

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Hradci Králové

Použití hepatocytů v léčbě akutního jaterního selhání v experimentu

- na velkém laboratorním zvířeti

Tomáš Pantoflíček

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program Chirurgie

Hradec Králové, 2011

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Chirurgie na Katedře Chirurgie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor:

MUDr. Tomáš Pantoflíček

Chirurgická Klinika 2. LFUK a UVN Praha

školitel: doc. MUDr. Karel Šmejkal, CSc., Chirurgická Klinika, LF UK, Hradec Králové

školitel konzultant: prof. MUDr. Zuzana Červinková, CSc, Ústav Fyziologie, LF UK, Hradec Králové

Oponenti:

prof. MUDr. Vladimír Král, CSc. I. chirurgická klinika LF UP, Olomouc

prof. MUDr. Vladislav Třeška, DrSc., Chirurgická klinika LF UK, Plzeň

Tato práce vznikla za podpory výzkumného centra LN00A065 - Centrum buněčné terapie a tkáňových náhrad.

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

.....

Jméno, příjmení, tituly

Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Chirurgie

Obsah:

1. Souhrn	5
2. Cíl práce	7
3. Úvod	8
3.1. Úvod do problematiky	8
3.2. Akutní jaterní selhání	8
3.3. Léčba akutního jaterního selhání	9
3.4. Eliminační metody léčby jaterního selhání	10
3.5. Bioeliminační metody léčby jaterního selhání	10
3.6. Komponenty BAL systémů	11
3.7. Modely akutního jaterního selhání	14
4. Metodika	15
4.1. Model akutního jaterního selhání	15
4.2. Izolace hepatocytů, plnění bioreaktoru	16
4.3. Pooperační péče a monitorace	17
4.4. Sledování hemodynamických parametrů	17
4.5. Terapie BAL	18
5. Materiál	18
6. Výsledky	20
7. Diskuze	24
7.1. Model akutního jaterního selhání	24

7.2. Izolace hepatocytů	26
7.3. BAL	26
7.4. Pooperační monitorace a léčba	27
8. Závěr	29
9. Literatura:	30

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 návniku izolace hepatocytů a plnění bioreaktoru (kapsle).
3. Zvládnutí napojení zvířete na eliminační metodu a provedení vlastní bioeliminace.

3. Úvod

3.1. Úvod do problematiky

Akutní selhání jater (ASJ) je velmi závažné onemocnění s vysokou mortalitou. ASJ je charakterizováno rychlým výpadkem jaterních funkcí s rozvojem žloutenky, 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.

3.2. 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 žloutenky, 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, přivádějícími živiny do jater ⁷.

3.3. Léčba akutního jaterního selhání

V současné době neexistuje až na výjimky (otrava paracetamolem a muchomůrkou zelenou) specifická léčba a pacient vyžaduje interdisciplinární intenzivní péči.

Jedinou kurativní metodou, která umožňuje přežití pacientů s ASJ je transplantace jater. Ojediněle se vyskytují kazuistiky ^{8,9} 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 léčby¹⁰.

3.4. 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) ^{11, 12}. Nověji se však začaly uplatňovat přístroje na bázi FPSA (fractionated plasma separation and adsorption) ¹³. 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 difuzí tak, jak je tomu u předchozího nebiologického podpůrného přístroje MARS® vyvinutého Stangem a Mitznerem na začátku 90. let minulého století ¹¹.

3.5. 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 prováděli 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 bioartifciální játra doznala však až v roce 1987¹⁴.

Pro tyto systémy se v poslední době vžil název BAL (Bioartificial liver device) či Bioreaktor. Většina systémů se v současnosti skládá s třidimenzionální kapsle, zapojené do okruhu extrakorporálního systému s plasmafiltrací, hemofiltrací a integrovaným oxygenátorem. BAL systémy jsou v současnosti používány jednak v experimentální medicíně, ale i v klinické praxi¹⁵⁻²³.

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.

3.6. Komponenty BAL systémů

3.6.1. 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 množství²⁴, 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 imunogenicita ²⁴⁻²⁶.

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 (vzhledem k ubývání lidských jater nevyužitelných k transplantaci).

V primárních kulturách však hepatocyty rostou pomalu, rychle se dediferencují a ztrácejí tudíž svoji schopnost náhrady funkcí jater ²⁷.

Immortalizované hepatocyty (nesmrtelné, transformované)

Transformované buněčné linie se dobře, rychle a v dostatečném množství kultivují ²⁸. 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 ^{24, 29-35}. K nejvíce používaným buňkám patří buňky lidského hepatoblastomu C3A ³⁶.

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 výroby ³⁷⁻⁴³.

3.6.2. 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 též velikostí těchto porů, která se pohybuje od 10 do 200nm ²⁸.

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 faktoru²⁷. Hepatocyty si díky tomu zachovávají mnohem déle diferencované funkce. 3D membrány bývají syntetizovány z různých polymerů. Nejčastější typ bývá složen ze svazku dutých vláken (hollow fiber) uzavřených do systému tvořící jako celek tzv “kapsli”⁴⁴ (obr. 3).

3.6.3. Konstrukce Bioreaktoru

V minulé části jsem zmínil 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 testování in vivo bývá nejčastěji systém mnoha kolagenem potažených desek (proto 2D model) s jednovrstevnou kulturou hepatocytů⁴⁵. Nevýhodou tohoto modelu je již sama 2D stavba. Pokud bychom chtěli rozvrstvit do plochy byť jen 1/10 hepatocytů obsažených v játrech člověka, potřebovali bychom desky o ploše 12.5 m², s obrovskou spotřebou nutného perfuzátu²⁸. Je proto logické, že až na výjimky⁴⁶, 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 krev⁴⁷) pacienta (eventuelně zvířete), druhý kompartment obsahuje hepatocyty. Oba kompartmenty jsou od sebe oddělené membránou. Novější přístroje však obsahují kompartmenty 3 nebo 4^{48, 49}.

3.7. 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 ⁵⁰:

- 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 ⁵¹. Posledních 30 let však naprosto jednoznačně převládá použití galaktosaminu nebo acetoaminofenu.

U **chirurgických** modelů ASJ můžeme použít v zásadě dva možné přístupy. Jde o totální hepatektomii nebo o devaskularizaci jater. 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 organizmu ⁵².

Devaskularizační model se skládá ze dvou fází. Nejdříve je provedena portokavální anastomóza a následuje podvaz hepatické tepny, či jejích větví ^{53, 54}. 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.

4. Metodika

4.1. Model akutního jaterního selhání

Pro naše účely jsme vytvořili chirurgický model akutního jaterního selhání na základě devaskularizace: podvaz a.hepatica propria a v. portae s vytvořením portokavální anastomózy^{55, 56}.

K vytvoření modelu jsme užili laboratorní dospělé miniprase hmotnosti 25 - 30 kg. Před operací zvíře lačnilo 12 hodin při zachování přísunu tekutin ad libitum. 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).

Operace

Laparotomii jsme vedli ve střední čáře od processus xiphoideus až do podbříšku. Po vypreparování průběhu v.portae a v.cava inf. jsme našli portokavální spojku end-to-side Prolen 5/0. Poté jsme ligovali a.hepatica comm. nebo její větve.

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 je.

Po uzavření laparotomie jsme zavedli intrakraniálně v oblasti temporoparietální čidlo ke kontinuálnímu měření intrakraniálního tlaku ⁵⁷.

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.

4.2. Izolace hepatocytů, plnění bioreaktoru

Pro izolaci hepatocytů jsme zvolili metodu jaterní perfuze s následnou centrifugací ⁵⁸. Při odběru jater jsme vypreparovali a kanylovali portální žílu. Jaterní arterii 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.

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°. 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 přidaný bovinní sérový albumin (Sigma-Aldrich, Německo). Teplá ischemie celkově nepřesahovala 55 minut.

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

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.

4.3. 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 pod 60 mm Hg jsme nasazovali noradrenalin v kontinuální infuzi.

V pravidelných intervalech jsme odebírali krevní vzorky na stanovení vnitřního prostředí, hodnot iontů, glykémie, krevního obrazu, parametrů hemokoagulace, jaterních testů a sérového kreatininu⁵⁵. Kontinuální monitorace intrakraniálního tlaku byla zahájena ihned po operaci.

4.4. 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 rezistence⁵⁹.

4.5. 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) .

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 napojena⁵⁶.

Experiment jsme ukončili po uplynutí 12 hodin od uvolnění svorky na v.portae po našíti 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.

5. 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 BAL⁵⁶.

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 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.

6. 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.). Jaterní ischémie byla provázena poklesem hodnot Quickova testu a nárůstem AST, laktátu a amoniaku. Srovnání hodnot s kontrolní skupinou uvádí tabulka 1. Jsou uvedeny průměrné hodnoty AST, laktátu, Quickova testu a amoniaku v obou skupinách se směrodatnou odchylkou (SD). Je patrné srovnání průměrné naměřené hodnoty jednotlivých laboratorních ukazatelů ve tříhodinových intervalech a statistická významnost rozdílnosti průměrných hodnot, která byla získána užitím 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.

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±35,5 5	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±0,4 5
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±0,2 1
Quickův čas (s)	ns.	ns.	ns.	ns.	ns.	-
ASJ	82,4±11,4 1	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 1: 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

II. část

Srovnávali jsme výsledky skupiny ASJ oproti skupině ASJ BAL.

Průměrná doba 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 BAL ⁵⁶. Získané údaje jsou přehledně shrnuté v tabulkách 2-5.

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 2: 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 3: 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 4: 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 5: 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. hodiny je signifikantně nevýznamný.

Kontinuální sledování ICP bylo součástí monitorovacího protokolu. Rozdíl v průběhu ASJ je statisticky nevýznamný (tab. 6)

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 6: Srovnání hodnot ICP (v mmHg) ve skupině zvířat s ASJ léčeným pomocí BAL a v kontrolní skupině.

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.

7. 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

7.1. 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.

Existují 2 postupy k vytvoření chirurgického modelu ASJ: anhepatický a devaskularizační. Chirurgický model byl poprvé proveden v roce 1886 Minkowskim⁵². 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 katétru²⁶. Absence nekrotické jaterní tkáně v organismu způsobí, že rozvoj ASJ nemá korelát v humánní medicíně: nedochází k vzestupu sérových hladin aromatických aminokyselin (methionin, tyrosin a fenylalanin, tryptofan)⁶⁰. Další nevýhodou tohoto modelu je krevní ztráta spojená s hepatektomií, častá nutnost krevních převodů ovlivňujících stupeň ASJ⁶¹. Přežití experimentálních zvířat se navíc neliší od modelu devaskularizačního⁶¹.

Devaskularizační model byl poprvé popsán Rappaportem^{62, 63} a Gigesem v roce 1953⁶⁴. Bývá obvykle proveden založením portokavální anastomózy (PCA) s následnou ligaturou hepatické artérie (HAL)^{53, 54}. Tento základní postup je modifikován způsobem provedení HAL. Pokud se hepatická artérie zkomprimujeme pouze po určitou dobu, můžeme se vyhnout irreversibilitě ASJ⁶⁵.

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

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

bud' proveden tzv. jednodobě, kdy je provedena resekce > 80 - 85% jaterního parenchymu, nebo dvoudobě, kdy je k resekci připojena teplá ischemie zbytku jaterního parenchymu ⁶⁶. 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 ⁶³.

7.2. Izolace hepatocytů

Jaterní buňky jsme izolovali pomocí metody jaterní perfuze⁵⁵ 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 Maganta⁶⁷, které si po rozmražení ponechávají poměrně vysokou viabilitu dosahující 70 – 80 %. Ta však velmi rychle klesá pod 40 %⁶⁸. 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^{27, 68-72}.

Po provedení izolace dosahovala průměrná viabilita hepatocytů 85 %. Tuto hodnotu jsme považovali v souladu s literárními údaji za dostatečnou^{19, 58}. 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.

7.3. BAL

Námi použitý systém se skládal s třídímní bioreaktoru zapojeného do okruhu extrakorporálního podpůrného systému přístroje O.Liver performer (Rand, Itálie)⁷³ 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^{26, 73, 74} 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 studiemi a potencionálně aplikovatelná v klinickém experimentu.

7.4. Pooperační monitorace a léčba

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. 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^{68, 69}. 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 skupinou⁶⁸. 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 spolupracovníky⁷⁵. 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 Sosef²⁶

a Naka⁷⁶, 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 konzumpce 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 nedostatečné⁷⁷⁻⁷⁹. Z těchto důvodů považujeme v souladu s názorem Sheila a spol.⁷⁵ 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 zvířat²⁶ 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^{68, 73, 76, 79} 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 experimentu¹⁹, tak i v klinice⁶.

8. 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 úspěšně použili mimo jiné v testování arteficiální podpory jater - systému Prométheus (FPSA).

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

Zdařilo se provést izolaci jaterních prasečích buněk. Izolace jaterních buněk, včetně potkanních se stala na našem pracovišti rutinní metodou.

Dosáhli jsme v našem experimentu iniciální viability 85% čerstvých hepatocytů a prokázali jsme přežívání hepatocytů po téměř celou dobu, kdy byly použity v bioreaktoru.

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.

Literatura:

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. 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.
9. 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.
10. Trunečka, P. Indikace k transplantaci jater. <http://www.transplant.cz/transplant/postupy.php?t=4> (4.6.2009),
11. 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.

12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.

20. Naruse, K. - Makuuchi, M. Development and perspectives of bioartificial liver support. *Hepatogastroenterology*, 2002, Vol. 49, No. 43, s. 91-5.
21. Naruse, K. - Tang, W. - Makuuchi, 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Gerlach, J. C. Bioreactors for extracorporeal liver support. *Cell Transplant*, 2006, Vol. 15 Suppl 1, No., s. S91-103.
28. 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.
29. 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.

30. Kobayashi, N. - Okitsu, T. - Tanaka, N. Cell choice for bioartificial livers. *Keio J Med*, 2003, Vol. 52, No. 3, s. 151-7.
31. 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.
32. 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.
33. Nerem, R. M. Cell-based therapies: from basic biology to replacement, repair, and regeneration. *Biomaterials*, 2007, Vol. 28, No. 34, s. 5074-7.
34. 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.
35. Stange, J. - Mitzner, S. Cell sources for bioartificial liver support. *Int J Artif Organs*, 1996, Vol. 19, No. 1, s. 14-7.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. Chamuleau, R. A. Artificial liver support in the third millennium. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 2003, Vol. 31, No. 2, s. 117-26.

41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. Terblanche, J. - Hickman, R. Animal models of fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci*, 1991, Vol. 36, No. 6, s. 770-4.

51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. 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.
55. 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.
56. 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.
57. 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.
58. Seglen, P. O. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*, 1976, Vol. 13, No., s. 29-83.
59. 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.
60. 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.

61. 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.
62. Rappaport, A. M. - Borowy, Z. J. - Lotto, W. N. Experimental hepatic coma. *Surg Forum*, 1953, Vol., No. 38th Congress, s. 504-10.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. 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.
68. 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.
69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. 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.
73. 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.
74. 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.
75. 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.
76. 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.
77. Hayes, P. C. - Lee, A. What progress with artificial livers? *Lancet*, 2001, Vol. 358, No. 9290, s. 1286-7.
78. 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.
79. 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.

Přehled publikační činnosti autora

Monografie a kapitoly v monografiích:

Mergental, H. - Pantoflíček, T.: Transplantace jater in: Baláž P, Mergental H a kol.: Transplantace v experimentu. 1. vydání. Praha 2006. Kapitola 2.2. ISBN-10: 80-7262-366-4, s. 75 - 85

Původní články:

Pantoflicek, T. - Koblihová, E. - Ryska, M. S-adenosylmethionine does not reduce ischaemia-reperfusion injury to a marginal liver graft in an in-vivo experiment. *Hepato - Gastroenterology*, 2011 v tisku

Lásziková, E. - Pražák, J. - Pantoflíček, T., et al. Frakcionovaná plazmatická separace a adsorpce neovlivňuje hemodynamické parametry u experimentálního akutního selhání jater. *Anesteziologie & intenzivní medicína*, 2010, roč. 21, č. 4, s. 191-198

Ryska, M. - Laszikova, E. - Pantoflicek, T. - Ryska O. - Prazak, J. - Koblihova, E. Prometheus Significantly Decreases Intracranial Pressure on Acute Liver Failure - Experimental Study. *Eur Surg Res*. 2009, Vol. 42, s. 230 - 235. (IF 1,5)

Pantoflicek, T. - Koblihová, E. - Ryska, M. Vliv S - adenosylmethioninu na ischemicko – reperfuční poškození jaterního štěpu v experimentu in vivo. *Ces Gastroenterol Hepat*, 2009, Vol. 63, No. 6, s. 275 – 279.

Ryska, M. - Laszikova, E. - Pantoflicek, T. - Kieslichová, E. - Ryska O. - Prazak, J. - Koblihova, E. - Skibová, J. Biologická a nebiologická eliminační léčba akutního selhání jater. Experimentální práce na velkém laboratorním zvířeti. *Čas Lék Čes*, 2008, Vol. 147, s. 367 – 375.

Ryska, O. - Pantoflíček, T. - Lásziková, E. - Pražák, J. - Ryska, M. Současný význam biologických a nebiologických eliminačních metod v léčbě akutního selhání jater. *Rozhl Chir*, 2008, Vol. 87, s. 291 – 296.

Ryska, O. - Pantoflíček, T. - Lásziková, E. - et al. Léčení experimentálního akutního selhání jater eliminačními metodami. *Medical Tribune*, 2008, Moderní technologie a trendy v medicíně, s. 27

Ryska, M. - Lásziková, E. - Pantoflíček, T. - et al. Prométheus v léčbě akutního selhání jater v experimentu na velkém laboratorním zvířeti. *Čes Slov Gastroent Hepatol*, 2007, Vol. 61, s. 297–303.

Drozenová, J. - Doležalová, H. - Pantoflíček, T. - Beneš, K. Nález *Listeria monocytogenes* v trombu aneurysmatu = Detection of *Listeria monocytogenes* in an intra-aneurysmal thrombus. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie*, 2007, Roč. 16, č. 7, s. 317-319.

Ryska, M. - Kieslichová, E. - Pantoflíček, T. - et al. Bioeliminace v léčbě akutního selhání jater v experimentu na velkém laboratorním zvířeti. *Čes Slov Gastroent Hepatol*, 2006, Vol. 60, s. 157–162.

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. **(IF 1,43)**

Mergental, H. - Kriz, J. - Pantoflicek, T. - Ryska, M. Gemcitabine does not prevent acute rejection of the transplanted liver in rats. *Transpl Int*, 2005, Vol. 17, s. 687 - 691. **(IF 3,254)**

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. **(IF 1,5)**

Ryska, M. - Kieslichová, E. - Pantoflíček, T. - et al. Chirurgický model akutního selhání jater u laboratorního miniprasete. *Čes Slov Gastroent Hepatol*, 2004, Vol. 58, s. 83–88.

Ryska, M. - Kieslichová, E. - Pantoflíček, T. - et al. Model akutního selhání jater u miniprasete z hlediska chirurga a anesteziologa. *Rozhl Chir*, 2004, Vol. 83, s. 436–442.

Pantoflíček, T. Vakuum terapie. *Bull.HPB Chir*, 2005, Vol. 13, No. 3-4, s. 48.

Pantoflíček, T. - Lipár, K. - Ryska, M. Ortotopická transplantace jater u krysy. *Bull.HPB Chir*, 1999, Vol. 7, No. 1-2, s. 11-14.

Lipár, K. - Pantoflíček, T. - Ryska, M. Technika ortotopické transplantace jater u krysy. *Bull.HPB Chir*, 1999, Vol. 7, s. 21-22

Statě ve sbornících:

Pantoflíček, T. - Jirkovská, J. - Majkus, D. Včasná indikace k podiatrické léčbě. Teorie versus realita. In: *Kazuistiky v diabetologii 8, supplementum 3*. Semily: *GEUM*, 2010, Vol. 8, suppl 3, s. 6–7.

Ryska, M. - Pantoflicek, T. - Laszikova, E. - Ryska, O. - Prazak, J. Artificial liver support system reduces intracranial pressure more effectively than bioartificial system – an experimental study In: *Int J Art Org. Compiegne: UTC*, 2009, Vol. 32, No. 7, s. 398-399.

Ryska, M. - Laszikova, E. - Pantoflicek, T. - Ryska, O. - Prazak, J. Biological and non-biological elimination therapy of acute liver failure. Experimental study on large laboratory animal. In: *Int J Art Org. Geneva: CMU*, 2008, Vol. 31, No. 7, s. 655.

Pantoflicek, T. Prometheus in the treatment of experimental acute liver failure decreases intracranial pressure significantly. In: *Eur.Surg*. Berlin: SpringerLink, 2008, Vol 40, Suppl. 223, s. 67.

Ryska, M. - Pantoflíček, T. Prometheus in the treatment of experimental acute liver failure decreases intracranial pressure significantly. In: *Int J Art Org*. Krems: Center for Biomedical Technology, 2007, Vol. 30, s. 703.

Pantoflicek, T. Experimental research on bioartificial liver support systém in minipigs with fulminant liver failure – pilot study. In: *HPB*. Edinburg: IHPBA, 2006, Vol. 8, Suppl. 2, s 183.

Pantoflíček, T. Surgical model of fulminant hepatic failure in minipig. In: *HPB*. Istanbul: IHPBA, 2003, Vol. 5, Suppl. 1, s 88.

Pantoflíček, T. Experimental orthotopic liver transplantation in hypercholesterolemic rats. In: *HPB*, Amsterdam, IHPBA, 2001, Vol. 3, s. 137.

Pantoflíček, T. - Segal, A. Zdravotní stav dětské populace občanů českého původu z oblasti postižené Černobylskou havárií = Health status of pediatric victims of the Chernobyl nuclear accident. In: *Plzeňský lékařský sborník*, Karolinum, Praha. 1994, Vol. 69, s. 221.

Přednášky na odborných setkáních

Pantoflíček, T. Včasná indikace k podiatrické léčbě: Teorie versus realita. Syndrom diabetické nohy, 26.11.2010, Praha.

Pantoflíček, T. Artificial liver support system reduces intracranial pressure more effectively than bioartificial system – an experimental study. ESAO 2009, 2.-5.9.2009, Compiègne, Francie

Pantoflíček, T. Naše zkušenosti s biologickou eliminační metodou v léčbě akutního selhání jater v experimentu . Současné možnosti eliminačních metod v léčbě akutního selhání jater. Jednodenní sympozium s mezinárodní účastí, 23.10.2009, Praha.

Pantoflíček T.: Gallbladder cancer. 8th EHPBA, 18-20.6. 2009, Atény, Řecko.

Pantoflíček T.: Prometheus in the treatment of experimental acute liver failure decreases intracranial pressure significantly. CECS Congress 2008, 8.-10.5.2008, Praha

Pantoflíček, T.: V.A.C. terapie. Syndrom diabetické nohy, 4.11.2005, Praha.

Pantoflíček, T. Experimental model of acute liver failure in minipigs. Acute liver failure and therapeutic impact of bioreactor (Symposium), 30.5.2002, Praha

Pantoflíček, T. Model of fulminant hepatic failure in minipig. Česko-Polsko-Německé trilaterální symposium, 28-30.11.2002, Karlovy Vary

Pantoflíček, T. Experimental orthotopic liver transplantation in hypercholesterolemic rats. 4. IHPBA Congress, 27.-30.4.2001, Amsterdam, Nizozemí