

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Josef Pražák

Intrakraniální tlak a jeho změny při léčbě akutního jaterního selhání metodou FPSA/Prometheus v chirurgickém modelu na praseti

Intracerebrální mikrodialýza při monitoraci léčby experimentálního akutního jaterního selhání metodou FPSA/Prometheus

The influence of the treatment of experimental acute liver failure by FPSA/Prometheus on intracranial pressure

Cerebral microdialysis in monitoring of the therapeutic effect of FPSA/Prometheus in experimental acute liver failure

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Karel Cvachovec, CSc., MBA

Konzultant: prof. MUDr. Miroslav Ryska, CSc.

Praha 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu.

Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

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

V Praze 16. 10. 2013

JOSEF PRAŽÁK

Poděkování:

Velký dík patří panu prof. MUDr. Karlu Cvachovcovi, CSc., a panu prof. MUDr. Miroslavu Ryskovi, CSc., za přátelskou podporu, kolegiální přístup a odbornou pomoc a vedení během postgraduálního studia, v průběhu experimentu i při tvorbě této disertační práce.

Identifikační záznam:

PRAŽÁK, Josef. Intrakraniální tlak a jeho změny při léčbě akutního jaterního selhání metodou FPSA/Prometheus v chirurgickém modelu na praseti. [The influence of the treatment of experimental acute liver failure by FPSA/Prometheus on intracranial pressure]. Praha, 2013, 60s. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní péče, 2.LF UK. Školitel Cvachovec, Karel. Konzultant Ryska, Miroslav

Klíčová slova: Akutní jaterní selhání, Intrakraniální tlak, Frakční plasmatická separace a adsorpce, Mikrodialýza

Key words: Acute liver failure, Intracranial pressure, Fractionated plasma separation and adsorption, Microdialysis



Prometheus - Nicolas-Sébastien Adam, 1762 (Louvre) zdroj: Wikipedia

OBSAH

Literární úvod a přehled problematiky.....	7
Úvod.....	7
Nitrolební hypertenze	8
Patofyziologie vzniku nitrolební hypertenze	8
Mozkový edém u ALF	9
Astrocyty.....	10
Amoniak u ALF.....	10
Atrocytární otok	11
Zvětšení intrakraniálního krevního kompartmentu u ALF.....	12
Biologické a nebiologické eliminační metody u ALF.....	12
Biologické eliminační metody.....	13
Nebiologické eliminační metody	13
Mikrodialýza.....	16
Princip.....	16
Mikrodialýza při ALF	17
Shrnutí	19
Cíle práce.....	20
Experimentální metoda.....	21
Experiment pilotní.	21
Experiment rozšířený.	21
Anestezie a perioperační péče.....	22
Pooperační péče	24
Mikrodialýza a monitorace intrakraniálního tlaku	25
Léčba FPSA	27
Statistické zpracování	28
Výsledky	29
Intrakraniální tlak.....	29
Parametry mikrodialýzy.....	32
Poměr laktát/pyruvát	32

Glutamát.....	34
Glycerol.....	35
Glukosa.....	37
Glutamin.....	38
Plasmatický amoniak	40
Diskuse.....	43
Intrakraniální tlak.....	44
Parametry mikrodialýzy.....	45
Poměr laktát/pyruvát	46
L/P vs. ICP	47
Ostatní parametry standardně určované analýzou mikrodialyzátu	48
Glutamát.....	48
Glycerol.....	48
Glukosa.....	48
Glutamin.....	49
Plasmatický amoniak	50
Závěr.....	51
Souhrn	52
Abstract	54
Seznam použitých zkratek.	55
Použitá literatura.	56

Literární úvod a přehled problematiky

Úvod

Akutní jaterní selhání (ALF - Acute Liver Failure) je poměrně vzácně se vyskytující avšak velmi závažné onemocnění s nepříznivou prognózou. Ať už je příčina vzniku ALF jakákoliv, dochází u takto postižených pacientů velmi záhy k elektrolytovému a metabolickému rozvratu s poruchou koagulace (Detry O et al., 1998) a k postižení mnoha orgánových systémů, mnohdy pod obrazem multiorgánového selhání (MOF - Multi Organ Failure). Nástup ALF je provázen jaterní encefalopatií a mozkovým edémem, vedoucím později k vzestupu nitrolebního tlaku (ICP – IntraCranial Pressure), což může vést k cerebrální herniaci, která je vedle MOF nebo společně s ním hlavní příčinou smrti u pacientů s ALF. Navzdory pokrokům v klinickém i experimentálním výzkumu nejsou doposud uspokojivě a vyčerpávajícím způsobem objasněny všechny patofyziologické pochody vedoucí ke vzniku intrakraniální hypertenze (ICH – IntraCranial Hypertension) u ALF. Metoda FPSA/Prometheus® (FPSA – Fractionated Plasma Separation and Adsorption) je poměrně nová podpůrná eliminační nebiologická metoda používaná při léčbě ALF. Klinicky významným parametrem efektivity léčby je právě schopnost eliminační metody pozitivně ovlivnit ICP. Intracerebrální mikrodialýza (MD - MicroDialysis), zmíněná v závěru přehledu, je metoda monitorace, kterou lze uplatnit při výzkumu a sledování patofyziologických dějů v průběhu ALF. Slibný by mohl být potenciál MD v monitoraci terapeutických konsekvencí stejně jako indikátoru časně léčebné intervence.

Nitrolební hypertenze

Mozkový otok je u jaterního selhání popisován a sledován relativně krátkou dobu. Dříve byly nejčastější příčinou smrti u ALF časně důsledky insuficience hepatocytů jako vykrvácení nebo nezvladatelná seps (Lucké B, 1944). Teprve v roce 1944 popsal Lucké změny na mozku pitvaných amerických vojáků, kteří zemřeli na hepatitidu (etiologicky podmíněnou pravděpodobně očkováním proti žluté zimnici látkou obsahující lidské sérum), a jako první vyslovil domněnku, že se může jednat o změny způsobené špatnou detoxifikační funkcí jater. První práce publikované v sedmdesátých letech dvacátého století popisující mozkový edém a herniaci jako komplikaci ALF, byly ve své době spíše kritizovány a širší odbornou veřejností byly tyto symptomy přijaty jako komplikace ALF vyžadující intenzivní terapii až v průběhu osmdesátých let (Ede RJ. et al., 1986). Přítomnost fatálního mozkového edému jako zásadního symptomu, respektive příčiny smrti, je u tohoto onemocnění popisována až teprve v relativně nedávné době, což souvisí pochopitelně především s výrazným zlepšením a novými možnostmi a pokrokem intenzivní péče konce minulého století. Přestože se v posledních dvaceti letech - opět díky optimalizaci péče o pacienty s ALF na jednotkách intenzivní péče (ICU - intensive care unit) snížila u těchto pacientů incidence smrti mozku, stále umírá na následky intrakraniální hypertenze 25 – 30 % pacientů s ALF (Auzinger G., Wendon J., 2008).

Patofyziologie vzniku nitrolební hypertenze

Normální nitrolební tlak je u dospělého člověka mezi 5 a 10 mmHg a o intrakraniální hypertenzi, která vyžaduje terapeutický zásah, hovoříme, pokud nitrolební tlak přesáhne 20 mmHg (Balestreri M et al., 2006). Nitrolební tlak nad 15mmHg bývá označován jako zvýšený a v některých indikacích, nikoliv však u ALF, je momentem pro zahájení symptomatické léčby. Hlavním důsledkem maligní nitrolební hypertenze u pacientů s ALF je herniace v oblasti tentorium cerebelli. Tato transtentoriální herniace může vést jednak k útlaku a ischemii v povodí arteria cerebri posterior, jednak k útlaku aquaeductus mesencephali a subarachnoidálního prostoru

vedoucímu ke vzniku obstrukčního hydrocefalu a také k útlaku mozkového kmene vedoucímu k jeho ischemii a smrti (Bingaman WE, Frank JI, 1995). Zvýšení nitrolebního tlaku vede ke snížení mozkového perfuzního tlaku (CPP – Cerebral Perfusion Pressure), který je definován jako rozdíl středního arteriálního tlaku (MAP - Mean Arterial Pressure) a intrakraniálního tlaku: $CPP = MAP - ICP$. Byť je optimální hodnota CPP při léčbě intrakraniální hypertenze obzvláště v oblasti problematiky traumatického poškození mozku TBI (traumatic brain injury) stále předmětem diskusí (Grande PO, 2006), je jasné, že snížení CPP a tím i průtoku krve mozkem CBF (cerebral blood flow) povede k mozkové ischemii, jejímž důsledkem je u pacientů přeživších ALF různě těžký neurologický deficit.

Obecně je vzrůst ICP důsledkem vzrůstu objemu jednoho ze tří intrakraniálních kompartmentů – cerebrospinální liquor, mozková tkáň a krev - uzavřených rigidní a u normálních dospělých jedinců neroztažitelnou lebkou. Protože cerebrospinální liquor u ALF svůj objem primárně nemění, lze shrnout, že příčinou vzniku intrakraniální hypertenze u ALF je mozkový edém a změna v regulaci průtoku krve mozkem, které vedou k cerebrální hyperémii.

Mozkový edém u ALF

Na vzniku mozkového edému u ALF se podílí mechanismus pravděpodobně jak vazogenní tak cytotoxický. Hlavní roli hraje cytotoxický edém a k poškození funkce hematoencefalické bariéry a vzniku edému na podkladě vazogenním tak dochází až sekundárně. Pro vliv primárně vazogenního edému sice hovoří některé experimentální práce dokládající přestup za normálních okolností hematoencefalickou bariérou neprostupných látek (Horowitz ME et al., 1983). Je však třeba konstatovat, že se jedná o modely ALF na malých laboratorních zvířatech. Naproti tomu schopnost manitolu snížit ICP u pacientů s ALF hovoří pro to, že hematoencefalická bariéra zůstává nepoškozená. Stejně tak analýza mozkové tkáně elektronovým mikroskopem u pacientů, kteří podleli ALF, potvrdila celistvost tight-junctions v hematoencefalické bariéře a otok perivaskulárních astrocytů (Kato M, 1992). Zobrazení magnetickou rezonancí u pacientů s ALF také potvrzuje převážně cytotoxický podklad mozkového edému u ALF.

V případě nepoškozené hematoencefalické bariéry dochází při cytotoxickém edému k přestupu vody, zodpovědné za vlastní buněčný otok, pomocí tří základních mechanismů. Jedná se o

prostup difuzí skrz cytoplazmatickou membránu a kotransport s organickými a anorganickými ionty a také o přestup díky speciálním vodním kanálům - aquaporinům. Hlavní aquaporin v mozku, který patrně hraje důležitou roli při vzniku cytotoxického edému u ALF, je aquaporin-4, jenž je nejčastěji lokalizován právě na endoteliálních buňkách v mozku a astrocytárních výběžcích obklopujících mozkové kapiláry. Zajímavé je, že u myši s experimentálně navozeným deficitem pro aquaporin-4 je mozkový otok u ALF zřetelně menší (Manley GT et al., 2004).

Astrocyty

Příčina mozkového otoku je multifaktoriální a zásadní roli v patofyziologických pochodech vedoucích k jeho vzniku hraje amoniak (Butterworth RF, 2002) a jeho vliv na otok astrocytů. Astrocyty jsou nejpočetnějším buněčným typem v mozkové kůře a mají zásadní význam pro metabolické pochody mozku včetně udržování a regulace stavu extracelulárního prostředí. Podílejí se na vodním hospodářství a hrají klíčovou roli v detoxifikaci amoniaku i udržování normálních hladin excitačních aminokyselin včetně glutamátu. Pokud hovoříme o cytotoxickém otoku u ALF, hovoříme de facto o astrocytárním otoku.

Amoniak u ALF

Amoniak vzniká činností enterocytů při metabolismu glutaminu, při metabolických pochodech v ledvinách a dále činností ureázy střevní flory. Je také produktem při odbourávání aminokyselin ve svalech. Vylučován je ledvinami a je využíván k syntéze glutaminu ve svalech. Nejdůležitější úlohu v jeho metabolismu mají játra, kde je amoniak spotřebováván při syntéze močoviny.

V průběhu ALF pak dochází k několikanásobnému vzestupu hladiny amoniaku v krvi, což je vysvětlováno právě poruchou syntézy močoviny v játrech. Amoniak ze střeva je s krví nesen mimo játra portosystémovým kolaterálním oběhem. Arteriální hyperamonemie (hladina amoniaku nad 50 μ mol/L) vede k jeho akumulaci v mozku a v důsledku poškození astrocytů ke vzniku mozkového otoku. Přestup amoniaku přes hematoencefalickou bariéru probíhá pasivní difuzí molekul NH₃ a transportem skrz kationtové kanály, které mohou být identické s kanály pro draslíkové ionty (Nagaraja TN, Brookes N, 1998). Samostatný specifický transportér pro amonné ionty obdobný jako přenašeč amonných iontů v ledvinách zatím nebyl v mozku nalezen, ale jeho přítomnost je pravděpodobná. Amoniak je sám o sobě pro neurony toxický a ovlivňuje přímo i nepřímo neurotransmisi, aktivuje excitační NMDA (N-methyl D-aspartát)

receptory a ovlivňuje i GABA (gama-amino-butyric acid) receptory (Albrecht J, 1998). Byl však popsán i jeho vliv na serotoninergní a dopaminergní transmissi (Lozeva V et al., 2004). Tato amoniakem podmíněná neuromodulace vede ve svém důsledku až k neuronální apoptóze.

Astrocytární otok

Po přestupu amoniaku přes hematoencefalickou bariéru dochází k jeho detoxifikaci reakcí s glutamátem za vzniku glutaminu. Reakce je katalyzována enzymem glutamin-synthetazou, který se nachází v cytoplazmě astrocytů. Glutamin jako konečný produkt detoxifikace amoniaku v astrocytech je elektrofyziologicky inertní a dlouhou dobu byla syntéza glutaminu vysvětlována jako efektivní obrana neuronů proti toxickým účinkům amoniaku. Opakovaně však bylo jak v klinických tak i v experimentálních studiích ukázáno, že množství glutaminu v mozku koreluje se vznikem mozkového edému (Tofteng F et al., 2006) podmíněného astrocytárním otokem u ALF. Toto tvrzení lze poměrně jednoduše hypoteticky vysvětlit osmotickým efektem intraplazmaticky nakumulovaného glutaminu – jeho zvýšená koncentrace vede k většímu influxu molekul vody do buněk. Tomuto vysvětlení také nahrává nepřímou i skutečnou, že v pokusech in vitro hyperamonemie zvyšuje astrocytární expresi aquaporinu-4 (Rama Rao KV, 2003).

V poslední době se ale ukazuje, že situace je pravděpodobně složitější a přímý osmotický vliv glutaminu není správným vysvětlením astrocytárního otoku. V roce 2006 formulovali Albrecht a Norenberg hypotézu tzv. „Trojského koně“, podepřenou výsledky experimentálních prací (Albrecht J, Norenberg MD, 2006). Podle této hypotézy hlavní mechanismus toxického účinku glutaminu spočívá ve funkci glutaminu jako přenašeče toxického amoniaku z cytoplazmy do mitochondrií. Tento transport je navíc ještě potencován právě zvýšenou koncentrací amoniaku. Uvnitř mitochondrie je glutamin hydrolyzován fosfát aktivovanou glutamázu (PAG). Uvolněný amoniak pak v relativně malém množství mitochondriálního prostoru dosahuje vysokých koncentrací. Intramitochondriální volný amoniak tvorbou volných radikálů způsobuje oxidativní stres, což vede k alteraci permeability mitochondriální membrány (MPT - Mitochondrial Permeability Transition), a tím k mitochondriální dysfunkci a zahájení apoptotického procesu. Tuto myšlenku potvrzují i některé nejnovější studie in vivo, dokládající korelaci sníženého oxidativního metabolismu mozkové tkáně s vyššími koncentracemi glutaminu (Bjerring PN et al., 2008).

Zvětšení intrakraniálního krevního kompartmentu u ALF

Druhou složkou podílející se na vzniku nitrolební hypertenze u ALF je změna v regulaci krevního průtoku mozkiem, která ALF provází a vede k mozkové hyperémii. Za normálních okolností je krevní průtok mozkiem (CBF - Cerebral Blood Flow) do velké míry nezávislý na změnách krevního tlaku díky velmi dobrým mechanismům autoregulace, schopným přizpůsobit i regionální krevní průtok aktuálním metabolickým potřebám jednotlivých oblastí mozkové tkáně. U jaterního selhání však přestávají tyto mechanismy fungovat (Dethloff TJ et al., 2008) a dochází ke globálnímu vzrůstu CBF a hyperémii. Jedním z možných vasodilatátorů, zodpovědných za generelní mozkovou vasodilataci, by mohl být adenosin, který se v mozkové tkáni kumuluje ve stavu snížené produkce ATP v průběhu ALF (Bjerring PN et al., 2009). Důležitější roli však pravděpodobně hraje systémová zánětlivá odpověď (SIRS – Systemic Inflammatory Response Syndrom), která je pravidelným průvodcem rozvoje ALF. Zánětlivá odpověď tak působením prozánětlivých mediátorů způsobuje v mozkové tkáni vasodilataci, a tím přispívá ke zvětšení CBF. Synergickým působením vasodilatace a zvýšení CBF společně s výše diskutovanými mechanismy vzniku vlastního otoku mozkové tkáně tak dochází ke vzniku fatální intrakraniální hypertenze.

Biologické a nebiologické eliminační metody u ALF

Ortotopická transplantace jater je v současné době nejefektivnější metodou, která zlepšuje přežití nemocného s ALF. Na straně druhé, v závislosti na etiologii ALF, může dojít u části nemocných k úplné regeneraci jaterní tkáně, a to dokonce při destrukci více jak 80 % hepatocytů. Regenerace pak vede k plnému uzdravení nemocného. Podmínkou je však dostatečné množství funkčního jaterního parenchymu (Panek, L, 1980). V době, po kterou pacient čeká na vhodného dárce jaterního štěpu či po kterou může dojít nebo dochází k spontánní regeneraci, je pacient akutně ohrožen na životě. Současné možnosti, jak pacienta přes toto období převést (tzv. „bridging“), jsou limitovány. Proto dochází v posledních 20 letech k rozvoji biologických i nebiologických

mimotělních eliminačních metod (ELS – Extracorporeal Liver Support), které by umožňovaly efektivnější bridging, a tím zlepšily šanci nemocného s ALF přežít.

Biologické eliminační metody

Biologické eliminační metody (BAL – BioArtificial Liver) používají k náhradě jaterních funkcí kultury živých hepatocytů, které mohou teoreticky kombinovat detoxifikační funkce s funkcí syntetickou (proteosyntéza, glukoneogeneze). Postup léčby ALF použitím těchto takzvaných bioartifciálních jater byl opakovaně vyzkoušen jak experimentálně (Flendrig LM et al., 1999; Cuervas-Mons V et al., 2000) tak i klinicky (Horslen SP et al., 2000; Levy MF et al., 2000). Algoritmus léčby stručně řečeno využívá perfuzi izolované plazmy léčeného organismu přes izolované živé hepatocyty v očišťovacích kolonách. Randomizovaná multicentrická studie provedená týmem profesora Demetriou (Demetriou AA et al., 2004) prokázala potencionální léčebný benefit u nemocných s ALF. Neprokázala však prodloužení života takto léčených nemocných. Mnohými oponenty bylo též poukazováno na nesourodost skupiny nemocných a malou zkušenost jednotlivých týmů, nesrovnatelnost kontrolní skupiny se skupinou BAL. Obdobně vyznívá hodnocení ostatních provedených studií (Hayes PC, Lee A, 2001). Spektrum problematiky tohoto postupu je navíc poměrně široké a kromě klíčové viability a typu hepatocytů v kolonách je určující a přitom doposud ne zcela jasně definované potřebné množství těchto buněk. Z výše zmiňovaných důvodů dochází momentálně v oblasti experimentální i klinické praxe při léčbě akutního jaterního selhání k ústupu od biologických eliminačních metod ve prospěch eliminačních metod nebiologických.

Nebiologické eliminační metody

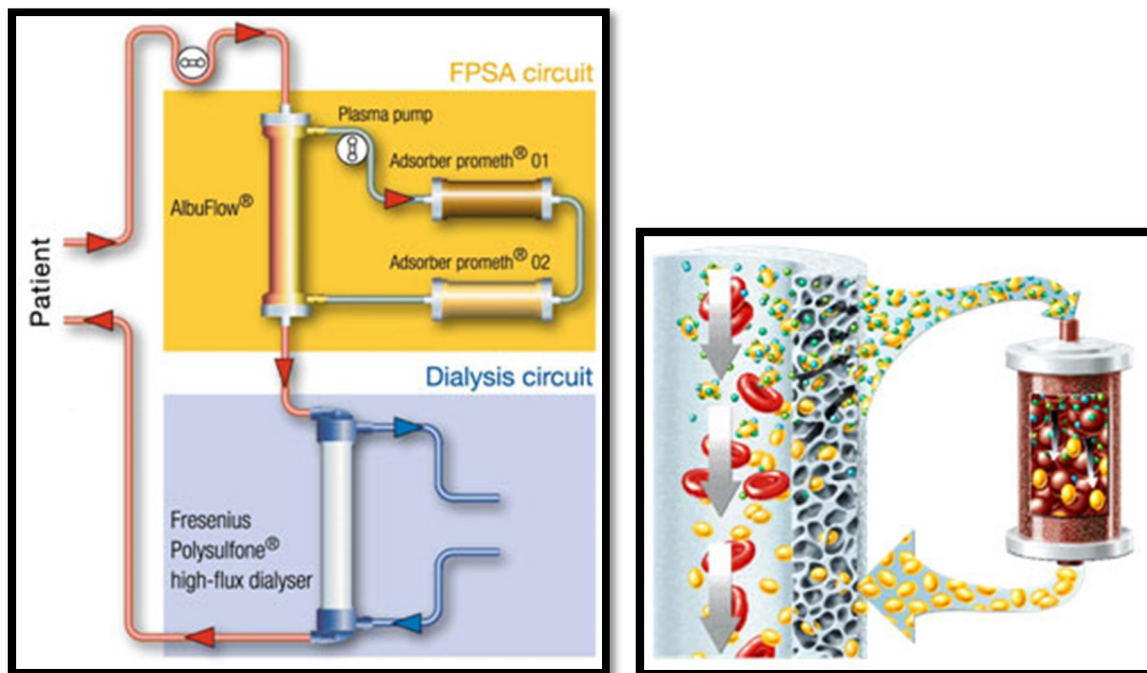
Metoda frakční plazmatické separace a adsorpce (FPSA - Fractionated Plasma Separation and Adsorption) umožňuje eliminovat jak toxické substance rozpuštěné ve vodě, tak i toxiny vázané na albumin. Přístroj se skládá z dialyzačního přístroje FMC 4008H představujícího standardní primární okruh. Ten je rozšířen o paralelně zapojený sekundární okruh s modulem pro frakcionovanou plazmatickou separaci prováděnou albuminovým filtrem a dvěma adsorbéry (Obr.č.1). Albumin, filtrovaný do sekundárního okruhu přes tento „Albu flow filtr“ (propouští molekuly do velikosti 250 kD – albumin tak přes membránu do sekundárního okruhu prostoupí,

větší molekuly, jako například fibrinogen, nikoliv) pak prochází do kolony s polysulfonovou membránou neutrálního pryskyřičného adsorbéru - Prometh01 (Obr.č.2). Zde dochází k adsorpci elektricky neutrálních žlučových kyselin, aromatických aminokyselin, fenolických substancí a toxinů. Druhý adsorbér - Prometh02 (Obr.č.3) - se styren-divinylbenzen kopolymerem s prostorovou sítí 100 μm , zapojený sériově za prvním adsorbérem Prometh01, vychytává negativně nabitě ligandy (nekonjugovaný bilirubin). Ve vodě rozpustné substance jsou odstraňovány hemodialýzou (Falkenhagen D et al., 1999) Jedná se tak o extrakorporální podpůrný systém, kdy jsou proces FPSA a hemodialýza integrovány do jednoho celku.

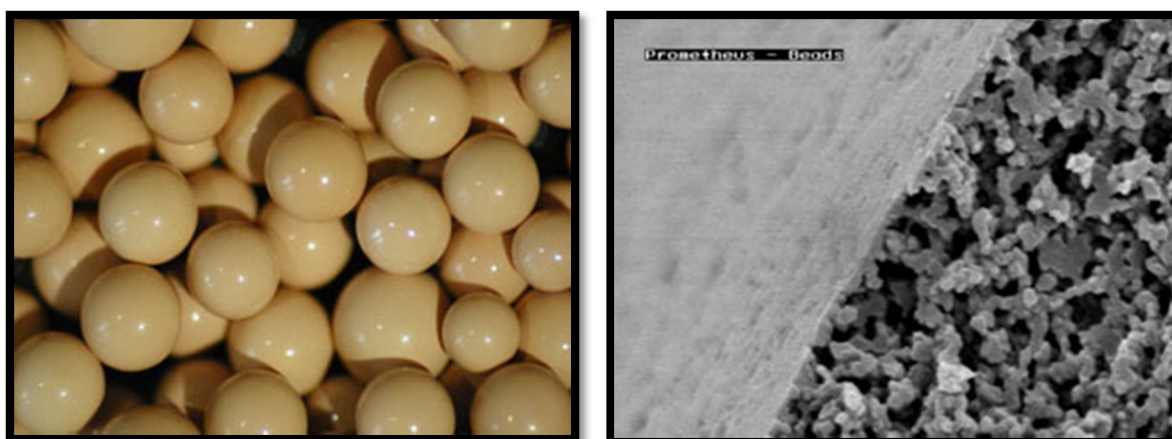
Albumin s vázanými toxiny je tedy přímo transportován na místo, kde jsou toxiny odstraněny. Proto není potřeba lidského albuminu a proces není limitován disociací z albuminu a difuzí tak, jak je tomu u nebiologického podpůrného přístroje MARS (Molecular Adsorbent Recirculating System) vyvinutého Stangem a Mitznerem na začátku 90. let minulého století (Stange J et al., 1993).

U metody MARS již byl prokázán pozitivní vliv na snížení intrakraniálního tlaku u ALF opakovaně v klinických studiích, převážně retrospektivních, s malým množstvím reprezentantů a multifaktoriální příčinou ALF (Pugliese F et al., 2007) i experimentálně (Sen S, 2009). U novější metody FPSA byl v klinických studiích, převážně retrospektivních a s malým množstvím representantů, podobně jako u metody MARS, opakovaně doložen pozitivní vliv na podpůrnou detoxifikační funkci (Grodzicki M et al., 2009; Oppert M et al., 2009). Snížení intrakraniálního tlaku metodou FPSA se však žádná z doposud publikovaných prací explicitně nevěnuje. Dále je třeba opět poznamenat, že pacientům byla pochopitelně poskytnuta stejně jako v případě výše uvedené metody MARS veškerá podpůrná péče, mající mimo jiné bezprostřední vliv na ICP, příčiny ALF byly navíc často multifaktoriální. Potvrzení jednoznačného vlivu FPSA na ICP porovnáním srovnatelných skupin tak může dát nejlépe experimentální práce na definovaném modelu ALF.

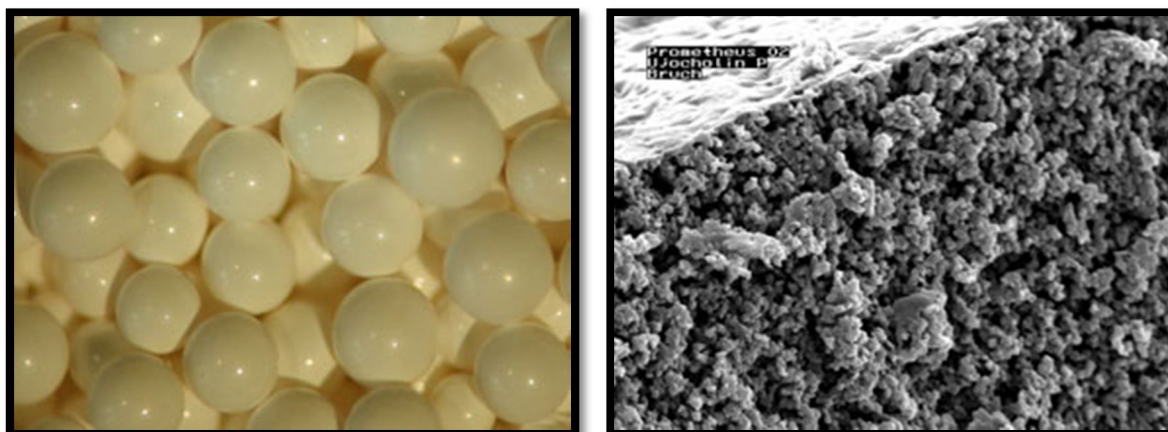
Obr. č. 1 Schéma zapojení primárního a sekundárního okruhu; AlbuFlow® - polysulfonový filtr, oddělující plazmu od krve (Copyright –Fresenius Medical Care)



Obr. č. 2 Prometh® 01 – vysoce porézní neutrálně nabitá pryskyřice s velkým vnitřním povrchem (Copyright –Fresenius Medical Care)



Obr. č.3 Prometh® 02 – vysoce porézní aniontová pryskyřice ve formě chloridu (adsorpce toxinů z albuminu) Copyright –Fresenius Medical Care

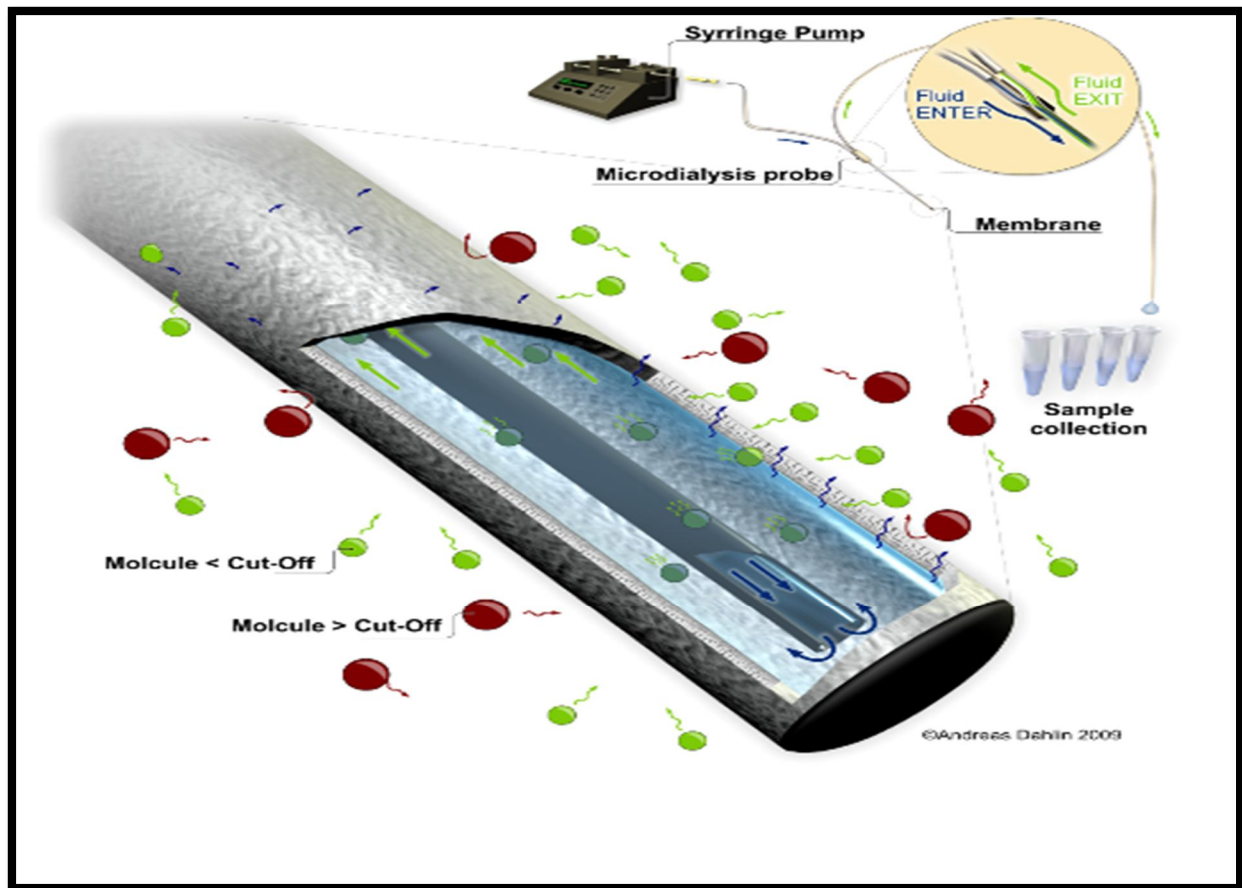


Mikrodialýza

Princip

Mikrodialýza, přesněji intersticiální mikrodialýza, je jedinečná metoda umožňující téměř kontinuální monitoraci změn extracelulárního prostředí takřka všech tkání (Ungerstedt U, 1991). Metoda funguje na principu napodobení funkce cévní kapiláry (Obr.č.4). Mikrodialyzační sonda, která má na svém konci membránu obsahující póry o definované velikosti, je zavedena jako umělá kapilára do tkáně. Membrána mikrodialyzačního čidla velikostí pórů definuje skupinu látek, které mohou difundovat na základě koncentračního spádu mezi intersticiální tekutinou a mikrodialyzační tekutinou, již je umělé mikrodialyzační céva promývána. Mikrodialyzační roztok je přiváděn do sondy speciální pumpou velmi pomalu, takže dochází téměř ke stoprocentnímu vyrovnání koncentrací látek v intersticiu a mikrodialyzátu, který velmi přesně odráží složení mezibuněčného prostředí v místě tkáně nebo orgánu, které je v kontaktu se zevní stranou mikrodialyzační membrány (Obr.č.5).

Obr. č. 4 Princip mikrodiálýzy a zapojení mikrodiálizačního katetru

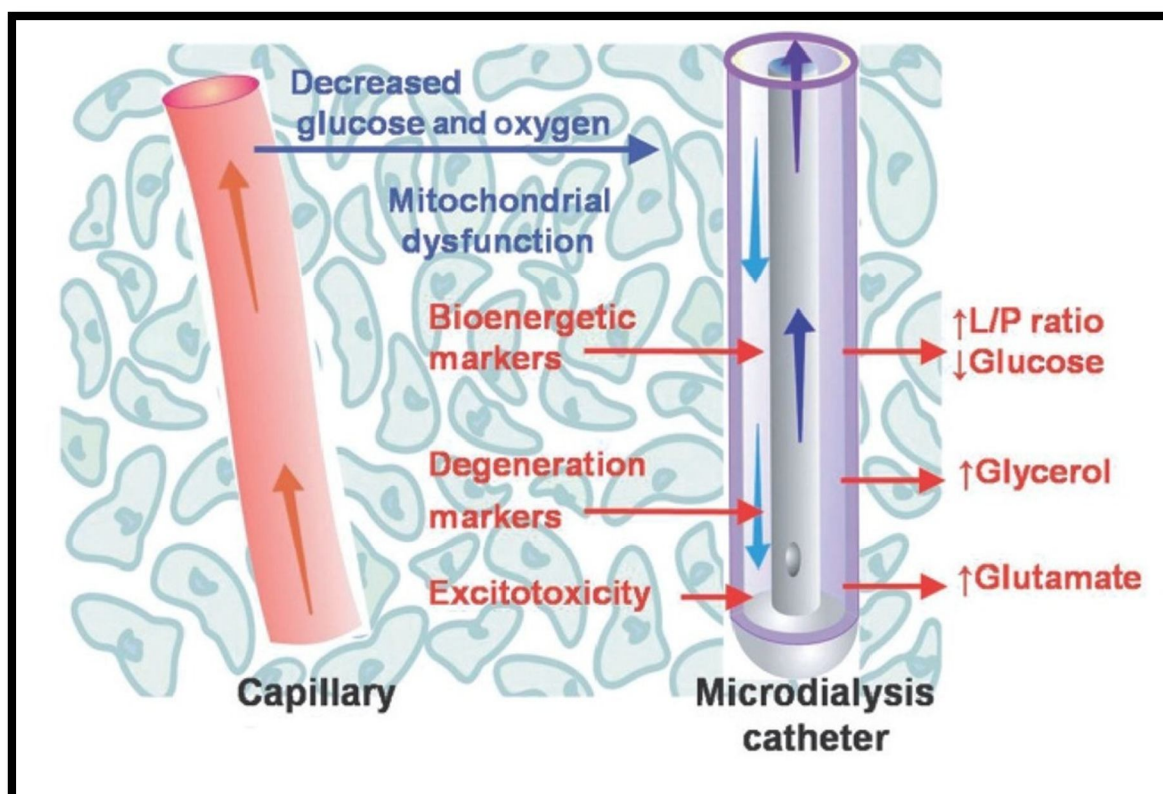


Mikrodiálýza při ALF

Na klinické i experimentální úrovni je mikrodiálýza uplatňována v širokém spektru indikací. Nejčastěji bývá metoda používána v oblasti neurointenzivní péče, především v problematice mozkové ischemie u cévních mozkových příhod nebo u závažných mozkových poranění (Goodman JC, 1999). Zmínky o jejím použití na poli akutního jaterního selhání, ať už v oblasti experimentální nebo v klinických studiích, se objevily teprve v několika posledních letech a její přínos jako nové metody monitorace zatím není jednoznačně prokázán. Pomineme-li studie monitorující pomocí mikrodiálýzy viabilitu jaterního štěpu (Novak G, et al, 2002; Silva MA, 2006) v případě transplantace jater u ALF, týkají se práce většinou monitorace cerebrálního metabolismu. Analýzou mikrodialyzátu byla klinicky prokázána souvislost mezi koncentrací

glutaminu a koncentrací amoniaku, uvedená v první části tohoto přehledu (Tofteng F et al 2006). Podobně ukazuje na výsledcích měření mikrodialýzy již výše zmiňovaná práce skupiny F.S. Larsena souvislost mezi zhoršeným cerebrálním metabolismem, koncentrací glutaminu a intrakraniálním tlakem (Bjerring PN et al., 2008). Na úrovni experimentu může sloužit mikrodialýza k doložení efektivity biologických nebo arteficiálních náhrad jater u ALF. Pro výhody analýzy mikrodialyzátu u pacientů s ALF hovoří i případová studie, dokumentující záchyt patologického snížení hladiny glukózy v mozkové tkáni bez korelace s patologickou hodnotou glykémie (Hutchinson PJ et al., 2006).

Obr. č. 5 Schematické znázornění funkce mikrodialyzačního katetru v průběhu monitorace tkáňového metabolismu (firemní dokumentace)



Shrnutí

Na vzniku nitrolební hypertenze má svůj podíl jednak astrocytární otok, jehož vznik souvisí s metabolismem amoniaku a glutaminu v mozkové tkáni, a jednak tkáňová hyperémie, která provází vznik a vývoj akutního jaterního selhání. Otázka vzniku nitrolební hypertenze však stále není úplně zodpovězena a pro uspokojivé vysvětlení všech průvodních patofyziologických dějů je třeba dalších výsledků na všech úrovních preklinického i klinického výzkumu. FPSA je relativně nová, nebiologická podpůrná eliminační metoda, používaná při léčbě ALF s klinicky doloženou podpůrnou eliminační funkcí při ALF. Její vliv na ICP, fatální komplikaci ALF, je třeba doložit experimentální prací. Mikrodialýza, jakožto nově zaváděná efektivní metoda monitorace aktuálního stavu vnitřního prostředí konkrétních tkání organismu, může být nadějnou pomůckou pro lepší pochopení metabolismu v průběhu akutního jaterního selhání. Monitorace pomocí intracerebrální mikrodialýzy by mohla v budoucnu sloužit jako časný marker efektivity klinické léčby tohoto závažného onemocnění.

Cíle práce

Práce se zaměřuje na možnosti ovlivnění mozkového edému, fatální komplikace při rozvoji akutního jaterního selhání, terapií extrakorporální náhradou jater. Klade si za cíl objektivní posouzení tohoto aspektu léčby, které umožňuje právě kontrolovaná studie na definovaném zvířecím chirurgickém modelu jaterního selhání.

Primárním cílem této práce bylo zhodnotit vliv arteficiální náhrady jater při akutním jaterním selhání (ALF – acute liver failure) metodou frakční plazmatické separace a adsorpce (FPSA) na snížení intrakraniálního tlaku (ICP – intracranial pressure).

Druhým úkolem a otázkou, kterou si práce pokládá, je zhodnocení metody monitorace intersticiální intracerebrální mikrodialýzy a její možné úlohy v monitoraci rozvoje a léčby jaterního mozkového edému při léčbě akutního jaterního selhání metodou arteficiální náhrady jater, konkrétně opět nebiologickou metodou frakční plazmatické separace a adsorpce.

Stanoveny byly následující hypotézy:

Hypotéza 1 – Metoda frakční plazmatické separace a adsorpce (FPSA) pozitivně ovlivňuje růst intrakraniálního tlaku při akutním jaterním selhání.

Hypotéza 2 – Intracerebrální mikrodialýza odráží efektivitu léčby akutního jaterního selhání metodou frakční plazmatické separace a adsorpce dříve a lépe než změna intrakraniálního tlaku.

Experimentální metoda

Celkově byly provedeny dvě kontrolované experimentální studie.

Experiment pilotní

V prvním experimentu byl použit chirurgický devaskularizační model akutního jaterního selhání (Ryska M. et al, 2004) na praseti o hmotnosti 35-40 kg. Tento originální model spočívá v chirurgické identifikaci veny portae a provedení prehepatální portokavální end-to-side anastomózy. Zvířata v této studii byla rozdělena pouze do dvou skupin - skupiny s chirurgicky navozeným ALF léčená metodou FPSA (zahrnuto 14 prasat) a skupiny pouze s devaskularizací navozeným ALF (zahrnuto 7 prasat). Na rozdíl od druhé, rozsáhlejší studie, byl v tomto experimentu monitorován pouze intrakraniální tlak, nikoliv parametry mikrodialýzy. Perioperační a pooperační péče, stejně jako napojení na přístroj FPSA/Prométheus® se nijak nelišily od metodiky, popsané podrobně u následující studie.

Experiment rozšířený

V druhém experimentu byl použit chirurgický resekční model akutního jaterního selhání opět na velkém laboratorním zvířeti – praseti o hmotnosti 35-40 kg. Tento modifikovaný model (Ladurner R, 2005) chirurgické resekce, provedený u dvaceti pokusných zvířat, kombinuje 70% pravostrannou neanatomickou resekci jaterního parenchymu s dvacetiminutovou totální hepatální venózní okluzí. Dvě hodiny po skončení operace byla zvířata náhodně rozdělena do dvou skupin, skupiny kontrolní (ALF-skupina), a skupiny, která byla léčena metodou frakční plazmatické separace a adsorpce (FPSA-skupina). Zvířata z FPSA skupiny byla napojena na eliminační přístroj

frakční plazmatické separace a adsorpce FPSA (Fresenius medical Care AG, Germany – známý též jako Prometheus®), jak je popsáno níže v textu, na jeden cyklus léčby trvající 6 hodin (Rifai K et al., 2005). U třetí srovnávací skupiny prasat byla provedena pouze jednoduchá laparotomie (SHAM-skupina). Všechna zvířata byla dvanáct hodin po skončení chirurgického zákroku utracena letální dávkou thiopentalu (Sodium Pentothal, Abbot Laboratories, UK) a chloridu draselného (KCl 7,45% Braun). Ve skupině FPSA zemřela v pooperačním období dvě pokusná zvířata v důsledku chirurgicky neovladatelného krvácení. Celkově bylo tedy do studie zařazeno 21 zvířat – 10 prasat ve skupině kontrolní (ALF-skupina), 8 prasat ve skupině léčené metodou FPSA (FPSA-skupina) a 3 prasata ve skupině pouze laparotomované (SHAM-skupina).

Anestezie a perioperační péče

Zvířata byla premedikována intramuskulárním podáním směsi ketaminu v dávce 10mg/kg (Narkamon, Léčiva, Czech Republic), atropinu v dávce 0,01 mg/kg (Atropin Biotika, Hoechst-Biotika, Slovakia), azaperonu v dávce 4 mg/kg (Stresnil, Janssen Pharmaceutical, Belgium) a medetomidinu v dávce 25 µg/kg (Domitor, Pfizer, USA). Tato směs byla zvířatům aplikována dvacet minut před úvodem do anestezie.

Celková anestezie pak byla navozena intravenózním podáním léků. K úvodu do anestezie byl aplikován fentanyl v dávce 4 µg/kg (Fentanyl Torrex, Torrex Chiesi, Austria) a etomidat 0,3 mg/kg (Hypnomidate, Janssen Pharmaceutica, Belgium); pro krátkodobou relaxaci facilitující tracheální intubaci byl podáván suxamethonium iodid (Succinylcholinjodid Valeant, Valeant Czech Pharma, Czech Republic) v dávce 1,5 mg/kg. Zvířata byla intubována v poloze na břicho s pomocí speciálně upraveného laryngoskopu umožňujícího přímou laryngoskopii.

Po intubaci a auskultační a kapnografické verifikaci správné polohy tracheální kanyly byla zvířata napojena na anesteziologický přístroj/ventilátor (Siemens Servo 900 C ventilator, Elema, Sweden). Zvířata byla ventilována v režimu objemově řízené ventilace (VCV - Volume-Controlled Ventilation), s FiO_2 (inspirační frakce O_2) 0,4, PEEP (Positive End Expiratory Pressure) byl udržován na 5 cm H_2O , iniciální respirační frekvence 16 dechů/min, inspirační objemy (TV - tidal volume) byly 6-8 ml/kg. Potřebnou adaptaci nastavení ventilačních parametrů byla udržována normokapnie ($paCO_2$ 4,6–5,3 kPa). Celková anestezie byla udržována inhalačně podáváním isofluranu (Forane, Abbott Laboratories, UK) ve směsi kyslíku a vzduchu a

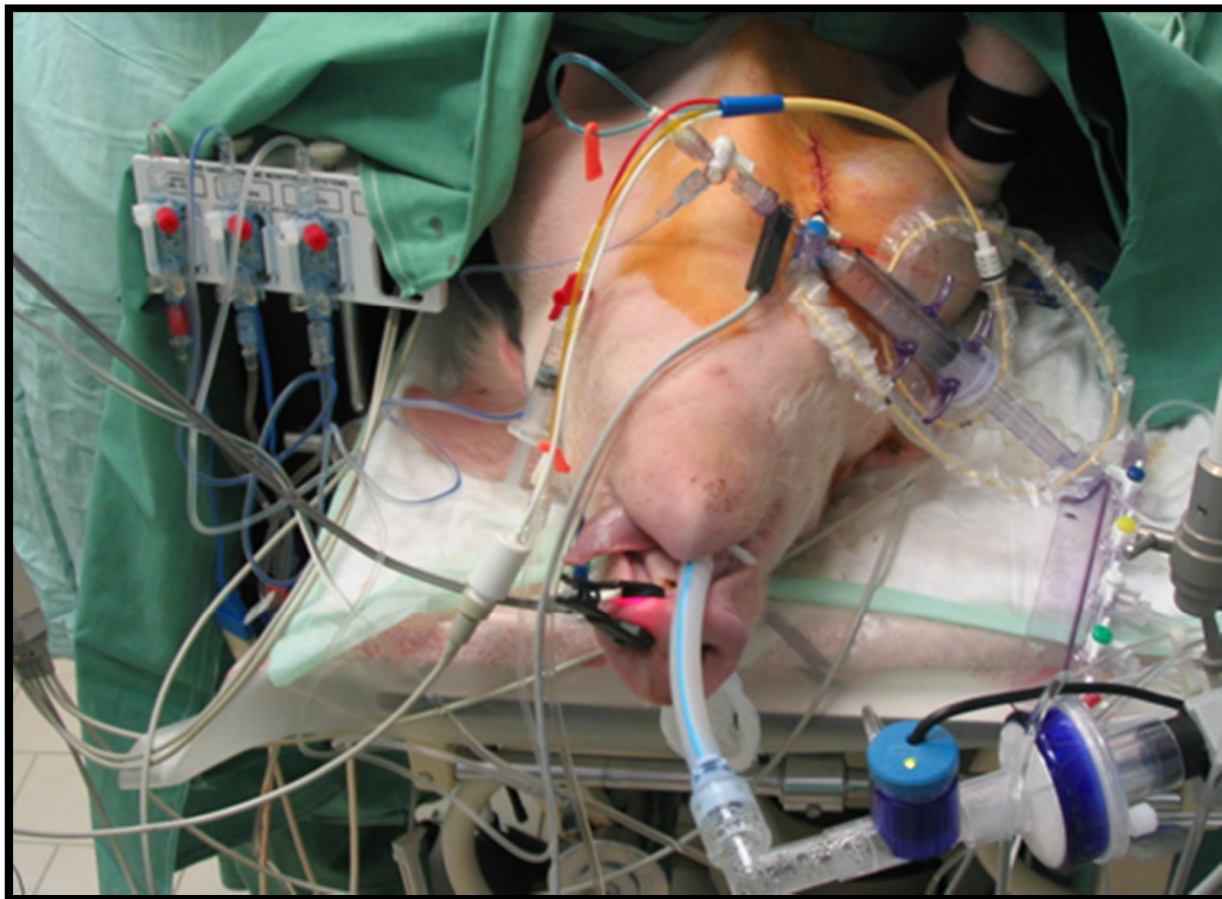
doplňována kontinuální aplikací fentanylu 6–10 µg/kg/h (Fentanyl Torrex, Torrex Chiesi, Austria). Inspirační frakce isofluranu se podle aktuální situace operačního zákroku pohybovala v rozmezí 0,75- 1,2%. Podle aktuální potřeby byly podávány jednorázové 50 µg bolusy fentanylu. V průběhu chirurgického zákroku byla svalová relaxace nezbytná k operačnímu postupu zajišťována podáváním nedepolarizujícího svalového relaxancia, použit byl pipecuronium bromid v dávce 0,02 mg/kg (Arduan, Gedeon Richter, Hungary).

Pro udržování dostatečného středního arteriálního tlaku (MAP – mean arterial pressure) v průběhu první a především pak druhé části operace, dočasně významně ovlivňující hemodynamiku pokusného zvířete, byly dle potřeby podávány krystaloidní a koloidní roztoky a noradrenalin. Protokol podávání katecholaminů (noradrenalin) a krystaloidních i koloidních roztoků byl ve všech experimentálních skupinách totožný. V rámci antibiotické profylaxe byl po úvodu do celkové anestezie podán jednorázově amoxicillin s kyselinou clavulanovou v dávce 1,2 mg (Augmentin 1.2g, Smithkline Beecham Pharmaceuticals, GB) a jako profylaxe stresového žaludečního vředu famotidin v jednorázové dávce 20 mg (Quamatel, Gedeon Richter, Hungary).

Kanylace femorální žíly, nutná pro pozdější napojení na mimotělní náhradu jater FPSA a kanylace femorální arterie pro kontinuální měření arteriálního tlaku a krevní odběry byla provedena punkční technikou dle Seldingera, eventuálně chirurgickým přístupem.

Zajištění vstupu do pravé vena jugularis interna bylo provedeno chirurgickou preparační technikou. Do žíly byl posléze vložen zavaděč pro thermodiluční plicnicový katetr (7F Arrow, USA) pro možnost monitorace hemodynamických parametrů v průběhu experimentu (Obr.č.6).

Obr. č. 6 - Plně monitorované experimentální zvíře v průběhu provádění chirurgického akutního jaterního selhání



Pooperační péče

Po provedení chirurgické jaterní resekce byla zvířata ventilována na přístroji Servo Ventilator tlakově řízenou ventilací (PCV – pressure controlled ventilation) s nezměněnými ventilačními parametry, tedy s $F_i O_2$ 0.4, PEEP 5 cm H_2O , respirační frekvence 16 dechů/min, a s inspiračními objemy 6-8 ml/kg. Nadále byla udržována normokapnie ($paCO_2$ 4.6–5.3 kPa). Tělesná teplota byla udržována ve fyziologickém rozmezí 36.5 °C – 38 °C. Zvířata byla analgosedována kombinací propofolu v úvodní dávce 6 mg/kg/h a následně kontinuálně v rozmezí 4-8 mg/kg/h (Propofol 1%, Fresenius Kabi, Germany) a fentanylu v dávce 2 μ g/kg/h (Fentanyl Torrex, Torrex Pharma GmbH, Austria).

V případě potřeby byly podávány krystaloidní a koloidní roztoky. Pro udržení hemodynamické stability a pro udržení MAP nad 65 mmHg byl výjimečně podáván noradrenalin (Noradrenalin, Léčiva, Czech Republic). V pravidelných intervalech byla měřena hladina glykemie a pro udržení hladiny krevní glukózy nad 4,5 mmol/l byla podávána kontinuální infuze 40% roztoku glukózy (Glucose 40% Braun, Germany).

Mikrodialýza a monitorace intrakraniálního tlaku

Monitorace intrakraniálního tlaku (ICP – intracranial pressure) a monitorace metodou intersticiální mikrodialýzy (MD – microdialysis) byla zajištěna bezprostředně po skončení chirurgického zákroku. Za sterilních podmínek byly v pravé frontální oblasti vytvořeny dva otvory do lebeční dutiny. Po punkci dury mater byl do oblasti pravého frontálního laloku jedním otvorem zaveden senzor pro měření intrakraniálního tlaku a druhým otvorem katetr s mikrodialyzační membránou (Obr.č.7). K zamezení potenciálního úniku cerebrospinálního likvoru byly posléze otvory uzavřeny kostním voskem.

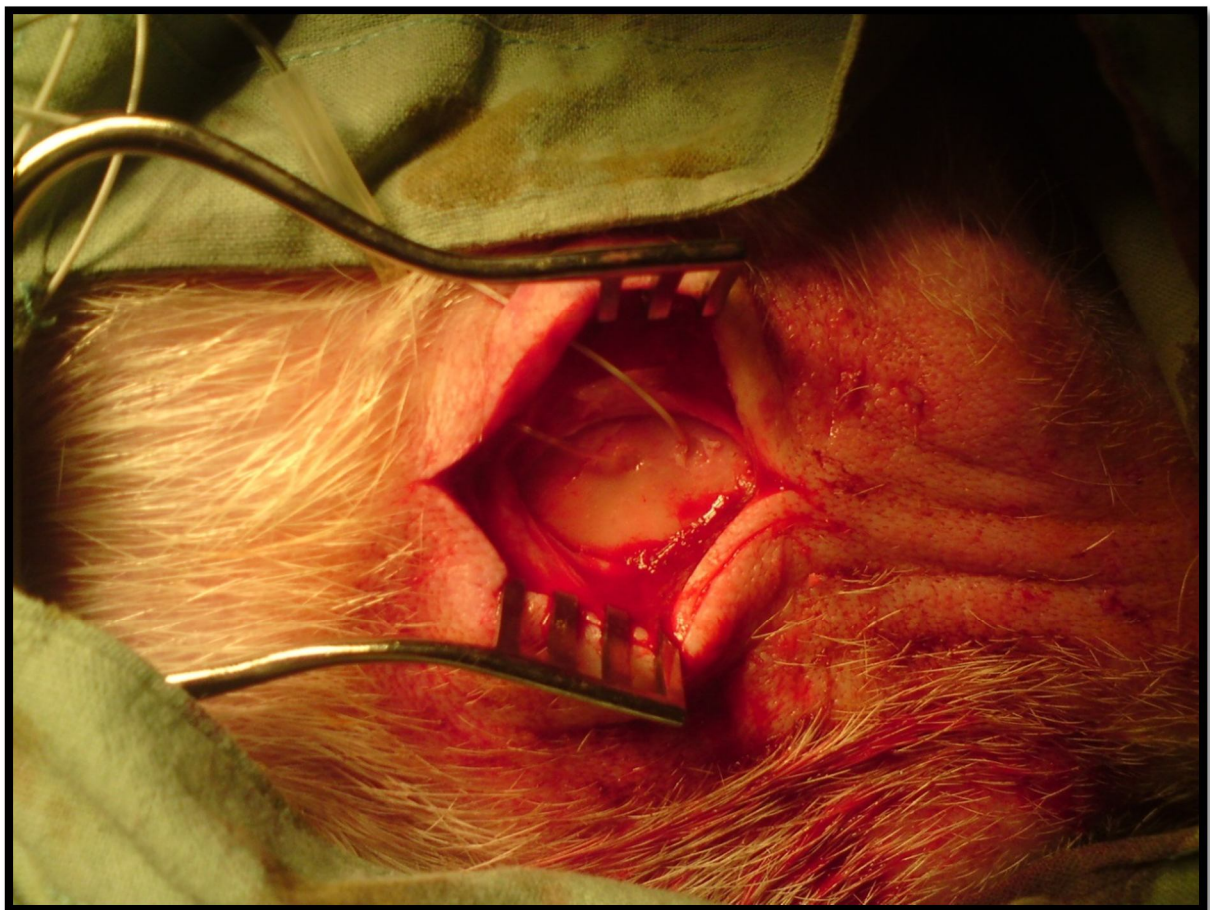
Námi použitý mikrodialyzační katetr CMA70 (CMA Solna Sweden) se skládá z velmi tenké 60 mm dlouhé dvojluminální plastikové kanyly, na jejímž konci je 10 mm dlouhá semipermeabilní membrána, propouštějící látky o velikosti maximálně 20 000 Daltonů. Po zavedení mikrodialyzační membrány do mozkové kůry byl katetr napojen na mikroinfuzní pumpu (CMA/106 Microinjection pump; CMA Microdialysis AB, Stockholm, Sweden) a kontinuálně perfundován/promýván arteficiální tekutinou s iontovým složením odpovídajícím cerebrospinálnímu liqoru rychlostí 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$. Pro následující analýzu mikrodialyzačním přístrojem - CMA 600 Microdialysis Analyzer (CMA Microdialysis AB) byl dialyzát sbírán v hodinových intervalech do mikrokyvet, z nichž každá obsahovala přibližně 18 μl roztoku.

Mikrodialyzační přístroj provádí v každém analyzovaném vzorku měření glukózy, laktátu, pyruvátu, glutamátu a glycerolu. Se stanovenou rychlostí perfuse za daných podmínek dochází k vyrovnání koncentrací zkoumaných látek v analyzované tkáni a v perfuzním roztoku a výtěžnost (recovery rate) dosahuje 99%. Jak bylo řečeno, sbírané vzorky byly bezprostředně po odebrání analyzovány ve zmiňovaném bed-side mikrodialyzačním přístroji. Vzorky byly posléze při -80°C zmrazeny pro další analýzu koncentrace glutaminu. První vzorky k analýze byly z druhé hodiny experimentu, perfuzní roztok byl tedy sbírán mezi koncem první a začátkem třetí hodiny experimentu.

Glutamin z mikrodialyzačních vzorků byl měřen a analyzován vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií HPLC – high performance liquid chromatography (Perkin-Elmer revers-phase HPLC systém) s fluorescenční detekcí a prekolumnální o-phthalaldehydovou derivatizací.

Monitorace intrakraniálního tlaku byla prováděna intraparenchymálním tlakovým čidlem (Codman Microsensor, Johnson and Johnson, USA).

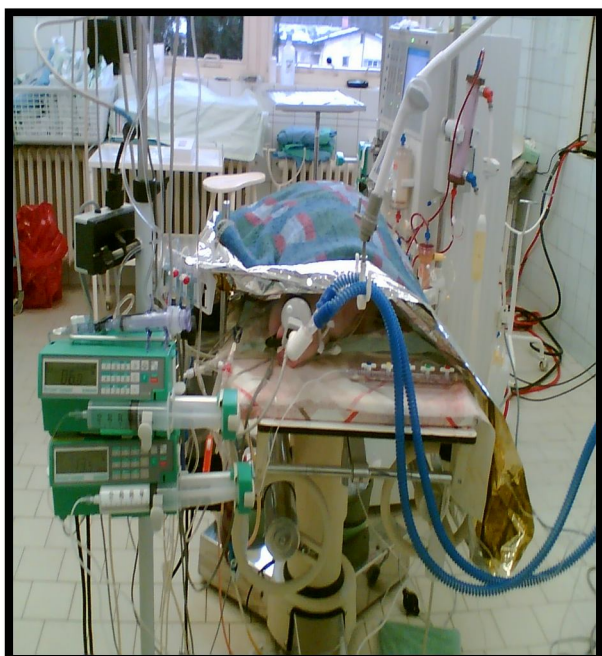
Obr. č.7 - Mikrodialyzační katetr a čidlo pro měření ICP zavedené v pravém frontálním mozkovém laloku experimentálního zvířete



Léčba FPSA

Pro nebiologickou podpurnou terapii jaterního selhání byla použita metoda frakční plazmatické separace a adsorpce – FPSA (FPSA/Prometheus®, Fresenius Medical Care AG). Extrakorporální systém byl před napojením na léčené zvíře naplněn a odvzdušněn roztokem NaCl 0,9%. Byl zvolen obvyklý veno-venozní způsob zapojení na dialyzační katetr zavedený v pravé femorální véné experimentálního zvířete. Přístroj FPSA zajišťuje detoxifikace a umožňuje eliminaci toxických substancí rozpustných ve vodě a zároveň i látek vázaných na albumin. Detailnější popis včetně schématu a zapojení FPSA je uveden na začátku této práce. Během našeho experimentu byla prováděna léčba se standardním nastavením parametrů přístroje s krevním průtokem 200 ml/h v primárním okruhu a s plasmatickým průtokem 300ml/h v sekundárním, vlastním FPSA okruhu. Pro antikoagulaci byl při přísné monitoraci příslušných hladin a následné substituci kalcia v krvi použit citrát sodný.

Obr.č. 8 Laboratorní zvíře v průběhu experimentu



Obr.č.9. Napojení laboratorního zvířete na přístroj FPSA/Prometheus



Statistické zpracování

V prvním experimentu byly výsledky porovnány pomocí dvouvýběrového Studentova t-testu. Za statisticky signifikantní byl rozdíl považován při $p < 0,05$.

Statistická analýza výsledků z rozsáhlejšího druhého experimentu byla provedena na prokladech získaných regresí. Regresní model byl postaven zvláště pro každou měřenou veličinu v každé skupině pozorování. Model je tvořen polynomem nejvýše pátého stupně s konstantním členem, členy jsou odhadnuty metodou nejmenších čtverců. Model byl odvozen zahrnutím všech členů na začátku a postupným odebráním členu s nejnižší významností, dokud všechny zbylé členy nebyly významné na hladině $\alpha = 5\%$. Konstantní člen nebyl odebrán. Člen prvního stupně byl zachován v modelech, ve kterých nebyl žádný člen významný. Proklady byly spočteny pro vybrané časy, včetně směrodatné chyby a intervalu spolehlivosti pro $P = 95\%$. Na stejném modelu byla provedena analýza rozptylu. Pro dané časy byl proveden dvouvýběrový Studentův test na těchto hypotézách: H_0 – rozdíl prokladů není významný; H_1 – rozdíl prokladů je významný. Studentův test byl vypočten s těmito parametry: střední rozdíl: rozdíl porovnávaných prokladů; počet stupňů volnosti: podle odpovídajícího chybového členu v analýze rozptylu, tj. počet pozorování mínus počet členů v regresním modelu; směrodatná odchylka: směrodatná chyba prokladu násobená odmocninou z [počet stupňů volnosti plus jedna]. Na Studentově statistice byla spočtena p-hodnota. Přijetí alternativní hypotézy bylo zhodnoceno na hladině $\alpha = 5\%$ ($p < 0,05$). Regresní model byl odvozen v Q-DAS Destra v.10. Proklady a související parametry byly vypočteny v Minitab 16.2.2. Vizualizace dat a výpočty Studentova testu byly připraveny v MS Excel 2010.

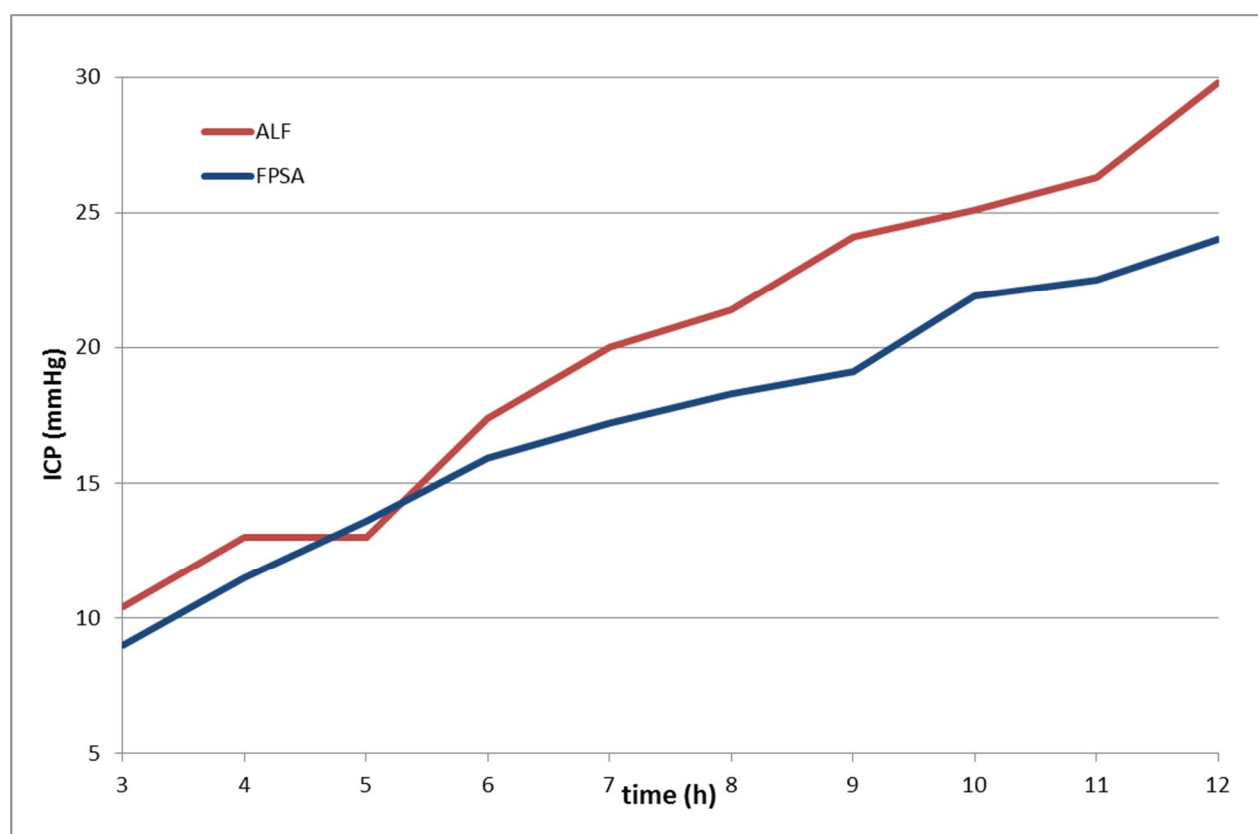
Předoperační příprava, operace a pooperační péče byla prováděna v souladu se zákonem ČR § 12 vyhlášky č. 311/97 Sb., o chovu a využití pokusných zvířat.

Výsledky

Intrakraniální tlak

V první studii byl zaznamenán signifikantně vyšší intrakraniální tlak ve skupině kontrolní než ve skupině léčené metodou FPSA v 9. – 12. hodině experimentu (Graf č. 1, Tabulka č. 1).

Graf č. 1 - Hodnoty ICP v mmHg u laboratorních zvířat s ALF léčených FPSA –skupina FPSA a u kontrolní skupiny bez léčby – skupina ALF

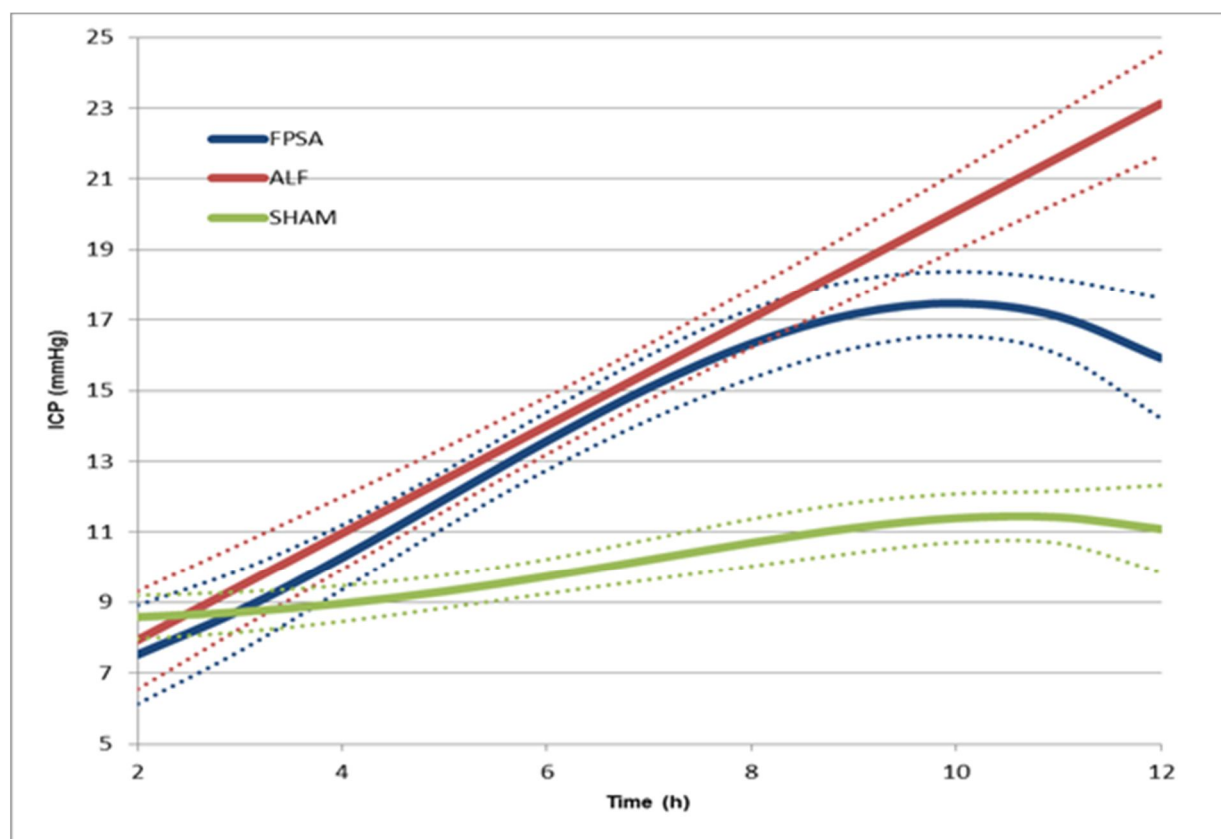


Tabulka č. 1 - Srovnání hodnot ICP ve skupině zvířat s ALF léčených metodou FPSA (FPSA) a v kontrolní skupině (ALF) - průměr se směrodatnou odchylkou SD, hodnota p

čas (h)	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ALF	10,4	13	13	17,4	20	21,4	24,1	25,1	26,3	29,8
SD	1,51	2,58	2,16	2,29	2,2	3,51	2,28	2,19	3,5	5,88
FPSA	9	11,5	13,6	15,9	17,2	18,3	19,1	21,9	22,5	24
SD	3,82	5,08	5,87	5,15	4,71	4,89	4,09	3,63	3,98	4,1
<i>P</i>	<i>p>0.05</i>	<i>p>0.05</i>	<i>p>0.05</i>	<i>p>0.05</i>	<i>p>0.05</i>	<i>p>0.05</i>	<i>p<0.01</i>	<i>p<0.01</i>	<i>p<0.01</i>	<i>p<0.01</i>

Stejně tak byl ve druhé studii ICP signifikantně nižší v léčené FPSA-skupině než v ALF-skupině od 9. do 12. hodiny experimentu. Od 4. respektive 5. hodiny byly hodnoty ICP signifikantně vyšší v obou ALF i FPSA skupinách než ve skupině SHAM. V porovnání se SHAM skupinou byl pozorován u skupiny FPSA i u skupiny ALF signifikantní nárůst ICP. Tento nárůst ICP byl signifikantně nižší u skupiny FPSA než u skupiny ALF (Graf č. 2, Tabulka č. 2).

Graf č. 2 - Hodnoty ICP v mmHg u laboratorních zvířat s ALF léčených FPSA (2-8h) – skupina FPSA, kontrolní skupiny bez léčby – skupina ALF a pouze laparotomované skupiny – skupina SHAM (zobrazeny křivky středních hodnot s 95% konfidenčním intervalem)



Tabulka č. 2 - Hodnoty ICP v mmHg u laboratorních zvířat s ALF léčených FPSA (2-8h) – skupina FPSA, kontrolní skupiny bez léčby – skupina ALF a pouze laparotomované skupiny – skupina SHAM (uvedeny střední hodnoty a standardní chyba – SE, hodnoty p)

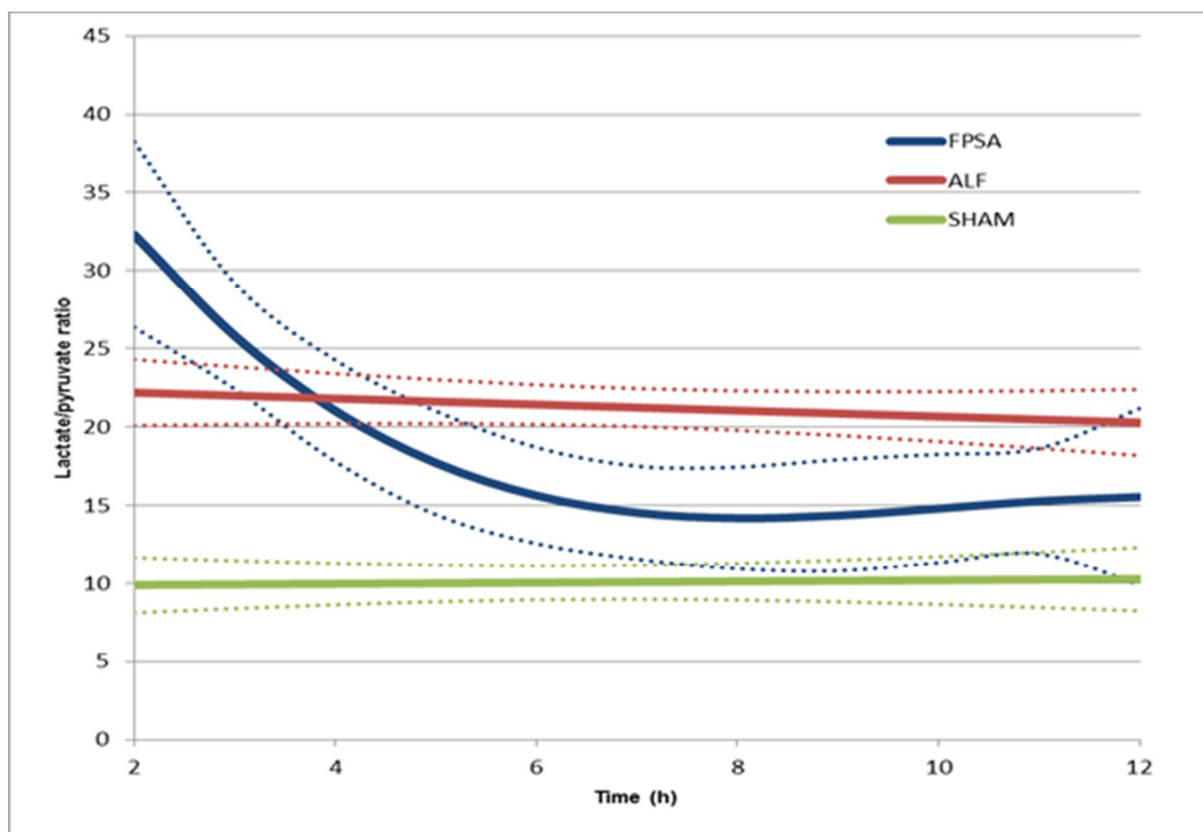
čas (h)		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ICP (mmHg)	FPSA	7,53	8,77	10,29	11,93	13,58	15,09	16,33	17,17	17,47	17,10	15,92
	<i>SE</i>	<i>0,70</i>	<i>0,58</i>	<i>0,46</i>	<i>0,40</i>	<i>0,41</i>	<i>0,46</i>	<i>0,49</i>	<i>0,49</i>	<i>0,46</i>	<i>0,54</i>	<i>0,85</i>
	ALF	7,94	9,46	10,98	12,49	14,01	15,53	17,05	18,57	20,09	21,61	23,13
	<i>SE</i>	<i>0,70</i>	<i>0,60</i>	<i>0,52</i>	<i>0,45</i>	<i>0,41</i>	<i>0,40</i>	<i>0,42</i>	<i>0,48</i>	<i>0,55</i>	<i>0,64</i>	<i>0,74</i>
	SHAM	8,58	8,73	8,97	9,31	9,74	10,22	10,70	11,12	11,40	11,43	11,09
	<i>SE</i>	<i>0,30</i>	<i>0,28</i>	<i>0,25</i>	<i>0,23</i>	<i>0,24</i>	<i>0,28</i>	<i>0,33</i>	<i>0,35</i>	<i>0,34</i>	<i>0,36</i>	<i>0,61</i>
P	FPSAxALF	0,68	0,42	0,33	0,36	0,46	0,46	0,26	0,04	< 0,01	< 0,01	< 0,01
	FPSAxSHAM	0,33	0,96	0,07	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
	ALFxSHAM	0,58	0,47	0,02	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01

Parametry mikrodialýzy

Poměr laktát/pyruvát

V léčené FPSA skupině byl na rozdíl od ALF a SHAM skupiny zaznamenán signifikantní pokles poměru laktát/pyruvát (L/P). Hodnoty poměru L/P byly v průběhu celého experimentu (2. - 12. hodina) signifikantně nižší u SHAM skupiny než u skupiny ALF. L/P poměr byl signifikantně nižší ve skupině FPSA než v ALF skupině mezi 5. – 11. hodinou experimentu. Poměr L/P byl signifikantně vyšší v FPSA skupině než v SHAM skupině mezi 2. – 7. hodinou a po 11. hodině experimentu (Graf. č. 3A, Tabulka č. 3). Graf č.3B znázorňuje změnu poměru L/P u pokusných skupin vztaženou ke 2. hodině experimentu. Pokles L/P je signifikantní a poměr L/P je signifikantně nižší u skupiny FPSA než u ALF od 3. hodiny pokusu.

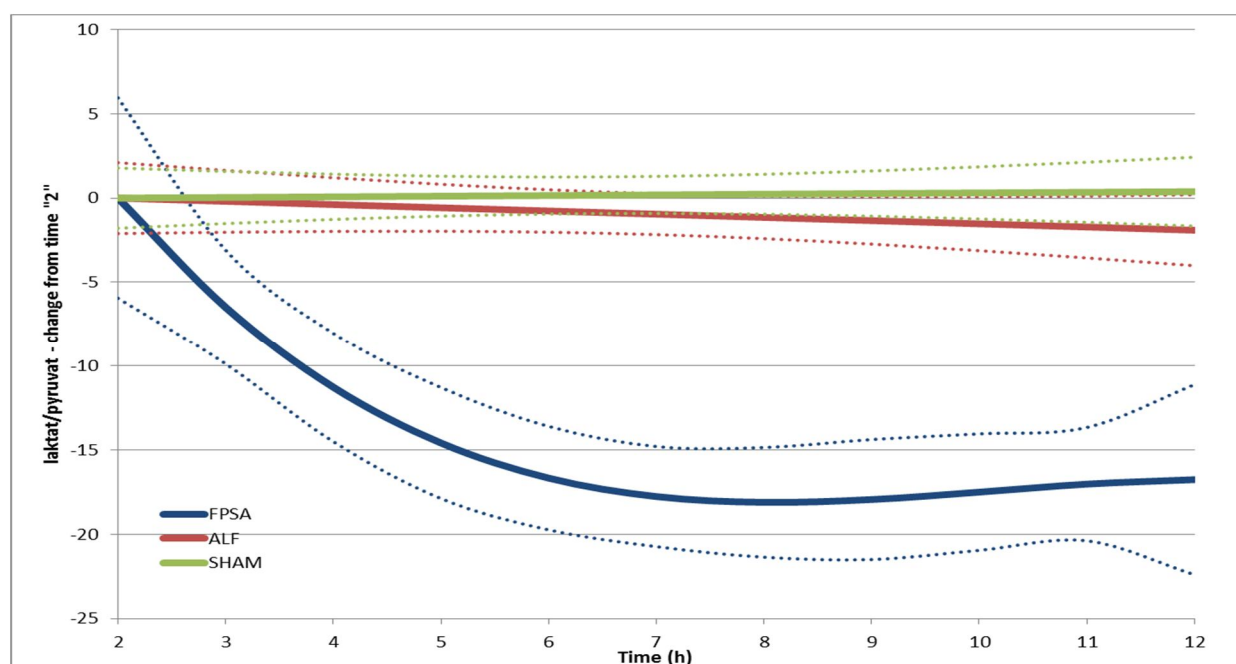
Graf č. 3A - Extracelulární cerebrální poměr L/P (laktát/pyruvát) u laboratorních zvířat s ALF léčených FPSA (2-8h) – skupina FPSA, kontrolní skupiny bez léčby – skupina ALF a pouze laparotomované skupiny – skupina SHAM (zobrazeny křivky středních hodnot s 95% konfidenčním intervalem)



Tabulka č. 3 - Extracelulární cerebrální poměr L/P (laktát/pyruvát) u laboratorních zvířat s ALF léčených FPSA (2-8h) – skupina FPSA, kontrolní skupiny bez léčby – skupina ALF a pouze laparotomované skupiny – skupina SHAM (uvedeny střední hodnoty a standardní chyba – SE, hodnoty p)

čas (h)		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L/P ratio	FPSA	32,29	25,81	21,03	17,71	15,63	14,54	14,19	14,36	14,80	15,27	15,54
	SE	2,98	1,70	1,62	1,65	1,54	1,49	1,63	1,79	1,73	1,69	2,83
	ALF	22,19	22,00	21,81	21,62	21,43	21,24	21,05	20,86	20,67	20,47	20,28
	SE	1,06	0,92	0,80	0,70	0,63	0,61	0,63	0,70	0,80	0,92	1,06
	SHAM	9,88	9,92	9,96	10,00	10,03	10,07	10,11	10,15	10,19	10,23	10,26
	SE	0,88	0,76	0,66	0,58	0,54	0,54	0,58	0,66	0,76	0,88	1,01
p	FPSA×ALF	<0,01	0,40	0,64	0,02	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,08
	FPSA×SHAM	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,02	<0,05	0,10	0,12	0,08	<0,05	<0,05
	ALF×SHAM	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

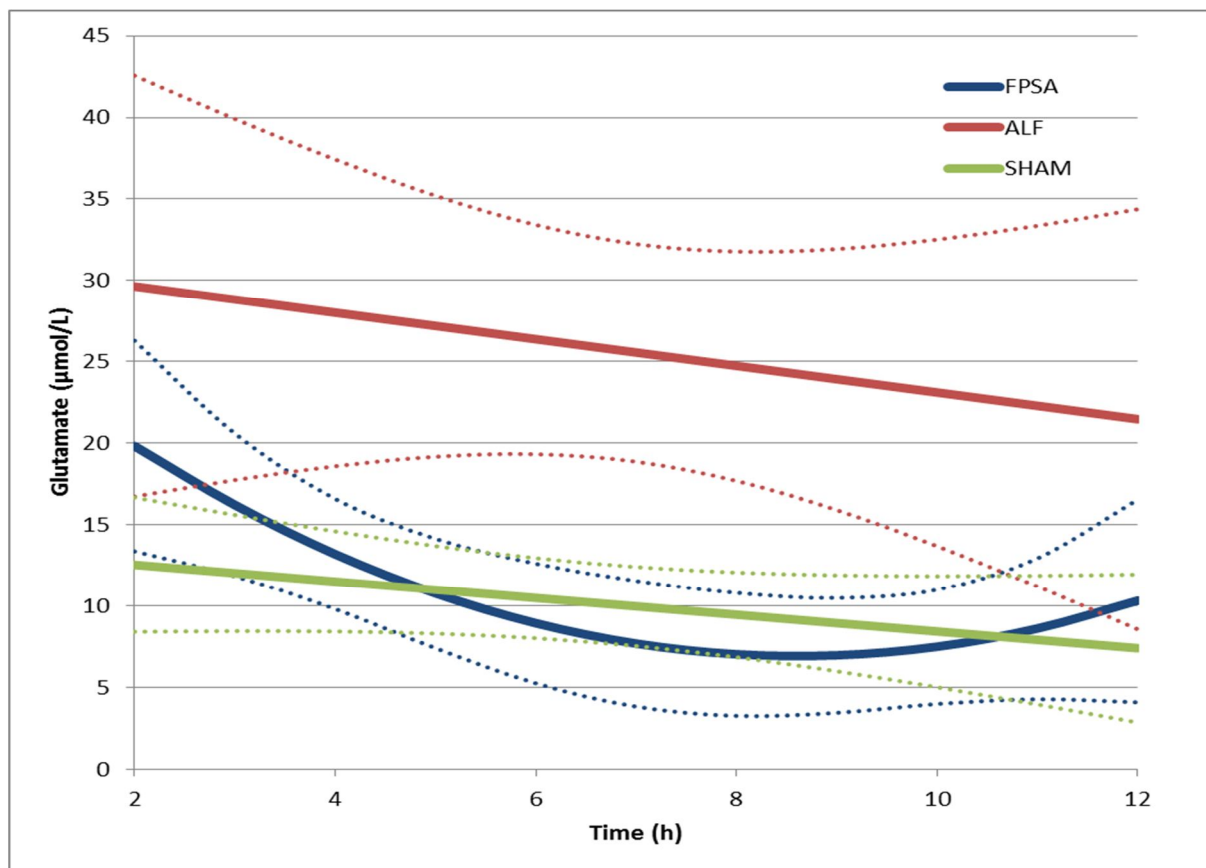
Graf č. 3B - Změna extracelulárního cerebrálního poměr L/P (laktát/pyruvát) u laboratorních zvířat s ALF léčených FPSA (2-8h) – skupina FPSA, kontrolní skupiny bez léčby – skupina ALF a pouze laparotomované skupiny – skupina SHAM, vztažená ke 2. hodině experimentu (zobrazeny křivky středních hodnot s 95% konfidenčním intervalem)



Glutamát

Hladina extracelulárního mozkového glutamátu byla signifikantně vyšší ve skupině ALF než ve skupině FPSA mezi 4. - 11. hodinou experimentu. Ve srovnání ALF skupiny a SHAM skupiny byla hladina glutamátu signifikantně vyšší v ALF skupině mezi 4. – 9. hodinou experimentu. Hladina glutamátu byla při porovnání FPSA a SHAM skupiny vyšší u skupiny FPSA mezi 2. - 4. hodinou, nižší mezi 5. -10. hodinou a vyšší mezi 11. - 12. hodinou, rozdíl ovšem v daném konfidenčním intervalu nebyl signifikantní (Graf č. 4, Tabulka č. 4).

Graf č. 4 - Extracelulární cerebrální glutamát u laboratorních zvířat s ALF léčených FPSA (2-8h) – skupina FPSA, kontrolní skupiny bez léčby – skupina ALF a pouze laparotomované skupiny – skupina SHAM (zobrazeny křivky středních hodnot s 95% konfidenčním intervalem)



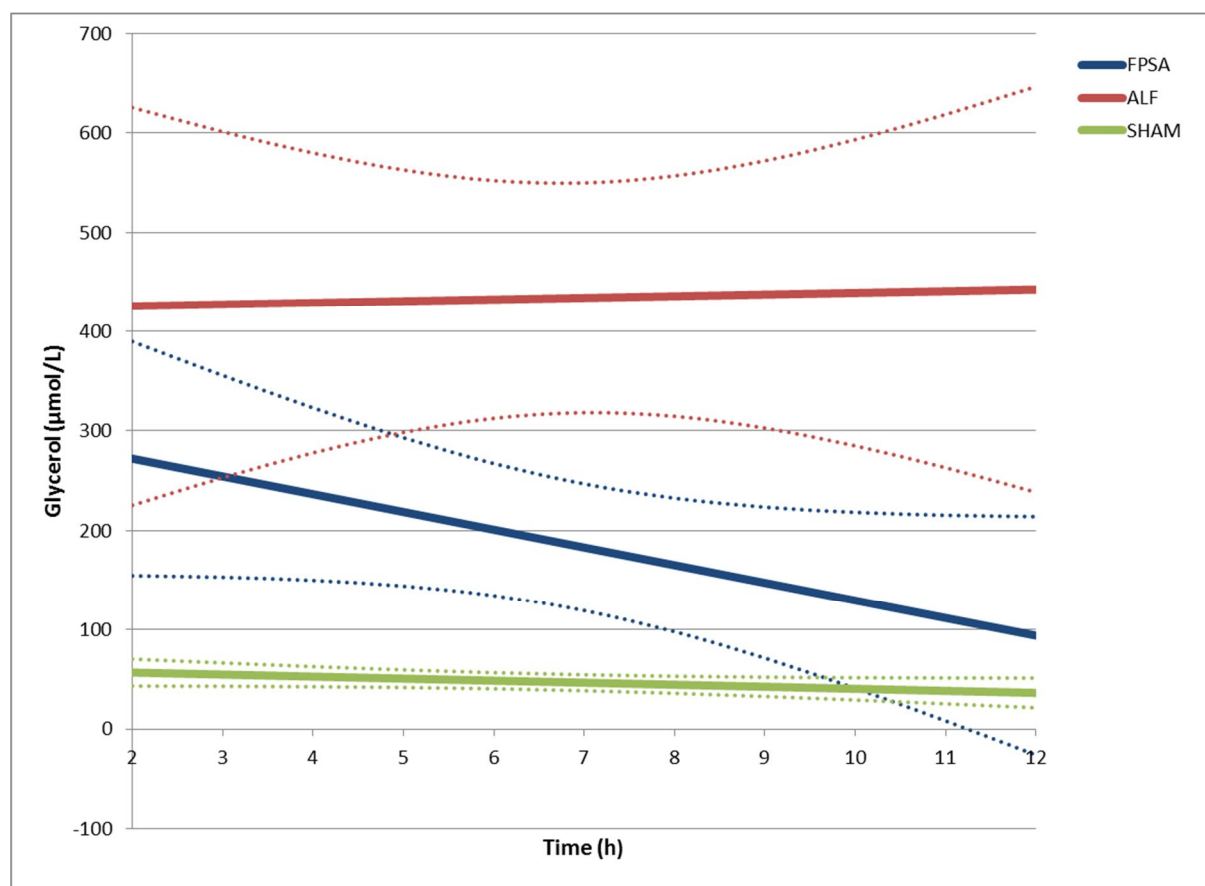
Tabulka č. 4 - Extracelulární cerebrální glutamát u laboratorních zvířat s ALF léčených FPSA (2-8h) – skupina FPSA, kontrolní skupiny bez léčby – skupina ALF a pouze laparotomované skupiny – skupina SHAM (uvedeny střední hodnoty a standardní chyba – SE, hodnoty p)

čas (h)		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Extracellular brain glutamate ($\mu\text{mol/L}$)	FPSA	19,82	16,22	13,20	10,77	8,93	7,69	7,03	6,97	7,49	8,61	10,32
	<i>SE</i>	<i>3,24</i>	<i>2,20</i>	<i>1,70</i>	<i>1,69</i>	<i>1,85</i>	<i>1,94</i>	<i>1,89</i>	<i>1,77</i>	<i>1,76</i>	<i>2,17</i>	<i>3,12</i>
	ALF	29,65	28,83	28,01	27,19	26,38	25,56	24,74	23,92	23,11	22,29	21,47
	<i>SE</i>	<i>6,50</i>	<i>5,58</i>	<i>4,74</i>	<i>4,04</i>	<i>3,55</i>	<i>3,37</i>	<i>3,55</i>	<i>4,04</i>	<i>4,74</i>	<i>5,58</i>	<i>6,50</i>
	SHAM	12,54	12,03	11,51	11,00	10,48	9,97	9,46	8,94	8,43	7,92	7,40
	<i>SE</i>	<i>2,03</i>	<i>1,76</i>	<i>1,52</i>	<i>1,33</i>	<i>1,21</i>	<i>1,20</i>	<i>1,28</i>	<i>1,45</i>	<i>1,68</i>	<i>1,94</i>	<i>2,23</i>
<i>p</i>	FPSA \times ALF	0,22	0,06	0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,01	0,04	0,16
	FPSA \times SHAM	0,15	0,23	0,54	0,93	0,59	0,45	0,41	0,48	0,74	0,84	0,55
	ALF \times SHAM	0,12	0,08	0,04	0,02	0,01	0,01	0,01	0,03	0,07	0,13	0,20

Glycerol

Hladina extracelulárního cerebrálního glycerolu byla ve skupině FPSA signifikantně nižší než ve skupině ALF od 5. do 12. hodiny experimentu. V porovnání se skupinou SHAM byla hladina extracelulárního glycerolu ve skupině ALF po celou dobu experimentu (2-12h) signifikantně vyšší. Extracelulární koncentrace glycerolu byla ve skupině SHAM signifikantně nižší než ve skupině FPSA do 8. hodiny experimentu, od hodiny 9. nebyl signifikantní rozdíl v koncentracích extracelulárního glycerolu mezi oběma skupinami (Graf č. 5, Tabulka č. 5).

Graf č. 5 - Extracelulární cerebrální glycerol u laboratorních zvířat s ALF léčených FPSA (2-8h) – skupina FPSA, kontrolní skupiny bez léčby – skupina ALF a pouze laparotomované skupiny – skupina SHAM (zobrazeny křivky středních hodnot s 95% konfidenčním intervalem)



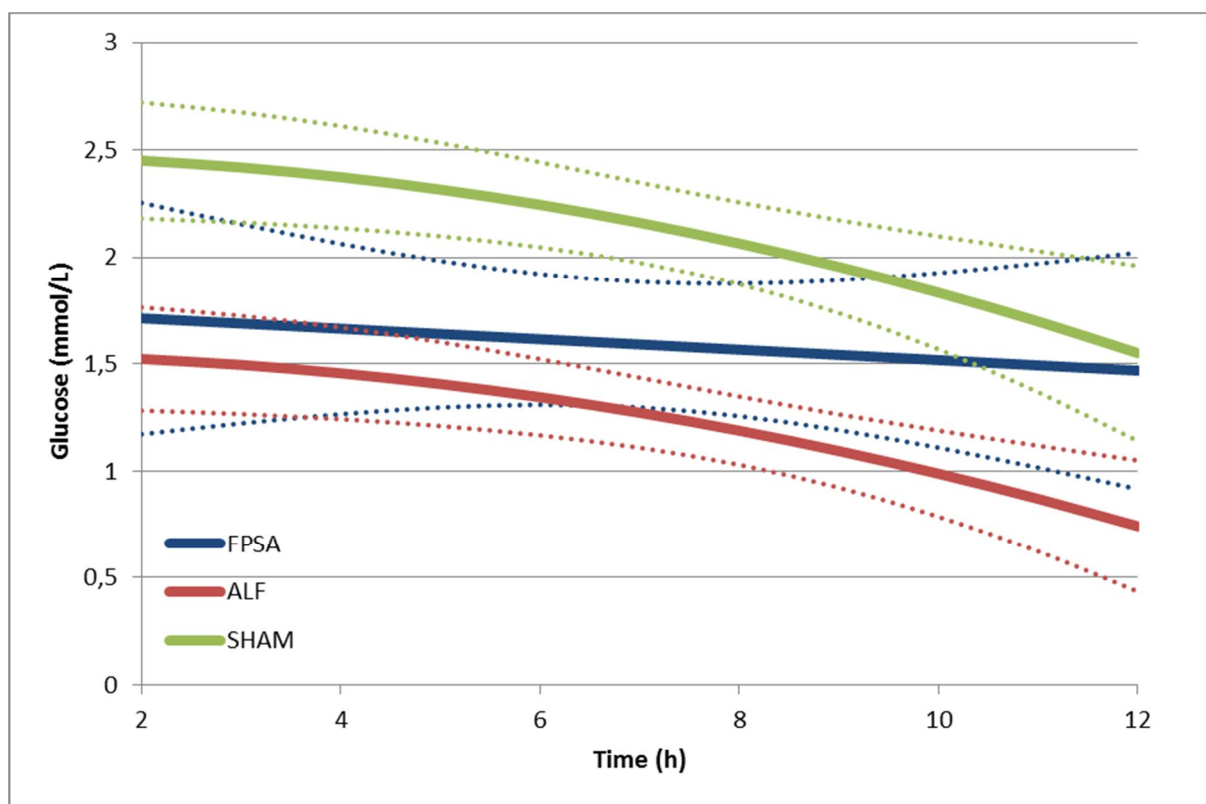
Tabulka č. 5 - Extracelulární cerebrální glycerol u laboratorních zvířat s ALF léčených FPSA (2-8h) – skupina FPSA, kontrolní skupiny bez léčby – skupina ALF a pouze laparotomované skupiny – skupina SHAM (uvedeny střední hodnoty a standardní chyba – SE, hodnoty p)

čas (h)		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	FPSA	272,2	254,4	236,6	218,8	201,0	183,2	165,3	147,5	129,7	111,9	94,1
	<i>SE</i>	58,9	50,8	43,4	37,4	33,3	32,0	33,8	38,2	44,5	52,0	60,3
Extracell. brain glycerol (µmol/L)	ALF	425,6	427,3	429,0	430,7	432,4	434,1	435,8	437,5	439,2	440,9	442,6
	<i>SE</i>	100,9	87,8	76,1	66,7	60,4	58,4	61,1	67,9	77,7	89,7	102,9
	SHAM	56,8	54,8	52,7	50,7	48,7	46,6	44,6	42,5	40,5	38,4	36,4
	<i>SE</i>	6,7	5,8	5,0	4,4	4,0	3,9	4,2	4,8	5,5	6,4	7,3
	FPSA×ALF	0,24	0,13	0,05	0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,01
	FPSA×SHAM	0,02	0,01	0,01	<0,01	<0,01	0,01	0,02	0,07	0,18	0,35	0,52
	ALF×SHAM	0,04	0,02	0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,01	0,03

Glukosa

Hladina extracelulární mozkové glukosy byla signifikantně vyšší ve skupině SHAM než ve skupině ALF mezi 2. – 12. hodinou experimentu a než ve skupině FPSA mezi 3. – 7. hodinou experimentu. Hladina extracelulární glukosy byla signifikantně vyšší v FPSA skupině než v ALF skupině od 7. hodiny experimentu (Graf č. 6, Tabulka č. 6).

Graf č. 6 - Extracelulární cerebrální glukóza u laboratorních zvířat s ALF léčených FPSA (2-8h) – skupina FPSA, kontrolní skupiny bez léčby – skupina ALF a pouze laparotomované skupiny – skupina SHAM (zobrazeny křivky středních hodnot s 95% konfidenčním intervalem)



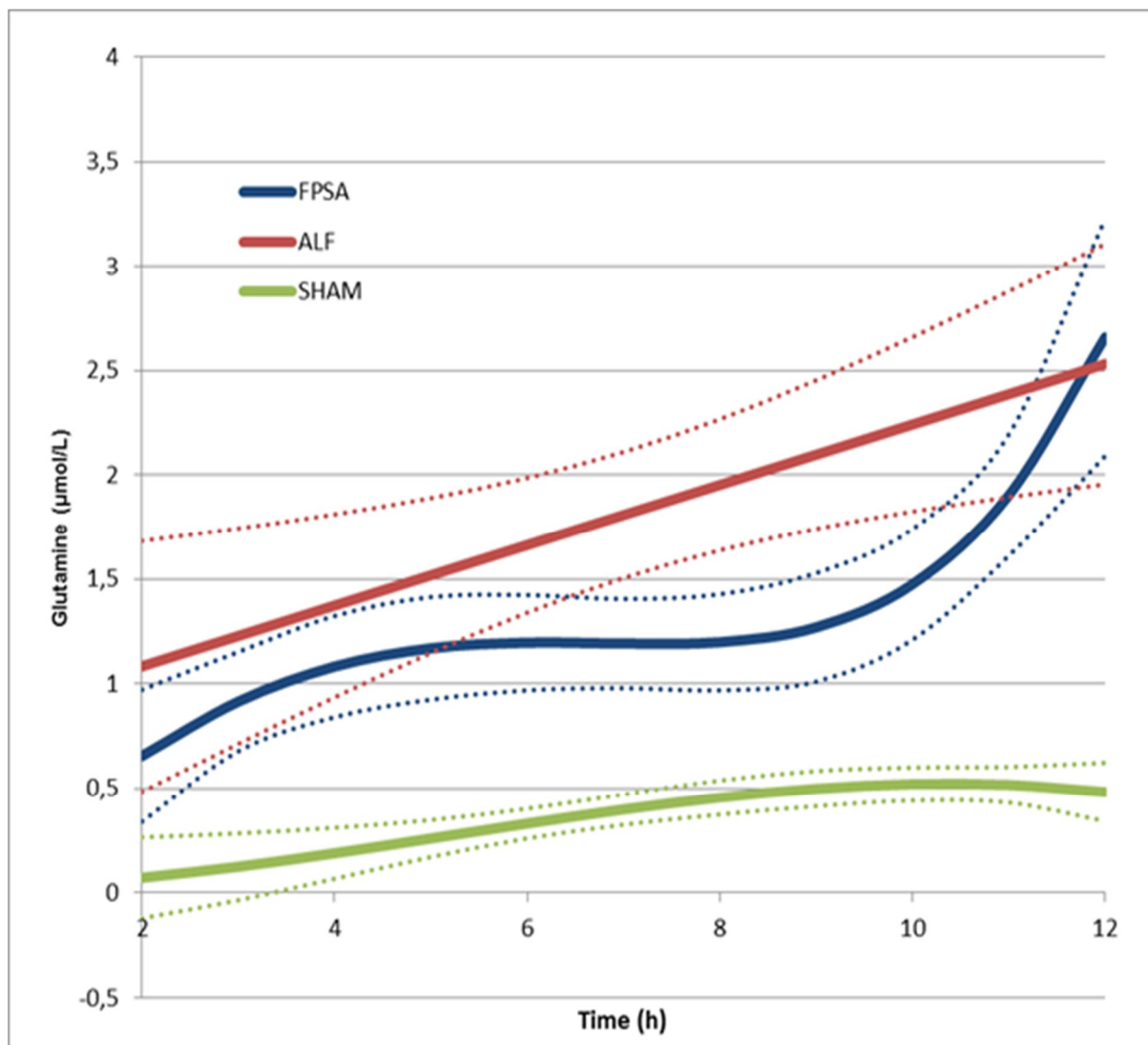
Tabulka č. 6 - Extracelulární cerebrální glukóza u laboratorních zvířat s ALF léčených FPSA (2-8h) – skupina FPSA, kontrolní skupiny bez léčby – skupina ALF a pouze laparotomované skupiny – skupina SHAM (uvedeny střední hodnoty a standardní chyba – SE, hodnoty p)

čas (h)		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Extracellular brain glucose (mmol/L)	FPSA	1,71	1,69	1,66	1,64	1,62	1,59	1,57	1,54	1,52	1,49	1,47
	<i>SE</i>	<i>0,27</i>	<i>0,23</i>	<i>0,20</i>	<i>0,17</i>	<i>0,15</i>	<i>0,15</i>	<i>0,16</i>	<i>0,18</i>	<i>0,21</i>	<i>0,24</i>	<i>0,28</i>
	ALF	1,52	1,50	1,46	1,41	1,35	1,27	1,19	1,09	0,99	0,87	0,74
	<i>SE</i>	<i>0,12</i>	<i>0,12</i>	<i>0,11</i>	<i>0,10</i>	<i>0,09</i>	<i>0,08</i>	<i>0,08</i>	<i>0,09</i>	<i>0,10</i>	<i>0,12</i>	<i>0,15</i>
	SHAM	2,45	2,42	2,37	2,32	2,25	2,16	2,07	1,96	1,83	1,70	1,55
	<i>SE</i>	<i>0,13</i>	<i>0,13</i>	<i>0,12</i>	<i>0,11</i>	<i>0,10</i>	<i>0,09</i>	<i>0,09</i>	<i>0,11</i>	<i>0,13</i>	<i>0,16</i>	<i>0,20</i>
<i>p</i>	FPSA×ALF	0,49	0,42	0,33	0,21	0,11	<0,05	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02
	FPSA×SHAM	0,09	0,05	0,03	0,02	0,01	0,02	0,05	0,15	0,34	0,60	0,86
	ALF×SHAM	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,01

Glutamin

Hladina extracelulárního mozkového glutaminu byla signifikantně vyšší v ALF skupině než v SHAM skupině mezi 3. - 12. hodinou experimentu. Stejně tak byla hladina glutaminu signifikantně vyšší v FPSA skupině než v SHAM skupině mezi 3. – 12. hodinou experimentu. Hladina glutaminu byla mezi 6. – 10. hodinou experimentu signifikantně nižší v FPSA skupině než v neléčené skupině ALF. V obou skupinách, ALF i FPSA, byl navíc signifikantní nárůst hodnot hladin glutaminu v porovnání se skupinou SHAM. Nárůst hodnot extracelulárního mozkového glutaminu byl signifikantně vyšší ve skupině ALF než ve skupině FPSA (Graf č. 7, Tabulka č. 7).

Graf č. 7 - Extracelulární cerebrální glutamin u laboratorních zvířat s ALF léčených FPSA (2-8h) – skupina FPSA, kontrolní skupiny bez léčby – skupina ALF a pouze laparotomované skupiny – skupina SHAM (zobrazeny křivky středních hodnot s 95% konfidenčním intervalem)



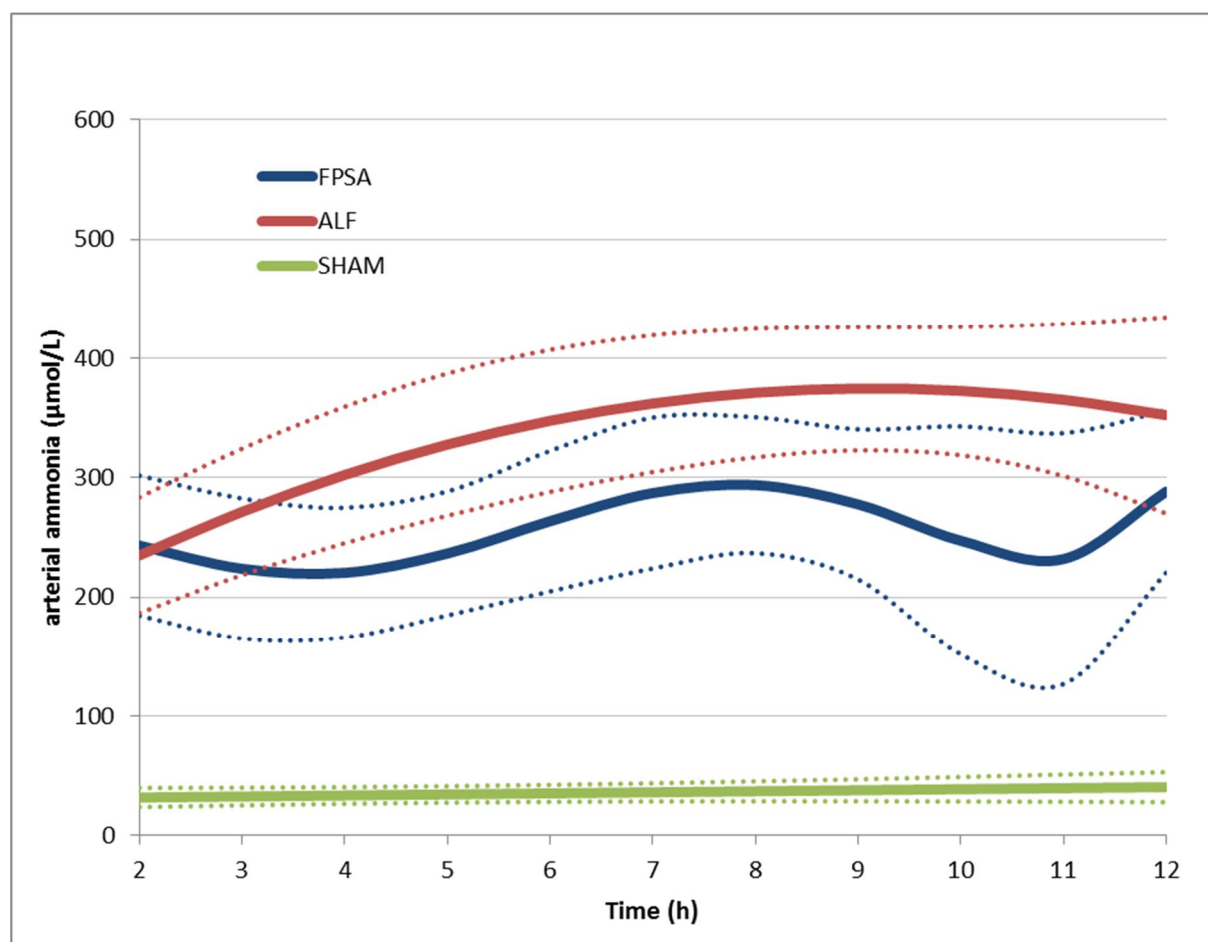
Tabulka č. 7 - Extracelulární cerebrální glutamin u laboratorních zvířat s ALF léčených FPSA (2-8h) – skupina FPSA, kontrolní skupiny bez léčby – skupina ALF a pouze laparotomované skupiny – skupina SHAM (uvedeny střední hodnoty a standardní chyba – SE, hodnoty p)

čas (h)		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Extracelular brain glutamin ($\mu\text{mol/L}$)	FPSA	0,66	0,92	1,08	1,17	1,20	1,19	1,20	1,27	1,48	1,90	2,66
	<i>SE</i>	<i>0,16</i>	<i>0,12</i>	<i>0,12</i>	<i>0,12</i>	<i>0,11</i>	<i>0,11</i>	<i>0,12</i>	<i>0,13</i>	<i>0,13</i>	<i>0,15</i>	<i>0,29</i>
	ALF	1,08	1,23	1,37	1,52	1,66	1,81	1,95	2,10	2,24	2,39	2,53
	<i>SE</i>	<i>0,30</i>	<i>0,26</i>	<i>0,22</i>	<i>0,19</i>	<i>0,16</i>	<i>0,15</i>	<i>0,16</i>	<i>0,18</i>	<i>0,21</i>	<i>0,25</i>	<i>0,29</i>
	SHAM	0,07	0,12	0,19	0,26	0,33	0,40	0,46	0,50	0,52	0,52	0,48
	<i>SE</i>	<i>0,09</i>	<i>0,08</i>	<i>0,06</i>	<i>0,04</i>	<i>0,03</i>	<i>0,04</i>	<i>0,04</i>	<i>0,04</i>	<i>0,04</i>	<i>0,04</i>	<i>0,07</i>
<i>p</i>	FPSA \times ALF	0,21	0,27	0,25	0,12	0,02	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,09	0,76
	FPSA \times SHAM	0,05	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	ALF \times SHAM	0,07	0,02	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Plazmatický amoniak

Koncentrace amoniaku v plazmě byla signifikantně vyšší ve skupině FPSA a ALF než ve skupině SHAM. Plazmatický amoniak byl vyšší ve skupině ALF než ve skupině FPSA. Rozdíl byl signifikantní v 5. - 6. hodině a mezi 9. – 11. hodinou experimentu (Graf č. 8A, Tabulka č. 8). Porovnáním relativních hodnot hladiny amoniaku vzhledem k začátku experimentu byl plazmatický amoniak signifikantně vyšší ve skupině ALF než ve skupině FPSA od 4. hodiny do konce experimentu ve 12. hodině. Na rozdíl od skupiny ALF nebyl ve skupině FPSA ani ve skupině SHAM zaznamenán signifikantní nárůst hladiny amoniaku v průběhu experimentu (Graf č. 8B).

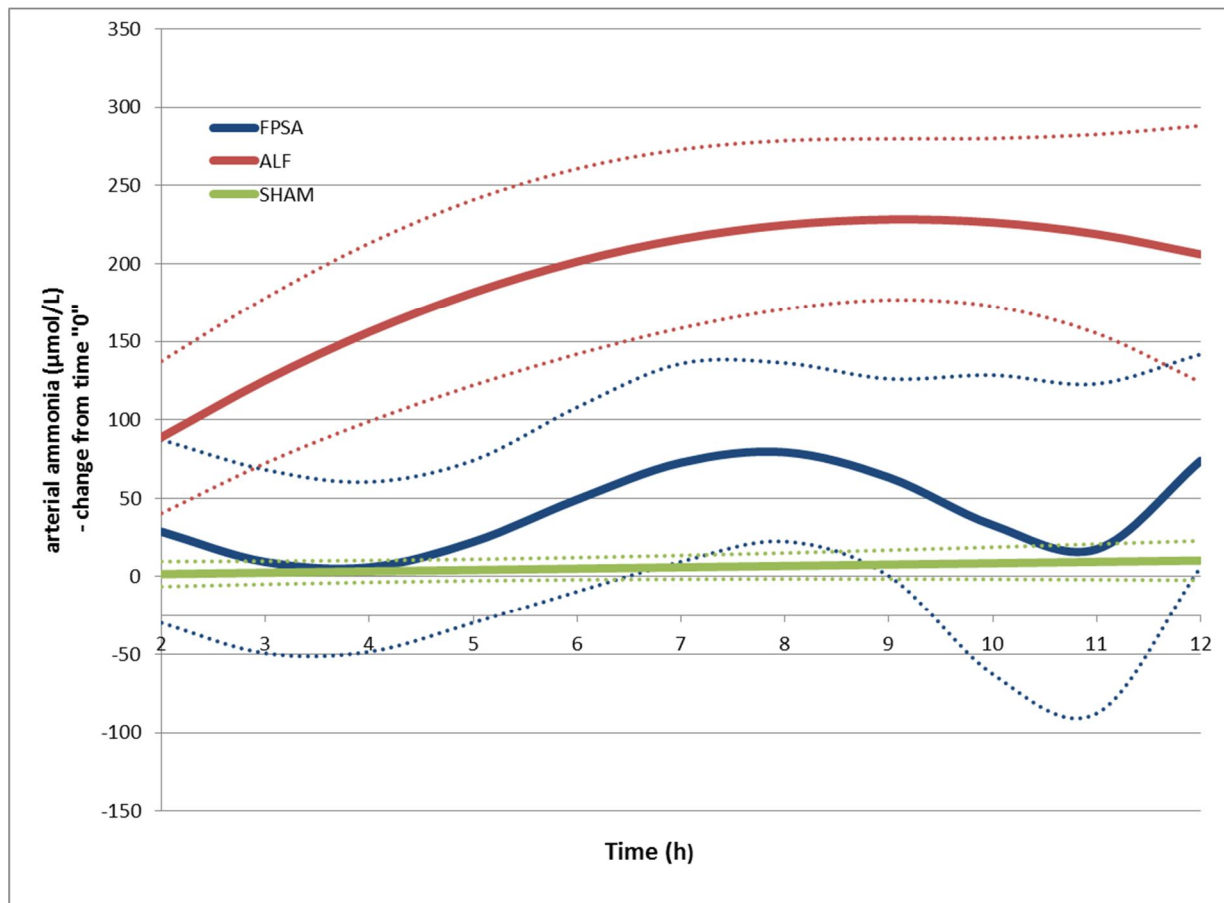
Graf č. 8 – Hladina plasmatického amoniaku u laboratorních zvířat s ALF léčených FPSA (2-8h) – skupina FPSA, kontrolní skupiny bez léčby – skupina ALF a pouze laparotomované skupiny – skupina SHAM (zobrazeny křivky středních hodnot s 95% konfidenčním intervalem)



Tabulka č. 8 – Hladina plasmatického amoniaku u laboratorních zvířat s ALF léčených FPSA (2-8h) – skupina FPSA, kontrolní skupiny bez léčby – skupina ALF a pouze laparotomované skupiny – skupina SHAM (uvedeny střední hodnoty a standardní chyba – SE, hodnoty p)

čas (h)		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Arterial ammonia (µmol/L)	FPSA	243	224	220	237	264	287	294	278	247	232	288
	SE	28,96	29,04	26,88	25,65	29,04	31,18	28,09	31,05	47,24	52,05	33,53
	ALF	235	271	302	328	348	362	371	375	373	365	352
	SE	24,2	26,39	28,48	29,67	29,68	28,61	26,94	25,77	26,86	31,84	41,05
	SHAM	31,8	32,7	33,6	34,4	35,3	36,2	37	37,9	38,8	39,7	40,5
	SE	3,78	3,48	3,29	3,24	3,33	3,57	3,91	4,34	4,82	5,36	5,93
p	FPSAxALF	0,83	0,23	0,05	0,03	<0,05	0,09	0,06	0,02	0,02	0,02	0,26
	FPSAxSHAM	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	ALFxSHAM	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Graf č. 8B – Porovnání relativních hodnot hladin plasmatického amoniaku u laboratorních zvířat s ALF léčených FPSA (2-8h) – skupina FPSA, kontrolní skupiny bez léčby – skupina ALF a pouze laparotomované skupiny – skupina SHAM (zobrazeny křivky středních hodnot s 95% konfidenčním intervalem)



Diskuse

Cerebrální poškození, které se manifestuje jako jaterní encefalopatie a vzrůst intrakraniálního tlaku, je dobře známá a fatální komplikace akutního jaterního selhání. Vzrůst intrakraniálního tlaku je vedle nezvladatelného multiorgánového selhání nejčastější příčinou smrti pacientů s akutním jaterním selháním (Auzinger G, Wendon J, 2008). Jedinou léčbou, signifikantně zvyšující šanci na přežití těchto pacientů, je transplantace jater (Bismuth H, 1995).

K překlenutí kritického období, kdy vlastní játra nejsou schopna zajistit bazální metabolické potřeby organismu nemocného, tzv. „bridging“, a to jak při postupné spontánní regeneraci jaterní tkáně, tak i při čekání na jaterní transplantaci, byla navržena od 50. let minulého století celá řada postupů a zkonstruována řada eliminačních přístrojů. Od prosté hemodialýzy a výměnné krevní transfuze přes perfuzi krve přes živá prasečí či lidská kadaverózní játra, plazmaferézu, hemoperfuzi pomocí aktivního uhlí až k současným sofistikovaným biologickým či nebiologickým eliminačním přístrojům (Williams R, 2006). Jednou ze slibných nebiologických extrakorporálních náhrad je právě metoda frakční plasmatické separace a adsorpce.

Vliv a účinnost léčby těchto extrakorporálních metod jak FPSA na zmírnění poškození mozkové tkáně provázející akutní jaterní selhání bývá, pokud vůbec, klinicky monitorována pouze měřením intrakraniálního tlaku. Z doposud publikovaných studií (Evenepoel P et al., 2005; Santoro A et al., 2006) vyplývá zlepšení biochemických markerů akutního jaterního selhání metodou FPSA, nicméně exaktní přínos eliminační léčby ve zlepšení přežívání nemocných je na základě víceméně kazuistických zkušeností obtížně hodnotitelný; vlivu FPSA na vzrůst intrakraniálního tlaku u ALF se navíc žádná práce přímo nevěnuje a experimentální kontrolované studie k tomuto tématu chybí. Stejně tak se jen několik málo nedávno publikovaných klinických studií (Bjerring FN et al., 2010; Bjerring FN et al., 2012) věnovalo vlivu metody FPSA na intracerebrální oxidativní metabolismus v průběhu akutního jaterního selhání. Tyto studie navíc z pochopitelných důvodů zahrnují pouze malé množství pacientů, k tomu ještě s rozličnými příčinami jaterního selhání.

Cílem naší práce bylo tedy primárně zhodnotit na definovaném zvířecím modelu vliv metody FPSA na ICP u akutního jaterního selhání.

Intrakraniální tlak

V obou popsaných studiích jsme dosáhli velmi podobných výsledků, které potvrzují nastolenou hypotézu. Hodnoty intrakraniálního tlaku jsou u prvního, devaskularizačního modelu ALF signifikantně vyšší od 9. hodiny experimentu v neléčené skupině než ve skupině zvířat, napojených na přístroj FPSA.

Obdobně u rozsáhlejšího druhého experimentu, kde byl užit chirurgický resekční model ALF, je od 9. hodiny experimentu signifikantně vyšší ICP ve skupině ALF, tedy skupině neléčené, než ve skupině napojené na FPSA. V obou skupinách, tedy FPSA i ALF skupině, je však intrakraniální tlak již od 5. hodiny experimentu signifikantně vyšší než ve skupině SHAM, kde byla provedena pouze laparotomie. Skutečnost, že intrakraniální tlak roste i u skupiny léčené metodou FPSA, i když je tedy signifikantně nižší než ve skupině ALF, podporuje již dříve formulovanou domněnku multifaktoriální geneze rozvoje intrakraniální hypertenze u akutního jaterního selhání (Bjerring FN et al., 2009), která může být ovlivněna pomocí extrakorporální eliminační metody pouze částečně. Lze se tedy domnívat, že FPSA ovlivňuje jen jeden ze dvou hlavních mechanismů, které mají u rozvoje akutního jaterního selhání rozhodující vliv na rozvoj mozkového otoku a vzrůstu ICP, totiž astrocytární swelling, jenž je přímým nebo nepřímým důsledkem akumulace toxických metabolitů (amoniak, glutamin, fenoly, žlučové kyseliny), které jsou právě díky sofistikované eliminační metodě frakční plasmatické separace a adsorpce kombinované s dialýzou z těla při absenci eliminačních funkcí jater odstraňovány.

Mozková hyperémie, způsobená dysfunkcí autoregulace průtoku krve mozkem, obdobně jako hyperdynamická cirkulace provázející jaterní selhání však zůstává při léčbě ALF metodou FPSA neovlivněna (Laszikova E et al., 2010). Naše výsledky tak korespondují s výsledky experimentální práce Sana a Rose (Sen S et al., 2006) s obdobným experimentálním modelem ALF a léčbou metodou jinou extrakorporální nebiologickou eliminační metodou MARS (Stange J et al., 1999).

Druhým cílem naší práce bylo na uvedeném dobře definovaném experimentálním modelu zhodnotit roli monitorace metodou intracerebrální mikrodialýzy v léčbě akutního jaterního selhání metodou FPSA. Vzhledem k významu hladiny plasmatického amoniaku v rozvoji intrakraniální hypertenze zde budou krátce komentovány i výsledky měření amonemie v průběhu experimentu.

Parametry mikrodialýzy

Mikrodialýza je jedinečná metoda umožňující přesné monitorování extracelulárního prostoru (Reinstrup P et al., 2000; Stahl N et al., 2001). Poměr laktát/pyruvát L/P je známý marker redoxního stavu tkáně a indikátor tkáňové ischemie a jeho měření a určování tak reflektuje metabolický stav astrocytů (Hillered L, 1999). Výhoda měření relativní (poměrné) hodnoty L/P navíc spočívá v nezávislosti na „recovery rate“ při přestupu těchto metabolitů přes dialyzační membránu. Také další parametry (Nilsson OG et al., 1999; Goodman JC, et al., 1999), standardně určované bed-side analyzátozem pro mikrodialyzační vzorky, zajišťují doplňující informace o patologických procesech probíhajících v mozkové tkáni.

Glutamát je hlavním excitačním neurotransmiterem v mozku a zvýšení jeho koncentrace v mozkové tkáni je považováno za znak nepřímého neuronálního poškození a suboptimálního stavu funkce, respektive metabolismu mozkové tkáně.

Glycerol je integrální součástí buněčných membrán. Je nespecifickým markerem míry poškození buněk patologickým procesem (Hillered L, 1998). Zjednodušeně řečeno vede nedostatek, respektive ztráta energie k intracerebrálnímu influxu kalcia a aktivace fosfolipáz, které glycerol z buněčné membrány odštěpí.

Hladina intersticiální glukózy je komplexní proměnná ovlivňovaná mnoha vlivy, mimo jiné buněčným vychytáváním v závislosti na poptávce, respektive změnou mezi aerobním a anaerobním metabolismem (Reinstrup P et al., 2000).

Naší hypotézou bylo, že právě parametry rutinně analyzované mikrodialyzačním přístrojem, ke kterým patří poměr laktátu/pyruvátu, hladina glutamátu, glycerolu a glukózy, budou odrážet pozitivní vliv eliminační metody FPSA na rozvoj cerebrálního poškození dříve než pouhé měření intrakraniálního tlaku. Dalším podúkolem, který jsme si stanovili, bylo zhodnotit roli určování intracerebrálního glutaminu při hodnocení terapeutické efektivity metody FPSA.

Poměr laktát/pyruvát

Naše výsledky jasně ukazují, že se poměr intersticiálního cerebrálního laktátu a pyruvátu (L/P), signifikantně snižuje téměř okamžitě po zahájení léčby metodou FPSA a odráží tak návrat k normálnímu metabolickému stavu mozkových buněk. Od 5. do 11. hodiny experimentu, tedy již ve třetí hodině od zahájení léčby metodou FPSA, je poměr L/P signifikantně nižší u léčené než u neléčené skupiny. Po šestihodinovém léčebném cyklu metodou FPSA se poměr L/P u FPSA skupiny dokonce signifikantně neliší od hodnot L/P skupiny SHAM. U ALF skupiny přitom z tohoto pohledu během této doby nedochází k žádnému zlepšení, respektive tedy signifikantnímu poklesu poměru L/P. Navíc následný vzrůst hodnoty L/P u FPSA skupiny po ukončení terapie mezi 10. – 12. hodinou pokusu, kdy se ve 12. hodině hodnota L/P signifikantně neliší od hodnot ve skupině neléčené, dobře ukazuje přerušení pozitivního léčebného vlivu metody FPSA s koncem 8. hodiny pokusu.

Pokud budeme u skupin FPSA a ALF sledovat pouze změnu hodnoty L/P od druhé hodiny pokusu, tedy od momentu, kdy začala léčba, dochází k signifikantnímu poklesu a rozdílu mezi skupinou ALF a FPSA dokonce již ve třetí hodině experimentu, tedy de facto bezprostředně se zahájením léčby.

Na tomto místě je třeba poznamenat, že výchozí hodnoty poměru L/P jsou u obou skupin relativně vysoké, zpočátku o něco málo vyšší v neprospěch skupiny FPSA, ovšem i tak je mezi skupinami velmi brzy patrný signifikantní rozdíl v L/P ve prospěch skupiny FPSA. Dále je třeba připomenout, že první vzorky, tedy vzorky z 2. hodiny experimentu, jednak obsahují dialyzát sbíraný v průběhu ekvibrace (Bellander, BM et al., 2004), navíc mohou být závěry o výsledcích z první hodiny experimentu limitovány přímým poškozením mozkové tkáně vzniklým při zavádění mikrodialyzačního katetru a ICP čidla. Iniciální zvýšení hodnot také jistě odráží důsledek operačního stresu při chirurgickém operačním navození akutního jaterního selhání. V každém případě jsou ale vstupní podmínky pro obě skupiny stejné a rozdíl mezi skupinou léčenou metodou FPSA a skupinou ALF s pouhým navozeným akutním jaterním selháním je jednoznačný.

Na rozdíl od aktuálně publikované klinické práce zkoumající efekt FPSA na cerebrální oxidativní metabolismus u pacientů s ALF, kterou uveřejnila skupina vedená Bjerringem (Bjerring PN, 2012), jsme tedy našli signifikantní rozdíl mezi léčenou a neléčenou skupinou a signifikantní pokles poměru L/P u skupiny léčené. To lze dobře vysvětlit mimo jiné použitím jasně

definovaného prediktivního zvířecího modelu ALF v kontrastu s rozdílnou etiologií jaterního selhání v malé kohortě (n = 7) pacientů zahrnutých do klinické studie. Sběr a analýza vzorků mohly být a byly v našem případě dobře načasovány vzhledem k momentu nástupu jaterního selhání, což je v případě klinické praxe mnohem obtížnější. Ze zmiňované klinické práce, která porovnává vzorky odebrané pouze jednou před a jednou po provedení FPSA, navíc jasně nevyplývá, na které období se sběr vztahuje a zda sběr druhého vzorku probíhá v průběhu nebo až po dokončení léčby FPSA, krom toho vzhledem k udávané rychlosti perfuze a množství nasbíraného dialyzátu vyplývá sběrné období jednoho vzorku přesahující časový interval pěti hodin. Protože se však poměr L/P mění v průběhu FPSA velmi rychle, jsou naše výsledky zjevně výrazně informativnější.

L/P vs. ICP

Jak již bylo řečeno, signifikantní rozdíl u hodnoty intrakraniálního tlaku mezi léčenou a neléčenou skupinou zvířat zaznamenáváme v 9. hodině experimentu, tedy až 7 hodin od zahájení terapie, dokonce teprve po ukončení jednoho šestihodinového cyklu léčby eliminační metodou FPSA. Přitom hodnoty L/P jsou u skupiny FPSA signifikantně nižší než v neléčené skupině již v 5. hodině experimentu, tedy tři hodiny po zahájení terapie a o 4 hodiny dříve než zmiňovaný signifikantní rozdíl mezi hodnotami intrakraniálního tlaku. Hodnota L/P tedy reflektuje pozitivní vliv léčby FPSA na cerebrální metabolismus jednoznačně dříve než obecnější parametr - ICP.

Navíc je v případě sledování pouze obecně rostoucího ICP relativně těžké rozpoznat zpomalení v přetrvávajícím růstu ICP a hodnotit tak jednotlivě účinnost léčby FPSA - naproti tomu téměř okamžitě zaznamenaný signifikantní pokles v poměru L/P reflektuje okamžitě pozitivní efekt léčby metodou FPSA na cerebrální metabolismus a jednoznačně podtrhuje větší klinický potenciál této metody. Analýza parametrů mikrodialýzy v průběhu ALF a v průběhu léčby ALF metodou FPSA tak umožňuje pozorovat změnu v orgánové biochemii - jako právě změny L/P - dříve, než se projeví klinické změny, jako je vzrůst/pokles intrakraniálního tlaku, což pak přinejmenším teoreticky umožňuje vyhodnotit rychle efekt nastavené terapie a upravit nebo změnit strategii léčby dříve, než když jsou jediným zdrojem informací klinické symptomy (Ungerstedt U, 2008).

Ostatní parametry standardně určované analýzou mikrodialyzátu

Glutamát

Výsledky dokumentují signifikantní rozdíl mezi FPSA skupinou a ALF skupinou mezi 4. – 11. hodinou, kdy je hladina intracerebrálního extracelulárního glutamátu nižší u FPSA skupiny než u ALF skupiny. Dynamika změny hladiny glutamátu dokonce připomíná dynamiku změny poměru L/P u téže skupiny. Nicméně pozorujeme jen malý rozdíl mezi ALF a SHAM skupinou – glutamát u ALF skupiny je větší pouze mezi 4. a 9. hodinou, od 10. hodiny není rozdíl mezi oběma skupinami signifikantní. Navíc v našem experimentu není signifikantní rozdíl mezi FPSA a SHAM skupinou. Obě tyto skutečnosti tak glutamát jako marker intracerebrálních změn při akutním jaterním selhání nebo jako parametr odrážející efektivitu metody FPSA spíše vylučují.

Glycerol

Extracelulární cerebrální glycerol byl v druhé části experimentu ve skupině FPSA signifikantně nižší než ve skupině ALF, a to od 5. hodiny experimentu. Na rozdíl od skupiny ALF došlo v průběhu pokusu u skupiny léčené metodou FPSA také k signifikantnímu poklesu hladiny glycerolu. Obdobně jako u poměru L/P se hladiny extracelulárního glycerolu na konci pokusu od deváté hodiny nelišily u léčené skupiny a u skupiny SHAM. Na rozdíl od L/P po ukončení šestihodinového léčebného cyklu u glycerolu nedochází v průběhu dvanáctihodinového pokusu k opětovnému signifikantnímu vzestupu a rozdílu mezi skupinou SHAM a skupinou FPSA. Dynamika změn hladin extracelulárního mozkového glycerolu tak, jak se zdá, s jistým zpožděním napodobuje dynamiku změn poměru L/P, pro definitivní závěry a potvrzení této domněnky by však bylo třeba delšího experimentu a opakovaných měření.

Glukóza

Extracelulární cerebrální glukóza byla signifikantně vyšší ve skupině SHAM než v obou skupinách s navozeným jaterním selháním. Toto pozorování, ačkoliv nikoliv obvyklé, tedy nižší hladina glukózy v mozku při normálních hladinách glykemie u akutního jaterního selhání, bylo již dříve popsáno a publikováno (Hutchinson PJ et al., 2006). Hladina glukózy byla signifikantně vyšší v FPSA skupině než v ALF skupině od 7. hodiny experimentu, což svědčí pro to, že by

léčba akutního jaterního selhání metodou FPSA mohla mít na hladinu intracerebrální glukózy pozitivní vliv - protože však dochází v průběhu experimentu k signifikantnímu poklesu intersticiální glukózy u skupiny ALF indukovaným jaterním selháním i u skupiny SHAM, nelze tento parametr dobře použít jako marker odrážející efektivitu metody FPSA v průběhu terapie.

Glutamin

Vztah mezi koncentrací intracerebrálního glutaminu, arteriálního amoniaku a intrakraniálního tlaku byl popsán v několika již zmiňovaných vědeckých pracích (Tofteng F et al., 2006). I v naší studii jsme zaznamenali signifikantně vyšší rozdíl arteriálního amoniaku u skupin FPSA a ALF než ve skupině SHAM, relativní rozdíl mezi skupinou FPSA a ALF byl pak patrný již brzy po začátku experimentální léčby metodou FPSA. Amoniak, který snadno vstupuje přes hemoencefalickou bariéru do mozku, způsobuje vzrůst mozkových hladin glutaminu v mozkové tkáni především akcelerací jeho syntézy predominantně v astrocytech (Martinez-Hernandez A, 1977). Jak bylo uvedeno již v úvodu této práce, akumulace glutaminu v astrocytech způsobuje jejich otok a přispívá tak k nárůstu ICP především osmotickým mechanismem (Brusilow SW, Traystman R, 1986) a glutamin funguje hlavně jako transportér při přenosu amoniaku z cytosolu do mitochondriální matrix (Albrecht J, Norenberg MD, 2006); amoniak pak komplexním toxickým působením porušuje propustnost mitochondriální membrány, což ve svém důsledku vede k porušení energetického metabolismu astrocytů a přispívá ke vzniku mozkového edému u ALF (Norenberg, MD, 2003). Intracerebrální intracelulární glutamin je tedy považován za jeden z významných faktorů zodpovědných za rozvoj mitochondriální dysfunkce a intracelulární hypoxie u akutního jaterního selhání. Proto jsme se v naší studii zaměřili na jeho další analýzu a naše data jasně ukazují pozitivní vliv metody FPSA na snížení intracerebrální koncentrace glutaminu při rozvoji akutního jaterního selhání. Naše výsledky tak podporují závěry, že glutamin přispívá k rozvoji intrakraniální hypertenze u ALF, a navíc podporují již dřív klinicky popsaná data popisující korelaci mezi intracerebrálním glutaminem, ICP a hodnotou L/P u pacientů s akutním jaterním selháním (Bjerring PN, 2008).

Signifikantně nižší hladiny glutaminu u zvířat z léčené FPSA skupiny oproti neléčené FPSA skupině byly zaznamenány již v 6. hodině experimentu, opět tedy významně dříve než signifikantní změny ICP obou skupin – 9. hodina experimentu. Rutinní bed-side analýza glutaminu však není běžně dostupná a zmiňovaná analýza vysokoúčinnou kapalinovou

chromatografií je technicky poměrně náročná. Z tohoto pohledu je třeba ještě zhodnotit klinický význam analýzy glutaminu pro monitoraci léčby akutního jaterního selhání.

Plasmatický amoniak

Jak bylo uvedeno výše, obecně se má za to, že zvýšení hladiny plasmatického amoniaku má bezprostřední vliv na rozvoj mozkového edému u akutního jaterního selhání. Výsledky experimentálních studií však v tomto ohledu nejsou jednoznačné. V rámci našeho experimentu jsme vedle hlavní monitorace a analýzy, zaměřené na intracerebrální tlak a parametry metabolismu, jako další a paralelní měření určovali a porovnávali hladiny plasmatického amoniaku v průběhu léčby jaterního selhání metodou FPSA. V našem přesně definovaném experimentu byly hladiny plasmatického amoniaku signifikantně vyšší v obou skupinách s navozeným akutním jaterním selháním, ve skupině ALF i FPSA, v porovnání s kontrolní laparotomovanou skupinou SHAM. V období mezi 5. - 6. a 10. - 11. hodinou experimentu je hladina plasmatického amoniaku signifikantně vyšší u skupiny ALF než u skupiny FPSA.

Nevýhodou měření a porovnávání hladin amoniaku v krvi v průběhu jaterního selhání je poměrně široké rozpětí hodnot hladin plasmatického amoniaku, akceptovaných jako fyziologické. Proto jsme porovnali u všech skupin hladiny amoniaku v hodnotách relativních vzhledem k výchozí hodnotě. Tak je dobře a jednoznačně vidět rozdíl mezi relativní hladinou amoniaku u skupin s navozeným jaterním selháním. Hladina amoniaku je u skupiny FPSA v porovnání s ALF signifikantně nižší již od čtvrté hodiny experimentu, tedy na konci druhé hodiny terapie, a hovoří i v tomto ohledu zřetelně ve prospěch léčby metodou FPSA.

Závěr

Závěrem lze shrnout, že metoda FPSA jednoznačně a signifikantně snižuje intrakraniální tlak u akutního jaterního selhání v experimentálním modelu akutního jaterního selhání na praseti. Dvě experimentální kontrolované studie tak potvrzují první hypotézu, vyslovenou na začátku této práce.

Stejně tak kontrolovaná experimentální studie na praseti dokládá, že změna poměru laktát/pyruvát, parametru určovaného rutinně při monitoraci metodou intracerebrální mikrodialýzy, reflektuje pozitivní efekt metody FPSA při léčbě jaterního selhání na cerebrální poškození výrazně dříve, pohotověji a dokonce srozumitelněji než pouhá monitorace intrakraniálního tlaku. Tak potvrzuje tato experimentální práce i druhou z hypotéz, která byla postulována úvodem.

Ostatní parametry, rutinně určované při analýze mikrodialyzátu, zatím nelze z pohledu klinického využití jednoznačně doporučit.

Intracerebrální koncentrace glutaminu, měřená při léčbě akutního jaterního selhání metodou FPSA, reflektuje pozitivní vliv této eliminační metody také výrazně dříve než pouhé měření intrakraniálního tlaku. Nicméně z praktického hlediska je třeba roli glutaminu jako markeru efektivity léčby akutního jaterního selhání metodou FPSA ještě důkladně posoudit.

Léčba metodou FPSA v našem modelu akutního jaterního selhání signifikantně snižuje hladinu plasmatického amoniaku.

Souhrn

Úvod: Mozkový edém je dobře známá a fatální komplikace akutního jaterního selhání (ALF – acute liver failure). Vliv léčby arteficiálními eliminačními metodami na cerebrální poškození u ALF je většinou, pokud vůbec, monitorován měřením intrakraniálního tlaku. Cílem této práce je posoudit vliv metody frakční plasmatické separace a adsorpce (FPSA – Fractionated Plasma Separation and Adsorption) – jedné z nebiologických eliminačních metod, na intrakraniální tlak. Druhým cílem této práce je vyhodnotit možnou roli intracerebrální mikrodialýzy v monitoraci efektivity léčby akutního jaterního selhání metodou FPSA.

Metody: Ve dvou experimentech na velkém zvířeti – praseti, byly použity dva různé chirurgické modely ALF. V prvním experimentu byla laboratorní zvířata rozdělena na dvě skupiny, skupinu ALF, u které bylo navozeno pouze jaterní selhání, a skupinu FPSA, kde bylo navozeno jaterní selhání a následně u ní proběhl jeden cyklus léčby metodou FPSA. U obou skupin byl měřen intrakraniální tlak a hodnoty byly následně statisticky porovnány. V druhém experimentu byla porovnávána laboratorní data, data z monitorace mikrodialýzou a intrakraniální tlak mezi třemi skupinami pokusných zvířat, tedy mezi skupinou s pouhým navozením ALF (ALF skupina), skupinou s ALF, u které proběhl šestihodinový cyklus léčby metodou FPSA (FPSA skupina), a skupinou, kde byla provedena pouze laparotomie (SHAM skupina).

Výsledky: V obou experimentech by signifikantně vyšší intrakraniální tlak u skupiny ALF než u skupiny léčené metodou FPSA mezi 9. – 12. hodinou experimentu. Růst ICP byl signifikantní a ICP bylo signifikantně vyšší v FPSA i ALF skupině oproti SHAM skupině. Nárůst intrakraniálního tlaku byl signifikantně vyšší u ALF skupiny než u FPSA skupiny. V druhém experimentu, zaměřeném především na vyhodnocení potenciálu monitorace metodou intracerebrální mikrodialýzy, byl poměr laktát/pyruvát (L/P) signifikantně nižší u FPSA skupiny než u ALF skupiny již v 5. hodině experimentu, tedy mnohem dříve než byl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi ICP obou skupin. Změna hodnoty L/P u skupiny FPSA byla signifikantní již po hodině léčby metodou FPSA. Hodnoty hladin intracerebrálního glutaminu byly u skupiny FPSA a ALF signifikantně vyšší než u skupiny SHAM. Hodnoty hladin glutaminu byly u skupiny FPSA signifikantně nižší než u skupiny ALF mezi 6. – 10. hodinou experimentu.

Závěr: Výsledky naší práce na chirurgickém modelu u prasete jasně ukazují, že metoda frakční plasmatické separace a adsorpce u experimentálního akutního jaterního selhání signifikantně snižuje intrakraniální tlak. Také jsme potvrdili a ukázali, že mikrodialýza je spolehlivá a hodnotná technika monitorace, která reflektuje efektivitu léčby metodou FPSA výrazně dříve a jednoznačněji, než monitorace pouhého intrakraniálního tlaku. Intracerebrální glutamin je slibný a spolehlivý marker efektivitu léčby metodou FPSA, jeho role v klinice však ještě vyžaduje hlubší posouzení.

Abstract

Background: Cerebral edema is a well-known and fatal complication of acute liver failure (ALF). The influence of the treatment by artificial liver devices on the cerebral damage caused by ALF is usually monitored by only measuring the intracranial pressure (ICP). The aim of this work was to determine the influence of Fractionated Plasma Separation and Adsorption (FPSA), non-biological artificial liver device, on the intracranial pressure. The second goal of this work was to determine the potential role of cerebral microdialysis in monitoring of the efficiency of fractionated plasma separation and adsorption (FPSA) treatment of ALF.

Methods: Two types of surgical resection model of ALF were used in two separate experiments in pigs. In the first study data from monitoring of the intracranial pressure of ALF group (animals with ALF only) and FPSA group (animals with ALF treated by FPSA) were compared. In the second study data from monitoring by cerebral microdialysis and ICP of the ALF group (animals with ALF only), FPSA group (animals with ALF treated by FPSA) and SHAM group (animals with only laparotomy) were compared using statistical analyses.

Results: In both experiments, the ICP was significantly higher in the ALF group than in the FPSA group from the 9th hour of the experiment. In the second experiment, a significant increase in ICP in the FPSA-treated group and the ALF group compared to the SHAM group was observed.

The lactate/pyruvate (L/P) ratio was significantly lower in the FPSA group than in the ALF group already from the 5th hour of the experiment, much earlier than when any significant change in ICP was observed. Moreover, the change in L/P ratio was significant already after one hour of the treatment.

Glutamine levels were significantly higher in both ALF and FPSA groups than in the SHAM group. Glutamine levels were significantly lower in the FPSA group than in the ALF group in the 6th – 10th hour of the experiment.

Conclusions: Our study shows clearly, that the treatment with FPSA decreases the rise of ICP in ALF. We also demonstrate that cerebral microdialysis is a valuable and promising technique that reflects the efficacy of FPSA treatment of ALF earlier than other monitoring modalities such as ICP. Monitoring the parameters of cerebral metabolism reflects the positive influence of the FPSA-treatment earlier than changes in ICP. The role of glutamine as a marker for the efficiency of FPSA treatment of ALF seems to be promising, but needs further evaluation.

Seznam použitých zkratek

ALF	Acute Liver Failure
BAL	BioArtificial Liver
CBF	Cerebral Blood Flow
CPP	Cerebral Perfusion Pressure
ELS	Extracorporeal Liver Support
FPSA	Fractionated Plasma Separation and Adsorption
GABA	Gama-Amino-Butyric Acid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICH	Intracerebral Hypertension
ICP	Intracranial Pressure
ICU	Intensive Care Unit
L/P	Lactat/Pyruvat
MAP	Mean Arterial Pressure
MARS	Molecular Adsorbent Recirculating System
MD	MicroDialysis
MPT	Mitochondrial Permeability Transition
MOF	MultiOrgan Failure
NMDA	N-Methyl D-Aspartate
PAG	Phosphat Activated Glutamase
PEEP	Positive End Expiratory Pressure
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrom
TBI	Traumatic Brain Injury
VCV	Volume-Controlled Ventilation

Literatura

1. Detry O, Honore P, Meurisse M, Jacquet N. Management of fulminant hepatic failure. *Acta Chir Belg* 1998; 98: 235-240
2. Lucké B. The pathology of fatal epidemic hepatitis. *Am J Pathol* 1944; 20: 471-525
3. Ede RJ, Gimson AE, Bihari D, Williams R. Controlled hyperventilation in the prevention of cerebral oedema in fulminant hepatic failure. *J Hepatol* 1986; 2: 43-51
4. Auzinger G, Wendon J. Intensive care management of acute liver failure, *Curr Opin Crit Care* 2008;14:179–188
5. Balestreri M, Czosnyka M, Hutchinson P, et al. Impact of intracranial pressure and cerebral perfusion pressure on severe disability and mortality after head injury. *Neurocrit Care* 2006;4:8–13
6. Bingaman WE, Frank JI. Malignant cerebral edema and intracranial hypertension. *Neurol Clin* 1995; 13: 479-509
7. Grande PO. The 'Lund Concept' for the treatment of severe head trauma – physiological principles and clinical application. *Intensive Care Med* 2006;32:1475–1484
8. Horowitz ME, Schafer DF, Molnar P, Jones EA, Blasberg RG, Patlak CS, Waggoner J, Fenstermacher JD. Increased blood-brain transfer in a rabbit model of acute liver failure. *Gastroenterology* 1983; 84: 1003-1011
9. Kato M, Hughes RD, Keays RT, Williams R. Electron microscopic study of brain capillaries in cerebral edema from fulminant hepatic failure. *Hepatology* 1992; 15: 1060-1066
10. Manley GT, Binder DK, Papadopoulos MC, Verkman AS. New insights into water transport and edema in the central nervous system from phenotype analysis of aquaporin-4 null mice. *Neuroscience* 2004;129:983-991.
11. Butterworth RF. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia. *Metab Brain Dis* 2002;17:221-227.
12. Nagaraja TN, Brookes N (1998) Intracellular acidification induced by passive and active transport of ammonium ions in astrocytes. *Am J Physiol* 274:C883–C891
13. Albrecht J, Bender AS, Norenberg MD (1998) Potassium-stimulated GABA release is a chloride-dependent but sodium- and calcium-independent process in cultured astrocytes. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 58:169–175
14. Lozeva V, Montgomery JA, Tuomisto L, Rocheleau B, Pannunzio M, Huet PM, Butterworth RF (2004) Increased brain serotonin turnover correlates with the degree of shunting and hyperammonemia in rats following variable portal vein stenosis. *J Hepatol* 40:742–748

15. Tofteng F, Hauerberg J, Hansen BA, Pedersen CB, Jorgensen L, Larsen FS (2006) Persistent arterial hyperammonemia increases the concentration of glutamine and alanine in the brain and correlates with intracranial pressure in patients with fulminant hepatic failure. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:21–27
16. Rama Rao KV, Chen M, Simard JM, Norenberg MD. Increased aquaporin-4 expression in ammonia treated cultured astrocytes. *Neuroreport* 2003;14:2379-2382
17. Albrecht J, Norenberg MD (2006) Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* 44:788–794
18. Bjerring PN, Hauerberg J, Frederiksen HJ, Jorgensen L, Hansen BA, Tofteng F, Larsen FS (2008) Cerebral Glutamine Concentration and lactate-Pyruvate Ratio in Patients with Acute Liver Failure. *Neurocrit Care*.9(1):3-7
19. Dethloff TJ, Knudsen GM, Larsen FS (2008) Cerebral blood flow autoregulation in experimental liver failure. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:916–926
20. Bjerring PN, Eefsen M, Hansen BA, Larsen FS The brain in acute liver failure. A tortuous path from hyperammonemia to cerebral edema, *Metab Brain Dis* (2009) 24:5–14
21. Panek, L., Andreasen, B., Tygstrup, N.: Galactosamine elimination capacity as a prognostic index in patients with fulminant hepatic failure. *Gut*, 17, 1980: 959 – 964).
22. Flendrig LM, Calise F, Di Florio E et al: Significantly improved survival time in pigs with complete liver ischemia treated with a novel bioartificial liver. *Int J Artif Organs*, 22, 1999: 701 – 708
23. Cuervas-Mons V, Colás A, Rivera JA et al: In vivo efficacy of a bioartificial liver improving spontaneous recovery from fulminant hepatic failure: a controlled study in pigs. *Transplantation* 69, 2000: 337- 344
24. Horslen SP, Hammel JM, Fristoe LW et al: Extracorporeal liver perfusion using human and pig livers for acute liver failure. *Extracorporeal liver perfusion using human and pig livers for acute liver failure. Transplantation*, 70, 2000: 1472 - 1478
25. Levy MF, Crippin J, Sutton S et al: Liver allotransplantation after extracorporeal hepatic support with transgenic (hCD55/hCD59) porcine livers. Clinical results and lack of pig-to-human transmission of the porcine endogenous retrovirus. *Transplantation*, 69, 2000: 272 - 280
26. Demetriou AA, Brown RS, Busuttill RW et al: Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. *Ann Surg*, 239, 2004: 660 – 670
27. Hayes PC, Lee A: What progress with artificial livers ? *Lancet* 358, 2001: 1286 - 1287
28. Falkenhagen D, Strobl W, Vogt G et al: Fractionated plasma separation and absorption system: a novel system for blood purification to remove albumin bound substance. *Artif Organs*, 1999, 23: 81 – 86).
29. Stange J, Ramlow W, Mitzner S et al: Dialysis against a recycled albumin solution enables the removal of albumin – bound toxins. *Artif Organs* 1993, 17: 809 – 81.

30. Pugliese F, Ruberto F, Perrella SM et al: Modifications of intracranial pressure after molecular adsorbent recirculating system treatment in patients with acute liver failure: case reports *P. Transplant Proc.* 2007 Jul-Aug;39(6):2042-4
31. Sen S, Rose C, Ytrebø LM et al :Effect of albumin dialysis on intracranial pressure increase in pigs with acute liver failure: a randomized study *Crit Care Med.* 2006 Jan;34(1):158-64.).
32. Grodzicki M, Kotulski M et al: Results of treatment of acute liver failure patients with use of the prometheus FPSA systém, *Transplant Proc.* 2009 Oct;41(8):3079-81
33. Oppert M, Rademacher S et al: Extracorporeal liver support therapy with Prometheus in patients with liver failure in the intensive care unit *A. Ther Apher Dial.* 2009 Oct;13(5):426-30)
34. Ungerstedt U (1991) Microdialysis--principles and applications for studies in animals and man. *J Intern Med.* 230(4):365-73
35. Goodman JC, Valadka AB, Gopinath SP, Uzura M, Robertson CS (1999) Extracelulare lactate and glucose alteration in the brain after head injury measured by mcrodialysis. *Crit Care Med*; 27: 1965-73
36. Novak G, et al, Metabolic Changes in the Liver Graft Monitored Continuously With Microdialysis During Liver Transplantation in a Pig Model *Liver Transpl* 2002;8:424-432
37. Silva MA, Arginine and Urea Metabolism in the Liver Graft: A Study Using Microdialysis in Human Orthotopic Liver Transplantation *Transplantation* 2006;82: 1304–1311
38. Hutchinson PJ, Gimson A, Al-Rawi PG, O'Connell MT, Czosnyka M, Menon DK (2006) Microdialysis in the management of hepatic encephalopathy. *Neurocrit Care.*;5(3):202-5.
39. Ryska M, Kieslichová E, Pantoflíček T, et al. Devascularization Surgical Model of Acute Liver Failure in Minipigs. *Eur Surg Res* 2004; 36: 179–184
40. Ladurner R, Hochleitner B, Schneeberger S, Barnas U, Krismer A, Kleinsasser A et al. 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;37 (6):365-369
41. Rifai K, Ernst T, Kretschmer U, Hafer C, Haller H, Manns MP et al. The Prometheus® device for extracorporeal support of combined liver and renal failure. *Blood Purif* 2005;23(4):298-202.
42. Auzinger G, Wendon J. Intensive care management of acute liver failure. *Curr Opin Crit Care* 2008;14(2):179-188.
43. Bismuth H, Samuel D, Castaing D, Adam R, Saliba F, Johann M et al. Orthotopic liver transplantation in fulminant and subfulminant hepatitis. *Ann Surg* 1995;222:109-119.
44. Williams R. The elusive goal of liver support—quest for the Holy Gril. *Clin Med* 2006; 6: 482–487.
45. Evenepoel P, Aleman W, Wolker A, et al. Detoxifying capacity and kinetics of Prométheus—a new extracorporeal systém for the treatment of liver failure. *Blood Purif* 2005; 23: 349–358

46. Santoro A, Faenza S, Mancini E, et al. Prométheus systém: a technological support in liver failure. *Transplant Proc* 2006; 38: 1078–1082
47. Bjerring FN, Hauerberg J, Jorgensen L, Frederiksen HJ, Tofteng F, Hansen BA et al. Brain hypoxanthine concentration correlates to lactate/pyruvate ratio but not intracranial pressure in patients with acute liver failure. *J Hepatol* 2010;53:1054-1058.
48. Bjerring FN, Hauerberg J, Frederiksen HJ, Nielsen HB, Clemmesen JO, Larsen FS. The effect of fractionated plasma separation and absorption on cerebral amino acid metabolism and oxidative metabolism during acute liver failure. *J Hepatol* 2012, 57; 774-776
49. Bjerring FN, Eefsen M, Hansen BA, Larsen FS. The brain in acute liver failure. A tortuous path from hyperammonemia to cerebral edema. *Metab Brain Dis* 2009;24(1):5-14
50. Laszikova E, Prazak J, Pantoflicek T, Ryska O, Koblíhova E, Jurenka B, Ryska M. Frakcionovaná plasmatická separace a adsorpce neovlivňuje hemodynamické parametry u experimentálního akutního selhání jater. *Časopis ČSARIM* 2010, roč.21/ 4: 191-198
51. Stange J, Mitzner SR, Risler T, et al: Molecular adsorbent recycling system (MARS):Clinical results of a new membrane-based blood purification system for bioartificial liver support. *Artif Organs* 1999; 23:319–330
52. Reinstrup P, Stahl N, Møllergaard P, Uski T, Ungerstedt U, Nordstrom CH. Intracerebral microdialysis in clinical practice: baseline values for chemical markers during wakefulness, anesthesia, and neurosurgery. *Neurosurgery* 2000;47(3):701-709
53. Stahl N, Møllergaard P, Hallstrom A, Ungerstedt U, Nordstrom CH. Intracerebral microdialysis and bedside biochemical analysis in patients with fatal traumatic brain lesions. *Acta Anaesthesiol Scand* 2001;45(8):977-985.
54. Hillered L, Persson L. Neurochemical monitoring of the acutely injured human brain. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1999;229:9-18
55. Nilsson OG, Brandt L, Ungerstedt U, Saveland H, Bedside detection of brain ischemia using intracerebral microdialysis: subarachnoid hemorrhage and delayed ischemic deterioration. *Neurosurgery*. 1999 Nov; 45 (5):1176-84;
56. Hillered L, Valtysson J, Enblad P, Persson L, Interstitial glycerol as a marker for membrane phospholipid degradation in the acutely injured human brain. *JNeurol Neurosurg Psychiatry* 1998 64:4 486-91
57. Bellander, B-M., Cantais, E., Enblad, P., Hutchinson, P., Nordström, C-H.,Robertson, C., Sahuquillo, J., Smith, M., Stocchetti, N., Ungerstedt, U.,Unterberg, A., and Vidiendal Olsen, N. (2004). Consensus Meeting on Microdialysis in Neurointensive Care. *Intensive Care Medicine* 30, 2166–2169

58. Ungerstedt U. Continuous monitoring of organ chemistry – a paradigm shift in management of intensive care. In: Anaesthesia, Pain, Intensive Care and Emergency, Gullo, A. (Ed.), Springer 2008; 29-45.
59. Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* 1977;195(4284):1356-1358.
60. Brusilow SW, Traystman R. Hepatic encephalopathy. *N Engl J Med* 1986;314(12):786-787.
61. Norenberg, MD. Oxidative and nitrosative stress in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* 2003;37(2):245-248.