

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Doktorský studijní program

Chirurgie

Použití hepatocytů v léčbě akutního jaterního selhání v experimentu

- na velkém laboratorním zvířeti

MUDr. Tomáš Pantoflíček

školitel: doc. MUDr. Karel Šmejkal, CSc.

školitel konzultant: prof. MUDr. Zuzana Červinková, CSc

Hradec Králové, 2011

Obhajoba dne:

Obsah:

1. Prohlášení autora	5
2. Poděkování	6
3. Seznam Zkratek	7
4. Souhrn	8
5. Cíl práce	10
6. Úvod	11
6.1. Úvod do problematiky	11
6.2. Akutní jaterní selhání	11
6.3. Léčba akutního jaterního selhání	13
6.4. Eliminační metody léčby jaterního selhání	14
6.5. Bioeliminační metody léčby jaterního selhání	16
6.6. Komponenty BAL systémů	18
6.6.1. Zdroje hepatocytů	18
6.6.2. Membrány	19
6.6.3. Konstrukce Bioreaktoru	20
6.7. Modely akutního jaterního selhání	27
7. Metodika	31
7.1. Model akutního jaterního selhání	31
7.2. Izolace hepatocytů, plnění bioreaktoru	36

7.3. Pooperační péče a monitorace	42
7.4. Sledování hemodynamických parametrů	43
7.5. Terapie BAL	43
8. Materiál	47
9. Výsledky	49
10. Diskuze	66
10.1. Model akutního jaterního selhání	66
10.2. Izolace hepatocytů	68
10.3. BAL	69
10.4. Pooperační monitorace a léčba	69
11. Závěr	72
12. Seznam Vyobrazení a tabulek	73
13. Literatura (dle ČSN ISO 690):	77

Prohlášení autora

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 4.4.2011

Poděkování

Na práci spolupracovali MUDr. Eva Kieslichová, MUDr. Eva Lásziková, MUDr. Ondřej Ryska, MUDr. Josef Pražák, MUDr. Eva Koblihová, MUDr. Ekaterina Tcherentsová, pod vedením prof. MUDr. Miroslava Rysky, CSc.

Práci by nebylo možné provést bez technické pomoci Jiřího Čápa, Miroslava Hmiráka a Zuzany Šimůnkové. Za statistické zhodnocení získaných dat děkuji paní RNDr. Jeleně Skibové. V nácviku izolace hepatocytů jsem velmi ocenil významnou pomoc paní prof. MUDr. Z. Červinkové, CSc. a jejího týmu, z LF UK v Hradci Králové.

Práce byla uskutečněna s podporou výzkumného centra LN00A065 - Centrum buněčné terapie a tkáňových náhrad.

Všem mým zmíněným spolupracovníkům, mým školitelům doc. MUDr. Karlu Šmejkalovi CSc. a prof. MUDr. Zuzaně Červinkové, CSc a dále prof. MUDr. Miroslavu Ryskovi, CSc. patří veliké poděkování za jejich odbornou i osobní pomoc při tvoření této práce.

Seznam Zkratek

APACHE II score: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II

ASJ (ALF): Akutní selhání jater

BAL: Bioartificial liver (bioarteficiální játra)

BLSS: Bioartificial liver support system

CI: Srdeční index

CO: Srdeční výdej

CVP: Centrální venózní tlak

ELAD: Extracorporeal liver assist device.

ETCO₂: end-tidal CO₂

FPASA: Fractionated plasma separation and adsorption

HAL: Podvaz hepatické arterie

HALSS: Hybrid artificial liver support system

HBAL: hybrid bioartificial liver

HA: Jaterní tepna

HAL: Podvaz jaterní tepny

HEP: Hepatektomie

ICP: Intrakraniální tlak

JFT: Jaterní funkční testy

KF: Koagulační faktory

LSS: Liver support system

MAP: Střední arteriální tlak

MARS: molecular adsorbent recirculating system

MELS: Modular extracorporeal liver support

MPAP: Střední tlak v plicnici

PCA: Portokavální anastomóza

PCWP: Tlak v zaklínění

RFB: Radial flow bioreactor

SD: směrodatná odchylka

SVRI: Indexovaná systémová cévní rezistence

VCI: Dolní dutá žíla

VP: Portální žíla

Souhrn

Úvod: Biologické eliminační metody by mohly efektivně pomoci léčit nemocné s akutním selháním jater (ASJ) v době, než dojde ke spontánní regeneraci jaterního parenchymu či po dobu kdy čekají na transplantaci.

Cíl: Zhodnotit účinek biologické eliminační metody – perfuzi plazmy přes izolované živé hepatocyty (BAL) u akutního selhání jater v experimentu na minipraseti.

Metodika: U 10 miniprasat byl proveden chirurgický model ASJ technikou devaskularizace (portokavální anastomóza, ligace hepatické tepny). Tato zvířata jsme následně léčili pomocí bioreaktoru BAL. Průběh ASJ jsme monitorovali prostřednictvím laboratorních a hemodynamických parametrů včetně intrakraniálního tlaku. Výsledky jsme porovnali s kontrolní skupinou miniprasat s ASJ bez léčby.

Výsledky: Při srovnání léčené a neléčené skupiny jsme pozorovali rozdíl pouze v sérových koncentracích bilirubinu. Rozdíl hodnot v 6. a 9. hodině je statisticky významný ($p < 0,01$) ve prospěch skupiny BAL (20,86 vs. 10,60, 22,29 vs. 11,75), rozdíl hodnot ve 12. hodině je též statisticky významný (37,4 vs. 12,88) při $p < 0,01$. Hodnoty ICP ve skupině léčené BAL a ve skupině kontrolní se v průběhu experimentu statisticky významně nelišily.

Závěr: Prokázali jsme funkčnost zapojení bioeliminační metody (BAL) u námi vytvořeného chirurgického modelu ASJ. Dosáhli jsme iniciační 85% viability čerstvých izolovaných prasečích hepatocytů a jejich přežívání po celou dobu, kdy byl bioreaktor použit k léčbě. Vyjma koncentrace bilirubinu naše výsledky neprokázaly signifikantní změny hodnot laboratorních ukazatelů ASJ. Naměřené hodnoty nitrolebního tlaku se statisticky významně nelišily ve skupině s léčbou akutního selhání jater napojením na BAL a v kontrolní skupině.

Klíčová slova: akutní jaterní selhání - miniprase - BAL - bioreaktor - hepatocyty - intrakraniální tlak

Summary

Bioartificial liver in the treatment of experimental acute hepatic failure in a large laboratory animal

Aim: To evaluate bioartificial liver (BAL) in the treatment of acute liver failure in the experiment.

Methods: 10 minipigs weight 25 – 30 kilograms with experimental acute liver failure (ALF) by surgical devascularization with portocaval by-pass were treated by BAL. The biochemical and hemodynamical parameters of ALF including intracranial pressure (ICP) were measured. The results were compared to control group without BAL treatment.

Results: To compare plasma bilirubin there was statistically significant difference between experimental and control groups in 6th and 9th hours to favourite BAL group of minipigs (20,86 vs. 10,60, 22.29 vs. 11,75) and in the 12th hour (37,4 vs. 12,88). The value of ICP in both groups was not significant.

Conclusion: The functionality of BAL on our own surgical model of ALF was proven. Initial 85 % viability of fresh isolated porcine hepatocytes and their survival in the time of BAL treatment was reached. Bilirubin plasma concentration has significantly changed in comparison in both groups. ICP values were not changed significantly.

Key words: acute liver failure - minipig - bioartificial liver - BAL - Bioreactor - hepatocytes - intracranial pressure

Cíl práce

Hlavní cíl:

Zhodnotit účinek biologické eliminační metody – perfuzi plazmy přes izolované živé hepatocyty (BAL) u akutního selhání jater v experimentu na minipraseti.

Vedlejší cíle:

1. Vytvořit model akutního jaterního selhání na laboratorním zvířeti - praseti, vhodný k testování biologické eliminační metody.
2. Zvládnutí náviku izolace hepatocytů a plnění bioreaktoru (kapsle).
3. Zvládnutí napojení zvířete na eliminační metodu a provedení vlastní bioeliminace.

6. Úvod

6.1. Úvod do problematiky

Akutní selhání jater (ASJ) je velmi závažné onemocnění s vysokou mortalitou. ASJ je charakterizováno rychlým výpadkem jaterních funkcí s rozvojem ikteru, koagulopatie a encefalopatie¹. Onemocnění dále progreduje až do multiorgánového selhání. Při konzervativní terapii dosahuje přežití vzhledem k výskytu fatálních infekčních komplikací pouhých 10 – 40 %². Jedinou současnou metodou, která zlepšuje přežití je ortotopická transplantace jater. Akutní provedení tohoto výkonu však naráží na nedostatek kadaverózních jaterních štěpů. V době, po kterou pacient čeká na vhodného dárce jaterního štěpu či po kterou může dojít nebo dochází ke spontánní regeneraci jaterního parenchymu, je pacient stále akutně ohrožen na životě. Současné možnosti, jak pacienta přes toto období převést (tzv. „bridging“), jsou limitovány. V posledních letech proto dochází k rozvoji biologických i nebiologických eliminačních metod, které by umožňovaly efektivnější bridging, a tím zlepšily šanci nemocného s ASJ přežít. Jednou z možností je použití tzv. bioreaktoru - bioartificiálních jater (BAL), která využívají perfuzi plazmy pacienta přes izolované živé hepatocyty. Cílem této práce je popsat účinek metody BAL při léčbě ASJ u velkého laboratorního zvířete.

6.2. Akutní jaterní selhání

Selhání jater definujeme jako chorobný stav, při kterém dochází k významnému zhoršení jaterních funkcí. Mezi jeho projevy patří porucha proteosyntézy s hypalbuminemií, koagulopatií, porucha exkreční fáze - ikterus, a dále porucha detoxifikace^{3, 4}.

Jaterní selhání jako takové v klinice rozdělujeme na hyperakutní, které se projeví do 7 dnů od počátku onemocnění, akutní, které vzniká do 7 - 28 dnů od začátku onemocnění a subakutní vznikající většinou do 3-6 měsíců od počátku onemocnění. Chronickým jaterním selháním označujeme stav trvající déle jak 6 měsíců. Klasifikace selhání jater však není v současné době plně sjednocena^{3, 5, 6}.

Akutní selhání jater, mezi něž se často řadí i hyperakutní selhání jater, je charakterizováno rychlým nástupem jaterní dysfunkce, pro jedince závažné, bez známého předchozího onemocnění jater. Dochází k rychlému rozvoji ikteru, jaterní encefalopatie a koagulopatie. Onemocnění dále progreduje až do multiorgánového selhání. Při konzervativní terapii dosahuje přežití pouhých 10-40%, hlavně z důvodu fatálních infekčních komplikací.

Etiologie ASJ:

ASJ je způsobeno nejčastěji těžce probíhajícím zánětem jater virového původu, otravou hepatotoxickými látkami (léky, toxiny - nejčastěji houby - Amanita phalloides), závažnými poruchami oběhu, které vyústí v nedostatečné zásobení jater krví a kyslíkem, nebo uzávěry cév, zásobujících jaterní parenchym ⁷ (Tab. 1).

Infekce	virové hepatitidy A, B, C, D, E, Herpes simplex virus, Epstein - Barr virus, CMV, paramyxovirus, influenza virus B.
Léky	acetaminofen (paracetamol), halotan, isoniazid, valproát, rifampicin, phenytoin, amiodaron, disulfiram, 3,4 metylendioxyamfetamin, nesteroidní antirevmatika, acylpyrin (Reyův syndrom).
Toxiny	amanita phalloides, organická rozpouštědla (tetrachlormetan), bakteriální toxiny (Bacillus cereus), žlutý fosfor, aflatoxin, drogy (Ecstasy).
Kardiovaskulární příčiny	trombóza portální žíly, srdeční tamponáda, pravostranné srdeční selhání, Budd - Chiari syndrom, venookluzivní nemoc, syndrom přehřátí, šok.
Metabolické příčiny	m. Wilson, hereditární tyrosinémie, Alfa-1-antitrypsin deficiencie, intolerance fruktózy, galaktosémie, neonatální hemochromatóza.
Gravidita	akutní steatóza jater v těhotenství, HELLP syndrom.
Nádory	lymfomy, metastatické poškození jater při ca prsu, plic, maligním melanomu, aj.
Jiné příčiny	autoimunitní hepatitis, primární afunkce štěpu po transplantaci jater.
Kryptogenní	

Tabulka 1: Etiologie ASJ (Trunečka⁸)

6.3. Léčba akutního jaterního selhání

V současné době neexistuje až na výjimky (otrava paracetamolem a muchomůrkou zelenou) specifická léčba ASJ a pacient vyžaduje interdisciplinární intenzivní péči. Symptomatická terapie zahrnuje: udržování vnitřního prostředí a nutričního stavu pacienta, sledování a úpravu kardiovaskulárních parametrů a plicní ventilace, monitorování intrakraniálního tlaku, profylaxi a léčbu edému mozku, profylaktické podávání antibiotik a antimykotik, použití eliminačních metod.

Jedinou kurativní metodou, která umožňuje přežití pacientů s ASJ je transplantace jater. Ojedinele se vyskytují kazuistiky^{9, 10} použití heterotopické - auxiliární transplantace jater, v současné době však s naprostou převahou dominuje technika ortotopické transplantace jater. Léčba ASJ pomocí transplantace jater se však potýká s nedostatkem kadaverozních jaterních štěpů a vzhledem k rychlému průběhu akutního selhání jater se pacient této léčby nemusí dočkat. V době, kdy pacient čeká na vhodný orgán - játra k transplantaci, je stále akutně ohrožen na životě. Možnosti, jak nemocného přes toto období převést (tzv. "bridging") jsou však v současné době značně limitovány. Indikace k transplantaci jater pro akutní selhání jater má několik důležitých aspektů. Jednak je nutné rychle identifikovat pacienty, u kterých se ASJ rozvíjí s vysokou pravděpodobností úmrtí při konzervativní terapii. Důležité je tento proces identifikace zvládnout včas, aby pacient do transplantace jater nevstupoval v době fatálního zhoršení stavu. Na druhé straně je neméně důležité zabránit zbytečné transplantaci jater u pacienta, který má vysokou naději na spontánní regeneraci jaterního parenchymu při konzervativní léčbě. Na závěr je nutné zmínit snahu zabránit transplantaci jater u pacienta s pravděpodobností špatného průběhu potransplantační léčby¹¹.

K určení letální prognózy spontánního průběhu akutního selhání jater slouží takzvaná "King's College kriteria" (Tab. 2.). Jejich predikční hodnota je vysoká, u pacientů s intoxikací paracetamolem při $\text{pH} < 7,3$ je 96%. U ASJ jiné etiologie, při $\text{INR} > 6,5$, dosahuje 100% predikability letálního vývoje při konzervativní terapii⁶.

Příčina selhání	Kriterium
Intoxikace paracetamolem	pH < 7,3 nebo INR > 6,5 a kreatinin > 300 μ mol/l u nemoných s encefalopatií III. a IV. st
Ostatní příčiny	INR > 6,5 nebo 3 z následujících kriterií: a) věk < 11 nebo > 40 let b) Jaterní selhání při non-A, non-B hepatidě, halotanové hep., idiosynkratické lékové reakci. c) Ikterus předcházející o týden jaterní encefalopatii d) INR > 3,5 e) Bilirubin > 300 μ mol/l

Tabulka 2: „King s College Criteria“.

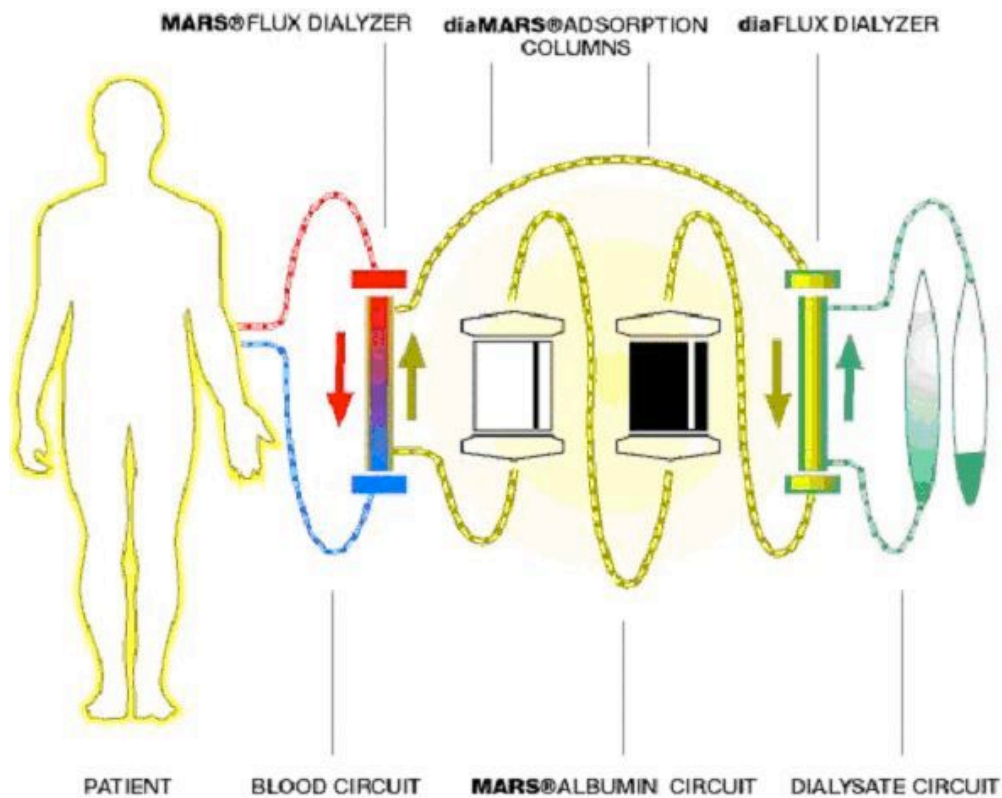
K určování mortality akutního jaterního selhání se používají i další skorovací systémy. Jako druhý nejpoužívanější je též APACHE II score ("Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II")¹², který má podobně velkou senzitivitu v určování prognózy u nemocných s ASJ¹³.

6.4. Eliminační metody léčby jaterního selhání

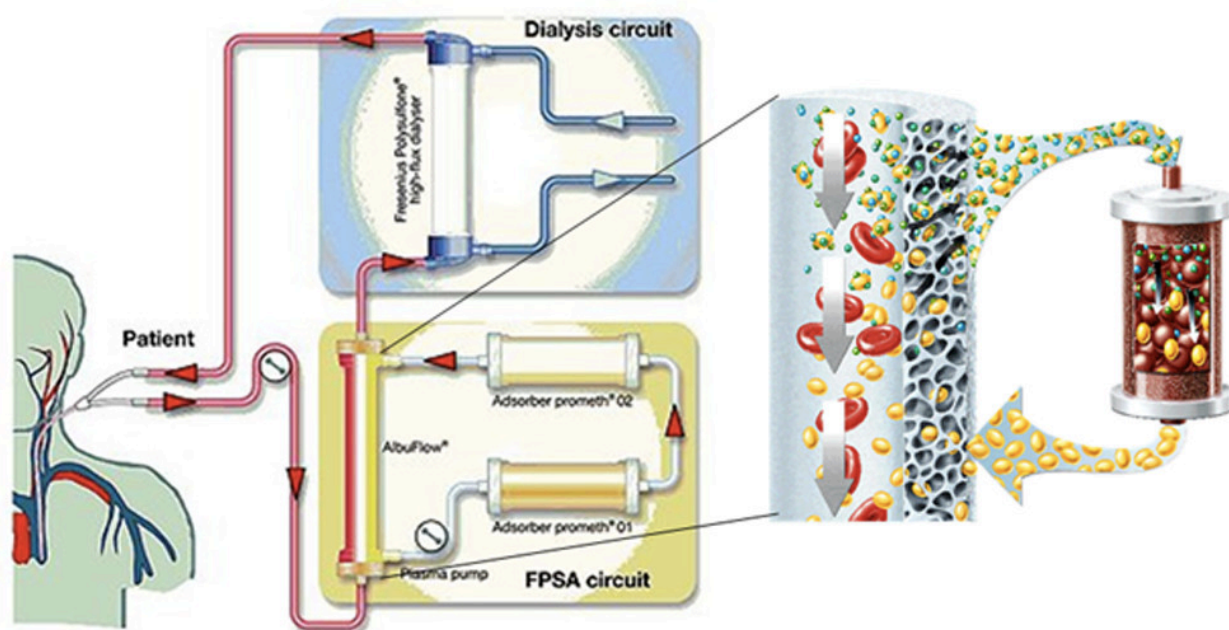
Za poslední desítky let byla zkonstruována a používána řada eliminačních přístrojů. Od prosté hemodialýzy, výměnné krevní transfuze, plazmaferézy, hemoperfuze pomocí aktivního uhlí, až po současné sofistikované nebiologické eliminační metody.

Z těchto nebiologických metod našel uplatnění v 90. letech minulého století systém MARS® (molecular adsorbent recirculating system – molekulární adsorbující recirkulární systém)^{14, 15} (Obr. 1). Nověji se však začaly uplatňovat přístroje na bázi FPSA (fractionated plasma separation and adsorption)¹⁶ (Obr. 2). Tento přístroj umožňuje eliminovat toxické substance rozpuštěné ve vodě, ale i toxiny vázané na albumin. Přístroj se skládá z dialyzačního přístroje rozšířeného o modul pro frakcionovanou plazmatickou separaci albuminovým filtrem a dvěma adsorbery. Albumin s vázanými toxiny je přímo

transportován na místo, kde jsou toxiny odstraněny. Proto není potřeba lidského albuminu a proces není limitován disociací z albuminu a difúzí tak, jak je tomu u předchozího nebiologického podpůrného přístroje MARS® vyvinutého Stangem a Mitznerem na začátku 90. let minulého století ¹⁴.



Obrázek 1: Schema systému MARS (zdroj: Teraklin®)



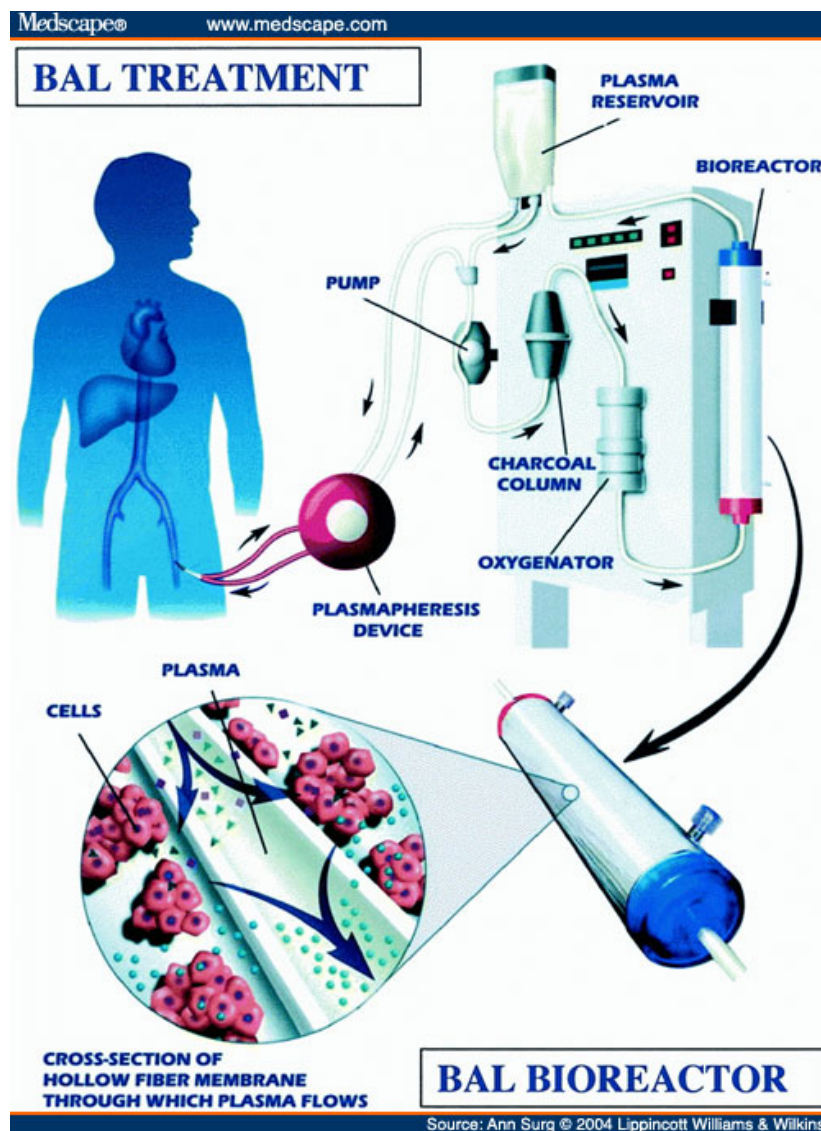
Obrázek 2: Schéma systému FPSA - Prometheus® (zdroj: Fresenius®)

6.5. Bioeliminační metody léčby jaterního selhání

V průběhu vývoje a používání nebiologických eliminačních metod byla zkoušena a testována řada bioeliminačních metod, tedy metod, kde do eliminačního procesu zapojujeme živé buňky, či celé tkáně.

Ideální bioeliminační systém by měl nahradit všechny základní funkce jater: syntetické a metabolické funkce, detoxifikaci a exkreci. Práce na vývoji "umělých jater" započaly v padesátých letech minulého století, kdy se prováděli experimenty spíše s prvními eliminačními metodami a výzkum byl zaměřen hlavně na detoxifikaci. Postupem času se zapojovaly extrakorporální perfuze jater jednak xenogenních, zvířecích či allogenních, humánních dárců. Vzhledem k tomu, že jaterní buňku a její složitou funkci nemůžeme nahradit umělou strukturou, vyvíjejí se systémy "bioarteficiální". Jedná se o systémy zahrnující většinou extrakorporální okruh - kompartment plazmafiltrace, hemofiltrace s kompartmentem buněčným, biologickým. Zpočátku se prováděly testy s různými plátky jater, mraženými granuláty, posléze se v sedmdesátých letech výzkum plně orientoval na použití suspenze izolovaných hepatocytů. Jeden z prvních funkčních systémů sestrojil ve Spojených Státech Amerických Matsumura v roce 1973. Prvního klinického užití bioarteficiální játra doznala však až v roce 1987¹⁷.

Pro tyto systémy se v poslední době vžil název BAL (Bioartificial liver device) či Bioreaktor. Většina systémů se v současnosti skládá s třídímní kapsle, zapojené do okruhu extrakorporálního systému s plazmafiltrací, hemofiltrací a integrovaným oxygenátorem (Obr. 3). BAL systémy jsou v současnosti používány jednak v experimentální medicíně, ale i v klinické praxi ¹⁸⁻²⁶.



obrázek 3: schematické zapojení BAL systému (zdroj: medscape.com)

Základním principem BAL systémů je tedy perfuze plazmy přes izolované živé hepatocyty uložené ve speciální kapsli, což umožňuje nejen detoxifikační, ale i syntetickou funkci celého systému.

BAL systém musí splňovat 2 základní funkce:

1. biochemickou funkci - náhrada detoxifikačních a syntetických funkcí hepatocytů
2. mechanickou funkci
 - a. zabránit imunitní reakci organismu na použité buněčné struktury BAL systému a PERV infekci
 - b. zajišťovat dostatečnou výživu buněk BAL systému, jejich dostatečnou oxygenaci.

6.6. Komponenty BAL systémů

6.6.1. Zdroje hepatocytů

Jaterní buňka - hepatocyt - je základní součástí BAL systémů. Ideálně by buňky měly být lidského původu, snadno dostupné, rychle a lehce pěstovatelné, nemaligní, zachovávající si řádově dny vysoce diferencované funkce a možnost vykonávat všechny funkce jaterních hepatocytů. V současné době však buňka, která by splňovala všechny tyto požadavky s důrazem kladeným na rychlou dostupnost ve velkém množství neexistuje.

Používají se nejčastěji následující 4 zdroje hepatocytů:

Prasečí hepatocyty.

Nejčastěji se používají k plnění bioreaktoru prasečí (porcinní) buňky hlavně z důvodu lehké dostupnosti čerstvých buněk v dostatečném množství²⁷, jejich problémem však stále zůstává možnost přenosu virové infekce (PERV - prasečí retrovirus), mezidruhové rozdíly v syntetizovaných bílkovinách, v aktivitě cytochromu P450 a související funkčnost a imunogenicita²⁷⁻²⁹.

Primární lidské hepatocyty

Lidské hepatocyty jsou sice ideální buňkou použitelnou v BAL systémech, avšak jsou hůře dostupné. Jejich zdrojem bývají játra nepoužitelná k transplantaci jater, nejčastěji z důvodu vysoké steatózy a peroperační resekáty. Dostupnost lidských hepatocytů se však stále více snižuje (z důvodu ubývání lidských jater nevyužitelných k transplantaci).

V primárních kulturách však hepatocyty rostou pomalu, rychle se dediferencují a ztrácejí tudíž svoji schopnost náhrady funkcí jater³⁰.

Immortalizované hepatocyty (nesmrtelné, transformované)

Transformované buněčné linie se dobře, rychle a v dostatečném množství kultivují³¹. Jejich problémem je pozměněný metabolismus, což ovlivňuje jejich funkčnost a hlavně možnost vznikajících klonů s velmi odlišnými charakteristikami, než měla původní linie a též možnost vzniku metastázy nádoru při úniku buňky mimo systém do těla pacienta^{27, 32-38}. K nejvíce používaným buňkám patří buňky lidského hepatoblastomu C3A³⁹.

Kmenové buňky (STEM Cells)

Kmenové buňky jsou nediferencované živočišné buňky, které mají schopnost se dělit (proliferovat) a přeměnit se na jiný buněčný typ (diferencovat). Dělicí potenciál kmenových buněk je obrovský a mohou být zdrojem teoreticky nekonečného množství hepatocytů. Nejčastěji se používají embryonální lidské kmenové buňky, či mezenchymální kmenové buňky. Problémem jejich použití zůstává stále nákladnost a složitost jejich výroby⁴⁰⁻⁴⁶.

6.6.2. Membrány

Membrány plní v bioreaktoru několik důležitých funkcí. Jedním úkolem je podpůrná funkce, kde membrány fyzicky oddělují pacientovu krev, respektive plazmu od hepatocytů. Je samozřejmě nutná určitá propustnost tak, aby byl možný prostup toxických látek ze strany pacienta a látek syntetizovaných hepatocyty zpět. Membrány se odlišují tudíž velikostí těchto porů, která se pohybuje od 10 do 200nm³¹.

Další funkcí membrán je poskytnout hepatocytům podporu, umožnit jim uchycení. S tím souvisí způsob stavby membrán, podle kterého je v základě rozdělujeme na 2D a 3D membrány.

V testování in vivo na velkých laboratorních zvířatech a v klinické praxi se v současnosti nejvíce používá 3D model membrán. 3D stavba membrány je výhodná nejen z důvodu akumulace velké masy hepatocytů na malém prostoru (na rozdíl od 2D modelu), též umožňuje mnohem širší mezibuněčné vazby, zvýšené uvolňování růstového faktoru³⁰. Hepatocyty si díky tomu zachovávají mnohem déle diferencované funkce. 3D membrány bývají syntetizovány z různých polymerů. 3D struktura dále umožňuje mnohem lepší oxygenaci hepatocytů. Nejčastější typ bývá složen ze svazku dutých vláken (hollow fiber) uzavřených do systému tvořící jako celek tzv "kapsli"⁴⁷ (obr. 3).

6.6.3. Konstrukce Bioreaktoru

Kapitole 6.6.2 popisuje základní rozdělení 2D a 3D modelu membrány, respektive celého bioreaktoru. Při stavbě bioreaktoru je nutné si uvědomit, zda bude použit na in-vitro testování, či pro in-vivo použití.

2D model pro použití in vivo bývá nejčastěji systém mnoha kolagenem potažených desek (proto 2D model) s jednovrstevnou kulturou hepatocytů⁴⁸. Nevýhodou tohoto modelu je již sama 2D stavba. Pokud bychom chtěli rozvrstvit do plochy byt' jen 1/10 hepatocytů obsažených v játrech člověka, potřebovali bychom desky o ploše 12,5 m², s obrovskou spotřebou nutného perfuzátu³¹. Je proto logické, že až na výjimky⁴⁹, naprostá většina dnes používaných a konstruovaných bioreaktorů využívá 3D stavbu kapsle s hepatocyty.

Většina bioreaktorů obsahuje 2 kompartmenty, nebo-li oddíly, které jsou od sebe oddělené. V prvním kompartmentu koluje plazma (zřídka přímo krev⁵⁰) pacienta (eventuálně zvířete), druhý kompartment obsahuje hepatocyty. Oba kompartmenty jsou od sebe oddělené membránou. Novější přístroje však obsahují kompartmenty 3 nebo 4^{51, 52}.

V tabulce 3 uvádím přehled typů bioreaktorů použitých na laboratorním zvířeti.

V tabulce 4 jsou uvedeny bioreaktory, které již byly testované klinicky. Obě tabulky zároveň přehledně uvádějí druh použitých buněk.

Technologie	Typ buněk	Odkaz
Bioreaktor na bázi dutých vláken s integrální oxygenací (Gerlach CellModule)	Prasečí hepatocyty	66, 67, 127, 128
Spirální plochá deska a bioreaktor z dutých vláken s integrální oxygenací	Prasečí hepatocyty	110
Plochá deska s integrální oxygenací	Prasečí hepatocyty	49
Renal tubule assist device - Bioreaktor na bázi dutých vláken	Lidské tubulární buňky	111-113

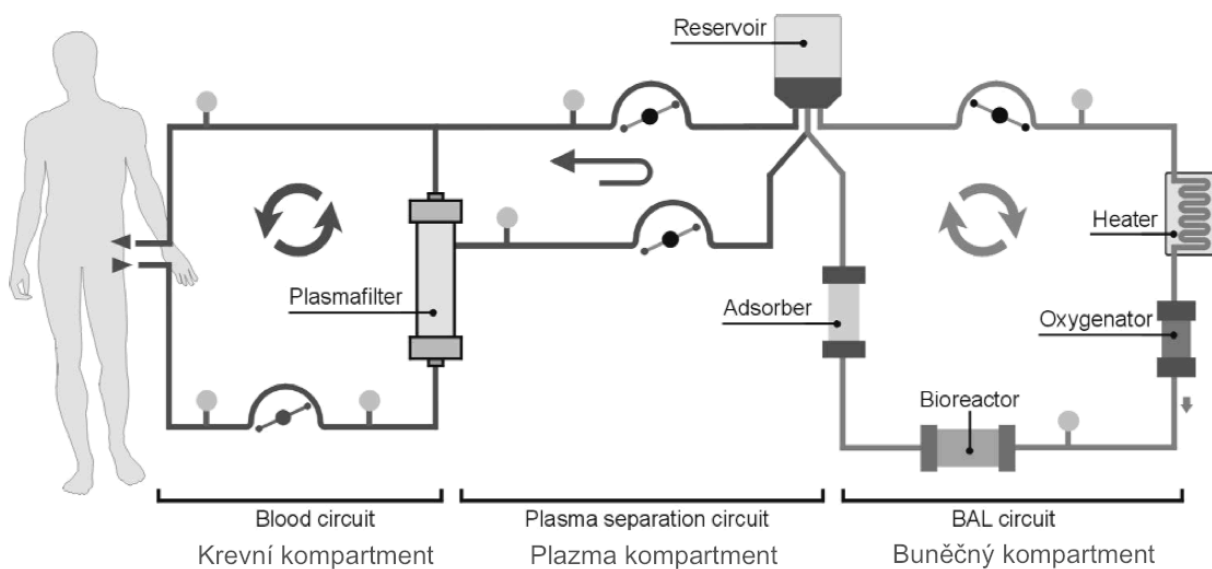
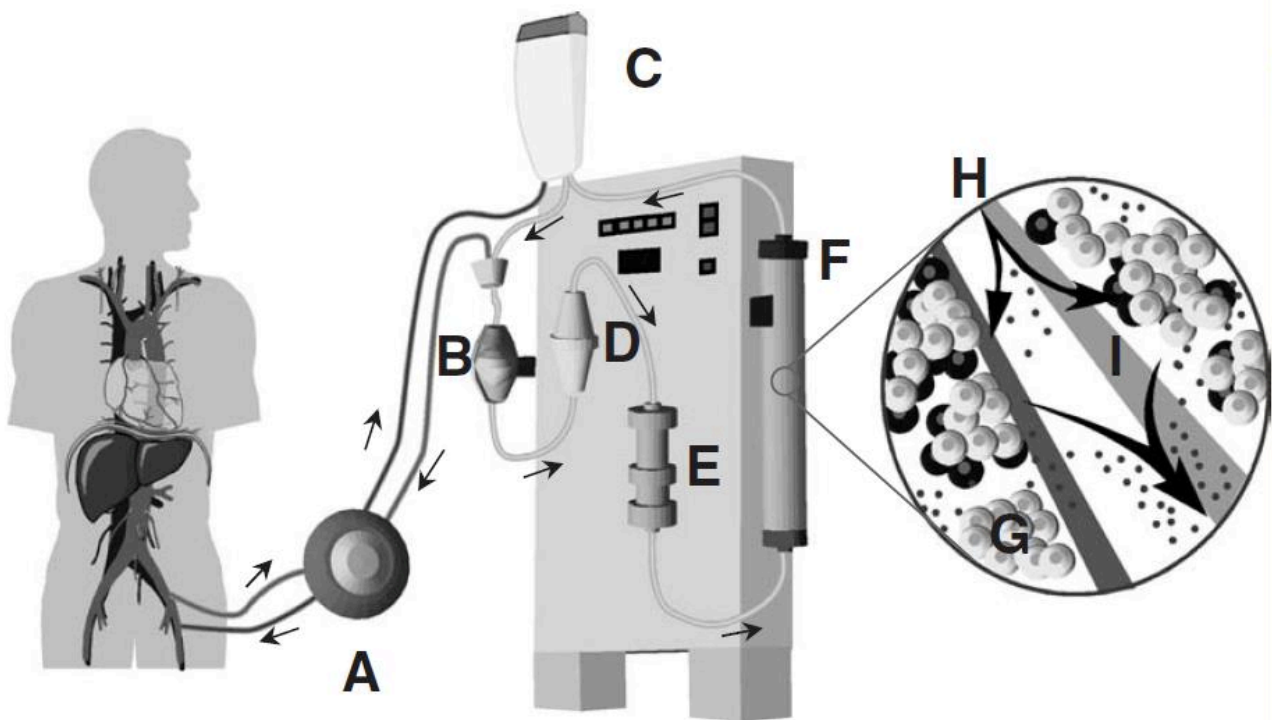
Tabulka 3: Konstrukce bioreaktorů použitých v experimentu na laboratorním zvířeti (upraveno dle Gerlach³⁰)

Technologie	Typ buněk	Odkazy
Bioreaktor na bázi dutých vláken (Vitagen ELAD)	Buňky Hepatoblastomu C3A	64
Bioreaktor na bázi dutých vláken (Circe Biomedical HepatAssist) s hepatocyty vázanými na mikronosiče	Prasečí hepatocyty	65
Renal tubule assist device - Bioreaktor na bázi dutých vláken	Lidské tubulární buňky	111, 112, 123-126
Bioreaktor na bázi dutých vláken perfundován krví (Excorp Medical BLSS)	Prasečí hepatocyty	50
bioreaktor na bázi dutých vláken s integrální oxygenací (CellModule)	Prasečí a lidské hepatocyty	30, 68-72, 120-122
Bioreaktor na bázi dutých vláken (Hep-Art AMC-BAL) s in-situ oxygenací	Prasečí buňky	29, 43, 114-117

Tabulka 4: Konstrukce bioreaktorů použitých v klinických studiích (upraveno dle Gerlach³⁰)

V současné době jsou používány následující bioreaktory:

1. RanD BAL® je dvoukompartimentový bioreaktor, ve kterém oxygenované, nutriční medium (plazma) perfunduje radiálně skrz membránu, na jejíž druhé straně jsou adherovány hepatocyty. Tento bioreaktor obsahuje tedy plazma kompartment a buněčný kompartment⁵³. (Obr. 8)
2. AMC BAL® se odlišuje axiálním průtokem perfuzátu s přidaným 3. kompartmentem, který je tvořen soustavou dutých vláken, které zabezpečují oxygenaci přímo u buněk^{29, 44, 52, 54-59}. (Obr. 6)
3. Arbios HepatAssist®, Excorp BLSS®, Vital Therapies ELAD® jsou systémy podobné RanD BALu, kde plazma, či krev proudí sestavou dutých hydrofilních vláken (1. kompartment) s buňkami adherovanými na vnější straně dutých vláken (2. kompartment)^{50, 60-65}. (Obr. 4,5)
4. MELS BAL® je čtyř kompartimentový bioreaktor, kombinující DetoxModule pro detoxifikaci - albuminovou dialýzu, DialysysModule systém pro kontinuální hemofiltraci a CellModule, systém s hepatocyty pro detoxifikaci a syntézu^{52, 55, 56, 66-72} (Obr. 7)



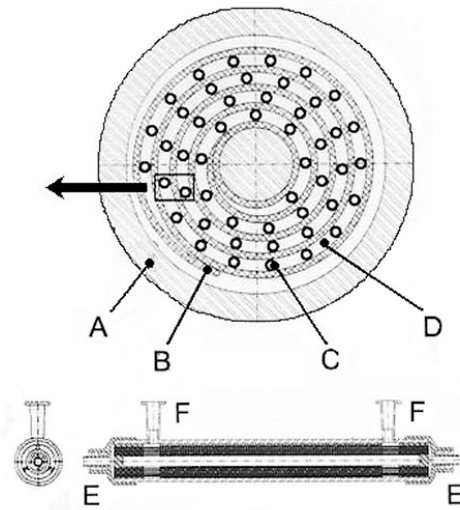
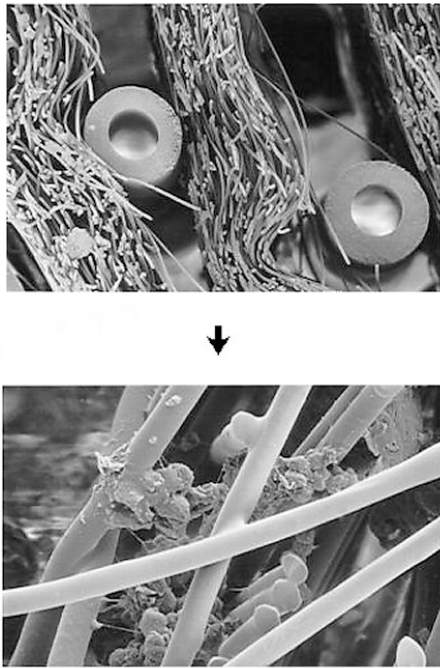
Obrázek 4: schematické znázornění bioreaktoru (zdroj: Demetriou¹⁹):

A - Plazmaferéza
B - Pumpa
C - Plazma rezervoár
D - Adsorber
E - Oxygenátor

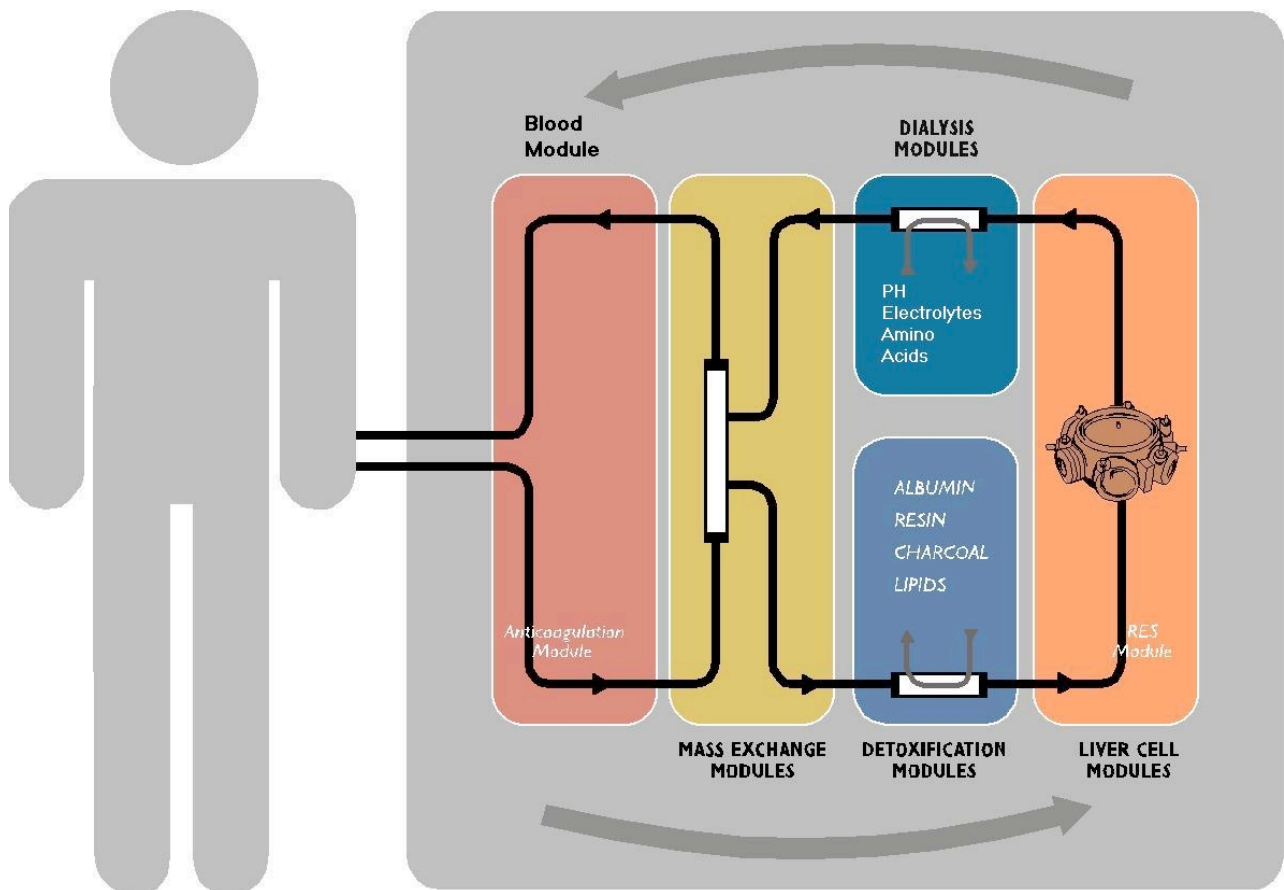
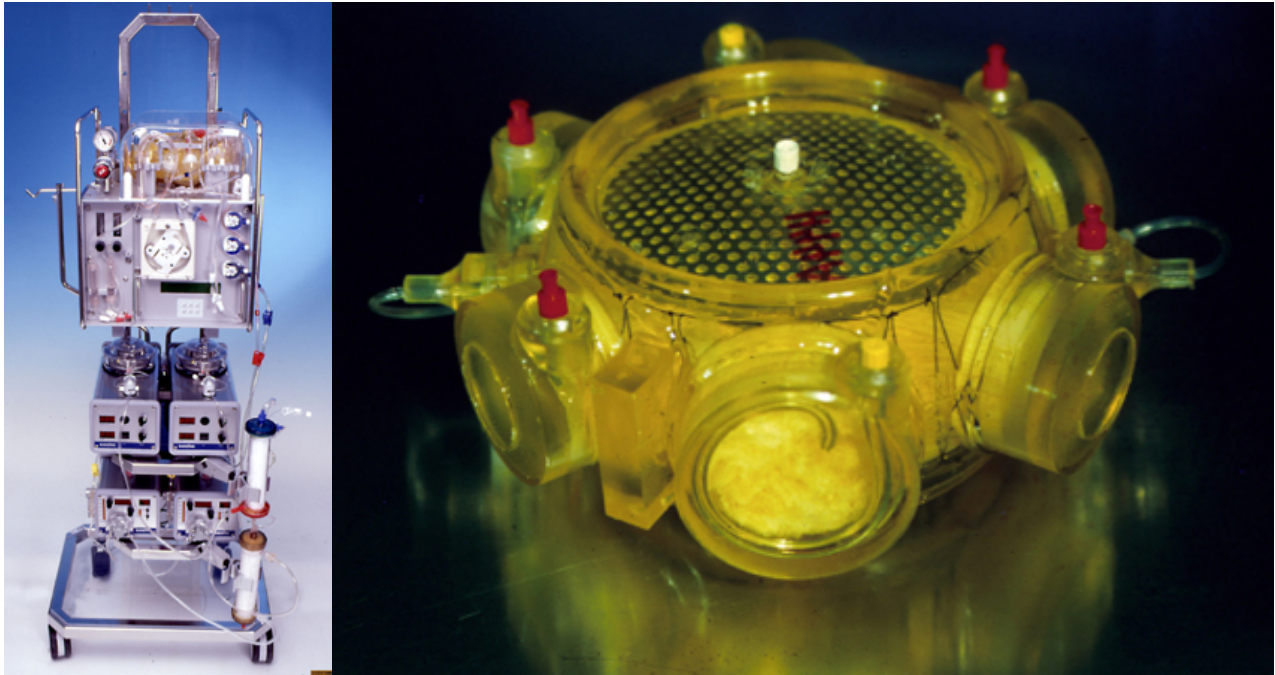
F - kapsle s hepatocyty
G - Hepatocyty
H - Plazma
I - Dutá vlákna (Hollow fiber)



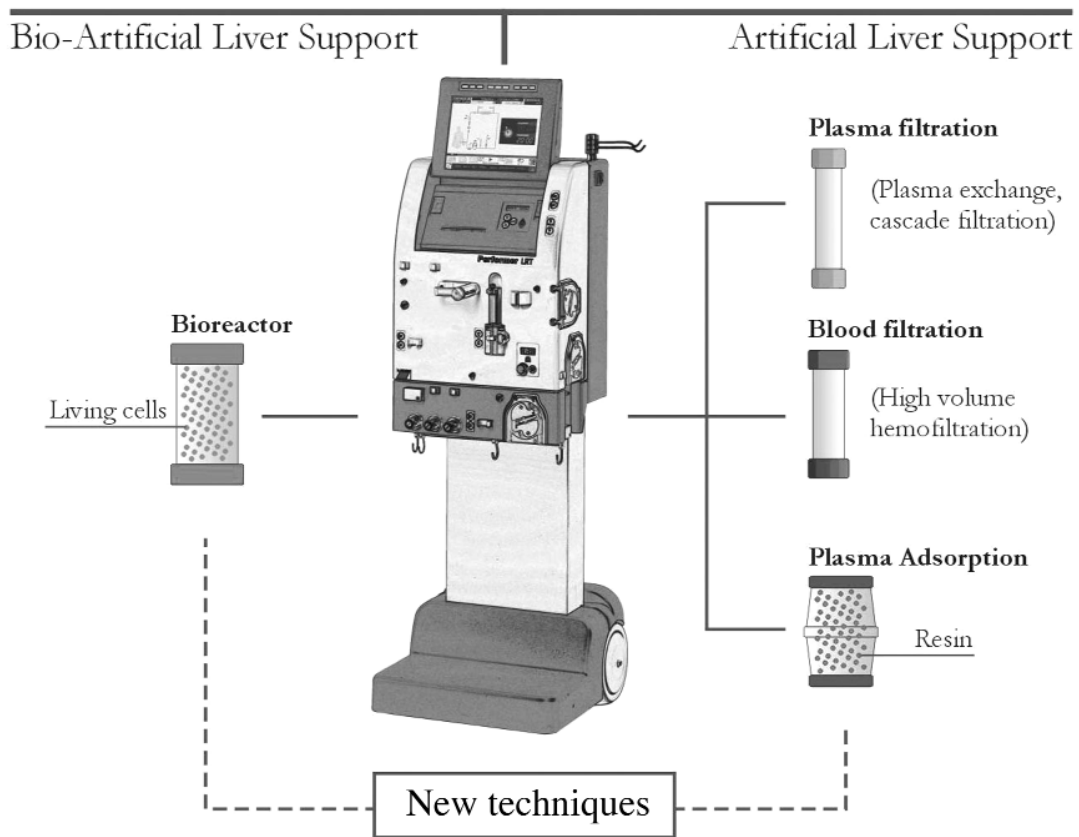
Obrázek 5: Bioreaktor ELAD (zdroj: Vitagen®)



Obrázek 6: Stavba a průřez kapsle bioreaktoru AMC-BAL (zdroj: Hep-Art®)



Obrázek 7: Bioreaktor Modular Extracorporeal Liver System - MELS® (zdroj: Charité Berlin)



Obrázek 8: Bioreaktor Performer OLiver (zdroj: Rand®)

6.7. Modely akutního jaterního selhání

Experimentální model akutního jaterního selhání je nutný k lepšímu pochopení patofyziologie onemocnění a k testování jednotlivých metod léčby ASJ. Kriteria pro ideální model ASJ jsou následující ⁷³:

- 1) Indukované selhání jater by mělo být reverzibilní
- 2) Model musí být reprodukovatelný
- 3) Poškození jater by mělo vést ke smrti zvířete identicky jako v klinice
- 4) Musí být vytvořeno dostatečně velké terapeutické okno
- 5) Případné použití toxinů nesmí představovat riziko pro personál

Dle typu provedení lze modely ASJ rozdělit na chemické a chirurgické. K vytvoření chemického modelu ASJ byla vyzkoušena celá řada látek: thioacetamid, nitrosaminy, halogenová anestetika ⁷⁴. Posledních 30 let však naprosto jednoznačně převládá použití galaktosaminu nebo acetoaminofenu. Příklady některých chemických modelů použitých u velkého laboratorního zvířete a jejich výhody či nevýhody shrnují tabulky 5 a 6.

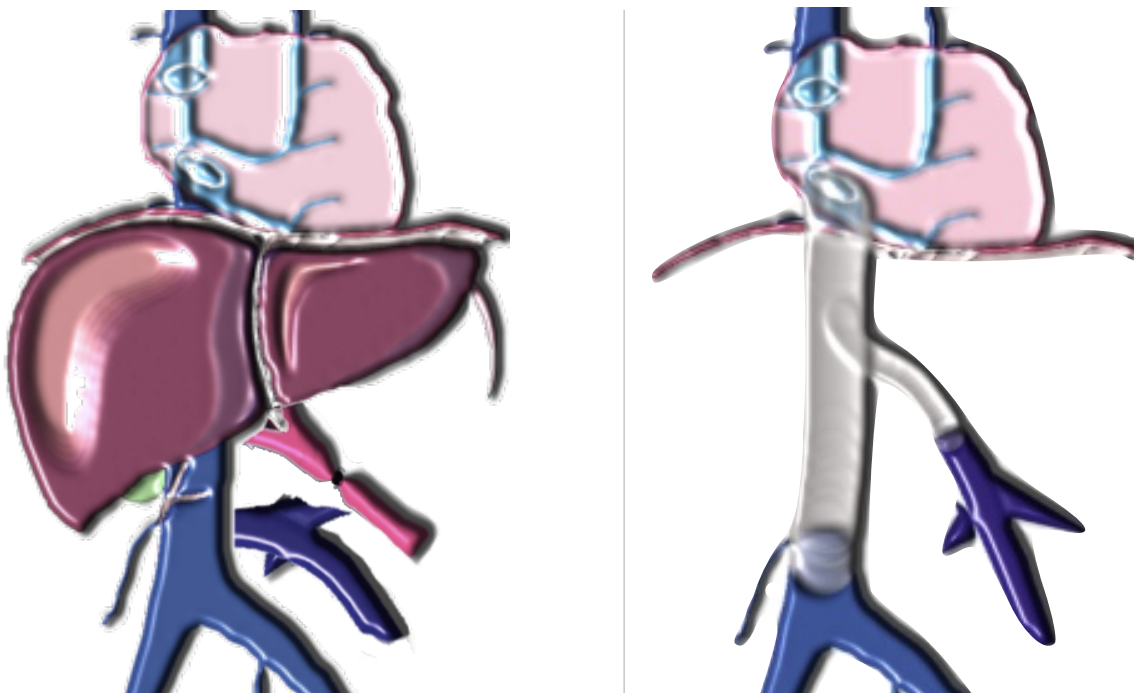
Autor	Kalpana ⁸⁴	Henne-Bruns ¹¹⁸	Miller ⁸⁵
druh zvířete	prase	kříženecké prase	prase
počet	14	12	54
hmotnost (kg)	8-15	10-17	15-25
látka	galaktosamin	acetaminofen	acetaminofen
dávka	1,0 g/kg	0,5-2,0 g/kg	1,1 g/kg
potvrzení ASJ	hypoglykemie, JFT, kratinin, biopsie	JFT, krevní plyny, biopsie	JFT, biopsie,
přežití	77-86h	58,3% zemřelo do 4,8h*	9,02-18,7h*

Tabulka 5: Chemické modely ASJ
(JFT – jaterní funkční testy, * neprokázán hepatotoxický účinek)

Galaktosamin	negativa	pozitiva
	interakce s halothanem chybí klinický ekvivalent vysoké náklady	reversibilita předpokládané účinky
Acetaminofen	negativa	pozitiva
	špatná reprodukovatelnost nestálé terapeutické okno vedlejší účinky nevysvětlený pokles hematokritu	reversibilita klinická podobnost

Tabulka 6: Výhody a nevýhody chemických metod ASJ ⁷³.

U **chirurgických** modelů ASJ můžeme použít v zásadě dva možné přístupy. Jde o totální hepatektomii nebo o devaskularizaci jater (Obr. 9). U metody totální hepatektomie existuje mnoho pochybností, přesto však k testování bývá používána, neboť je jednodušší na provedení. Model je ireverzibilní a celkový klinický obraz neodpovídá běžnému ASJ. Další nevýhodou je krátké terapeutické okno a největším nedostatkem tohoto modelu je absence nekrotické jaterní tkáně v organismu ⁷⁵. Bylo potvrzeno, že v porovnání s modelem hepatektomie jsou u devaskularizačního modelu zvýšené hladiny transamináz. Tento fakt byl vysvětlen právě přítomností nekrotizujících hepatocytů v organismu ⁷⁶. S ohledem na tyto nedostatky by anhepatický model měl být spíše v pozadí zájmu. Devaskularizační model se skládá ze dvou fází. Nejdříve je provedena portokavální anastomóza a následuje podvaz hepatické tepny, či jejích větví ^{77, 78}. Tento základní postup je dále rozvíjen ve smyslu různého časového odstupu mezi oběma fázemi a způsobem provedení HAL. Velkou nevýhodou tohoto modelu je jeho ireverzibilita. Té se lze částečně vyhnout způsobem, kdy hepatickou arterii jen po určitou dobu komprimujeme. (tabulky 7, 8).



Obrázek 9: Schematické znázornění devaskularizačního (vlevo) a anhepatického (vpravo) modelu ASJ.

Autor	Filipponi ²⁰	Tonnesen ⁷⁶	Filipponi ¹¹⁹	Hanid ⁷⁸	de Groot ⁹²
počet	-	-	11	34	15
váha (kg)	40	35-40	27-35	18-20	28-33
operace	HEP	1.HEP 2.PCA+HAL	PCA +70% HEP	PCA+HAL	PCA
kontrola	-	-	samotná PCA, samotná 70% HEP	laparotomie	komprese HA (4h)
anestézie	propofol, fentanyl	50% N ₂ O	halothan	-	-
potvrzení ASJ	KF	pH, bilirubin, ALT	AST, bilirubin	bilirubin, AST	KF
přežití (hod ± SE)	16,9 ± 5,38	1. 16,0 ± 0,9 2. 18,6 ± 1,1	30,0	9,1	20-50

Tabulka 7: Chirurgické modely ASJ
(HA – a.hepatica, KF – koagulační faktory)

Totální hepatektomie	negativa	pozitiva
	- velké chirurgické trauma ireverzibilita absence nekrotických hepatocytů	+ jednoduchost provedení
Devaskularizace	negativa	pozitiva
	chirurgické trauma částečná ireverzibilita	reprodukovatelnost dostatečné terapeutické okno nízké náklady

Tabulka 8: Výhody a nevýhody chirurgických metod ASJ ⁷³.

7. Metodika

7.1. Model akutního jaterního selhání

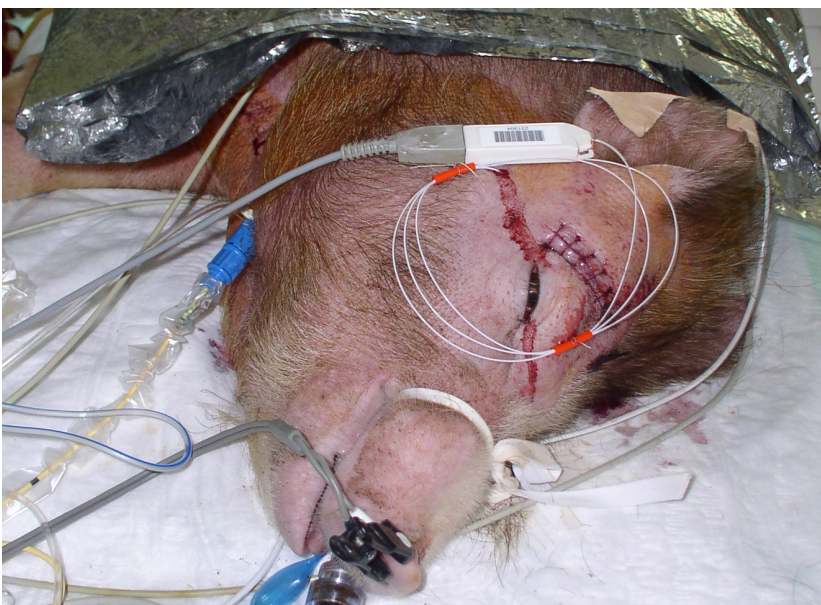
Pro naše účely jsme vytvořili chirurgický model akutního jaterního selhání na základě experimentální devaskularizace: podvaz a.hepatica propria a v. portae s vytvořením portokavální anastomózy^{79, 80}.

K vytvoření modelu jsme užili laboratorní dospělé miniprase hmotnosti 25 - 30 kg. Před operací zvíře lačnilo 12 hodin při zachování přísunu tekutin ad libidum. Před operačním výkonem bylo zvíře premedikováno kombinací ketaminu 10 mg/kg (Ketaset, Fort Dodge, USA) s atropinem 0,1 mg (Atropin, Hoechst-Biotika, SRN) a azaperonem 5 mg (Stressnil, Janssen, Belgie) intramuskulárně. Po uložení na operační stůl byla kanylována žíla na uchu a proveden intravenózní úvod ketaminem 5 mg/kg (Narkamon, Spofa, ČR) a metomidatem 2 – 5 mg/1 kg (Hypnodil, Janssen, Belgie). Po endotracheální intubaci bylo zvíře relaxováno pipecuroniem v dávce 50 μ g/kg (Arduan, Chemical Works of Gedeon Richter, Maďarsko) a řízeně ventilováno směsí kyslíku a oxidu dusného (obr. 10).

Anestézie byla doplňována opakovanými dávkami fentanylu 100 μ g (Fentanyl, Janssen, Belgie) a etomidatu 10 mg i.v. (Hypnomidate, Janssen, Belgie). K prevenci tromboembolie jsme podávali heparin 5000 IU (Heparin, Léčiva,a.s., ČR), k prevenci stresového vředu famotidin 20mg i.v. (Quamatel, Chemical Works, Maďarsko) intravenózně. K antibiotické profylaxi jsme užívali amoxicilin 1,2 g i.v. (Augmentin, Léčiva, ČR). Po úvodu do celkové anestézie byl zaveden katétr 18G (Braun, SRN) do a. femoralis k přímému měření krevního tlaku. Do femorální žíly jsme zaváděli dvoucestný katétr 7Fr (Arrow, USA) pro podávání léků a infuzí. Na krku byla vypreparována pravá v. jugularis interna a zaveden Swan - Ganz katétr 7Fr (Arrow, USA) s termistorem k měření hemodynamických parametrů. Během operace jsme monitorovali EKG, krevní tlak, CVP, MPAP, PCWP, CO,CI, SVRI, SpO₂, ETCO₂, tělesnou centrální i periferní teplotu monitorovacím systémem Marquette (GE Marquette, USA) a hodinovou diurézu. Na začátku výkonu a po uvolnění svorky jsme odebírali žilní krev ke stanovení biochemických parametrů, krevního obrazu a koagulace, k vyšetření ABR, iontogramu, laktátu a glykémie. Byly podávány krystaloidní roztoky 20 - 50 ml/hod, podle potřeby i koloidy (Gelofusine, Braun).



Obrázek 10: Endotracheální intubace, i.v., i.a. katetrizace.



Obrázek 11: Monitorace miniprasete, detail na ICP čidlo.

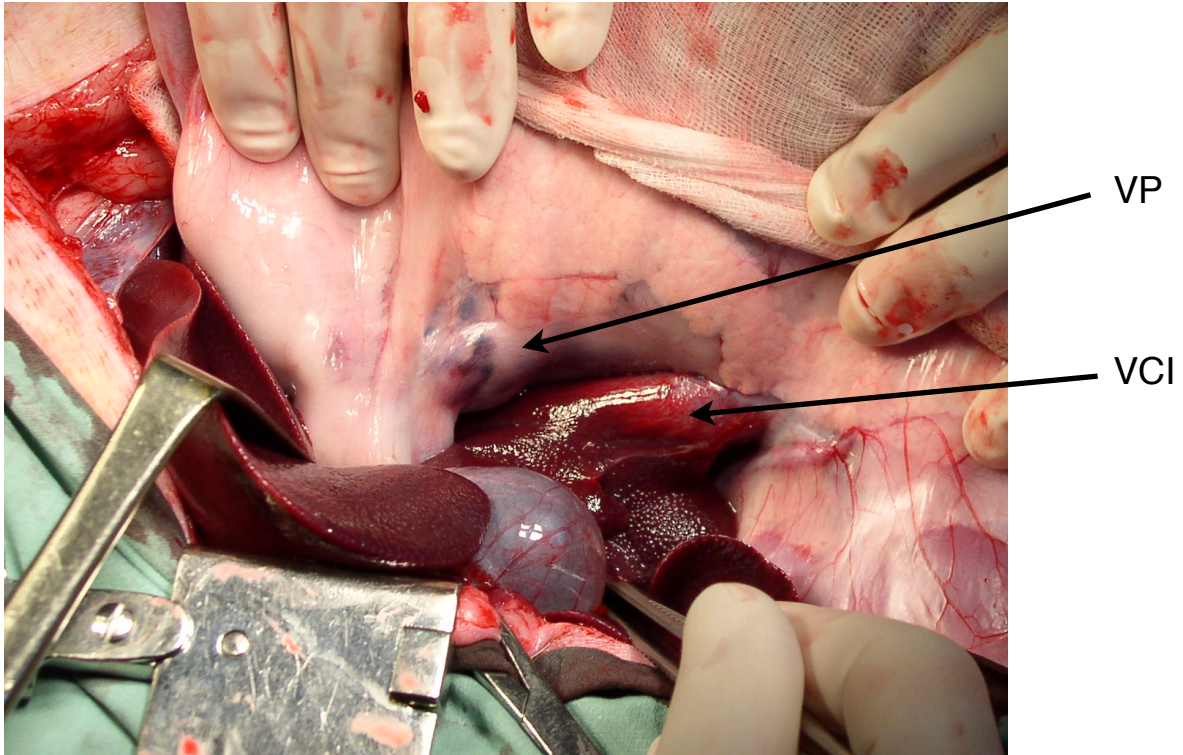
Operace

Laparotomii jsme vedli ve střední čáře od processus xiphoideus až do podbříšku. Po vypreparování průběhu v. portae a v. cava inferior jsme našli portokavální spojku end-to-side Prolenem 5/0. Poté jsme ligovali a. hepatica communis nebo její větve (obr. 12).

K pooperačnímu sledování jsme založili epicystostomii a choledochostomii. Operační výkon jsme ukončili zavedením pojistného drénu do dutiny břišní a vyvedením gastrostomie k odsávání žaludečního obsahu. Operační ránu jsme uzavřeli v jedné vrstvě, miniprase jsme přeložili na bok, ponechali na operačním stole zaintubované a zahřívali jsme jej (obr. 10, 11).

Po uzavření laparotomie jsme zavedli intrakraniálně v oblasti temporoparietální čidlo ke kontinuálnímu měření intrakraniálního tlaku (ICP) ⁸¹ (obr. 11).

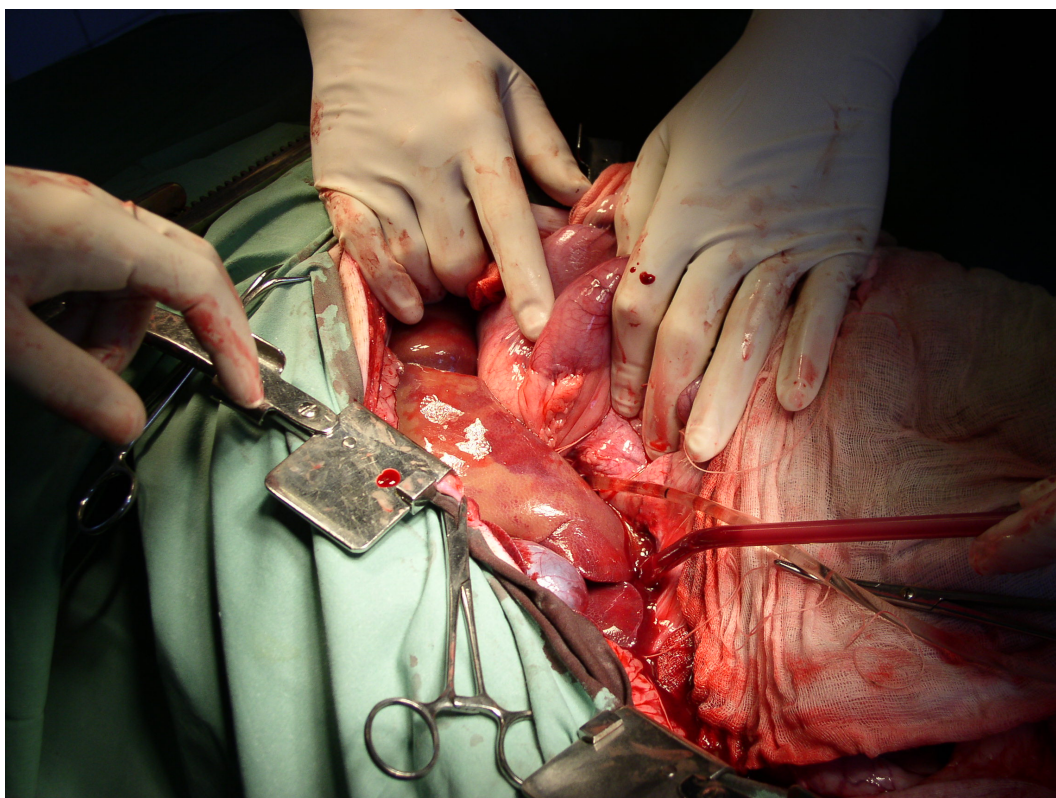
Pro vyloučení vlivu samotné operace na klinický průběh ASJ jsme vytvořili kontrolní skupinu, u které byla provedena identická příprava včetně cévních přístupů a po provedení laparotomie a zavedení epicystostomie a gastrostomie jsme operační ránu uzavřeli se založením pojistného drénu.



Obrázek 12: Průběh v. portae a c. cava inf. před preparací.

7.2. Izolace hepatocytů, plnění bioreaktoru

Pro izolaci hepatocytů jsme zvolili metodu jaterní perfuze s následnou centrifugací⁸². Při odběru jater jsme vypreparovali a kanylovali portální žílu. Jaterní artérii jsme spolu s celým hepatoduodenálním ligamentem ligovali. Těsně před odběrem jsme punkcí vypustili obsah žlučníku. Játra jsme in-situ perfundovali 37°C teplým fyziologickým roztokem v celkovém objemu 4.000 ml (obr. 13).



Obrázek 13: Počátek in-situ perfuze jater.

Vyjmutá játra jsme postupně perfundovali třemi iontovými roztoky (magistraliter Lékárna IKEM, Praha), pracovně nazvanými A,B,C, které byly syceny směsí karbogenu (95% O₂ a 5% CO₂) a jejich pH jsme následně upravili na 7,4. Složení roztoků je uvedeno v tabulce č. 9. Perfuzi iontovým roztokem A stabilizovaným etylenglykoltetraoctovou kyselinou (EGTA) v celkovém objemu 1500 ml jsme již prováděli in vitro ve vodní lázni zahřáté na teplotu 37°C (obr. 2). Následovala 30 minutová perfuze roztokem B s uzavřeným okruhem pod tlakem 30 mm vodního sloupce. Tento roztok obsahoval již kolagenázu (Collagenasa cruda, aktivita 1000, Sevapharma, Česká Republika). Poté jsme játra perfundovali 1.000 ml roztoku C (Krebs - Henseleitovo medium), který byl zchlazen na 4 °C a došlo k

deaktivaci účinku kolagenázy. Roztok C obsahoval spolu s glukózou i přidáný bovinní sérový albumin (Sigma-Aldrich, Německo). Teplá ischemie celkově nepřesahovala 55 minut (obr. č.14).

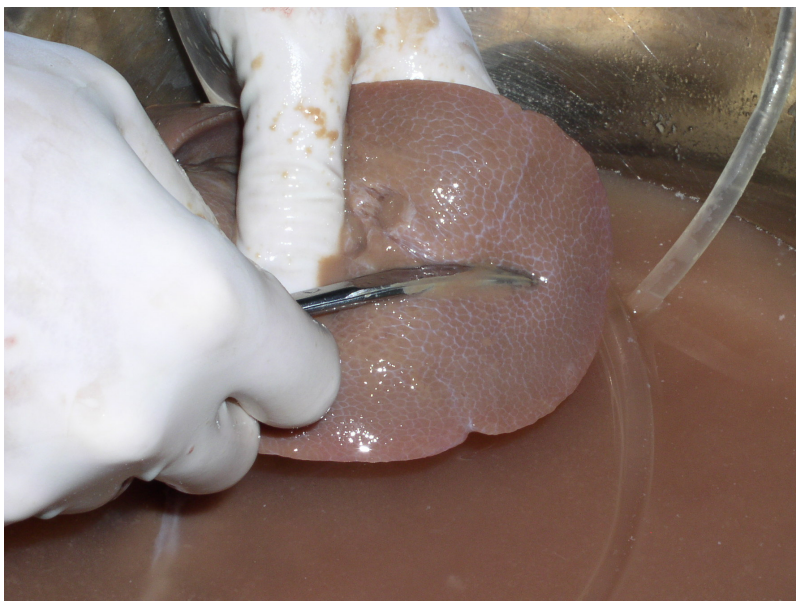
Zásobní roztoky					
Roztok 1			Roztok 2		
NaCl	80,0g		NaCl	69,0g	
KCl	4,0g		KCl	3,6g	
MgSO ₄ . x H ₂ O	0,977g		MgSO ₄ . x H ₂ O	1,441g	
Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O	1,206g		KH ₂ PO ₄	1,3g	
KH ₂ PO ₄	0,60g		CaCl. 2H ₂ O	3,74g	
Ad 1000 ml aqua dest.			Ad 1000 ml aqua dest.		
Perfuzní roztoky					
Roztok A			Roztok B		Roztok C
Zásobní roztok 1	100 ml		Zásobní roztok 1	60 ml	Zásobní roztok 2 100 ml
Destil. H ₂ O	800 ml		Destil. H ₂ O	440 ml	Destil. H ₂ O 800 ml
NaHCO ₃	2,188g		NaHCO ₃	1,314g	Glukoza 0,9g
EDTA	0,19g		CaCl.2H ₂ O	0,3528g	NaHCO ₃ 2g
Doplnit do 1000 ml (H ₂ O)			Doplnit do 600 ml (H ₂ O)		Doplnit do 1000 ml (H ₂ O)

Tabulka 9: Schema přípravy a složení roztoků pro perfuzi jater.



Obrázek 14: Perfuze jater cestou v. portae in vitro ve vodní lázni.

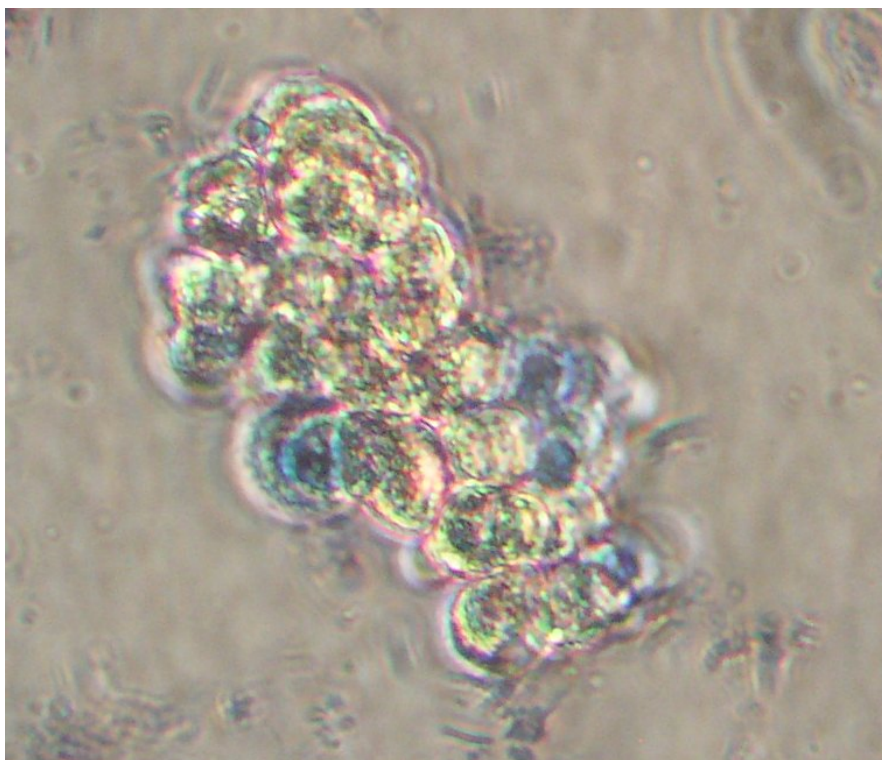
Po poslední perfuzi jsme mechanicky rozrušili jaterní pouzdro tak, aby se parenchym lépe uvolnil do média (obr. 15). Vzniklou suspenzi hepatocytů jsme následně filtrovali a postupně třikrát centrifugovali rychlostí 500 otáček za minutu při stálém chlazení na 4 °C (obr. 16). Tímto postupem jsme získali suspenzi izolovaných jaterních buněk, které se spontánně začaly situovat do charakteristických shluků (obr. 17). Viabilitu hepatocytů jsme hodnotili mikroskopicky po obarvení trypanovou modří (Sigma-Aldrich, Německo).



Obrázek 15: Rozrušení pouzdra jater, filtrace suspenze jater.



Obrázek 16: Suspenze izolovaných hepatocytů po opakované centrifugaci.



Obrázek 17: Shluky hepatocytů.

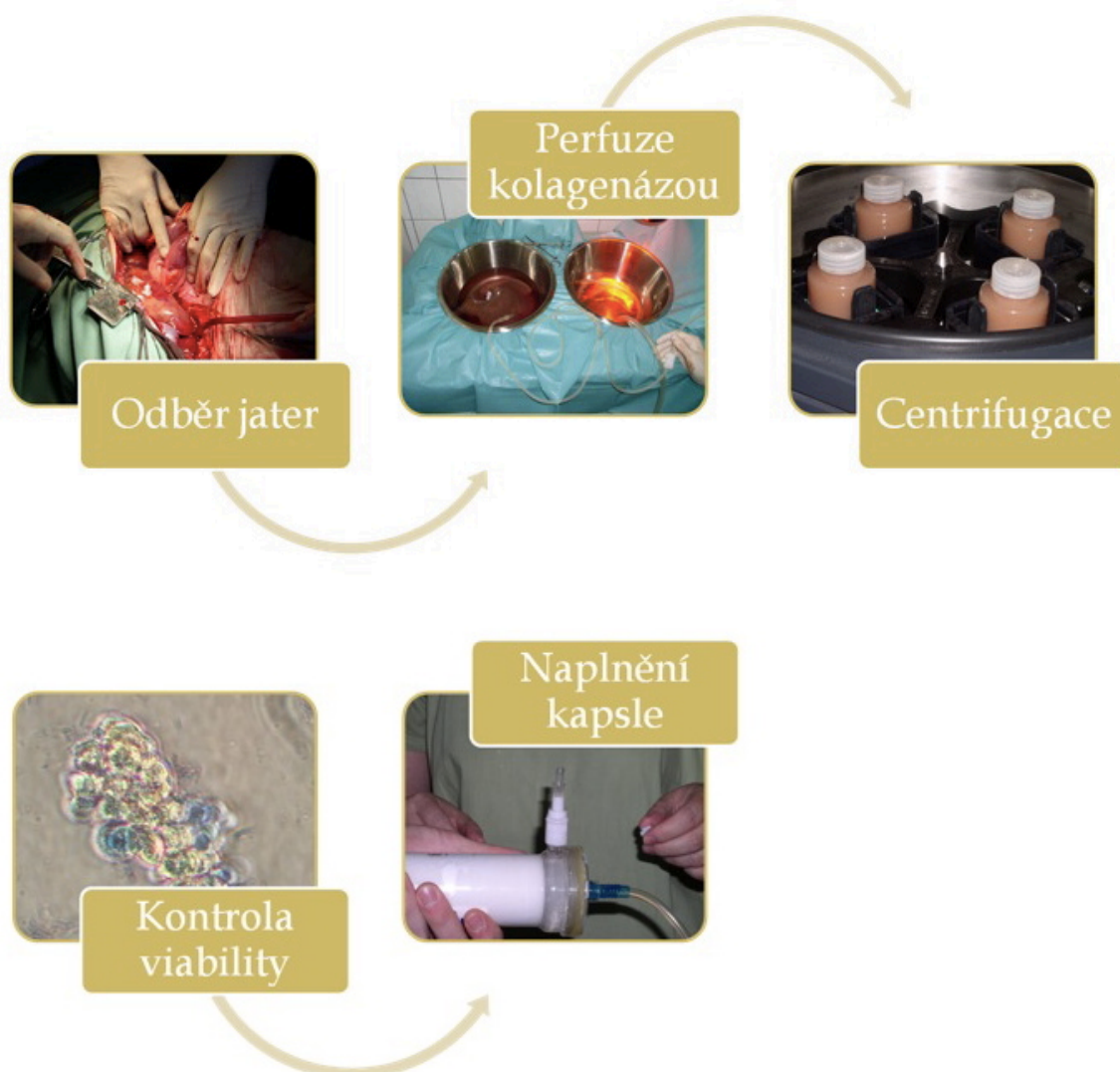
Následně jsme suspenzí hepatocytů naplnili kapsli bioreaktoru, který jsme předtím promyli 2.000 ml fyziologického roztoku a důkladně odvzdušnili. Kapsli Bioreaktoru jsme po naplnění uložili do termoboxu při teplotě 4°C až do doby jeho zapojení do přístroje (obr. 18, 19).



Obrázek 18: Kapsle bioreaktoru naplněná hepatocyty a zchlazená na 4 °C.



Obrázek 19: Připravena kapsle bioreaktoru k použití.



Obrázek 20: Schematické znázornění celého procesu izolace hepatocytů a plnění kapsle

7.3. Pooperační péče a monitorace

Po operačním výkonu jsme zvíře zahřívali a řízeně ventilovali směsí kyslíku se vzduchem s FiO_2 0.5. Trvale jsme podávali intravenózní analgosedaci s využitím farmak s převážně mimojaterní cestou eliminace. Používali jsme kombinaci propofolu, remifentanilu a medetomidinu. Podávali jsme krystaloidní a koloidní roztoky, k forsírování diurézy poté bolusově furosemid. Při poklesu sérové koncentrace glukózy v krvi pod hodnotu 3,5 mmol/l jsme podávali hypertonickou glukózu v kontinuální infuzi s cílem udržet normoglykémii

(3,3 – 4,9 mmol/l). Při poklesu středního arteriálního tlaku (MAP) pod 60 mm Hg jsme nasazovali noradrenalin v kontinuální infuzi (0,1ug/kg/min).

V pravidelných intervalech jsme odebírali krevní vzorky na stanovení vnitřního prostředí, hodnot iontů, glykémie, krevního obrazu, parametrů hemokoagulace, jaterních testů a sérového kreatininu⁷⁹. Kontinuální monitorace intrakraniálního tlaku byla zahájena ihned po operaci.

7.4. Sledování hemodynamických parametrů

Během operace jsme monitorovali EKG, krevní tlak, tepovou frekvenci, střední arteriální tlak, centrální venózní tlak, střední tlak v plicnici, tlak v zaklínění monitorovacím systémem Marquette (GE Marquette, USA) v hodinových intervalech, termodiluční technikou srdeční výdej, tělesnou centrální a periferní teplotu. Měřili jsme hodinovou diurézu. Byl kalkulován srdeční index a indexovaná systémová cévní rezistence⁸³.

7.5. Terapie BAL

Nástup ASJ jsme zaznamenali v čase poklesu glykémie pod hodnoty 3,5 mmol/l. Tento moment byl počátkem otevření tzv. terapeutického okna a napojením bioreaktoru. V první fázi zapojení byla pouze z krve zvířete filtrována plazma, která byla zatím skladována v rezervoáru přístroje. Poté byl samotný bioreaktor, naplněný suspenzí živých hepatocytů, umístěn do terciálního okruhu přístroje O. liver Performer (O-Liver Performer, Rand, Itálie) (obr. 21, 22).



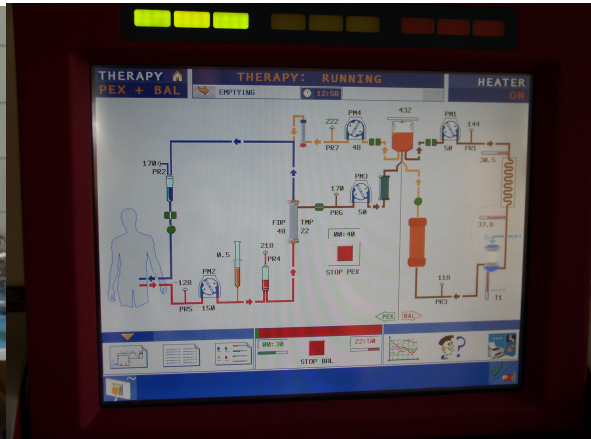
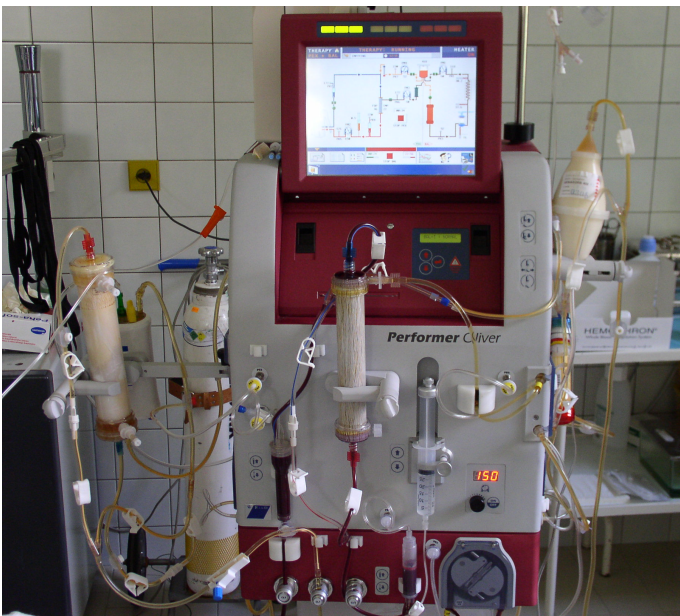
Obrázek 21: Příklad O. liver Performer (fy Rand, Itálie) se zapojením bioreaktoru

Monitoraci hodnot jednotlivých laboratorních ukazatelů ASJ a hodnot ICP jsme prováděli po celou dobu operace, rozvoje ASJ a léčby BAL až do doby úmrtí zvířete.

Získané hodnoty laboratorních vyšetření v průběhu léčby ASJ připojením na BAL, jsme porovnali s parametry kontrolní skupiny, tedy skupiny zvířat, u které bylo vyvoláno ASJ, a která nebyla na BAL napojena⁸⁰.

Experiment jsme ukončili po uplynutí 12 hodin od uvolnění svorky na v.portae po našití porto-kavální anastomózy podáním 50 ml 5 % roztoku KCl a bolusu Thiopentalu. Následovala relaparotomie, revize dutiny břišní, odebrání vzorku jater a sleziny k histologickému vyšetření a kontrola polohy všech katetrů.

Údaje byly statisticky zpracovány pomocí T-testu, Mann-Whitneyovým neparametrickým testem použitím tabulátoru EXCEL a QUATRO a testem Wilcoxon. Hladina statistické významnosti je uvedena vždy u jednotlivých měření.



Obrázek 22: Zapojení systému BAL, monitorace.

8. Materiál

I. Část

Vytvoření vhodného modelu akutního jaterního selhání.

V této části experimentu jsme použili celkově 27 miniprasat z chovu veterinární laboratoře AVČR v Liběchově. 7 zvířat uhynulo při úvodu do anestezie či v důsledku vlastní operace (krevní ztráta).

Tato část experimentu byla rozdělena na 3 skupiny:

1. skupina ASJ

Do této skupiny jsme zařadili 10 miniprasat hmotnosti 25 – 30 kg z chovu veterinární laboratoře AVČR v Liběchově, u nichž jsme metodou devaskularizace provedli akutní selhání jater. Tato skupina nebyla léčena BAL a byla skupinou kontrolní pro skupinu ASJ BAL⁸⁰.

2. skupina ASJ ICP

Do této skupiny jsme zařadili 5 miniprasat u nichž jsme metodou devaskularizace provedli akutní selhání jater s následnou monitorací intrakraniálního tlaku ICP čidlem.

3. skupina kontrolní

Do této kontrolní (sham) skupiny jsme zařadili 5 zvířat - miniprasat hmotnosti 25-30 kg - u nichž jsme provedli laparotomii, invazivní přístupy, bez vyvolání akutního jaterního selhání. Tato zvířata byla identicky monitorována jako zvířata v ostatních skupinách. Byla to skupina kontrolní pro skupinu 1, 2 (ASJ, ASJ ICP) v této části experimentu.

II. Část

Vytvoření metodiky izolace hepatocytů, plnění bioreaktoru BAL a jeho použití.

V této části experimentu jsme použili celkově 14 miniprasat z chovu veterinární laboratoře AVČR v Liběchově. 4 zvířata (z celkového počtu 14) nebyla do studie zařazena a vyřadili jsme je z těchto důvodů: jedno pro významné krvácení do dutiny břišní po provedení ASJ,

dvě pro kardiopulmonální dekompenzaci při předoperačně nepoznané konstriktivní perikarditidě a jedno pro nestandardní ovlivnění ICP při jeho prudkém vzestupu.

Do této části byla zahrnuta 1 skupina:

4. skupina ASJ BAL

Do této skupiny jsme zařadili 10 miniprasat hmotnosti 25 – 30 kg, u kterých jsme vyvolali ASJ chirurgickou devaskularizací, tato zvířata byla léčena metodou BAL.

9. Výsledky

I. část.

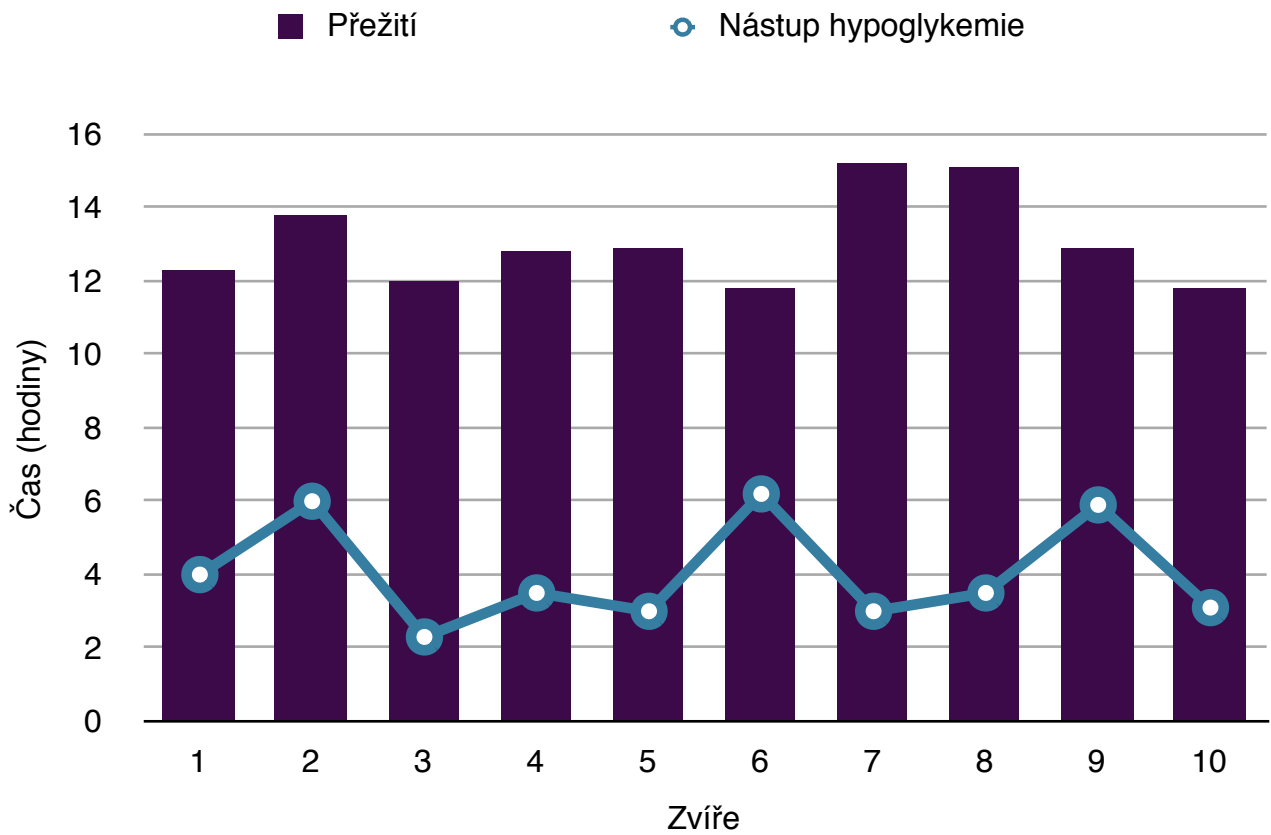
Srovnávali jsme výsledky 1. skupiny ASJ a kontrolní, 3. skupiny.

1. skupina – experimentální ASJ

Průměrná doba přežití miniprasat byla 13 hodin (rozmezí 11 hod. 40 min. – 15 hod. 10 min.). Počátek rozvoje hypoglykémie pod 3,5 mol/l (= počátek rozvoje ASJ považovaný za otevření terapeutického okna) byl zaznamenán v průměru po 4 hodinách od operace (rozmezí 2 hod. 30 min. – 6 hod. 30 min.) – graf 1. Jaterní ischémie byla provázána poklesem hodnot Quickova testu a nárůstem AST, laktátu a amoniaku (graf 2, 3, 4, 5). Srovnání hodnot s kontrolní skupinou uvádí tabulka 10. Jsou uvedeny průměrné hodnoty AST, laktátu, Quickova testu a amoniaku v obou skupinách se směrodatnou odchylkou (SD). Byl zaznamenán signifikantní rozdíl v naměřených hodnotách jednotlivých laboratorních ukazatelů ve tříhodinových intervalech a je patrná statistická významnost rozdílnosti průměrných hodnot, která byla získána Mann-Whitneyovým neparametrickým testem.

U kontrolní skupiny byla doba plánovaného přežití zvířete stanovena na 15 hodin po operaci. V pooperační době nebyl zaznamenán ani v jednom případě výrazný pokles glykémie. Ani v jednom případě nedošlo k rozvoji ASJ.

Průměrné naměřené hodnoty ICP ve tříhodinových intervalech u 2.skupiny zvířat s ASJ jsou uvedeny v hodnocení výsledků II. části, tabulka 16, graf 10 na straně 62.

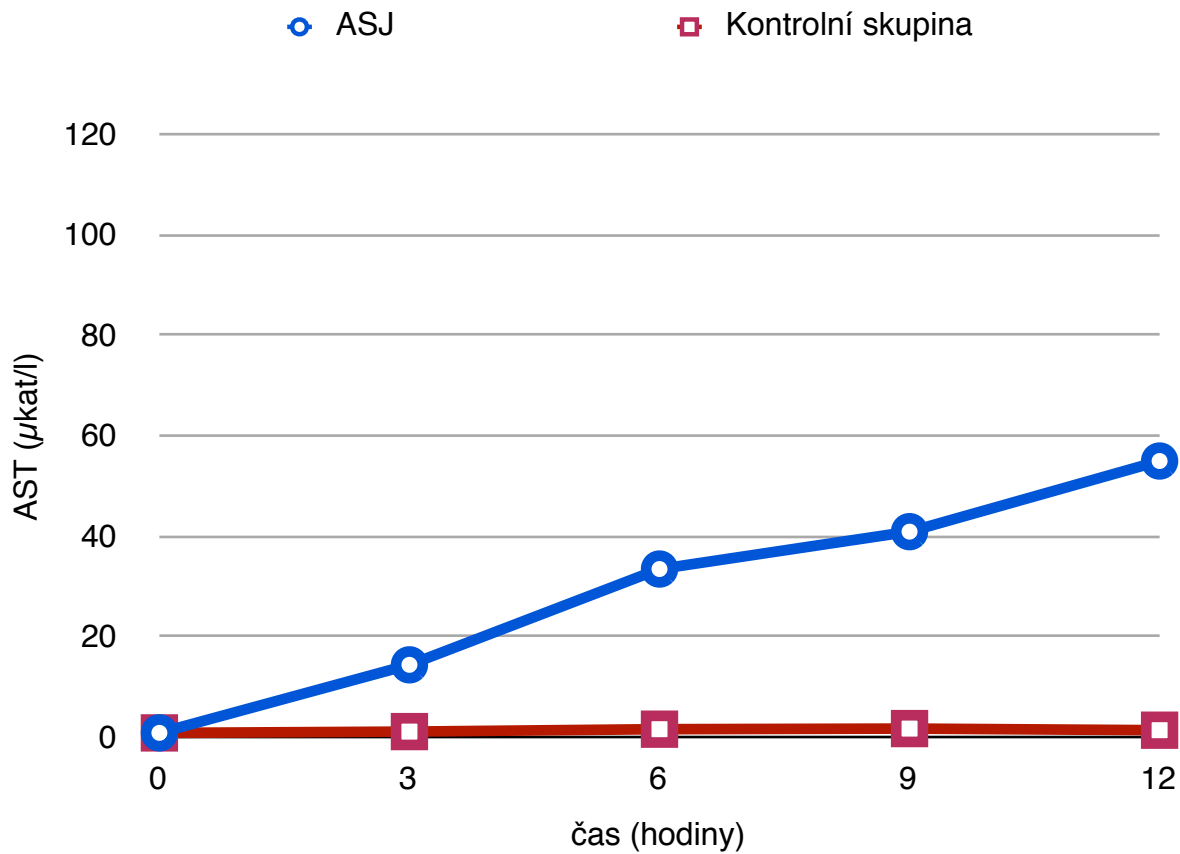


Graf 1: Délka přežívání laboratorních zvířat skupiny ASJ s vyznačením začátku hypoglykémie (modrá křivka)

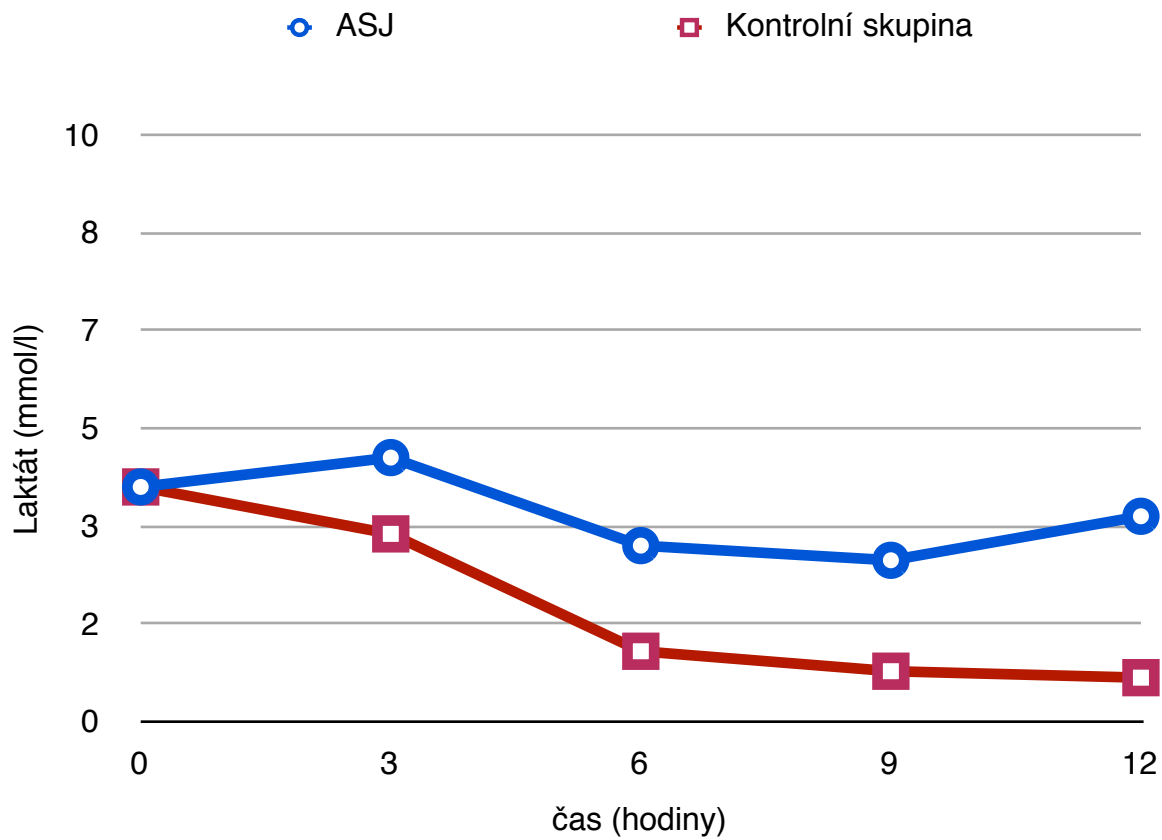
Čas	0	3	6	9	12	15
AST (μkat/l)	ns.	ns.	p<0.01	p<0.01	p<0.01	-
ASJ	0,83±0,29	14,37±35,55	33,44±39,96	40,88±41,34	54,94±43,22	
Kontrolní	0,82±0,30	1,08±0,25	1,56±0,50	1,68±0,75	1,36±0,65	1,32±0,45
Laktát (mmol/l)	ns.	ns.	p<0.01	p<0.01	p<0.01	-
ASJ	3,97±1,62	4,52±1,87	2,97±1,16	2,75±1,08	3,49±1,64	
Kontrolní	4,08±1,34	3,20±1,74	1,18±0,61	0,86±0,29	0,76±0,32	0,75±0,21
Quickův test (s)	ns.	ns.	ns.	ns.	ns.	-
ASJ	82,4±11,41	83,3±13,06	67,4±17,03	56,0±27,48	51,6±21,52	
Kontrolní	85,6±5,13	74,2±3,56	75,2±2,68	74,2±2,17	73,8±6,10	68,0±1,00
Amoniak (μmol/l)	ns.	-	p<0.01	p<0.01	P<0.01	-
ASJ	44,8±19,25	173,8±61,22	264,3±93,05	350,7±159,49	463,4±178,47	
Kontrolní	29,7±9,74	34,4±5,66	42,5±12,98	61,4±31,39	41,0±11,02	37,2±5,24

Tabulka 10: Průměrné hodnoty jednotlivých laboratorních ukazatelů ASJ s vyznačenou významností a směrodatnou odchylkou u skupiny s ASJ (1.skupina) a skupiny kontrolní (3.skupina).

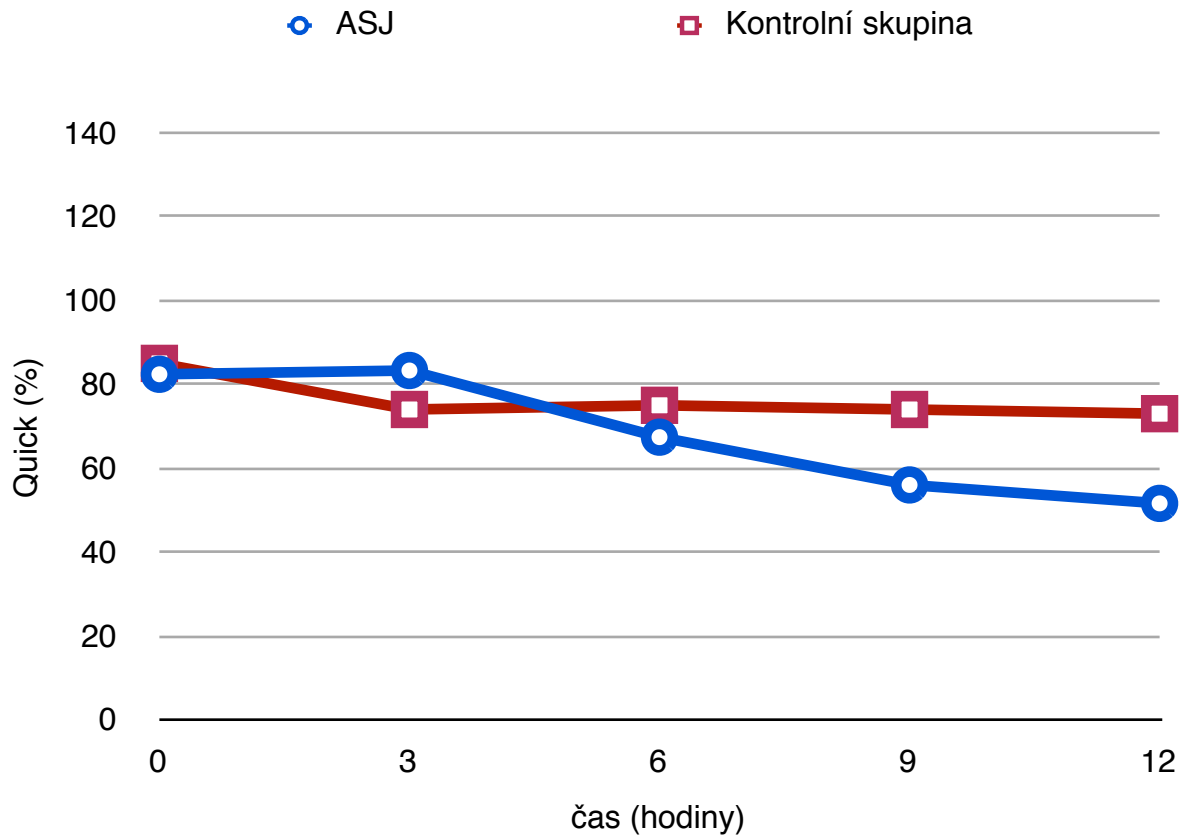
ns. – neliší se, p<0,01 – statisticky významná rozdílnost průměrných hodnot



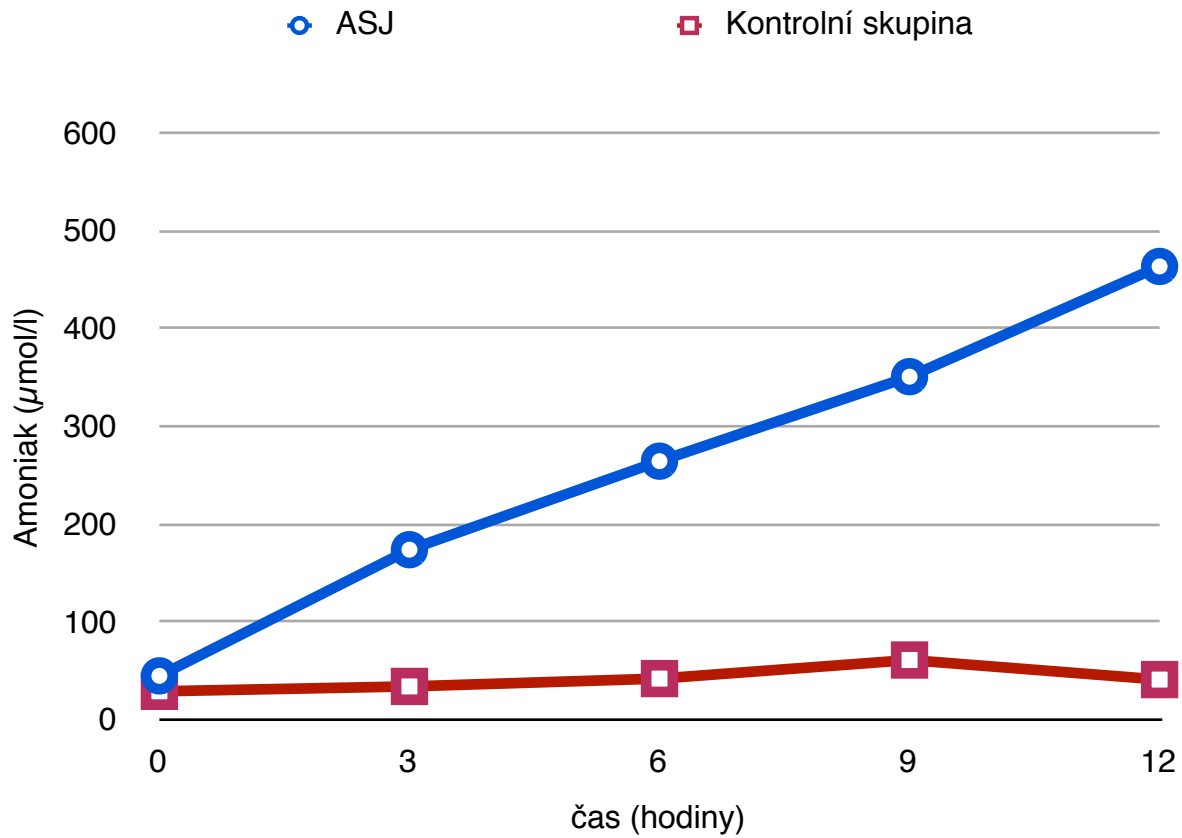
Graf 2: Srovnání průměrných hodnot AST u laboratorních zvířat skupiny ASJ s kontrolní skupinou.



Graf 3: Srovnání průměrných hodnot Laktátu u laboratorních zvířat skupiny ASJ s kontrolní skupinou.



Graf 4: Srovnání průměrných hodnot Quick u laboratorních zvířat skupiny ASJ s kontrolní skupinou.



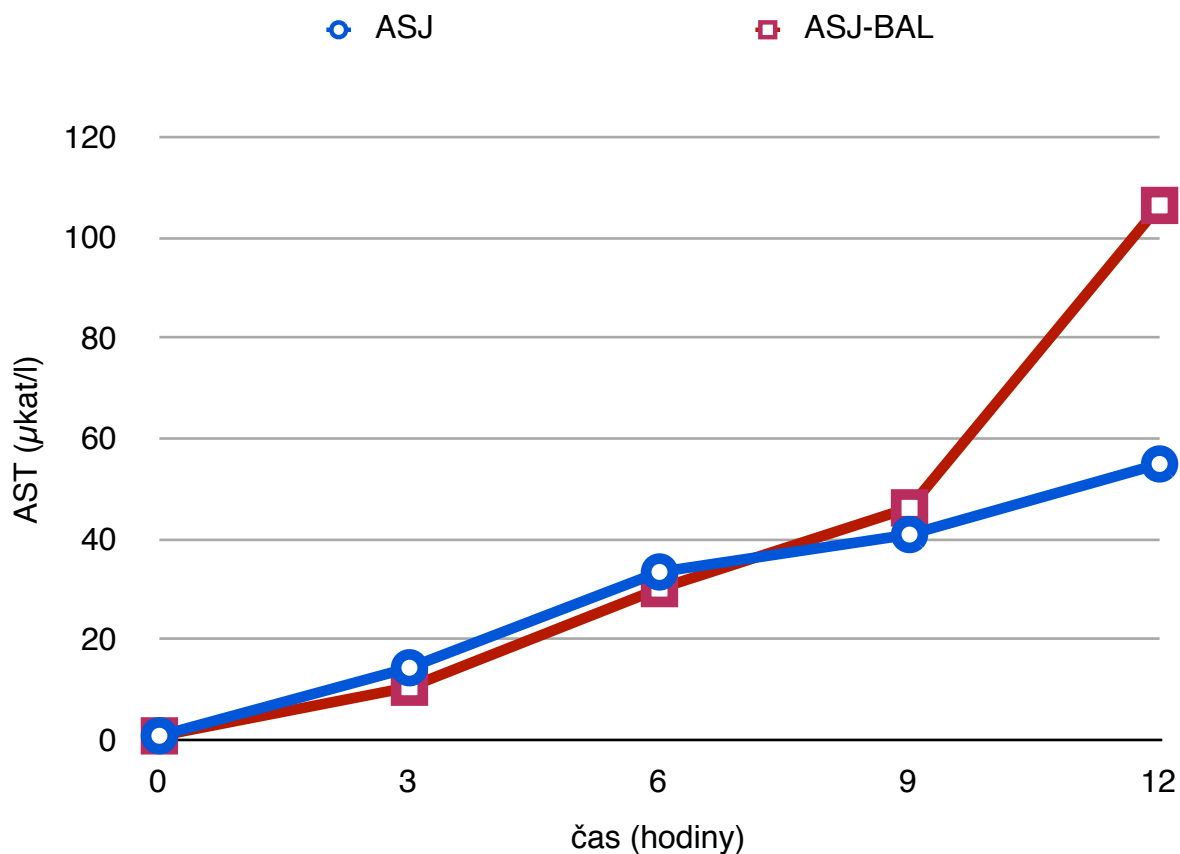
Graf 5: Srovnání průměrných hodnot Amoniak u laboratorních zvířat skupiny ASJ s kontrolní skupinou.

II. část

Srovnávali jsme výsledky skupiny ASJ oproti skupině ASJ BAL.

Průměrná doby přežití miniprasat byla 13 hodin. U skupiny ASJ BAL 10 zařazených zvířat se ASJ rozvinulo v průměru za 2 hod. 7 min. od provedené devaskularizace jater (48 min. – 3 hod 16 min.) a korespondovalo s nástupem hypoglykémie pod hodnoty 3,5 mmol/l. Léčba ASJ napojením zvířete na BAL byla zahájena v průměru po 2 hod. 21 min. (1 hod. – 3 hod.45 min.) a trvala v průměru 5 hod. 43 min. (3 hod.25 min. – 8 hod. 10 min.).

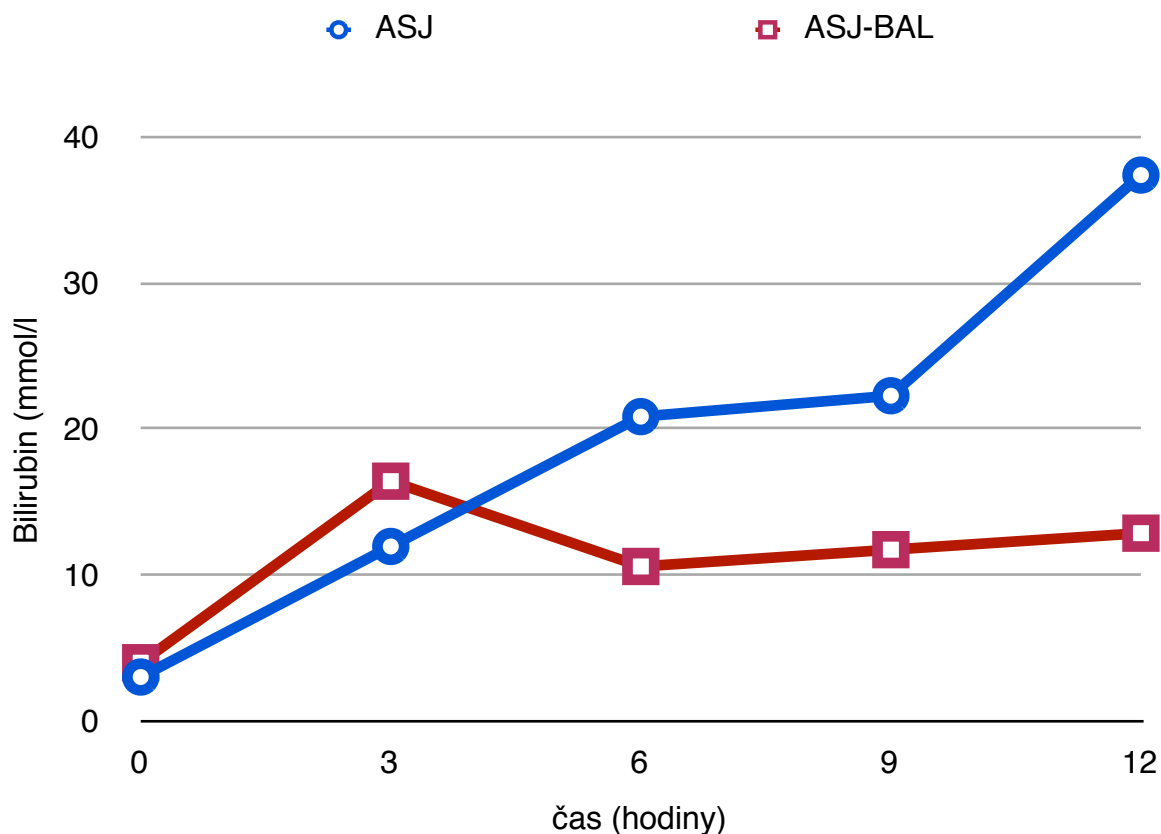
Získané průměrné hodnoty vybraných laboratorních ukazatelů ASJ zvířat s ASJ léčených pomocí BAL jsem srovnali s průměrnými hodnotami laboratorních ukazatelů kontrolní skupiny, tedy skupiny bez napojení na BAL⁸⁰. Získané údaje jsou přehledně shrnuté v následujících tabulkách a grafech.



Čas (hod)	0	3	6	9	12
AST (μkat/l)	ns.	ns.	ns.	ns.	ns.
ASJ	0.83 ± 0.29	14.37 ± 35.55	33.44 ± 39.96	40.88 ± 41.34	54.94 ± 43.22
ASJ-BAL	0.814 ± 0.47	10.50 ± 7.82	30.13 ± 15.76	46.20 ± 41.20	106,40 ± 146.40

Tabulka 11, Graf 6: Srovnání průměrných hodnot AST u laboratorních zvířat léčených pomocí BAL s kontrolní skupinou, včetně směrodatné odchylky.

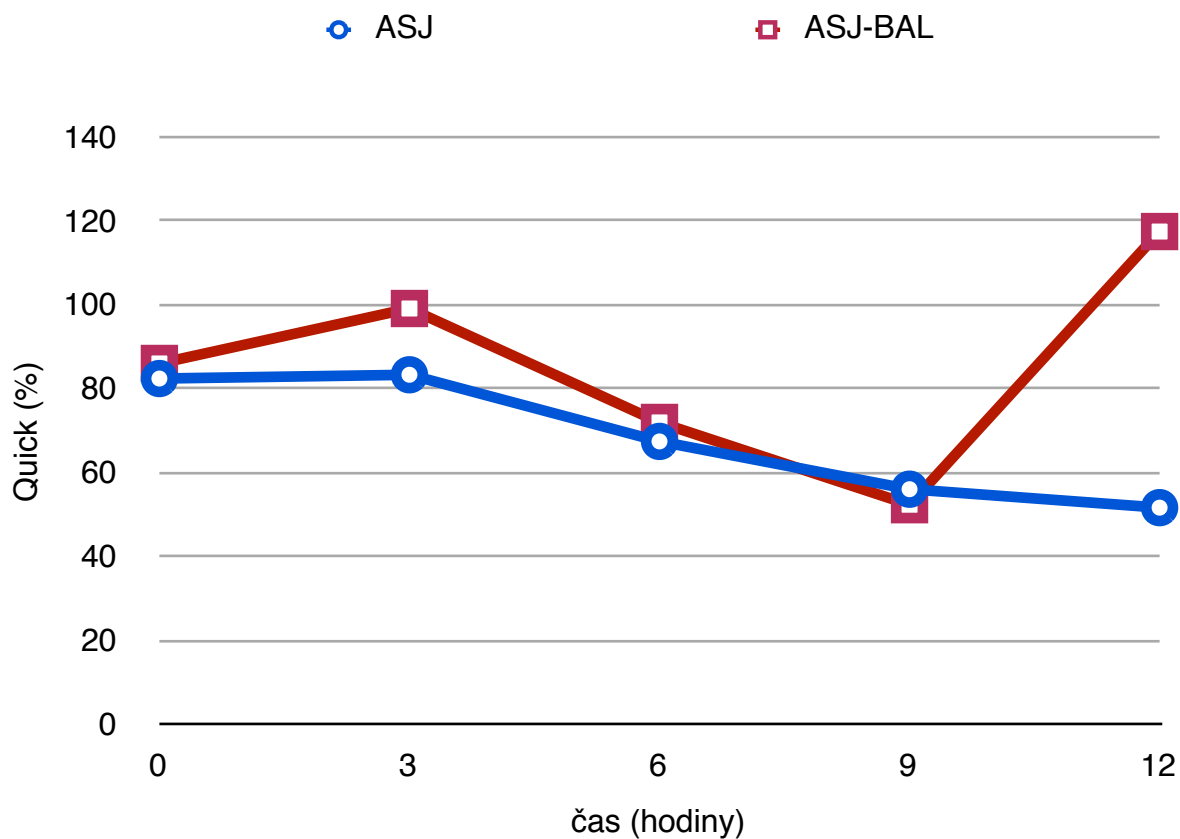
ns. – neliší se, $p < 0,01$ – statisticky významná rozdílnost průměrných hodnot



Čas (hod)	0	3	6	9	12
Bilirubin (mmol/l)	ns,	p<0,05	p<0,01	p<0,01	p<0,01
ASJ	3.03 ± 0.96	11.97 ± 6.09	20.86 ± 12.35	22.29 ± 16.41	37.4 ± 14.57
ASJ-BAL	4.01 ± 1.38	16.44 ± 6.78	10.60 ± 3.18	11.75 ± 4.42	12.88 ± 4.59

Tabulka 12, Graf 7: Srovnání průměrných hodnot Bilirubinu u laboratorních zvířat léčených pomocí BAL s kontrolní skupinou, včetně směrodatné odchylky.

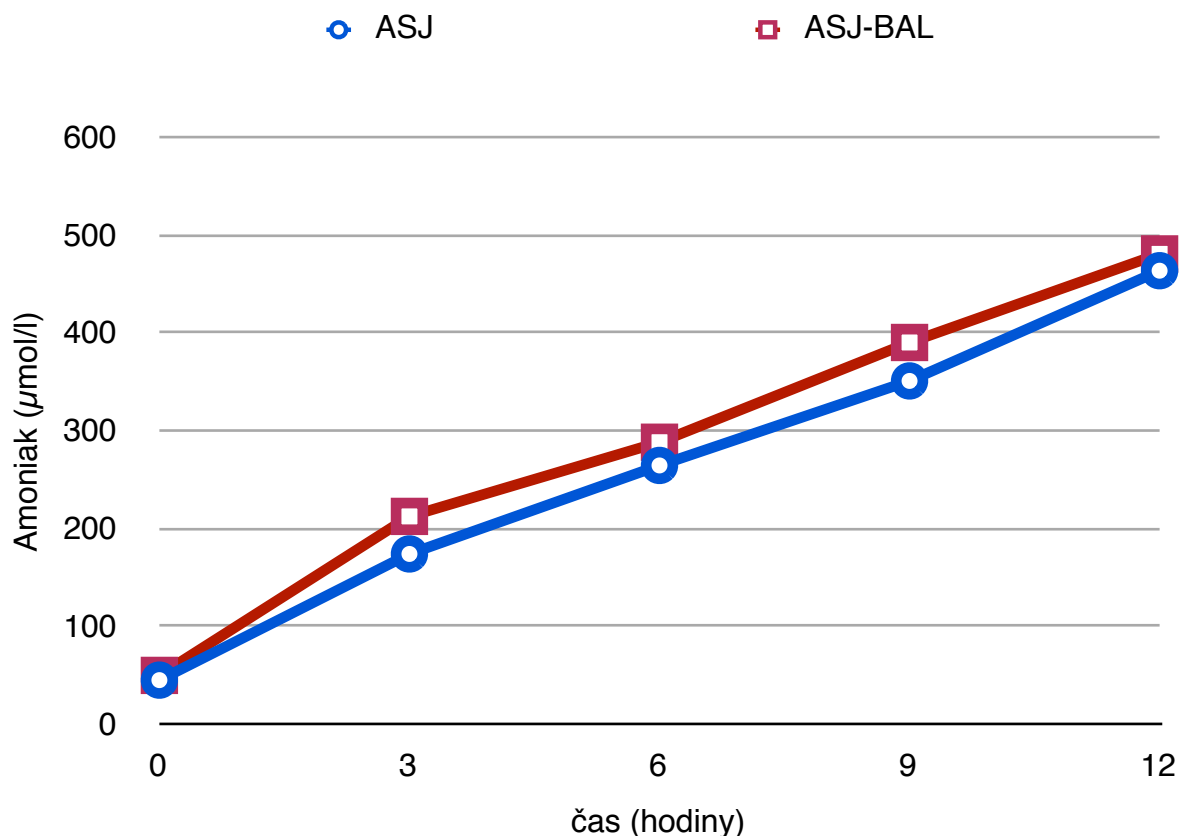
ns. – neliší se, p<0,01 – statisticky významná rozdílnost průměrných hodnot



Čas (hod)	0	3	6	9	12
Quick (%)	ns.	ns.	ns.	ns.	ns.
ASJ	82.40 ± 11.41	83.30 ± 13.06	67.40 ± 17.03	56.00 ± 27.48	51.60 ± 21.52
ASJ-BAL	86.00 ± 42.55	99.11 ± 30.48	71.93 ± 72.78	52.30 ± 71.29	117.47 ± 154.28

Tabulka 13, Graf 8: Srovnání průměrných hodnot Quick u laboratorních zvířat léčených pomocí BAL s kontrolní skupinou, včetně směrodatné odchylky.

ns. – neliší se, $p < 0,01$ – statisticky významná rozdílnost průměrných hodnot



Čas (hod)	0	3	6	9	12
Amoniak (µmol/l)	ns.	ns.	ns.	ns.	ns.
ASJ	44.80 ± 19.25	173.80 ± 61.22	264.30 ± 93.05	350.70 ± 159.49	463.40 ± 178.47
ASJ-BAL	49.63 ± 21.14	212.20 ± 97.09	288.04 ± 93.54	390.02 ± 212.96	480.58 ± 206.43

Tabulka 14, Graf 9: Srovnání průměrných hodnot amoniaku u laboratorních zvířat léčených pomocí BAL s kontrolní skupinou, včetně směrodatné odchylky.

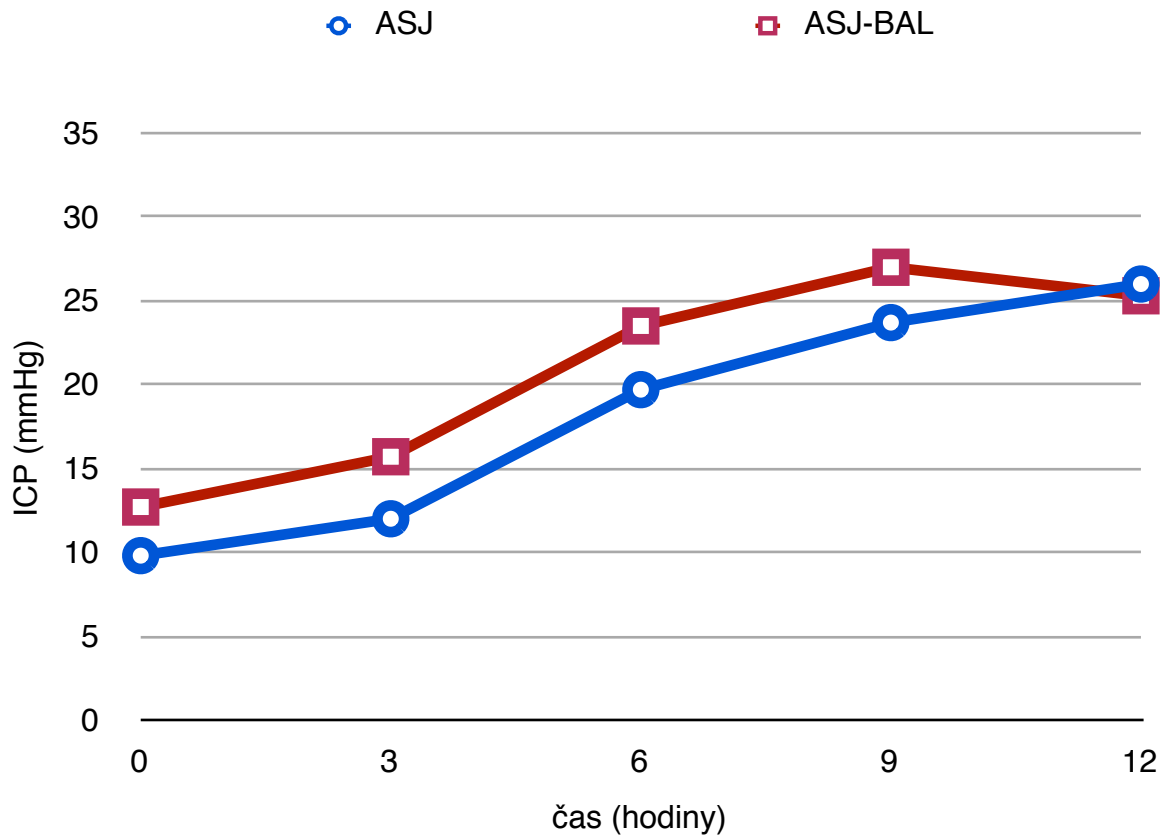
ns. – neliší se, p<0,01 – statisticky významná rozdílnost průměrných hodnot

Viabilitu hepatocytů jsem měřili na několika úrovních. Před plněním bioreaktoru tvořil podíl živých hepatocytů průměrně $85 \% \pm 4.5$. Po zapojení bioreaktoru do systému jsme posuzovali viabilitu dle srovnání hodnot parciálního tlaku kyslíku naměřených před a po průchodu bioreaktorem. Rozdíl byl signifikantně významný v 1. – 3. a 5. hodině perfuze ($p < 0,05$), ve 4. a 6. hodině je signifikantně nevýznamný (tab. 12).

hodina po napojení	1	2	3	4	5	6
před bioreaktorem	59.84	52.39	55.44	49.73	59.39	53.59
za bioreaktorem	30.71	42.37	44.62	43.20	43.30	49.40
Rozdíl	29.12	10.02	10.82	6.54	16.09	4.20

Tabulka 15: Průměrné hodnoty parciálního tlaku kyslíku před bioreaktorem a za ním v průběhu perfuze (v mm Hg sloupce)

Kontinuální sledování ICP bylo součástí monitorovacího protokolu. Srovnání hodnot v obou skupinách je znázorněno v tabulce 13 a na grafu 5. Rozdíl v průběhu ASJ je statisticky nevýznamný.



hodina	1	3	6	9	10
ASJ	9.8 ± 1.8	12.0 ± 1.1	19.7 ± 7.0	23.7 ± 8.3	26.0 ± 11.0
ASJ + BAL	12.7 ± 6.6	15.7 ± 7.3	23.5 ± 15.3	27.0 ± 8.6	25.3 ± 11.2

Tabulka 16, Graf 10: Srovnání hodnot ICP (v mmHg) ve skupině zvířat s ASJ léčeným pomocí BAL a v kontrolní skupině. Rozdíly byly statisticky nesignifikantní.

Ze statistického zpracování hodnot jednotlivých laboratorních ukazatelů ASJ v obou skupinách, tj. ve skupině léčené pomocí BAL a ve skupině kontrolní bez léčby, vyplývá, že významného rozdílu bylo dosaženo pouze v sérových koncentracích bilirubinu, kdy v 0. hodině jsou průměrné hodnoty v obou skupinách prakticky totožné (3,03 vs. 4,01 mmol/l), ve 3. hodině je rozdíl statisticky významný ($p < 0,05$) v neprospěch skupiny s BAL (11,97 vs. 16,44 mmol/l). Rozdíl hodnot v 6. a 9. hodině je statisticky významný ($p < 0,01$) ve prospěch skupiny BAL (20,86 vs. 10,60, 22,29 vs. 11,75), rozdíl hodnot ve 12. hodině je též statisticky významný (37,4 vs. 12,88).

Hodnoty ICP ve skupině léčené BAL a ve skupině kontrolní se v průběhu experimentu statisticky významně nelišily.

Skupina ASJ-BAL						Skupina ASJ					
AST ukat/l						AST ukat/l					
hodina	0	3	6	9	12		0	3	6	9	12
prase 1	0,73	13,3		7,2		Prase 1	1,04	1,22	1,5	1,26	1,37
prase 2	2,09	7,7	8,37	149	368,2	Prase 2	1,07	0,97	2	20,84	57,8
prase 3	0,74	4,13	25,47	75,2	40,5	Prase 3	0,64	108,4	106,6	77,5	83,1
prase 4	0,57	25,8	57,3	58,6		Prase 4	0,43	0,91	10,88	20,67	22,86
prase 5	0,44	16,09	32,4	33		Prase 5	0,56	19,9	36,87	56	50,13
prase 6	0,72	5,18	21,63	22,63	38,6	Prase 6	0,59	1,23	2,71	5,93	
prase 7	0,66	9,21	21,28	19,22		Prase 7	1,07	3,79	13,53	20,04	37,5
prase 8	0,83	1,93	19,91	26,09	45,7	Prase 8	1,23	3,11	11,55	29,07	32,76
prase 9	0,49	3,14	52,2	43,75		Prase 9	1,06	2,26	100	139	152
prase 10	0,87	18,9	32,64	27,63	39	Prase 10	0,6	1,37	48,8	38,47	56,9
Průměr	0,81	10,54	30,13	46,23	106,40	Průměr	0,83	14,32	33,44	40,88	54,94
SD	0,47	7,82	15,76	41,23	146,38	SD	0,29	33,55	39,96	41,34	43,22

Skupina ASJ-BAL						Skupina ASJ					
Bilirubin umol/l						Bilirubin umol/l					
čas	0	3	6	9	12		0	3	6	9	12
prase 1	3	13,3		7,2		Prase 1	3,3	4,9	7,2	7,8	
prase 2	5,7	10,4	5,4	7	10,5	Prase 2	3,2	5,3	21,6	29,8	
prase 3	2,5	10,7	7,4	9,4	7,8	Prase 3	4	6,5	6,1	5,7	
prase 4	5,4	15,3	9,8	11,6		Prase 4	3,1	5,2	15,95	17,3	
prase 5	3,7	21,4	12,2	12,5		Prase 5	3,8	17,3	18,8	24,3	
prase 6	4,7	26,4	13,7	13,7	18	Prase 6	2,4	20,6	30,2	22,9	27,1
prase 7	4,5	12,8				Prase 7	3	13,4	24,9	29	47,7
prase 8	2	9,7	15,1	20,9		Prase 8	4,2	16,4	49	57,9	
prase 9	2,9	15,7	10,1	11,7	15,2	Prase 9	2,4	11,8	14,2	11,1	
prase 10	5,7	28,7	10,9			Prase 10	0,9	18,3	20,7	17,1	
Průměr	4,01	16,44	10,58	11,75	12,88	Průměr	3,03	11,97	20,865	22,29	37,4
SD	1,38	6,78	3,18	4,42	4,59	SD	0,96	6,10	12,35	15,04	14,57

Tabulka 17: Detailní data skupin ASJ-BAL a ASJ u všech zvířat pro hodnoty AST a bilirubin.

Skupina ASJ-BAL						Skupina ASJ					
Quick (%)						Quick (%)					
hodina	0	3	6	9	12		0	3	6	9	12
prase 1	84	80		6		Prase 1	88	83	77	74	79
prase 2	112	98		35	36	Prase 2		95	58	45	20
prase 3	127	91	38	25		Prase 3	93	73	58	53	45
prase 4	141	112	39	31		Prase 4	62	97	99	93	
prase 5	134	139	35	20		Prase 5	96	103	86	80	73
prase 6	32,3	163,2	221,4	223	295,4	Prase 6	93	89	57	13	
prase 7	24,4	78,9	149	139		Prase 7	74	86	81	89	66
prase 8	46,3	84	21	18	21	Prase 8	78	70	54	52	38
prase 9	91	75	33	5		Prase 9	73	63	57	39	40
prase 10	68	70	39	21		Prase 10	85	74	47	22	
Průměr	86,00	99,11	71,93	52,30	117,47	Průměr	82,44	83,30	67,40	56,00	51,6
SD	42,55	30,48	72,78	71,29	154,28	SD	11,41	13,06	17,03	27,48	21,52

Skupina ASJ-BAL						Skupina ASJ					
AMONIAK umol/l						AMONIAK umol/l					
hodina	0	3	6	9	12		0	3	6	9	12
prase 1	63	236		260		Prase 1					
prase 2	30,2	218	169	289	326	Prase 2					
prase 3	69,2	387	403	384	384	Prase 3	34,4	291,5	250	214,5	229,8
prase 4	80	294	368	462		Prase 4					529
prase 5	78,6	289,9	295,1	325,7		Prase 5					
prase 6	32,2	163,2	221,4	223	295,4	Prase 6		93	381	459	
prase 7	24,4	78,9	149,9	139		Prase 7		232	206,5	296,3	
prase 8	46,3	232,4	343,7	318,4	636,5	Prase 8	78,7		409,25	668,5	838,8
prase 9	34	117,7	260,5	842,1		Prase 9	23,3	101,9	128,7	199	310
prase 10	38,4	105,2	381,8	657	761	Prase 10	42,6	150,66	210,2	267,2	409,2
Průměr	49,63	212,23	288,04	390,02	480,58	Průměr	44,8	173,8	264,3	350,8	463,4
SD	21,14	97,09	93,54	212,96	206,43	SD	19,3	61,2	93,1	159,5	178,5

Tabulka 18: Detailní data skupin ASJ-BAL a ASJ u všech zvířat pro hodnoty Quick, a amoniak.

10. Diskuze

Celá problematika testování a využití metody BAL v experimentu se sestává z několika částí:

- 1) vhodný model ASJ
- 2) zdroj hepatocytů a jejich izolace
- 3) funkční extrakorporální systém cirkulace s bioreaktorem (BAL)
- 4) monitorace, zpracování výsledků a zhodnocení efektivity léčby

10.1. Model akutního jaterního selhání

Experimentální model ASJ na velkém zvířeti je nutný ke studiu patofyziologických dějů spojených se selháním jater a k testování extrakorporálních eliminačních metod.

K vytvoření modelu ASJ je možné použít některých toxických chemických látek nebo ho lze vytvořit chirurgicky. V prvním případě byla vyzkoušena řada toxinů. V posledních 30 let je nejčastěji užíván galaktosamin⁸⁴ a acetoaminophen⁸⁵. Chemické modely jsou jednoduše proveditelné, reverzibilní a aplikace toxinů má předpověditelné účinky. Mají však mnoho nevýhod. Při užití galaktosaminu to jsou především jeho významné extrahepatální účinky, absence klinického ekvivalentu a vysoká cena. U acetoaminophenu je nestálé terapeutické okno, špatná reprodukovatelnost pokusu narozdíl od chirurgických modelů a významná anémie zvířete⁷⁵. Toxin přetrvává v organismu po dobu 12 hodin od podání^{86, 87}, což může znemožnit využití eliminační biologické metody v léčbě ASJ. Nevýhodou chemických modelů je možnost kontaminace personálu toxiny.

Existují 2 základní postupy k vytvoření chirurgického modelu ASJ: anhepatický a devaskularizační.

Chirurgický model byl poprvé proveden v roce 1886 Minkowskim⁷⁵. U hepatektomovaného zvířete pozoroval křeče a následné koma. Tento pokus byl základem pro anhepatický model ASJ u laboratorního zvířete. Principem je zachování průtoku v povodí dolní duté žíly s napojením v. portae pomocí trojcestného katétru²⁹. Absence nekrotické jaterní tkáně v organismu způsobí, že rozvoj ASJ nemá korelát v humánní medicíně (narozdíl od devaskularizačního modelu): nedochází k vzestupu sérových hladin aromatických aminokyselin (methionin, tyrosin a fenylalanin, tryptofan)⁸⁸. Další nevýhodou tohoto modelu je krevní ztráta spojená s hepatektomií, častá nutnost krevních převodů

ovlivňujících stupeň ASJ ⁷⁶. Přežití experimentálních zvířat se navíc neliší od modelu devaskularizačního ⁷⁶.

Devaskularizační model byl poprvé popsán Rappaportem^{89, 90} a Gigesem v roce 1953 ⁹¹. Bývá obvykle proveden založením portokavální anastomózy (PCA) s následnou ligaturou hepatické artérie (HAL) ^{77, 78}. Tento základní postup je modifikován způsobem provedení HAL. Pokud se hepatická artérie zkomprimujeme pouze po určitou dobu, můžeme se vyhnout ireversibilitě ASJ ⁹². U nás se metabolickými změnami u ASJ a dočasnou ischemizací jater u psa jako modelem akutního jaterního selhání zabýval Horák ⁹³⁻⁹⁵. Prokázal výhody ischemického modelu oproti toxickému.

Při devaskularizaci jater a provedení PCA nedochází ke krevním ztrátám. Přítomnost nekrotické jaterní tkáně vede ke srovnatelnému průběhu ASJ jako u člověka.

De Groot a spol.⁹² prezentoval skupinu 15 prasat, u kterých provedl PCA a dočasnou kompresi hepatické artérie. Ze 13 zvířat, které zhytnuly v intervalu od 20 – 50 hodin, pouze u osmi bylo příčinou smrti ASJ. Ve snaze dodržet všechny výše uvedené body popsal Benois se spol ⁹⁶ modifikovaný chirurgický model ASJ s dočasným uzávěrem hepatické artérie u 17 zvířat. 13x byl úspěšný a dosáhl osmihodinového terapeutického okna. Celkem 10 zvířat zhytnulo následkem jaterního komatu.

V současné době se začíná do popředí dostávat též model resekční. Jedná se o model experimentálního akutního selhání, u kterého je provedená velká jaterní resekce. Model je buď proveden tzv. jednodobě, kdy je provedena resekce > 80 - 85% jaterního parenchymu, nebo dvoudobě, kdy je k resekci připojena teplá ischemie zbytku jaterního parenchymu ⁹⁷. Tyto modely mají svoji důležitost vzhledem k podobnosti v klinice (jaterní selhání po velkých resekčních výkonech), avšak jejich nevýhodou oproti devaskularizačnímu modelu je horší reprodukovatelnost a značná variabilita průběhu jaterního selhání.

Pro náš experiment jsme zvolili model devaskularizační s provedením PCA a HAL v jedné době pro jeho jednoduchost a snadnou reprodukovatelnost.

Závažné poškození jater je běžně provázeno metabolickými poruchami. Výrazná hypoglykémie je důsledkem porušené glukoneogeneze, neschopnosti mobilizovat zásoby jaterního glykogenu a zvýšené hodnoty cirkulujícího inzulínu. U našeho modelu se v průměru po 4 hodinách po operaci miniprase dostalo do prohlubující se hypoglykémie pod hodnoty 3,5 mmol/l. Tento stav jsme zaznamenali jako nástup ASJ. Hypertonickou glukózu jsme podávali kontinuálně proto, abychom se vyhnuli prudkému zvýšení glykémie

při podávání bolusovém, které stimuluje uvolnění inzulínu. Zde pak nastupuje bludný kruh zvýšených dávek a vzestupů koncentrace inzulínu.

Monitorovali jsme laboratorní markery jaterního selhání – AST, Quickův test, laktát a amoniak. Za statisticky významný rozdíl mezi experimentální skupinou ASJ a kontrolní skupinou lze považovat pouze hodnoty AST, laktátu a amoniaku od 6. hodiny experimentu. Změny v hodnotách Quickova času nebyly shledány statisticky významné. Zatímco hypoglykémie nastupovala v experimentální skupině v průměru po uplynutí 4 hodin po ukončení operace, hodnoty AST, laktátu a amoniaku svědčily pro nástup ASJ až po šesti hodinách od konce operace. Při průměrném přežívání 13 hodin jsme získali 9 hodin trvající terapeutické okno. Tento interval považujeme za dostatečný k následnému testování eliminačních metod. Vzhledem k ireverzibilitě modelu nemůžeme hodnotit přežívání experimentálních zvířat. Efektivitu eliminačních metod můžeme posuzovat podle změn v laboratorních údajích. I když je ASJ velmi komplexním stavem, ireverzibilitu modelu nepovažujeme za jeho nevýhodu.

Dynamika ICP je považována za důležitý údaj v hodnocení průběhu a predikce ASJ. Měření ICP jsme provedli v jedné samostatné skupině 5 zvířat s ASJ (II.skupina). Při zavádění čidla jsme nezaznamenali větší krevní ztráty (do 1-2ml)⁹⁰.

10.2. Izolace hepatocytů

Jaterní buňky jsme izolovali pomocí metody jaterní perfuze ⁷⁹ s následnou centrifugací. Tuto metodu jsme zvolili především pro její snadnou proveditelnost a malou náročnost na technické vybavení. Někteří autoři používají metodu izolace s následným mražením podle Maganta ⁹⁸, které si po rozmražení ponechávají poměrně vysokou viabilitu dosahující 70 – 80 %. Ta však velmi rychle klesá pod 40 % ⁹⁹. Ani množství použitých hepatocytů k náplni bioreaktoru není u různých autorů totožné a pohybuje se řádově od 10⁹ po 10¹⁰ bez závislosti na váze experimentálního zvířete ^{30, 66, 99-102}.

Po provedení izolace dosahovala průměrná viabilita hepatocytů 85 %. Tuto hodnotu jsme považovali v souladu s literárními údaji za dostatečnou ^{22, 82}. Mikroskopicky hodnotit procento živých hepatocytů v samotném bioreaktoru během terapie je nemožné. Proto jsme viabilitu ověřili pomocí konzumpce kyslíku v plazmě při průchodu bioreaktorem. V hodinových intervalech jsme prováděli vyšetření parciálního tlaku kyslíku ze vzorku odebraných před a po průchodu bioreaktorem. Získaná data potvrzují, že v průběhu terapie, tj. po průměrnou dobu 5 hod. 43 min. (3 hod.25 min. – 8 hod. 10 min.) si

hepatocyty životaschopnost uchovaly v průměru prvních 5 hodin. Potom soudě podle výrazně snížené konzumpce kyslíku, se jejich viabilita se snižovala.

10.3. BAL

Námi použitý systém se skládal s třídímní bioreaktoru zapojeného do okruhu extrakorporálního podpůrného systému přístroje O.Liver performer (Rand, Itálie) ⁵³ s plazmafiltrací, hemofiltrací a integrovaným oxygenátorem. Vzhledem k malému průtoku kanylovaných cév byla rychlost plazmafiltračního okruhu 150 ml/min. V nezávislém okruhu s oxygenátorem, zahříváčem plazmy a bioreaktorem byla rychlost průtoku 50 ml/min. Samotný bioreaktor byl naplněn 200 ml suspenze obsahující 80 gramů izolovaných hepatocytů v souladu s výrobcem. Okamžitě po naplnění byl bioreaktor zchlazen na 4°C a uchován při této teplotě do doby použití. Tím byly aktivně sníženy metabolické nároky jaterních buněk, které si tak zachovaly vyšší viabilitu. Doba terapie trvala v průměru 5 hodin a 43 minut, což jsme považovali v souladu s literárními zdroji ^{29, 53, 103} za dostatečné. K volbě uvedených komponentů BAL nás nutily především následující důvody:

- 1 – snadná dostupnost živých čerstvých porcinních hepatocytů,
- 2 – relativní jednoduchost jejich izolace s dosažením vysoké viability,
- 3 – provedení pilotního pokusu, jenž by byl srovnatelný s již publikovanými výsledky experimentálních studií,
- 4 – volba metody, která by mohla být srovnávána s již publikovanými klinickými studii a potenciálně aplikovatelná v klinickém experimentu.

10.4. Pooperační monitorace a léčba

Výsledky našeho měření jsme zpracovávali standardním srovnáváním dvou souborů nezávislých výběrů.

Výsledky statistického zpracování naměřených hodnot laboratorních ukazatelů ASJ ve skupině BAL a kontrolní skupiny lze následovně shrnout:

- 1) aktivita AST, koncentrace amoniaku a hodnota Quickova času se signifikantně nelišily v obou skupinách,

2) koncentrace bilirubinu byla signifikantně nižší ve skupině s léčbou pomocí BAL, a to v 6. a 9. a 12 hodině ve prospěch skupiny s BAL, ve 3. hodině naopak v její neprospěch

3) naměřené hodnoty ICP se v obou skupinách signifikantně nelišily, i když po 9. hodině nelze trend naměřených hodnot posuzovat pro blížící se ukončení experimentu.

Ve většině experimentálních studií autoři prokazují snížení hladin amoniaku, koncentrace bilirubinu a hodnot nitrolebního tlaku u skupiny léčených BAL^{99, 100}. Cuervas-Mons se spoluautory uvádí v randomizované studii s 53 zvířaty signifikantně delší přežívání a snížení ICP při léčbě ASJ pomocí BAL ve srovnání s kontrolní skupinou⁹⁹. K experimentu však použili model s parciální resekci jaterního parenchymu, který vede k 86 % mortalitě v průběhu prvních 4 dnů. Při léčbě bioreaktorem s použitím 0.6×10^9 hepatocytů došlo v některých časových bodech k signifikantnímu snížení sérových hladin bilirubinu a protrombinu, k signifikantnímu zvýšení glykémie a albuminu. Celkově však signifikantních rozdílů v sérových hladinách AST, laktát dehydrogenázy, bilirubinu, albuminu, glukózy a protrombinu dosaženo nebylo. ICP byl u bioreaktorem léčené skupiny nižší. Po léčbě bioreaktorem byla mortalita 56 % ve srovnání s kontrolní skupinou, kde dosáhla 88 %. Všechna zvířata exitovala v průběhu prvních 3 dní.

Výrazně lepších výsledků dosáhl Sheil se spolupracovníky¹⁰⁴. Provedli obdobný experiment na skupině 5 miniprasat s použitím systému BALLS (bioartificial liver support) s hepatocyty v množství 2.5×10^{10} s viabilitou cca 30 hodin, v kombinaci s dialýzou. Konstatovali snížení hladin amoniaku, aminových kyselin a ICP v léčené skupině.

Obdobného zlepšení laboratorních ukazatelů ASJ u prasat s ASJ dosáhl Sosef²⁹ a Naka¹⁰⁵, kteří pozorovali signifikantního prodloužení života a snížení hladiny amoniaku. Zvýšené hodnoty bilirubinu vysvětlují důsledkem jeho extrahepatické konjugace. K experimentu však použili hepatektomovaná zvířata, kdy rozvoj a především průběh ASJ není srovnatelný s průběhem ASJ u člověka.

Skutečnost, proč jsme v naší sestavě nedosáhli literárně uváděného signifikantního zlepšení většiny laboratorních ukazatelů ASJ a hodnot ICP, je možné vysvětlit řadou faktorů, které ovlivňují výsledek pokusu:

1) Fyziologická nejednotnost jednotlivých laboratorních zvířat jejich rozdílné reakce na stres z operačního zákroku.

2) Viabilita hepatocytů, která postupně v průběhu perfuze bioreaktoru plazmou klesá. Dle sledované konzumce kyslíku nedosahovala požadovaná životnost celých 6 hodin terapie.

3) Použité množství hepatocytů v suspenzi mohlo být vzhledem k váze experimentálního zvířete s ASJ nedostatečné. V tomto bodě jsme byli omezeni výrobními parametry bioreaktoru, u kterého hrozí při pokusu o naplnění větším množstvím buněk ucpání kapilár. I když není mezi autory doposud shody, množství viabilních hepatocytů v bioreaktoru považujeme za zásadní a námi použitých 80 gramů v suspenzi za nedostatečné¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Z těchto důvodů považujeme v souladu s názorem Sheila a spol.¹⁰⁴ velikost použitého bioreaktoru za nevyhovující.

4) Monitorace měla být prováděna po delší dobu. Zde je omezující ireverzibilita námi zvoleného modelu. Ten se ovšem na druhé straně na rozdíl od modelů hepatektomovaných zvířat²⁹ daleko více blíží klinickému průběhu ASJ s vyplavením vasoaktivních substancí a ostatních toxických látek z nekrotických částí jater do oběhu nemocného. Možností změnit ireverzibilitu modelu je použití resekčního modelu. Resekční model má však nevýhodu v jeho špatné reprodukovatelnosti a ve variabilním průběhu vlastního jaterního selhání. V současné době (r. 2011) však tento model na našem pracovišti testujeme.

5) Výběr parametrů k monitoraci průběhu ASJ před i po nasazení léčby považujeme v souladu s literaturou^{53, 99, 105, 108} za vhodný. Měření hodnot intrakraniálního tlaku považujeme za zásadní vzhledem ke skutečnosti, že především ovlivnění této hodnoty by mělo mít finálně vliv na hodnocení metody BAL jak v experimentu²², tak i v klinice⁶.

11. Závěr

Vedlejší cíle:

1. Vytvořit model akutního jaterního selhání na laboratorním zvířeti - praseti, vhodný k testování biologické eliminační metody.

Podařilo se vytvořit funkční, reprodukovatelný a klinicky relevantní model akutního jaterního selhání na minipraseti. Tento model akutního selhání lze úspěšně použít v testování ostatních eliminačních metod. Model akutního jaterního selhání devaskularizační metodou jsme následně úspěšně použili v jiné studii v testování arteficiální podpory jater - systému Prométheus (FPSA).

2. Zvládnutí nácviku izolace hepatocytů a plnění bioreaktoru (kapsle).

Zdařilo se provést izolaci jaterních prasečích buněk. Dosáhli jsme v našem experimentu iniciační viability 85% čerstvých hepatocytů a prokázali jsme přežívání hepatocytů po téměř celou dobu, kdy byly použity v bioreaktoru.

Izolace jaterních buněk, včetně potkanních se stala na našem pracovišti rutinní metodou.

3. Zvládnutí napojení zvířete na eliminační metodu a provedení vlastní bioeliminace.

Úspěšně jsme zvládli nácvik sestavení a prokázali jsme funkčnost zapojení eliminační metody – BAL.

Hlavní cíl:

Zhodnotit účinek biologické eliminační metody – perfuzi plazmy přes izolované živé hepatocyty (BAL) u akutního selhání jater v experimentu na minipraseti.

Výsledky neprokázaly signifikantní změny hodnot laboratorních ukazatelů ASJ, kromě sérových hodnot bilirubínu. Naměřené hodnoty nitrolebního tlaku se statisticky významně nelišily ve skupině s léčbou akutního selhání jater pomocí BAL a ve skupině s akutním selháním jater bez napojení na BAL.

Získané zkušenosti umožňují v experimentální práci s BAL dále pokračovat obzvláště se zaměřením na technické rozšíření kapacity bioreaktoru pro prasečí hepatocyty.

12. Seznam Vyobrazení a tabulek

Srovnáno dle vyobrazení v textu

Tabulka 1: Etiologie ASJ (Trunečka¹⁰⁹)

Tabulka 2: „King's College Criteria“.

Obrázek 1: Schema systému MARS (zdroj: Teraklin®)

Obrázek 2 : Schéma systému FPSA - Prométhéus® (zdroj: Fresenius®)

Obrázek 3.: Schematické zapojení BAL systému (zdroj: medscape.com)

Tabulka 3: Konstrukce bioreaktorů použitých v experimentu na laboratorním zvířeti (upraveno dle Gerlach³⁰)

Tabulka 4: Konstrukce bioreaktorů použitých v klinických studiích (upraveno dle Gerlach³⁰)

Obrázek 4: Schematické znázornění bioreaktoru (zdroj: Demetriou)¹⁹:

Obrázek 5: Bioreaktor ELAD (zdroj: Vitagen®)

Obrázek 6: Stavba a průřez kapsle bioreaktoru AMC-BAL (zdroj: Hep-Art®)

Obrázek 7: Bioreaktor Modular Extracorporeal Liver System - MELS® (zdroj: Charité Berlin)

Obrázek 8: Bioreaktor Performer OLiver (zdroj: Rand®)

Tabulka 5: Chemické modely ASJ

Tabulka 6: Výhody a nevýhody chemických metod ASJ ⁷³.

Obrázek 9: schematické znázornění devaskularizačního (vlevo) a anhepatického (vpravo) modelu ASJ.

Tabulka 7: Chirurgické modely ASJ

Tabulka 8: Výhody a nevýhody chirurgických metod ASJ ⁷³.

Obrázek 10: Endotracheální intubace, i.v., i.a. katetrizace.

Obrázek 11: Monitorace minipraste, detail na ICP čidlo.

Obrázek 11: Monitorace miniprasete, detail na ICP čidlo.

Obrázek 13: Počátek in-situ perfuze jater.

Tabulka 9: Schema přípravy a složení roztoků pro perfuzi jater.

Obrázek 14: Perfuze jater cestou v. portae in vitro ve vodní lázni.

Obrázek 15: Rozrušení pouzdra jater, filtrace suspenze jater.

Obrázek 16: Suspenze izolovaných hepatocytů po opakované centrifugaci.

Obrázek 17: Shluky hepatocytů.

Obrázek 18: Kapsle bioreaktoru naplněná hepatocyty a zchlazená na 4 °C.

Obrázek 19: Připravena kapsle bioreaktoru k použití.

Obrázek 20: Schematické znázornění celého procesu izolace hepatocytů a plnění kapsle

Obrázek 21: Příklad O. liver Performer (fy Rand, Itálie) se zapojením bioreaktoru

Obrázek 22: Zapojení systému BAL, monitorace.

Graf 1: Délka přežívání laboratorních zvířat skupiny ASJ s vyznačením začátku hypoglykémie (modrá křivka)

Tabulka 10: Průměrné hodnoty jednotlivých laboratorních ukazatelů ASJ s vyznačenou významností a směrodatnou odchylkou u skupiny s ASJ (1.skupina) a skupiny kontrolní (3.skupina).

Graf 2: Srovnání průměrných hodnot AST u laboratorních zvířat skupiny ASJ s kontrolní skupinou.

Graf 3: Srovnání průměrných hodnot Laktátu u laboratorních zvířat skupiny ASJ s kontrolní skupinou.

Graf 4: Srovnání průměrných hodnot Quick u laboratorních zvířat skupiny ASJ s kontrolní skupinou.

Graf 5: Srovnání průměrných hodnot Amoniaku u laboratorních zvířat skupiny ASJ s kontrolní skupinou.

Tabulka 11, Graf 6: Srovnání průměrných hodnot AST u laboratorních zvířat léčených pomocí BAL s kontrolní skupinou, včetně směrodatné odchylky.

Tabulka 12, Graf 7: Srovnání průměrných hodnot Bilirubinu u laboratorních zvířat léčených pomocí BAL s kontrolní skupinou, včetně směrodatné odchylky.

Tabulka 13, Graf 8: Srovnání průměrných hodnot Quick u laboratorních zvířat léčených pomocí BAL s kontrolní skupinou, včetně směrodatné odchylky.

Tabulka 14, Graf 9: Srovnání průměrných hodnot amoniaku u laboratorních zvířat léčených pomocí BAL s kontrolní skupinou, včetně směrodatné odchylky.

Tabulka 15: Průměrné hodnoty parciálního tlaku kyslíku před bioreaktorem a za ním v průběhu perfuze (v mm Hg sloupce)

Tabulka 16, Graf 10: Srovnání hodnot ICP ve skupině zvířat s ASJ léčeným pomocí BAL a v kontrolní skupině

Tabulka 17: Detailní data skupin ASJ-BAL a ASJ u všech zvířat pro hodnoty AST, Bilirubinu

Tabulka 18: Detailní data skupin ASJ-BAL a ASJ u všech zvířat pro hodnoty Quick, Amoniak.

Literatura (dle ČSN ISO 690):

1. Bernuau, J. - Rueff, B. - Benhamou, J. P. Fulminant and subfulminant liver failure: definitions and causes. *Semin Liver Dis*, 1986, Vol. 6, No. 2, s. 97-106.
2. Trey, C. - Davidson, C. S. The management of fulminant hepatic failure. *Prog Liver Dis*, 1970, Vol. 3, No., s. 282-98.
3. O'Grady, J. G. - Williams, R. Acute liver failure. *Baillieres Clin Gastroenterol*, 1989, Vol. 3, No. 1, s. 75-89.
4. Williams, R. Classification, etiology, and considerations of outcome in acute liver failure. *Semin Liver Dis*, 1996, Vol. 16, No. 4, s. 343-8.
5. Griffith, H. W., Griffith's 5 minute clinical consult. In Williams & Wilkins: Baltimore, 1996; p v.
6. O'Grady, J. G. - Alexander, G. J. - Hayllar, K. M. - Williams, R. Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology*, 1989, Vol. 97, No. 2, s. 439-45.
7. Nečas, E. - kol., a., *Patologická fyziologie orgánových systémů, část II. 1. vyd.* Nakladatelství Karolinum: Praha, 2006; p 760.
8. Trunečka, P. Jaterní selhání. <http://www.cls.cz/dokumenty2/os/t237.rtf> (19.6.2009),
9. Belghiti, J. - Sommacale, D. - Dondero, F. - Zinzindohoue, F. - Sauvanet, A. - Durand, F. Auxiliary liver transplantation for acute liver failure. *HPB (Oxford)*, 2004, Vol. 6, No. 2, s. 83-7.
10. Chenard-Neu, M. P. - Boudjema, K. - Bernuau, J. - Degott, C. - Belghiti, J. - Cherqui, D. - Costes, V. - Domergue, J. - Durand, F. - Erhard, J. - De Hemptinne, B. - Gubernatis, G. - Hadengue, A. - Kemnitz, J. - McCarthy, M. - Maschek, H. - Mentha, G. - Oldhafer, K. - Portmann, B. - Praet, M. - Ringers, J. - Rogiers, X. - Rubbia, L. - Schalm, S. - Bellocq, J. P. - et al. Auxiliary liver transplantation: regeneration of the native liver and outcome in 30 patients with fulminant hepatic failure--a multicenter European study. *Hepatology*, 1996, Vol. 23, No. 5, s. 1119-27.
11. Trunečka, P. Indikace k transplantaci jater. <http://www.transplant.cz/transplant/postupy.php?t=4> (4.6.2009),
12. Knaus, W. A. - Draper, E. A. - Wagner, D. P. - Zimmerman, J. E. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med*, 1985, Vol. 13, No. 10, s. 818-29.

13. Bailey, B. - Amre, D. K. - Gaudreault, P. Fulminant hepatic failure secondary to acetaminophen poisoning: a systematic review and meta-analysis of prognostic criteria determining the need for liver transplantation. *Crit Care Med*, 2003, Vol. 31, No. 1, s. 299-305.
14. Stange, J. - Mitzner, S. R. - Risler, T. - Erley, C. M. - Lauchart, W. - Goehl, H. - Klammt, S. - Peszynski, P. - Freytag, J. - Hickstein, H. - Lohr, M. - Liebe, S. - Schareck, W. - Hopt, U. T. - Schmidt, R. Molecular adsorbent recycling system (MARS): clinical results of a new membrane-based blood purification system for bioartificial liver support. *Artif Organs*, 1999, Vol. 23, No. 4, s. 319-30.
15. Stange, J. - Ramlow, W. - Mitzner, S. - Schmidt, R. - Klinkmann, H. Dialysis against a recycled albumin solution enables the removal of albumin-bound toxins. *Artif Organs*, 1993, Vol. 17, No. 9, s. 809-13.
16. Falkenhagen, D. - Strobl, W. - Vogt, G. - Schrefl, A. - Linsberger, I. - Gerner, F. J. - Schoenhofen, M. Fractionated plasma separation and adsorption system: a novel system for blood purification to remove albumin bound substances. *Artif Organs*, 1999, Vol. 23, No. 1, s. 81-6.
17. Matsumura, K. N. - Guevara, G. R. - Huston, H. - Hamilton, W. L. - Rikimaru, M. - Yamasaki, G. - Matsumura, M. S. Hybrid bioartificial liver in hepatic failure: preliminary clinical report. *Surgery*, 1987, Vol. 101, No. 1, s. 99-103.
18. Abouna, G. M. - Ganguly, P. K. - Hamdy, H. M. - Jabur, S. S. - Tweed, W. A. - Costa, G. Extracorporeal liver perfusion system for successful hepatic support pending liver regeneration or liver transplantation: a pre-clinical controlled trial. *Transplantation*, 1999, Vol. 67, No. 12, s. 1576-83.
19. Demetriou, A. A. - Brown, R. S., Jr. - Busuttil, R. W. - Fair, J. - McGuire, B. M. - Rosenthal, P. - Am Esch, J. S., 2nd - Lerut, J. - Nyberg, S. L. - Salizzoni, M. - Fagan, E. A. - de Hemptinne, B. - Broelsch, C. E. - Muraca, M. - Salmeron, J. M. - Rabkin, J. M. - Metselaar, H. J. - Pratt, D. - De La Mata, M. - McChesney, L. P. - Everson, G. T. - Lavin, P. T. - Stevens, A. C. - Pitkin, Z. - Solomon, B. A. Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. *Ann Surg*, 2004, Vol. 239, No. 5, s. 660-7; discussion 667-70.
20. Filipponi, F. - Boggi, U. - Meacci, L. - Burchielli, S. - Vistoli, F. - Bellini, R. - Prota, C. - Colizzi, L. - Kusmic, C. - Campani, D. - Gneri, C. - Trivella, M. G. - Mosca, F. A

- new technique for total hepatectomy in the pig for testing liver support devices. *Surgery*, 1999, Vol. 125, No. 4, s. 448-55.
21. Jalan, R. - Sen, S. - Steiner, C. - Kapoor, D. - Alisa, A. - Williams, R. Extracorporeal liver support with molecular adsorbents recirculating system in patients with severe acute alcoholic hepatitis. *J Hepatol*, 2003, Vol. 38, No. 1, s. 24-31.
 22. Khalili, T. M. - Navarro, A. - Ting, P. - Kamohara, Y. - Arkadopoulos, N. - Solomon, B. A. - Demetriou, A. A. - Rozga, J. Bioartificial liver treatment prolongs survival and lowers intracranial pressure in pigs with fulminant hepatic failure. *Artif Organs*, 2001, Vol. 25, No. 7, s. 566-70.
 23. Naruse, K. - Makuuchi, M. Development and perspectives of bioartificial liver support. *Hepatogastroenterology*, 2002, Vol. 49, No. 43, s. 91-5.
 24. Naruse, K. - Tang, W. - Makuuch, M. Artificial and bioartificial liver support: a review of perfusion treatment for hepatic failure patients. *World J Gastroenterol*, 2007, Vol. 13, No. 10, s. 1516-21.
 25. Ryska, M. - Laszikova, E. - Pantoflicek, T. - Kieslichova, E. - Ryska, O. - Prazak, J. - Koblihova, E. - Skibova, J. [Biological and non-biological elimination therapy of acute liver failure. Experimental study on large laboratory animal]. *Cas Lek Cesk*, 2008, Vol. 147, No. 7, s. 367-75.
 26. Stange, J. - Mitzner, S. R. - Klammt, S. - Freytag, J. - Peszynski, P. - Loock, J. - Hickstein, H. - Korten, G. - Schmidt, R. - Hentschel, J. - Schulz, M. - Lohr, M. - Liebe, S. - Schareck, W. - Hopt, U. T. Liver support by extracorporeal blood purification: a clinical observation. *Liver Transpl*, 2000, Vol. 6, No. 5, s. 603-13.
 27. Vilei, M. T. - Granato, A. - Ferrareso, C. - Neri, D. - Carraro, P. - Gerunda, G. - Muraca, M. Comparison of pig, human and rat hepatocytes as a source of liver specific metabolic functions in culture systems--implications for use in bioartificial liver devices. *Int J Artif Organs*, 2001, Vol. 24, No. 6, s. 392-6.
 28. Paradis, K. - Langford, G. - Long, Z. - Heneine, W. - Sandstrom, P. - Switzer, W. M. - Chapman, L. E. - Lockey, C. - Onions, D. - Otto, E. Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. *Science*, 1999, Vol. 285, No. 5431, s. 1236-41.
 29. Sosef, M. N. - Abrahamse, L. S. - van de Kerkhove, M. P. - Hartman, R. - Chamuleau, R. A. - van Gulik, T. M. Assessment of the AMC-bioartificial liver in the anhepatic pig. *Transplantation*, 2002, Vol. 73, No. 2, s. 204-9.

30. Gerlach, J. C. Bioreactors for extracorporeal liver support. *Cell Transplant*, 2006, Vol. 15 Suppl 1, No., s. S91-103.
31. Smrzova, J. - Lata, J. - Simanek, V. - Ulrichova, J. [The bioartificial liver--an alternative in the treatment of acute liver failure]. *Vnitr Lek*, 2000, Vol. 46, No. 4, s. 218-24.
32. Bartosikova, L. - Necas, J. - Suchy, V. - Jankovska, D. - Janostikova, E. - Bartosik, T. - Klusakova, J. - Jurica, J. - Florian, T. - Frydrych, M. - Krcmar, J. - Frana, P. - Franova, J. [Morin in the therapy of the ischemia-reperfusion damage model of the rat kidney]. *Ceska Slov Farm*, 2006, Vol. 55, No. 2, s. 78-83.
33. Kobayashi, N. - Okitsu, T. - Tanaka, N. Cell choice for bioartificial livers. *Keio J Med*, 2003, Vol. 52, No. 3, s. 151-7.
34. Mitry, R. R. - Hughes, R. D. - Aw, M. M. - Terry, C. - Mieli-Vergani, G. - Girlanda, R. - Muiesan, P. - Rela, M. - Heaton, N. D. - Dhawan, A. Human hepatocyte isolation and relationship of cell viability to early graft function. *Cell Transplant*, 2003, Vol. 12, No. 1, s. 69-74.
35. Morsiani, E. - Brogli, M. - Galavotti, D. - Pazzi, P. - Puviani, A. C. - Azzena, G. F. Biologic liver support: optimal cell source and mass. *Int J Artif Organs*, 2002, Vol. 25, No. 10, s. 985-93.
36. Nerem, R. M. Cell-based therapies: from basic biology to replacement, repair, and regeneration. *Biomaterials*, 2007, Vol. 28, No. 34, s. 5074-7.
37. Poyck, P. P. - Hoekstra, R. - van Wijk, A. C. - Attanasio, C. - Calise, F. - Chamuleau, R. A. - van Gulik, T. M. Functional and morphological comparison of three primary liver cell types cultured in the AMC bioartificial liver. *Liver Transpl*, 2007, Vol. 13, No. 4, s. 589-98.
38. Stange, J. - Mitzner, S. Cell sources for bioartificial liver support. *Int J Artif Organs*, 1996, Vol. 19, No. 1, s. 14-7.
39. Ellis, A. J. - Hughes, R. D. - Wendon, J. A. - Dunne, J. - Langley, P. G. - Kelly, J. H. - Gislason, G. T. - Sussman, N. L. - Williams, R. Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Hepatology*, 1996, Vol. 24, No. 6, s. 1446-51.
40. Dahlke, M. H. - Popp, F. C. - Larsen, S. - Schlitt, H. J. - Rasko, J. E. Stem cell therapy of the liver--fusion or fiction? *Liver Transpl*, 2004, Vol. 10, No. 4, s. 471-9.

41. Abdel Aziz, M. T. - Atta, H. M. - Mahfouz, S. - Fouad, H. H. - Roshdy, N. K. - Ahmed, H. H. - Rashed, L. A. - Sabry, D. - Hassouna, A. A. - Hasan, N. M. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. *Clin Biochem*, 2007, Vol. 40, No. 12, s. 893-9.
42. Aquino, J. B. - Bolontrade, M. F. - Garcia, M. G. - Podhajcer, O. L. - Mazzolini, G. Mesenchymal stem cells as therapeutic tools and gene carriers in liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Gene Ther*, 2010, Vol. 17, No. 6, s. 692-708.
43. Chamuleau, R. A. Artificial liver support in the third millennium. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 2003, Vol. 31, No. 2, s. 117-26.
44. Chamuleau, R. A. - Deurholt, T. - Hoekstra, R. Which are the right cells to be used in a bioartificial liver? *Metab Brain Dis*, 2005, Vol. 20, No. 4, s. 327-35.
45. Chang, Y. J. - Liu, J. W. - Lin, P. C. - Sun, L. Y. - Peng, C. W. - Luo, G. H. - Chen, T. M. - Lee, R. P. - Lin, S. Z. - Harn, H. J. - Chiou, T. W. Mesenchymal stem cells facilitate recovery from chemically induced liver damage and decrease liver fibrosis. *Life Sci*, 2009, Vol. 85, No. 13-14, s. 517-25.
46. Cho, C. H. - Parashurama, N. - Park, E. Y. - Suganuma, K. - Nahmias, Y. - Park, J. - Tilles, A. W. - Berthiaume, F. - Yarmush, M. L. Homogeneous differentiation of hepatocyte-like cells from embryonic stem cells: applications for the treatment of liver failure. *FASEB J*, 2008, Vol. 22, No. 3, s. 898-909.
47. Tilles, A. W. - Berthiaume, F. - Yarmush, M. L. - Tompkins, R. G. - Toner, M. Bioengineering of liver assist devices. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2002, Vol. 9, No. 6, s. 686-96.
48. Uchino, J. - Tsuburaya, T. - Kumagai, F. - Hase, T. - Hamada, T. - Komai, T. - Funatsu, A. - Hashimura, E. - Nakamura, K. - Kon, T. A hybrid bioartificial liver composed of multiplated hepatocyte monolayers. *ASAIO Trans*, 1988, Vol. 34, No. 4, s. 972-7.
49. Shito, M. - Tilles, A. W. - Tompkins, R. G. - Yarmush, M. L. - Toner, M. Efficacy of an extracorporeal flat-plate bioartificial liver in treating fulminant hepatic failure. *J Surg Res*, 2003, Vol. 111, No. 1, s. 53-62.
50. Mazariegos, G. V. - Patzer, J. F., 2nd - Lopez, R. C. - Giraldo, M. - Devera, M. E. - Grogan, T. A. - Zhu, Y. - Fulmer, M. L. - Amiot, B. P. - Kramer, D. J. First clinical use of a novel bioartificial liver support system (BLSS). *Am J Transplant*, 2002, Vol. 2, No. 3, s. 260-6.

51. Hoque, M. E. - Mao, H. Q. - Ramakrishna, S. Hybrid braided 3-D scaffold for bioartificial liver assist devices. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2007, Vol. 18, No. 1, s. 45-58.
52. Yu, C. B. - Pan, X. P. - Li, L. J. Progress in bioreactors of bioartificial livers. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2009, Vol. 8, No. 2, s. 134-40.
53. Borra, M. - Galavotti, D. - Bellini, C. - Fumi, L. - Morsiani, E. - Bellini, G. Advanced technology for extracorporeal liver support system devices. *Int J Artif Organs*, 2002, Vol. 25, No. 10, s. 939-49.
54. Chamuleau, R. A. - Poyck, P. P. - van de Kerkhove, M. P. Bioartificial liver: its pros and cons. *Ther Apher Dial*, 2006, Vol. 10, No. 2, s. 168-74.
55. Pless, G. - Sauer, I. M. Bioartificial liver: current status. *Transplant Proc*, 2005, Vol. 37, No. 9, s. 3893-5.
56. Poyck, P. P. - Pless, G. - Hoekstra, R. - Roth, S. - Van Wijk, A. C. - Schwartlander, R. - Van Gulik, T. M. - Sauer, I. M. - Chamuleau, R. A. In vitro comparison of two bioartificial liver support systems: MELS CellModule and AMC-BAL. *Int J Artif Organs*, 2007, Vol. 30, No. 3, s. 183-91.
57. van de Kerkhove, M. P. - Di Florio, E. - Scuderi, V. - Mancini, A. - Belli, A. - Bracco, A. - Dauri, M. - Tisone, G. - Di Nicuolo, G. - Amoroso, P. - Spadari, A. - Lombardi, G. - Hoekstra, R. - Calise, F. - Chamuleau, R. A. Phase I clinical trial with the AMC-bioartificial liver. *Int J Artif Organs*, 2002, Vol. 25, No. 10, s. 950-9.
58. van de Kerkhove, M. P. - Di Florio, E. - Scuderi, V. - Mancini, A. - Belli, A. - Bracco, A. - Scala, D. - Scala, S. - Zeuli, L. - Di Nicuolo, G. - Amoroso, P. - Calise, F. - Chamuleau, R. A. Bridging a patient with acute liver failure to liver transplantation by the AMC-bioartificial liver. *Cell Transplant*, 2003, Vol. 12, No. 6, s. 563-8.
59. van de Kerkhove, M. P. - Poyck, P. P. - Deurholt, T. - Hoekstra, R. - Chamuleau, R. A. - van Gulik, T. M. Liver support therapy: an overview of the AMC-bioartificial liver research. *Dig Surg*, 2005, Vol. 22, No. 4, s. 254-64.
60. Balasubramanian, S. K. - Cogger, R. N. Heat and mass transfer during the cryopreservation of a bioartificial liver device: a computational model. *ASAIO J*, 2005, Vol. 51, No. 3, s. 184-93.
61. Park, J. K. - Lee, D. H. Bioartificial liver systems: current status and future perspective. *J Biosci Bioeng*, 2005, Vol. 99, No. 4, s. 311-9.

62. Patzer, I. J. - Lopez, R. C. - Zhu, Y. - Wang, Z. F. - Mazariegos, G. V. - Fung, J. J. Bioartificial liver assist devices in support of patients with liver failure. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2002, Vol. 1, No. 1, s. 18-25.
63. Patzer, J. F., 2nd. Advances in bioartificial liver assist devices. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, Vol. 944, No., s. 320-33.
64. Sussman, N. L. - Chong, M. G. - Koussayer, T. - He, D. E. - Shang, T. A. - Whisennand, H. H. - Kelly, J. H. Reversal of fulminant hepatic failure using an extracorporeal liver assist device. *Hepatology*, 1992, Vol. 16, No. 1, s. 60-5.
65. Watanabe, F. D. - Mullon, C. J. - Hewitt, W. R. - Arkadopoulos, N. - Kahaku, E. - Eguchi, S. - Khalili, T. - Arnaout, W. - Shackleton, C. R. - Rozga, J. - Solomon, B. - Demetriou, A. A. Clinical experience with a bioartificial liver in the treatment of severe liver failure. A phase I clinical trial. *Ann Surg*, 1997, Vol. 225, No. 5, s. 484-91; discussion 491-4.
66. Gerlach, J. C. - Botsch, M. - Kardassis, D. - Lemmens, P. - Schon, M. - Janke, J. - Puhl, G. - Unger, J. - Kraemer, M. - Busse, B. - Bohmer, C. - Belal, R. - Ingenlath, M. - Kosan, M. - Kosan, B. - Sultmann, J. - Patzold, A. - Tietze, S. - Rossaint, R. - Muller, C. - Monch, E. - Sauer, I. M. - Neuhaus, P. Experimental evaluation of a cell module for hybrid liver support. *Int J Artif Organs*, 2001, Vol. 24, No. 11, s. 793-8.
67. Gerlach, J. C. - Fuchs, M. - Smith, M. D. - Bornemann, R. - Encke, J. - Neuhaus, P. - Riedel, E. Is a clinical application of hybrid liver support systems limited by an initial disorder in cellular amino acid and alpha-keto acid metabolism, rather than by later gradual loss of primary hepatocyte function? *Transplantation*, 1996, Vol. 62, No. 2, s. 224-8.
68. Sauer, I. M. - Gerlach, J. C. Modular extracorporeal liver support. *Artif Organs*, 2002, Vol. 26, No. 8, s. 703-6.
69. Sauer, I. M. - Kardassis, D. - Zeillinger, K. - Pascher, A. - Gruenwald, A. - Pless, G. - Irgang, M. - Kraemer, M. - Puhl, G. - Frank, J. - Muller, A. R. - Steinmuller, T. - Denner, J. - Neuhaus, P. - Gerlach, J. C. Clinical extracorporeal hybrid liver support--phase I study with primary porcine liver cells. *Xenotransplantation*, 2003, Vol. 10, No. 5, s. 460-9.
70. Sauer, I. M. - Neuhaus, P. - Gerlach, J. C. Concept for modular extracorporeal liver support for the treatment of acute hepatic failure. *Metab Brain Dis*, 2002, Vol. 17, No. 4, s. 477-84.

71. Sauer, I. M. - Obermeyer, N. - Kardassis, D. - Theruvath, T. - Gerlach, J. C. Development of a hybrid liver support system. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, Vol. 944, No., s. 308-19.
72. Sauer, I. M. - Zeilinger, K. - Obermayer, N. - Pless, G. - Grunwald, A. - Pascher, A. - Mieder, T. - Roth, S. - Goetz, M. - Kardassis, D. - Mas, A. - Neuhaus, P. - Gerlach, J. C. Primary human liver cells as source for modular extracorporeal liver support--a preliminary report. *Int J Artif Organs*, 2002, Vol. 25, No. 10, s. 1001-5.
73. Terblanche, J. - Hickman, R. Animal models of fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci*, 1991, Vol. 36, No. 6, s. 770-4.
74. Smith, J. S. - Harrison, G. G. The effects of multiple anaesthetics on the livers of rats subjected to microsomal enzyme induction. A preliminary report. *S Afr Med J*, 1973, Vol. 47, No. 18, s. 797-9.
75. Newsome, P. N. - Plevris, J. N. - Nelson, L. J. - Hayes, P. C. Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation. *Liver Transpl*, 2000, Vol. 6, No. 1, s. 21-31.
76. Tonnesen, K. Experimental liver failure. A comparison between hepatectomy and hepatic devascularization in the pig. *Acta Chir Scand*, 1977, Vol. 143, No. 5, s. 271-7.
77. Hanid, M. A. - Davies, M. - Mellon, P. J. - Silk, D. B. - Strunin, L. - McCabe, J. J. - Williams, R. Clinical monitoring of intracranial pressure in fulminant hepatic failure. *Gut*, 1980, Vol. 21, No. 10, s. 866-9.
78. Hanid, M. A. - Mackenzie, R. L. - Jenner, R. E. - Chase, R. A. - Mellon, P. J. - Trewby, P. N. - Janota, I. - Davis, M. - Silk, D. B. - Williams, R. Intracranial pressure in pigs with surgically induced acute liver failure. *Gastroenterology*, 1979, Vol. 76, No. 1, s. 123-31.
79. Ryska, M. - Kieslichova, E. - Pantoflicek, T. - Ryska, O. - Zazula, R. - Skibova, J. [A model of acute hepatic failure in a minipig from the surgical and anesthesia point of view]. *Rozhl Chir*, 2004, Vol. 83, No. 9, s. 436-42.
80. Ryska, M. - Kieslichova, E. - Pantoflicek, T. - Ryska, O. - Zazula, R. - Skibova, J. - Hajek, M. Devascularization surgical model of acute liver failure in minipigs. *Eur Surg Res*, 2004, Vol. 36, No. 3, s. 179-84.
81. Ryska, M. - Laszikova, E. - Pantoflicek, T. - Ryska, O. - Prazak, J. - Koblihova, E. Fractionated plasma separation and adsorption significantly decreases intracranial

- pressure in acute liver failure: experimental study. *Eur Surg Res*, 2009, Vol. 42, No. 4, s. 230-5.
82. Seglen, P. O. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*, 1976, Vol. 13, No., s. 29-83.
83. Kieslichova, E. - Ryska, M. - Pantoflicek, T. - Ryska, O. - Zazula, R. - Skobova, J. Hemodynamic parameters in a surgical devascularization model of fulminant hepatic failure in the minipig. *Physiol Res*, 2005, Vol. 54, No. 5, s. 485-90.
84. Kalpana, K. - Ong, H. S. - Soo, K. C. - Tan, S. Y. - Prema Raj, J. An improved model of galactosamine-induced fulminant hepatic failure in the pig. *J Surg Res*, 1999, Vol. 82, No. 2, s. 121-30.
85. Miller, D. J. - Hickman, R. - Fratter, R. - Terblanche, J. - Saunders, S. J. An animal model of fulminant hepatic failure: a feasibility study. *Gastroenterology*, 1976, Vol. 71, No. 1, s. 109-13.
86. Sielaff, T. D. - Hu, M. Y. - Rollins, M. D. - Bloomer, J. R. - Amiot, B. - Hu, W. S. - Cerra, F. B. An anesthetized model of lethal canine galactosamine fulminant hepatic failure. *Hepatology*, 1995, Vol. 21, No. 3, s. 796-804.
87. Rasenack, J. - Koch, H. K. - Nowack, J. - Lesch, R. - Decker, K. Hepatotoxicity of D-galactosamine in the isolated perfused rat liver. *Exp Mol Pathol*, 1980, Vol. 32, No. 3, s. 264-75.
88. Mazziotti, A. - Bernardi, M. - Antonini, L. - Dioguardi, F. S. - Bellusci, R. - Papa, V. - Tacconi, C. - Gasbarrini, G. - Cavallari, A. - Possati, L. Plasma amino acid patterns in experimental acute hepatic failure: comparison between hepatectomy and liver devascularization in pigs. *Surgery*, 1981, Vol. 90, No. 3, s. 527-34.
89. Rappaport, A. M. - Borowy, Z. J. - Lotto, W. N. Experimental hepatic coma. *Surg Forum*, 1953, Vol., No. 38th Congress, s. 504-10.
90. Rappaport, A. M. - Macdonald, M. H. - Borowy, Z. J. Hepatic coma following ischemia of the liver. *Surg Gynecol Obstet*, 1953, Vol. 97, No. 6, s. 748-62.
91. Giges, B. - Dein, H. L. - Sborov, V. M. - Seligson, D. - Howard, J. M. Experimental hepatic coma. *Surg Gynecol Obstet*, 1953, Vol. 97, No. 6, s. 763-8.
92. de Groot, G. H. - Reuvers, C. B. - Schalm, S. W. - Boks, A. L. - Terpstra, O. T. - Jeekel, H. - ten Kate, F. W. - Bruinvels, J. A reproducible model of acute hepatic failure by transient ischemia in the pig. *J Surg Res*, 1987, Vol. 42, No. 1, s. 92-100.

93. Horak, J. - Horky, J. - Rabl, M. Haemoperfusion through activated charcoal in dogs with fulminant liver failure. *Digestion*, 1980, Vol. 20, No. 1, s. 22-30.
94. Horak, J. - Horky, J. - Ruzbarsky, V. [Temporary ischemia of the liver as a model of acute hepatic failure in the dog]. *Rozhl Chir*, 1980, Vol. 59, No. 4, s. 283-8.
95. Horak, W. [Liver cirrhosis]. *Pharm Unserer Zeit*, 1978, Vol. 7, No. 3, s. 63-74.
96. Benoist, S. - Sarkis, R. - Baudrimont, M. - Delelo, R. - Robert, A. - Vaubourdolle, M. - Balladur, P. - Calmus, Y. - Capeau, J. - Nordlinger, B. A reversible model of acute hepatic failure by temporary hepatic ischemia in the pig. *J Surg Res*, 2000, Vol. 88, No. 2, s. 63-9.
97. Ladurner, R. - Hochleitner, B. - Schneeberger, S. - Barnas, U. - Krismer, A. - Kleinsasser, A. - Offner, F. - Konigsrainer, I. - Margreiter, R. - Konigsrainer, A. Extended liver resection and hepatic ischemia in pigs: a new, potentially reversible model to induce acute liver failure and study artificial liver support systems. *Eur Surg Res*, 2005, Vol. 37, No. 6, s. 365-9.
98. Maganto, P. - Cienfuegos, J. A. - Santamaria, L. - Eroles, G. - Andres, S. - Castillo-Olivares, J. L. - Municio, A. M. Cryopreservation and transplantation of hepatocytes: an approach for culture and clinical application. *Cryobiology*, 1988, Vol. 25, No. 4, s. 311-22.
99. Cuervas-Mons, V. - Colas, A. - Rivera, J. A. - Prados, E. In vivo efficacy of a bioartificial liver in improving spontaneous recovery from fulminant hepatic failure: a controlled study in pigs. *Transplantation*, 2000, Vol. 69, No. 3, s. 337-44.
100. Flendrig, L. M. - Calise, F. - Di Florio, E. - Mancini, A. - Ceriello, A. - Santaniello, W. - Mezza, E. - Sicoli, F. - Belleza, G. - Bracco, A. - Cozzolino, S. - Scala, D. - Mazzone, M. - Fattore, M. - Gonzales, E. - Chamuleau, R. A. Significantly improved survival time in pigs with complete liver ischemia treated with a novel bioartificial liver. *Int J Artif Organs*, 1999, Vol. 22, No. 10, s. 701-9.
101. Gerlach, J. C. - Mutig, K. - Sauer, I. M. - Schrade, P. - Efimova, E. - Mieder, T. - Naumann, G. - Grunwald, A. - Pless, G. - Mas, A. - Bachmann, S. - Neuhaus, P. - Zeilinger, K. Use of primary human liver cells originating from discarded grafts in a bioreactor for liver support therapy and the prospects of culturing adult liver stem cells in bioreactors: a morphologic study. *Transplantation*, 2003, Vol. 76, No. 5, s. 781-6.

102. Gerlach, J. C. - Zeilinger, K. - Sauer, I. M. - Mieder, T. - Naumann, G. - Grunwald, A. - Pless, G. - Holland, G. - Mas, A. - Vienken, J. - Neuhaus, P. Extracorporeal liver support: porcine or human cell based systems? *Int J Artif Organs*, 2002, Vol. 25, No. 10, s. 1013-8.
103. Sosef, M. N. - Van De Kerkhove, M. P. - Abrahamse, S. L. - Levi, M. M. - Chamuleau, R. A. - Van Gulik, T. M. Blood coagulation in anhepatic pigs: effects of treatment with the AMC-bioartificial liver. *J Thromb Haemost*, 2003, Vol. 1, No. 3, s. 511-5.
104. Sheil, A. G. - Sun, J. - Wang, L. - Rao, N. - Mears, D. C. - Wang, C. - Woodman, K. - Johnston, B. - Watson, J. A biodialysis system for liver support tested in a porcine hepatic failure model. *Aust N Z J Surg*, 2000, Vol. 70, No. 2, s. 127-31.
105. Naka, S. - Takeshita, K. - Yamamoto, T. - Tani, T. - Kodama, M. Bioartificial liver support system using porcine hepatocytes entrapped in a three-dimensional hollow fiber module with collagen gel: An evaluation in the swine acute liver failure model. *Artif Organs*, 1999, Vol. 23, No. 9, s. 822-8.
106. Hayes, P. C. - Lee, A. What progress with artificial livers? *Lancet*, 2001, Vol. 358, No. 9290, s. 1286-7.
107. Busse, B. - Gerlach, J. C. Bioreactors for hybrid liver support: historical aspects and novel designs. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, Vol. 875, No., s. 326-39.
108. Busse, B. - Smith, M. D. - Gerlach, J. C. Treatment of acute liver failure: hybrid liver support. A critical overview. *Langenbecks Arch Surg*, 1999, Vol. 384, No. 6, s. 588-99.
109. Trunečka, P. Jaterní selhání. <http://www.cls.cz/dokumenty2/os/t237.rtf>
110. Flendrig, L. M. - la Soe, J. W. - Jorning, G. G. - Steenbeek, A. - Karlsen, O. T. - Bovee, W. M. - Ladiges, N. C. - te Velde, A. A. - Chamuleau, R. A. In vitro evaluation of a novel bioreactor based on an integral oxygenator and a spirally wound nonwoven polyester matrix for hepatocyte culture as small aggregates. *J Hepatol*, 1997, Vol. 26, No. 6, s. 1379-92.
111. Ding, F. - Humes, H. D. The bioartificial kidney and bioengineered membranes in acute kidney injury. *Nephron Exp Nephrol*, 2008, Vol. 109, No. 4, s. e118-22.
112. Humes, H. D. Bioartificial kidney for full renal replacement therapy. *Semin Nephrol*, 2000, Vol. 20, No. 1, s. 71-82.

113. Humes, H. D. - Fissell, W. H. - Weitzel, W. F. - Buffington, D. A. - Westover, A. J. - MacKay, S. M. - Gutierrez, J. M. Metabolic replacement of kidney function in uremic animals with a bioartificial kidney containing human cells. *Am J Kidney Dis*, 2002, Vol. 39, No. 5, s. 1078-87.
114. Calise, F. - Mancini, A. - Amoroso, P. - Belli, A. - Bracco, A. - Ceriello, A. - Di Florio, E. - Di Nicuolo, G. - Di Martino, A. - Maida, P. - Scala, D. - Zeuli, L. - Chamuleau, R. A. Functional evaluation of the AMC-BAL to be employed in a multicentric clinical trial for acute liver failure. *Transplant Proc*, 2001, Vol. 33, No. 1-2, s. 647-9.
115. Di Nicuolo, G. - van de Kerkhove, M. P. - Hoekstra, R. - Beld, M. G. - Amoroso, P. - Battisti, S. - Starace, M. - di Florio, E. - Scuderi, V. - Scala, S. - Bracco, A. - Mancini, A. - Chamuleau, R. A. - Calise, F. No evidence of in vitro and in vivo porcine endogenous retrovirus infection after plasmapheresis through the AMC-bioartificial liver. *Xenotransplantation*, 2005, Vol. 12, No. 4, s. 286-92.
116. Mareels, G. - Poyck, P. P. - Eloot, S. - Chamuleau, R. A. - Verdonck, P. R. Three-dimensional numerical modeling and computational fluid dynamics simulations to analyze and improve oxygen availability in the AMC bioartificial liver. *Ann Biomed Eng*, 2006, Vol. 34, No. 11, s. 1729-44.
117. Poyck, P. P. - Mareels, G. - Hoekstra, R. - van Wijk, A. C. - van der Hoeven, T. V. - van Gulik, T. M. - Verdonck, P. R. - Chamuleau, R. A. Enhanced oxygen availability improves liver-specific functions of the AMC bioartificial liver. *Artif Organs*, 2008, Vol. 32, No. 2, s. 116-26.
118. Henne-Bruns, D. - Artwohl, J. - Broelsch, C. - Kremer, B. Acetaminophen-induced acute hepatic failure in pigs: controversial results to other animal models. *Res Exp Med (Berl)*, 1988, Vol. 188, No. 6, s. 463-72.
119. Filipponi, F. - Fabbri, L. P. - Marsili, M. - Falcini, F. - Benassai, C. - Nucera, M. - Romagnoli, P. A new surgical model of acute liver failure in the pig: experimental procedure and analysis of liver injury. *Eur Surg Res*, 1991, Vol. 23, No. 1, s. 58-64.
120. Mundt, A. - Puhl, G. - Muller, A. - Sauer, I. - Muller, C. - Richard, R. - Fotopoulou, C. - Doll, R. - Gabelein, G. - Hohn, W. - Hofbauer, R. - Neuhaus, P. - Gerlach, J. A method to assess biochemical activity of liver cells during clinical application of extracorporeal hybrid liver support. *Int J Artif Organs*, 2002, Vol. 25, No. 6, s. 542-8.
121. Deurholt, T. - van Til, N. P. - Chhatta, A. A. - ten Bloemendaal, L. - Schwartzlander, R. - Payne, C. - Plevris, J. N. - Sauer, I. M. - Chamuleau, R. A. - Elferink, R. P. -

- Seppen, J. - Hoekstra, R. Novel immortalized human fetal liver cell line, cBAL111, has the potential to differentiate into functional hepatocytes. *BMC Biotechnol*, 2009, Vol. 9, No., s. 89.
122. Sauer, I. M. - Zeilinger, K. - Pless, G. - Kardassis, D. - Theruvath, T. - Pascher, A. - Goetz, M. - Neuhaus, P. - Gerlach, J. C. Extracorporeal liver support based on primary human liver cells and albumin dialysis--treatment of a patient with primary graft non-function. *J Hepatol*, 2003, Vol. 39, No. 4, s. 649-53.
123. Humes, H. D. Application of gene and cell therapies in the tissue engineering of a bioartificial kidney. *Int J Artif Organs*, 1996, Vol. 19, No. 4, s. 215-7.
124. Humes, H. D. Tissue engineering of a bioartificial kidney: a universal donor organ. *Transplant Proc*, 1996, Vol. 28, No. 4, s. 2032-5.
125. Humes, H. D. - Fissell, W. H. - Weitzel, W. F. The bioartificial kidney in the treatment of acute renal failure. *Kidney Int Suppl*, 2002, Vol., No. 80, s. 121-5.
126. Humes, H. D. - Weitzel, W. F. - Bartlett, R. H. - Swaniker, F. C. - Paganini, E. P. - Luderer, J. R. - Sobota, J. Initial clinical results of the bioartificial kidney containing human cells in ICU patients with acute renal failure. *Kidney Int*, 2004, Vol. 66, No. 4, s. 1578-88.
127. Gerlach, J. C. - Lemmens, P. - Schon, M. - Janke, J. - Rossaint, R. - Busse, B. - Puhl, G. - Neuhaus, P. Experimental evaluation of a hybrid liver support system. *Transplant Proc*, 1997, Vol. 29, No. 1-2, s. 852.
128. Gerlach, J. - Trost, T. - Ryan, C. J. - Meissler, M. - Hole, O. - Muller, C. - Neuhaus, P. Hybrid liver support system in a short term application on hepatectomized pigs. *Int J Artif Organs*, 1994, Vol. 17, No. 10, s. 549-53.