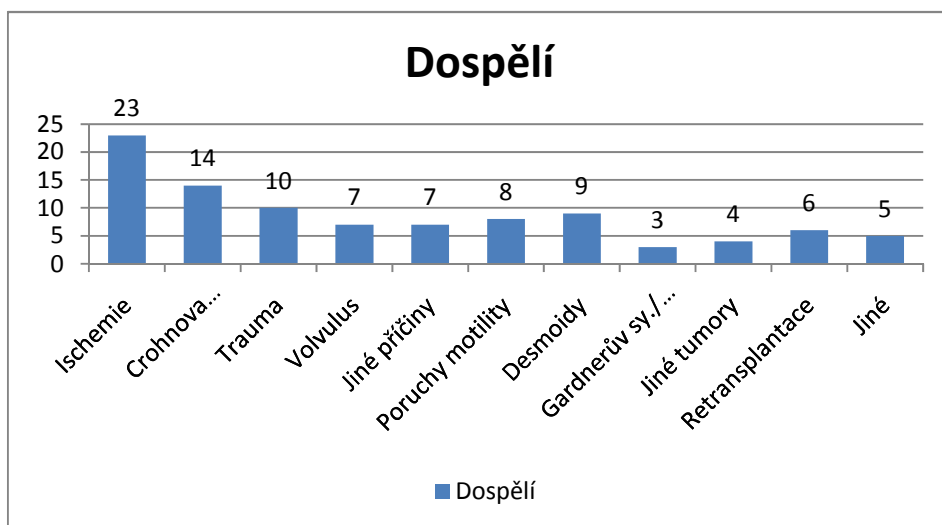
Přes všechny dodržované zásady hygieny představuje centrální žilní katétr přímý vstup do cévního řečiště s nebezpečím infekce. S katérovou infekcí se setká prakticky každý pacient. Jejich nebezpečí spočívá v možnosti přechodu do celkové sepse se vznikem multiorgánového selhání. Tyto septické komplikace zejména způsobené mykotickými infekcemi mají vysokou mortalitu.

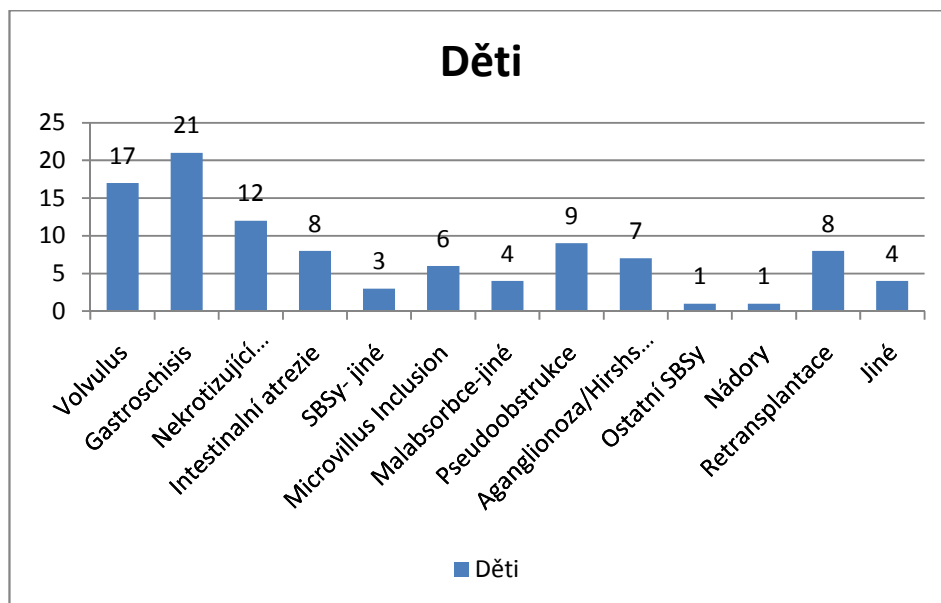
Další závažnou komplikací je trombóza a postupná ztráta žilního vstupu. Přitom žilní vstup představuje pro pacienta pupeční šňůru, kterou je spjatý s životem. Postupný uzávěr hlavních žilních vstupů nutí k získávání neobvyklých cévních přístupů a po jejich vyčerpání k úmrtí v důsledku nemožnosti zajištění výživy.

Existuje malá skupina nemocných, u kterých ani adekvátní žilní přístup bez známek poruchy jaterních funkcí a příznaků infekce nedokáže situaci zvládnout. Příčinou jsou excesivní ztráty tekutin a minerálů způsobené enormním výdejem ze stomie. Jde o pacienty s ultrakrátkým střevem v rozsahu 20 – 40cm s terminální jejunostomií.

První zmínky o významu kvality života pacientů na TPN ve srovnání s úspěšnou SBTx zazněly na devátém mezinárodním kongresu v Bruselu 2005. Z posledních prací vyplývá, že více jak u 80 % pacientů po úspěšné transplantaci došlo do 6 měsíců k plnému přechodu na perorální stravu bez nutnosti podávání infuzí. V porovnání s úspěšnou transplantací není TPN nikdy schopna zajistit plnou kvalitu života (15).

Vzhledem k nutnosti podávání trvalé imunosuprese není transplantace střeva, podobně jako u ostatních transplantovaných orgánů, indikována u maligních onemocnění. Z hlediska indikace pro nádory připadá v úvahu u nemocných s chirurgicky neodstranitelným desmoidním tumorem, rozsáhlého postižení při familární polypóze nebo Gardnerově syndromu (tab. 3).





Tab. 3. Indikace k transplantaci a jejich četnost u dospělých a dětí podle údajů International transplant registry.

1.4 Kontraindikace k transplantaci tenkého střeva

Vzhledem k náročnosti celého procesu je nezbytné splnit základní podmínku, aby nemocný z provedené transplantace dlouhodobě profitoval. K transplantaci proto nejsou indikováni nemocní, kteří trpí **závažným nevyлéčitelným onemocněním**, zejména ve smyslu malignity, HIV nebo těžkým invalidizujícím, psychiatrickým nebo neurologickým postižením.

Obecnou kontraindikací k transplantaci je **septický stav** pacienta, **kompletní ztráta cévních přístupů**, protože vlastní operace a bezprostřední pooperační průběh vyžadují adekvátní přístupy pro podávání infuzí a léků.

Přítomnost nevyлéčitelného onemocnění v podobě malignit nebo HIV infekce je pochopitelně jasnou kontraindikací.

Sám věk pacienta není kontraindikací k transplantaci a dle transplantačního registru je nejmladšímu pacientovi, který byl transplantován 1,2 měsíce a nejstarší pacient je 68 let starý.

Rozhodující je biologický věk a celkový zdravotní stav umožňující přestát tento složitý výkon a bezprostředně z něj profitovat.(16)

Dalším velmi významným faktorem, který je v indikacích nutno zvažovat, je psychický stav nemocného, případně jeho opatrovníků a jejich schopnost spolupráce – tzv. **compliance**. Každý pacient vyžaduje po transplantaci trvalou imunosupresivní léčbu, bez které by došlo brzy k odmítnutí orgánu.

1.5 Čekací listina (waiting list)

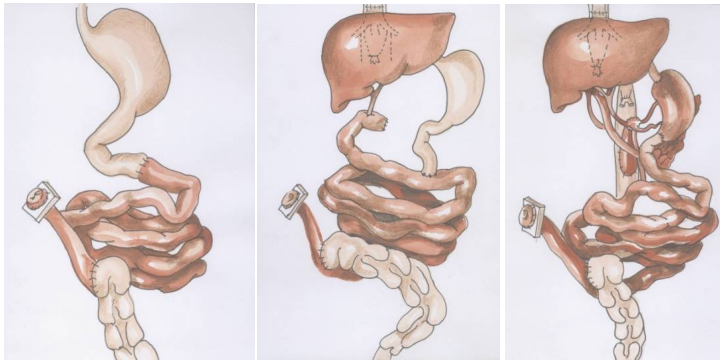
Hlavním úkolem transplantačního centra při posuzování kandidátů k transplantaci je vyloučit nemocné, kteří nesplňují indikační kritéria k výkonu včetně těch, u kterých není stanovena diagnóza nezvratného selhání tenkého střeva. Nemocní, kteří nemají neovlivitelné kontraindikace a splňují stanovené indikace, musí být podrobně vyšetřeni se zaměřením na základní diagnózu, přesné posouzení ostatních komorbidit a celkové duševní a fyzické kondice. Podrobný onkologický skríníng je součástí tohoto vyšetření. Zároveň je nezbytné aktivně pátrat po případných infekčních focusech a při jejich nalezení je odstranit.

Po splnění všech podmínek je nemocný zařazen na čekací listinu (WL- waiting list) a jemu přidělena urgence na základě aktuálního zdravotního stavu (0- nemocný je zařazen, ale není aktivní; 1- nemocný zařazený, čekající v domácích podmínkách; 2- nemocný zařazený, hospitalizovaný; 3- nemocný zařazený, hospitalizovaný na JIP; 4- urgentní nemocný bezprostředně ohrožený na životě).

1.6 Typy transplantací tenkého střeva

Rozeznáváme tři základní typy transplantace tenkého střeva. **Izolovanou transplantaci tenkého střeva** (SBTx- small bowel transplantation); transplantaci **tenkého střeva spolu s játry** (LITx- liver intestine transplantation) a **multiviscerální transplantaci** (MVTx-

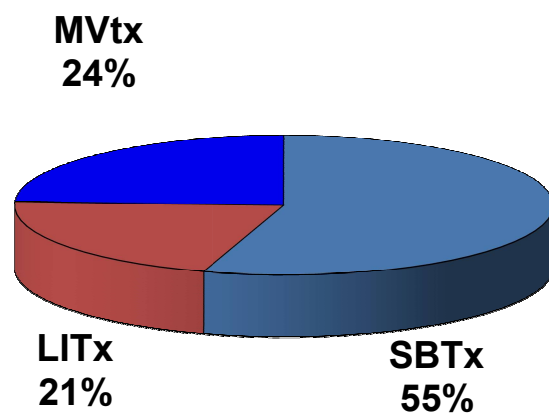
multivisceral transplantation), kdy se společně transplantují tenké střevo s žaludkem, dvanáctníkem, slinivkou a játry (obr. 1 a-c).



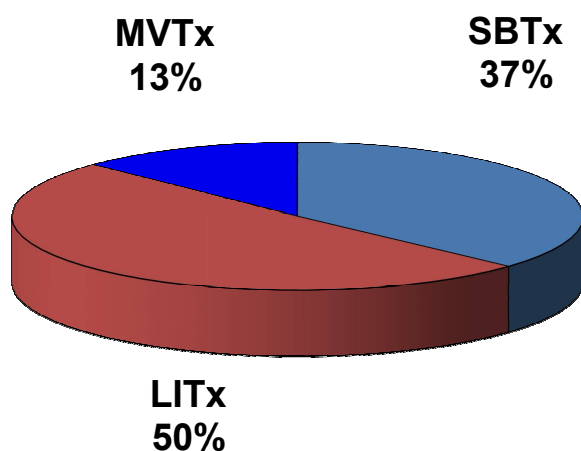
Obr. 1a- c: a) izolovaná transplantace tenkého střeva; b) transplantace střeva a jater; c) multiorgánová transplantace.

Podle údajů z ITR (intestinal transplant registry- mezinárodní databáze nemocných po transplantaci tenkého střeva) je potřeba SBTx častější u dospělých (55% versus 37%). Naopak u dětí převládá LITx. Podobně MVtx je častěji prováděna u dospělých nemocných oproti dětem (24% vs. 13%) (graf 2. a, b).

Dospělí



Děti



Graf 2. a, b. Podíl jednotlivých typů transplantací u dospělých nemocných a u dětí.

1.7 Imunosuprese po transplantaci

Tenké střevo je největší imunitní orgán v lidském těle. Úspěchy transplantace jsou proto úzce spojeny s vývojem imunosupresivní léčby (IS). V počátečním období byla koncepce IS založena na podávání vysokých dávek dostupných léků. To mělo za následek vysoké procento závažných infekčních komplikací a v dlouhodobé perspektivě vysoký počet zhoubných onemocnění (17).

Celkový koncept léčby se postupně měnil v závislosti na nově se vyvíjejících preparátech a tento vývoj nadále pokračuje. Z dnešního pohledu rozeznáváme tři období (18).

Počáteční období bylo založeno na kombinované léčbě převážně s použitím cyklosporinu a azathioprinu (období do roku 1990). Revoluci v transplantologii představuje rok 1990 kdy Murase s kolektivem představil úspěšné použití tacrolimu při SBTx u potkana (19). Na konci milénia se do léčby dostávají monoklonální protilátky a většina režimů je založena na indukční léčbě a udržovacích dávkách tacrolimu v kombinaci se steroidy (20-22). V roce 1998 byl do léčby zaveden sirolimus, který v kombinaci s monoklonálními protilátkami proti IL-2 významně

snížil výskyt akutních rejekcí při eliminaci nežádoucích účinků tacrolimu (23). Vývoj na tomto poli intenzivně pokračuje a je nadějí pro další zlepšování výsledků.

1.8 Komplikace transplantace

Transplantace střeva představuje jeden z nejsložitějších zákroků spojených s množstvím potenciálních komplikací, které vycházejí ze tří základních příčin. Většina nemocných indikovaných k transplantaci je po opakovaných chirurgických zákrocích a má zaniklou dutinu břišní. To samo o sobě představuje technicky složitý chirurgický přístup. Orgán je vysoce citlivý na dobu studené ischemie a jakékoli škodlivé vlivy, zejména ve smyslu hypoperfúze a hypoxie, které jsou spojené s obdobím kolem resuscitace a úmrtí dárce.

Střevo představuje největší imunitní orgán v těle s velkým objemem imunokompetentních buněk.

V neposlední řadě střevní obsah není nikdy zcela sterilní a po provedené transplantaci je střevo nadále vystavováno velkému objemu cizích mikroorganismů přijatých potravou.

Tyto důvody logicky vedou k vysokým nárokům na štěp, maximálnímu zkrácení studené ischemie štěpu, potřebu dostatečně účinné imunosuprese vyvážené adekvátní antimikrobiální, antifungální a antivirovou profylaxí. Na rozdíl od jiných orgánů nejsou k dispozici jednoduché diagnostické metody sloužící k včasné diagnostice rejekce jako je např. kreatinin u transplantované ledviny nebo jaterní testy u jater.

Nejčastější komplikace jsou spojeny buď s vlastním chirurgickým zákrokem, nebo vlivem imunitních reakcí mezi štěpem a hostitelem. Při dostatečné IS se do popředí mohou dostávat různé i oportunní infekce. V dlouhodobé perspektivě díky podávané IS je třeba počítat s možným výskytem zhoubných onemocnění a lymfoproliferativních chorob.

1.8.1 Chirurgické komplikace

Po stránce chirurgické představuje výkon komplex složitých po sobě navazujících zákroků, z nichž každý jednotlivý z nich je pro celkový úspěch rozhodující. Celý proces začíná multiorgánovým odběrem, kde každé technické pochybení může být limitující včetně nešetrného zacházení s štěpem. Následuje fáze přípravy transplantátu na „back-table“ event. našití cévních konduktů. Vlastní transplantace je otázkou často komplikovaného otevření dutiny břišní a nalezení cév a části trávicí trubice pro napojení štěpu většinou u nemocných po opakovaných operačních zákrocích se zaniklou dutinou břišní. Následuje fáze našití cévních anastomóz a reperfuze štěpu s obnovením kontinuity trávicí trubice a vytvoření stomie. Poslední částí je uzávěr dutiny břišní komplikovaný ve většině případů nedostatkem přirozeného materiálu chybějící stěny. Zatímco fáze odběru je nejčastěji spojena s technickou chybou spojenou s poškozením štěpu. Fáze transplantace je potenciálně ohrožena krvácením, případně poraněním dalších struktur dutiny břišní v nepřehledném terénu. Celý štěp, který je našit na cévní stopku, je dále ohrožen jejím uzávěrem. To může být způsobeno buď prostou torzí, nebo zalomením. Nedostatek vhodného materiálu často vyžaduje ponechání otevřené dutiny břišní se všemi důsledky, které z toho plynou. Další možností je současná transplantace břišní stěny.

V pozdních fázích je štěp dlouhodobě ohrožen poruchou výživy při zúžení, zalomení nebo ucpání cév. Dále pak poruchou hojení střevních anastomóz v komplikovaném terénu ischemicko-reperfusního poškození (IRI- ischemic reperfusion injury) a následných imunitních reakcí.

1.8.2 Rejekce štěpu

Zatímco chirurgická stránka výkonu je v dnešní době z velké části vyřešena a standardizována, největší ohrožení štěpu představuje rejekce. Ta je způsobena imunitní reakcí mezi štěpem a hostitelem. Rozeznáváme základní dva typy rejekce. **Rejekci akutní**, která se v současnosti díky vysoce účinné IS vyskytuje bezprostředně po transplantaci méně často,

nicméně s nějakou její formou se pravděpodobně v prvním roce setká každý nemocný.

Rejekce chronická, která je v pozdějším období nejčastější příčinou ztráty štěpu.

1.8.2.1 Akutní rejekce

Alloimunitní reakce mezi štěpem a příjemcem začíná prakticky ihned po reperfuzi orgánu. Klíčovou roli v ní hrají antigenprezentující buňky (APC- antigen presenting cells) z krvinek bílé řady. Tyto buňky rychle migrují z transplantovaného orgánu do lymfoidních orgánů příjemce (lymfatických uzlin a sleziny) kde se dostávají do kontaktu s příjemcovskými T lymfocyty. V průběhu tohoto procesu příjemcovské T lymfocyty svými receptory přímo rozeznávají alogenní MHC peptidový komplex na dárcovských APC, což má za následek jejich aktivaci. Tato **přímá cesta aktivace** je v kontrastu s **konvenční nepřímou cestou**, při které příjemcovské APC přijímají cizí antigeny (Ag- antigen) a zpracovávají je v peptidy, které jsou prezentovány příjemcovským T buňkám cestou MHC molekul na jejich povrchu. Odhaduje se, že až 7% T buněk je schopno takto přímo rozeznávat alloantigeny(24). To může způsobit velmi rychlou a silnou alloantigenní reakci zejména ve střevě, které obsahuje vysoké množství APC dárcovských buněk v lymfatické tkáni. Tento způsob přímé imunitní reakce převažuje u akutní rejekce v bezprostředním postransplantačním období, zatímco role nepřímé cesty antigenní prezentace se spíše uplatňuje v pozdějších fázích chronické rejekce (25). Situace je pochopitelně mnohem imunologicky složitější a kompletní aktivaci T buněk vyžaduje další signály, které rezultují z interakce mezi kostimulačními molekulami na jejich povrchu a jejich ligandy prezentovanými profesionálními APC buňkami.

Diagnostika akutní rejekce je nesmírně složitá a prakticky neexistuje žádný spolehlivý diagnostický marker. Klinické příznaky jako teplota, průjem, bolest břicha jsou nespecifické a objevují se většinou s latencí od vzniku rejekce. Navíc jsou diagnostiky špatně odlišitelné od jiných komplikací, jako je infekce štěpu. Jediným spolehlivým ukazatelem zůstává včasná biopsie štěpu. Ta je však limitována jednak přístupem, jednak nerovnoměrným rozložením

lymfatické tkáně s jejím maximálním výskytem v místě Payerských plátů a v neposlední řadě i riziky tohoto invazivního postupu.

Ačkoli akutních rejekcí díky vysoce účinné IS v bezprostředním období po transplantaci ubylo, v dlouhodobé perspektivě stále zůstává příčinou ztráty 56,3 % štěpů a úmrtí až 11,2 % nemocných po transplantaci (22).

1.8.2.2 Chronická rejekce

Chronická rejekce se může vyskytnout prakticky kdykoli po transplantaci. Klinické příznaky opět zahrnují širokou a nespecifickou škálu od neprospívání, zvýšení počtu průjemovitých stolic až po obraz akutního břicha s rychle nastupující translokací bakterií a rozvojem septického stavu. Situace je často komplikována tím, že nemocný má již zanořenou stomii, která by umožnila histologickou diagnostiku a k dispozici není žádný laboratorní ukazatel, který by včas upozornil na problém. Jako slibný se zdál citrulin, nicméně jeho diagnostická výpověď je omezená až pokročilejšími změnami a těžko odlišitelná od infekce štěpu (26).

1.8.3 Infekce po transplantaci

Infekce představuje po rejekci druhý největší problém po SBTx. Navíc jsou oba stavy úzce spojené. Rejekce totiž ve své finální části představuje ztrátu bariérové schopnosti střeva s následnou translokací a vznikem infekce. Na druhou stranu agresivní infekční agens vlivem imunitní reakce může nastartovat rejekční mechanismy. Situaci komplikuje velké množství imunitní tkáně ve štěpu, neustálý kontakt velké plochy transplantovaného orgánu s infekčními a toxickými agens přijímanými potravou, nutnost vysokých dávek účinné imunosuprese, která tlumí přirozenou obranyschopnost. Podle údajů z mezinárodního registru se infekce podílí téměř z padesáti procent na úmrtí nemocných. V popředí stojí zejména oportunní infekce cytomegalovirem (CMV), virem Ebstein- Barové (EBV), mykotické infekce způsobené převážně kandidami. Dále se uplatňují i méně obvyklá infekční agens jako adenoviry, aspergillus apod.

Nutnost podávání selektivní dekontaminace a širokospektrých antibiotik u nemocných s agresivní imunosupresí vytváří podmínky pro tyto situace. Tato léčba, stejně jako profylaktické podávání antivirotik nemůže být celoživotní, a proto jsou nemocní ohroženi v různých obdobích různě.

1.8.4 Nádorová onemocnění a postransplantační lymfoproliferativní onemocnění

Populace transplantovaných nemocných je obecně v dlouhodobé perspektivě ohrožena vyšším výskytem zhoubných nádorů v porovnání s ostatní populací (27, 28). Podíl různých typů malignit je odlišný v závislosti na věku nemocných. U dospělých je na prvním místě rakovina kůže, zatímco u dětí převažuje postransplantační lymfoproliferativní onemocnění (PTLD- post transplant lymphoproliferative disease) (29). Vznik tohoto onemocnění je úzce spjat s infekcí EBV. Vzhledem k vysoké promořenosti populace není diagnostika onemocnění jednoduchá a navíc ne každá infekce EBV představuje PTL. Základem diagnostiky je detekce EBV DNA pomocí PCR (polymerase chain reaction), nicméně test je obtížně interpretovatelný zejména u imunosuprimovaných nemocných. Spolehlivější je identifikace EBV v nádorové mase pomocí in-situ hybridizace EBV RNA. Méně spolehlivé je imunohistochemické barvení na EBV protein až s 25% falešnou negativitou. EBV infekce resp. reaktivace se může projevovat v latentní formě až po generalizované onemocnění podobné mononukleóze. Nejtypičtější projevem PTL je zvětšení masy imunitní tkáně ve štěpu. Základem léčby je snížení až přechodné vysazení IS a podání rituximabu (30).

Vzhledem k výše uvedenému je u všech nemocných po SBTx nutný trvalý a intenzivní follow-up se zaměřením na aktivní vyhledávání potenciálních malignit a jejich případnou léčbu. Nicméně i tak představuje úmrtí na zhoubná onemocnění a PTL závažnou komplikaci u nemocných po SBTx.

2 Cíle dizertační práce

Cílem dizertační práce bylo provedení experimentální transplantace tenkého střeva na prasety před zahájením klinického programu SBTx v České republice. Tento experiment nebyl dosud v Čechách realizován.

Jednotlivé úkoly řešené v průběhu experimentu:

1/ zvládnutí a standardizace **chirurgické techniky SBTx** na prasety (technika cévní rekonstrukce, konstrukce anastomóz zažívacího traktu včetně stomie)

2/ stanovení nejvhodnějšího **imunosupresivního režimu** po transplantaci (tacrolimus v monoterapii nebo kombinace tacrolimus a sirolimus)- posledně jmenovaný režim nebyl v době zahájení experimentu publikován.

3/ nalezení vhodného **humorálního markeru akutní celulární rejekce**.

- **Stanovení hladiny citrulinu**
- **Vyšetření ukazatelů humorální imunity ve vztahu k ACR.**

Naší hypotézou bylo:

1/ Kombinace tacrolimus a sirolimus je vhodnější pro ovlivnění vzniku ACR po SBT než tacrolimus v monoterapii.

2/ Sérová hladina citrulinu je vhodným nespecifickým ukazatelem poškození střevní sliznice.

3/ ACR vyvolává změny, které lze detekovat vyšetřením humorální imunity.

3 Experimentální část

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Experimentální zvířata

K experimentu byla použita nepříbuzenská prasata domácí *Sus crofa domestica* váhy 30–35 kg. Prasata jsou standardním modelem velkého zvířete pro transplantaci. Jsou relativně rezistentní k imunologickým inzultům Gastrointestinální trakt prasete má nevelké anatomické odlišnosti a analogické fyziologické funkce.

Práce s laboratorními zvířaty probíhala na základě schváleného projektu pokusu s povolením Ministerstva zdravotnictví České republiky číslo 1/ 2006 podle § 23 odst. 1 písm. a) zákona č. 246/1992 Sb. ve znění vyhlášky č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat. Zvířata byla před zahájením pokusu ustájena ve zvířetníku IKEM po dobu týdenní karantény.

Celkově jsme odoperovali 43 zvířat. Pro hodnocení technické části experimentu zabývající se chirurgickou technikou jsme hodnotili všechna operovaná zvířata. U první **skupiny n1=18** zvířat byla transplantace prováděna tak, že jedno zvíře bylo současně dárce a zároveň příjemcem štěpu od druhého zvířete. Cévní rekonstrukce byla provedena na vlastní portomezenterické řečiště. Ve druhé **skupině n2=25** se jedno prase stalo dárce štěpu a druhé příjemcem s tím, že cévní rekonstrukce byla provedena na centrální řečiště - aortu a dolní dutou žílu

Pro hodnocení zbylé části experimentu zaměřené na hodnocení imunosuprese a diagnostiku ACR jsme z hodnocení vyřadili zvířata, která zemřela v důsledku technické chyby. K celkovému hodnocení bylo zařazeno celkem 24 prasat. Zvířata byla rozdělena do čtyř skupin. První **skupina A** (celkem 3 zvířata) představovala kontrolní skupinu s autotransplantací, u **skupiny B** (7 zvířat) byla provedena allotransplantace s imunosupresí

v monoterapii tacrolimem, ve **skupině C** (8 zvířat) allotransplantace s kombinovanou imunosupresí tacrolimem a sirolimem. U poslední kontrolní **skupiny D** (6 zvířat) jsme provedli allotransplantaci bez imunosuprese.

3.1.2 Anestésie, analgezie, pooperační péče a euthanasie pokusných zvířat

3.1.2.1 Anestézie pokusných zvířat

Patnáct minut před uvedením do anestésie byla zvířata premedikována intramuskulárně podaným azaperonem (STRESNIL[®], Janssen Pharmaceutical, Irsko) 4mg/kg hmotnosti, ketaminem 10% (NARKETAN[®], Vétoquinol, Francie) v dávce 10mg/kg hmotnosti a atropinem (ATROPIN BIOTIKA[®], Hoechst – Biotika, Česká republika) 0,01mg/kg hmotnosti. Následně provedena kanylace periferní žíly na uchu.

Úvod do celkové anestézie byl zajištěn intravenózním podáním fentanylu (FENTANYL TORREX[®], Torrex Chiesi Pharma GmbH, Rakousko) 1ml/10kg hmotnosti + midazolamu (DORMICUM[®], Roche s.r.o, Česká republika) 1mg/10kg hmotnosti +1% propofolu (PROPOFOL, FRESENIUS[®], Fresenius Kabi, Rakousko) do účinku (cca 3mg/kg hmotnosti). Orotracheální intubace v topické anestézii xylocainem (XYLOCAINE 10% SPRAY[®], Astrazeneca, Švýcarsko), ve sternální poloze s použitím modifikované Miller laryngoskopické lžice. Endotracheální kanyla modifikovaná (prodloužená) č. 7,0 – 8,5 s těsnící manžetou. Vedení celkové anestézie zajištěno inhalační směsí AIR+O₂+Isofluran 1 – 2% (ISOFLURAN NICHOLAS PIRAMAL[®], Torrex Chiesi Pharma GmbH, Rakousko), potencovaná kontinuálně i. v. podávaným fentanylem (FENTANYL TORREX[®], Torrex Chiesi Pharma GmbH, Rakousko) v dávce 2ml/10kg/hodinu, bez nutnosti použití kurarimimetik. K umělé plicní ventilaci použit přístroj Chirana Venar Media (Chirana, Praha, Česká republika) UPV – (CMV) Vt 10ml/kg, df : 15 – 20/min, I:E 1:2. V průběhu anestézie jsme monitorovali základní životní funkce pomocí pětisvodového EKG v modifikaci Kaplan; kyslíková saturační analýza byla prováděna perkutánním čidlem na nose. Tělesná teplota měřena jícnovou sondou. Pro potřeby měření

arteriálního tlaku byla na končetině kanylována arteria brachialis, v případě nedostupnosti arteria karotis na krku (ARROW 20Ga, 12cm). Centrální žilní tlak měřen tunelizovanou kanylou do v.jugularis (ARROW 7Fr, 20cm, 1lumen). Kanyla tunelizována za ucho zvířete, kde vyšita a využívána k zajišťování protokolárních odběrů. Infuzní terapie upravována dle měřeného centrálního žilního tlaku s cílem udržení hodnot před naložením cévních svorek na 10 – 13cm H₂O. Použit roztok plazmaexpanderů Voluven 6% (Voluven[®] inf., Fresenius Kabi, Německo) a elektrolytů Plasma-Lyte (PlasmaLyte[®], Baxter, Česká republika) kontinuálně 2ml/kg/hodinu. Chráněné koagulum bylo zajištěno podáním amoksiklavu (Synulox Veterinary[®], Pfizer, Velká Británie) 30mg/kg hmotnosti před incizí. Před naložením cévní svorky byl celkově podán heparin (HEPARIN[®], Zentiva, Česká republika) v dávce 2.000 mj.

Před reperfuzí štěpu podán bisulepin (DITHIADEN INJ.[®], Zentiva, Česká republika) 0,5mg, hydrocortizon (HYDROCORTISON VALEANT[®], Valeant Česká republika s.r.o, Česká republika) 100mg a kalcium gluconikum (CALCIUM GLUCONICUM 10%, B. Braun Melsungen AG, Německo) 10ml. Noradrenalin (NORADRENALIN LÉČIVA INJ[®], Zenativa, Česká republika) 5mg v případě potřeby jako bolusová podpora oběhu, event. Noradrenalin 5mg/50ml FR, rychlost 2 – 10ml/hodinu – přechodně jako kontinuální podpora oběhu po reperfuzi štěpu.

3.1.2.2 *Pooperační analgezie a léčba*

Pooperační tlumení bolesti u experimentálních zvířat bylo zajištěno první tři dny podáváním analgetika butorphanol hydrogenotartras (TORBUGESIC[®], Fort Dodge Animal Health, USA) 0,05 mg/kg i. m. v kombinaci s nesteroidním analgetikem carprofenu (RIMADYL[®], Vericore Ltd, Velká Británie) 2- 5mg/kg i. m. po 12 hodinách. Rimadyl byl dále podáván v dávce 2mg/kg i. m. každých 24 hodin po dobu dvou až tří dnů event. déle, při klinických známkách bolesti.

První až třetí pooperační den po transplantaci podávány antibiotika. Veterinární amoksiklav (SYNULOX VETERINARY[®], Pfizer, Velká Británie) ve standardním dávkování 30mg/kg/den.

3.1.2.3 *Pooperační výživa*

První pooperační den energetické potřeby kryty infuzí glukózy a aminokyselin. Od druhého dne podáván do žaludeční sondy roztok glukózy spolu s infuzemi dle diurézy a celkového stavu. Od třetího pooperačního dne podávána tekutá strava. Při normálním pooperačním průběhu od čtvrtého dne prasata převáděna na standardní stravu laboratorních zvířat.

3.1.2.4 *Euthanasie laboratorních zvířat*

Zvířata, která se dožila ukončení experimentu (30. pooperační den) byla utracena uvedením do hluboké anestezie thiopentalem (THIOPENTHAL VALEANT[®], VUAB Pharma a.s., Česká republika) a navozením srdeční zástavy podáním 10% kalium chloridu.

3.1.3 Pooperační sledování

Celková doba pokusu byla stanovena na 30 dnů od transplantace. Zvířata byla pravidelně při protokolárních odběrech vážena a byla jim měřena teplota. Klinický stav ve smyslu kontroly celkového stavu, vizuálního vzhledu stomie, množství a charakteru odpadu ze stomie, měření teploty, zapisování příjmu potravy byl prováděn denně. U všech zvířat pooperačně odebrána základní laboratoř: krevní obraz, hladina kreatininu, iontů a dle potřeby i acidobazická rovnováha. V případě výskytu klinických projevů respirační infekce odebrán sekret z nozder na kultivaci a citlivost.

3.1.4 Odběr vzorků pro hodnocení

Ve dnech 0., 3., 5., 7., 10., 14., 20., 28. a 30. jsme u všech zvířat odebírali biopsie z ileostomie a krev, která byla následně centrifugována a plasma odebrána k laboratornímu hodnocení.

3.1.5 Histologická vyšetření

Materiál k histologickému zpracování byl odebrán ve formě resekce části štěpu 30 minut po reperfusi nebo resekce části štěpu při protokolární pitvě po euthanasii. Dále byly zpracovány biopsie 3., 5., 7., 10., 14., 20., 28. a 30. den pokusu získané klíčkovým odběrem z komínové jejunostomie pomocí bioptických kleští (Radial jaw Jumbo biopsy forceps, Boston Scientific, USA). Všechny vzorky byly fixované v 10% formolu a zpracované parafinovou technikou podle standardního protokolu. 3-4 μ m silné řezy byly barvené hematoxylinem a eosinem (HE) a PASem. Rejekční změny byly hodnoceny podle kritérií používaných v experimentu pro velká zvířata v modifikaci využívající zkušenosti z humánní patologie (19, 31, 32)

Morfologické znaky akutní celulární rejekce (ACR) zahrnovaly přítomnost zánětlivé celulizace v proprii v kombinaci s různým stupněm poškození krypt. Poškození krypt představuje snížení množství hlenu, zvýšenou basofilii epitelových buněk, s tzv. alterovanými jádry s hyperchromasií. Diagnostickým znakem těžšího poškození jsou apoptotická tělíčka, která jsou korelátem zániku individuálních epitelových buněk. Těžké poškození je charakterizované splývající destrukcí krypt a může být doprovázeno krvácením do střešní stěny charakteru hemorhagické nekrózy. Rozsah rejekčních změn byl kvantifikován ve stupnici: **0** (bez morfologických znaků akutní rejekce), **1** (mírná ACR), **2** (střední stupeň ACR), **3** (těžká ACR) (tab.4).

ACR 0	Žádná ACR	Normální střešní sliznice
ACR 1	Mírná ACR	Edém, dilatované lymfatické cévy, otupělé klky, minimální infiltrace lamina propria aktivovanými lymfocyty
ACR 2	Střední ACR	Stejně jako předchozí, ale pokročilejší změny s výraznější generalizovanou leukocytární infiltrací a s epiteliálními nekrotizacemi a obnažováním
ACR 3	Těžká ACR	Stejně jako předchozí, ale mnohem závažnější poškození zahrnující transmurní leukocytární infiltraci, splývající destrukce krypt a rozšířené hemorhagické nekrózy sliznice.

Tab. 4. Protokol histologického hodnocení akutní celulární rejekce štěpu.

3.1.6 Statistika

K popisu veličin byl použit průměr a střední chyba průměru. K testování veličin byla použita ANOVA a metoda kontrastu, pro ACR skóre byl použit Kruskal-Wallisuv test. Všechny použité testy byly dvoustranné a jako významné považujeme $p < 0,05$. K výpočtům byl použit statistický software SYSTAT.

3.2 Cíl 1. Zvládnutí a standardizace chirurgické techniky transplantace tenkého střeva na praseti

3.2.1 Úvod

Odběr štěpu tenkého střeva, jeho konzervace a následná transplantace je složitý výkon, který má za následek rozvoj mnoha komplexních dějů, které spolu vzájemně souvisí a ovlivňují se.

V první řadě jde o náročný chirurgický zákrok spojený s celkovou odpovědí organismu, která je vyjádřením na stres a poškození tkání. Navíc zde přistupují významné vlivy imunologické, spojené s přenosem masivního množství lymfatické tkáně (GALT) obsažené jednak v Peyerských plátech a také v lymfatických uzlinách radixu mesenteria. Od prvního dne se začíná rozvíjet reakce mezi imunitním systémem příjemce a přenesenou tkání dárce. Ta může vést ve svém důsledku k fatálnímu destruktivnímu vlivu příjemcovského imunitního systému s poškozením a ztrátou štěpu. Ale i opačně může dojít k poškození příjemce imunitním systémem dárce ve smyslu GVHD – graft versus host disease.

Pro zdárný průběh transplantace je nutno splnit mnoho faktorů. V první řadě dokonalé zvládnutí chirurgické techniky odběru a konzervace štěpu. Následně bezchybné technické provedení vlastní transplantace zejména vytvoření cévních anastomóz štěpu a rekonstrukce zažívacího traktu s vytvořením diagnostické stomie. Další průběh ovlivňuje dokonalá pooperační péče zahrnující maximální možnou prevenci infekčních komplikací spojených s cévními vstupy a operační ranou.

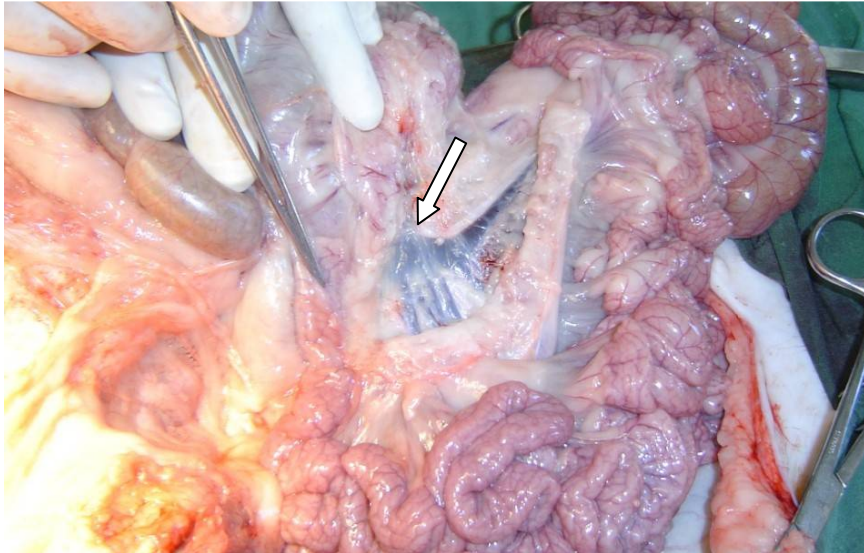
3.2.2 Metodika

Zpočátku jsme prováděli transplantaci tak, že jedno zvíře bylo zároveň dárce i příjemcem štěpu získaného od druhého zvířete. Smyslem tohoto postupu bylo minimalizovat náklady a omezit absolutní počet použitých experimentálních zvířat.

Díky vysokému procentu cévních komplikací, způsobených zalamováním tenké anastomózy, s následnou ztrátou štěpu jsme postup změnili tak, že jedno zvíře se stává dárce a druhé příjemcem štěpu. Štěp z dárcovského zvířete byl odebrán s terčem aorty, který byl našit na aortu příjemce. Podobně výtoková část byla řešena našitím na dolní dutou žílu příjemce. Velikost transplantovaného štěpu se neměnila.

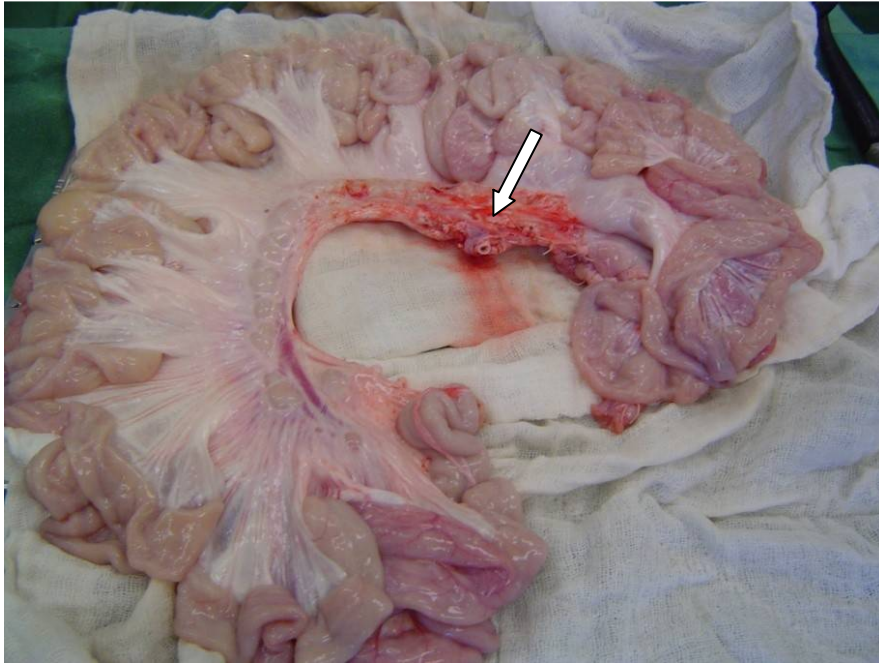
3.2.2.1 Odběr a transplantace – první skupina zvířat (n1= 18 prasat)

Dutina břišní byla otevřena prodlouženou střední laparotomií. Celý štěp byl zabalen do teplé roušky a okruží tenkého střeva bylo otevřeno v bezkrevné části podél ileokolických cév po jejich odstup z pravých kolických cév. Pečlivě jsme podvazovali všechny lymfatické cévy jdoucí k paketům uzlin z důvodů omezení následných lymfatických ztrát. V orální části jsme přerušili radix asi 20 cm od začátku první jejunální kličky. Tímto postupem jsme vypreparovali kmen horních mezenterických cév. Následně jsme přerušili oba konce tenkého střeva. Orální část jsme pro budoucí lepší orientaci označili stehem. Po podání heparinu jsme naložili cévní svorky na tepnu a poté na horní mezenterickou žílu a štěp explantovali. Mezenterická žíla byla přerušena až za odstupem pravé kolické žíly, tak abychom neporušili zásobení tlustého střeva (obr. 2).



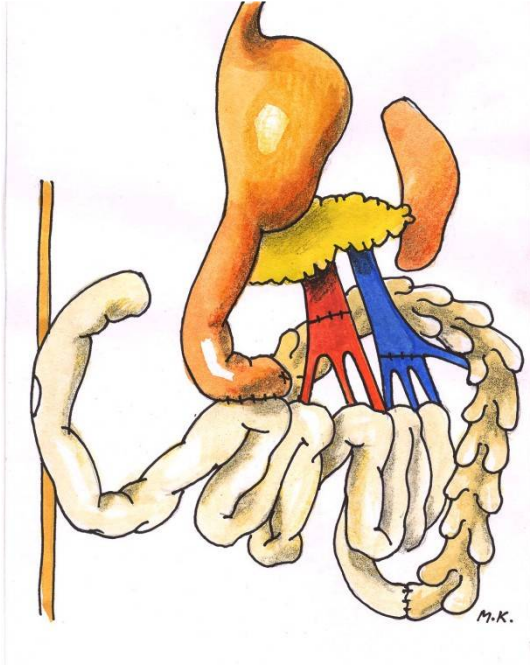
Obr. 2. Vypreparované větvení horní mezenterické žíly- šipka znázorňuje místo přerušení za odstupem pravé colické žíly.

Následně jsme přenesli štěp do umyvadla s fyziologickým roztokem a ledovou tříští, kde jsme po kanylaci pahýlu horní mezenterické tepny zahájili jeho konzervaci ledovým roztokem histidine-tryptophan-ketoglutarátu HTK (CUSTODIOL[®], Methapharm, Canada). Množství použitého roztoku bylo zvoleno podle zbarvení štěpu a vytékající tekutiny z mezenterické žíly s cílem dosažení optimální konzervace. Poté byl štěp uložen do zbylého roztoku a ve sterilních obalech uložen na dvě hodiny do ledové tříště (obr. 3).



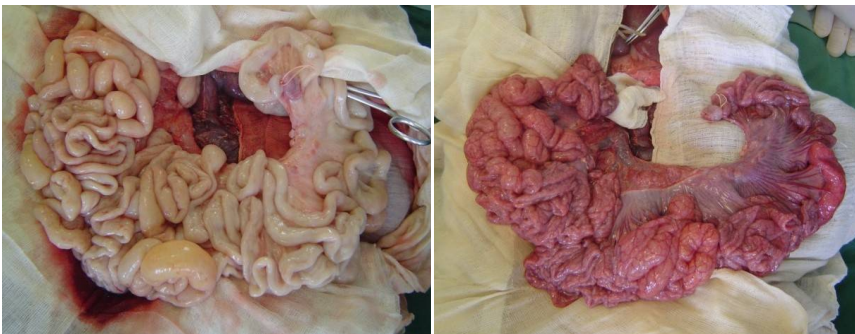
Obr. 3. Konzervovaný štěp s odstupy mezenterických cév (šipka).

Po uplynutí předepsané doby studené ischemie byl štěp zabalen do ledové roušky a vložen do příjemce. Nejprve byla konstruována anastomóza na tepně koncem ke konci jednotlivými stehy Prolenem 6/0 (Johnson and Johnson, USA). Následně byla stehem stejné síly pomocí pokračujícího stehu ušita anastomóza žilní. Schematické znázornění transplantace (obr. 4).



Obr. 4. Schematické zobrazení transplantace u první skupiny s anastomózami na mezenterické řečiště příjemce.

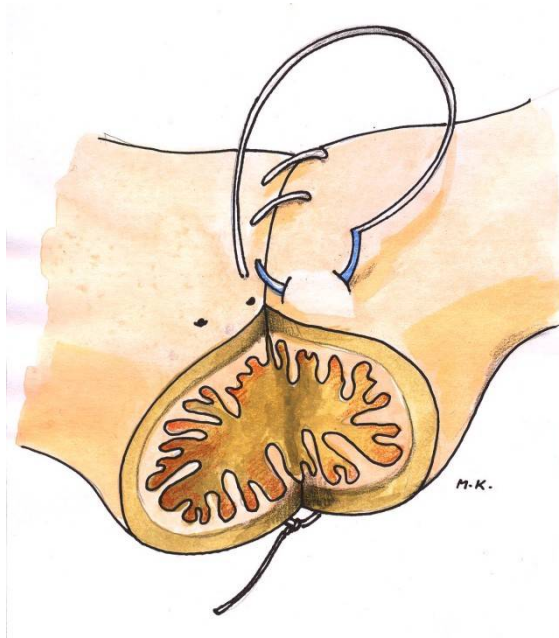
Po uvolnění svorek jsme provedli reperfuzi štěpu za současného ohřívání teplým fyziologickým roztokem (obr. 5. a, b). V případě špatného prokrvení okrajových částí štěpu jsme provedli jejich resekcii a odebrali krev a kultou biopsii.



Obr. 5 a, b. Štěp střeva před a po reperfuzi.

Rekonstrukce zažívacího traktu probíhala tak, že jsme zaslepenou orální část štěpu ponechali pro vytvoření nástěnné diagnostické jejunostomie. Zhruba dvacet centimetrů od jejího okraje jsme ušili anastomózu stranou ke straně mezi první jejunální kličkou příjemce a

štěpu. Aborální anastomóza mezi oběma konci ilea byla ušita koncem ke konci. Všechny střevní anastomózy byly ušity PDS 3/0 (polydioxanone, Johnson and Johnson, USA) technikou pokračujícího jednovrstevného seromuskulárního stehu (obr. 6).



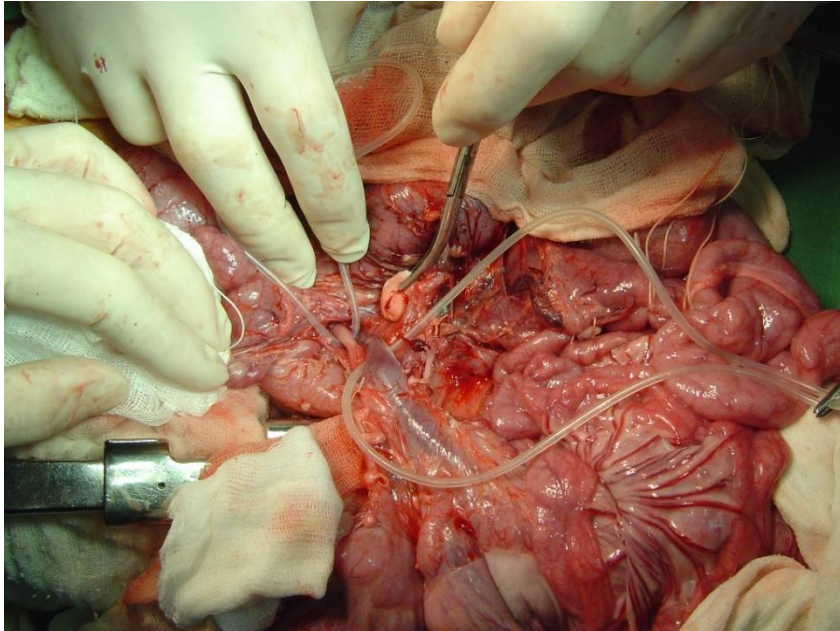
Obr. 6. Schematické znázornění střevní anastomózy.

Jednotlivými stehy jsme uzavřeli okraje radixu vlastního střeva a štěpu. Jako prevenci gastrektázie a z důvodů potřeby následného podávání definovaných dávek léků jsme standardní technikou vyšili na přední stěnu žaludku Witzelovu gastrostomii za pomoci močového katetru Nelaton 10CH, vyvedenou v levém podžebří. Poslední fází bylo vyšítí jejunostomie v pravém mesogastriu, která sloužila k vizuální kontrole štěpu a k odběrům protokolárních biopsií. Dutinu břišní jsme nikdy nedrénovali a uzavřeli ji pokračujícím stehem PDS loop 2/0 (polydioxanone, Johnson and Johnson, USA) s následnou suturou podkoží a kůže.

3.2.2.2 Odběr a transplantace – druhá skupina zvířat (n2= 25)

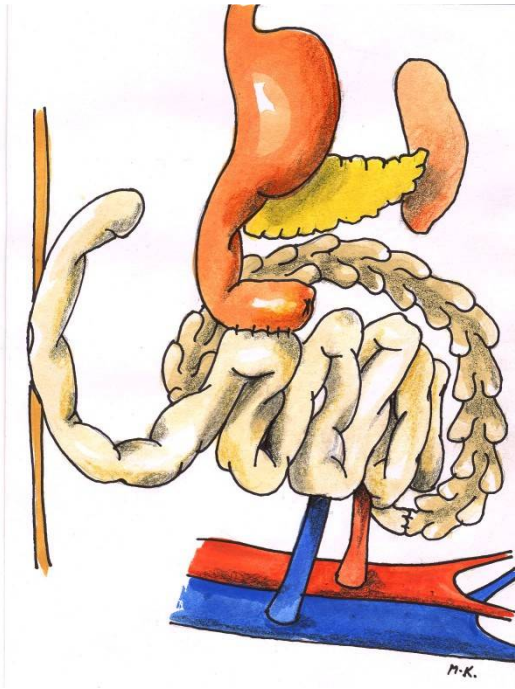
Po změně techniky transplantace sloužilo jedno zvíře jako dárce a druhé jako příjemce štěpu. V případě operace dárce jsme při odběru zachovali celou horní mezenterickou žílu

s částí mezenterikoportální. Tepnu jsme uvolnili za podvazů prvních jejunálních větvíček a větví a. pancreaticoduodenalis inferior až k aortě, kde byla odebrána s malým patchem (obr. 7).

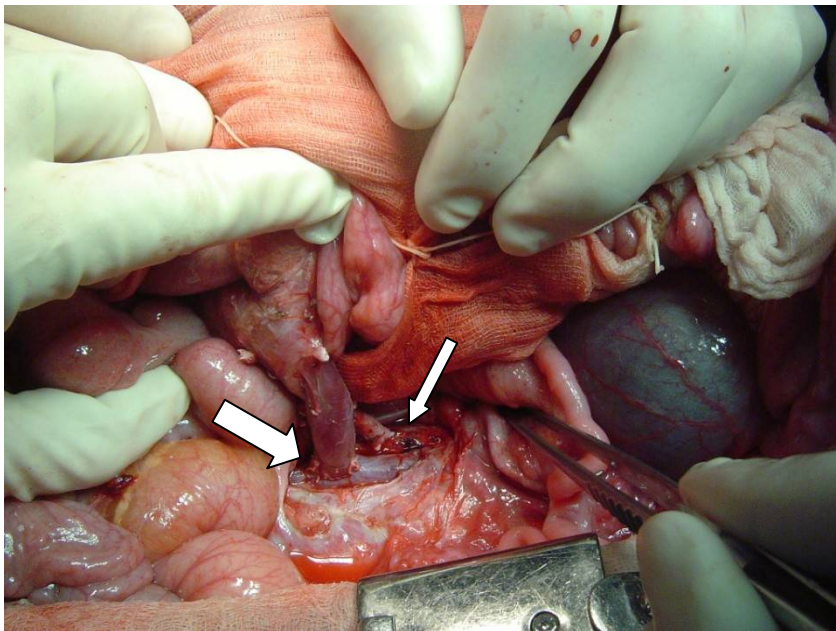


Obr. 7. Vypreparované cévní kmeny mezenterické tepny a žíly štěpu.

Technika konzervace štěpu byla taktéž simplifikována kanylací aorty a dolní duté žíly. Těsně před konzervací jsme podvázali dolní mezenterické cévy a obě renální cévy. Svorka byla naložena na aortu nad odstup vypreparovaného odstupu horní mezenterické tepny. Pod kanylou zavedenou k perfuzi štěpu jsme aortu uzavřeli svorkou. Po uplynutí studené ischémie následovala transplantace. U příjemce jsme nejprve odstranili vlastní tenké střevo s celým radixem a podvazem horních mezenterických cév. Poté jsme vypreparovali subrenální kmen dolní duté žíly a aorty. Po naložení Satinského svorky a arteriotomii jsme ušili pokračujícím stehem tepnou anastomózu mezi patchem aorty dárce a aortou příjemce. Podobně jsme koncem ke straně provedli anastomózu mezi horní mezenterickou žílou resp. portomezenterickou oblastí štěpu a dolní dutou žílou příjemce. Následná reperfuze štěpu, konstrukce střevních anastomóz, jejunostomie a gastrostomie probíhala obdobným způsobem (obr. 8, 9).



Obr. 8. Schematické znázornění anastomóz štěpu na centrální řečiště.



Obr. 9. Anastomóza mezenterické žíly na dolní dutou žílu (silná šipka) a tepenná anastomóza na aortu (tenká šipka).

3.2.3 Výsledky

V technické části experimentu převažovaly chyby spojené s konstrukcí cévní anastomózy. Zejména v první skupině skupině n1 (18 zvířat), kde jsme použili techniku, kdy jedno zvíře je dárce štěpu, a zároveň i příjemcem od zvířete druhého byly komplikace časté (12 z 18 tj 67%). Jedno prase zemřelo na sepsi v důsledku bronchopneumonie první pooperační den s vitálním štěpem a funkčními anastomózami. Pět zvířat z této skupiny přežilo (3 -32 dnů; se střední délkou přežívání 12.5 dne; medián 5.5 dne).

Po změně techniky, kdy jsme jedno zvíře použili jako dárce a druhé jako příjemce jsme nezaznamenali ani jednu okluzi anastomózy a k technickému selhání došlo jen u tří zvířat z důvodů krvácení (3 z 25 tj. 12%). Další tři prasata zemřela během prvních 48 hodin z důvodů perforace střeva při neporušených cévních anastomózách a zachovalé vitalitě zbylého střeva. Jedno zvíře této skupiny zemřelo v důsledku cirkulačního selhání krátce po transplantaci. Zbýlých 18 prasat dlouhodobě přežívalo (2 -30 dní; střední délka přežívání 16 dní; medián 11 dní) (tab. 5).

	Skupina n1 (18 zvířat)	Skupina n2 (25 zvířat)
Krvácení z anastomózy	1	3
Uzávěr anastomózy s ischemií štěpu	11	0
Nevaskulární komplikace	1	4
CELKEM	13	7

Tab. 5. příčiny úmrtí v průběhu prvních 48 hodin po transplantaci.

Ani u jednoho zvířete jsme nepozorovali selhání střevní anastomózy šité pokračujícím jednovrstevným seromuskulárním stehem.

3.2.4 Diskuze

Transplantace tenkého střeva počínaje odběrem, přes konzervaci až po vlastní našití štěpu s reperfuzí představuje vysoce komplikovaný zákrok zatížený množstvím technických

komplikací. Nejčastější příčinou jsou obtíže spojené s konstrukcí cévních anastomóz. Tyto komplikace zahrnují krvácení, stenózu nebo torzi anastomózy s následnou ischemií a ztrátou štěpu. Tyto technické obtíže jsou nejčastější na začátku experimentu v období tzv. „learnig curve“. V literatuře jsou tyto komplikace referovány v 10- 50% (33, 34). Imunologické příčiny ve smyslu akutní celulární rejekce většinou nemají zásadní význam v prvních 48 hodinách po transplantaci a ovlivňují přežívání štěpu až v následujícím období.

3.2.5 Závěr

V technické části experimentu jsme prokázali, že rekonstrukce štěpu na vlastní mezenterální řečiště je technicky možná, ale zatížena vysokým podílem komplikací spojených s cévní anastomózou, které vedou v konečné fázi k jeho ztrátě a úmrtí experimentálního zvířete. Z těchto důvodů se nám jeví druhý způsob, při kterém je jedno zvíře dárce a druhé příjemce a mezenterické cévy jsou napojeny na centrální řečiště (dolní dutou žílu a aortu) bezpečnější. Technika jednovrstevné anastomózy pokračujícím jednovrstevným seromuskulárním stehem se ukázala být bezpečná i v komplikovaných podmínkách hojení při podávané imunosupresivní terapii. Ani u jednoho laboratorního zvířete nedošlo k selhání střevní anastomózy, dokonce ani u zvířat s plně rozvinutou akutní celulární rejekcí.

3.3 Cíl 2. Stanovení nejvhodnějšího imunosupresivního režimu po transplantaci.

3.3.1 Metodika

3.3.1.1 *Imunosupresivní režimy.*

Indukční terapie ani kortikoidy podávány nebyly. Imunosuprese byla zahájena první dávkou intravenózního tacrolimu (PROGRAF[®], Astellas, Irsko) s reperfuzí štěpu v dávce 0,3mg/kg. Od prvního pooperačního dne jsme podávali dávku tacrolimu 0,6mg/kg/den rozdělenou do dvou dávek po 12 hodinách podaných do zavedené gastrické sondy. Ve skupině B jsme hladinu tacrolimu udržovali v rozmezí 15ng/ml +/-5 ng/ml dle měřené sérové hodnoty.

Ve skupině C jsme s reperfuzí štěpu podali stejnou dávku intravenózního tacrolimu (tj. 0,3mg/kg). Dále jsme od prvního pooperačního dne podávali do sondy tacrolimus v dávce 0,1mg/kg/den ve dvou dávkách s cílem udržení hladiny tacrolimu 7–10 ng/ml. Tato skupina měla navíc od prvního pooperačního dne podávánu jednu dávku sirolimu (RAPAMUNE[®], Weyeth Pharmaceutical, Velká Británie) 0,1mg/kg/den do sondy. Hladiny sirolimu jsme udržovali v rozmezí 5-10ng/ml.

3.3.1.2 *Stanovení hladiny imunopresiv*

Plasmatická hladina tacrolimu byla měřena od třetího dne s cílem dosažení požadované plasmatické koncentrace metodou Emit[®] 2000 Tacrolimus Assay. Souprava Emit[®] 2000 Tacrolimus Assay pracuje na principu homogenního enzymo-imunostanovení tacrolimu v plné krvi. Souprava obsahuje myší monoklonální protilátky s vysokou specificitou k tacrolimu.

Emit[®] 2000 Tacrolimus Assay – stanovení je založeno na kompetici o vazebná místa na protilátce proti tacrolimu. Tacrolimus ze vzorku kompetuje s tacrolimem značeným

rekombinantním enzymem glukoso-6-fosfát dehydrogenázou (G6PDH) obsaženým v enzymovém reagentu. Aktivní enzym konvertuje oxidovaný NAD v protilátkovém reagentu na NADH. Kinetická změna absorbance při této reakci je měřena spektrofotometricky. Enzymová aktivita klesá s vazbou na protilátku, což umožňuje měřit koncentraci tacrolimu ve vzorku prostřednictvím enzymové aktivity. Endogenní sérová G6PDH neinterferuje, protože koenzym NAD reaguje jen s bakteriálním (*Leuconostoc mesenteroides*) enzymem použitým v soupravě.

Ve stejném období jsme stanovovali hladinu sirolimu u skupiny C. Ke stanovení byla použita chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročásticích (CMIA – Chemiluminescent microparticle Immunoassay) ke kvantitativnímu stanovení sirolimu v lidské plné krvi na systému ARCHITECT i System.

3.3.1.3 *Experimentální skupiny zvířat.*

Z hlediska hodnocení vlivu imunosuprese na přežívání experimentálních zvířat a vznik akutní celulární rejekce jsme zvířata rozdělili do čtyř skupin. K hodnocení byla použita pouze zvířata, která nezemřela z důvodu technického selhání nebo interních příčin (n= 24). Zvířata byla rozdělena do čtyř skupin. **Skupina A** (n=3) – autotransplantace, bez imunosuprese; **skupina B** (n=7) - allotransplantace s imunosupresí v monoterapii s tacrolimem a **skupina C** (n=8) - allotransplantace s imunosupresí v kombinaci tacrolimus se sirolimem. Poslední kontrolní **skupina D** (n=6) měla provedenu allotransplantaci bez podání imunosuprese. Charakteristiku jednotlivých skupin a cílové hladiny imunosuprese zobrazuje tabulka 6.

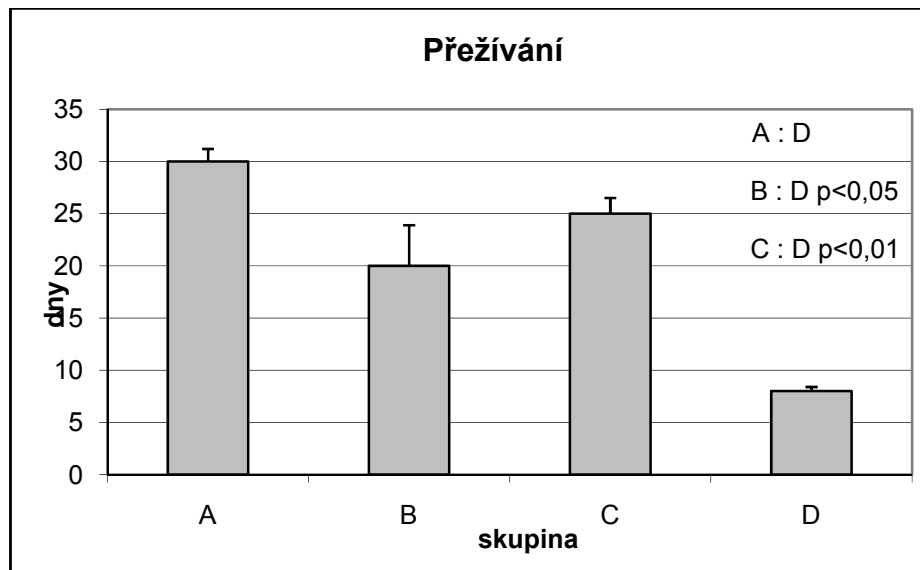
Skupina (n=počet zvířat)	Imunosuprese po transplantaci	Průměrná hladina tacrolimu (ng/ml)	Průměrná hladina sirolimu (ng/ml)	Průměrné přežití ve skupině
A (n= 3)	žádná			30
B (n= 7)	Tac	15 ±5		20
C (n= 8)	Tac+ sirol	7 až 10	5 až 10	25
D (n= 6)	žádná			7

Tab. 6. Celková charakteristika souboru a přežívání ve skupinách.

3.3.2 Výsledky

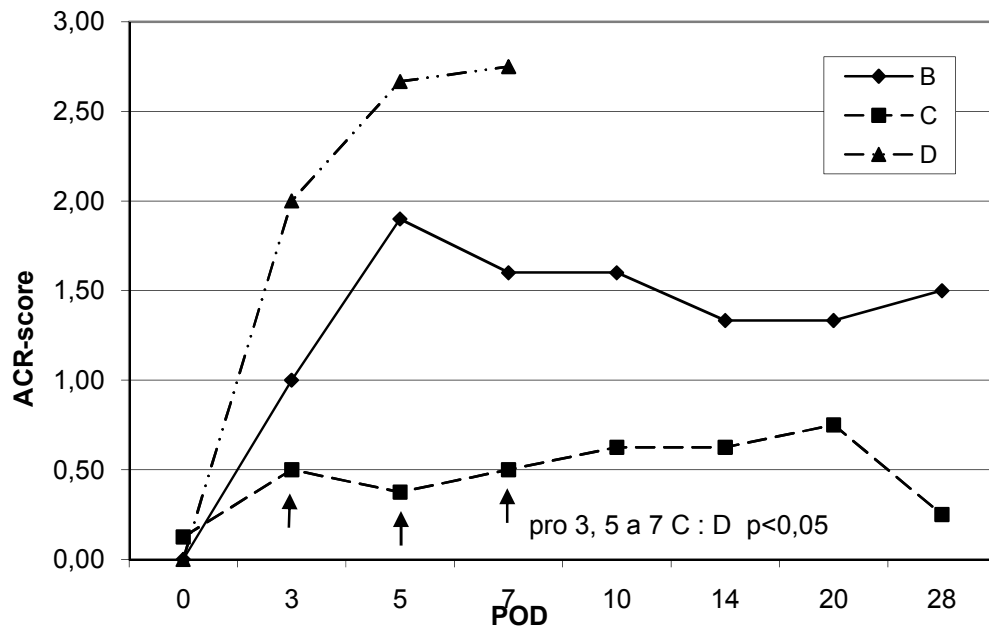
Nejdelší délka přežívání byla dle očekávání ve skupině autotransplantovaných zvířat a nejmenší ve skupině zvířat s allotransplantací bez imunosuprese.

Průměrná doba přežívání a střední chyba průměru v jednotlivých skupinách je zobrazena v grafu 3. Z hlediska celkového přežívání jsme prokázali statisticky významný rozdíl mezi přežíváním skupin A- C oproti skupině D, která neměla podávanou imunosupresi a proto u ní rychle dochází k rozvoji akutní celulární rejekce s následnou bakteriální translokací a vznikem sepse. Přežívání skupina A- C oproti skupině D se liší na hladině významnosti $p (A, B, C: D) < 0,01; 0,05; 0,01$.



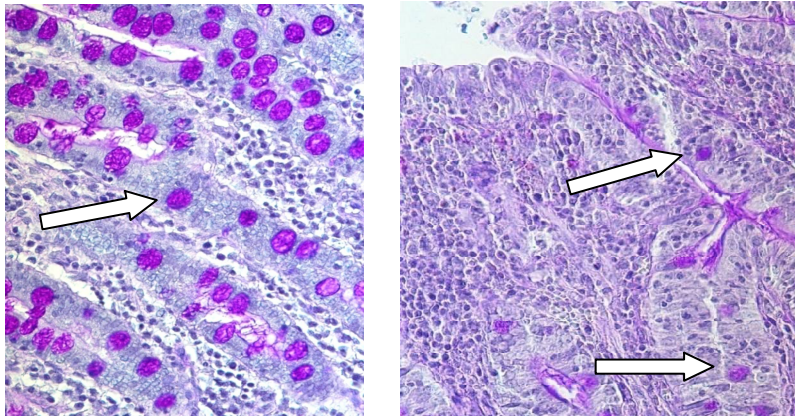
Graf 3. Průměrná doba přežívání experimentálních zvířat v jednotlivých skupinách.

Ve skupině A (autotransplantace) jsme změny ve smyslu ACR nezaznamenali. U zvířat skupiny D (alotransplantace bez imunosuprese) jsme od třetího dne pozorovaly první známky ACR, které u všech zvířat rychle progredovaly do těžkých forem s následnou sepsí způsobenou bakteriální translokací a uhynutím zvířat. Projevy akutní celulární rejeckce u imunosuprimovaných zvířat skupiny B a C byly mírnější. Ve skupině C (alotransplantace s kombinovanou IS) došlo ve dnech 3, 5 a 7 POD k statisticky významnému rozdílu ve výskytu a tíži ACR oproti skupině D bez imunosuprese $p < 0,05$. Při porovnání stupně ACR u obou imunosuprimovaných zvířat (B a C) jsme statisticky významný rozdíl nezaznamenali (graf 4).

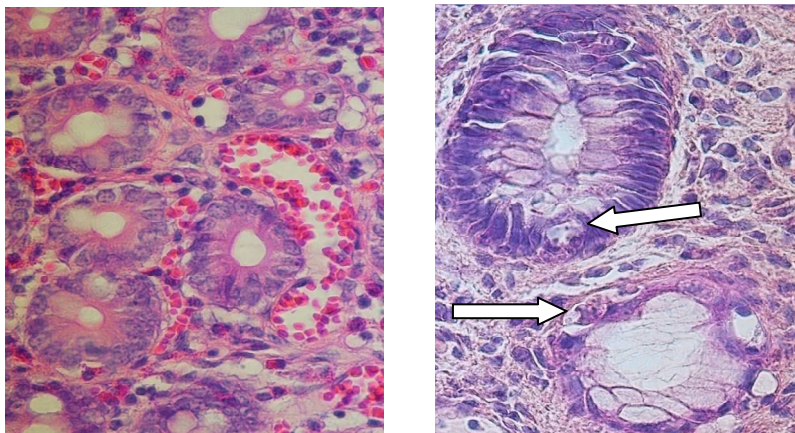


Graf 4. Stupeň akutní celulární rejekce u jednotlivých skupin experimentálních zvířat v průběhu času. (Skupina A nezobrazena pro nepřítomnost známek rejekce). (ACR-score – stupeň rejekce (0- 3); POD- pooperační dny).

Makroskopické změny a histologické nálezy se zobrazením typických změn pro různé stupně akutní celulární rejekce jsou patrné na obrázcích 10-13.

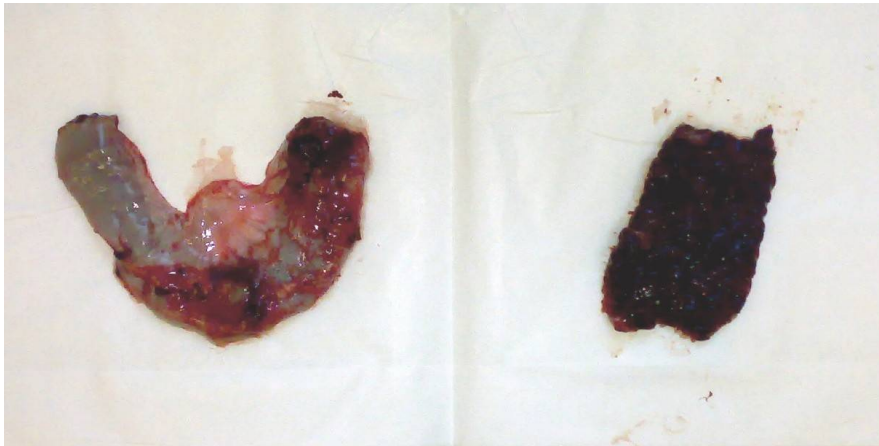


Obr 10. Vlevo normální architektura sliznice tenkého střeva s četnými hlenovými vakuolami v buňkách epitelu. Vakuoly jsou fialové v barvení PASem (šipka). Vpravo deplece hleny ve sliznici se středním stupněm rejekčních změn. Lamina propria sliznice i epitel jsou prostoupené zánětlivými elementy a v epitelu zůstávají pouze ojediněle hlenové vakuoly (šipky). Barvení PAS, zvětšení 20x.

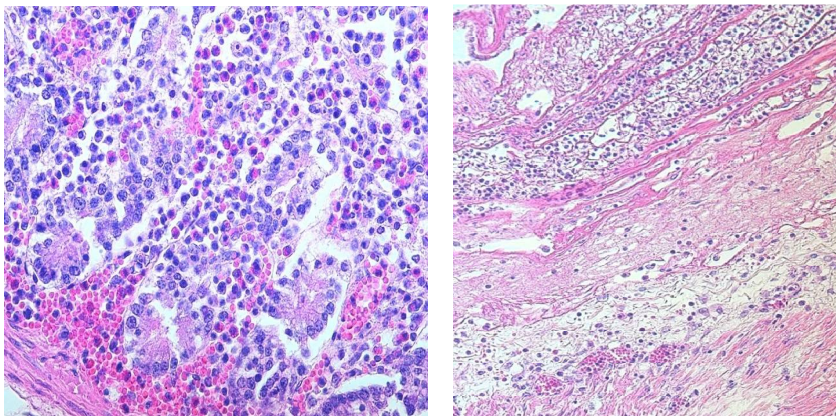


Obr. 11. Rejckce mírného stupně se smíšenou zánětlivou celulizací v proprii a tzv. apoptotickými tělísky v epitelu (šipky vlevo). Intenzita zánětlivé celulizace a počet apoptotických tělísek určují stupeň rejckce mírného nebo středního stupně. Barvení H&E, zvětšení 20x vlevo, 40x vpravo.

Třetí stupeň ACR představuje nejzávažnější poškození, které je makroskopicky dobře patrné na seróze i slizničním povrchu (obr. 12).



Obr. 12. Makroskopické změny na seróze střeva s překrváním vlevo a prokrvácená, nekrotická sliznice vpravo.



Obr. 13. Rejekční změny těžkého stupně s denzní zánětlivou celulizací v lamina propria sliznice, která destruuje epitelové struktury (vlevo). Vpravo je zastižena pokročilá destrukce sliznice, kde zůstává jenom zánětlivá celulizace a všechny epitelové struktury úplně vymizely. Barvení H&E, zvětšení vlevo 20x, vpravo objektiv 10x.

3.3.3 Diskuze

Bezprostředně po reperfuzi dochází ve štěpu ke změnám, které lze shrnout pod pojmem ischemicko-reperfusionního poškození (I/R – ischemia-reperfusion injury). Ischémie orgánu a následná reperfuze navozuje kaskádu procesů, v jejichž důsledku dochází v buňkách k různému stupni dysfunkce. Při rozsáhlejší poškození vlivem apoptózy až k významné orgánovému poškození nebo v krajním případě selhání (35). I/R tak může spolu s imunitními a pooperačními změnami být limitující pro časný rozvoj funkce štěpu (36). Poškození všech vrstev stěny tenkého střeva díky patofysiologickým procesům na úrovni mikrocirkulace po reperfuzi je přímo úměrné změnám vzniklým v průběhu studené ischémie (37). Rozsah a závažnosti těchto změn a následně rozvoj funkce štěpu a pacientovo přežívání je přímo úměrné době studené ischémie. S narůstající dobou studené ischémie dochází úměrně k zhoršení I/R změn. Posouzení viability štěpu před vlastní transplantací je zásadní pro úspěch celého výkonu, obzvláště v případě marginálních štěpů. Lehké formy I/R poškození mají tendenci k rychlé úpravě bez významnějšího vlivu na funkci. Tyto změny většinou od druhého pooperačního dne vymizely a v histologii nejsou patrné (38).

Zatímco chirurgická technika SBTx je z velké části dobře zvládnuta rozhodující pro další osud transplantovaného střeva je ale ovlivnění imunitní reakce mezi štěpem a příjemcem. Ta je zprostředkována složitým systémem imunitních reakcí jak humorálních, tak celulárních. V jejich důsledku může dojít k poškození štěpu s různou klinickou odezvou. Její projevy počínají zpožděním nástupu funkce až po těžké poškození s destrukcí orgánu. Každé poškození integrity má za následek ztrátu funkce, projevující se poruchou trávení a absorpce a zároveň ztrátou obranyschopnosti vůči vnějším vlivům. Dochází k rychlé translokaci mikrobů a toxických nox do oběhu s rychlým rozvojem sepse a následným úmrtím. Tento proces lze ovlivnit podáním imunosuprese. Jejím cílem je kontrolovat imunitní reakce a zabránit ztrátě štěpu. Negativním jevem je snížení obranyschopnosti organismu vůči infekčním vlivům a v dlouhodobém důsledku i vyšší výskyt nádorů u transplantovaných.

V rámci experimentu jsme vytvořili tři základní modelové situace. U autotransplantovaných zvířat, které představují kontrolní skupinu, nedochází k žádné reakce mezi štěpem a hostitelem. Ani u jednoho zvířete nedošlo k histologickým projevům celulární rejekce a mírné, ojediněle detekovatelné histologické změny odpovídají přechodnému ischemickoreperfuznímu poškození. Opačným pólem je skupina allotransplantovaných zvířat bez imunoprese, kde dochází k akcentaci těchto změn, projevujících se rozvojem akutní celulární rejekce, kterou jsme detekovali u některých zvířat již třetí pooperační den. Následná progresse akutní celulární rejekce štěpu s klinickými projevy sepse vedla postupně k úhynu nebo vynucené euthanasii všech zvířat skupiny D nejpozději devátý pooperační den.

Mezi těmito skupinami stojí experimentální zvířata, u kterých byla podávána imunoprese s cílem ovlivnění rejekce. Ve skupině B jsme podávali tacrolimus. Tacrolimus je vysoce potentní imunopresivum ze skupiny makrolidových antibiotik, získaných z houby *streptomyces tsukubaensis*. Hlavní mechanismus akce spočívá v blokádě proliferace lymfocytů v časně fázi, která je obvykle ukončené v prvních několika hodinách po silném mitogenickém stimulu (39, 40). Jak bylo prokázáno v předchozích studiích tacrolimus představuje účinné imunopresivum, které je schopno i v monoterapii v experimentu zabránit vzniku a rozvoji ACR (41-44).

Vysoké hladiny imunoprese mají za následek vyšší výskyt infekčních komplikací a většina experimentálních zvířat umírá v důsledku septických komplikací i při nepřítomnosti rejekce. Z tohoto důvodu jsou často používány kombinace imunopresivních léků. Nejčastěji používanou kombinací je potenciace účinku tacrolimu ve spojení s mycofenolátem.

V naší studii jsme ve skupině C kombinovali účinek tacrolimu spolu s sirolimem. Sirolimus neinhibuje calcineurin, ale váže se a zároveň inhibuje savčí receptor pro rapamycin, klíčovou proteinkinázu regulující signální transdukci. Touto inhibicí dochází k potlačení cytokiny řízené proliferaci T buněk (45, 46). Ačkoliv sirolimus a tacrolimus mají podobnou strukturu a kompetují o stejný intracelulární vazebný protein (FKBP12), je jejich vzájemný efekt

synergický. Komplex sirolimus-FKBP12 neinhibuje calcineurin a aktivaci T-buněk jako to dělá komplex tacrolimus-FKBP12, ale zvyšuje svůj imunosupresivní efekt výše zmíněnou inhibicí mTOR (esenciálního proteinu pro cytokiny řízenou proliferaci T-buněk. To bylo prokázáno v různých studiích transplantovaných orgánů (47, 48). Do doby zahájení experimentu nebyla publikována žádná experimentální práce u prasečího modelu kombinující imunosupresivní efekt tacrolimu a sirolimu.

3.3.4 Závěr

V naší studii se nám nepodařilo prokázat statisticky významný rozdíl ve výskytu akutní celulární rejekce mezi jednotlivými imunosupresivními kombinacemi (skupina B a C). Pouze ve skupině C (alotransplantace s kombinovanou IS) došlo ve dnech 3., 5. a 7. POD k statisticky významnému rozdílu ve výskytu a tíži ACR oproti skupině D bez imunosuprese na hladině významnosti $p < 0,05$.

3.4 Cíl 3. nalezení vhodného humorálního markeru akutní celulární rejekce

3.4.1 Citrulinová analýza

3.4.1.1 Úvod

K diagnostice a posouzení rozsahu poškození a poruch funkce tenkého střeva je k dispozici mnoho vyšetřovacích metod, ale žádná z nich sama o sobě není schopna při zachování jednoduchosti, neinvazivity a reproducibility, podat obraz o rozsahu poškození. Jednou z velmi slibných metod z tohoto pohledu vhodných k diagnostice se zdá být plasmatická hladina sérového citrulinu.

Citruline je aminokyselina, která není součástí proteinů, ale je prakticky exklusivně produkována enterocyty ve sliznici tenkého střeva (49). Tvorba citrulinu probíhá převážně v orálních částech tenkého střeva a ve střední a horní části střevních klků. Základním prekursorem pro tvorbu citrulinu je glutamin. V menší míře hrají roli i jiné aminokyseliny jako proline a ornitin. Játra nehrají v metabolismu citrulinu významnější roli. Významnou místo v metabolismu mají ledviny. Z celkového množství vytvořeného citrulinu je 80% konvertováno na arginin v proximálních konvolutech tubulů ledvin za exprese dvou enzymů (ASS- arginosukcinát syntetáza a ASL- arginosukcinát lyáza). Cirkulující citrulin tak prezentuje jakousi maskovanou formu argininu bránící játrům k tomu, aby jej použila v rámci tvorby močoviny, a tak se významně podílí na metabolismu této aminokyseliny. Významné je především to, že cirkulující plasmatický citrulin je exklusivně tvořen enterocyty a jeho hladina tak odráží vlastní množství funkční slizniční tkáně tenkého střeva. Na rozdíl od jiných aminokyselin, kdy jejich hladina málokdy reprezentuje celkový buněčný pool je citrulin u pacientů s normální funkcí ledviny závislý pouze na jeho tvorbě a degradaci. Z tohoto důvodu, s výjimkou některých vzácných autoimunitních onemocnění (rheumatoidní arthritida kdy se citrulin vyskytuje jako

endogenní protein (50) má snížená plasmatická koncentrace dva důvody: 1) nízká produkce vlivem chybění či poruchy enterocytů a za 2) zvýšená utilizace, která však dosud nebyla klinicky popsána. Na druhou stranu se zvýšenou koncentrací se můžeme setkat: 1) díky zvýšené produkci ve střevě v důsledku nízkoproteinové diety a za 2) při porušené clearance při selhání ledvin.

3.4.1.2 *Metodika stanovení hladiny citrulinu*

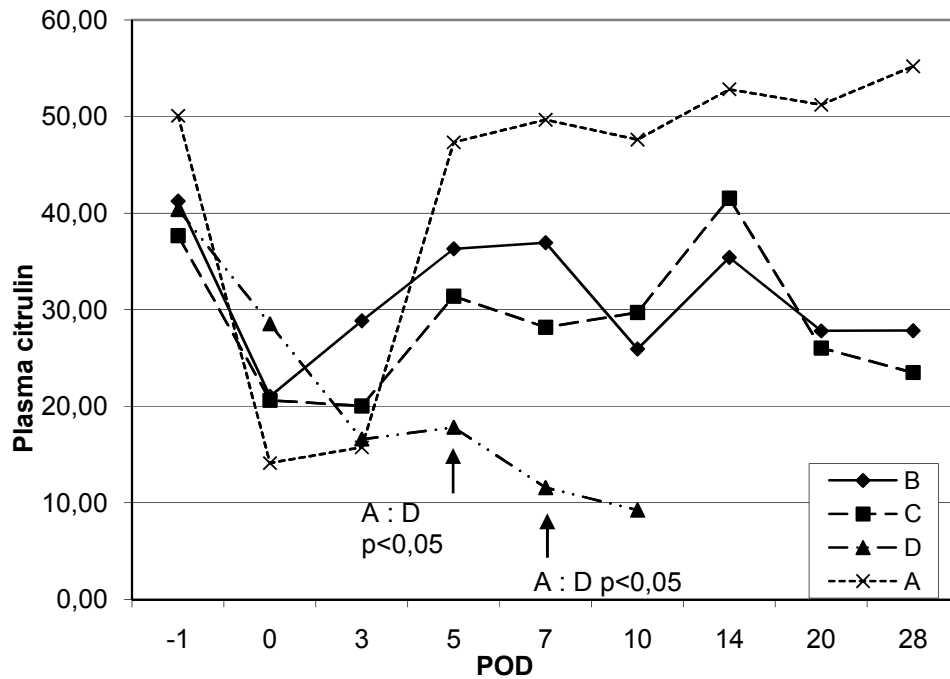
Krevní vzorky odebrané do citrátu sodného a následně centrifugovány při 4st.C a 800x (10min). Vzorek plasmy zmražen na minus 80st C. Plasma pro citrulinovou analýzu byla zpracována metodou ion-exchange chromatografie na přístroji firmy Beckman Amino Acid Analyzer 400, Beckman.Coulter, Fullerton, CA USA. Aminokyseliny vzorku deproteinovaného séra nebo plazmy se dělí na koloně katexu v systému kapalinové chromatografie, po výstupu z kolony reagují při 120 st. s ninhydrinem a barevné produkty jsou detekovány fotometricky při 570 nm, resp. 440 nm. Identifikace a kvantifikace se provádějí metodou vnějšího standardu.

Vyšetření bylo provedeno v laboratoři dědičných a metabolických chorob University Karlovy.

Na základě mnoha předchozích studií byla hladina cut off (norma) stanovena na 30 μ mol/l jako norma. Referenční hodnoty se pohybují v rozmezí 5- 50 μ mol/l. Mez detekce je 0,6 μ mol/l; mez kvantifikace 2,2 μ mol/l . U všech zvířat jsme měřili absolutní hodnoty.

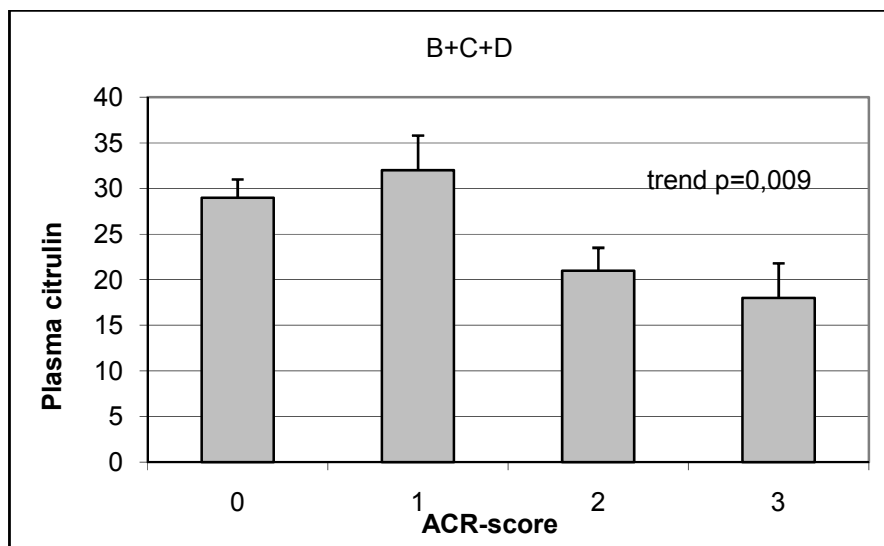
3.4.1.3 *Výsledky citrulinové analýzy*

Dynamiku hladiny plasmatického citrulinu (PCL plasma citrulline level) v průběhu pooperačních dnů zobrazuje graf 5. První hodnota (0. POD) byla odebrána třicet minut po reperfuzi.



Graf 5. Dynamika plasmatické hladiny citrulinu v závislosti na pooperačních dnech (POD).

Při hodnocení ACR skóre společně pro všechny vyšetřované skupiny s výjimkou kontrolní skupiny A (autotransplantace), která nerejkovala, nacházíme lineární trend poklesu průměrné hladiny citrulinu ve vztahu k progresi histologických rejekčních změn na hladině významnosti $p < 0,009$. S významnou progresí ACR úměrně klesá hodnota naměřené hladiny citrulinu pro všechny skupiny společně (graf 6).



Graf 6. Závislost plasmatické hladiny citrulinu na rozsahu rejekčních změn (ACR- skóre).

Průměrné plasmatické hodnoty citrulinu a střední chyba průměru na hladině významnosti $p < 0,009$.

3.4.1.4 Diskuze

K tvorbě citrulinu dochází hlavně v proximální části tenkého střeva a velmi pravděpodobně v enterocytech lokalizovaných ve středních a horních partiích střevních klků (49). Během rejekce je nejprve postižena dolní část sliznice, kde nejprve narůstá mononukleární zánětlivá celulizace a poškození enterocytů je fokální a mírné. Proto se zdá logické, že mírné fokální poškození enterocytů navíc v dolní části sliznice, kde je syntéza citrulinu malá, nebude mít významnou dramatickou odezvu v sérové hladině uvolňovaného citrulinu. Navíc v období časně po SBTx, kdy tento experiment probíhal, je v diferenciální diagnostice také IRI poškození, které naopak postihuje epitel v horních částech střevní sliznice, což se odráží v přechodném poklesu hladiny citrulinu v prvních dnech po SBTx. Prokázali jsme, že během prvního dne po SBTx pokles hladiny citrulinu u všech operovaných zvířat, jako součást reakce na IRI poškození. U skupiny autotransplantovaných zvířat, kde nedochází k rozvoji ACR, sledujeme po

odeznění IRI poškození sliznice její postupnou restaurací. To se dobře projevuje v hladině plasmatického citrulinu, která se vrací rychle k normálním hodnotám, na kterých se udržuje do konce experimentu. U zvířat po alotransplantaci s podávanou imunosupresí dochází od třetího dne k mírnému vzestupu hladiny citrulinu, která dosahuje kolem pátého až sedmého dne hladin blízkých normě. U skupiny D, allotransplantace bez imunosuprese, však vlivem rozvoje rejekčních změn pozorujeme plynulý pokles hladiny citrulinu, který souvisí s postupnou ztrátou enterocytů.

Přestože se zdá, že krátce po transplantaci bude interpretace mírného poklesu hladiny citrulinu v plasmě obtížně diagnosticky interpretovatelná, v pozdějším období by stanovení hladiny citrulinu mohlo představovat významný diagnostický přínos.

3.4.1.5 Závěr

Na základě našeho experimentu jsme prokázali vztah mezi hladinou citrulinu danou množstvím funkčních enterocytů a rozsahem ACR. Prokázali jsme lineární trend poklesu hladiny plasmatického citrulinu ve vztahu k zvyšujícímu se stupni akutní celulární rejekce (do 0 do 3 stupně) při $p=0,009$.

Ve dnech 5. a 7. se statisticky odlišuje skupina B od D $p<0,05$ a pro den 10. skupina C od D na hladině významnosti $p<0,05$. Největší rozdíl je patrný mezi skupinou autotransplantovaných zvířat (A) a skupinou alotransplantovaných zvířat (D) na hladině významnosti $p < 0,05$.

Časně po transplantaci je střevo dobře přístupné endoskopickým kontrolám z chirurgicky vytvořené stomie a provedení biopsie s následnou histologickou diagnózou nepředstavuje velkou zátěž pro pacienta. Jiná je situace v pozdějším období po SBTx, kdy stomie je zanořená a jakýkoli neinvasivní marker, který by přispěl k diferenciálně diagnostické rozvaze o příčinách dysfunkce, má velký

význam. Hladina plasmatického citrulinu se nám jeví jako vhodný ukazatel rozsahu poškození funkčního střevního epitelu.

3.4.2 Cytokinová analýza

3.4.2.1 Úvod- Vyšetření hladin humorální aktivity (cytokinová analýza)

Transplantace střeva představuje významný inzult projevující se obranou zánětlivou reakcí organismu spojenou s vyplavením vysoké hladiny prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů. Již samotná operace vyvolá rozsáhlé poškození tkání, na které reagují imunokompetentní buňky produkcí některých cytokinů – to je patrné např. zvýšením hladiny TNF i po autotransplantaci. Dále dochází k indukci iNOS (inducible nitric oxide synthase), disrupci aktinu, poruše těsnosti střeva a úniku střevních bakterií a jejich složek do cirkulace. Tyto procesy se pak výrazně akcentují s rozvojem celulární rejekce. Tyto mikrobiální motivy vedou k reaktivitě krevních leukocytů a indukci pro- a proti- zánětlivých cytokinů. Naším cílem bylo zjistit, zda existuje korelace mezi hladinami pro- a protizánětlivých cytokinů v souvislosti s akutní celulární rejeckí.

3.4.2.2 Metodika

Protokolárně ve dnech 0., 3., 5., 7., 10., 14., 28 a 30 vzorky krve odebrány do citrátu sodného a následně centrifugovány při 4st.C a 800x (10min). Vzorek plasmy zmražen na minus 80st C a následně definitivně zpracován. Použité ELISA Cytosety byly zakoupeny od fi. Biosource International, Inc. (Camarillo, USA)-pro IFN- γ (CSC4033), TNF- α (CSC1753), IL-4 (CSC1284) a IL-10 (CSC0103). IL-8 byl stanoven vlastními monoklonálními protilátkami a rekombinantním proteinem. Metodika zpracování byla popsána jinde (51, 52). Všechny detekční systémy vykazovaly minimální citlivost 15 pg/mL. Každý cytokin byl stanoven v duplikátech a v několika ředěních. Absorbance byly měřeny při 450 a 620 nm na fotometru

RC Multiskan a hodnoty vyhodnoceny pomocí software Genesis verze 3,01 (Labsystems, Helsinky, Finsko).

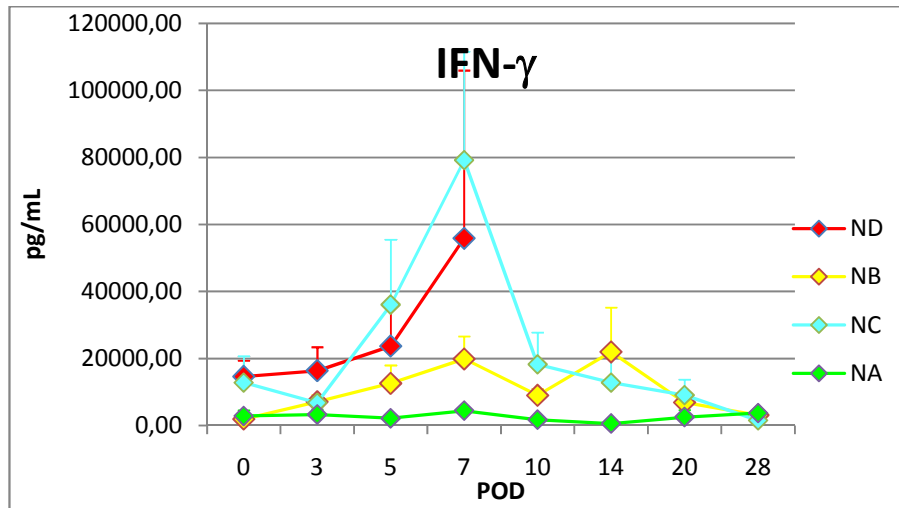
Z panelu zánětlivých cytokinů jsme hodnotili kromě IFN-gama a TNF-alfa ještě IL-4, IL-8 a IL-10.

3.4.2.3 Výsledky

3.4.2.3.1 *IFN gama*

MHC inkompatibilita indukuje daleko vyšší procento lymfocytů než antigen, na který specificky reaguje jenom kolem 10-4 lymfocytů. Při transplantaci však reaguje několik procent lymfocytů, tedy o 2-3 řády více. IFN- γ je produkován TH lymfocyty, které jsou transplantací aktivovány a indukují diferenciaci výkonových TC lymfocytů. IFN- γ zvyšuje expresi MHC a zvyšuje tak prezentaci antigenu. Působí tedy amplifikaci odhojovací reakce. Dále působí diferenciaci makrofágů a indukuje tvorbu toxických kyslíkových a NO metabolitů, které vedou k poškození tkáně. Tak např. iNOS hraje významnou úlohu při poruše motility allotransplantátu střeva.

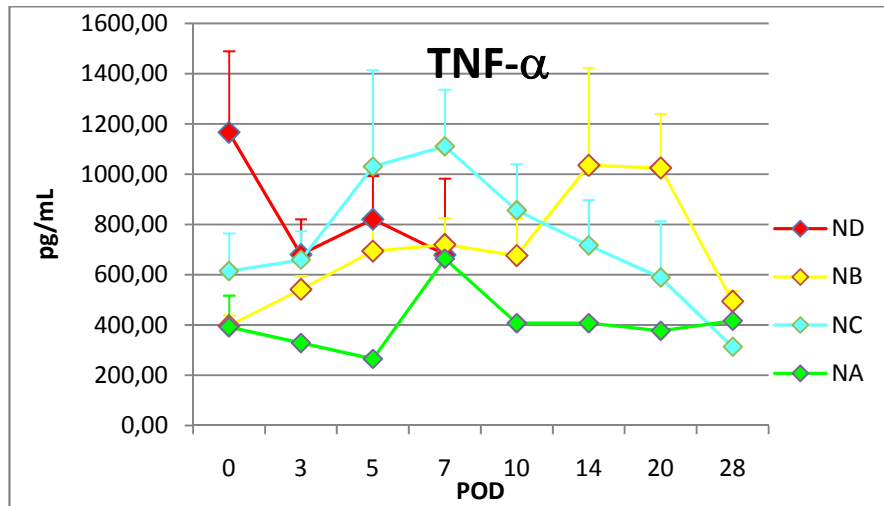
IFN- γ při autotransplantaci měl trvale nízké hodnoty, protože autotransplantace nevyvolala aktivaci lymfocytů, ale byl významně zvýšen po allotransplantaci střeva. IFN- γ lze považovat za dobrý ukazatel reaktivních změn při allotransplantaci. Jeho přímou souvislost s podávanou léčbou jsme ale nezaznamenali. Naopak v léčené skupině C (tacrolimus a sirolimus) jsou hladiny sedmý pooperační den vysoké při minimálních změnách ve smyslu ACR (graf 7).



Graf 7. Plasmatické hladiny interferonu gama (IFN- γ) v průběhu pooperačních dnů (POD).

3.4.2.3.2 *TNF-alfa*

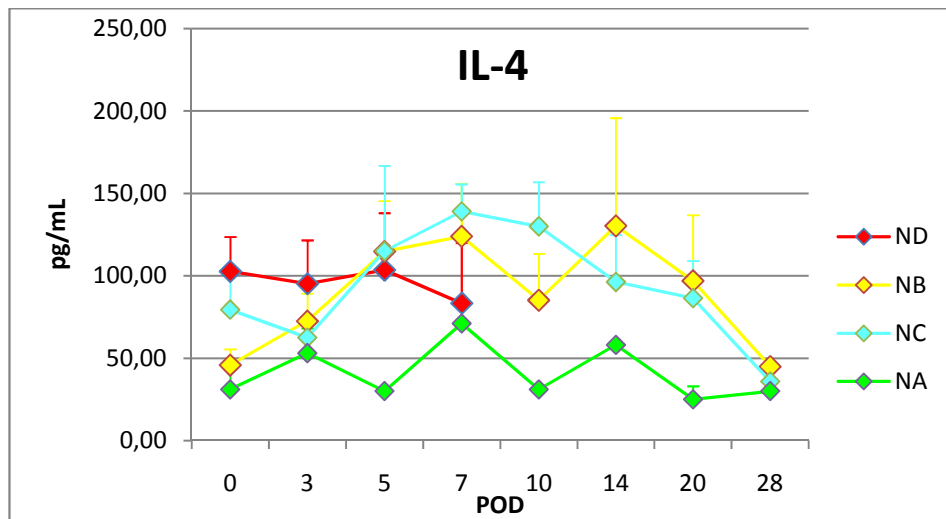
TNF je v krvi produkován monocyty i lymfocyty (ve střevě enterocyty při poškození epitelu a dále buňkami lamina propria – lymfocyty, NK buňkami, žírnými buňkami, makrofágy apod.). Oproti IFN- γ byla i po autotransplantaci nalezena dosti vysoká koncentrace TNF. Koncentrace TNF byla tedy patrně více ovlivněna operací a případnými mikrobiálními produkty (zejména bakteriální lipopolysacharidy). Koncentrace TNF- α se zvyšuje při zánětové odpovědi na operační trauma a poškození tkání. Z hlediska předpokládané hypotézy se TNF- α se neukázal jako vhodný marker k diagnostice a posouzení rozsahu ACR (graf 8).



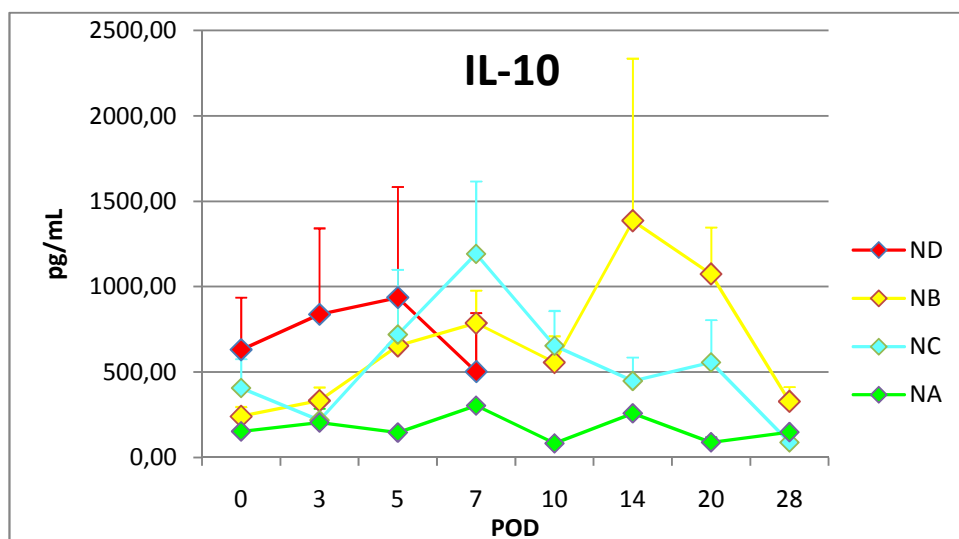
Graf 8. Plasmatická hladina tumor necrotising faktoru (TNF- α) v závislosti na pooperačních dnech (POD).

3.4.2.3.3 IL-4 a IL-10

Oba cytokiny jsou produkovány TH2 buňkami, IL-10 také monocyty. Po autotransplantaci byly plasmatické koncentrace IL-4 a IL-10 nízké. Oba cytokiny jsou protizáněťové, tzn. působící antagonisticky proti TNF a dalším cytokinům amplifikujícím záněť. Koncentrace IL-4 a IL-10 se zvyšují po allotransplantaci, ale i v přítomnosti jejich vysokých koncentrací a nízkých koncentrací IFN dochází k odhojení aloštěpu. Zejména koncentrace IL-10 po allotransplantaci byla vysoká, ale nebyl pozorován vliv terapie (graf 9-10).



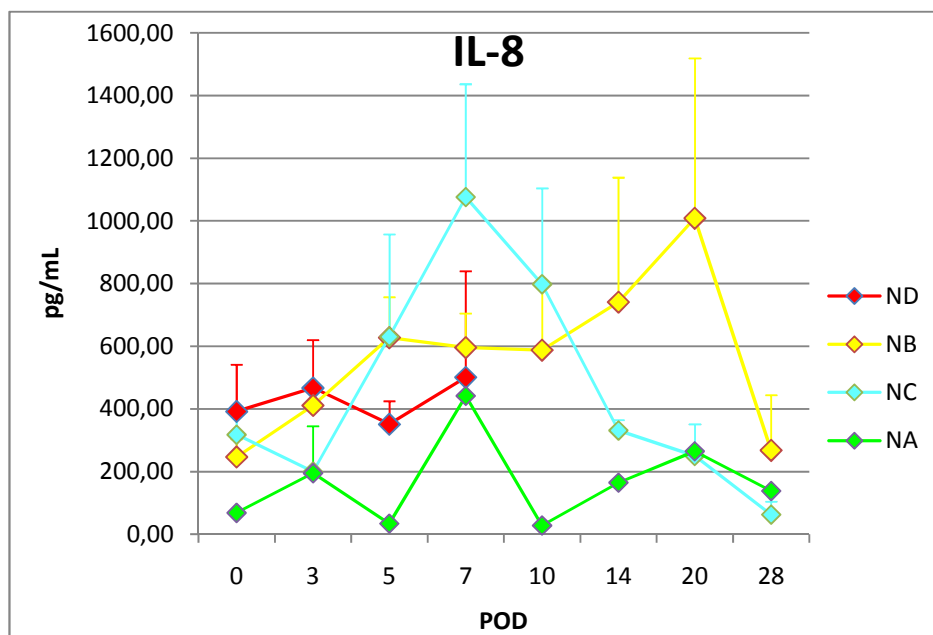
Graf 9. Plasmatická koncentrace interleukinu čtyři (IL- 4) v průběhu pooperačních dnů (POD).



Graf 10. Plasmatická koncentrace interleukinu deset (IL- 10) v průběhu pooperačních dnů (POD).

3.4.2.3.4 IL-8

Tento prozánětlivý chemokin neutrofilů je produkován krevními monocyty a endotelem (ve střevě enterocyty a makrofágy). Jeho občasná detekce v plasmě po autotransplantaci může být způsobena indukcí mikrobiálními motivy, např. flagelinem střevních enterobakterií. Nález těchto bakteriálních motivů (surgical site infection) v cirkulaci po transplantaci by vysvětlil změny v cytokinové koncentraci. Tyto motivy se samozřejmě vyskytují i u mrtvých mikrobuů po aplikaci antibiotik. IL-8 na ně velmi citlivě reaguje. V některých případech po autotransplantaci byla jeho koncentrace nulová, zatímco po allotransplantaci byly naměřené hodnoty vždy vysoké. Plasmatický IL-8 odráží dynamiku imunitních změn u allotransplantace (graf 11).



Graf 11. Plasmatická hladina interleukinu osm (IL- 8) v průběhu pooperačních dnů (POD).

3.4.2.4 Diskuze

Jako cytokiny se označují malé polypeptidové molekuly, které jsou produkovány na různé podněty buňkami imunitního systému. Jsou produkovány místně a jsou účinné ve velmi malých koncentracích. Cytokiny jsou sekretovány různými buňkami zahrnutými v imunitní odpovědi a působí na cílové buňky nesoucí receptory pro daný cytokin. Vazba cytokinu na buněčný receptor přenáší signál do buňky a vede k aktivaci a expresi genů. Cytokiny regulují intenzitu a trvání imunitní odpovědi. Transplantované orgány exprimují jejich mRNA a na vzniku rejekce štěpu se podílí zejména IFN γ a TNF α (53)

IFN- γ se uplatňuje v buněčně zprostředkované imunitě, je produkován TH1 buňkami a NK buňkami. Podílí se na aktivaci makrofágů a stimuluje expresi MHC antigenů II.třídy. TNF α je prozánětlivý cytokin, indukuje místní zánět, aktivuje endotelové buňky. Je produkován monocyty/makrofágy, neutrofilů a NK buňkami. IL-4 má převážně inhibiční účinek na zánětlivé reakce, je produkován TH2 buňkami a stimuluje B lymfocyty. Inhibuje TH1 a makrofágy. IL-10 má také převážně inhibiční účinek na zánětlivé reakce, je produkován zejména makrofágy. Inhibuje TH1 i TH2 buňky. IL-8 (CXCL8) je chemokin, který se podílí na chemotaxi a aktivaci granulocytů. Je produkován různými typy buněk, kromě makrofágů i parenchymovými buňkami. Je jedním z hlavních mediátorů zánětlivé odpovědi.

V odpovědi na antigen, ale i poškození tkáně, dochází ke kaskádě nespecifických jevů známých jako odpověď akutní fáze. Pod vlivem cytokinů dochází k adherenci zánětlivých buněk na vaskulární endotel a k jejich migraci do tkáně. Výsledkem je příliv lymfocytů, neutrofilů, monocytů, eosinofilů, basofilů a žírných buněk do místa poškození a účast těchto buněk v likvidaci antigenu a hojení poškození tkáně.

Akutní fáze zánětlivé reakce je zahájena aktivací tkáňových makrofágů a uvolněním tří cytokinů: TNF α , IL-1 a IL-6. Tyto cytokiny působí synergicky a indukují množství lokálních i systémových změn. Pod jejich vlivem dochází ke koagulaci a zvýšení propustnosti cév. TNF α a IL-1 zvyšují expresi adhezivních molekul na cévních endoteliích. Oba cytokiny také působí na makrofágy a indukují produkci IL-8, který zvyšuje adhezi neutrofilů k endotelovým buňkám a současně funguje jako jejich chemotaktický faktor. IFN γ chemotakticky přitahuje makrofágy, IFN γ a TNF α aktivují makrofágy a neutrofilly.

O charakteru imunitní reakce proti cizorodému antigenu (buněk allotransplantátu) rozhoduje poměr mezi lymfocyty TH1 a TH2.

Za určitých okolností dochází přednostně ke stimulaci buněk TH1 a ty vyvolají ve spolupráci s makrofágy zánět; za jiných okolností se přednostně stimulují lymfocyty TH2, které pak pomáhají B-lymfocytům tvořit protilátky. To, jestli se imunitní odpověď rozběhne směrem TH1 nebo TH2 závisí na řadě okolností, ale hlavní úlohu hraje cytokinové prostředí. Cytokiny produkované buňkami TH1 (hlavně interferon- γ) výrazně potlačují dozrávání buněk TH2, a naopak cytokinové produkty lymfocytů TH2 (hlavně interleukin-4) brání diferenciaci buněk TH1. Jakmile se tedy reakce rozběhne jedním směrem, má tendenci se stabilizovat a bránit překlopení do konkurenčního opačného typu. Na základě tohoto modelu by se dalo očekávat, že lymfocyty TH2 antigeně specifické proti antigenům transplantátu by měly potlačovat odhojovací reakci. Paradoxně tomu tak však není. Ačkoli buňky TH2 potlačí zánětlivou reakci založenou na TH1, vyvolají jiný typ zánětu, který transplantát také poškodí, či dokonce zlikviduje. Je tomu tak proto, že hlavní cytokinové produkty buněk TH2, interleukin-4 a interleukin-5, aktivují eozinofilní granulocyty. Eozinofily stimulované IL-4 a IL-5 uvolňují prozánětlivé látky a vyvolávají tak v

transplantátu opět poněkud odlišný, ale v konečných důsledcích obdobně destruktivní zánět.

3.4.2.5 Závěr

Transplantace střeva představuje významný inzult projevující se obranou zánětlivou reakcí organismu spojenou s vyplavením vysoké hladiny prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů. Již samotná operace vyvolá rozsáhlé poškození tkání, na které reagují imunokompetentní buňky produkcí některých cytokinů – to je patrné např. zvýšením hladiny TNF i po autotransplantaci. Dále dochází k indukci iNOS (inducible nitric oxide synthase), disrupci aktinu, poruše těsnosti střeva a úniku střevních bakterií a jejich složek do cirkulace. Tyto procesy se pak výrazně akcentují s rozvojem celulární rejekce.

Při vyhodnocování výsledků hodnot cytokinů v našem souboru nebyla nalezena korelace mezi koncentrací cytokinů v plazmě a průběhem posttransplantační reakce u žádné skupiny vyšetřovaných zvířat. Ani použitá terapie nevykázala signifikantní změny u naměřených hodnot plazmatických cytokinů. Důvodem je pravděpodobně skutečnost, že ke zvýšení koncentrací cytokinů dochází hlavně v místě jejich produkce a účinku, a tudíž se zvýšené hodnoty nenacházejí v plazmě.

4 Závěry dizertační práce

V rámci náročného experimentu se nám podařilo úspěšně **zrealizovat a standardizovat odběr a transplantaci štěpu tenkého střeva** na praseti. Zvládnutí chirurgické techniky je důležitým faktorem pro zavedení transplantace střeva do klinické praxe.

Histologické vyšetření biopsie štěpu je standardní metodou k hodnocení rozsahu celulární rejekce. Zkušenosti získané hodnocením biopsií jsou neocenitelným přínosem pro rozvoj klinického programu transplantace střeva.

Vyšetření **hladiny plasmatického citrulinu** ukázalo význam této metody pro neinvazivní diagnostiku poškození střevního epitelu v souvislosti s celulární rejekcí. Z hlediska budoucího klinického využití bude citrulin využíván jako marker vhodný pro monitoraci funkce štěpu.

Problematika **hodnocení cytokinů** a jejich přínos pro neinvazivní diagnostiku rejekce je složitá, protože do hry vstupuje mnoho dalších faktorů počínaje operačním stresem, přes infekční komplikace až po imunitní vlivy. Nejmenší hladiny prozánětlivých cytokinů jsme naměřily ve skupině zvířat autotransplantovaných, u kterých je imunologický inzult minimální. Naše výsledky, ale nepotvrdily očekávaný nárůst hladiny u skupiny allotransplantovaných zvířat bez imunosuprese. Stanovení hladiny cytokinů v našem experimentu nepřineslo větší přínos pro humorální diagnostiku rejekce štěpu.

Celospolečenský význam provedeného experimentu spočívá ve vytvoření podmínek pro zahájení **klinického programu transplantace tenkého střeva** v České republice.

5 Literatura

1. Sade RM. Transplantation at 100 years: Alexis Carrel, pioneer surgeon. *Ann Thorac Surg*2005 Dec;80(6):2415-8.
2. Carrel A. Landmark article, Nov 14, 1908: Results of the transplantation of blood vessels, organs and limbs. By Alexis Carrel. *JAMA*1983 Aug 19;250(7):944-53.
3. Lillehei RC, Goott B, Miller FA. The physiological response of the small bowel of the dog to ischemia including prolonged in vitro preservation of the bowel with successful replacement and survival. *Ann Surg*1959 Oct;150:543-60.
4. Monchik GJ, Russell PS. Transplantation of small bowel in the rat: technical and immunological considerations. *Surgery*1971 Nov;70(5):693-702.
5. Lillehei RC, Idezuki Y, Feemster JA, Dietzman RH, Kelly WD, Merkel FK, Goetz FC, Lyons GW, Manax WG. Transplantation of stomach, intestine, and pancreas: experimental and clinical observations. *Surgery*1967 Oct;62(4):721-41.
6. Starzl TE, Rowe MI, Todo S, Jaffe R, Tzakis A, Hoffman AL, Esquivel C, Porter KA, Venkataramanan R, Makowka L, et al. Transplantation of multiple abdominal viscera. *JAMA*1989 Mar 10;261(10):1449-57.
7. Deltz E, Schroeder P, Gebhardt H, Gundlach M, Engemann R, Timmermann W. [First successful clinical small intestine transplantation. Tactics and surgical technic]. *Chirurg*1989 Apr;60(4):235-9.
8. Calne RY, Pollard SG, Jamieson NV, Friend PJ, Rasmussen A, Neale G, Wight DG, Joysey V, Wraight EP. Intestinal transplant for recurring mesenteric desmoid tumour. *Lancet*1993 Jul 3;342(8862):58-9.
9. Starzl TE, Todo S, Fung J, Demetris AJ, Venkataraman R, Jain A. FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. *Lancet*1989 Oct 28;2(8670):1000-4.
10. Messing B, Lemann M, Landais P, Gouttebel MC, Gerard-Boncompain M, Saudin F, Vangossum A, Beau P, Guedon C, Barnoud D, et al. Prognosis of patients with nonmalignant chronic intestinal failure receiving long-term home parenteral nutrition. *Gastroenterology*1995 Apr;108(4):1005-10.
11. Howard L, Ashley C. Management of complications in patients receiving home parenteral nutrition. *Gastroenterology*2003 May;124(6):1651-61.
12. Sudan D, Horslen S, Botha J, Grant W, Torres C, Shaw B, Jr., Langnas A. Quality of life after pediatric intestinal transplantation: the perception of pediatric recipients and their parents. *Am J Transplant*2004 Mar;4(3):407-13.
13. Abu-Elmagd KM. Intestinal transplantation for short bowel syndrome and gastrointestinal failure: current consensus, rewarding outcomes, and practical guidelines. *Gastroenterology*2006 Feb;130(2 Suppl 1):S132-7.
14. Reinshagen K, Adams R, Trunk M, Wessel LM. The chronic liver disease in patients with short bowel syndrome: etiology and treatment. *Minerva Pediatr*2009 Jun;61(3):273-81.
15. Sudan D. Cost and quality of life after intestinal transplantation. *Gastroenterology*2006 Feb;130(2 Suppl 1):S158-62.
16. Intestinal Transplant Registry Data. Available at: [http:// www.intestinaltransplant.org/](http://www.intestinaltransplant.org/).
17. Fishbein TM, Gondolesi GE, Kaufman SS. Intestinal transplantation for gut failure. *Gastroenterology*2003 May;124(6):1615-28.
18. Pascher A, Kohler S, Neuhaus P, Pratschke J. Present status and future perspectives of intestinal transplantation. *Transpl Int*2008 May;21(5):401-14.
19. Murase N, Demetris AJ, Kim DG, Todo S, Fung JJ, Starzl TE. Rejection of multivisceral allografts in rats: a sequential analysis with comparison to isolated orthotopic small-bowel and liver grafts. *Surgery*1990 Nov;108(5):880-9.
20. Pinna AD, Weppler D, Nery JR, Khan F, Ruiz P, Kato T, De Faria W, Berho M, Tzakis AG. Induction therapy for clinical intestinal transplantation: comparison of four different regimens. *Transplant Proc*2000 Sep;32(6):1193-4.
21. Mueller AR, Pascher A, Platz KP, Nussler NC, Schulz RJ, Junge G, Klupp J, Rayes N, Dignass A, Radtke C, Neuhaus P. Immunosuppressive management following small bowel transplantation. *Transplant Proc*2002 Aug;34(5):1894-6.

22. Grant D, Abu-Elmagd K, Reyes J, Tzakis A, Langnas A, Fishbein T, Goulet O, Farmer D. 2003 report of the intestine transplant registry: a new era has dawned. *Ann Surg*2005 Apr;241(4):607-13.
23. Fishbein TM, Florman S, Gondolesi G, Schiano T, LeLeiko N, Tschernia A, Kaufman S. Intestinal transplantation before and after the introduction of sirolimus. *Transplantation*2002 May 27;73(10):1538-42.
24. Suchin EJ, Langmuir PB, Palmer E, Sayegh MH, Wells AD, Turka LA. Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *J Immunol*2001 Jan 15;166(2):973-81.
25. Baker RJ, Hernandez-Fuentes MP, Brookes PA, Chaudhry AN, Cook HT, Lechler RI. Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy. *J Immunol*2001 Dec 15;167(12):7199-206.
26. Oliverius M, Kudla M, Balaz P, Valsamis A. [Plasma citrulline concentration--a reliable noninvasive marker of functional enterocyte mass]. *Cas Lek Cesk*2010;149(4):160-2.
27. Gurlich R, Novotny J, Striz I, Honsova E, Oliverius M, Janousek L, Pokorna E, Maruna P. [The risk of malignancy after organ transplantation]. *Cas Lek Cesk*2005;144(9):597-600; discussion -1.
28. Abu-Elmagd KM, Mazariegos G, Costa G, Soltys K, Bond G, Sindhi R, Green M, Jaffe R, Wu T, Koritsky D, Matarese L, Schuster B, Martin L, Dvorchik I, Nalesnik MA. Lymphoproliferative disorders and de novo malignancies in intestinal and multivisceral recipients: improved outcomes with new outlooks. *Transplantation*2009 Oct 15;88(7):926-34.
29. Abu-Elmagd KM, Zak M, Stamos JM, Bond GJ, Jain A, Youk AO, Ezzelarab M, Costa G, Wu T, Nalesnik MA, Mazariegos GV, Sindhi RK, Marcos A, Demetris AJ, Fung JJ, Reyes JD. De novo malignancies after intestinal and multivisceral transplantation. *Transplantation*2004 Jun 15;77(11):1719-25.
30. Nishida S, Kato T, Burney T, Levi D, Nery J, Madariaga J, Mittal N, Weppler D, Ruiz P, Tzakis A. Rituximab treatment for posttransplantation lymphoproliferative disorder after small bowel transplantation. *Transplant Proc*2002 May;34(3):957.
31. Alessiani M, De Ponti F, Fayer F, Abbiati F, Zonta S, Zitelli E, Arbustini E, Morbini P, Poggi N, Klersy C, Blangetti I, Dionigi P, Zonta A. The influence of surgery, immunosuppressive drugs, and rejection, on graft function after small bowel transplantation: a large-animal study. *Transpl Int*2003 May;16(5):327-35.
32. Ruiz P, Bagni A, Brown R, Cortina G, Harpaz N, Magid MS, Reyes J. Histological criteria for the identification of acute cellular rejection in human small bowel allografts: results of the pathology workshop at the VIII International Small Bowel Transplant Symposium. *Transplant Proc*2004 Mar;36(2):335-7.
33. Calleja-Kempin J, Vazquez-Estevez J, Martin-Cavanna J, Jimenez-Almonacid P, De Agustin JC. Vascular thrombosis in small bowel transplantation: a comparative study in the pig. *Transplant Proc*1998 Sep;30(6):2646.
34. Kaneko H. Technical aspects of small bowel transplantation in the pig allograft model. *Transplant Proc*1996 Jun;28(3):1843-4.
35. Varga J, Stasko P, Toth S, Pristasova Z, Bujdos M, Pomfy M. Development of jejunal graft damage during intestinal transplantation. *Ann Transplant*2009 Jul-Sep;14(3):62-9.
36. Massberg S, Messmer K. The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc*1998 Dec;30(8):4217-23.
37. Massberg S, Gonzalez AP, Leiderer R, Menger MD, Messmer K. In vivo assessment of the influence of cold preservation time on microvascular reperfusion injury after experimental small bowel transplantation. *Br J Surg*1998 Jan;85(1):127-33.
38. Nadalin S, Biglarnia AR, Testa G, Koppa TR, Schaffer R, Johnson C, Toetsch M, Broelsch CE, Malago M. Role and significance of plasma citrulline in the early phase after small bowel transplantation in pigs. *Transpl Int*2007 May;20(5):425-31.
39. Kay JE, Moore AL, Doe SE, Benzie CR, Schonbrunner R, Schmid FX, Halestrap AP. The mechanism of action of FK 506. *Transplant Proc*1990 Feb;22(1):96-9.
40. Steinmann B, Superti-Furga A, Bruckner P. Mechanism of action of FK 506 and cyclosporin. *Lancet*1991 Feb 16;337(8738):439.

41. Alessiani M, Spada M, Vischi S, Maestri M, Dionigi P, Arbustini E, Grossi P, Ippoliti GB, Regazzi M, De Ponti F, et al. Total orthotopic small bowel transplantation in swine under FK 506. *Transplant Proc*1994 Jun;26(3):1606-8.
42. Doni M, Cobiachi L, Alessiani M, Zonta S, Abbiati F, Morbini P, Bardone M, Mazzilli M, Vigano J, De Martino M, Dominioni T, Dionigi B, Molinaro MD, Bottazzi A, Dionigi P. Early outcome of different steroid-free regimens in small bowel transplantation: a large-animal study. *Transplant Proc*2006 Jul-Aug;38(6):1812-4.
43. Gruessner RW, Fryer JP, Fasola C, Nakhleh RE, Gruessner AC, Kim S, Dunn DL, Pirenne J, Bekersky I, Benedetti E, et al. A prospective study of FK506 versus CsA and pig ATG in a porcine model of small bowel transplantation. *Transplantation*1995 Jan 27;59(2):164-71.
44. Kobayashi N, Sakagami K, Orita K. Effect of FK 506 on abdominal organ cluster transplantation in pigs. *Transplant Proc*1991 Dec;23(6):3275-9.
45. Sehgal SN. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem*1998 Jul;31(5):335-40.
46. Terada N, Lucas JJ, Szepesi A, Franklin RA, Domenico J, Gelfand EW. Rapamycin blocks cell cycle progression of activated T cells prior to events characteristic of the middle to late G1 phase of the cycle. *J Cell Physiol*1993 Jan;154(1):7-15.
47. Dumont FJ, Melino MR, Staruch MJ, Koprak SL, Fischer PA, Sigal NH. The immunosuppressive macrolides FK-506 and rapamycin act as reciprocal antagonists in murine T cells. *J Immunol*1990 Feb 15;144(4):1418-24.
48. Chen H, Qi S, Xu D, Vu DM, Fitzsimmons WE, Bekersky I, Peets J, Sehgal SN, Daloze P. FK 506 and rapamycin in combination are not antagonistic but produce extended small bowel graft survival in the mouse. *Transplant Proc*1998 Jun;30(4):1039-41.
49. Crenn P, Messing B, Cynober L. Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction. *Clin Nutr*2008 Jun;27(3):328-39.
50. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest*1998 Jan 1;101(1):273-81.
51. Frey A, Meckelein B, Externest D, Schmidt MA. A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays. *J Immunol Methods*2000 Jan 13;233(1-2):47-56.
52. Splichal I, Muneta Y, Mori Y, Takahashi E. Development and application of a pig IL-8 ELISA detection system. *J Immunoassay Immunochem*2003;24(2):219-32.
53. Levay-Young B, Shearer JD, Gruessner AC, Kim SC, Nakhleh RE, Gruessner RW. Intestinal graft versus native liver cytokine expression in a rat model of intestinal transplantation: effect of donor-specific cell augmentation. *Transplant Proc*2004 Mar;36(2):399-400.

6 Publikační aktivita

6.1 Grant IGA MZd ČR

V rámci dizertační práce byl řešen programový projekt podpořený interní grantovou agenturou Ministerstva zdravotnictví ČR registrační číslo: NR/ 8896-3 s názvem: Transplantace tenkého střeva v experimentu.

Tento projekt dostal **hodnocení A a čestné uznání Ministryně zdravotnictví České republiky.**

6.2 Články s IF ve vztahu k dizertační práci

- **Oliverius M.**, Král D., Honsova E., Lodererova A., Kudla M., Balaz P., Valsamis A., Cap J. Surgical technique of small bowel transplantation in a large animal model. Acta Veterinaria Brunensis ISSN 0001-7213 **(IF 0,403 z roku 2009)**
- Honsová, E., Lodererová, A., Baláž, P., **Oliverius, M.** Plasma citrulline levels and acute cellular rejection early after small bowel transplantation in pigs. Veterinární medicína, 2009, roč. 54, č. 5, s. 215-222. ISSN 0375-8427. **(IF 0,644 z r. 2009)**
- **Oliverius, M.**, Baláž, P., Kudla, M., Valsamis, A., Čáp, J., Adamec, M. Small bowel graft revascularization in experiment. Bratislavské lekárske listy, 2009, vol. 110, no. 2, p. 65-68. ISSN 0006-9248. (Původní sdělení). **(IF 0,317 z r. 2009)**
- Baláž, P., Kudla, M., Lodererová, A., **Oliverius, M.**, Adamec, M. Preservation injury of the small bowel graft in clinical small bowel transplantation. Bratislavské lekárske listy, 2007, vol. 108, no. 12, p. 516-518. ISSN 0006-9248. **(IF 0,317 z r. 2009)**

6.3 Články bez IF ve vztahu k dizertační práci

- Honsová, E., Lodererova, A., Balaz, P., **Oliverius, M.** Number of serotonin positive cells and acute cellular rejection in the early period after small bowel transplantation in pigs. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc 2010; 154(1): 25- 9
- Baláž, P., Kudla, M., Lodererová, A., **Oliverius, M.**, Adamec, M. Preservation injury to the human small bowel graft: jejunum vs. ileum. Annals of transplantation, 2007, vol. 12, no. 1, p. 15-18. ISSN 1425-9524.
- **Oliverius, M.** Hladina plasmatického citrulinu - spolehlivý neinvazivní ukazatel množství funkčních enterocytů. Časopis lékařů českých, 2010, roč. 149., č. 4, s. 160-162. ISSN 0008-7335. (Přehled).
- **Oliverius, M.**, Kudla, M., Baláž, P., Valsamis, A., Honsová, E., Lodererová, A., Čáp, J., Adamec, M. Transplantace tenkého střeva v experimentu. Rozhledy v chirurgii, 2009, roč. 88, č. 11, s. 662-668. ISSN 0035-9351. (Původní sdělení).
- **Oliverius, M.**, Dastych, M. Selhání tenkého střeva - od parenterální výživy k transplantaci střeva. Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie, 2009, roč. 63, č. 3, s. 105-112. ISSN 1213-323X. (Přehled).
- **Oliverius, M.**, Kudla, M., Baláž, P., Valsamis, A. Transplantace tenkého střeva. Postgraduální medicína, 2008, roč. 10, č. 9, s. 1026-1031. ISSN 1212-4184. (Původní sdělení).
- **Oliverius, M.** Transplantace tenkého střeva. Medical Tribune, 2008, č. 9, s. IV-V. ISSN 1214-8911. (Přehled).
- Kudla, M., Baláž, P., **Oliverius, M.**, Adamec, M. Chirurgická technika odběru tenkého střeva pro transplantaci. Rozhledy v chirurgii, 2007, roč. 86, č. 6, s. 297-299 ISSN 0035-9351. (Původní sdělení).

- **Oliverius, M.** Transplantace tenkého střeva - současný stav ve světě a v České republice. Lékařské Listy, 2006, roč. 55, č. 2, s. 24-25. ISSN 0044-1996. Příloha Zdrav. Nov. ze dne 27. 1. 2006. - (Přehled).
- **Oliverius, M.** Transplantace tenkého střeva (1. část). Šance novým životům. Stěžeň, 2009, roč. 20, č. 3, s. 23-27. ISSN 1210-0153. (Přehled).
- **Oliverius, M.** Transplantace tenkého střeva (2. část). Stěžeň, 2009, roč. 20, č. 4, s. 34-37. ISSN 1210-0153. (Přehled).
- **Oliverius, M.,** Kudla, M., Baláž, P. IX. mezinárodní sympozium transplantace tenkého střeva, Brusel, 2005. Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie, 2005, roč. 59, č. 6, s. 310-312. ISSN 1213-323X. (Článek jiný).

6.4 Přednášky a postery ve vztahu k dizertační práci

6.4.1 Přednáška s abstraktem

- **Oliverius, M.,** Mendl, J. Komplexní přístup k pacientům se selháním střeva - od rehabilitace střeva po transplantaci. XXVI. mezinárodní kongres SKVIMP. Hradec Králové, CZ, 18.02.2010 - 20.02.2010. In: Sborník prezentací XXVI. mezinárodního kongresu SKVIMP, Plzeň: Eurovelag. 2010, s. 53. (Přednáška s abstraktem). ISSN/ISBN 978-80-7177-022-0.
- Wohl, P., Wohl, P., Kopecký, J., Drastich, P., Gottfriedová, H., **Oliverius, M.,** Trunečka, P., Pelikánová, T. Staging jaterní léze u domácí parenterální výživy - návrh algoritmu pro praxi. XXVI. mezinárodní kongres SKVIMP. Hradec Králové, CZ, 18.02.2010 - 20.02.2010.
In: Sborník prezentací XXVI. mezinárodního kongresu SKVIMP, Plzeň: Eurovelag. 2010, s.47-48. (Přednáška s abstraktem). ISSN/ISBN 978-80-7177-022-0.
- Baláž, P., Kudla, M., Lodererová, A., **Oliverius, M.,** Adamec, M. Naše první zkušenosti s odběrem tenkého střeva od lidského dárce. 1. československý transplantační kongres. Brno, CZ, 16.-18.11.2006. In: 1. československý

transplantační kongres. Sborník abstrakt s programem. B. m. : b.n., 2006, nestr.,
č. abstr. U50. ISBN 80-239-8022-X. - (Přednáška s abstraktem).

- **Oliverius, M.**, Kudla, M., Baláž, P. Transplantace tenkého střeva. 22. kongres SKVIMP. Hradec Králové, CZ, 2.-4.3.2006. Zorg. SKVIMP ČLS JEP. In: Klinická výživa a metabolická péče v gastroenterologii a gerontologii. Hradec Králové: Nucleus HK, 2006, s.41-42. ISBN 80-86225-91-7. - (Přednáška s abstraktem).
- **Oliverius, M.**, Baláž, P., Kudla, M., Špičák, J. Transplantace tenkého střeva - současný stav ve světě a v České republice. Český gastroenterologický a hepatologický kongres s mezinárodní účastí. Hradec Králové, CZ, 10.-12.11.2005. In: Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie, 2005, roč. 59, suppl. 2, s.57. ISSN 1213-323X. - (Přednáška s abstraktem).

6.4.2 Přednášky bez abstraktu

- Baláž, P., Kudla, M., Lodererová, A., **Oliverius, M.**, Adamec, M. Human small bowel graft procurement and evaluation of the preservation injury in clinical experimental study. 10th International Small Bowel Transplant Symposium. Santa Monica, CA, 06.- 09.09.2007. (Přednáška bez abstraktu)
- Baláž, P., Kudla, M., **Oliverius, M.**, Klein, D., Adamec, M. Transplantácia tenkého čreva - stav vo svete a Českej republike. 5. slovenský transplantologický kongres. Bratislava, SK, 8.-10.9.2005. (Přednáška bez abstraktu).
- **Oliverius, M.** Transplantace tenkého střeva. 19. pracovní dny dětské gastroenterologie a výživy. Nymburk, 15.10.2009 - 17.10.2009. (Přednáška bez abstraktu).
- **Oliverius, M.** Transplantace tenkého střeva. 7. pracovní den DPV spojený s 1. setkáním pacientů na DPV. Slavkov, CZ, 09.10.2009 - 10.10.2009. Zorg. SKVIMP. (Přednáška bez abstraktu).

- **Oliverius, M.,** Horáčková, M. Transplantace tenkého střeva. Aktuální stav transplantačního Waiting listu. 5. pracovní den PS DPV. Praha, CZ, 30.05.2008. (Přednáška bez abstraktu).
- **Oliverius, M.,** Kudla, M., Píza, P. Význam a přínos enterální nutrice u chirurgických pacientů. XXIV. kongres SKVIMP. Hradec Králové, CZ, 28.02.2008 - 01.03.2008.
- **Oliverius, M.** Transplantace tenkého střeva. 4. pracovní den SDPV. Praha, CZ, 16.11.2007 - (Přednáška bez abstraktu).
- **Oliverius, M.,** Kudla, M., Baláž, P., Beneš, P. Transplantace tenkého střeva - současný stav ve světě a v české republice. 13. pražský chirurgický den - Jiráskův den. Praha, CZ, 8.6.2006. Zorg. Česká chirurgická společnost. (Přednáška bez abstraktu).
- **Oliverius, M.,** Baláž, P., Kudla, M. Transplantace tenkého střeva. Celouštavní seminář. Praha, CZ, 25.10.2005. Zorg. IKEM. (Přednáška bez abstraktu).

6.5 Články s IF bez vztahu k dizertační práci

- Hucl, T., Benes, M., Kocik, M., Krak, M., Maluskova, J., Kieslichova, E., **Oliverius, M.,** Spicak, J. A novel double-endoloop technique for natural orifice transluminal endoscopic surgery gastric access site closure. *Gastrointest Endosc.* 2010;71(4):806-11. **(IF 6,713 v r. 2009)**
- **Oliverius, M.,** Kala, Z., Varga, M., Gürlich, R., Lánská, V., Kubešová, H. Radical surgery for pancreatic malignancy in the elderly. *Pancreatology*, 2010; 10(4): 499- 502 ISSN 1424-3903. **(IF 2,195 z r. 2009).**
- Votrubova, J., Belohlavek, O., Jaruskova, M., **Oliverius, M.,** Lohynska, R., Trskova, K., Sedlackova, E., Lipska, L., Stahalova, V. The role of FDG-PET/CT in the detection of recurrent colorectal cancer. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 2006, vol. 33, no. 7, p. 779-784. ISSN 1619-7070. (Původní sdělení). **(IF 4,531 z r. 2009)**

6.6 Články ostatní bez vztahu k dizertační práci

- **Oliverius, M.**, Varga M., Honsová E., Chirurgická léčba gastrointestinálních stromálních nádorů. *Onkologie*, 2010, roč. 4, č. 1, s. 9-12. ISSN 1802-4475. (Přehled).
- **Oliverius, M.**, Šafanda, M., Kříž, R. Multimodální léčba metastáz kolorektálního karcinomu. *Remedia*, 2009, roč. 19, č. 5, s. 362-365. ISSN 0862-8947. (Přehled).
- Gürlich, R., **Oliverius, M.**, Lipár, K., Varga, M., Špičák, J., Štirand, P., Valsamis, A., Novotný, J., Vyhnánek, F. Výsledky jednoročního přežití u nemocných po resekci hlavy slinivky břišní s resekci žil portomezenterické oblasti (PMO).. *Rozhledy v chirurgii*, 2009, roč. 88, č. 8, s. 417-421. ISSN 0035-9351. (Přehled).
- **Oliverius, M.** Komenář [k článku: Mazzaferro, V. et al. Předpověď přežití po transplantaci jater u pacientů s hepatocelulárním karcinomem přesahujícím Milánská kritéria: Retrospektivní, předběžná analýza.]. *The lancet oncology* : české vydání, 2009, roč. 8, č. 1, s. 52-53. ISSN 1213-9432. (Přehled).
- Varga, M., **Oliverius, M.**, Valsamis, A., Kučera, M., Gürlich, R., Šafanda, M., Matia, I., Honsová, E. Resekce pankreatu pro metastázy karcinomu ledviny. *Klinická onkologie*, 2009, roč. 22, č. 6, s. 288-290. ISSN 0862-495X. (Kazuistika).
- Varga, M., Valsamis, A., Matia, I., Peregrin, J., Honsová, E., Šafanda, M., **Oliverius, M.** Transarteriální chemoembolizace u hepatocelulárního karcinomu jater. *Rozhledy v chirurgii*, 2009, roč. 88, č. 8, s. 434-438. ISSN 0035-9351. (Přehled).
- Honsová, E., Gottfriedová, H., **Oliverius, M.**, Trunečka, P. Allograft hepatitis after liver transplantation for epithelioid haemangioendothelioma. *Prague medical report*, 2009, roč. 110, č. 3, s. 214-221. ISSN 1214-6994. (Původní sdělení).
- Hucl, T., Beneš, M., Kočík, M., Krak, M., Kubecová, H., Čáp, J., Šimůnková, Z., Malušková, J., Kieslichová, E., **Oliverius, M.**, Špičák, J. NOTES cholecystektomie.

Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie, 2009, roč. 63, č. 3, s. 95-99.

ISSN 1213-323X. (Původní sdělení).

- Mendl, J., **Oliverius, M.**, Valsamis, A., Krak, M. Minimalizace krevních ztrát v jaterní chirurgii. *Rozhledy v chirurgii*, 2009, roč. 88, č. 7, s. 373-376. ISSN 0035-9351. (Přehled).
- **Oliverius, M.** Soudobý pohled na léčbu jaterních metastáz kolorektálního karcinomu. *Tempus Medicorum*, 2009, roč. 18, č. 6, s. 20-21. (Přehled).
- Honsová, E., Gottfriedová, H., **Oliverius, M.**, Trunečka, P. Allograft hepatitis after liver transplantation for epithelioid haemangioendothelioma. *Prague medical report*, 2009, vol. 110, no.3, p.214-221. ISSN 1214-6994.
- Trna, J., Husová, L., **Oliverius, M.**, Dastych jr., M., Šenkyřík, M., Příbramská, V. Případ familiární adenomatózní polypózy a návrh systému dispenzarizace. *Vnitřní lékařství*, 2009, roč. 55, č. 6, s. 587-592. ISSN 0042-773X. (Kazuistika).
- Valsamis, A., **Oliverius, M.**, Varga, M., Mareš, K. Primární retroperitoneální tumor – extraadrenální paragangliom – kazuistika. *Rozhledy v chirurgii*, 2008, roč. 87, č. 5, s. 263-267. ISSN 0035-9351. (Kazuistika).
- Hejlová, I., **Oliverius, M.**, Honsová, E., Kautznerová, D., Filipová, H., Šperl, J., Špičák, J., Trunečka, P. Abces jater při asymptomatické perforující divertikulitidě imitující maligní nádor jater. *Praktický lékař*, 2008, roč. 88, č. 8, s. 474-477. ISSN 0032-6739. (Kazuistika).
- Šafanda, M., **Oliverius, M.** Léčba karcinomu pankreatu ve 21. století. *Onkologie*, 2008, roč. 2, č. 2, s. 103-104, 106. ISSN 1802-4475. (Přehled).
- Špičák, J., Adamec, M., Štirand, P., Drastich, P., Filipová, H., Peregrin, J., **Oliverius, M.**, Janoušek, L., Šperl, J., Fraňková, S., Ryska, M., Bělina, F., Vítko, Š., Trunečka, P. Biliární komplikace u 500 následných transplantací jater. *Folia gastroenterologica et hepatologica*, 2008, roč. 6, č. 2, s. 47-53. ISSN 1214-4088. (Původní sdělení).

- Gürlich, R., **Oliverius, M.**, Ryska, M., Sixta, B., Pirk, J., Skalský, I., Hošková, L., Špičák, J. Chirurgické výkony na gastrointestinálním traktu po transplantaci srdce. Časopis lékařů českých, 2007, roč. 146, č. 12, s. 934-937. ISSN 0008-7335. (Původní sdělení).
- **Oliverius, M.**, Bělina, F., Novotný, J., Studeník, P., Pudil, J., Ryska, M. Léčba hepatocelulárního karcinomu a současný stav v České republice. Rozhledy v chirurgii, 2007, roč. 86, č. 12, s. 635-641. ISSN 0035-9351. (Přehled).
- **Oliverius, M.**, Kočík, M., Kieslichová, E., Poulová, P. Použití lokálního hemostatika Tachosil v resekcční chirurgii jater. Medical Tribune, 2007, roč. 3, č. 25, s. III-IV. ISSN 1214-8911. Tematická příloha - Moderní technologie a trendy v medicíně. (Přehled).
- Gürlich, R., Sixta, B., Drastich, P., Beneš, M., Čermák, J., **Oliverius, M.**, Šváb, J. Laparoskopická rektopexe. Rozhledy v chirurgii, 2006, roč. 85, č. 5, s. 233-235. ISSN 0035-9351. (Původní sdělení).
- Gürlich, R., Sixta, B., **Oliverius, M.** Plánované laparoskopické výkony v klinické praxi. Časopis lékařů českých, 2006, roč. 145, č. 3, s. 195-200. ISSN 0008-7335. (Přehled).
- Kudla, M., Baláž, P., Sixta, B., **Oliverius, M.** Endoskopická transgastrická drenáž pseudocysty pankreatu jako příčina pozdní perforace střeva. Rozhledy v chirurgii, 2006, roč. 85, č. 6, s. 290-292. ISSN 0035-9351. (Kazuistika).
- **Oliverius, M.** Ke článku Diagnostický přístup k hepatocelulárnímu karcinomu. Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie, 2006, roč. 60, č. 6, s. 246-247. ISSN 1213-323X. Komentář ke článku na s. 239-245. - (Přehled).
- Gürlich, R., Cibulka, D., Babjuk, M., **Oliverius, M.**, Pešková, M., Svárovský, J., Novotný, J., Mareš, P. Exenterační výkony v pánvi. Rozhledy v chirurgii, 2005, roč. 48, č. 8, s. 403-409. ISSN 0035-9351. (Původní sdělení).

- Gürlich, R., Novotný, J., Stříž, I., Honsová, E., **Oliverius, M.**, Janoušek, L., Pokorná, E., Maruna, P. Riziko vzniku malignity po orgánové transplantaci. Časopis lékařů českých, 2005, roč. 144, č. 9, s. 597-600. ISSN 0008-7335. (Přehled).
- Gürlich, R., Sixta, B., **Oliverius, M.**, Kment, M., Rusina, R., Špičák, J., Šváb, J. Laparoskopická distální resekce pankreatu. Rozhledy v chirurgii, 2005, roč. 84, č. 9, s. 463-465. ISSN 0035-9351. (Kazuistika).
- **Oliverius, M.**, Studeník, P. Transplantace jater pro hepatocelulární karcinom v České republice. Folia gastroenterologica et hepatologica, 2005, roč. 3, č. suppl. 1, s. S69-S77. ISSN 1214-4088. (Přehled).
- **Oliverius, M.**, Taimr, P., Špičák, J. Empirická antibiotická léčba infekcí žlučových cest Cefoperazonem. Bulletin HPB Chirurgie, 2005, roč. 13, č. 2, s. 35-38. ISSN 1210-6755. (Přehled).
- Malíková, H., Weichet, J., Vymazal, J., Balák, J., Drugová, B., Mareš, K., **Oliverius, M.** Naše první zkušenosti s magneticko-rezonanční cholangiopankreatikografií. Časopis lékařů českých, 2003, roč. 142, č. 11, s. 656-660. ISSN 0008-7335.
- **Oliverius, M.**, Wohl, R. Adenokarcinom tenkého střeva. Rozhledy v chirurgii, 2003, roč. 82, č. 10, s. 529-532. ISSN 0035-9351.
- Visokai, V., Lipská, L., **Oliverius, M.**, Dutka, J. Komplikace chirurgické léčby chronické pankreatitidy. Bulletin HPB Chirurgie, 2001, roč. 9, č. 4, s. 120-123. ISSN 1210-6755. Předneseno na: Chronická Pankreatitida. Pankreatický klub, Brno 20.4.2001. (Přehled).
- Visokai, V., Bergmann, P., Lipská, L., **Oliverius, M.**, Dutka, J. Centrální trisegmentektomie jater pro metastázu kolorektálního karcinomu. Rozhl.Chir., 1998, roč. 77, č.6, s.279-283. ISSN 0035-9351.
- Visokai, V., Lipská, L., Dutka, J., Sixta, B., **Oliverius, M.**, Pavlíčková, V. Limitované jaterní resekce při metastatickém postižení u kolorektálního karcinomu. Rozhl.Chir., 1996, roč. 75, č.3, s.139-142. ISSN 0035-9951

- **Oliverius, M.**, Gürlich, R. Zpráva z VI. světového kongresu IHPBA. Bulletin HPB Chirurgie, 2005, roč. 13, č. 1, s. 28. ISSN 1210-6755.

6.7 Monografie CZ

- Trunečka, P., Adamec, M., Lake, JR., Filip, K., Šafka, V., Lata, J., Fraňková, S., Šperl, J., **Oliverius, M.**, Kieslichová, E., Ročeň, M., Trotter, JF., Kerkar, N., Emre, S., Janoušek, L., Špičák, J., Drastich, P., Gottfriedová, H., Honsová, E., Filipová, H., Kautznerová, D., Novotný, J., Fendrych, P., Peregrin, J., Cindr, J., Červinková, Z. Transplantace jater. 1. vyd. Praha : Karolinum. 2009. 290 s. ISBN 978-80-246-1671-1. (Monografie).

6.8 Kapitola v monografii CZ

- **Oliverius, M.**, Novotný, J. Hepatocelulární karcinom a cholangiokarcinom jater (HCC). In: Novotný, J., Vítek, P., Petruželka, L. Klinická a radiační onkologie pro praxi. Praha : Triton, 2005, s. 90-99. ISBN 80-7254-736-4. (Kapitola v monografii).
- **Oliverius, M.**, Novotný, J. Karcinom žlučníku a extrahepatálních žlučových cest. In: Novotný, J., Vítek, P., Petruželka, L. Klinická a radiační onkologie pro praxi. Praha : Triton, 2005, s. 100-108. ISBN 80-7254-736-4. (Kapitola v monografii).

6.9 Kapitola ve sborníku CZ

- **Oliverius, M.** Nádory jater a možnosti transplantační léčby. In: Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie. 2005, roč. 59, č. 5, s. 246-248. ISSN 1213-323X. Přednášky, volná sdělení, postery. - (Přehled).
- Visokai, V., Lipská, L., Bergmann, P., **Oliverius M.** Postavení lymfadenektomie a její rozsah v léčbě kolorektálního karcinomu. 21. Evropský kongres International College of Surgeons a 4. kongres ČLS J.E. Purkyně. Praha, CZ, 2.-4.6.1999. In:

XXI. evropský kongres International College of Surgeons. 1. vyd. Praha : Galén,
1999, s. 177. ISBN 80-86257-06-1.