

UNIVERZITA KARLOVA  
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI

# **DISERTAČNÍ PRÁCE**

**MUDr. Václav Opatrný**

**Plzeň 2017**



Univerzita Karlova

Lékařská fakulta v Plzni

Chirurgická klinika

MOŽNOSTI ZLEPŠENÍ VLASTNOSTÍ  
LEDVINNÝCH ŠTĚPŮ OD NEBIJÍCÍCH DÁRCŮ POMOCÍ  
IHNEDE ZAHÁJENÉ MECHANICKÉ PULZATILNÍ PERFUZE

Disertační práce

MUDr. Václav Opatrný

školitel: Doc. MUDr. Jiří Moláček Ph.D.

Plzeň 2017



## **Prohlášení k autorství**

Předkládaná práce byla vypracována samostatně pod vedením školitele Doc. MUDr. Jiřího Moláčka Ph.D. Práce je rozdělena do dvou částí. První část – teoretická – čerpá z literárních dat, všechny použité literární zdroje jsou řádně ocitovány a seznam zdrojů je uveden na konci práce. Druhá část – experimentální – sumarizuje výsledky vlastního experimentu. Experiment byl proveden ve spolupráci s kolegy z Chirurgické kliniky, z Šiklova patologicko – anatomického ústavu Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty v Plzni. Dále se na experimentu podíleli kolegové z Fakulty biomedicínského inženýrství Českého vysokého učení technického v Praze. Zázemí k provedení experimentu bylo poskytnuto Biomedicínským centrem v Plzni.

Souhlasím s půjčováním disertační práce.

## Obsah

### I. Část teoretická

1.	Poděkování .....	8
2.	Abstrakt .....	9
3.	Summary.....	12
4.	Úvod.....	15
5	Cíl disertační práce .....	17
6	Transplantace ledvin.....	18
7	Dárci ledvin k transplantaci .....	18
7.1	Úvod.....	18
7.2	Žijící dárce .....	19
7.3	Zemřelý dárce .....	20
7.3.1	Zemřelý dárce se smrtí mozku (DBD) .....	20
7.3.2	Zemřelý dárce po nezvratné zástavě oběhu (DCD) .....	21
8	Technika odběru ledvin od DCD .....	28
8.1	Technika rychlé laparotomie .....	28
8.2	Technika in-situ perfuze.....	28
8.3	Extrakorporální membránová oxygenace (ECMO) .....	28
9	Výsledky transplantací od DCD.....	30
10	Uchovávání štěpů od DCD .....	33
10.1	Cold storage .....	33
10.2	Mechanická perfuze .....	33
10.2.1	Hypotermní mechanická perfúze .....	34
10.2.2	Subnormotermní mechanická perfúze.....	34
10.2.3	Normotermní mechanická perfuze .....	34
10.3	Retrográdní oxygenová persuflace .....	34

### II. Část experimentální

1	Cíle projektu .....	37
2	Úvod.....	38
3	Pracovní hypotéza .....	39
3.1	Retrográdní oxygenová persuflace (ROP).....	39

3.2	Ihned zahájená, intraarteriální mechanická perfúze ledvinných štěpů .....	39
4	Experimentální perfuzor .....	40
5	Retrográdní oxygenová persuflace – experiment na velkém zvířeti.....	41
5.1	Metodika .....	41
5.2	Výsledky .....	44
5.2.1	Vyhodnocení sérových hladin ury: .....	44
5.2.2	Histopatologické vyhodnocení bioptických vzorků: .....	46
6	Ihned zahájená pulzatilní perfuze – experiment na malém zvířeti .....	50
6.1	Metodika .....	50
6.2	Výsledky .....	53
7	Experiment na velkém zvířeti .....	57
7.1	Metodika .....	57
7.2	Výsledky .....	61
7.2.1	Srovnání maximálního a středního průtoku, poklesu teploty a diurézy mezi skupinami A a B u pokusných zvířat .....	61
7.2.2	Srovnání histologického vyšetření mezi skupinami A a B .....	64
7.2.3	Porovnání laboratorních parametrů v 6 hodinách .....	67
7.2.4	Porovnání průběhu poklesu teploty, průtoku, tlaku a odporu mezi skupinami A a B .....	69
7.2.5	Srovnání vývoje markerů poškození ledvin .....	73

### III. Diskuze a závěr dizertační práce

1	Diskuze.....	79
2	Závěr .....	84
3	Seznam použitých zkratek .....	85
4	Literatura .....	87
5	Publikační činnost autora .....	94
5.1	Přednášky.....	94
5.2	Publikace .....	95
6	Přílohy.....	97
6.1	Seznam obrázků .....	97
6.2	Seznam tabulek.....	97
6.3	Seznam grafů .....	98

# I. část – teoretická

## 1. Poděkování

Nejprve bych rád poděkoval všem, bez jejichž přispění by vznik této práce nebyl možný.

Na prvním místě bych rád poděkoval panu prof. MUDr. Vladislavu Třeškovi, DrSc. za příležitost pracovat na Chirurgické klinice v Plzni pod jeho vedením a za možnost neustále získávat nové zkušenosti.

Velký dík patří mému školiteli doc. MUDr. Jiřímu Moláčkovi, PhD. za jeho trpělivé vedení v průběhu mého postgraduálního studia a za předání řady cenných zkušeností v oblasti experimentální, a hlavně klinické chirurgie.

Dále bych rád poděkoval Ing. Romanu Matějkovi z Fakulty biomedicínského inženýrství ČVUT v Praze, jež sestrojil a obsluhoval perfuzor využívaný v experimentu, prof. MUDr. Ondřeji Hesovi, PhD. z Ústavu patologie FN a LF UK v Plzni za vyhodnocení histologických preparátů. Velký dík též patří prof. MUDr. Rackovi, DrSc. a Ing. Vladislavu Trefilovi a personálu Ústavu klinické biochemie FN a LF UK v Plzni za vyhodnocení laboratorních veličin. Neobešel bych se ani bez zázemí Biomedicínského centra LF UK v Plzni a pomoci Ing. Pavla Kleina, PhD. v průběhu experimentální práce.

Velmi rád bych též poděkoval své ženě Andree a dceři Josefíně, za podporu a trpělivost v průběhu mého studia, jež ukrajovalo náš společný čas.

Práce byla finančně podpořena Výzkumným záměrem Univerzity Karlovy PRVOUK.



## 2. Abstrakt

### Možnosti zlepšení vlastností ledvinných štěpů od nebijících dárců pomocí ihned zahájené mechanické pulzatilní perfuze

Opatrný V.

Chirurgická klinika FN Plzeň a LF UK v Plzni

**Úvod:** Množství ledvin dostupných k transplantaci stále nedosahuje počtu pacientů na čekací listině, jež se každoročně prodlužuje. Přitom je transplantace ledvin jedinou šancí pacientů na dlouhodobé přežití s dobrou kvalitou života. Proto jsou v poslední době využívány i orgány od tzv. marginálních dárců, mezi něž patří též zemřelí dárci po nezvratné zástavě oběhu (DCD – donors after cardiac death). Nejčastější příčinou smrti těchto dárců je závažné trauma, zejména kraniocerebrální, či náhlá srdeční zástava s následnou neúspěšnou resuscitační péčí. Po konstatování smrti jedince dle přesně daných kritérií, je možno přistoupit k odběru ledvin. Při tom dochází nejprve k promytí štěpů v těle dárce pomocí perfuzního roztoku a následně k jejich vyjmutí a uchování zvolenou prezervační metodou. V oblasti DCD je nejčastěji využívána mechanická pulzatilní perfuze pomocí speciálního přístrojového vybavení. I přes dobré dlouhodobé výsledky štěpů od DCD, je tato skupina zatížena větším počtem opožděného nástupu funkce štěpu (DGF) i primární afunkce štěpu (PNF).

**Cíl:** Shrnutí základních poznatků o DCD a jejich následné využití v experimentální práci. Kvalitu štěpu od DCD významně určuje období těsně po zástavě oběhu dárce a následná perfuze štěpu. S využitím perfuzoru vlastní konstrukce jsme nejprve prozkoumali metodu ROP – retrográdní oxygenové perfuze. Tento experiment nás přivedl na myšlenku mechanického promývání ledvin konzervačním roztokem ještě v těle dárce. Cílem je po opětovné transplantaci štěpu příjemci dosáhnout snížení výskytu opožděného nástupu funkce štěpu či jeho primární afunkce.

**Metodika:** Metoda ROP byla testována na souboru 10 zvířat (prase) rozdělených do dvou skupin. U všech zvířat proběhla simulace teplé ischemie po dobu 20 min. V první skupině (n=5) byla následně po explantaci k uchování štěpu využita metoda ROP, ve druhé (n=5) mechanická přístrojová perfuze, u obou skupin po dobu 60 min. Následně byl orgán transplantován zpět původnímu zvířeti. V daných časových intervalech po dobu 2 hodin byly odebírány vzorky žilní krve ke stanovení hladiny urey. Stejně tak bylo provedeno vyhodnocení bioptických vzorků tkáně ledvin odebraných v průběhu a na konci experimentu. Následující experiment se již zabýval ihned zahájenou pulzatilní perfuzí. První část spočívala v pokusu na malém zvířeti (králík). Opět byla u všech zvířat simulována teplá ischemie po dobu 30 minut. Následně byla v první skupině (n=5) jedna ledvina v těle zvířete promyta zvykle užitím hydrostatického tlaku a ve druhé skupině (n=5) pak pomocí mechanického perfuzoru po dobu 30 minut. Byly zaznamenávány parametry průtoku ledvinou a teplota uvnitř orgánu. Po ukončení pokusu bylo provedeno histologické vyšetření promývaných ledvin. Druhý experiment

hodnotící ihned zahájenou pulzatilní perfuzi již probíhal opět na velkém zvířeti (prase). 7 zvířat prodělalo simulaci teplé ischemie jedné ledviny po dobu 30 min. Následně byly v první skupině (n=3) tyto promyty opět užitím hydrostatického tlaku a ve druhé (n=4) mechanickým perfuzorem po dobu 60 minut. Byly měřeny parametry průtoku a pokles teploty v orgánu. Následně byl obnoven původní krevní průtok a takto autotransplantovány. Po dobu dalších 6 hodin byla sledována diuréza, měřeny biochemické hodnoty a markery ledvinného poškození v séru a moči. Po promytí a na konci pokusu byly odebírány vzorky k histologickému vyšetření.

**Výsledky:** V experimentu zkoumajícím ROP jsme nezjistili rozdíl naměřených hodnot sérové urey v žilní krvi odebírané po autotransplantaci orgánu ( $p=0,843$ ). Stejně tak nebyl statisticky významný rozdíl v kvalitě promytí ledvinných štěpů při vyšetření patologem v čase I, II, III ( $p=1,00$ ). Obě metody byly tedy rovnocenné. První experiment s ihned zahájenou perfuzí na malém zvířeti prokázal signifikantně vyšší maximální průtok při užití mechanické perfuze, než u kontrolní skupiny při užití pouze hydrostatického tlaku ( $p=0,004$ ). Stejně tak jsme pozorovali statisticky významný rozdíl v poklesu teploty štěpu ve prospěch mechanické perfuze ( $p < 0,001$ ). Statisticky významné bylo i kvalitativní histopatologické hodnocení proplachu štěpů opět ve prospěch mechanické perfuze ( $p = 0,005$ ). Ve druhém experimentu na velkém zvířeti jsme mechanickou perfuzí jsme opět dosáhli statisticky významnějšího rozdílu mezi oběma skupinami, a to jak pro vrcholový průtok, tak pro průtok ve srovnání s maximálním průtokem u hydrostatické perfuze ( $p=0,007$ , resp.  $0,019$ ). Co se týče poklesu měřené teploty orgánu, nebylo těsně dosaženo úrovně statistické významnosti ( $p=0,071$ ). Stejně tak nebyla významně rozdílná ani diuréza po transplantaci ( $p=0,602$ ). Srovnání sledovaných biochemických markerů a markerů poškození ledvinného parenchymu v séru a moči se v žádném z časů 0,1,3,6 hod. významně nelišilo.

**Diskuze:** Výsledky prokazují identickou kvalitu štěpů prezervovaných jak klasickou intraarteriální perfuzí, tak retrográdní oxygenovou persufací. Nenalezli jsme signifikantní rozdíly jak v histopatologickém hodnocení odebraných štěpů, tak v hodnotách urey u zvířat po transplantaci daných štěpů. Uvedené výsledky jsou v souladu s literaturou. Nepotvrdili jsme názor některých autorů, že ROP může být dokonce superiorní ve srovnání s klasickou perfuzí event. s „cold storage“. Prokázali jsme ale bez pochyby, že i prostá ROP dokáže parenchym ochránit. Otázkou podle našeho názoru není nahrazení zvyklé intraarteriální perfuze retrográdní persufací, nabízí se však možnost určité kombinace obou metod. V prvním experimentu s ihned zahájenou mechanickou perfuzí je patrné statisticky významné rychlejší zchlazení ledvinných štěpů u přístrojové perfuze, stejně tak i statisticky významně vyšší průtok perfuzního roztoku ledvinou za minutu. Za stejnou časovou jednotku je tak orgán propláchnut větším množstvím perfuzátu. Dosud užívaná metoda pracuje s chladným perfuzátem, který se však již při podávání do těla zemřelého ohřívá od okolní pokojové teploty. Díky zapojení chladiče média v našem perfuzoru až těsně před vstup do těla dárce jsme mohli dosáhnout velmi nízké teploty perfuzátu kolem 4 st. C. Proto

je následné zchlazení orgánu účinnější. Prokázali jsme pomocí histologického vyšetření, že promytí ledviny pomocí mechanického perfuzoru v těle zvířete je výrazně lepší než při použití hydrostatického tlaku. Na histologických preparátech nebyly v glomerulech přítomny krevní elementy u ledviny promyté perfuzorem. Zdá se, že řízená mechanická perfuze je schopna z ledviny odstranit i drobné již vytvořené mikrotromby a zachovat maximum cévního řečiště pro obnovení krevního průtoku. Ve druhém experimentu na velkém zvířeti jsme mechanickou perfuzí opět dosáhli statisticky významnějšího rozdílu mezi oběma skupinami, a to jak pro vrcholový průtok u mechanické pulzatilní perfuze (průtok na vrcholu systoly čerpadla), tak pro průtok střední (vypočítaný identicky jako v klinické praxi) ve srovnání s maximálním průtokem u hydrostatické perfuze ( $p=0,007$ , resp.  $0,019$ ). Při srovnání sledovaných markerů poškození ledvinného parenchymu obě skupiny významně nelišily. Z výše uvedeného se domníváme, že ihned zahájená pulzatilní perfuze štěpů v těle dárce po nezvratné zástavě oběhu štěpy lépe promyje, tím zachová větší počet nepoškozených glomerulů a nefronů v parenchymu. Efektivnějším zchlazením lze dosáhnout časnějšího zastavení již probíhajících ischemických změn a po následné transplantaci snížit procento výskytu PNF a DGF. Jako ideální by se jevila tato metoda v následné kombinaci s možným využitím ROP před transplantací příjemci.

**Závěr:** Dárci ledvin po nezvratné zástavě oběhu jsou v dnešní době nedílnou součástí transplantační medicíny. Jejich využití může výrazně navýšit počet orgánů využitelných k transplantaci a tím zlepšit kvalitu života řadě nemocných v terminální fázi renálního selhání. Jedná se též o nejnáročnější skupinu dárců z pohledu organizace a provedení orgánového odběru, spojenou s řadou nejen logistických, ale i společensky a eticky citlivých otázek. K uchování orgánů odebraných DCD je dnes ve valné většině využívána přístrojová perfuze, jež garantuje nejlepší funkční výsledky po následné transplantaci příjemci. Proto se jako příhodné jeví využití co nejčasnější zahájení přístrojové perfuze již v těle zemřelého dárce. V našem experimentu jsme ověřili účinnost retrogradní oxygenové persuflace ve shodě s literárními daty. Dále jsme ve dvou experimentálních modelech prokázali možnost lepšího zchlazení a promytí ledvinného štěpu v těle dárce. Ideálním cílem našeho výzkumu by bylo zavedení nové metodiky, resp. algoritmu perfuze ledviny odebrané od marginálního dárce. Zavedení do klinické praxe jistě vyžaduje ještě významný kus práce na experimentálním poli, přesto finanční i logistická nenáročnost této metody je příslibem do budoucna.

### 3. Summary

**Introduction:** The number of kidneys available for transplantation still does not match the number of patients on the waiting list, which gets longer every year. At the same time, kidney transplantation is the only chance for the long-term survival of patients with good quality of life. Therefore, organs from marginal donors, including donors after cardiac death (DCD), have recently been used. The most common cause of death of these donors is severe trauma, especially craniocerebral trauma, or sudden cardiac arrest, followed by unsuccessful resuscitation. Kidneys can be harvested once an individual is declared dead according to the exact criteria. This involves initial washing of the grafts in the donor's body using a perfusion solution, followed by their removal and storage using selected preservation method. Mechanical pulsatile perfusion using special instrumentation is the most frequently used technique in the area of DCD. Despite of good long-term outcomes of grafts from DCDs, this group is burdened by a greater number of delayed graft function (DGF) and primary nonfunction (PNF).

**Objective:** To summarize the essential knowledge about DCD and its subsequent use in experimental work. Graft quality from DCD donors is significantly determined by the period just after the donor's circulatory arrest and subsequent graft perfusion. Using a perfusion system of our own design, we first explored the ROP (retrograde oxygen persufflation) technique. This experiment led us to the idea of mechanical perfusion of the kidneys with a preservation solution already in the donor's body. The aim is to reduce the incidence of delayed onset of graft function or its primary nonfunction after graft transplantation.

**Methodology:** The ROP methodology was tested in a population of 10 animals (pigs) divided into two groups. All animals were subjected to simulated warm ischemia for 20 minutes. Immediately after the explantation, the ROP method was used in the first group (n = 5) and mechanical machine perfusion in the second group (n = 5) to preserve the graft, for a period of 60 minutes in both groups. Subsequently, the organ was re-transplanted to the original animal. Venous blood samples were collected at given time intervals over a period of 2 hours to determine the urea level. Biopsy samples of kidney tissue taken during and at the end of the experiment were also evaluated. The subsequent experiment studied the immediately initiated pulsatile perfusion. The first part consisted of an experiment on a small animal (rabbit). Again, all the animals were subjected to simulated warm ischemia for 30 minutes. Subsequently, one kidney in the animal body was routinely perfused using hydrostatic pressure in the first group (n = 5) and using a mechanical perfusion pump in the second group (n = 5), in both groups for 30 minutes. The kidney flow parameters and the temperature inside the organ were recorded. Histological examination of the perfused kidneys was performed after ending the experiment. The second experiment, evaluating the immediately initiated pulsatile perfusion, was conducted on a large animal (pig). Seven (7) animals were subjected to simulated warm ischemia of one kidney for 30 minutes. Subsequently, the kidneys in the animal body were routinely perfused under hydrostatic pressure in the first group (n = 3) and using a mechanical perfusion pump in the second group (n = 5) for 60 minutes. The

flow parameters and the temperature decrease in the organ were measured. Subsequently, the original blood flow was restored and autotransplantation was performed. Over the next 6 hours, diuresis was monitored and biochemical values and markers of renal damage in the serum and urine were measured. After perfusion and at the end of the experiment, samples were taken for histological examination.

**Results:** In an experiment to examine ROP, we found no difference in serum urea levels in venous blood taken after organ autotransplantation ( $p=0.843$ ). Similarly, no statistically significant difference was found in the quality of renal graft perfusion when examined by a pathologist at times I, II, and III ( $p=1.00$ ). Both methods were therefore equivalent. The first experiment with the immediately initiated perfusion on a small animal showed a significantly higher maximum flow rate when using mechanical perfusion compared to the control group using only hydrostatic pressure ( $p=0.004$ ). Similarly, we observed a statistically significant difference in graft temperature decrease in favor of mechanical perfusion ( $p<0.001$ ). The qualitative histopathological evaluation of the graft perfusate was also statistically significant, again in favor of mechanical perfusion ( $p=0.005$ ). In the second experiment on a large animal, we again achieved a statistically significant difference between the two groups when using mechanical perfusion, for both peak flow and flow compared to the maximum flow rate in hydrostatic perfusion ( $p=0.007$  and  $0.019$ , respectively). Concerning the decrease in the measured organ temperature, the level of statistical significance ( $p=0.071$ ) was closely not reached. Similarly, diuresis after the transplantation was not significantly different, either ( $p=0.602$ ). Comparison of the observed biochemical markers and markers of renal parenchymal damage in the serum and urine showed no significant difference at any of the time points of 0, 1, 3, and 6 hours.

**Discussion:** The results confirm the identical quality of grafts preserved by classical intraarterial perfusion and retrograde oxygen persufflation. We found no significant differences in either the histopathological evaluation of the grafts taken or the urea levels in the animals after transplantation of the respective grafts. The results are in accordance with the literature data. We did not confirm the opinion of some authors that the ROP may even be superior to conventional perfusion or to "cold storage". However, we undoubtedly confirmed that even simple ROP can protect the kidney parenchyma. In our opinion, the aim is not to replace the usual intra-arterial perfusion with retrograde persufflation, but there is a possibility of a certain combination of both methods. In the first experiment with immediately started mechanical perfusion, we observed statistically significant faster cooling of the kidney grafts with machine perfusion, as well as a statistically significantly higher perfusion solution flow rate per minute through the kidney. In this way, the organ can be perfused with a greater amount of perfusate during the same time. The method used so far uses cold perfusate, which, however, warms up from ambient room temperature when administered to the body of a deceased donor. In our perfusion system, we were able to achieve a very low perfusate temperature of about 4 degrees Centigrade by incorporating a special cooler of the medium just before the entrance to the donor's body. Therefore, subsequent cooling of the organ is more

effective. We demonstrated by histological examination that kidney perfusion using a mechanical perfusion system in the animal's body is significantly better than perfusion under hydrostatic pressure. Histological preparations did not contain blood elements in the glomeruli of a kidney perfused with the perfusion pump. Controlled mechanical in-situ perfusion appears to be able to remove even small microthrombi already formed in the kidney and preserve maximum of kidneys microcirculation. In the second experiment on a large animal, mechanical perfusion again achieved a statistically significant difference between the two groups, both for the peak flow in mechanical pulsatile perfusion (flow at peak systole of the pump) and for the mean flow (calculated identically as in clinical practice) compared to the maximum flow rate under hydrostatic perfusion ( $p=0.007$  and  $0.019$ , respectively). When comparing the markers of renal parenchymal damage, neither groups differed significantly. We conclude from the above that pulsatile graft perfusion immediately initiated in a donor's body after irreversible circulatory arrest is better able to perfuse the graft, thus preserving a greater number of undamaged glomeruli and nephrons in the parenchyma. More efficient cooling can result in early arrest of ongoing ischemic changes and reduce the percentage occurrence of PNF and DNF after the transplantation. This method would seem to be optimal when combined with ROP prior to the transplantation to the recipient.

**Conclusion:** Kidney donors after irreversible circulatory arrest are an integral part of transplantation medicine today. Their use can significantly increase the number of organs that can be used for transplantation, thereby improving the quality of life of many patients in the terminal phase of renal failure. It is also the most challenging group of donors in terms of organization and performance of the organ removal, as it is associated with a number of logistical, social and ethically sensitive issues. In the vast majority of cases, machine perfusion is currently used to preserve organs from DCD donors, which guarantees the best functional results after subsequent transplantation to the recipient. Therefore, it is advisable to initiate machine perfusion as soon as possible, already in the body of the deceased donor. In our experiment, we examined the efficacy of retrograde oxygen persufflation in line with the literature data. Further, we demonstrated the possibility of better cooling and washing of the kidney graft in the donor's body in two experimental models. The optimal goal of our research would be to introduce a new methodology, a perfusion algorithm for kidneys removed from marginal donors. Its introduction into clinical practice certainly requires a significant amount of work to be done in the experimental field, yet the low financial and logistics requirements of this method are promising for the future.

## 4. Úvod

Transplantace ledviny je pro pacienty v terminálním stadiu renálního selhání jedinou šancí na udržení dobré kvality života a snížení rizika komplikací vyplývajících z dlouhodobé peritoneální dialýzy nebo hemodialýzy. Počet čekatelů na transplantaci se však v České republice v posledních letech neustále zvyšuje, z cca 700 v r. 2006 až k téměř 1000 v r. 2014, do budoucna lze nadále předpokládat další pozvolný nárůst tohoto počtu[1]. Naproti tomu celkový roční počet transplantací zůstává již několik let spíše neměnný, okolo 500-600 ročně v České Republice[1]. Tato situace proto vyžaduje akceptování i tzv. marginálních dárců neboli extended criteria donors – ECD, tedy dárců s horšími vlastnostmi štěpu. Kvalitní perioperační a pooperační péče se dokáže s riziky spojenými s transplantací těchto štěpů vyrovnat. Jedním z typických příkladů těchto marginálních dárců jsou dárci s nebijícím srdcem – donors after cardiac death – DCD. Rozšiřování programu DCD má z dlouhodobého hlediska zásadní důležitost pro navýšení počtu transplantací orgánů, zejména pak ledvin. Na Chirurgické klinice LF UK a FN v Plzni tento program funguje od roku 2002 a byl zahájen jako první v České republice[2].

Problematika DCD, na kterou se soustředí tato disertační práce se zabývá pacienty, u kterých dochází primárně k selhání kardiopulmonálních funkcí. Ty se nepodařilo přes účinnou resuscitaci trvající alespoň 30 minut obnovit. Nejčastější příčinou je polytrauma, infarkt myokardu či devastující kraniocerebrální poranění neslučitelné se životem. DCD jsou dále děleni podle tzv. Maastrichtské klasifikace do 5 skupin. Klasifikace zohledňuje, kde a za jakých okolností došlo k zástavě oběhu a je-li zaznamenána přesná doba srdeční zástavy. V zásadě existují dva možné postupy odběru orgánů od nebijícího dárce. První se výrazně neliší od klasického odběru u zemřelého dárce s mozkovou smrtí – DBD (donor after brain death). Je využíván hlavně u nemocných III. skupiny Maastrichtské klasifikace a spočívá v zavedení perfuzních kanyl cestou pánevních cév po laparotomii na operačním sále po konstatování nevratné srdeční zástavy a uplynutí tzv. non-touch intervalu. Druhou možností, využívanou zejména u II. skupiny DCD je kanylace abdominální aorty cestou femorální tepny za pomoci DBTL (double balloon, triple lumen) katetru. V obou případech je následně provedeno promytí ledvin studeným perfuzním roztokem za užití hydrostatického tlaku. Ten je generován zavěšením vaku s perfuzátem do výše alespoň jednoho metru nad lůžko pacienta. Cílem je vymytí krve z ledviny, její zchlazení, tím snížení metabolismu a konzervace parenchymu.

Po dostatečném promytí jsou ledviny vyjmuty z těla a nejčastěji napojeny na mechanický pulzatilní perfuzor, ve kterém jsou dále promývány roztokem a chlazeny. Na perfuzoru jsou sledovány funkční parametry jako průtok ledvinou a její cévní rezistence, dále je možné odebírat vzorky perfuzátu ke stanovení markerů poškození ledvinového parenchymu. Na základě těchto parametrů je rozhodnuto o použití či vyloučení štěpu k transplantaci. Dále je štěp indikovaný k transplantaci pulzatilně promýván perfuzním roztokem až do opětovného transplantování příjemci. Alternativou přístrojové perfuze je pouze uchování ve studeném prostředí, tzv. „cold

storage“ [3]. I přes dobré dlouhodobé výsledky štěpů od DCD, je tato skupina zatížena větším počtem opožděného nástupu funkce štěpu (DGF) i primární afunkce štěpu (PNF) [4–6].



## 5 Cíl disertační práce

Cílem této disertační práce je shrnout základní fakta v oblasti dárců k transplantaci ledvin, zejména pak týkající se dárců po nezvratné zástavě oběhu (donors after cardiac death – DCD). Následně pak tyto informace využít v experimentální práci s cílem ozřejmit možnosti zlepšení vlastností štěpů odebraných právě těmto dárcům.

Hypotéza, ze které vychází naše experimentální práce, se zakládá na předpokladu, že důležitou roli hraje období těsně po zástavě oběhu dárce a následná perfuze štěpu. Proto jsme nejprve prozkoumali možnost uchování orgánu pomocí retrogradní oxygenové perfuze. Tento experiment s využitím perfuzoru vlastní konstrukce nás přivedl na myšlenku mechanického promývání ledvin konzervačním roztokem ještě v těle dárce. Další hypotézou tedy bylo, že při okamžitém zahájení promývání ledvin perfuzním roztokem za užití mechanického perfuzoru (namísto pouhého hydrostatického tlaku) ještě v těle dárce, dojde k lepšímu promytí štěpů, jejich účinnějšímu zchlazení a tím kvalitnější prezervaci. Cílem je po opětovné transplantaci štěpu příjemci dosáhnout snížení výskytu opožděného nástupu funkce štěpu či jeho primární afunkce. Dalším přínosem by mohla být záchrana – resp. určitá rekondice štěpů, výrazněji poškozených déle trvajících teplou ischemií u nekontrolovaných DCD. Tím by bylo možno zvýšit počet získaných orgánů od DCD.

Pro ověření této hypotézy jsme v první fázi experimentální studie provedli pokus na malém zvířeti k ověření metodiky. V další fázi jsme provedli experiment na větším laboratorním zvířeti – praseti domácím a sledovali funkční parametry štěpu po opětovné transplantaci.

## 6 Transplantace ledvin

Nemocní v terminálním stadiu selhání ledvin jsou trvale rostoucí skupinou nemocných. Zatímco v roce 2000 bylo v ČR dialýzou léčeno 359 nemocných na 1 milion obyvatel, v roce 2015 již tento počet dosahoval 635 nemocných na 1 milion obyvatel. Celkem bylo v roce 2015 léčeno 6668 pacientů, valná většina za pomoci hemodialýzy, jen 6,9% pomocí peritoneální dialýzy [7]. Hemodialýza, která je bezpochyby život zachraňující eliminační metodou, má ale z dlouhodobého hlediska i svá úskalí. Roční mortalita nemocných na hemodialýze činí 18,7 %. Mezi příčinami úmrtí dominují kardiovaskulární choroby u více než 50 % [8]. Ve výsledku tedy i přes adekvátní léčbu a náhradu ledvinných funkcí vede terminální selhání ledvin k významnému zkrácení života nemocného [9]. Druhým aspektem eliminačních metod, je jejich pravidelnost, což výrazně ovlivňuje zejména osobní život pacientů. Průměrná doba hemodialýzy činí 5-6 hodin, v počtu 3x týdně [10]. Výhodou peritoneální dialýzy je možnost její domácí aplikace, avšak je možné ji využít jen u zlomku nemocných vzhledem k řadě kontraindikací této metody. V neposlední řadě je nutné zmínit pro pacienta frustrující tekutinové restrikce, jež dovolují nemocným přijímat jen omezené množství tekutin denně. Vzhledem k výše uvedenému je za neoptimálnější metodu léčby v dnešní době považována transplantace ledviny, která v průměru prodlouží život nemocného nejméně dvojnásobně oproti setrvání na hemodialýze [9]. Z celkového počtu dialyzovaných pacientů se však na čekací listinu dostane jen asi 10 % ročně [8]. Toto číslo stále převyšuje dostupné množství orgánů k transplantaci. V r. 2015 bylo transplantováno celkem 435 ledvin [7].

První úspěšná transplantace ledviny u člověka byla provedena v roce 1954 v Bostonu Murrayem a Merrillem mezi jednovaječnými dvojčaty [11]. Na území tehdejšího Československa byla první transplantace provedena v roce 1961 v Hradci Králové u nemocné, které z důvodů komplikací musela být odstraněna solitární ledvina s nefrolitiázou. První skutečně úspěšnou transplantaci ledviny provedl tým lékařů Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze v roce 1966 [12].

## 7 Dárci ledvin k transplantaci

### 7.1 Úvod

Před obdobím rozmachu transplantologie byli hlavním zdrojem orgánů k transplantaci zejména žijící dárci, na druhém místě pak dárci zemřelí, po nezvratné zástavě oběhu (donor after cardiac death – DCD). Výsledky však byly velmi tristní, štěpy výrazně poškozené teplou ischemií trpěly často primární afunkcí a rejekčními komplikacemi z důvodu nedostatečné imunosuprese. V roce 1968 byla na Harvardské lékařské fakultě v USA stanovena kritéria smrti mozku a tím i smrti jedince jako takového i při zachování funkčního srdečního oběhu. To znamenalo dramatický nárůst počtu orgánů dostupných k transplantaci a od této doby jsou dárci po mozkové smrti (donor after brain death – DBD) hlavním zdrojem orgánů. Dárci po zástavě oběhu na nějaký čas upadli v zapomnění. Hlavní osobností stojící za renesancí DCD je prof. Koostera z Maastrichtského transplantčního centra. Ten v roce 1990

vypracoval klasifikaci a metodiku využití dárců po nezvratné zástavě oběhu [13]. V České Republice byla tato metodika využita k ustanovení programu nebijících dárců v Transplantačním centru v Plzni v roce 2002 a funguje zde dodnes stejně jako v ostatních centrech [14].

## 7.2 Žijící dárce

Žijícím dárce ledviny se může stát teoreticky kterýkoli dospělý jedinec s vůlí darovat svůj orgán k transplantaci. V praxi se jedná většinou o osobu pokrevně či emočně příbuznou nemocnému v terminálním stadiu selhání renálních funkcí. Tato skupina dárců představuje v ČR spíše minoritu v celkovém objemu transplantovaných ledvin [15]. V roce 2016 bylo v České republice využito 262 zemřelých dárců, zatímco orgán žijícímu dárci byl odejmut pouze ve 49 případech [16]. Jsou však země, kde žijící dárce představují většinový zdroj orgánů k transplantaci – například v Japonsku až 80 %, v USA, ve skandinávských zemích dosahuje až 50 %, v Německu 32 % [17]. Žijící dárce skýtá celou řadu výhod v mnoha ohledech. Odběr i následnou transplantaci lze přesně naplánovat. Nefrektomie dárci bývá provedena nejčastěji na levé straně s ohledem na výhodnější anatomii cévního zásobení, je však možný i odběr pravé ledviny eventuálně s částí dolní duté žíly. Alternativou je prodloužení cévní stopky žilní náhradou například z vena saphena magna, v krajním případě cévní protézou. Po vyjmutí orgánu z těla dárce je tento jen krátce promyt perfuzním roztokem k vymytí dárcovské krve z orgánu a jeho zchlazení, následně je ihned po nutné úpravě přenesen do operačního pole příjemce. Je tedy zcela minimalizováno trvání jak teplé, tak studené ischemie. To se samozřejmě kladně projeví na rychlosti nástupu funkce štěpu a jeho dlouhodobém přežívání. Transplantace ledviny od žijícího dárce má zdaleka nejlepší dlouhodobé výsledky, není výjimkou přežívání štěpu i více než desítky let [18]. Stejně tak z pohledu necenzurovaného přežívání štěpů bylo v České republice v r. 2009 5 let po transplantaci funkčních 85,6 % štěpů získaných od žijícího dárce, v porovnání se 73,1 % štěpů od dárce zemřelého [15]. V posledních letech je též k odběru ledvinného štěpu dárci využíván laparoskopický přístup. Poprvé byla laparoskopická nefrektomie orgánu určeného k transplantaci provedena v r. 1995 v Johns Hopkins University Hospital [19]. V dnešní době je ve světě tato technika využívána asi v polovině dárcovských nefrektomií v různých modifikacích [20]. Nejčastěji užívaným je transperitoneální přístup [21], dalšími možnými jsou přístup retroperitoneální, laparoskopicky/rukou asistovaný či robotický. Možnou nevýhodou laparoskopického přístupu je delší „learning-curve“ při zavádění metody při malém počtu ročně provedených příbuzenských transplantací. Taktéž operační časy laparoskopického výkonu bývají delší, v průměru kolem 3 hodin [17]. Další diskutovanou nevýhodou může být přítomnost, byť většinou velmi krátké, teplé ischemie, jež probíhá od naložení svorek na cévní stopku a ureter do doby vyjmutí ledviny minilaparotomií z těla dárce a promytí chladným perfuzním roztokem. Průměrná délka trvání je udávána kolem 2 minut

[17]. V rozsáhlé metaanalýze z roku 2009 však nebyl nalezen rozdíl ve funkčnosti ledvin odebraných laparoskopicky či otevřenou technikou [22].

### 7.3 Zemřelý dárce

Většinou zdrojem orgánů k transplantaci jsou dárce zemřelí. Zde rozeznáváme další dvě podskupiny – dárce se smrtí mozku, tzv. donor after brain death (DBD) a dárce po nezvratné zástavě oběhu – donor after circulatory death (DCD).

#### 7.3.1 Zemřelý dárce se smrtí mozku (DBD)

Dříve také označovaný jako heart beating donor (HBD). V této skupině dárců jsou většinou nemocní po prodělané závažné cévní mozkové příhodě či kraniotraumatu, které vyústilo ve vyhasnutí všech mozkových funkcí od mozkového kmene výše. Jak již bylo zmíněno, v roce 1968 byla na Harvardské lékařské fakultě v USA stanovena kritéria smrti mozku a tím i smrti jedince jako takového i při zachování funkčního srdečního oběhu. Po stanovení této definice došlo k výraznému navýšení počtu orgánů k transplantaci a na čas odsunulo do pozadí dárce po nezvratné zástavě oběhu. DBD je tedy dárce, u kterého je dosud zachován krevní oběh a výživa orgánů určených k odběru k transplantačním účelům není zásadněji ohrožena. Je tedy možno plánovat a koordinovat orgánový odběr, zhodnotit kvalitu orgánů a eventuálně již před vlastním odběrem vyřadit dárce jako nevhodného. Samotný odběr orgánů od DBD probíhá víceméně plánovaně, po laparotomii a zvyklé přípravě orgánů k odběru je zavedena perfuzní kanyla cestou abdominální aorty či pánevní tepny a drenážní kanyla cestou dolní duté žíly a proplach viscerálního segmentu je realizován ihned po naložení svorky na aortu s následnou zástavou oběhu kardioplegickým roztokem aplikovaným intravenózně. Ledviny jsou tedy ihned promývány chladným konzervačním roztokem, současně jsou chlazeny ledovou tříští umístěnou do peritoneální dutiny. Následně jsou ledviny vyjmuty z těla dárce a uloženy v chladném perfuzním roztoku při tzv. „cold storage“, teplota štěpu se pohybuje kolem +4 stupňů Celsia. Takto mohou být uchovány v krajním případě až 36 hodin. Jedná se tedy o studenou ischemii ledviny. Po tuto dobu se předpokládá významné snížení metabolických procesů v buňkách ledviny, nikoliv však jejich úplná zástava. Následná transplantace příjemci by se tedy měla uskutečnit v nejkratším možném čase. Každá hodina studené ischemie navíc znamená vyšší riziko rozvoje pozdního nástupu funkce štěpu – tzv. delayed graft function (DGF), tedy nutnosti dialýzy v prvním týdnu po transplantaci. DGF navíc zvyšuje riziko rozvoje rejekční epizody a má též dopad na dlouhodobé přežívání štěpů od zemřelého dárce [23]. V České republice byl výskyt DGF u ledvin od DBD v roce 2010 35 %. U většiny štěpů však dochází k okamžitému rozvoji funkce (65 %) [15]. Pouze u 5 % transplantovaných se vyskytuje tzv. primární non-funkce (PNF), kdy orgán nenastoupí svou funkci vůbec, na vině může být dlouhá teplá nebo studená ischemie, akutní rejekce či závažné chirurgické komplikace, kdy je kompromitováno cévní zásobení štěpu. I tak patří výsledky transplantací od zemřelých dárců se smrtí mozku dlouhodobě mezi velmi dobré. Necenzurované 3-leté přežívání štěpů je 82,6 %, 5-leté potom 73,1 % podle poslední souhrnné studie

z roku 2011 [15]. V Transplantačním centru v Plzni je dosahováno velmi dobrých výsledků od DBD s pětiletým necenzurovaným přežíváním štěpu 84 % [24].

### 7.3.2 Zemřelý dárce po nezvratné zástavě oběhu (DCD)

#### 7.3.2.1 Úvod

DCD jsou specifickým zdrojem orgánů k transplantaci. Jedná se o nemocné, u nichž došlo k selhání kardiopulmonálních funkcí, které se i přes účinnou a dostatečně dlouho trvající resuscitaci nepodařilo obnovit [25]. Tato skupina dárců byla do jisté míry opomíjena po ustanovení kritérií smrti mozku v roce 1968. Vzhledem k trvale rostoucímu počtu nemocných vyžadující náhradu funkce ledvin a nedostatku dostupných orgánů k transplantaci, byli tito dárce znovu vzati do úvahy jako cenný zdroj orgánů. Renesance DCD dárců je zásluhou především profesora Koostry z Maastrichtského transplantačního centra. Ten se svým týmem v roce 1990 ustanovil základní klasifikaci DCD dárců a provedl sérii úspěšných transplantací od DCD [26].

Příčiny selhání kardiopulmonálních funkcí DCD mohou být různé, mezi nejčastější patří masivní infarkt myokardu, rozsáhlá plicní embolie, polytrauma, devastující poškození mozku, které však nesplňuje kritéria pro konstatování mozkové smrti [14]. Nezvratná zástava oběhu může být prohlášena po splnění alespoň dvou z následujících kritérií – nepřítomnost pulzové vlny při invazivní monitoraci tlaku, absence elektrické aktivity na elektrokardiogramu či vyhasnutí mechanické aktivity na echokardiografii srdce [25]. DCD dárce dělíme do 5 skupin podle tzv. Maastrichtské klasifikace (MK) [13]. Důležitou informací je znalost přesné doby srdeční zástavy či předpoklad jejího nastání, podle toho je dárce nazýván jako kontrolovaný či nekontrolovaný. Tento fakt je důležitý, protože definuje počátek měření délky teplé ischemie (warm ischemia time – WIT), což je doba od zástavy efektivního krevního oběhu ledvinou až do doby jejího promytí a zchlazení některou z užívaných metod, jak bude diskutováno dále. Teplá ischemie je zásadní problematikou v oblasti transplantací od DCD, protože do značné míry určuje míru poškození orgánu a jeho další vlastnosti v krátkodobém i dlouhodobém horizontu po transplantaci. Následné časové období, začínající promytím a zchlazením štěpu, se nazývá ischemií studenou (cold ischemia time – CIT), její trvání končí v momentě obnovení krevního průtoku štěpem po našíti cévních anastomóz v těle příjemce.

#### 7.3.2.2 Patofyziologie teplé ischemie

Problematika kvality štěpu od DCD spočívá, jak bylo zmíněno výše, zejména v délce teplé ischemie, rychlosti zchlazení orgánu a také míře jeho promytí od krve dárce. Délka teplé ischemie a teplota štěpu bezprostředně ovlivňuje rychlost a míru vyčerpání energetických zásob buněk.

Za fyziologických podmínek je hlavním intracelulárním iontem draslík, extracelulárním sodík, dále je intracelulárně udržována extrémně nízká hladina vápníku, který je součástí mnoha nitrobuněčných signálních cest. Toto iontové rozložení je udržováno za pomoci specializovaných iontoměničů na buněčné membráně a intracelulárních vakuolách v případě kalcia. K udržení výše uvedené rovnováhy je nutná energie získávaná štěpením vysokoenergetických vazeb ATP a pohánějící především Na-K ATP-ázu a Na-Ca ATP-ázu. Hlavním zdrojem energie buněk ledviny jsou aerobní procesy. V případě ischemie ledviny dochází k hypoxii ledvinného parenchymu, jejímž následkem rychle klesá množství dostupného ATP, jež je produkováno v mitochondriích každé buňky. Následně selhávají pro nedostatek substrátu membránové ATP-ázy a dochází k efluxu kalia z buňky a vnikání sodíku a kalcia do nitrobuněčného prostoru. Tím dochází k narušení buněčné homeostázy, depolarizaci buněčné membrány s následným přesunem chloridových iontů a vody do nitra buňky, což v důsledku způsobí její otok. Při edematózních změnách většího množství tubulárních buněk může dojít též k útlaku cévních struktur ledvinného parenchymu a následné poruše krevního proudění. Dále dochází k uvolnění kalcia z nitrobuněčných zásob. Zvýšená nitrobuněčná hladina kalcia spouští další kaskádu intracelulárních změn např. aktivaci fosfolipáz narušujících buněčnou stěnu, alteraci cytoskeletonu a uvolnění lysozomálních enzymů. K zabránění této letální kaskády buněčných dysfunkcí dnes užíváme speciální perfuzní roztoky v kombinaci s hypotermií štěpu. Složení perfuzních roztoků odpovídá iontové poměrům uvnitř buňky tedy, obsahuje vyšší koncentraci kalia a nízkou koncentraci sodíku, což napomáhá zpomalení efluxu kalia z nitra buňky při snížené funkci membránových ATP-áz. Hypotermie snižuje nároky buňky na kyslík zpomalením enzymových reakcí. Udává se 50% redukce metabolismu na 10 stupňů Celsia zchlazení [27]. Na druhé straně však dochází k pasivním ztrátám energetických substrátů z buňky ve formě nukleotidových fosfátů, jež poté prohlubují energetické nároky v prvních okamžicích po transplantaci. Hypotermie též sice zvyšuje renální vaskulární rezistenci, ale dle recentních literárních dat prodlužuje životnost štěpu a omezuje DGF i při delším času studené ischemie [28].

### 7.3.2.3 Klasifikace DCD

Nutnost klasifikovat dále dárce po nezvratné zástavě oběhu vyplývá z heterogenity této skupiny. Ta v sobě zahrnuje širokou škálu příčin smrti od náhlého úmrtí nastalého i mimo zdravotnické zařízení, mnohdy s nejasnou dobou jeho trvání, až po nemocné s plánovaným odejmutím podpory života pro jejich infaustní prognózu, kdy pokračování v terapii je bezúčelné a marné. Je zřejmé, že v každé kategorii bude předpoklad jiného trvání doby teplé ischemie a z toho vyplývající možnost predikce vlastností orgánu odebraného dárci konkrétní kategorie. Jako první široce přijatou, a v praxi dosud v podstatě nepřekonanou klasifikací je Maastrichtská klasifikace (MK), která je složena ze 4 základních skupin DCD.

Skupiny DCD dle původní MK z roku 1995 jsou v následující tabulce č. 1

Skupina		
I.	„Mrtvý přivezený“	Nekontrolovaný
II.	Neúspěšná KPCR	Nekontrolovaný
III.	(Očekávaná) zástava srdeční u nemocného s ireverzibilním poškozením mozku	Kontrolovaný
IV.	Náhlá zástava srdeční u plánovaného dárce s bijícím srdcem	Kontrolovaný

Tab. 1 – Skupiny DCD dle původní MK z roku 1995 [14]

V první skupině MK jsou nemocní, u kterých došlo k zástavě srdeční činnosti mimo zdravotnické zařízení. Není zcela přesně známa a dokumentována doba srdeční zástavy a nebyla ani zahájena resuscitace, často z důvodu masivních poranění zjevně neslučitelných se životem. Tito nemocní jsou jako DCD indikováni velmi uvážlivě pro nejasnou délku trvání srdeční zástavy, a tedy i teplé ischemie, která bývá u této kategorie nejdelší. V některých zemích, např. ve Španělsku se však jedná o dominující kategorii DCD s velmi dobrými výsledky po transplantaci [29].

Druhá skupina je tvořena z nemocných, u nichž došlo k neočekávané zástavě srdeční činnosti v nemocničním zařízení či mimo něj, ale byla ihned zahájena odborná rozšířená resuscitace a je tedy dokumentována přesná doba srdeční zástavy a délka trvání resuscitace. V nemocničním zařízení se může jednat o zástavu na oddělení urgentního příjmu, běžném oddělení či jednotce intenzivní péče. V modifikované klasifikaci z roku 2000 tvoří tyto nemocní samostatnou V. skupinu.

Třetí skupinu MK tvoří dárce, u kterých je přítomno rozsáhlé poranění mozku či jeho jiné ireverzibilní poškození, nejsou však splněna nutná kritéria pro smrt mozku. Nemocný je zcela závislý na ventilační a medikamentózní oběhové podpoře a další prodloužení této terapie by bylo z hlediska dalšího vývoje stavu bezúčelné a marné. Odběr orgánů je tedy prováděn po ukončení intenzivní péče eventuálně terminálním weaningu/extubaci a zástavě oběhu. Z etického hlediska se jedná o nejcitlivější skupinu DCD.

Čtvrtou skupinu tvoří dárce indikovaní k odběru jako DBD, u kterých však došlo k náhlému selhání kardiopulmonálních funkcí. Měl by být učiněn pokus o obnovu a udržení krevního oběhu, je-li tato snaha neúspěšná, pak je na místě včasné zahájení postupu odběru jako DCD.

Pátou skupinou přidanou Španělskými autory z Transplantačního centra v Madridu v roce 2000, jsou nemocní s náhlou zástavou srdeční v rámci hospitalizace na jednotce intenzivní péče (JIP). Důvodem k přidání této kategorie bylo vlastní pozorování, z něhož vyplynulo, že tyto nemocní mají výrazně horší výsledky po transplantaci, konkrétně 33,4 % selektovaných štěpů nikdy nenastoupilo svou

funkci, což výrazně kontrastovalo s 0-10,5 % primární non-funkce u ostatních kategorií DCD, přičemž nejhojněji zastoupenou skupinou v této práci je I. skupina MK! Důvodem tohoto jevu se zdá být horší celkový oběhový stav nemocných hospitalizovaných na JIP s možnými předchozími epizodami resuscitace či výrazné oběhové podpory, což ústí ve výraznější poškození ledvin i přes relativně kratší periodu WIT [29]. Někteří autoři však tuto kategorii nerozeznávají a řadí tyto nemocné do kategorie II MK [30].

Jak již bylo zmíněno výše, důležitým termínem užívaným v rámci MK je pojem kontrolovaný/nekontrolovaný dárce. V praxi se jedná o možnost plánování srdeční zástavy daného dárce. U nekontrolovaného dárce, tedy I., II. a doplněné V. skupiny MK se jedná o neočekávanou srdeční zástavu či neúspěšnou resuscitaci, ať už ve zdravotnickém zařízení či mimo něj. U kontrolovaného dárce III. skupiny se jedná o plánovaný akt odejmutí podpory života, je tedy možno očekávat srdeční zástavu v určitém časovém období, odběr naplánovat a tím výrazně zkrátit dobu následné teplé ischemie. Taktéž je možno začít připravovat k transplantaci případného příjemce orgánu, a tedy zkrátit na minimum dobu trvání studené ischemie a tím minimalizovat další poškození štěpu. Vše však musí probíhat striktně dle dané legislativy. U IV. kategorie, jež taktéž spadá do podskupiny dárců kontrolovaných je již prokázána smrt mozku a je tedy možno neprodleně po selhání oběhových funkcí přistoupit k rychlému odběru orgánů a tím zkrátit dobu teplé ischemie na minimum.

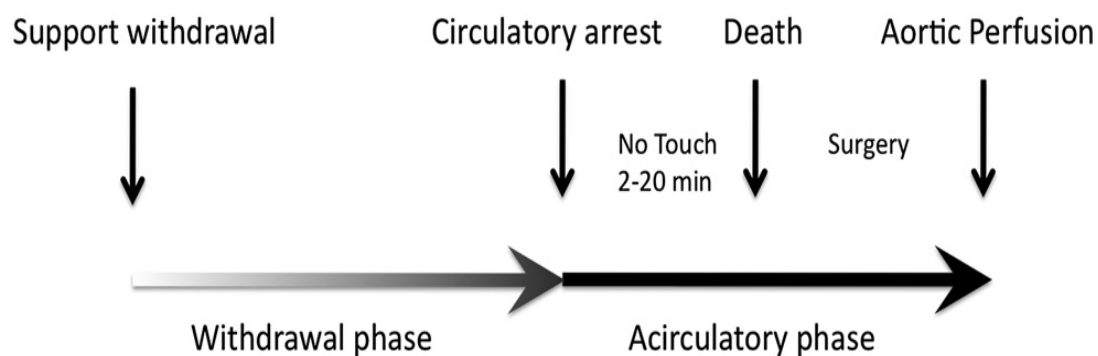
Patofyziologická podstata teplé ischemie je vcelku dobře popsána (viz výše). Samozřejmě je rozdílný dopad na různé buněčné skupiny tkání ledvinného parenchymu. Určitým problémem zůstává přesná definice trvání teplé ischemie.

U nekontrolovaných dárců je její počátek brán od chvíle prohlášení definitivní srdeční zástavy, tedy až po ukončení neúspěšné resuscitace. Tato však může být různě dlouho trvajícím. Definována je pouze její minimální délka trvání, a to nejméně 30 minut. Během samotné resuscitace již však dochází k určitému omezení prokrvení viscerálního řečiště dané centralizací oběhu v rámci šokového stavu, ať už je jeho příčina jakákoli. Stejně tak podávání vazoaktivních farmak může vést k vystupňované vasokonstrikci s omezením průtoku ledvinami. Důležitým faktorem je též kvalita prováděné zevní srdeční masáže a umělé plicní ventilace při úplné zástavě oběhu. Tuto však lze velmi těžko posoudit, zvláště pokud trvala delší dobu mimo zdravotnické zařízení a nemocný je přivezen již resuscitovaný. Je tedy otázkou kdy již začíná ischemické poškození orgánu a zda je tedy možné jej přesně časově určit.

U kontrolovaných dárců se zdá situace jednodušší, ale rovněž skrývá několik úskalí. U těchto dárců, kde dominuje III. skupina MK, je odběr proveden po nezvratné zástavě oběhu, ke kterému dojde po odejmutí podpory života, eventuálně v kombinaci s terminální extubací. Detry (et al.) dělí následující období do dvou fází. Jako první probíhá fáze postupného selhávání oběhových funkcí. Následně, po



splnění kritérií nezvratné zástavy oběhu, která umožňují prohlášení smrti jedince s následujícím non-touch intervalem, nastává tzv. acirkulatorní fáze, která končí zahájením proplachu orgánů studeným perfuzním roztokem v těle dárce, v závislosti na zvolené metodě. Zatímco acirkulatorní fáze bývá většinou relativně krátká, první fáze do zástavy oběhu může trvat relativně delší dobu. V této době již dochází k výraznější hypoxii orgánů, při zatím zachovaném krevním oběhu po ukončení umělé plicní ventilace. Krevní tlak může taktéž klesat jen postupně či se delší dobu udržovat na subnormálních hodnotách, které již nestačí k zabezpečení perfuze orgánů, ale zatím nedovolují prohlášení zástavy oběhu. Může docházet i k jistým agonálním výkyvům směrem k vyšším hodnotám s následným dalším poklesem. To vcelku prodlužuje fázi ukončování terapie. Výsledkem může být výrazné poškození orgánů plánovaných k odběru ještě před vlastním prohlášením smrti dárce. Teplá ischemie zde tedy zahrnuje celou dobu již od odejmutí ventilační a oběhové podpory až po zahájení aortálního proplachu [30, 31]. Celý časový průběh odběru od kontrolovaného dárce s jednotlivými fázemi popsány výše je shrnut v následujícím schématu (Obr.1).



Obr. 1 - Schéma průběhu odběru kontrolovaného dárce [30]

Se všemi těmito okolnostmi na zřeteli byla tedy Belgickými autory navržena upravená Maastrichtská klasifikace, která v základu zachovává původní 4 kategorie, avšak rozdělené do dalších subkategorií, a navíc přidává pátou s ohledem na nový typ dárce v Belgii, Nizozemí a Lucembursku, kterými jsou nemocní podstupující eutanazii (Tab.2).

Modified DCD Categories

Proposed Adapted Categories	Proposed Definition	Controlled/Uncontrolled
1A	Cardiocirculatory death outside hospital with no witness	Totally uncontrolled
1B	Cardiocirculatory death outside hospital with witnesses and rapid resuscitation attempt	Uncontrolled
2A	Unexpected cardiocirculatory death in ICU	Uncontrolled
2B	Unexpected cardiocirculatory death in hospital (ER or ward), with witnesses and rapid resuscitation attempt	Uncontrolled
3A	Expected cardiocirculatory death in ICU	Controlled
3B	Expected cardiocirculatory death in OR (withdrawal phase >30 min)	Controlled
3C	Expected cardiocirculatory death in OR (withdrawal phase ≤ 30 min)	(Highly) controlled
4A	Unexpected cardiocirculatory arrest in a brain-dead donor (in ICU)	Uncontrolled
4B	Expected cardiocirculatory arrest in a brain-dead donor (in OR or ICU)	(Highly) controlled
5A	Medically assisted cardiocirculatory death in ICU or ward	Controlled
5B	Medically assisted cardiocirculatory death in OR	Highly controlled

DCD, donation after cardiocirculatory death; ICU, intensive care unit; ER, emergency department; OR, operating room.

Tab. 2 - Modifikované kategorie DCD [30]

Cílem této nové klasifikace je v klinické praxi a následně v hodnocení větších souborů odlišit různé vlivy, jež mohou u dárců vést k poškození štěpu a následně moci porovnat rizika a přínosy takových dárců. Ve skupině I. je snaha oddělit dárce zemřelé zcela beze svědků s naprosto neznámou dobou zástavy, od těch, u kterých je tato doba alespoň známa a byl například učiněn pokus o resuscitaci. Ve druhé skupině jsou odlišeni již výše zmínění pacienti hospitalizovaní na jednotkách intenzivní péče, jejichž výsledky jsou horší než u ostatních nemocných s proběhlou neúspěšnou resuscitací. Ve třetí skupině jsou odděleni pacienti s ukončením podpory života na jednotce intenzivní péče od těch, kde je toto prováděno přímo na operačním sále. Dále je zde zohledněna délka trvání této fáze – kratší či delší než 30 minut. Čtvrtá skupina se opět týká dárců se smrtí mozku s očekávanou či neočekávanou zástavou před plánovaným odběrem orgánů. První varianta je tedy nově zařazena mezi nekontrolované dárce, druhá mezi (vysoce) kontrolované. Pátá skupina nově definuje DCD po vykonané eutanazii. Tato klasifikace dále stratifikuje původní kontrolované/nekontrolované dárce na další 2 podskupiny v každé kategorii s cílem opět predikovat kvalitu a možné výsledky štěpů odebraným těmto dárcům. Byť tato klasifikace zachovává původní základní koncept Maastrichtské klasifikace s přidáním logických a v praxi se často vyskytujících variant DCD, je otázkou, zdali bude přijata širší transplantologickou veřejností. Jistě by její přijetí však přispělo k možné "homogenizaci" výsledků a lepšímu hodnocení souborů DCD.

Maximální délky trvání jednotlivých fází odběru nekontrolovaného DCD se mohou výrazně lišit v závislosti na zvyklostech daného transplantáčního centra. Doba od srdeční zástavy do zahájení resuscitace může být v rozmezí od 15 do 20 minut. Tzv. non-touch interval se též liší svou délkou, pohybuje se mezi 3-20 minutami, nejdelší je užíván v Italských transplantáčních centrech. Dalším udávaným časovým rozmezím je doba resuscitace do kanylace řečiště k proplachu orgánů, pohybuje se v rozmezí 90–120 minut. Posledním výrazně variabilním parametrem je celková doba trvání proplachu orgánů v dutině břišní před jejich vyjmutím,

120 -360 minut [32]. V Plzeňském TC je přípustný jako nekontrolovaný DCD jen ten, u něhož byla ihned zahájena resuscitace, non-touch interval po konstatování nezvratné zástavy oběhu trvá 10 minut. Maximální délka trvání intervalu od uplynutí tohoto intervalu do kanylace je 30 minut. Doba in-situ proplachu maximálně 120 minut. U dárců kontrolovaných je zásadní délka trvání období od ukončení podpory životních funkcí do dosažení hodnot umožňujících prohlášení nezvratné srdeční zástavy. Maximální přípustná délka trvání této fáze (withdrawal phase) se pohybuje mezi 1-4 hodinami [24].

## 8 Technika odběru ledvin od DCD

Existují v zásadě 3 hlavní techniky odběru od DCD užívané v klinické praxi, jejich volba záleží na více faktorech. Základním je, o kterou kategorii DCD dárce dle MK se jedná, je-li dárce kontrolovaný či nekontrolovaný. Do jisté míry také volba způsobu odběru záleží na zavedených zvyklostech daného pracoviště.

### 8.1 Technika rychlé laparotomie

Jedná se o postup podobný odběru DBD využívaný zejména u dárců kontrolovaných, typicky kategorie III. / IV. Maastrichtské klasifikace, u nichž ukončení terapie probíhá přímo na operačním sále. Je možná příprava operačního pole a rouškování. Po konstatování nezvratné zástavy oběhu a uplynutí non-touch intervalu je ihned provedena kompletní střední laparotomie, vypreparována abdominální aorta nad bifurkací a dolní dutá žíla ve stejné výši. Do aorty je zavedena kanyla s perfuzním roztokem, jež je umístěn ve vaku ve výšce 1 m nad tělem dárce a je ihned zahájen proplach viscerálního segmentu aorty. Dále je subfrenicky naložena cévní svorka k omezení úniku perfuzátu do hrudní aorty. Na závěr je umístěna drenážní kanyla do dolní duté žíly. Zároveň je dutina břišní vyplněna ledovou tříští k dosažení maximálního zchlazení orgánů. Po promytí cca 15 litry perfuzního roztoku je přistoupeno k odběru ledvin, celkový čas perfuze by neměl přesáhnout 120 minut.

### 8.2 Technika in-situ perfuze

Jedná se o techniku využívanou výhradně u DCD, zvláště u nekontrolovaných skupin I. a II. MK, je možno ji však použít i u kategorie III., je-li ukončení terapie prováděno na jednotce intenzivní péče. Opět po prohlášení smrti a uplynutí non-touch intervalu je přistoupeno nejprve k preparaci femorálních cév v třísle za sterilních kautel. Cestou arteria femoralis communis je zaveden tzv. double balloon-triple lumen katetr (DBTL). Distální balon je zaklíněn v bifurkaci aorty, proximální obturuje suprarenální aortu, čímž je opět dosaženo promývání pouze viscerálního segmentu. Do vena femoralis communis je zaveden drenážní katetr, nejčastěji Foleyův, k volnému odtoku nejprve krve a poté perfuzátu. Vak s roztokem je opět umístěn do výše 1 m nad lůžko dárce, objem proplachu je i tomto případě cca 15 litrů perfuzního roztoku. Během perfuze je dárce transportován na operační sál, kde je následně po přípravě operačního pole a rouškování opět provedena laparotomie a do peritoneální dutiny umístěna ledová tříšť k chlazení ledvin. Po promytí štěpů jsou tyto zvykle vyjmuty z těla dárce.

### 8.3 Extrakorporální membránová oxygenace (ECMO)

V klinické praxi je ECMO využíváno převážně v případě kardiálního či plicního selhání k překlenutí doby nutné k restituci fyziologických funkcí. Jedná se o formu mimotělního krevního oběhu. Skládá se z pumpy a oxygenátoru, jež okysličuje odebranou venózní krev nemocného a odebírá produkovaný CO<sub>2</sub> namísto plicního parenchymu. V oblasti DCD je hojně využíván pro dárce z I. a II. skupiny, tedy dárce nekontrolované. Po konstatování smrti a uplynutí non-touch intervalu jsou

zavedeny kanyly mimotělního oběhu cestou femorálních cév. Je možno provést i uzavření aorty subdiafragmaticky balonovým katetrem zavedeným z kontralaterálního třísla. ECMO poté udržuje krevní oběh v oblasti viscerálního segmentu, a tedy redukuje dobu teplé ischemie orgánů plánovaných k odběru. ECMO lze užít jak v nastavení normotermním, kdy je udržována fyziologická tělesná teplota, tak v hypotermním, kdy je teplota cirkulující krve cíleně snížena. Dárce je poté transportován na operační sál a odběr dále veden jako při odběru od DBD, tedy po zavedení kanyly s perfuzním roztokem je viscerální segment aorty promyt a zchlazen a je ukončena činnost ECMO. Poté jsou odebrány orgány k transplantaci.

## 9 Výsledky transplantací od DCD

V praxi jsou štěpy od DCD brány jako takzvané marginální. Řadí se tedy do skupiny společně se štěpy odebranými starším nemocným, či nemocným s již přítomnými komorbiditami, poškozujícími renální parenchym (hypertenze, diabetes mellitus apod.). Ovšem výsledky transplantací od DCD jsou v dlouhodobém horizontu srovnatelné s výsledky od DBD. I proto je patrný vzestupný trend v oblasti transplantací od dárců s nezvratnou zástavou oběhu. Podle údajů Eurotransplantu bylo v roce 2005 transplantováno 123 štěpů od DCD, což z celkového objemu tvořilo pouhých 3 %, v roce 2015 jich bylo již 384. Mezi lety 2014 a 2015 se jedná téměř o dvacetiprocentní nárůst, jak vyplývá z následující tabulky č. 3. [33]

Type of transplant	2011	2012	2013	2014	2015	2014/2015
Kidney	306	329	353	321	384	19.6%
Kidney en bloc	1	3	2	3	1	-66.7%
Whole liver	81	88	100	98	126	28.6%
Liver + kidney	3	0	0	3	5	66.7%
Single lung	2	8	10	1	3	200.0%
Double lung	42	41	50	37	58	56.8%
Lungs + kidney	0	0	0	0	1	0.0%
Pancreas	1	0	0	0	2	0.0%
Pancreas + kidney	4	1	2	4	9	125.0%
Pancreatic islets	8	12	6	5	20	300.0%
<b>Total</b>	<b>448</b>	<b>482</b>	<b>523</b>	<b>472</b>	<b>609</b>	<b>29.0%</b>

Tab. 3 – Transplantace od DCD v letech 2011-2015 v zemích Eurotransplantu [33]

Největší zastoupení ze zemí Eurotransplantu má v tomto směru Nizozemí, na druhém místě potom Belgie viz tabulka č. 4.

Type of transplant	Transplant country	A	B	NL	Total	%
Kidney	A	11	9	11	31	8.1%
	B	0	117	2	119	30.9%
	NL	0	17	218	235	61.0%
<b>Total</b>		<b>11</b>	<b>143</b>	<b>231</b>	<b>385</b>	<b>100.0%</b>

Tab. 4 – Transplantace od DCD dle země v r. 2015 [33]

Z celkového počtu 3468 ledvin odebraných zemřelým dárcům v roce 2015 se již jednalo o 9 %, což je jistě nezanedbatelný přínos do dárcovského poolu stran DCD. Drtivá většina – 99% štěpů - byla odebrána III. skupině MK [33].

Markantnější podíl na celkovém počtu transplantací je patrný ve Spojeném království. Zde bylo od DBD odebráno 1462 ledvin a od DCD 1102 ledvin. To z celkového objemu 2664 ledvin odebraných zemřelým dárcům znamená 41 % podíl, což je ohromný přínos transplantačnímu programu. Taktéž je zde patrný významný nárůst počtu transplantací od

DCD od roku 2006 kdy těchto bylo jen 250 za rok [34]. I zde se jedná převážně o dárce ze III. skupiny MK.

Další zemí, kde jsou DCD velmi hojně využívány, je Španělsko. Z počtu 2517 transplantací ledviny od zemřelého dárce, bylo 460 od DCD. Nutno podotknout, že ve Španělsku je značná část ze skupiny nekontrolovaných dárců I. a II. skupiny MK [35].

V České republice též dochází postupně k nárůstu počtu transplantací od DCD, avšak ne tak dramatickému, jako v ostatních zmiňovaných státech (Tab.5). V roce 2015 bylo k odběru indikováno 8 dárců po nezvratné zástavě oběhu [1].

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Dárci orgánů (zemřelí + žijící) - celkem	229	251	227	227	223	225	288	301	327	299
Zemřelí dárci orgánů - celkem	195	217	198	200	206	185	216	218	263	246
zemřelí dárci orgánů po smrti mozku (DBD)	193	215	197	200	204	184	214	217	259	238
zemřelí dárci orgánů po zástavě oběhu (DCD)	2	2	1	0	2	1	2	1	4	8
Žijící dárci orgánů	34	34	29	27	17	40	72	83	65	53

Tab. 5 – Transplantační aktivita v ČR od roku 2006–2015 [36]

Počty transplantovaných orgánů jsou volně dostupné v ročních statistikách jednotlivých koordinačních transplantačních center v jednotlivých státech či v nadnárodních souhrnech (Tab.5). Naproti tomu výsledky transplantací jsou dostupné většinou pouze skrze publikované práce jednotlivých autorů působících na poli DCD.

Z větších publikovaných souborů po zavedení transplantací od DCD zpět do klinické praxe vyplývá, že mohou zcela směle konkurovat štěpům odebraným DBD. Je však třeba počítat s několika specifiky. Prvním je možný vyšší výskyt primární afunkce štěpu tzv. PNF (primary non-function). Její výskyt je však velmi variabilní v závislosti na typu DCD dle Maastrichtské klasifikace, užívaných časových rámců v průběhu odběru od DCD jak bylo diskutováno výše (agonální fáze, non-touch interval, délka in-situ perfuze), dále též v závislosti na metodě odběru a uchování štěpů, jak bude ještě osvětleno dále. Všechny tyto modalities tvoří ze skupiny DCD velmi různorodý soubor, kde porovnávání výsledků může být velmi obtížné a zkreslující. Z prvních souborů publikovaných po renesanci DCD dárců vyplývá výskyt PNF v rozmezí 2-19 % [5, 37], zatímco u štěpů odebraných DBD se pohybuje mezi 1-9 % [37, 38]. Jedná se o práce v časovém rozmezí 1997-2007. Z r. 2011 pochází souhrnná práce hodnotící soubor DCD z celé Evropské unie, resp. z 10 zemí využívajících DCD. Z ní vyplývá výskyt PNF u 5,6 % nekontrolovaných dárců, a u 6,4 % dárců kontrolovaných [39]. V Plzeňském transplantačním centru mezi lety 2002-2015 byl výskyt PNF 7,1 % [24]. Druhým specifickým problémem štěpů od nebijícího dárce je opožděný nástup funkce štěpu (DGF – delayed graft function). Ten je definován jako nutnost dialýzy v prvním týdnu po transplantaci. Je odrazem poškození ledvinného parenchymu zejména teplou ischémií, a proto se vyskytuje zejména u DCD. V literatuře se uvádí výskyt DGF v širokém rozmezí 39-77% [37, 38]. To je ovšem dáno rozdílnými skupinami dárců preferovaných jednotlivými autory. Zatímco nižší výskyt DGF je přítomen u dárců kontrolovaných, u nekontrolovaných to může být až zmiňovaných 77 %. I přesto, že se toto číslo může zdát velmi vysoké, z dlouhodobého hlediska nemá větší klinický

dopad, protože výskyt a trvání DGF nemá vliv na dlouhodobou funkci štěpu [40, 41]. Byť podle jedné souhrnné práce může DGF být spojena s vyšší mírou akutních rejekcí, cytomegalovirovou infekcí, horšími renálními funkcemi a arteriální hypertenzí 3 měsíce po transplantaci [42]. V Plzeňském transplantačním centru mezi lety 2002-2015 byl výskyt DGF 17,9 % [24].



## 10 Uchovávání štěpů od DCD

### 10.1 Cold storage

Uchovávání ledvinných štěpů pomocí prosté hypotermie je v klinické praxi užíváno nejčastěji u DBD, lze ji však užít i u štěpů od DCD, zvláště u kontrolovaných kategorií MK s velmi krátkou teplou ischemií orgánu, zejména při použití odběrové techniky rychlé laparotomie. Po promytí štěpu in situ perfuzním roztokem je dosaženo jeho stabilizace na úrovni tkání, vymytí krve z orgánu a jeho částečné zchlazení. Následně je vyjmut z těla dárce a uložen v plastovém sáčku s perfuzátem. Ten je poté uložen do několika dalších společně s ledovou tříští. Nakonec je takto zabalený orgán umístěn do termoboxu, kde je udržován při teplotě kolem 4 st. Celsia. Délka uchování pomocí cold storage by neměla přesáhnout 24 hodin. Poté již dochází k horším výsledkům po následné transplantaci štěpu [6]. Z recentní studie Debout (et al.) z r. 2015 vyplývá, že každá hodina studené ischemie štěpu zvyšuje riziko selhání štěpu a mortalitu transplantovaných [23]. Hlavní nevýhodou statické „cold storage“ je nemožnost vyšetření funkčních vlastností takto uchovávaného orgánu, proto je využívána zejména u DBD, kde je předpoklad minimálního poškození ledvinného parenchymu před odběrem orgánu.

### 10.2 Mechanická perfuze

V případě tohoto způsobu uchovávání orgánu, je nutné použití přístroje – perfuzoru. Jeho užití je dominantní u DCD dárce, i když jsou centra, kde se užívá i k perfuzi štěpů od DBD. Celkové zastoupení u DBD je pouze asi 2 – 3,4 % [43]. Štěpy jsou po vyjmutí z těla dárce, opět po předchozím proplachu, umístěny do perfuzoru, do tepny je zavedena perfuzní kanyla a orgán je následně kontinuálně promýván. Součástí perfuzoru může být též oxygenátor sytící cirkulující roztok kyslíkem. Samotný perfuzor však může být založen na různém principu uchovávání daného orgánu. V klinické praxi nejčastěji užívanou metodou je tzv. hypotermní perfuze, kdy je orgán cirkulujícím médiem chlazen na teplotu kolem 4 st. Celsia. Tímto médiem bývá některý z běžně užívaných perfuzních roztoků. Zatím pouze experimentální či jen prvotní klinické zkušenosti jsou s metodami subnormotermní a normotermní perfuze. Výhodou užití mechanické perfuze k uchovávání ledvinných štěpů je možnost sledování vlastností perfundovaného orgánu. Je možné měřit průtok a z něj odvozenou renální rezistenci, stanovovat biomarkery ledvinného poškození z odebraných vzorků perfuzátu. Většinou se jedná o intracelulárně uložené enzymy či jiné molekuly, jež se uvolňují extracelulárně jen při porušení buněčné integrity. Těchto molekul byla studována celá řada. Zatím nebyla nalezena žádná univerzální, jejíž hladina by korelovala s tíží ischemického poškození ledvinného parenchymu a predikovala tak jednoznačný osud orgánu po případné transplantaci. Obecně je využíváno stanovení t-GST, tedy celkové hladiny glutathion-s-transferázy, cytosolického enzymu buněk proximálního tubulu v 6. hodině po začátku mechanického promývání štěpu společně s hodnotou renální rezistence (RR).

### 10.2.1 Hypotermní mechanická perfúze

Hypotermní mechanická perfúze je nejstarší užívanou metodou mechanické perfúze. Jako první ji v klinické praxi použil Belzer v r. 1967 aby umožnil transport orgánů k transplantaci [44]. Od té doby metoda prošla významnými změnami. V dnešní době je dominantně užívána v oblasti DCD dárců. Hlavní výhodou je již výše zmíněná možnost monitorace perfundovaného orgánu. Užitím hypotermní perfúze je dosaženo ochlazení orgánu na stabilní teplotu kolem 4 stupňů Celsia, čímž jsou výrazně zpomaleny metabolické procesy na buněčné úrovni [45]. Cílem je omezení energetických nároků v tkáních. I přesto však dochází v čase k depleci energetických substrátů a postupnému odumírání buněk orgánu. Proto by i doba studené ischemie měla být co nejkratší.

### 10.2.2 Subnormotermní mechanická perfúze

Jak již vyplývá z názvu jedná se o perfuzi štěpu s užitím teplot pod fyziologickým normálem, nejčastěji mezi 20-35 stupni Celsia. V publikovaných pracích zejména v oblasti transplantace jater je většinou cílem určitá rekondice a vyhodnocení vlastností orgánu po předchozí konzervaci pomocí „cold storage“ s dobrým efektem na následnou funkci a vlastnosti štěpu [46–48]. V oblasti transplantace ledvin je tato metoda rozvíjena zatím na experimentální úrovni. V práci německých autorů bylo provedeno srovnání HMP (hypothermic machine perfusion) a SNMP (subnormothermic machine perfusion) a cold storage u modelu DCD. Štěpy uchovávané pomocí SNMP měly v tomto experimentu lepší následnou funkci ve smyslu vyššího průtoku krve a diurézy po následné reperfuzi v umělém krevním oběhu [49].

### 10.2.3 Normotermní mechanická perfúze

V literatuře v poslední době často diskutovaná metoda. V principu se jedná o určitý způsob inkubace orgánu s užitím podmínek co nejbližší fyziologickému normálu. Cílem je již od odběru poskytnout podmínky pro normální průběh metabolických dějů, tedy dodání kyslíku, živin a udržování homeostázy. Zatím se stále jedná o metodu experimentální. Jako médium pro perfuzi je většinou využívána autologní krev experimentálního zvířete, či resuspenze erytrocytů v nosném roztoku. Je možné užití i umělých kyslík-transportujících molekul imitujících funkci hemoglobinu. Hlavním úmyslem je poskytnout takto uchovávanému orgánu možnost k reparaci po proběhlém ischemickém inzultu, proto je tato metoda uvažována zvláště u DCD. Dosavadní práce se věnují zejména oblasti transplantace jater, jež jsou velmi náchylná k poškození teplou ischemií [50].

## 10.3 Retrogradní oxygenová persuflace

Retrogradní oxygenová persuflace (ROP) je další možnou alternativní metodou prezervace orgánu k transplantaci. Při této metodě dochází k promývání plynným kyslíkem retrogradně cestou ledvinné žíly či jaterních žil a tím k rekondici orgánu. Insuflovaný plynný kyslík by měl napomoci udržení energetických substrátů v mitochondrii a alespoň minimální produkci ATP s následnou stabilizací buněčné membrány, resp. ATP-áz udržujících iontovou homeostázu [50]. Metoda byla popsána již v 70. letech minulého století [51]. V minulosti byla provedena řada experimentálních studií [52, 53]. Poprvé v klinické praxi je ROP pravděpodobně použita u ledvin Rollesem [54] v roce 1989.

Opakovaně proběhly studie porovnávající kvalitu štěpů prezervovaných ROP a zvyklým skladováním v chladu nebo intraarteriální perfuzí [55, 56]. Bylo opakovaně prokázáno, že ROP může být v mnoha ohledech dokonce výhodnější než zvyklá prezervace jak u ledvin, tak u jater. Nejčastěji se jednalo o experimenty na menších zvířatech (krysy, psi). Další experimenty s ROP se zabývaly zejména bioenergetickým stavem štěpů a jejich funkcí po transplantaci [51]. Recentnější podobné experimenty byly provedeny i u prasat [57–59]. Naše vlastní experimentální práce v oblasti ROP (viz níže) potvrdila data dostupná v literatuře, tedy srovnatelnou schopnost prezervace ledvinného štěpu v porovnání s mechanickou perfuzí [59]. ROP byl v klinické praxi již použit k rekondici pěti výrazněji ischemicky poškozených jaterních štěpů, jež by jinak byly vyřazeny. Výsledky byly povzbudivé, po 60 minutách ROP cestou jaterních žil a následné transplantaci všech 5 orgánů nastoupilo funkci, po dvou letech byly funkční všechny štěpy [60].

Transplantace ledvin od DCD je velmi komplexní a složitou problematikou na poli transplantace ledvin, kde dochází trvale k dalšímu vývoji v oblasti klasifikace, možností využití i tzv. marginálních dárců z pohledu déle trvající teplé ischemie odebraných orgánů. S tím souvisí i výzkum nových metod prezervace štěpů odebraných z DCD. Není zatím přesně zřejmé, zdali v dnešní době postupně upřednostňované metody subnormotermní a normotermní perfuze orgánů za téměř fyziologických podmínek, přinese následné zlepšení krátkodobé, či dlouhodobé funkce ledvin odebraných z DCD.

## II. část – experimentální

## 1 Cíle projektu

Cílem experimentální práce bylo v praxi vyzkoušet různé metody perfuze ledvin určených k transplantaci a rovněž funkčnost perfuzoru vlastní konstrukce. Nejprve byl přístroj využit k provedení retrográdní oxygenové persuflace na prasečím modelu, jež se nám jevila jako relativně levná a málo probádaná alternativa klasické mechanické perfuze. V rámci tohoto experimentu byl přístroj využit též k mechanické perfuzi ledvinného štěpu v kontrolní skupině. Jeho jednoduchá konstrukce a možnost vřazení velmi účinného chladiče perfuzního roztoku nás přivedly k myšlence ihned zahájené mechanické perfuze v těle dárce po nezvratné zástavě krevního oběhu. Dalším stanoveným cílem bylo tedy prokázat pozitivní vliv tohoto způsobu prezervace na vlastnosti štěpu od DCD, zejména jeho promytí a následnou funkci po transplantaci. V první fázi experimentální práce bylo zvoleno malé laboratorní zvíře k ověření základní metodiky. V druhé fázi experimentu na větším laboratorním zvířeti bylo hlavním cílem prokázat zlepšení vlastností ledvinného štěpu promytého ihned zahájenou mechanickou pulzatilní perfuzí, nad promytím pouze za použití hydrostatického tlaku, což je metoda užívaná v klinické praxi.

## 2 Úvod

Po transplantaci štěpů od DCD dochází častěji k opožděnému nástupu funkce štěpu či primární afunkci v porovnání se štěpy od DBD. Na vině je jistě prolongovaná teplá ischemie, kterou orgán trpí v době po zástavě cirkulace v těle dárce do zahájení promýváním perfuzním roztokem a napojení na mechanický perfuzor po explantaci. Námi provedené experimenty na zvířecím modelu se zaměřují na tyto dárce a na možnost zlepšit vlastnosti štěpů jim odebraných.

Retrogradní oxygenová perfúze (ROP) je jednoduchou, levnou metodou k uchování ledvinného štěpu. Její využití u DCD bylo jen sporadicky dokumentováno v literatuře, proto jsme se rozhodli tuto metodu vyzkoušet k uchování štěpů odebraným DCD.

Ihned zahájená in-situ mechanická pulzatilní perfuze je druhou modalitou kterou jsme testovali ve zvířecím experimentu ke zlepšení vlastností ledvin odebraných DCD. V první fázi experimentální práce bylo využito malé laboratorní zvíře, druhá fáze na praseti domácím již zahrnovala i funkční sledování orgánu po autotransplantaci.

Celý experiment probíhal po schválení etickou komisí LF UK a v souladu s vyhláškou pro práci s laboratorními zvířaty.

## 3 Pracovní hypotéza

### 3.1 Retrográdní oxygenová persuflace (ROP)

Jde o možnou alternativou rekondice ledvinného štěpu poškozeného teplou ischemií. Jedná se o metodu technicky nenáročnou, nevyžadující speciální perfuzní roztoky. Hypotézou v tomto experimentu bylo, že štěp ošetřený po proběhlé teplé ischemii pomocí ROP, bude po autotransplantaci vykazovat stejnou či lepší funkci než při ošetření mechanickou hypotermní perfuzí.

### 3.2 Ihned zahájená, intraarteriální mechanická perfúze ledvinných štěpů

V další fázi experimentu se naše pozornost obrací k in situ intraarteriální perfúzi ledvinných štěpů. V běžné klinické praxi je při odběru ledvin od DCD technikou in-situ perfúze realizován proplach viscerálního segmentu abdominální aorty prostřednictvím DBTL katetru. Perfúzní tlak roztoku k promývání je generován výškou zavěšení vaku s roztokem nad lůžkem dárce, většinou ve výšce cca 1 metru. Jedná se tedy o tlakem řízenou perfúzi, kde se průtok mění jen v závislosti na odporu kladeném cévním řečištěm ledviny. Naše hypotéza je následující. Užitím mechanického perfúzoru k promytí ledvin cestou DBTL katetru již v těle dárce, užitím průtokem řízené perfúze, by mohlo dojít k lepšímu proplachu orgánu, čímž by zůstalo zachováno větší množství funkčních glomerulů. Zároveň by došlo k účinnějšímu zchlazení orgánu již v těle dárce při užití aktivního chlazení perfúzního roztoku před vstupem do katetru a těla dárce. To by ve výsledku mohlo vést k lepším funkčním vlastnostem transplantovaných štěpů, snížení výskytu DGF eventuálně PNF. Mohlo by být též dosaženo rekondice štěpů které byly déle vystaveny teplé ischemii. Tím bychom mohli dosáhnout užití většího množství orgánů od dárců I. a II. skupiny MK.

## 4 Experimentální perfuzor

Pro potřeby monitorování a kontroly parametrů v průběhu experimentů byla sestrojena ve spolupráci s kolegy z Fakulty biomedicínského inženýrství při Českém vysokém učení technickém experimentální jednotka založená na multifunkční platformě využívající technologie hradlových polí FPGA. Konkrétně se jednalo kartu NI-PCI-7831R (National Instruments, Austin, TX, USA), která byla instalovaná ve vývojové počítačové jednotce. K této kartě byly připojeny jednotlivé snímače pro měření procesních veličin (tlak, průtok, teplota) a také elektronika pro řízení čerpadel pro zajištění nucené mechanické perfuze. Při retrogradní perfuzi kyslíkem byl nastaven tlak kyslíku na 18 mmHg (2,4 kPa) s odchylkou  $\pm 0,2$  mmHg. Tlak byl měřen v T odbočce mezi katetrem zavedeným v přívodní hadici. Měření tlaku obstarávaly jednak senzory MPXV5010 a MPXV4002 (Freescale Semi., Austin, TX, USA) a kapalinové tlakové komory TruWave (Edwards Lifesciences, Irvine, CA, USA). Měření teploty bylo realizováno pomocí standardních čidel Pt-100 umístěných do skleněných pouzder (Theta90, Praha, Česká Republika) a čidel pro povrchové měření teploty s NTC 30k@25 °C (LHL s.r.o., Ústí n. Labem, Česká Republika). Průtok byl měřen pomocí inline průtokového senzoru Sonoflow IL52 (Sonotec, Halle, Německo). Senzory byly doplněny o nezbytnou elektroniku pro zajištění požadované přesnosti a stability. Nucená perfuze byla docílena pomocí zubových čerpadel (Diener, Embrach, Švýcarsko) s elektronickým řízením výkonu pomocí pulzně šířkové modulace. Díky tomuto řízení bylo možné plynule nastavovat parametry průtoku včetně simulace pulzatilní vlny. Pro potřeby řízení experimentální jednotky, monitorování parametrů a tvorby logu byl vytvořen vlastní software.



Obr. 2 – Experimentální perfuzor vlastní konstrukce



## 5 Retrogradní oxygenová persuflace – experiment na velkém zvířeti

### 5.1 Metodika

Jako experimentální zvíře bylo použito prase domácí o hmotnosti cca 30 kg. Vlastní provedení bylo následující.

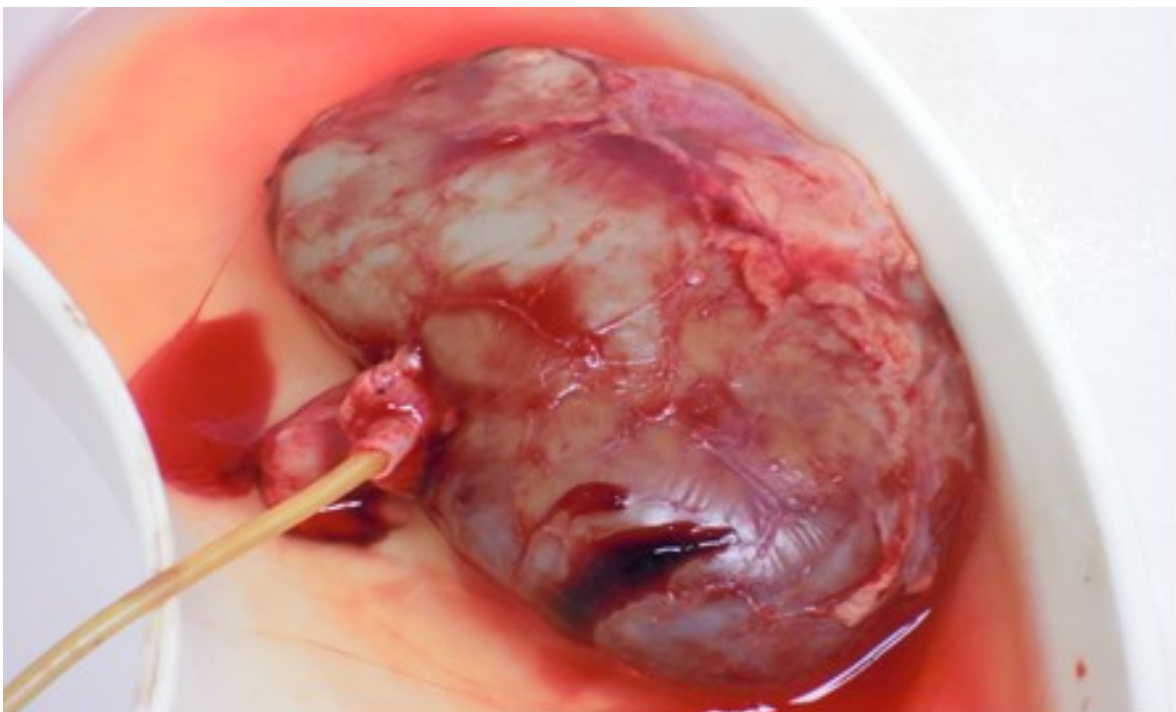
Ve skupině A (N=5 zvířat) bylo experimentální zvíře uvedeno po premedikaci (Atropin, Stresnil) do celkové anestézie (Thiopental, Calypsol, Fentanyl), střední laparotomií jsme pronikli do retroperitonea, byl vypreparován ledvinový hilus pravé ledviny, cévní stopka ledviny byla na 20 min. uzavřena cévní svorkou (simulace teplé ischemie). Poté byl proveden odběr této ledviny. V tento moment je odebrán první vzorek biopsie ledviny (biopsie – IA). Bioptický vzorek je odebírán jako klínovitá excize parenchymu ledviny zahrnující kůru i dřeň. Ledvinový štěp byl po explantaci napojen na endosuflátor, pomocí kterého byl štěp retrogradně promýván zvlhčeným plynným kyslíkem pod tlakem 18 mm rtuťového sloupce. Jedná se o retrogradní promývání, kanyla je zavedena do renální žíly. Štěp je při tom umístěn v chladném perfuzním roztoku (Custodiol) při teplotě + 4 st. C. Bylo nutné udělat jehlou do parenchymu ledviny několik perforačních otvorů pro únik plynného kyslíku. Promývání trvalo 60 minut, na konci tohoto intervalu byl odebrán druhý vzorek biopsie ledviny (biopsie-IIA). Poté byl ledvinový štěp opět transplantován identickému zvířeti a zároveň byla provedena druhostranná (levostranná) nefrektomie. Při transplantaci byla anastomozována renální tepna na aortu (end to side anastomóza) a renální žíla na dolní dutou žílu (end to side anastomóza). Obě anastomózy provedeny pokračujícím polypropylenovým stehem 7/0. Po obnovení průtoku štěpem byl každých 30 minut z renální žíly natransplantované ledviny odebrán vzorek žilní krve pro stanovení markerů renálních funkcí. Po 120 minutách byl štěp opět explantován, odebrán třetí vzorek biopsie ledviny (biopsie-IIIA) a pokusné zvíře usmrceno kardioplegickým roztokem. Vše probíhalo v pokračující celkové anestézii.

Ve skupině B (N=5 zvířat) byla opět simulována ischemie ledviny 20 min. klampáží cévní stopky, poté byl ledvinový štěp po nefrektomii zvykle intraarteriálně perfundován perfuzním roztokem pomocí hydrostatického tlaku Custodiolem. Kanyla byla zavedena zvykle do renální tepny. Vlastní dialyzát byl chlazen na teplotu 4 °C pomocí laboratorního termostatu s chlazením, ale z důvodu jeho recirkulace a prvotním ohřátím orgánem byla teplota po dobu experimentu v rozmezí 3,9 – 6,4 °C. Teplota orgánu klesla na teplotu cca. 5,2 °C měřené na povrchu. Promývání trvalo stejně jako ve skupině A 60 minut. Stejným způsobem byla ledvina poté autotransplantována a rovněž byla provedena druhostranná nefrektomie. Vzorky krve byly odebírány opět z renální žíly v identických časových intervalech jako ve skupině A. Stejně tak byly identicky odebírány bioptické vzorky z ledviny (biopsie IB-IIIB). Po 120 minutách bylo opět zvíře usmrceno pomocí kardioplegie.

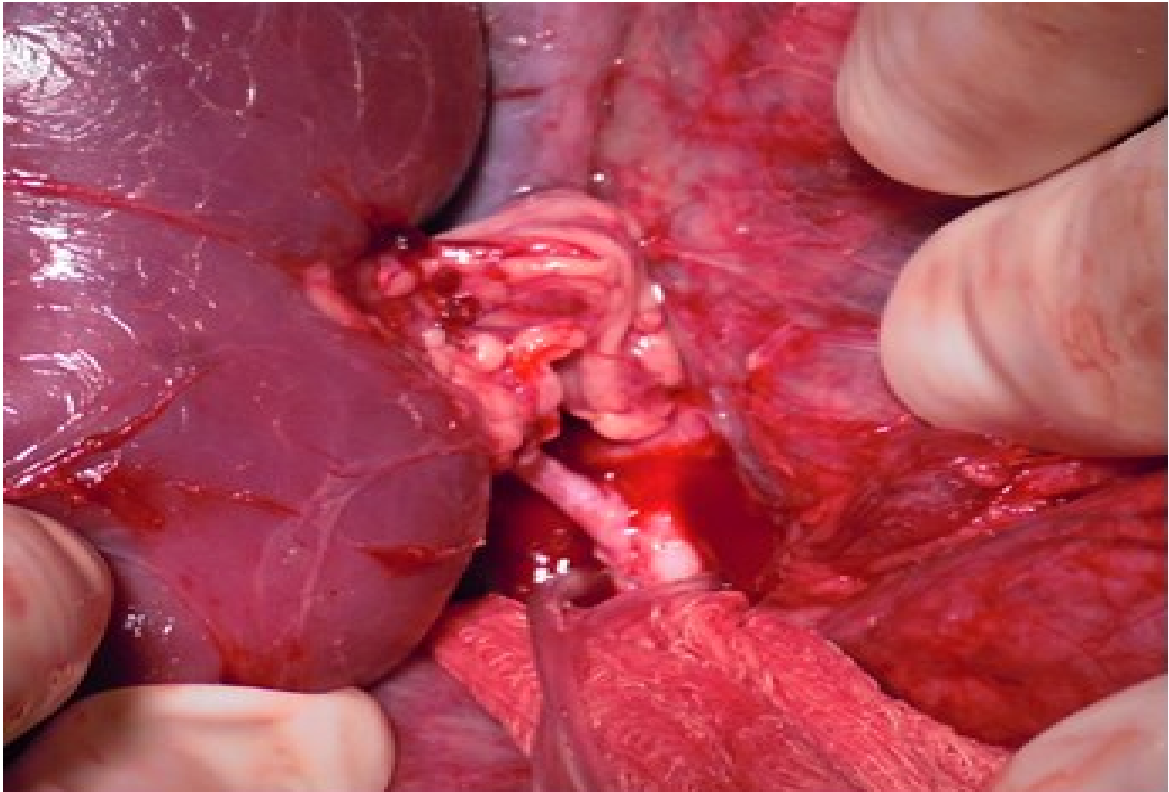
Histopatologické vyšetření bioptických vzorků štěpů bylo provedeno zkušeným patologem, který hodnotil obecně míru poškození nefronu (na základě stupnice uvedené ve výsledcích). Byla hodnocena míra propláchnutí glomerulu, přítomnost mikrotrombů a event. přítomnost akutní tubulární nekrózy. Pro patologa byla studie zaslepena. Ze vzorků žilní krve byla vyhodnocována sérová hladina ury.



Obr. 3 - Retrográdní oxygenová persuflace ledviny



Obr. 4 - Intraarteriální perfúze



Obr. 5 - Stav po opětovné transplantaci štěpu

## 5.2 Výsledky

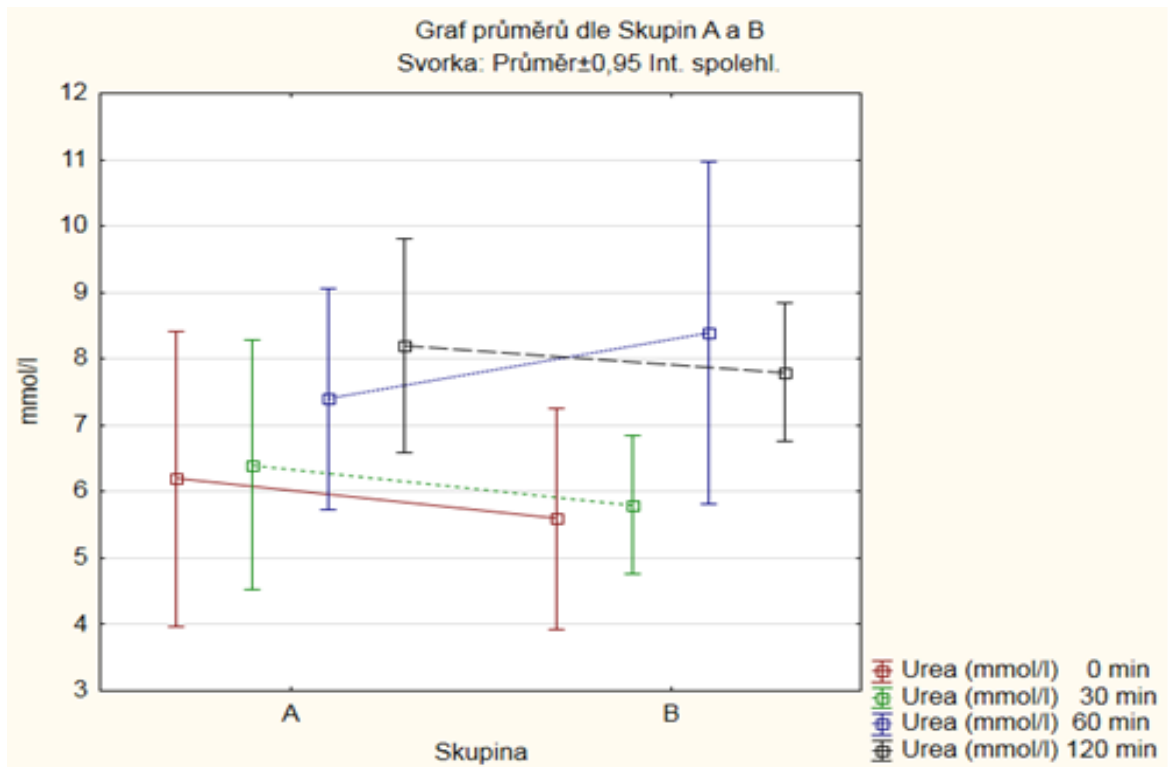
U žádného z prezentovaných experimentálních zvířat se neobjevily technické problémy s perfuzí štěpu či s vlastní transplantací. Ve dvou případech (jeden případ v každé skupině) došlo k horšímu segmentálnímu promytí orgánu při přerušení pólové tepny.

### 5.2.1 Vyhodnocení sérových hladin urey:

Tabulka 6 ukazuje hodnoty urey v krvi odebrané z renální žíly po natransplantování ledviny v jednotlivých intervalech (0, 30, 60, 120 minut).

Číslo zvířete (skupina)	Urea (mmol/l)			
	0 min	30 min	60 min	120 min
1 (A)	4	4	6	7
2 (A)	5	6	6	7
3 (A)	8	8	8	10
4 (A)	8	7	9	9
5 (A)	6	7	8	8
6 (B)	5	5	7	7
7 (B)	7	7	8	9
8 (B)	4	6	12	8
9 (B)	7	6	8	8
10 (B)	5	5	7	7

Tab. 6 - Hladina urey v mmol/l u jednotlivých zvířat v časech 0-120 min.



Graf 1. Hladina urey v mmol/l u jednotlivých zvířat v časech 0-120 min.

Výsledná p hodnota Repeated measure ANOVA testu pro rozdíly mezi skupinami A a B je  $p = 0,843$ , mezi skupinou A a B tedy nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly.

## 5.2.2 Histopatologické vyhodnocení bioptických vzorků:

Tabulka 7 ukazuje vyhodnocení odebraných vzorků patologem:

Vzorky byly hodnoceny dle níže uvedené stupnice 1-4, bylo provedeno celkové zhodnocení kvality parenchymu (přítomnost mikrotrombů, akutní tubulární nekrózy), byla hodnocena míra kvality propláchnutí nefronu.

Stupnice hodnocení kvality

Stupeň 1 ... kompletní promytí, bez erytrocytů v kapilárách, bez mikrotrombů

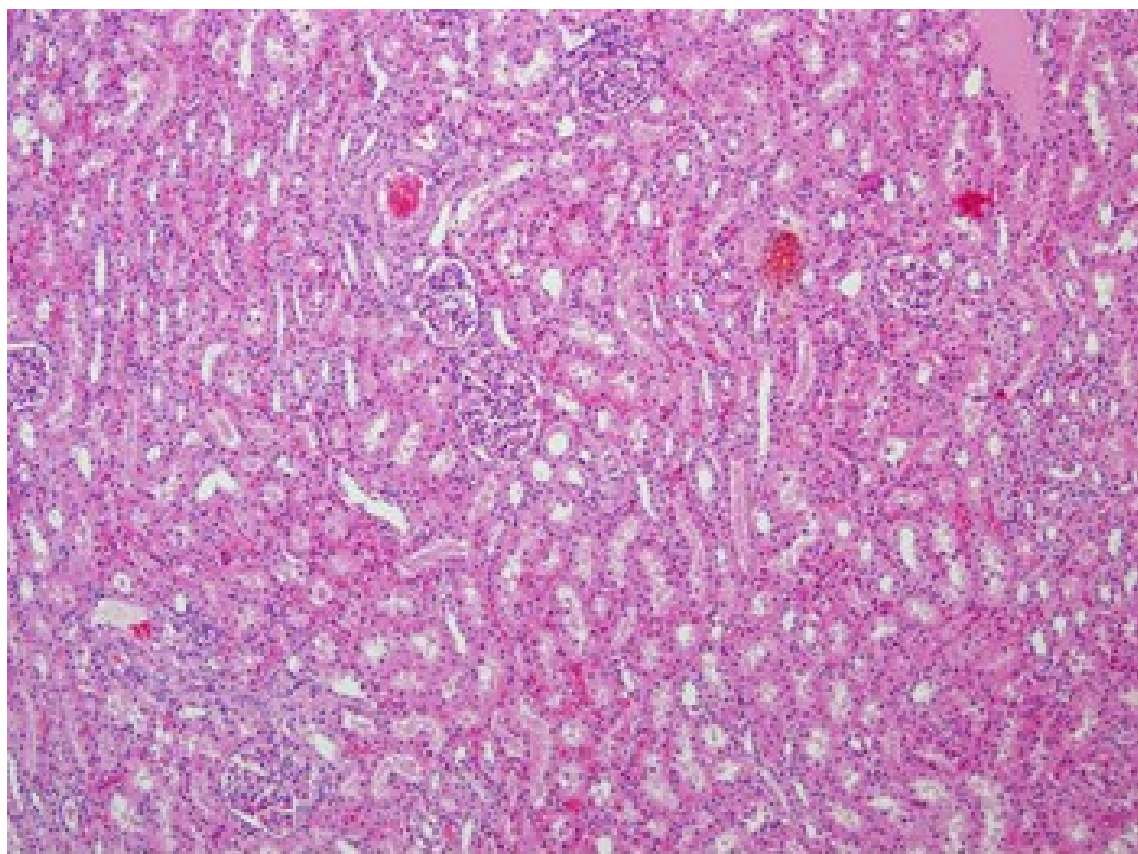
Stupeň 2 ... neúplné promytí, občasné skupiny erytrocytů v kapilárách (zejména glomerulu), občasné mikrotromby

Stupeň 3 ... adekvátně nepromyté ledviny (fyziologický obraz)

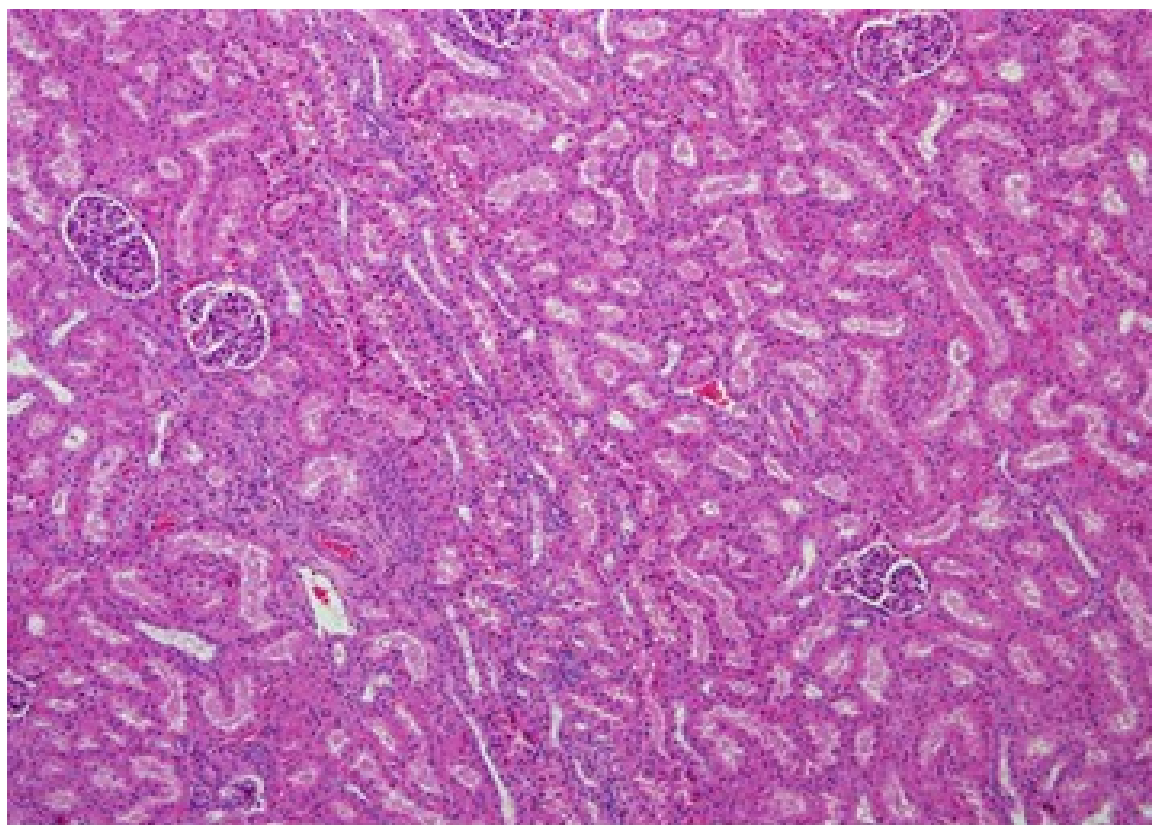
Stupeň 4 ... nepromyté ledviny, přítomnost akutní tubulární nekrózy

Zvíře (skupina) / Vzorek	I	II	III
1 (A)	2	2	3
2 (A)	3	2	2
3 (A)	1	2	1
4 (A)	2	3	2
5 (A)	2	2	3
6 (B)	2	1	3
7 (B)	3	2	2
8 (B)	3	3	2
9 (B)	1	1	2
10 (B)	1	4	3

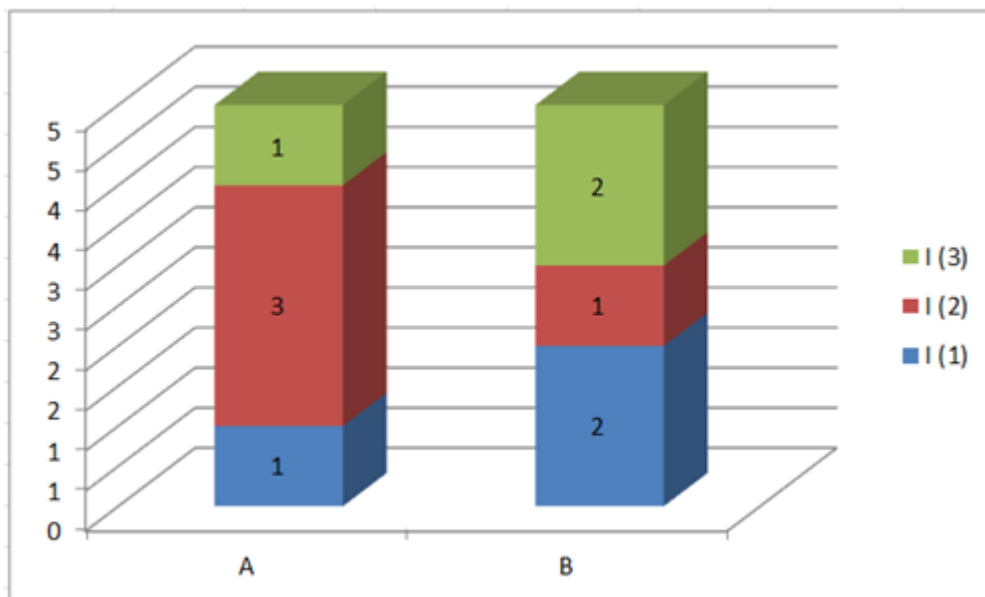
Tab. 7 – Histologické vyhodnocení odebraných vzorků



Obr. 6 - Biopsický vzorek IIIA (stav po transplantaci u skupiny s ROP)

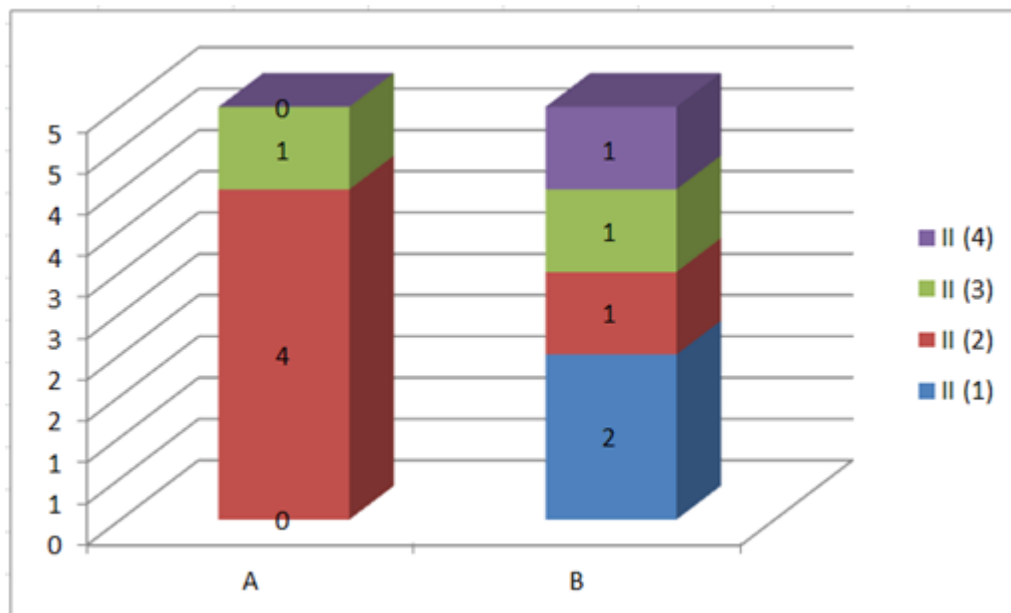


Obr. 7 - Biopsický vzorek IIIB (stav po transplantaci u skupiny s intraarteriální perfúzí)



Graf 2 - Vyjádření kvality propláchnutí ledvin Fisherova exaktního testu pro čas I.

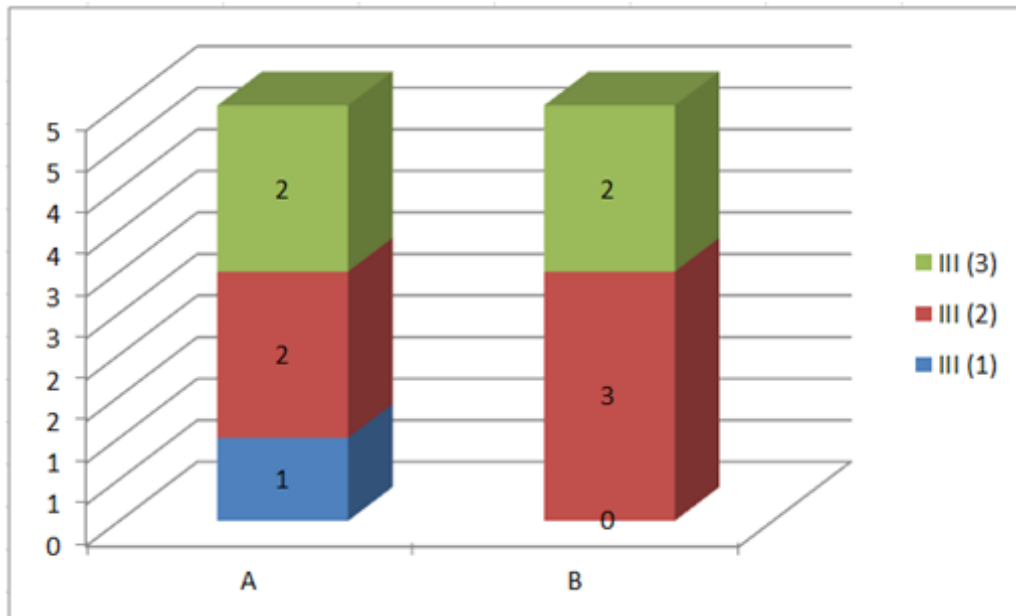
Hodnota signifikance dle Fisherova exaktního testu pro čas I vyšla  $p = 1,00$ , tedy větší než  $0,05$ . Stupeň propláchnutí ledviny 1,2,3, případně 4 se tedy mezi skupinami A a B statisticky významně neliší.



Graf 3 - Vyjádření kvality propláchnutí ledvin Fisherova exaktního testu pro čas II.

Hodnota signifikance dle Fisherova exaktního testu pro čas II vyšla  $p = 1,00$ , tedy větší než  $0,05$ . Stupeň propláchnutí ledviny 1,2,3, případně 4 se tedy mezi skupinami A a B statisticky významně neliší.





Graf 4 -Vyjádření kvality propláchnutí ledvin Fisherova exaktního testu pro čas III.

Hodnota signifikance dle Fisherova exaktního testu pro čas III vyšla  $p = 1,00$ , tedy větší než 0,05. Stupeň propláchnutí ledviny 1,2,3, případně 4 se tedy mezi skupinou A a B statisticky významně neliší.

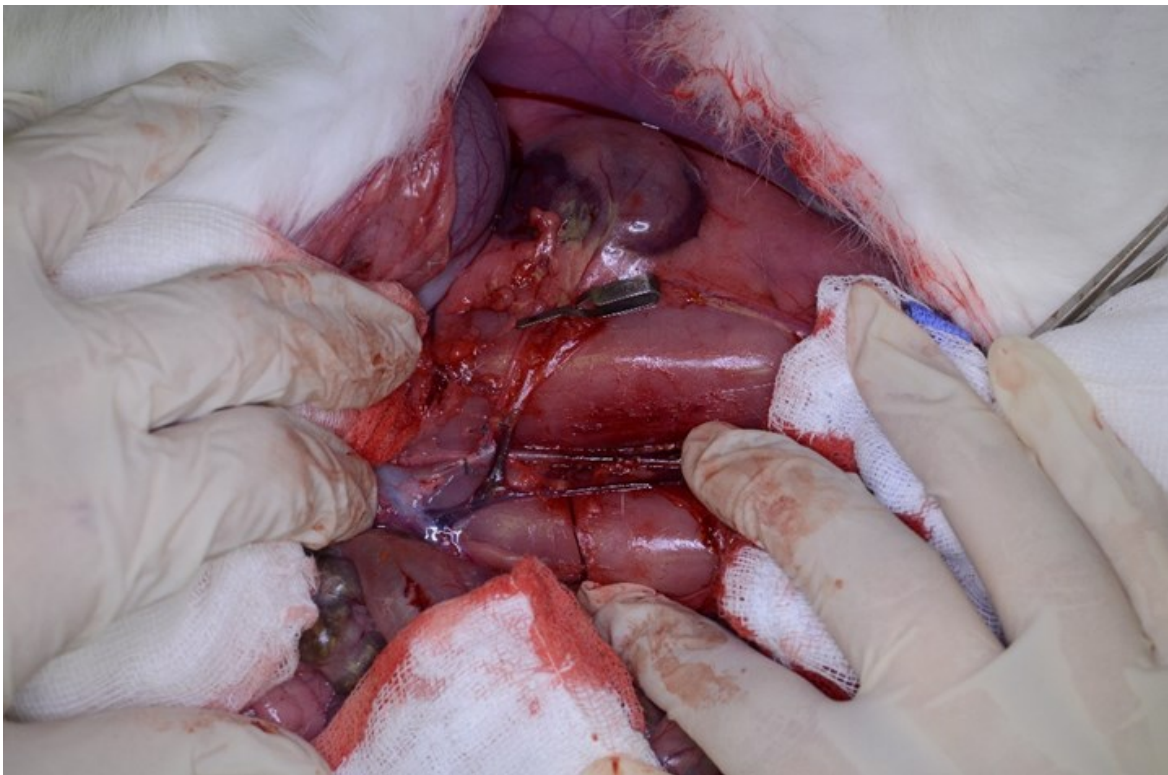
Výsledky prokazují identickou kvalitu štěpů prezervovaných jak klasickou intraarteriální perfuzí, tak retrográdní oxygenovou persufací. Nenalezli jsme signifikantní rozdíly jak v histopatologickém hodnocení odebraných štěpů, tak v hodnotách urey u zvířat po transplantaci daných štěpů. Uvedené výsledky jsou v souladu s literaturou. Nepotvrdili jsme názor některých autorů, že ROP může být dokonce superiorní ve srovnání s klasickou perfuzí event. s „cold storage“ [58]. Prokázali jsme ale bez pochyby, že i prostá ROP dokáže parenchym ochránit. Otázkou podle našeho názoru není nahrazení zvyklé intraarteriální perfuze retrográdní persufací, nabízí se však možnost určité kombinace obou metod.

## 6 Ihned zahájená pulzatilní perfuze – experiment na malém zvířeti

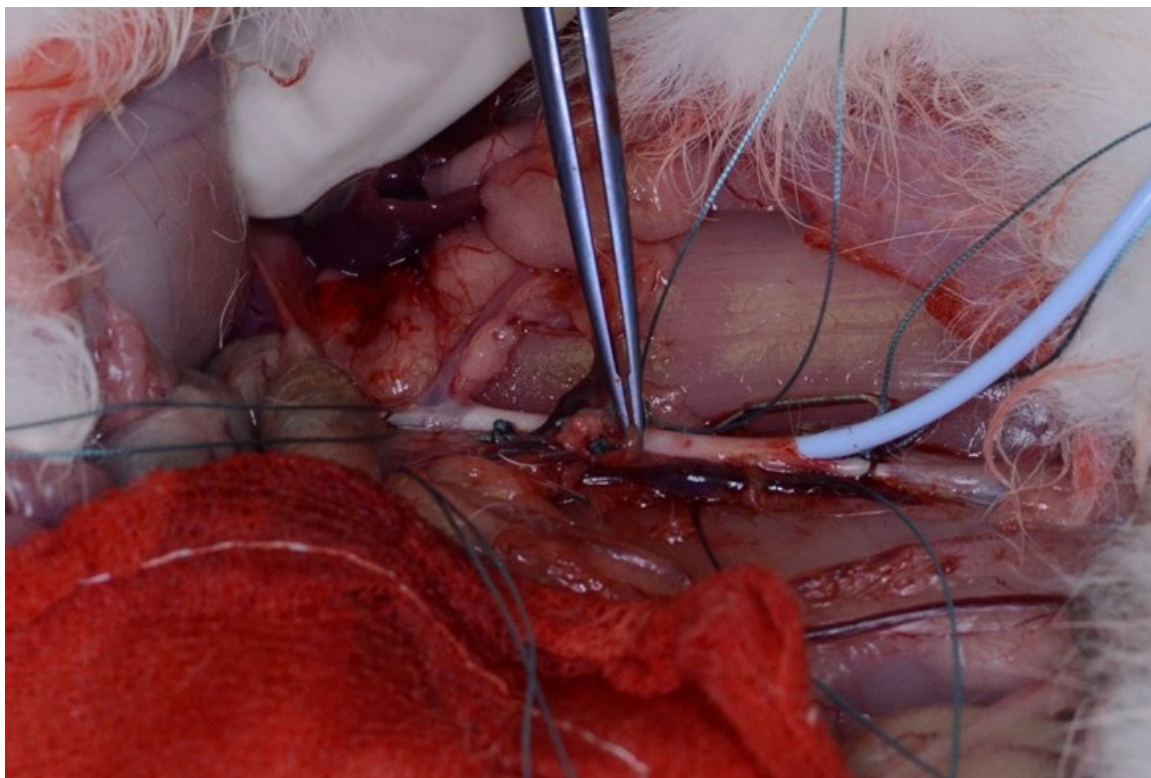
### 6.1 Metodika

První fáze tohoto experimentu byla realizována na malém laboratorním zvířeti (králík domácí). Důvodem byla potřeba ověřit v praxi funkčnost experimentálního perfuzoru a měřících jednotek, k čemuž bylo malé laboratorní zvíře zcela dostačující. Cílem bylo porovnat zejména promytí a zchlazení ledviny v těle dárce.

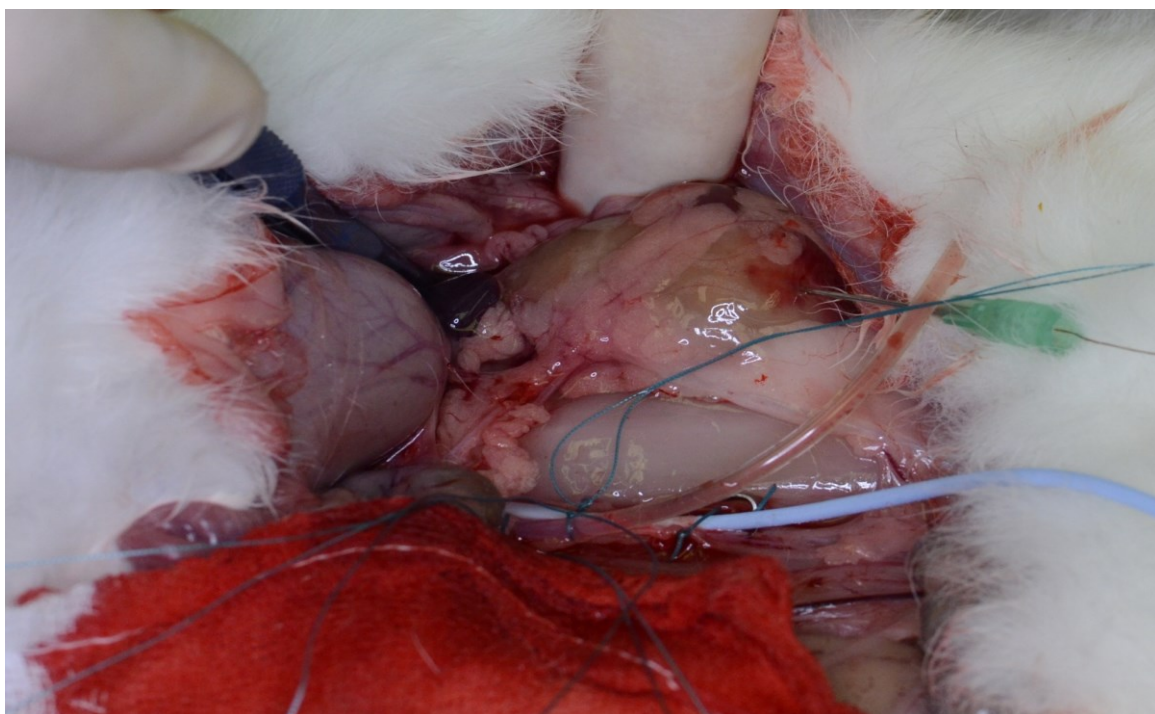
Pracovali jsme opět s 10 experimentálními zvířaty, ta byla rozdělena do dvou skupin po pěti kusech. V obou skupinách bylo zvíře premedikováno (midazolam i.m.), poté uvedeno do celkové anestezie (ketamin i.v.). Byla provedena střední laparotomie, proniknuto do retroperitonea a vypreparována abdominální aorta, dolní dutá žíla a cévní stopka levé ledviny. Ledvinný hilus byl na 30 minut klampován, čímž byla simulována teplá ischemie levé ledviny (obr. 8) – to odpovídá obvyklé hranici maximální délky teplé ischemie v klinické praxi. Poté byl proveden podvaz aorty nad odstupem levostranných ledvinných cév a nad bifurkací, do aorty byl zaveden tenký perfuzní katetr. Identicky byl zaveden katetr do dolní duté žíly k odvádění perfuzátu z ledviny (obr. 9,10).



Obr. 8 - Svorka na ledvinné stopce

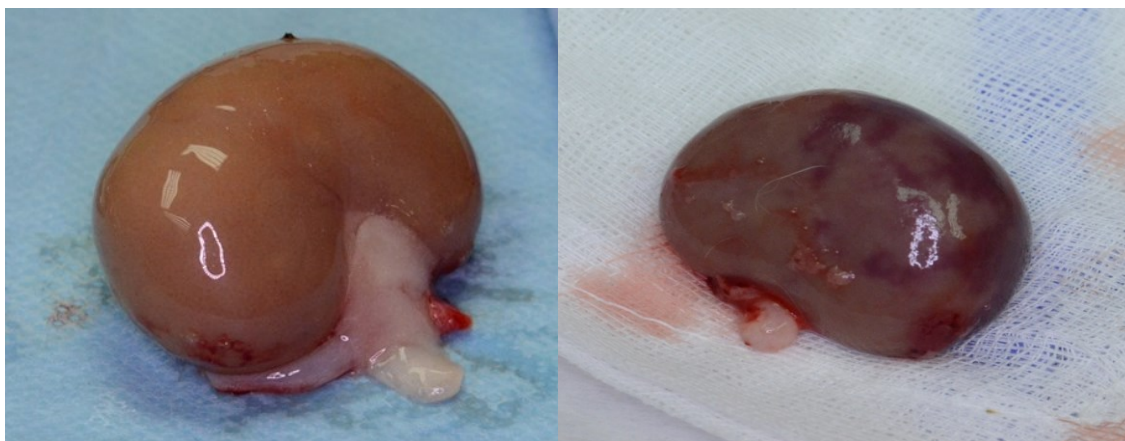


Obr. 9 - Perfuzní katetr v břišní aortě



Obr. 10 - Žilní katetr v dolní duté žíle, teplotní čidlo v parenchymu ledviny

V první skupině (skupina A, N=5) byl štěp promýván zvykle za užití hydrostatického tlaku pomocí vaku zavěšeného ve standardní výšce nad operačním stolem. Ve druhé skupině (skupina B, N=5) byla ledvina promývána za užití přístrojového mechanického perfuzoru za definovaných poměrů. Doba promývání byla u obou skupin 30 minut. Byly měřeny parametry průtoku ledvinou a teplota orgánu pomocí čidla zavedeného do ledvinného parenchymu. Poté bylo zvíře usmrceno pomocí kardioplegického roztoku a ledvina odebrána k histologickému vyšetření (obr. 11). Patologem byla objektivně hodnocena míra promytí ledviny a stupeň poškození parenchymu dle standardizované již výše uvedené stupnice.



Obr. 11 - Explantovaná ledvina, vlevo promytá mechanicky, vpravo hydrostatickým tlakem

Jako parametry kvality prezervace štěpu byla hodnocena teplota ledvinného parenchymu (resp. rychlost jejího poklesu), objem průtoku perfuzního roztoku a kvalita promytí štěpu hodnocena patologem, pro něhož byla studie zaslepena. Byla identicky jako v předchozím experimentu hodnocena míra propláchnutí glomerulu, přítomnost mikrotrombů a event. přítomnost akutní tubulární nekrózy.

Stupeň 1... kompletní promytí, bez erytrocytů v kapilárách, bez mikrotrombů

Stupeň 2... neúplné promytí, občasné skupiny erytrocytů v kapilárách (zejména glomerulu), ojedinělé mikrotromby

Stupeň 3... adekvátně nepromyté ledviny (fyziologický obraz)

Stupeň 4... nepromyté ledviny, přítomnost akutní tubulární nekrózy

Tato klasifikace je na našem pracovišti běžně užívána společně s Remuzziho klasifikací.

## 6.2 Výsledky

V průběhu experimentu nedošlo k technickým obtížím ani k peroperačním komplikacím.

Tabulka 8 popisuje naměřené parametry u jednotlivých zvířat.

Zvíře	Skupina	Průtok max. (ml/min)	Pokles teploty (st. C)	Promytí (1-4)
1	A (kontrolní)	8,7	3,7	3
2	A (kontrolní)	6,9	2,4	3
3	A (kontrolní)	1,26	3,46	3
4	A (kontrolní)	5,7	3,3	3
5	A (kontrolní)	8,5	4	3
6	B (mech. perfuze)	14,15	19,53	1
7	B (mech. perfuze)	12,08	17	2
8	B (mech. perfuze)	9,74	14,3	1
9	B (mech. perfuze)	15,25	20	2
10	B (mech. perfuze)	13,82	16,9	2

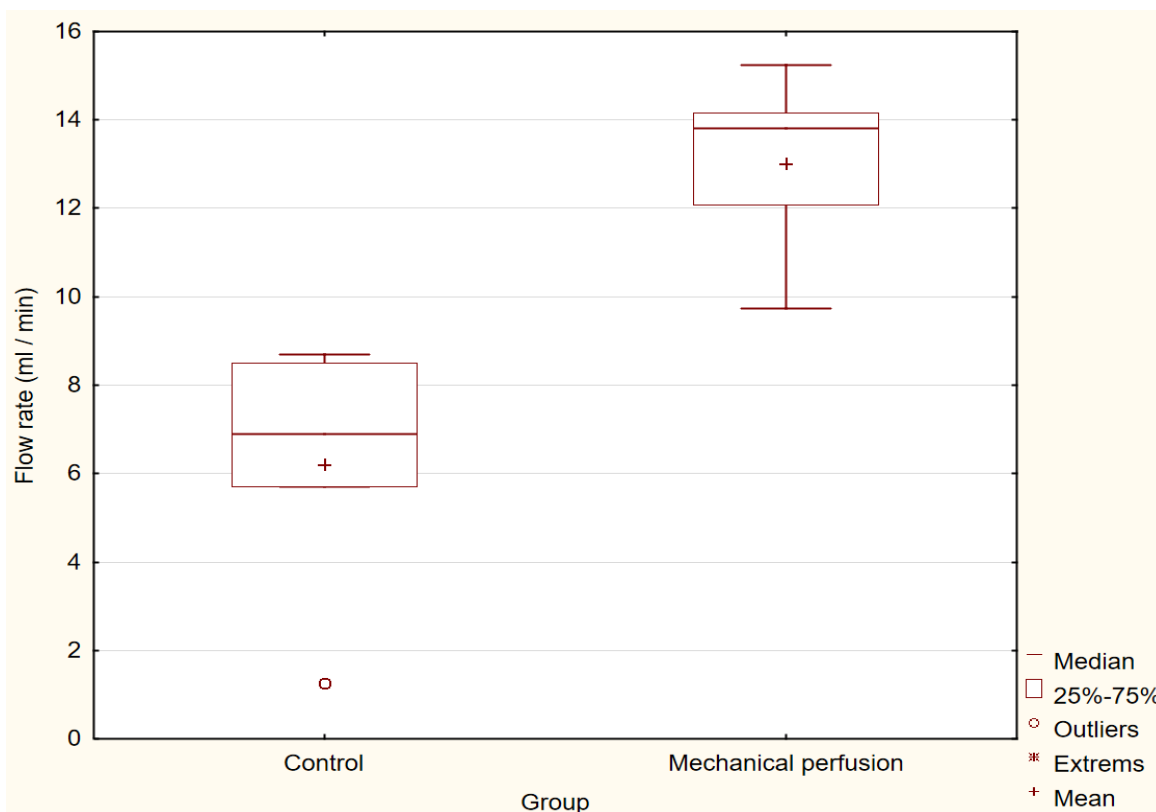
Tab. 8 - Hodnocené parametry u jednotlivých zvířat

Tabulka 9 popisuje statistické zhodnocení jednotlivých veličin.

	Skupina	N	Průměr	SD	Medián	Min	Max	t-test
Průtok max.	A (kontrolní)	5	6,212	3,028	6,900	1,260	8,700	p = 0,004
	B(mech.perf.)	5	13,008	2,152	13,820	9,740	15,250	
Snižení teploty	A(kontrolní)	5	3,372	0,604	3,460	2,400	4,000	p <0,001
	B(mech.perf.)	5	17,546	2,303	17,000	14,300	20,000	
Promytí	A (kontrolní)	5	3,000	0,000	3,000	3,000	3,000	p = 0,005
	B(mech.perf.)	5	1,600	0,548	2,000	1,000	2,000	

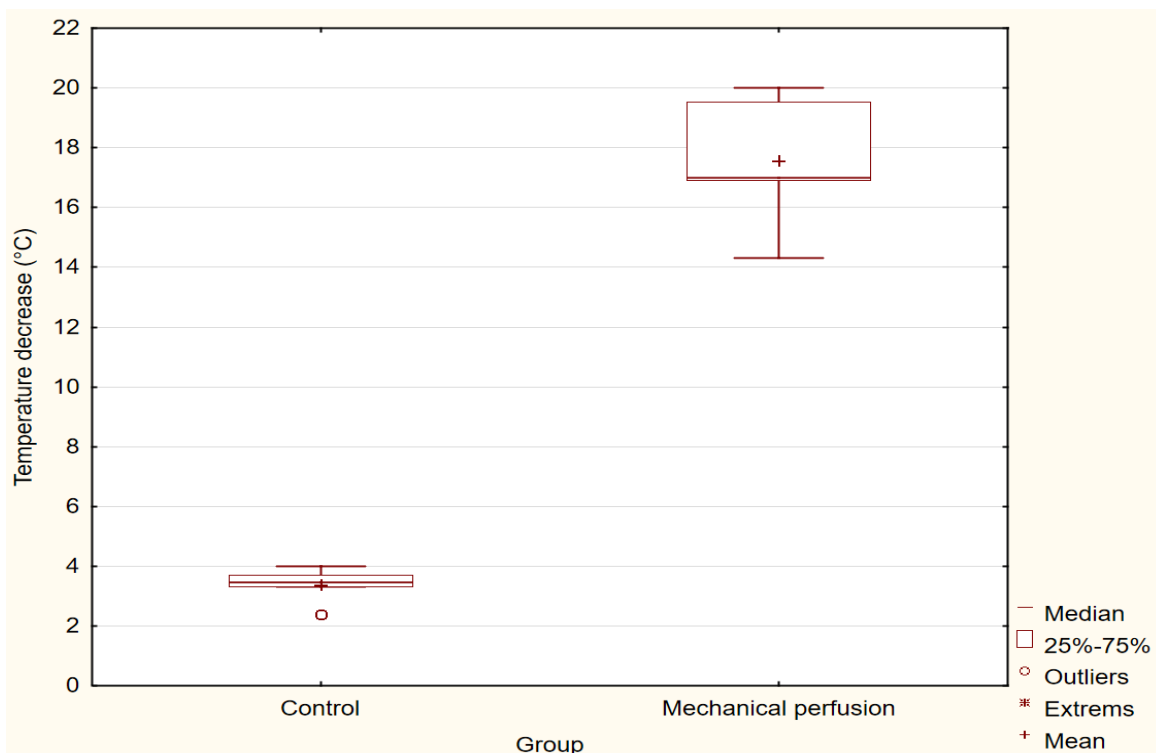
Tab. 9 – Statistické vyhodnocení naměřených hodnot

I u takto malého souboru zvířat jsme našli jasný signifikantní rozdíl v maximálním průtoku, kdy u skupiny mechanicky perfundovaných zvířat byl max. průtok signifikantně vyšší než u kontrolní skupiny při užití pouze hydrostatického tlaku viz graf 5 ( $p=0,004$ ).

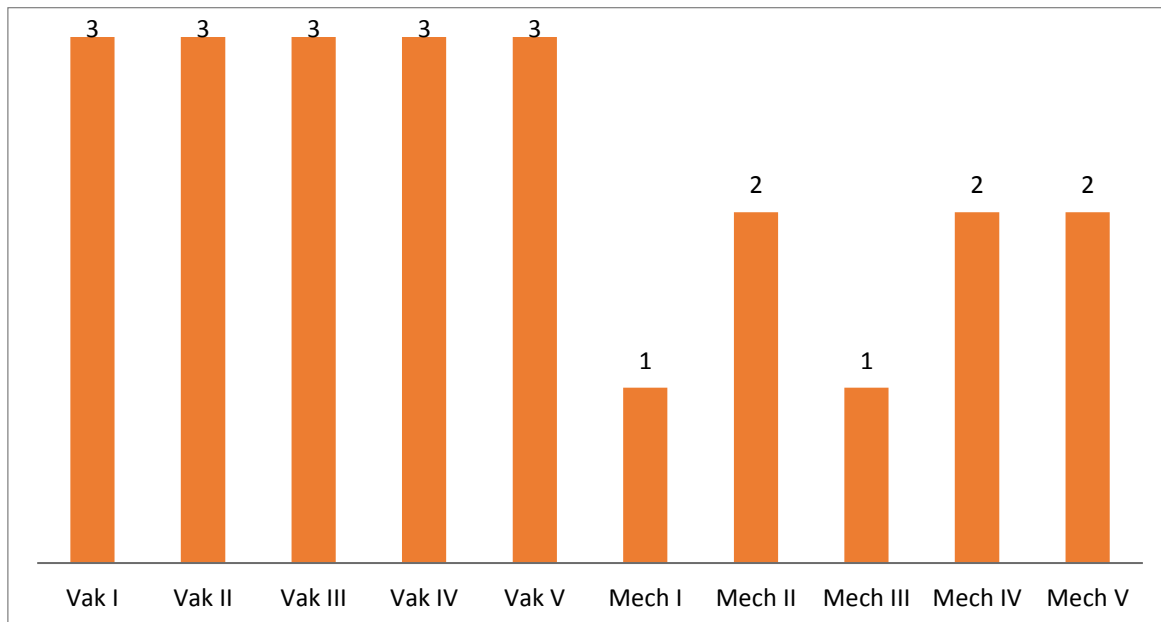


Graf 5. - Maximální průtok v ml/min u jednotlivých skupin

Stejně tak jsme pozorovali statisticky významný rozdíl v poklesu teploty štěpu ve prospěch pulzatilní perfuze viz graf 6 ( $p < 0,001$ ).



Graf 6. - Pokles teploty ve st. C v průběhu perfuze u jednotlivých skupin



Graf 7. - Histologické hodnocení proplachu štěpů dle škály 1-4

Statisticky významné bylo i kvalitativní histopatologické hodnocení proplachu štěpů opět ve prospěch pulzatilní perfuze ve skupině B ( $p = 0,005$ ).

Výsledky tedy ukazují jak statisticky významné rychlejší zchlazení ledvinných štěpů u přístrojové perfuze, tak i statisticky významně vyšší průtok perfuzního roztoku ledvinou za

minutu. Za stejnou časovou jednotku je tak orgán propláchnut větším množstvím perfuzátu. Dosud užívaná metoda pracuje s chladným perfuzátem, který se však již při podávání do těla zemřelého ohřívá od okolní pokojové teploty. Díky zapojení chladiče média v našem perfuzoru až těsně před vstup do těla dárce jsme mohli dosáhnout velmi nízké teploty perfuzátu kolem 4 st. C. Proto je následné zchlazení orgánu účinnější.

Rovněž objektivní hodnocení kvality propláchnutí štěpu vyznívá jednoznačně pro mechanickou pulzatilní perfuzi.

Prokázali jsme pomocí histologického vyšetření, že promytí ledviny pomocí mechanického perfuzoru v těle zvířete je výrazně lepší než při použití hydrostatického tlaku. Na histologických preparátech nebyly v glomerulech přítomny krevní elementy u ledviny promyté perfuzorem. Zdá se, že řízená mechanická perfuze je schopna z ledviny odstranit i drobné již vytvořené mikrotromby a zachovat maximum cévního řečiště pro obnovení krevního průtoku.



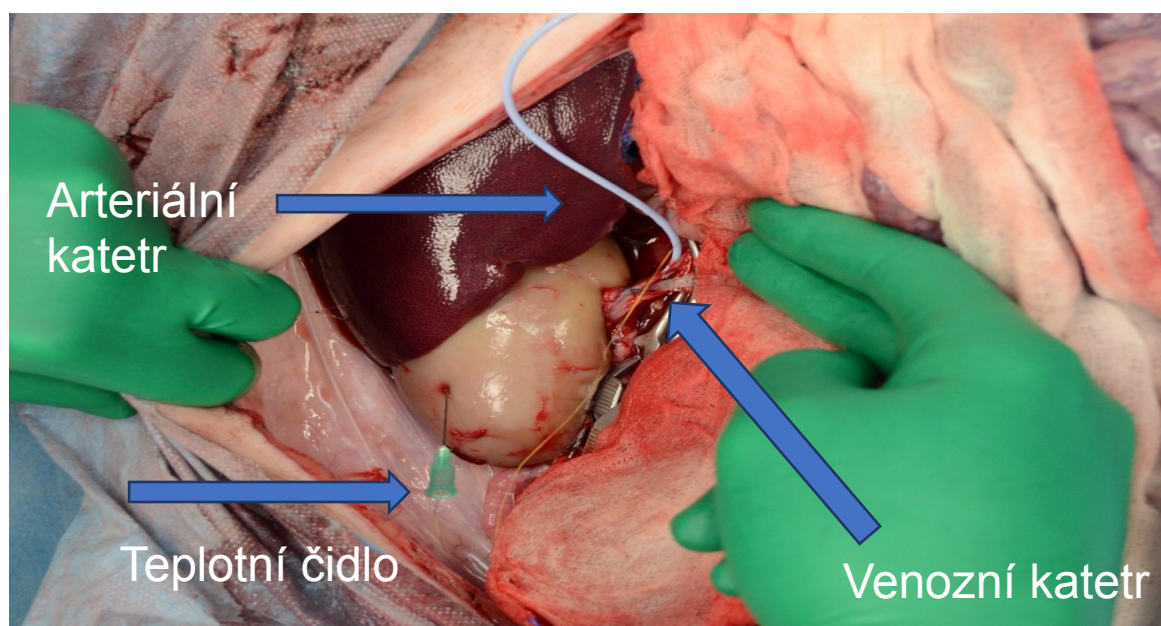
## 7 Experiment na velkém zvířeti

### 7.1 Metodika

Po prvotním ověření naší hypotézy a funkčnosti experimentálního perfuzoru v pokusu na malém zvířeti, jsme jako další model vybrali prasce domácí. Důvodem byla větší velikost ledvin a cévních struktur a tím pádem snazší kanylace renálních cév. Zvířata jsme opět rozdělili do dvou skupin, celkem bylo použito 7 zvířat.

Po premedikaci (Stresnil i.m.) a následném uvedení do celkové anestezie (Propofol 2 % i.v.) bylo zvíře orotracheálně intubováno a ponecháno na umělé plicní ventilaci. Anestezie byla vedena jako totální intravenózní užitím 2 % Propofolu podávaného kontinuálně. K analgezii byl užit Nalbufin 1 % rovněž i.v. kontinuálně s eventuálním bolusovým navýšením dávky dle potřeby.

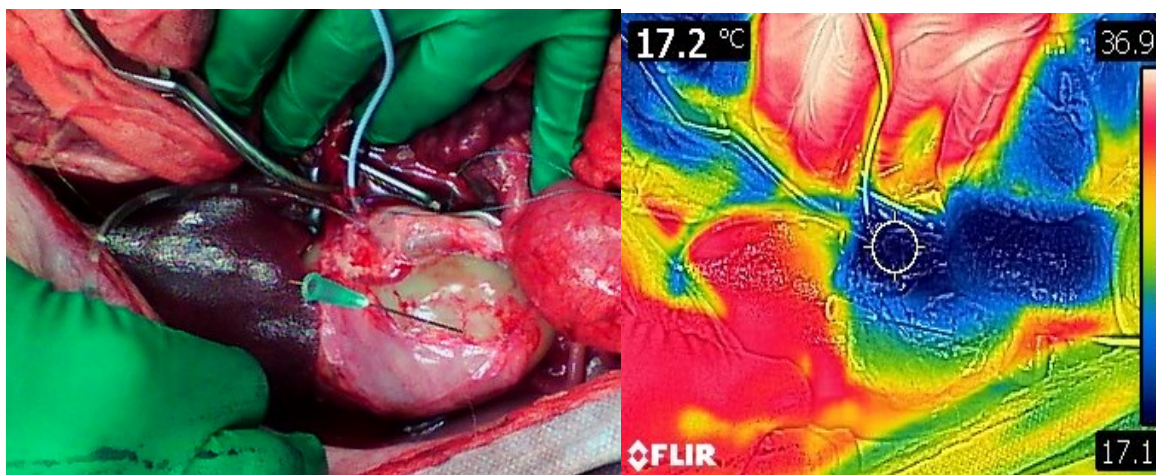
Po zvyklé přípravě operačního pole byla vedena kompletní střední laparotomie, vypreparován oboustranně ledvinový hilus a průběh ureteru. Podle příhodnější cévní anatomie byla zvolena ledvina k provedení vlastního experimentu. Často bylo přítomno zdvojení renální žíly, které by výrazně ztížilo zavedení drenážního katetru k odvodu perfuzátu. Na straně zvolené k experimentu byly poté nasazeny cévní svorky na renální tepnu co nejbližší k odstupu z abdominální aorty a na renální žílu před soutokem se suprarenálními žilami a žilními spojkami z retroperitonea. Cílem bylo zabránit pronikání perfuzátu do žilního řečiště zvířete a tím snížení rizika tekutinového přetížení a iontového rozvratu. Svorky byly ponechány po dobu 30 minut k simulaci délky teplé ischemie, opět ve shodě s maximální délkou trvání užívanou v klinické praxi. V této době byl ještě do vypreparovaného a přerušeno ureteru zaveden katetr k měření diurézy. Po uplynutí doby simulace teplé ischemie, byla provedena příčná arteriotomie a zaveden perfúzní katetr do lumen a. renalis. Zde byl fixován připravenou ligaturou. Identicky byl umístěn drenážní katetr do v. renalis. Poté byl zahájen proplach ledviny (obr. 12).



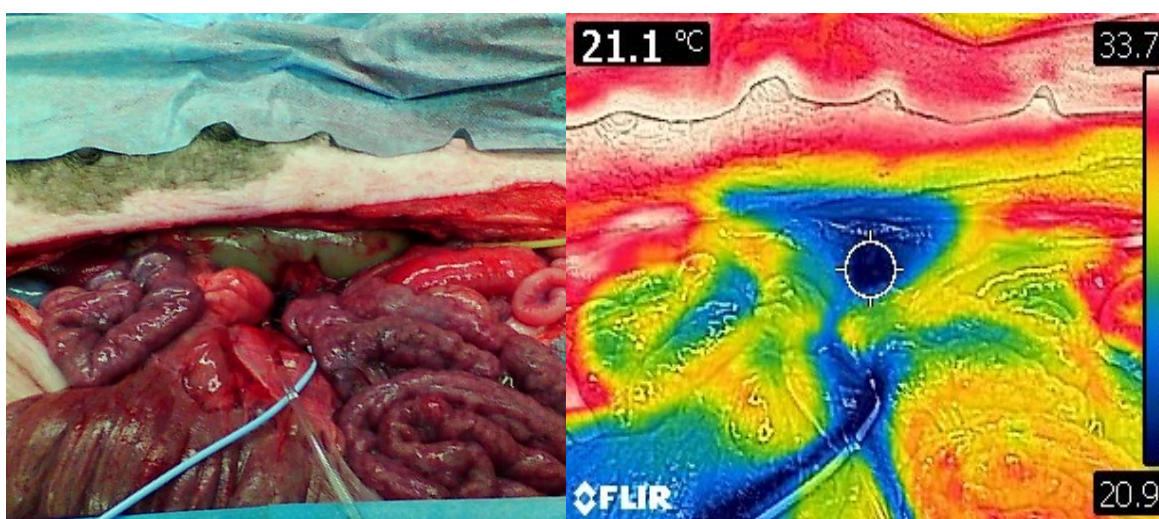
Obr. 12 – In-situ perfuze pravé ledviny u prasce domácího

V první skupině (skupina A, N=3) bylo promytí provedeno shodně s klinickou praxí použitím vaku zavěšeného do výše 1 m nad operačním stolem. Tím byl generován hydrostatický tlak cca 73,5 torr. Vak byl uskladněn v chladničce při teplotě 5 stupňů Celsia. Ve druhé skupině (skupina B, N=4) byl k proplachu ledviny opět užit mechanický perfuzor s pulzatickým režimem toku. Perfuzát před vstupem do těla zvířete procházel chladičem, ve kterém měl na výstupu teplotu + 4 stupně Celsia. Perfuzor byl ovládán pomocí počítačové řídicí jednotky. Hlavním parametrem, podle kterého jsme perfuzi řídili, byl průtok ledvinou. Zprvu jsme průtok udržovali nižší (3-6 ml/min) a postupně jej zvyšovali (14-16 ml/min) v závislosti na odezvě promývaného orgánu, zejména na úrovni tlaku v cévním řečišti ledviny.

V obou případech trvalo promývání 1 hodinu. Po tuto dobu byly zaznamenávány hodnoty průtoku a tlaku v perfuzním katetru umístěném v renální tepně. Teplotním čidlem zavedeným do parenchymu ledviny byla snímána teplota uvnitř orgánu. Teplota na povrchu byla snímána termokamerou (obr. 13, 14).

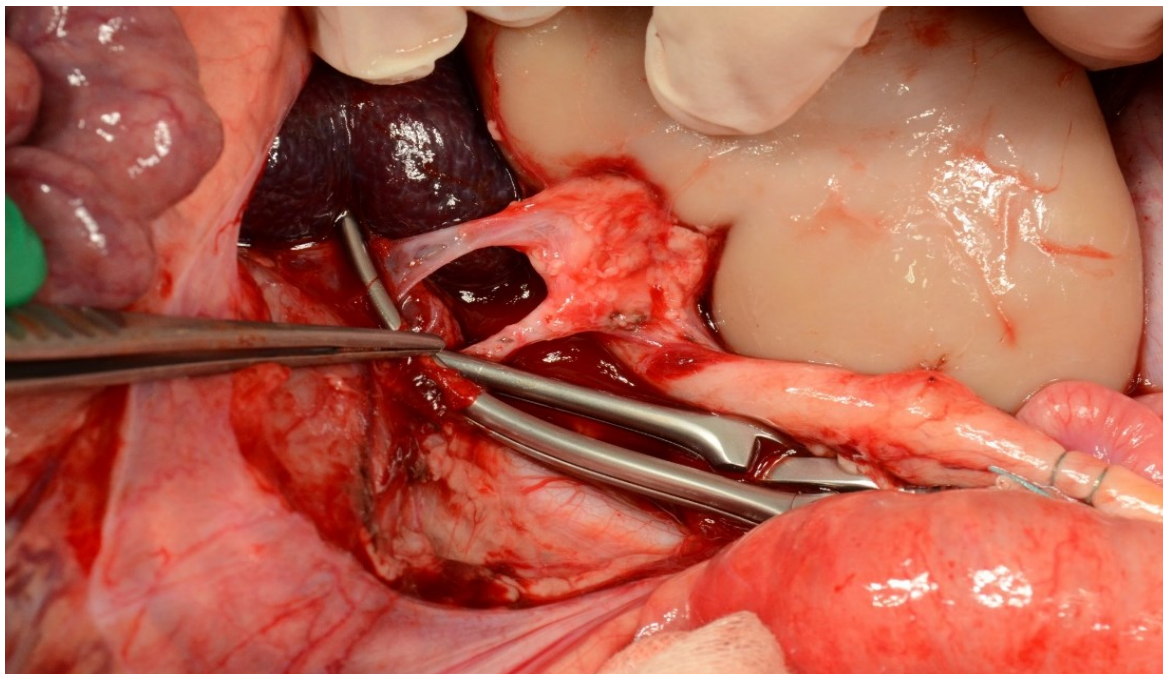


Obr. 13 – Snímání teploty perfundované ledviny termokamerou



Obr. 14 – Snímání teploty perfundované ledviny termokamerou

Na konci promývání byl odebrán první histologický vzorek (I) za pomoci klínové excize z okraje ledviny, místo odběru bylo přesito jednotlivými polypropylenovými stehy. Katetry z renálních cév byly odstraněny a arterio- a venotomie uzavřena pokračující cévní suturou polypropylenovým stehem 6/0 (obr. 15).



Obr. 15 – Vypreparovaný hilus levé ledviny s cévní svorkou



Obr. 16 – Ledvina po obnovení průtoku krve, do močovodu zavedený katetr

Následně došlo k sejmutí cévních svorek a obnovení průtoku krve ledvinou (obr. 16). Ihned nato byla provedena kontralaterální nefrektomie. Zvíře bylo ponecháno v pokračující celkové anestezii a ventilované. Laparotomie byla uzavřena a katetr z ureteru ponechané ledviny byl vyveden v jejím distálním pólu a napojen na sběrný vak s měřicí škálou. Sledování laboratorních hodnot a diurézy probíhalo po dobu 6 hodin. Na konci experimentu bylo zvíře usmrceno kardioplegickým roztokem KCl a odebrána ledvina k histologickému vyšetření (vzorek II).

Sledované laboratorní hodnoty z moči a séra byly stanoveny nejprve po úvodu do anestezie a dále na konci 1., 3. a 6. hodiny po obnovení průtoku ledvinou. Dále byl zaznamenán objem moči na konci 6. hodiny. V séru byly stanovovány  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , Urea, Kreatinin, stejně tak v moči. Ve všech vzorcích séra byla stanovena hladina lipokalinu asociovaného s gelatinázou neutrofilů – neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL), stejně jako pi-GST (pi-glutathion-S-transferase) jako markerů poškození ledvinného parenchymu. Tento marker byl též stanoven v moči.

Histologické vyšetření bylo shodné jako u prvního experimentu, pro patologa byly vzorky zaslepeny. Hodnocení bylo opět provedeno na 4 stupňové škále.

V průběhu experimentu nedošlo k technickým obtížím ani k peroperačním komplikacím.

## 7.2 Výsledky

V následujících tabulkách a grafech jsou znázorněny naměřené hodnoty z průběhu perfuze ledvin u jednotlivých zvířat, naměřené laboratorní hodnoty a jejich statistické zhodnocení.

Statistické zpracování bylo provedeno v software STATISTICA 10 (Statsoft, USA). Všechny testy byly provedeny na hladině spolehlivosti 5 %. Pro srovnání různých veličin u dvou skupin byl použit dvou výběrový t test. Pro srovnání veličin na začátku a na konci studie mezi dvěma skupinami byl spočten rozdíl mezi posledním a prvním měřením a na ten aplikován dvou výběrový t test. Grafické porovnání bylo provedeno pomocí bodových a spojnicových grafů.

### 7.2.1 Srovnání maximálního a středního průtoku, poklesu teploty a diurézy mezi skupinami A a B u pokusných zvířat

#### 7.2.1.1 Vstupní data

K dispozici byly od skupiny A tři měření a od skupiny B čtyři měření parametrů průtok maximální (maximální průtok ledvinou), střední průtok, pokles teploty a diuréza viz následující tabulka č. 10.

	Skupina	Diuréza celkem [ml]	Max. průtok [ml/min]	Střední průtok [ml/min]	Teplota začátek [°C]	Teplota konec [°C]	Pokles teploty [°C]
<b>A1</b>	A	20	8.5		31.2	24	7.2
<b>A2</b>	A	20	9.4		29.9	26	3.9
<b>A3</b>	A	100	8.4		32.1	23.5	8.6
<b>B1</b>	B	0	17.6	11.7	31.9	23.8	8.1
<b>B2</b>	B	100	15.6	11.9	29.2	18.5	10.7
<b>B3</b>	B	250	25.4	16.8	32.3	19.1	13.2
<b>B4</b>	B	0	20.3	15.0	27.4	17.5	9.9

Tab. 10 – Naměřené veličiny u skupiny A a B

#### 7.2.1.2 Srovnání měřených parametrů mezi skupinami A a B

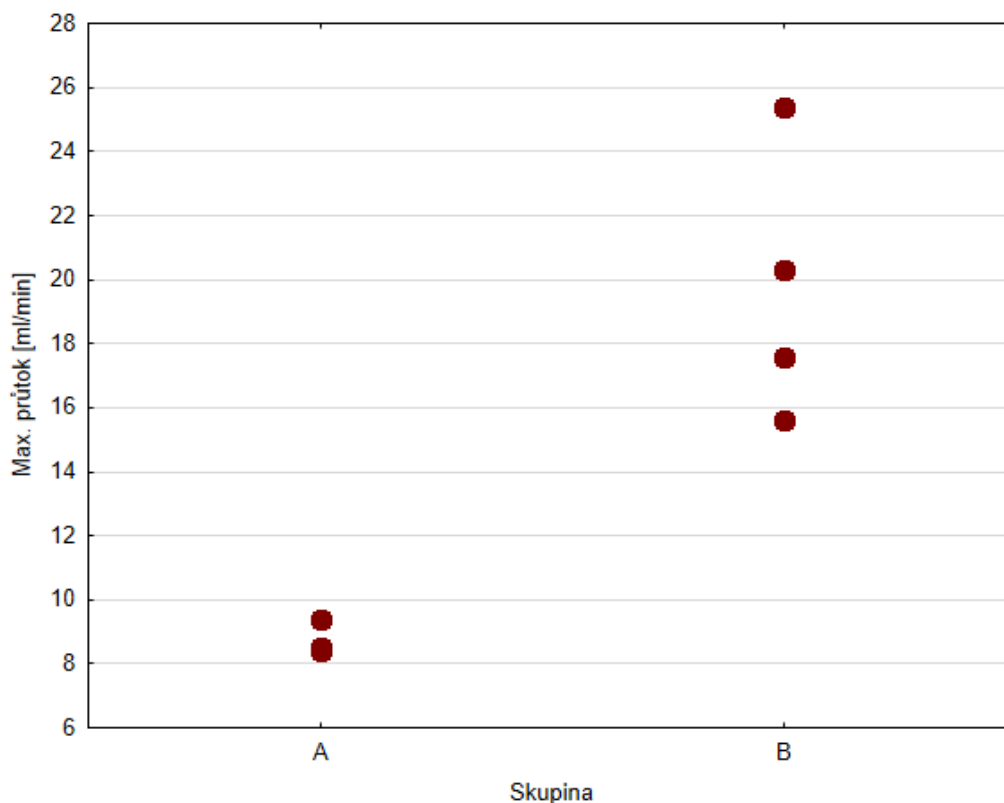
Pro srovnání parametrů průtok max., pokles teploty, průtok maximální u A se středním průtokem skupiny B a diurézy byl kromě standardních popisných statistik průměr, SD, medián, min. a max. použit dvou výběrový t test (two sample t test). Metoda testuje nulovou hypotézu, že mezi oběma skupinami není rozdíl oproti alternativní hypotéze, že se obě skupiny v rámci daného parametru významně liší. Je-li hodnota významnosti v posledním sloupci tabulky menší než 0.05, hovoříme o statisticky významné rozdílnosti mezi skupinami.

	Skupina	N	Průměr	SD	Medián	Min	Max	t-test
Průtok max	A	3	8.767	0.551	8.5	8.4	9.4	p = 0.007
	B	4	19.725	4.245	19.9	15.6	25.4	
Pokles teploty	A	3	6.567	2.413	7.2	3.9	8.6	p = 0.071
	B	4	10.475	2.117	10.3	8.1	13.2	
Průtok max. u A. střední u B	A	3	8.767	0.551	8.5	8.4	9.4	p = 0.019
	B	4	13.850	2.480	13.5	11.7	16.8	
Diuréza celkem	A	3	46.667	46.188	20	20	100	p = 0.602
	B	4	87.500	118.145	50	0	250	

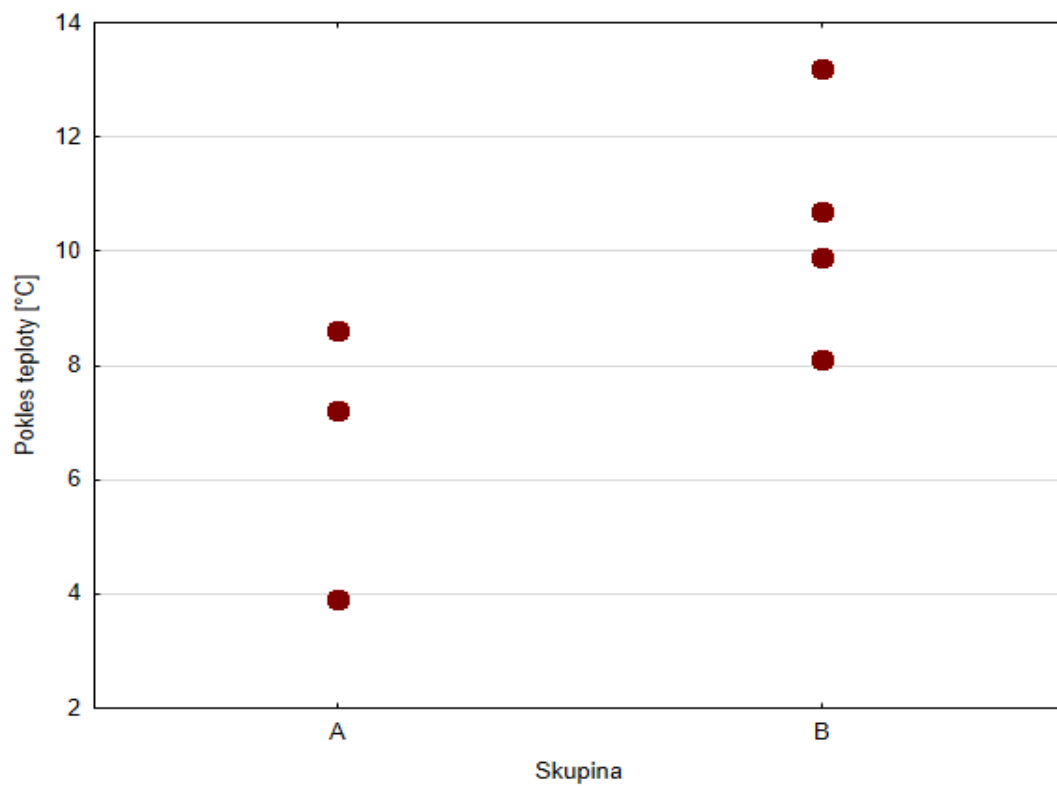
Tab. 11 – Statistické vyhodnocení naměřených veličin

Z uvedené tabulky popisných statistik a p hodnot dvou výběrových t testů plyne, že se oba parametry týkající se průtoku statisticky významně liší, přičemž u obou testů dopadla lépe skupina B. Pokles teploty ani diuréza se statisticky významně nelišily u jednotlivých skupin.

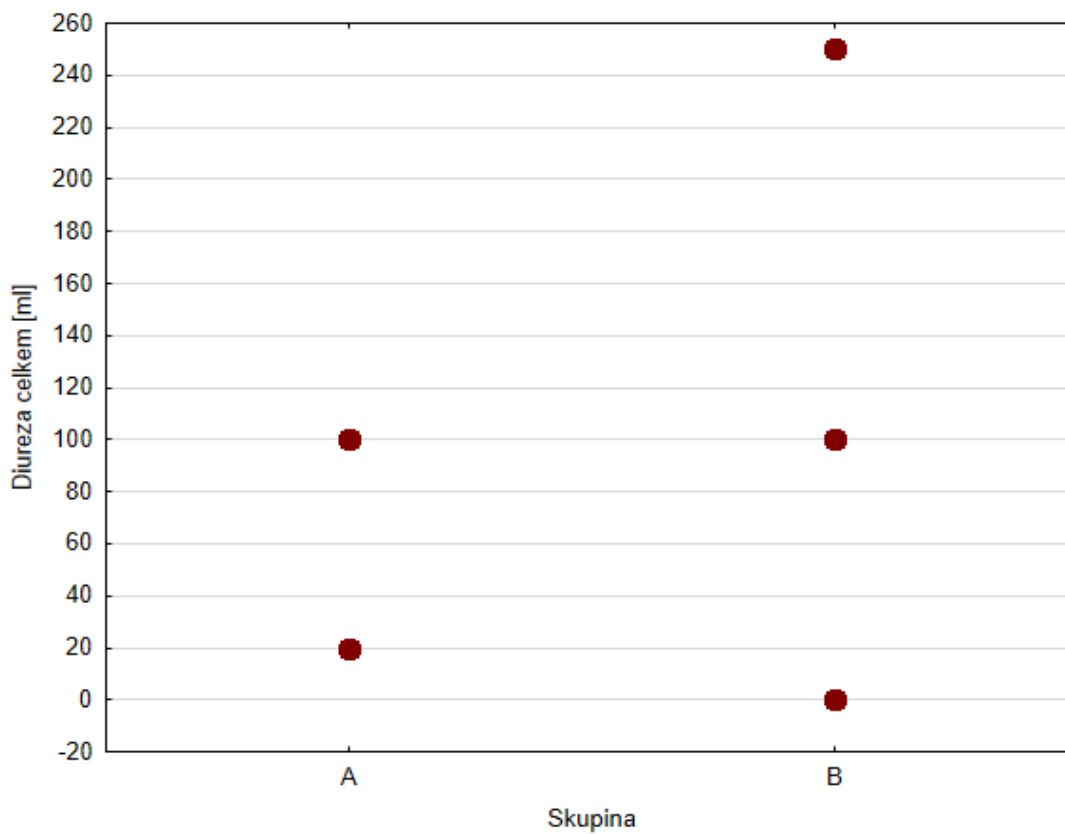
Grafické znázornění parametrů maximálního průtoku a pokles teploty bylo provedeno pomocí bodových grafů.



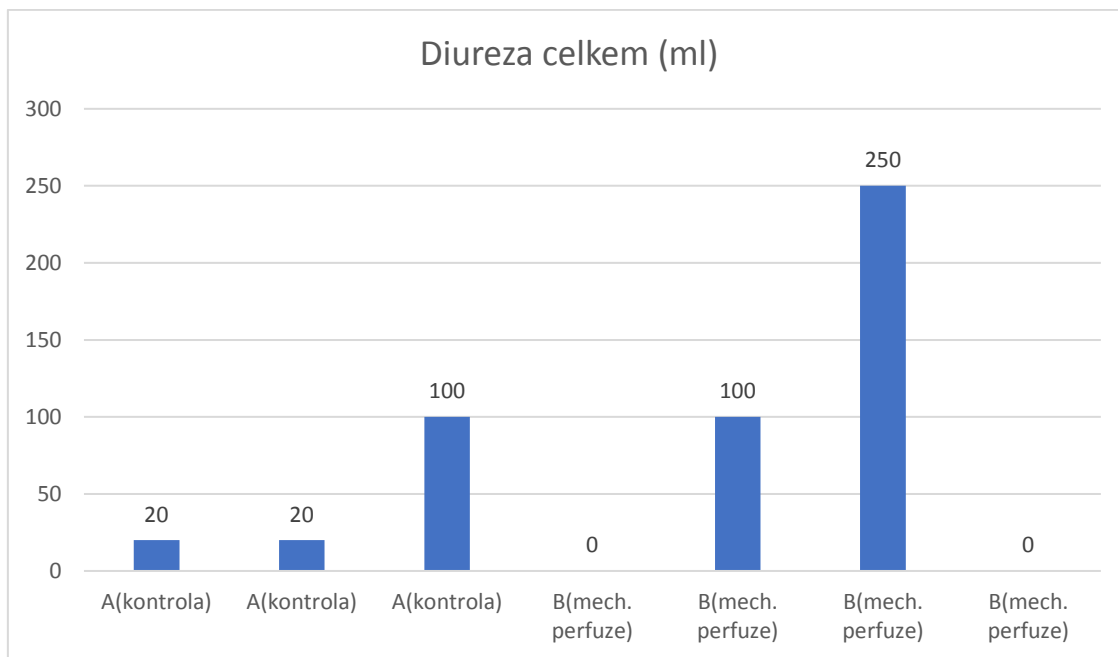
Graf 8 – Porovnání maximálního průtoku v obou skupinách (ml/min)



Graf 9 – Porovnání poklesu teploty v obou skupinách (st. C)



Graf 10 – Porovnání diurezy po obnovení průtoku ledvinou mezi oběma skupinami (ml)



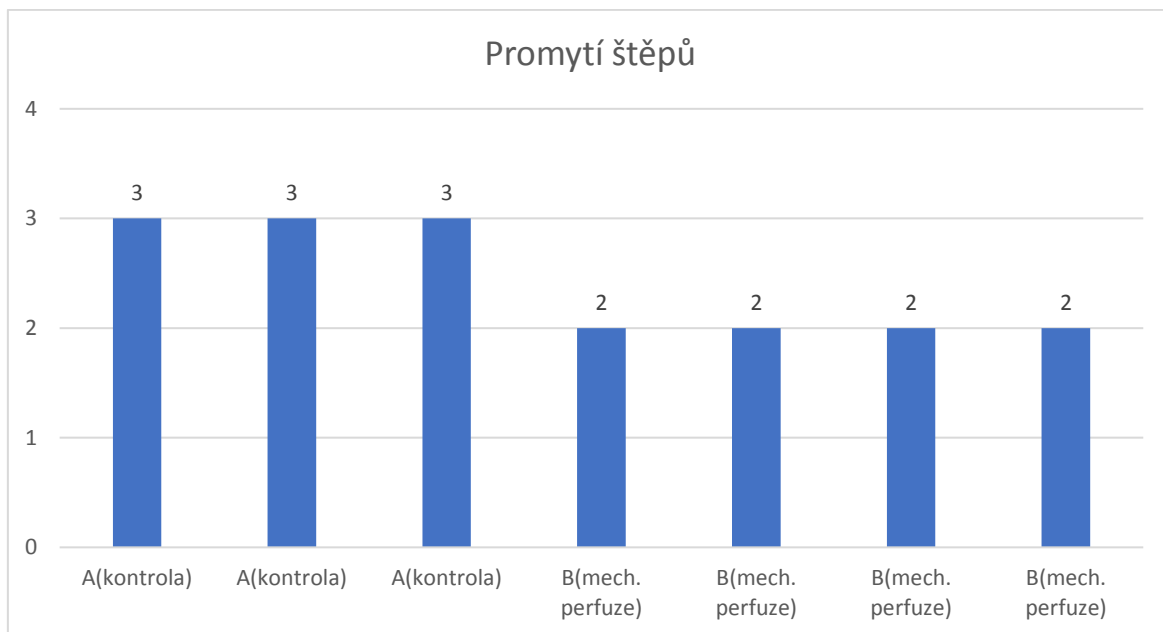
Graf 11 - Porovnání diurezy po obnovení průtoku ledvinou mezi oběma skupinami (ml)

### 7.2.2 Srovnání histologického vyšetření mezi skupinami A a B

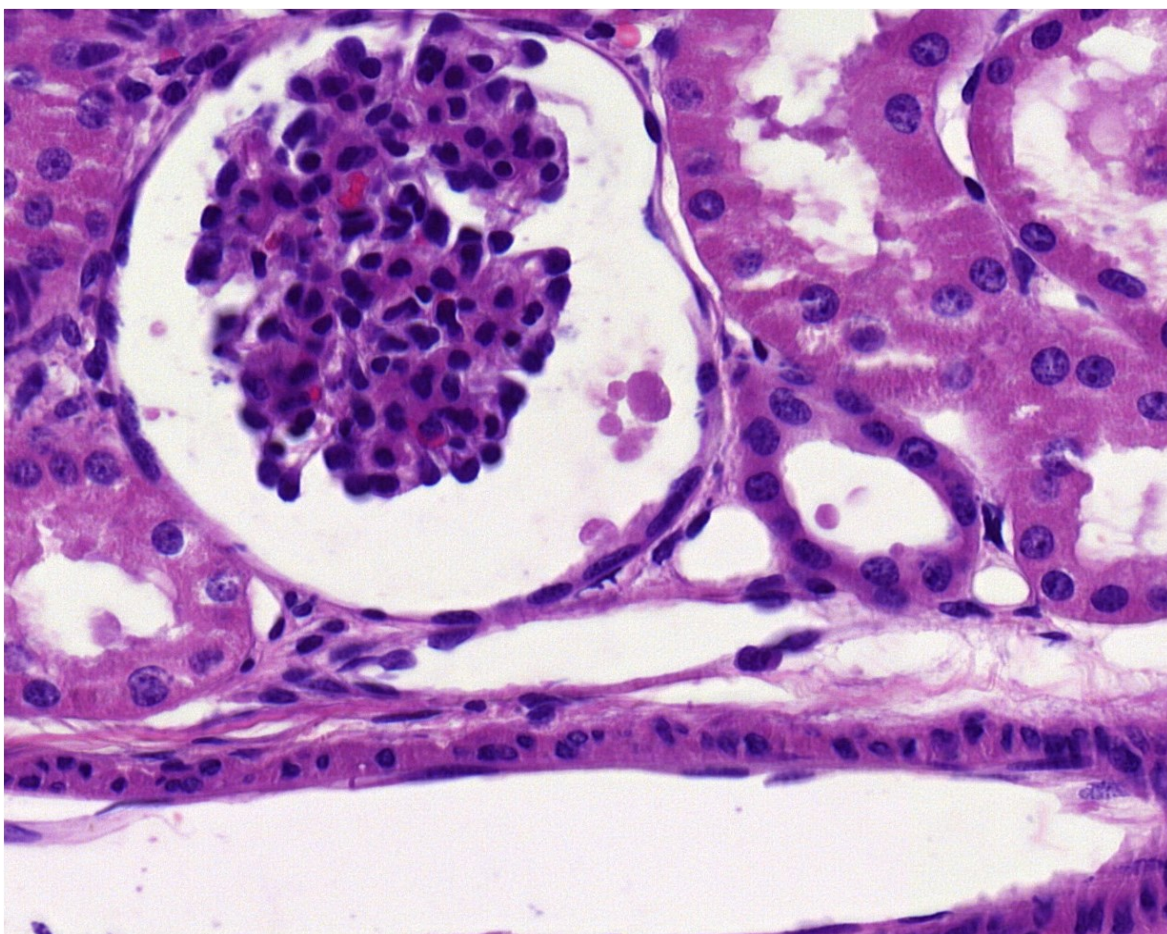
Zvíře (skupina)	Vzorek	
	I (po perfuzi)	II (po 6 hodinách po „Tx“)
1 (A)	3	3
2 (A)	3	3
3 (A)	3	3
1 (B)	2	3, kongesce v parenchymu
2 (B)	2	3
3 (B)	2	3
4 (B)	2	3, kongesce v parenchymu

Tab. 12 – Histologické vyhodnocení odebraných vzorků

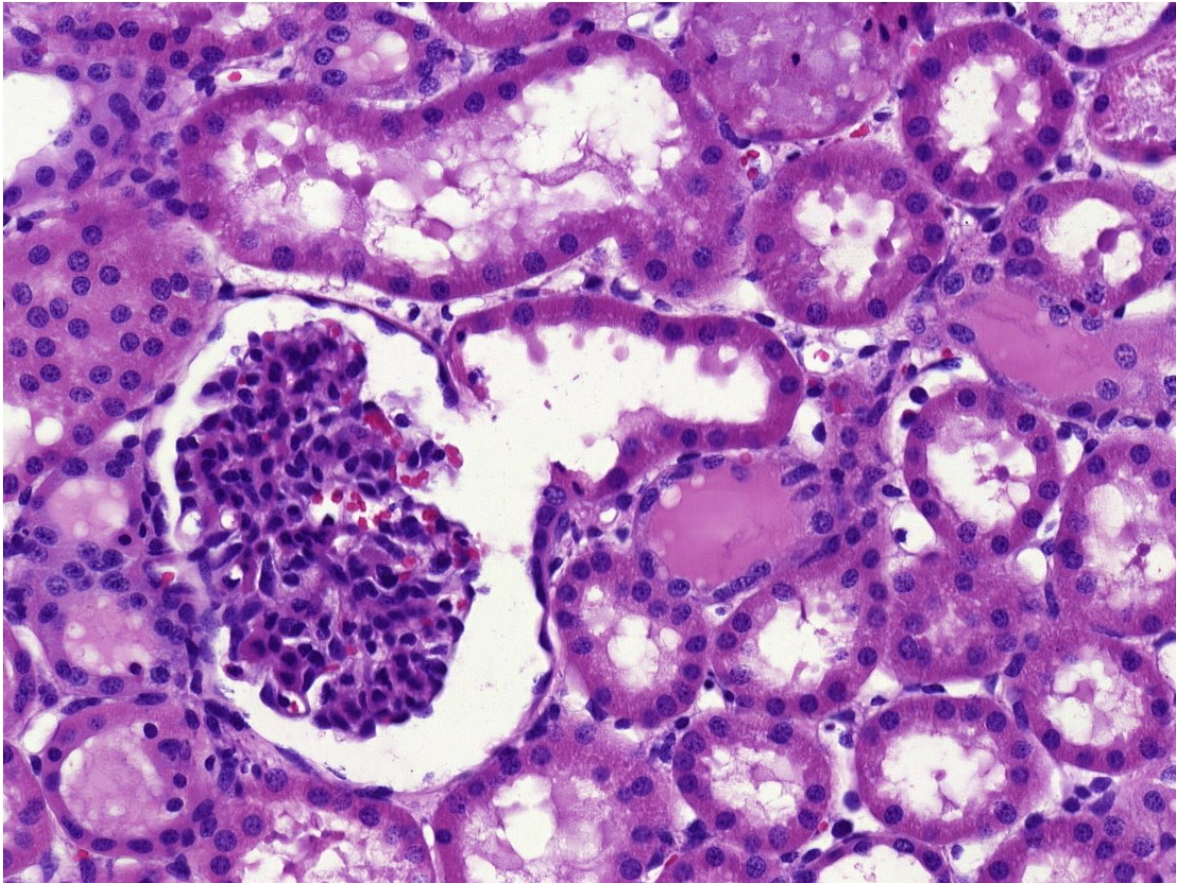




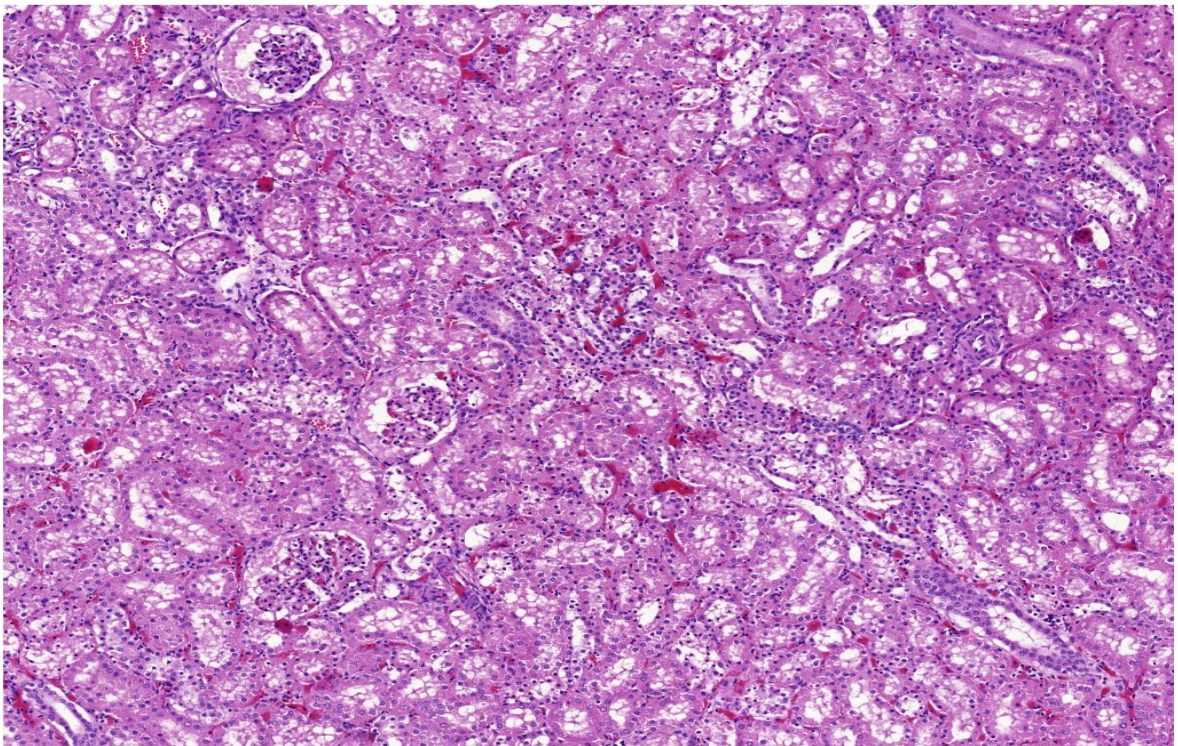
Graf 12 – Výsledky histologického vyšetření vzorku po perfuzi (I), odečtené hodnoty na stupnici 1-4



Obr. 17 – Dobře promytý parenchym ledviny



Obr. 18 – Horší promytí ledvinného parenchymu



Obr. 19 – Nativní parenchym ledviny

Proplach byl hodnocen na stupnici 1 až 4 viz předchozí experimenty. Všechna zvířata ze skupiny A měla proplach u vzorku (I) hodnocen stupněm 3 a zvířata ze skupiny B měla proplach ve vzorku (I) po perfuzi hodnocen stupněm 2. Zde nebyla provedena žádná statistika ani krabicové grafy, neboť máme nulový rozptyl.

### 7.2.3 Porovnání laboratorních parametrů v 6 hodinách

#### 7.2.3.1 Vstupní data

K dispozici byly od skupiny A tři měření a od skupiny B čtyři měření parametrů Na, Cl, K, Urea a Kreat v 6. hodině po obnovení průtoku ledvinou.

Zvíře	Skupina	Na v 6 hod.	Cl v 6 hod.	K v 6 hod.	Urea v 6 hod.	Kreat v 6 hod.
A1	A	130	92	7.0	4.1	125
A2	A	141	101	4.9	4.6	91
A3	A	141	101	5.2	4.9	121
B1	B	144	100	4.2	2.3	93
B2	B	134	92	4.4	5.4	95
B3	B	134	100	5.6	5.9	124
B4	B	136	98	9.8	4.8	126

Tab. 13 – Naměřené laboratorní parametry v 6. hodině po obnovení průtoku

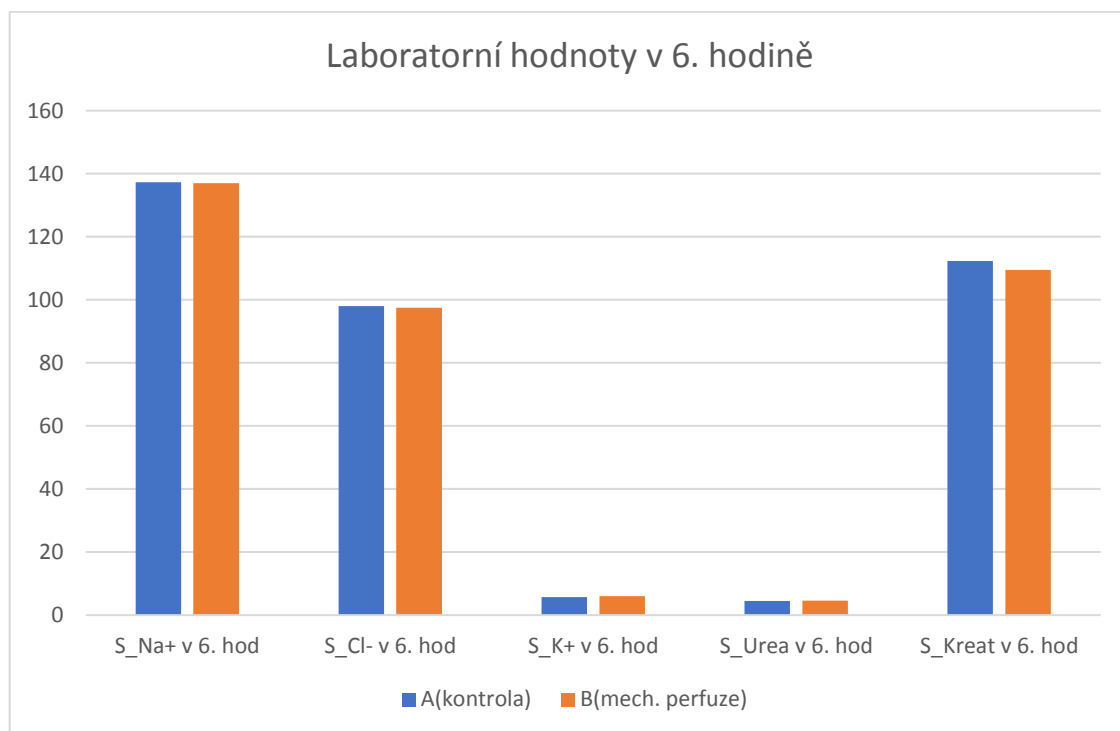
#### 7.2.3.2 Srovnání měřených laboratorních parametrů mezi skupinami

Pro srovnání laboratorních parametrů byl kromě standardních popisných statistik průměr, SD, medián, min a max použit dvou výběrový t test.

	Skupina	N	Průměr	SD	Medián	Min	Max	t-test
Na v 6 hod.	A	3	137.33	6.35	141	130	141	p = 0.94
	B	4	137.00	4.76	135	134	144	
Cl v 6 hod.	A	3	98.00	5.20	101	92	101	p = 0.89
	B	4	97.50	3.79	99	92	100	
K v 6 hod.	A	3	5.70	1.14	5.2	4.9	7.0	p = 0.86
	B	4	6.00	2.61	5.0	4.2	9.8	
Urea v 6 hod.	A	3	4.53	0.40	4.6	4.1	4.9	p = 0.95
	B	4	4.60	1.60	5.1	2.3	5.9	
Kreat v 6 hod.	A	3	112.33	18.58	121	91	125	p = 0.85
	B	4	109.50	17.94	109.5	93	126	

Tab. 14 – Statistické zhodnocení laboratorních parametrů v 6. hodině po obnovení průtoku

Z uvedené tabulky (tab. 14) popisných statistik a p hodnot dvou výběrových t testů plyne, že ani jeden laboratorní parametr nevyšel statisticky významný. I v grafickém znázornění průměrných hodnot v následujícím grafu č. 13 není patrný výrazný rozdíl mezi oběma skupinami.



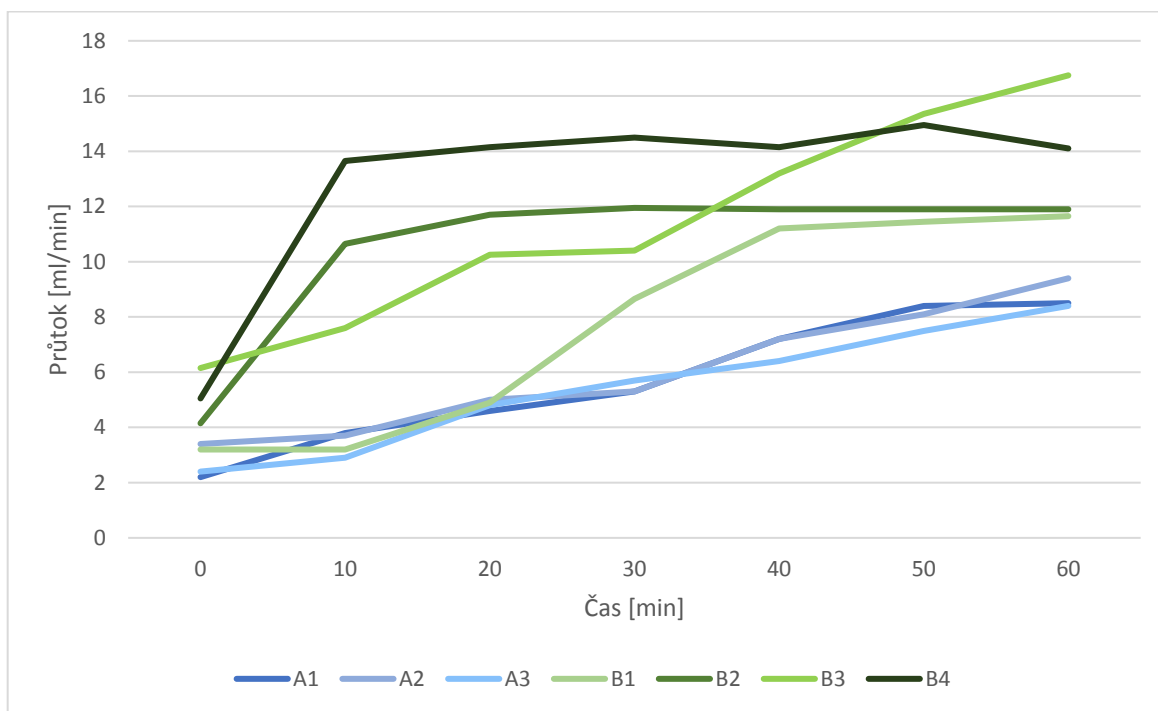
Graf 13 – Porovnání průměrů laboratorních hodnot v 6. hodině obnovení průtoku

## 7.2.4 Porovnání průběhu poklesu teploty, průtoku, tlaku a odporu mezi skupinami A a B

K dispozici byly od skupiny A tři měření a od skupiny B čtyři měření v časech 0, 10, 20, 30, 40, 50 a 60 min. Měřil se průtok [ml/min], teplota [°C], tlak [mmHg] a odpor [mmHg.min/l].

		Průtok [ml/min]						
Čas [min]	0	10	20	30	40	50	60	
A1	2.2	3.8	4.6	5.3	7.2	8.4	8.5	
A2	3.4	3.7	5.0	5.3	7.2	8.1	9.4	
A3	2.4	2.9	4.8	5.7	6.4	7.5	8.4	
B1	3.2	3.2	4.9	8.7	11.2	11.5	11.7	
B2	4.2	10.7	11.7	12.0	11.9	11.9	11.9	
B3	6.2	7.6	10.3	10.4	13.2	15.4	16.8	
B4	5.1	13.7	14.2	14.5	14.2	15.0	14.1	

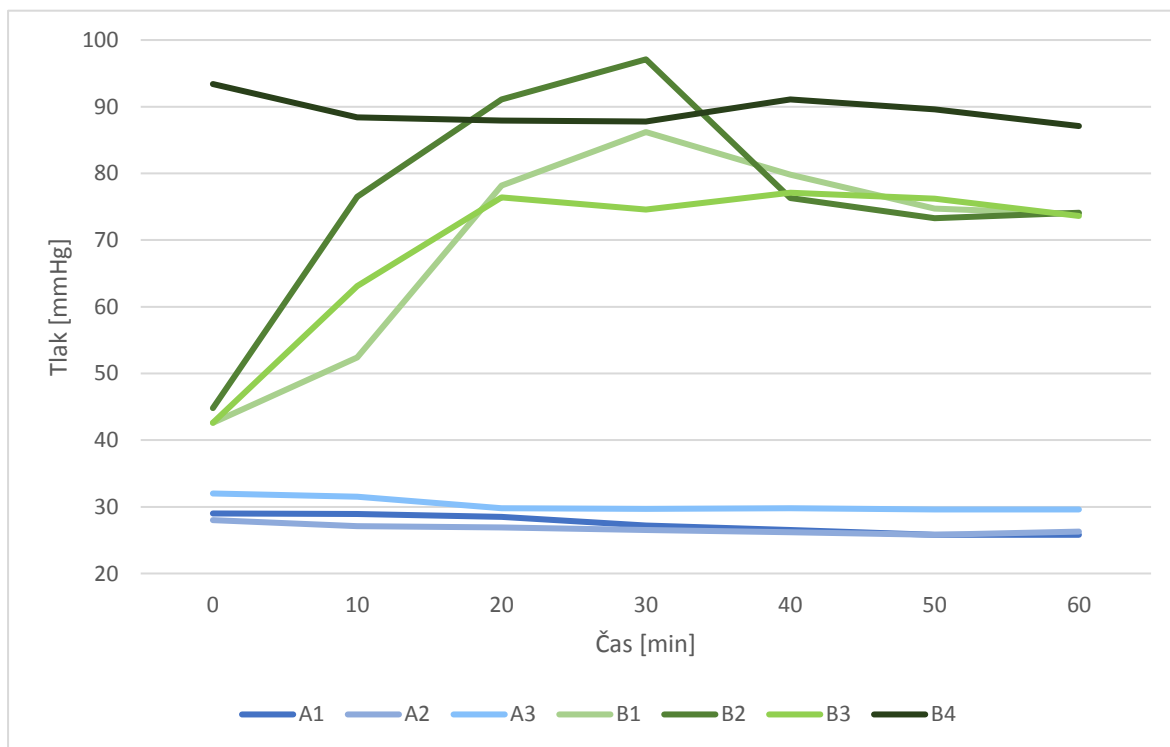
Tab. 15 - Hodnoty průtoku ledvinou v ml/min v jednotlivých časových intervalech



Graf 14 – Srovnání hodnot průtoku ledvinou v ml/min v čase mezi oběma skupinami

Tlak [mmHg]							
Čas [min]	0	10	20	30	40	50	60
A1	29.0	28.9	28.5	27.2	26.5	25.8	25.8
A2	28.0	27.1	26.9	26.5	26.2	25.8	26.3
A3	32.0	31.5	29.8	29.7	29.8	29.6	29.6
B1	42.6	52.4	78.2	86.2	79.8	74.7	73.9
B2	44.8	76.5	91.1	97.1	76.3	73.3	74.1
B3	42.6	63.1	76.4	74.6	77.1	76.2	73.6
B4	93.4	88.4	87.9	87.8	91.1	89.6	87.1

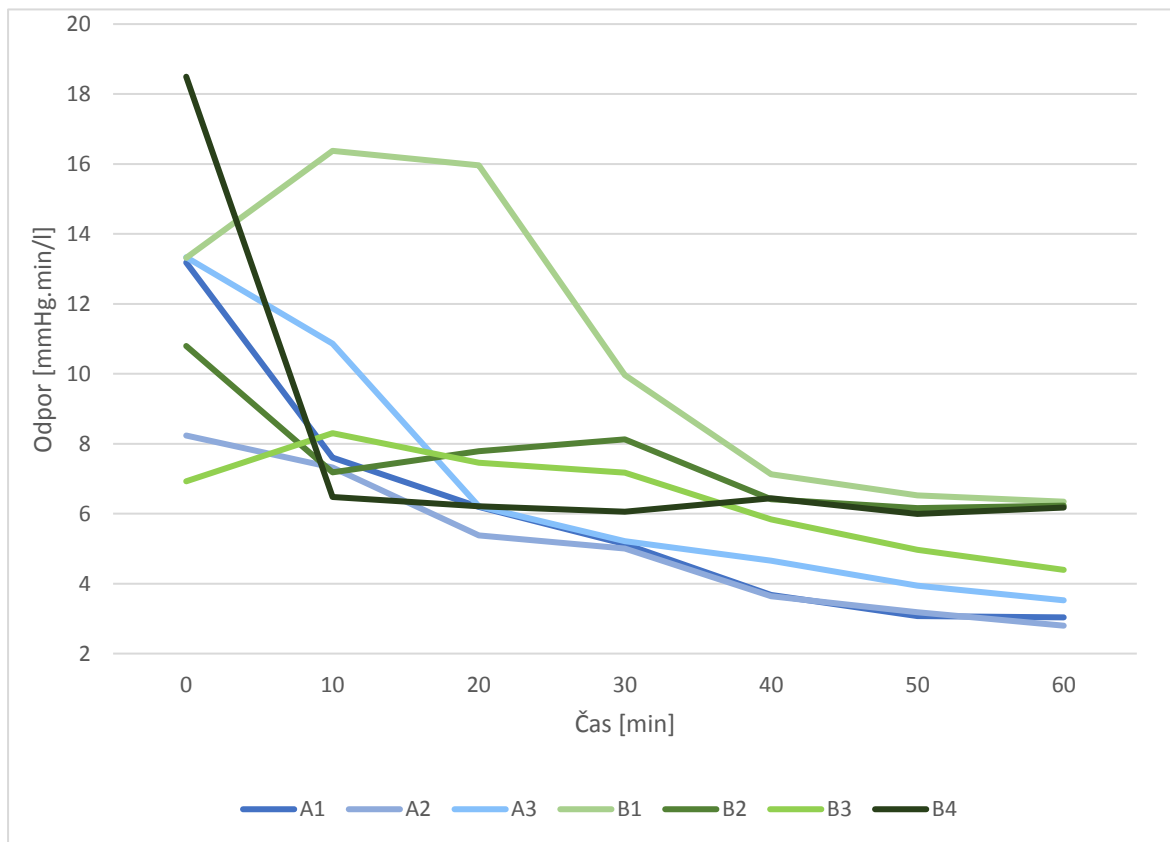
Tab. 16 - Hodnoty perfúzního tlaku v mmHg v jednotlivých časových intervalech



Graf 15 - Srovnání hodnot perfúzního tlaku v mmHg v čase mezi oběma skupinami

Odpor [mmHg.min/l]							
Čas [min]	0	10	20	30	40	50	60
A1	13.2	7.6	6.2	5.1	3.7	3.1	3.0
A2	8.2	7.3	5.4	5.0	3.6	3.2	2.8
A3	13.3	10.9	6.2	5.2	4.7	3.9	3.5
B1	13.3	16.4	16.0	10.0	7.1	6.5	6.3
B2	10.8	7.2	7.8	8.1	6.4	6.2	6.2
B3	6.9	8.3	7.5	7.2	5.8	5.0	4.4
B4	18.5	6.5	6.2	6.1	6.4	6.0	6.2

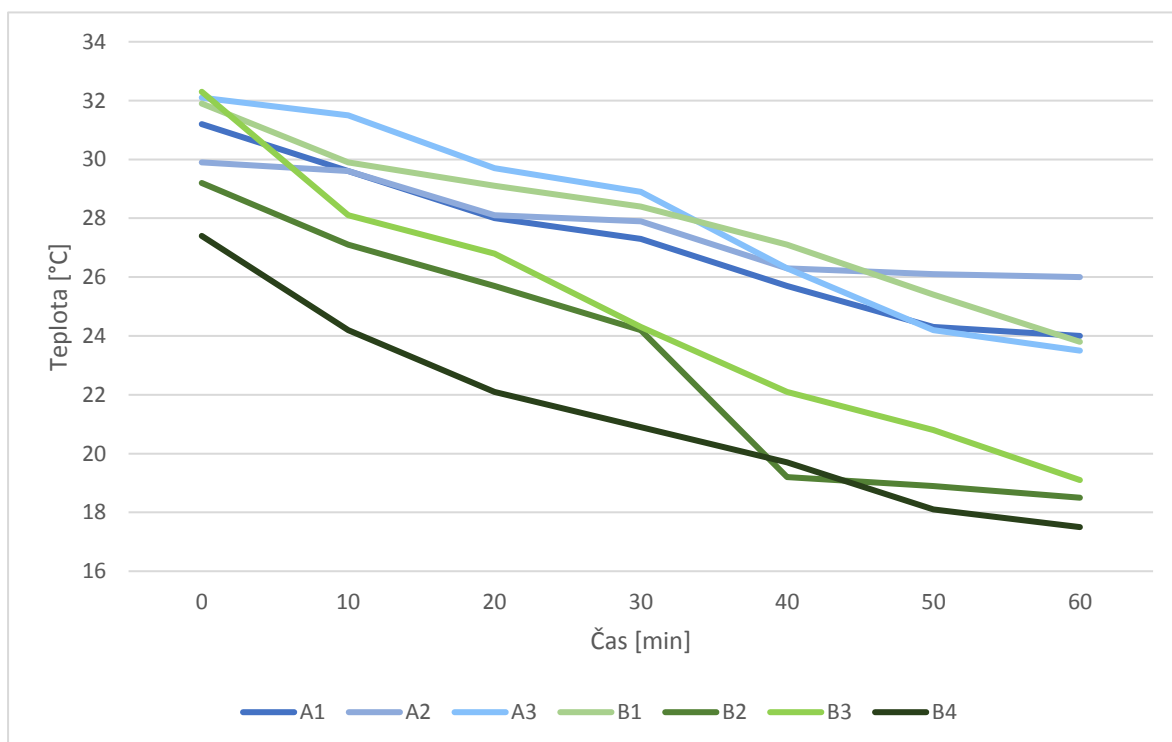
Tab. 17 - Hodnoty cévní rezistence v jednotlivých časových intervalech



Graf 16 - Srovnání hodnot cévní rezistence uvnitř orgánu v čase mezi oběma skupinami

Teplota [°C]							
Čas [min]	0	10	20	30	40	50	60
A1	31.2	29.6	28	27.3	25.7	24.3	24.0
A2	29.9	29.6	28.1	27.9	26.3	26.1	26.0
A3	32.1	31.5	29.7	28.9	26.3	24.2	23.5
B1	31.9	29.9	29.1	28.4	27.1	25.4	23.8
B2	29.2	27.1	25.7	24.2	19.2	18.9	18.5
B3	32.3	28.1	26.8	24.3	22.1	20.8	19.1
B4	27.4	24.2	22.1	20.9	19.7	18.1	17.5

Tab. 18 - Hodnoty naměřené teploty v parenchymu v jednotlivých časových intervalech



Graf 17 - Srovnání hodnot teploty uvnitř orgánu ve °C v čase mezi oběma skupinami



### 7.2.5 Srovnání vývoje markerů poškození ledvin

Hodnoty nad hranicí měřitelnosti u markerů plazma pi-GST a moč pi-GST z důvodu zachování dostatečného počtu dat nahrazeny expertním odhadem v blízkosti hodnoty 30. Identicky bylo postupováno u hodnot pi-GST v moči u ledvin, které nenastoupily diurézu. Hodnota je dostatečně vysoká k vyjádření výrazného poškození ledvinného parenchymu, bez jejího využití by nebylo statistické zhodnocení této veličiny možné.

K dispozici byly od skupiny A tři měření a od skupiny B čtyři měření v každém čase (Tab. 19).

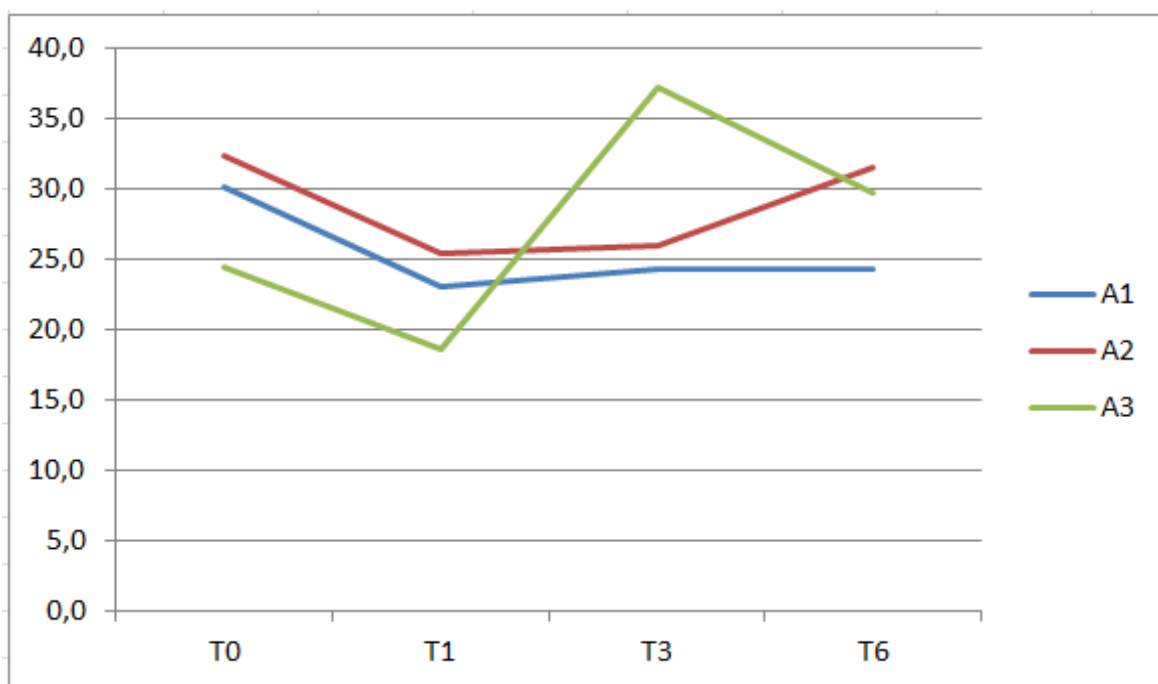
Prase	Náběr	NGAL-plazma	GSTpí-plazma	GSTpí-moč
A1	0	30,2	31,00	8,68
A1	1	23,1	30,00	9,89
A1	3	24,3	29,00	15,93
A1	6	24,4	32,00	18,40
A2	0	32,4	15,18	2,05
A2	1	25,4	16,55	9,38
A2	3	26,0	12,58	11,35
A2	6	31,6	15,87	5,93
A3	0	24,4	9,89	6,00
A3	1	18,6	12,28	9,08
A3	3	37,2	8,50	11,96
A3	6	29,8	10,06	20,32
B1	0	36,5	8,31	10,73
B1	1	26,0	9,38	31,00
B1	3	28,4	7,17	29,00
B1	6	31,9	14,47	30,00
B2	0	24,9	11,35	5,80
B2	1	22,8	10,87	15,30
B2	3	23,7	16,41	12,08
B2	6	27,8	14,47	7,00
B3	0	28,6	9,89	6,24
B3	1	31,4	6,57	21,54
B3	3	30,3	7,94	16,17
B3	6	35,9	12,73	18,26
B4	0	34,1	8,31	7,44
B4	1	34,1	8,31	31,00
B4	3	23,8	8,85	30,00
B4	6	35,0	10,22	29,00

Tab. 19 – Hodnoty sledovaných markerů poškození ledvinného parenchymu

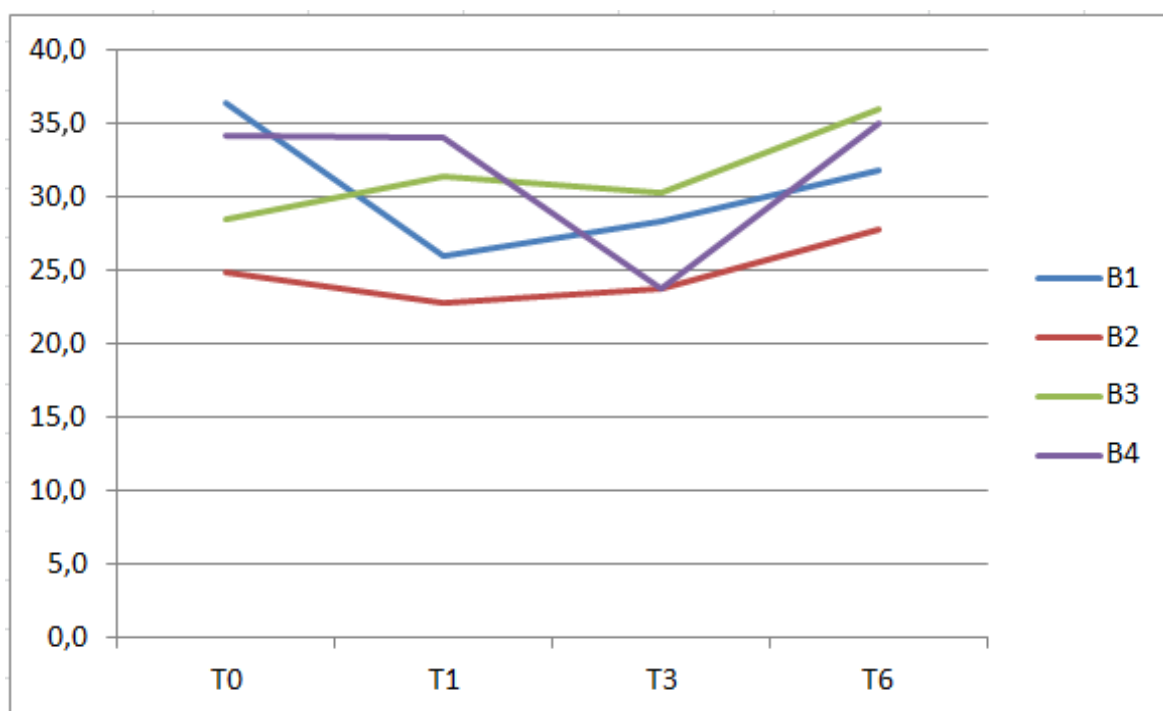
<b>Čas 0</b>	Půměr A	Průměr B	Sm.odch A	Sm.odch B	Počet A	Počet B	p
NGAL-plazma	29,008	31,013	4,124	5,265	3	4	0,611
GSTpí-plazma	18,688	9,466	10,985	1,459	3	4	0,147
GSTpí-moč	5,573	7,552	3,334	2,231	3	4	0,386
<b>Čas 1</b>	Půměr A	Průměr B	Sm.odch A	Sm.odch B	Počet A	Počet B	p
NGAL-plazma	22,354	28,549	3,472	5,117	3	4	0,133
GSTpí-plazma	19,608	8,783	9,250	1,813	3	4	0,065
GSTpí-moč	9,449	24,711	0,408	7,697	3	4	0,020
<b>Čas 3</b>	Půměr A	Průměr B	Sm.odch A	Sm.odch B	Počet A	Počet B	p
NGAL-plazma	29,164	26,549	7,042	3,344	3	4	0,536
GSTpí-plazma	16,691	10,096	10,853	4,267	3	4	0,308
GSTpí-moč	13,081	21,813	2,490	9,041	3	4	0,172
<b>Čas 6</b>	Půměr A	Průměr B	Sm.odch A	Sm.odch B	Počet A	Počet B	p
NGAL-plazma	28,584	32,655	3,753	3,691	3	4	0,211
GSTpí-plazma	19,307	12,975	11,370	2,012	3	4	0,311
GSTpí-moč	14,883	21,064	7,815	10,778	3	4	0,442

Tab. 20 - Hodnoty uvedených markerů v čase 0 až 6 hodin

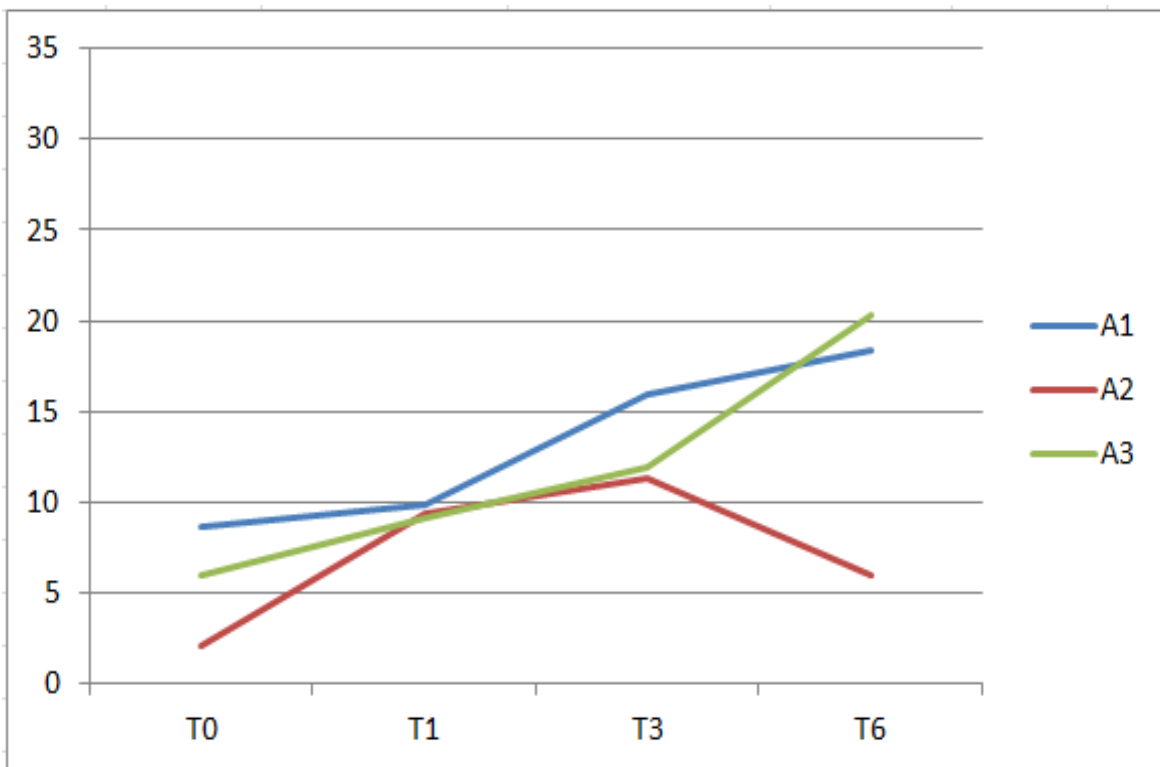
Dobrou představu o vývoji sledovaných parametrů je možné získat z grafického znázornění pomocí spojnicových grafů (graf 18-21).



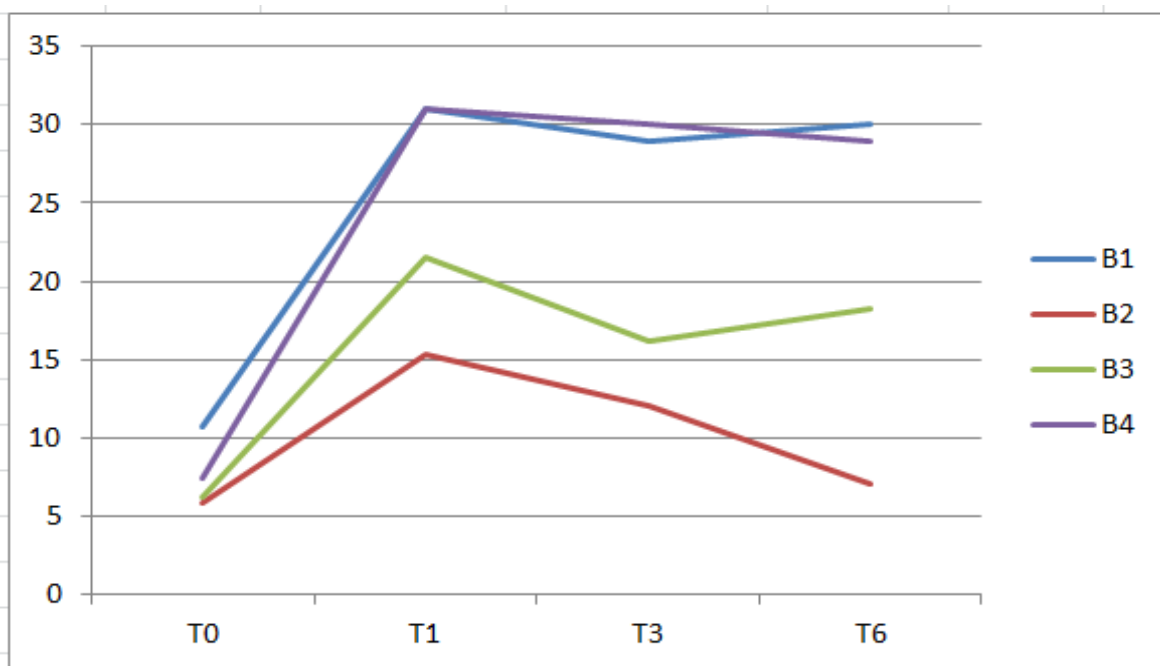
Graf 18 – Vývoj markeru NGAL v plazmě v čase 0-6 u skupiny A



Graf 19 - Vývoj markeru NGAL v čase 0-6 u skupiny B



Graf 20 – Vývoj markeru pi-GST v moči v čase 0-6 u skupiny A



Graf 21 – Vývoj markeru pi-GST v moči v čase 0-6 u skupiny B

Během perfuze jsme opět porovnávali měřené parametry průtoku a zchlazení orgánu v těle zvířete. Mechanickou perfuzí jsme opět dosáhli statisticky významnějšího rozdílu mezi oběma skupinami, a to jak pro vrcholový průtok u mechanické pulzatilní perfuze (průtok na vrcholu systoly čerpadla), tak pro průtok střední (vypočítaný identicky jako v klinické praxi) ve srovnání s maximálním průtokem u hydrostatické perfuze ( $p=0,007$ , resp.  $0,019$ ). Z grafu č. 15, který zobrazuje hodnoty naměřeného tlaku v ledvině a grafu č. 16, kde jsou znázorněny hodnoty cévní rezistence v čase, je patrný rozdílný průběh perfuze při užití hydrostatického tlaku (modře) a mechanické perfuze (zeleně). Je zřejmé, že u klasického proplachu hydrostatickým tlakem je tento konstantní, zatímco při užití mechanického perfuzoru je tlak závislou veličinou podle zvolené hodnoty průtoku. Průtok jsme zprvu nastavili na nižší hodnoty 3-6 ml/min, a poté postupně zvyšovali, cílem bylo nepřekročit hodnotu 90 mmHg. Z grafu č. 16 je potom patrný postupný pokles cévního odporu, což se domníváme, že je způsobeno postupným uvolněním většího množství cévního řečiště. V grafu č. 17 je poté patrný výraznější pokles teploty v parenchymu ledviny a jeho nižší hodnoty. Přesto co se týče poklesu měřené teploty orgánu, nebylo těsně dosaženo úrovně statistické významnosti ( $p=0,071$ ).

Srovnání sledovaných markerů poškození ledvinného parenchymu je patrné z tabulky č.20. Z výsledných p hodnot vyplývá, že v žádném z časů 0,1,3,6 hod. se skupiny A a B statisticky významně nelišily s výjimkou času 1 u markeru pi-GST moč. Statistická nevýznamnost ale samozřejmě může být způsobena malým počtem hodnot u skupin A a B. I z grafického znázornění je patrné, že vývoj markerů je v časech 0,1,3,6 pro obě skupiny A a B dosti podobný.

### III. část – diskuze a závěr disertační práce

## 1 Diskuze

Terminální stadium selhání ledvin znamená pro nemocné postižené tímto onemocněním zásadní změny v dosavadním životě. To je způsobeno zejména nutností zajištění náhrady ledvinných funkcí. Tyto je možno zajistit pravidelnou hemodialýzou či dialýzou peritoneální. Obě tyto metody však z dlouhodobého hlediska znamenají pro nemocné nejen vyšší rizika zejména kardiovaskulární morbidity a mortality, ale i možné komplikace spojené jak s hemodialýzou, tak s peritoneální dialýzou. Výraznou limitací jsou i změny v oblasti sociální. Metodou zajišťující nejfyziologičtější náhradu funkce ledviny je její transplantace, která znamená pro nemocného návrat do běžného života. V našem regionu je dárcovství od žijícího dárce zastoupeno spíše okrajově. Hlavním zdrojem orgánů k transplantaci jsou dárce zemřelí se smrtí mozku. Množství čekatelů na ledvinu však dlouhodobě převyšuje množství dostupných orgánů. To vedlo ve světě i u nás k ustanovení programu zemřelých dárců po nezvratné zástavě oběhu. Dvě hlavní podskupiny těchto DCD označujeme jako kontrolované a nekontrolované. Kritériem tohoto dělení je, zdali se jedná o zástavu oběhu očekávanou, či náhlou. S tím souvisí i způsob odběru a následná prezervace ledvinných štěpů. Po konstatování nezvratné zástavy oběhu a uplynutí non-touch intervalu následuje odběr orgánů k transplantaci. U dárců nekontrolovaných je většinou užívána metoda in situ perfuze s použitím katetru zavedeného do abdominální aorty k proplachu viscerálního segmentu pomocí speciálních roztoků, jež mají za cíl zabránit iontovým přesunům na buněčné membráně a tím stabilizovat vnitřní prostředí buňky. Taktéž jsou nositelem hypotermie, jež snižuje metabolické nároky orgánu. Na některých pracovištích je užívána ECMO, a to buď v nastavení normotermním, či hypotermním. Tato metoda je však nákladná a vyžaduje zvláštní přístrojové vybavení. U dárců kontrolovaných je možno užít metodu rychlé laparotomie s přímým promytím viscerálních orgánů cestou abdominální aorty, jako při odběru z DBD. Druhou možností je též zprvu in situ perfuze užitím trojcestného katetru, s následnou laparotomií a odběrem ledvin. Co se týče následného uchování štěpů po jejich vyjmutí z těla dárce, je u DCD zlatým standardem metoda mechanické pulzatilní perfuze. „cold storage“ je možno užít zejména u dárců kontrolovaných s minimální dobou teplé ischemie, odebraných metodou rychlé laparotomie. Zvláště u dárců nekontrolovaných, pakliže bylo delší trvání teplé ischemie, je mechanická pulzatilní perfuze cestou ke zhodnocení vlastností odebraného štěpu. Teplá ischemie je specifikem právě DCD. Počíná již při neefektivním krevním oběhu v době tzv. agonální fáze u dárců kontrolovaných, při poklesu systolického TK pod 70 torrů. U dárců nekontrolovaných v době náhlé srdeční zástavy. V jejím průběhu dochází k patofyziologickým změnám zapříčiněným zástavou buněčného metabolismu v mitochondriích při nedostatečném přísunu kyslíku a metabolických substrátů pro oxidativní pochody zajišťující tvorbu ATP. Tím je zastavena činnost membránových ATP-áz. Důsledkem jsou přesuny iontů po prostém koncentračním gradientu v obou směrech přes buněčnou membránu. Stejně tak dochází k uvolnění nitrocelulárních zásob kalcia, jež má významné signalizační dopady uvnitř buňky. Výsledkem je edém a lýza buňky, její zánik. Množství uvolněných výhradně nitrobuněčných enzymů je možno měřit v průběhu mechanické perfuze. V praxi užívaným je zejména t-GST z oblasti tubulárního aparátu ledviny. Dalším faktorem ke zhodnocení je

úroveň renální vaskulární rezistence. Čím nižší je míra odporu kladeného cévním systémem štěpu, tím větší je šance na dobrý funkční výsledek po transplantaci.

Dalšími možnými přístupy v oblasti prezervace ledvinných štěpů před transplantací je užití perfuze s užitím teplot perfuzátu pod úrovní fyziologické normy, či přímo teploty shodné jako v lidském těle. Cílem je umožnit orgánu před vlastní transplantací určitou restituci energetických zásob a tím zajistit časný nástup funkce. Jedná se zatím o metody spíše experimentální, bez většího užití v klinické praxi. Zvláštní metodou je retrográdní oxygenová persuflace. Zde je plynný kyslík katetrem persuflován cestou renální žíly do odebraného orgánu. Pozitivní experimentální výsledky vedly k užití metody i v klinické praxi, zejména však v oblasti transplantace jater.

Dárci po nezvratné zástavě oběhu se postupem času ukázali jako velmi významný přínos v orgánových transplantacích. V některých zemích, např. ve Spojeném království dnes znamenají až padesátiprocentní podíl na celkovém počtu zemřelých dárců. Jedná se zejména o dárce kontrolované. Naproti tomu ve Španělsku je velmi dobře zaveden program DCD nekontrolovaných, s velmi dobrými výsledky. K programu DCD však neodiskutovatelně patří vyšší procento výskytu PNF, jež je odrazem tíže proběhlé teplé ischemie, eventuálně poškození orgánu v době agonální fáze před odběrem. Výskyt PNF u DCD je v rozmezí 2-19 %, zatímco u štěpů odebraných DBD se pohybuje mezi 1-9 %. Výrazněji diskutovanou problematikou DCD je DGF, jež se vyskytuje v širokém rozmezí 39-77 %. Vyšší procento je možno očekávat u dárců nekontrolovaných. Opožděný nástup funkce štěpu však nemá větší dopad na dlouhodobou funkci štěpu. Znamená však prodloužení hospitalizace a vyšší náklady na léčbu v období po transplantaci.

Naším cílem tedy bylo prozkoumat možnosti perfuze ledvinného štěpu a v experimentu se pokusit odhalit možnou cestu ke zlepšení vlastností štěpu odebraného z DCD.

První experimentálně testovanou cestou k dosažení tohoto cíle bylo porovnání ROP a promytí ledvinného štěpu hydrostatickým tlakem. Persuflátor byl konstruován konkrétně pro tento experimentální projekt. Technicky se jedná o velmi snadnou a finančně nenáročnou proceduru. Pro hodnocení kvality štěpu jsme zvolili histopatologickou analýzu štěpu (jak po vlastní prezervaci, tak po následné transplantaci). Naše vlastní škála kvality štěpu (1-4) je na našem pracovišti dlouhodobě užívána (vedle zvyklé Remuzziho klasifikace) při hodnocení štěpů od DCD. Druhým hodnotícím faktorem byla funkce natransplantované ledviny, která byla objektivizována pravidelnými odběry žilní krve z vlastního štěpu. Jako marker funkce štěpu jsme stanovili hladinu urey (při kontralaterální nefrektomii). Jsme si vědomi určitého zjednodušujícího pohledu (zejména krátká doba sledování), avšak naším cílem bylo zjištění, zdali ROP může být určitou alternativou při rekondici ledvinného štěpu.

Výsledky prokazují identickou kvalitu štěpů prezervovaných jak klasickou intraarteriální perfuzí, tak retrográdní oxygenovou persuflací. Nenalezli jsme signifikantní rozdíly jak v histopatologickém hodnocení odebraných štěpů (bylo testováno pomocí Fisherova exaktního testu v kontingenční tabulce (Fisher's exact test) pro každý z časů I, II a III



samostatně), tak v hodnotách urey u zvířat po transplantaci daných štěpů. Uvedené výsledky jsou v souladu s literaturou. Nepotvrdili jsme názor některých autorů, že ROP může být dokonce superiorní ve srovnání s klasickou perfuzí event. s „cold storage“. Prokázali jsme ale bez pochyby, že i prostá ROP dokáže parenchym ledviny ochránit, resp. restaurovat. Eventuální přínos této metody vidíme spíše v možné kombinaci s jinými perfuzními mechanismy v rámci rekondice orgánů postižených teplou ischemií.

Dále jsme si položili otázku, zdali by nebylo možné dosáhnout záchrany většího množství glomerulů a rychlejšího zchlazení orgánu již v těle dárce. Již do jisté míry využívanou možností je užití ECMO, která je však přístrojově velmi komplikovanou a nákladnou metodou. V našem experimentu jsme tedy navrhli in situ promytí viscerálního segmentu pomocí zavedeného katetru do abdominální aorty, za užití hypotermní pulzatilní perfuze. Hypotermie logicky snižuje nároky buňky na kyslík zpomalením enzymových reakcí. Udává se 50 % redukce metabolismu na 10 st. C zchlazení. Hypotermie sice parciálně zvyšuje renální vaskulární rezistenci, ale dle recentních literárních dat prodlužuje životnost štěpu a omezuje DGF i při delším času studené ischemie. Jako experimentální zvíře v této fázi studie byl zvolen králík domácí, zejména vzhledem ke snazší logistice a manipulaci.

Statistické zhodnocení bylo provedeno pomocí dvou výběrového t-testu. Výsledky naší iniciální práce na malém zvířeti prokázaly statisticky významně lepší zchlazení ledvinných štěpů u přístrojové perfuze ( $p < 0,001$ ), zatímco in situ proplach hydrostatickým tlakem snížil teplotu průměrně o 3,5 st. C, proplach mechanický průměrně o 17,5 st. C. Statisticky významně vyšší byl i maximální dosažený průtok perfuzního roztoku orgánem za minutu ( $p=0,004$ ). Za stejnou časovou jednotku je tak orgán propláchnut větším množstvím perfuzátu. Rutinně užívaná metoda pracuje s chladným perfuzátem proudícím z vaku, ve kterém je uskladněn při teplotě asi 8st. C. Tento se však již při podávání do těla dárce ohřívá od okolní pokojové teploty v instrumentáriu, ve kterém je veden. Díky zapojení chladiče média v našem perfuzoru až těsně před vstup do těla dárce jsme mohli dosáhnout velmi nízké teploty perfuzátu kolem 4 st. C. Proto následné zchlazení orgánu je účinnější. Rovněž objektivní hodnocení kvality propláchnutí štěpu vyznívá jednoznačně pro mechanickou pulzatilní perfuzi. Prokázali jsme pomocí histologického vyšetření, že promytí ledviny pomocí mechanického perfuzoru v těle zvířete je výrazně lepší než při použití hydrostatického tlaku. Na histologických preparátech nebyly v glomerulech přítomny krevní elementy u ledviny promyté perfuzorem. Kontrolní skupina měla celkově výrazně horší promytí ledvin i makroskopickým pozorováním. Zdá se, že řízená mechanická perfuze je schopna z ledviny odstranit i drobné již vytvořené mikrotromby a zachovat maximum cévního řečiště pro obnovení krevního průtoku. Jsme si rovněž vědomi limitací tohoto experimentu, zejména v malém počtu zvířat a v měření pouze tří základních ukazatelů. Jednalo se o pilotní projekt, který měl prokázat funkčnost modelu in situ perfuze a též použitelnost experimentálního perfuzoru.

Pro další fázi experimentální práce jsme tedy zvolili větší zvíře, prase domácí. Cílem bylo opět prokázat superioritu mechanické in situ perfuze nad prostým proplachem hydrostatickým tlakem, k tomu posloužilo zejména následné pozorování v šesti hodinách

po „autotransplantaci“ orgánu zvířeti. Během perfuze jsme opět porovnávali měřené parametry průtoku a zchlazení orgánu v těle zvířete. Mechanickou perfuzí jsme opět dosáhli statisticky významnějšího rozdílu mezi oběma skupinami, a to jak pro vrcholový průtok u mechanické pulzatické perfuze, tak pro průtok střední ve srovnání s maximálním průtokem u hydrostatické perfuze ( $p=0,007$ , resp.  $0,019$ ). Co se týče poklesu měřené teploty orgánu, zde nebylo těsně dosaženo úrovně statistické významnosti ( $p=0,071$ ). V tomto případě je však nutno uvažovat o chybě způsobené statistickým hodnocením malého souboru. Ledviny byly obklopeny okolními orgány natolik, nakolik to dovolovalo zavedení perfuzních kanyl. Byla tedy simulována reálná situace proplachu v těle zemřelého, kdy je výrazný teplotní gradient z okolních orgánů.

Co se týče sledování funkce orgánu po obnovení průtoku ledvinou, byla průměrná diuréza téměř dvakrát vyšší ve skupině mechanické perfuze. Při statistickém vyhodnocení však rozdíl nebyl na hladině významnosti ( $p=0,602$ ). Srovnání měřených laboratorních hodnot séra a moči (urea, kreatinin,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) v 6. hodině po obnovení průtoku nevykazovalo rozdíl v obou skupinách. Stejně tak hodnocení vlastnosti transplantované ledviny pomocí markerů ledvinného poškození, neukázalo významný rozdíl mezi oběma skupinami. Všechny 3 markery (NGAL v plazmě, pi-GST v plazmě, pi-GST v moči) nevykazovaly statisticky významný rozdíl v žádném čase po opětovné „autotransplantaci“.

Histologické vyšetření odebrané po proplachu orgánu prokazovalo signifikantně lepší promytí orgánu pomocí mechanické perfuze. Všechny preparáty promyté mechanicky byly hodnoceny 2/4, zatímco při promytí hydrostatickým tlakem 3/4. Opět se tedy potvrdila naše domněnka, že je možné při užití mechanické perfuze odstranit i drobné trombotické hmoty na úrovni kapilárního řečiště, jež by jinak odstraněny nebyly.

V našem experimentu jsme učinili určité pozorování v oblasti tlakových poměrů uvnitř promývaného orgánu. Obecně můžeme říci, že perfuze hydrostatickým tlakem je řízena v podstatě pouze tlakem, který je generován výškou zavěšení vaku nad lůžkem dárce a stupněm renální rezistence. Jedná se tedy o tlakem řízenou perfuzi. Tento tlak byl v našem měření v rozmezí 25,8 – 32 torrů. Pakliže tedy v orgánu tekutina narazí na okrasek s vyšším odporem, nemůže jej dále překonat a proudí okrsky, kde tento odpor není přítomen. Průtok poté tedy zůstává konstantní, nelze jej dále uměle navýšit, jak je vidět v grafickém znázornění. Naopak v případě mechanické perfuze lze ovládat oba dva parametry, jak perfuzní tlak, tak průtok. Naším cílem bylo dosáhnout vyššího průtoku orgánem při omezení rizika edému tkáně. Výhodou průtokem řízené perfuze je, že je do orgánu vždy vpraveno dané množství média, které pokud narazí na místo vyššího odporu, např. mikrotrombus, má snahu jej překonat zvýšením tlaku v systému. Naše měření v průběhu promývání zahajovala na úrovni 40 torrů, s rostoucím průtokem však rostl i odpor v ledvině, bylo tedy nutno perfuzní tlak zvýšit, většinou na zhruba 70 torrů. Závislost však nebyla lineární. Mohlo se tedy s velkou pravděpodobností jednat o postupné vymývání mikrotrombů z parenchymu ledviny, nebo o prostou autonomní reakci cévního řečiště. V čase však odpor postupně výrazně klesl až na třetinové hodnoty oproti počátečnímu stavu. Konečná cévní rezistence byla téměř dvojnásobná oproti

hydrostatické perfuzi (6 resp. 3 mmHg.min/l), což může být na vrub zachované autoregulace ledviny která na vyšší průtok reaguje zvýšením vaskulární rezistence. V negativním případě by se mohlo jednat o odpor způsobeným edémem orgánu, jež se však makroskopicky ani mikroskopicky nezdál přítomen. Tato výše cévní rezistence by jistě neuspěla v rámci hodnocení orgánu k přijetí k transplantaci, kde je hraniční hodnota 0,5 mmHg.min/l. Avšak v tomto experimentu byly orgány výrazně ischemicky poškozeny, čemuž bychom přičítali přítomnou vyšší renální rezistenci i při promytí hydrostatickým tlakem. Cévní rezistenci je samozřejmě možno ovlivnit i farmakologicky podáním vazoaktivních látek. V klinické praxi se při odběru orgánu od DCD podává fentolamin i.v., jež má zabránit cévním spazmům při hypoxii orgánu. V našem experimentu jsme tyto látky neužívali z důvodu zkreslení měření cévní rezistence a nemožnosti následného porovnání obou skupin.

Z výše uvedeného se domníváme, že ihned zahájená pulzatilní perfuze štěpů v těle dárce po nezvratné zástavě oběhu štěpy lépe promyje, tím zachová větší počet nepoškozených glomerulů a nefronů v parenchymu. Efektivnějším zchlazením lze dosáhnout časnějšího zastavení již probíhajících ischemických změn a po následné transplantaci snížit procento výskytu PNF a DNF. Jako ideální by se jevila tato metoda v následné kombinaci s možným využitím ROP před transplantací příjemci.

Finanční náročnost při zavedení této metody by nebyla jistě vysoká, komerční přístrojové perfuzory jsou již běžně na trhu a naprostá většina transplantačních center s nimi pracuje. V dalších fázích experimentu bychom chtěli použít opět experimentální model prasete domácího, ovšem s dlouhodobým přežíváním po autotransplantaci mechanicky promytého orgánu v časovém období několika týdnů. Mohli bychom tak lépe hodnotit stav štěpů zejména ve smyslu přítomnosti akutní tubulární nekrózy.

## 2 Závěr

Dárci ledvin po nezvratné zástavě oběhu jsou v dnešní době nedílnou součástí transplantační medicíny. Jejich využití může výrazně navýšit počet orgánů využitelných k transplantaci a tím zlepšit kvalitu života řadě nemocných v terminální fázi renálního selhání. Jedná se též o nejnáročnější skupinu dárců z pohledu organizace a provedení orgánového odběru, spojenou s řadou nejen logistických, ale i společensky a eticky citlivých otázek. K uchování orgánů odebraných DCD je dnes ve valné většině využívána přístrojová perfuze, jež garantuje nejlepší funkční výsledky po následné transplantaci příjemci. Proto se jako příhodné jeví využití co nejčasnější zahájení přístrojové perfuze již v těle zemřelého dárce. V našem experimentu jsme ověřili účinnost retrogradní oxygenové persuflace ve shodě s literárními daty. Dále jsme ve dvou experimentálních modelech prokázali možnost lepšího zchlazení a promytí ledvinného štěpu v těle dárce. Ideálním cílem našeho výzkumu by bylo zavedení nové metodiky, resp. algoritmu perfuze ledviny odebrané od marginálního dárce. Zavedení do klinické praxe jistě vyžaduje ještě významný kus práce na experimentálním poli, přesto finanční i logistická nenáročnost této metody je příslibem do budoucna.

### 3 Seznam použitých zkratek

ATP – adenosin trifosfát  
CIT – cold ischemia time  
CS – cold storage  
DBD – donor after brain death  
DBTL – double balloon, triple lumen  
DCD – donors after cardiac death  
DGF – delayed graft function  
ECD – extended criteria donors  
ECMO – extrakorporální membránová oxygenace  
ER – emergency department  
HBD – heart beating donor  
HMP – hypothermic machine perfusion  
i.a. - intraarteriálně  
i.m. – intramuskulárně  
i.v. – intravenózně  
ICU – intensive care unit  
JIP – jednotka intenzivní péče  
MK – Maastrichtská klasifikace  
NGAL – neutrophil gelatinase associated lipocalin  
NHBD – non heart beating donor  
OR – operating room  
pi-GST – pi glutathion s transferase  
PNF – primární non-funkce  
ROP – retrográdní oxygenové perfuze  
RR – renální resistance  
SNMP – subnormothermic machine perfusion  
TC – transplantační centrum  
t-GST – total glutathion s transferase

WIT – warm ischemia time

## 4 Literatura

- [1] *Rok 2015 | Koordinační středisko transplantací* [online]. [vid. 2017-02-06]. Dostupné z: <http://www.kst.cz/statistiky/domaci/rok-2015/>
- [2] TRESKA, V., D. HASMAN, M. CECHURA, T. REISCHIG, J. RACEK, L. TREFIL, O. HES, S. HADRAVSKÁ a P. MUKENSNÁBL. [Initial experience with transplantation of a kidney from a non-beating heart donor (NHBD)]. *Rozhledy V Chirurgii: Mesicnik Ceskoslovenske Chirurgicke Spolecnosti*. 2002, **81**(11), 582–586. ISSN 0035-9351.
- [3] WATSON, C. J. E., A. C. WELLS, R. J. ROBERTS, J. A. AKOH, P. J. FRIEND, M. AKYOL, F. R. CALDER, J. E. ALLEN, M. N. JONES, D. COLLETT a J. A. BRADLEY. Cold machine perfusion versus static cold storage of kidneys donated after cardiac death: a UK multicenter randomized controlled trial. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* [online]. 2010, **10**(9), 1991–1999. ISSN 1600-6143. Dostupné z: [doi:10.1111/j.1600-6143.2010.03165.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03165.x)
- [4] NISHIKIDO, M., M. NOGUCHI, S. KOGA, H. KANETAKE, F. MATSUYA, M. HAYASHI, T. HORI a K. SHINDO. Kidney transplantation from non-heart-beating donors: analysis of organ procurement and outcome. *Transplantation Proceedings* [online]. 2004, **36**(7), 1888–1890. ISSN 0041-1345. Dostupné z: [doi:10.1016/j.transproceed.2004.06.030](https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2004.06.030)
- [5] DAEMEN, J. H., B. DE VRIES, A. P. OOMEN, J. DEMEESTER a G. KOOTSTRA. Effect of machine perfusion preservation on delayed graft function in non-heart-beating donor kidneys—early results. *Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation*. 1997, **10**(4), 317–322. ISSN 0934-0874.
- [6] SALAZAR MEIRA, F., J. ZEMIACKI, A. E. FIGUEIREDO, L. VILIANO KROTH, D. SAUTE KOCHHANN, D. O. D’AVILA, M. TRAESEL, D. SAITOVITCH a C. E. POLI-DE-FIGUEIREDO. Factors Associated With Delayed Graft Function and Their Influence on Outcomes of Kidney Transplantation. *Transplantation Proceedings* [online]. 2016, **48**(7), 2267–2271. ISSN 1873-2623. Dostupné z: [doi:10.1016/j.transproceed.2016.06.007](https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2016.06.007)
- [7] *Dialyzační statistika | Česká nefrologická společnost* [online]. [vid. 2017-02-20]. Dostupné z: <http://www.nefrol.cz/odbornici/dialyzacni-statistika>
- [8] VIKLICKÝ, O. a S. RAJNOCHOVÁ-BLOUDÍČKOVÁ. [Recent possibilities of treatment of End Stage Renal Disease]. *Vnitřní Lekarství*. 2013, **59**(8), 747–751. ISSN 0042-773X.
- [9] MEIER-KRIESCHE, Herwig-Ulf, Jesse D. SCHOLD, Titte R. SRINIVAS, Alan REED a Bruce KAPLAN. Kidney transplantation halts cardiovascular disease progression in patients with end-stage renal disease. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of*

*Transplant Surgeons* [online]. 2004, **4**(10), 1662–1668. ISSN 1600-6135. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-6143.2004.00573.x

- [10] TESAŘ, Vladimír a Ondřej VIKLICKÝ. *Klinická nefrologie*. 2015. ISBN 978-80-247-4367-7.
- [11] HARRISON, J. H., J. P. MERRILL a J. E. MURRAY. Renal homotransplantation in identical twins. *Surgical Forum*. 1956, **6**, 432–436. ISSN 0071-8041.
- [12] TŘEŠKA, Vladislav. *Transplantologie pro mediky*. V Praze: Karolinum, 2002. ISBN 978-80-246-0331-5.
- [13] KOOTSTRA, G., J. H. DAEMEN a A. P. OOMEN. Categories of non-heart-beating donors. *Transplantation Proceedings*. 1995, **27**(5), 2893–2894. ISSN 0041-1345.
- [14] TŘEŠKA, Vladislav. *Transplantace ledvin od nebijících dárců*. Praha: Maxdorf, 2008. ISBN 978-80-7345-167-7.
- [15] POKORNÁ, E., P. BACHLEDA, J. DEDOCHOVÁ, P. FIXA, M. KUMAN, P. NAVRÁTIL, P. NEMEC, T. REISCHIG, J. SAMLÍK, T. SEEMAN, D. SOBOTOVÁ, J. SPATENKA, P. TRUNECKA, V. TRESKA, O. VIKLICKÝ a J. ZADRAZIL. [An overview of the results of renal transplantation in the Czech Republic]. *Vnitřní Lekarství*. 2011, **57**(7–8), 645–649. ISSN 0042-773X.
- [16] *Rok 2016 / Koordinační středisko transplantací* [online]. [vid. 2017-02-23]. Dostupné z: <http://www.kst.cz/statistiky/domaci/rok-2016/>
- [17] DOSTALÍK, J., P. GUNKOVÁ, L. MARTÍNEK, I. GUNKA, M. MAZUR, J. SAMLÍK a A. FOLTYS. [„Low volume“ laparoscopic nephrectomy for relative-to-relative transplantation]. *Rozhledy V Chirurgii: Mesicnik Ceskoslovenske Chirurgicke Spolecnosti*. 2011, **90**(5), 293–297. ISSN 0035-9351.
- [18] ROMŽOVÁ M, P. NAVRÁTIL, PACOVSKÝ J. a HOLUB L. Transplantace ledvin od žijících dárců. *Urologické listy*. nedatováno, **2009**(7), 18–20.
- [19] RATNER, L. E., L. J. CISECK, R. G. MOORE, F. G. CIGARROA, H. S. KAUFMAN a L. R. KAVOUSSI. Laparoscopic live donor nephrectomy. *Transplantation*. 1995, **60**(9), 1047–1049. ISSN 0041-1337.
- [20] CHIN, Edward H., David HAZZAN, Daniel M. HERRON, John N. GAETANO, Scott A. AMES, Jonathan S. BROMBERG a Michael EDYE. Laparoscopic donor nephrectomy: intraoperative safety, immediate morbidity, and delayed complications with 500 cases. *Surgical Endoscopy* [online]. 2007, **21**(4), 521–526. ISSN 1432-2218. Dostupné z: doi:10.1007/s00464-006-9021-y
- [21] TOOHER, Rebecca L., M. Mohan RAO, David F. SCOTT, Daryl R. WALL, David M. A. FRANCIS, Franklin H. G. BRIDGEWATER a Guy J. MADDERN. A systematic review of



laparoscopic live-donor nephrectomy. *Transplantation*. 2004, **78**(3), 404–414. ISSN 0041-1337.

- [22] NANIDIS, Theodore G., David ANTCLIFFE, Constantinos KOKKINOS, Catherine A. BORYSIEWICZ, Ara W. DARZI, Paris P. TEKKIS a Vassilios E. PAPALOIS. Laparoscopic versus open live donor nephrectomy in renal transplantation: a meta-analysis. *Annals of Surgery* [online]. 2008, **247**(1), 58–70. ISSN 0003-4932. Dostupné z: doi:10.1097/SLA.0b013e318153fd13
- [23] DEBOUT, Agnes, Yohann FOUCHER, Katy TRÉBERN-LAUNAY, Christophe LEGENDRE, Henri KREIS, Georges MOURAD, Valérie GARRIGUE, Emmanuel MORELON, Fanny BURON, Lionel ROSTAING, Nassim KAMAR, Michèle KESSLER, Marc LADRIÈRE, Alexandra POIGNAS, Amina BLIDI, Jean-Paul SOULILLOU, Magali GIRAL a Etienne DANTAN. Each additional hour of cold ischemia time significantly increases the risk of graft failure and mortality following renal transplantation. *Kidney International* [online]. 2015, **87**(2), 343–349. ISSN 00852538. Dostupné z: doi:10.1038/ki.2014.304
- [24] TŘEŠKA, V., T. REISCHIG, D. HASMAN, B. ČERTÍK, J. MOLÁČEK, R. ŠULC, M. ČECHURA, L. KIELBERGER, K. HOUDEK a V. OPATRNÝ. [Kidney donors after circulatory death (DCD) - single centre experience]. *Rozhledy V Chirurgii: Mesicnik Ceskoslovenske Chirurgicke Spolecnosti*. 2016, **95**(4), 147–150. ISSN 0035-9351.
- [25] KIESLICOVÁ, Eva. *Dárci orgánů*. 2015. ISBN 978-80-7345-451-7.
- [26] KOOTSTRA, G., J. K. KIEVIT a E. HEINEMAN. The non heart-beating donor. *British Medical Bulletin*. 1997, **53**(4), 844–853. ISSN 0007-1420.
- [27] DANOVITCH, Gabriel M., ed. *Handbook of kidney transplantation*. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. A Lippincott Williams & Wilkins handbook. ISBN 978-0-7817-2066-3.
- [28] DION, Marie S., Thomas B. MCGREGOR, Vivian C. MCALISTER, Patrick P. LUKE a Alp SENNER. Hypothermic machine perfusion improves Doppler ultrasonography resistive indices and long-term allograft function after renal transplantation: a single-centre analysis. *BJU International* [online]. 2015, **116**(6), 932–937. ISSN 14644096. Dostupné z: doi:10.1111/bju.12960
- [29] SÁNCHEZ-FRUCTUOSO, A. I., D. PRATS, J. TORRENTE, M. J. PÉREZ-CONTÍN, C. FERNÁNDEZ, J. ALVAREZ a A. BARRIENTOS. Renal transplantation from non-heart beating donors: a promising alternative to enlarge the donor pool. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2000, **11**(2), 350–358. ISSN 1046-6673.
- [30] DETRY, O., H. LE DINH, T. NOTERDAEME, A. DE ROOVER, P. HONORÉ, J.-P. SQUIFFLET a M. MEURISSE. Categories of Donation After Cardiocirculatory Death. *Transplantation Proceedings* [online]. 2012, **44**(5), 1189–1195. ISSN 00411345. Dostupné z: doi:10.1016/j.transproceed.2012.05.001

- [31] LEWIS, Jonathan, James PELTIER, Helen NELSON, William SNYDER, Kristi SCHNEIDER, Dina STEINBERGER, Michael ANDERSON, Alexander KRICHEVSKY, James ANDERSON, Jill ELLEFSON a Anthony D’ALESSANDRO. Development of the University of Wisconsin donation After Cardiac Death Evaluation Tool. *Progress in Transplantation (Aliso Viejo, Calif.)*. 2003, **13**(4), 265–273. ISSN 1526-9248.
- [32] ORTEGA-DEBALLON, Iván, Laura HORNBY a Sam D. SHEMIE. Protocols for uncontrolled donation after circulatory death: a systematic review of international guidelines, practices and transplant outcomes. *Critical Care* [online]. 2015, **19**(1) [vid. 2017-03-14]. ISSN 1364-8535. Dostupné z: doi:10.1186/s13054-015-0985-7
- [33] *Eurotransplant - Statistics* [online]. [vid. 2017-03-20]. Dostupné z: <http://statistics.eurotransplant.org/>
- [34] *NHSBT - ODT Clinical Site - Annual Activity Report* [online]. [vid. 2017-03-20]. Dostupné z: <http://www.odt.nhs.uk/uk-transplant-registry/annual-activity-report/>
- [35] *newsletter\_transplant\_volume\_21\_september\_2016.pdf* [online]. [vid. 2017-03-20]. Dostupné z: [https://www.edqm.eu/sites/default/files/newsletter\\_transplant\\_volume\\_21\\_september\\_2016.pdf](https://www.edqm.eu/sites/default/files/newsletter_transplant_volume_21_september_2016.pdf)
- [36] *Transplantacni-aktivita-v-CR-od-roku-2006-2015.pdf* [online]. [vid. 2017-06-26]. Dostupné z: <http://www.kst.cz/wp-content/uploads/2015/04/Transplantacni-aktivita-v-CR-od-roku-2006-2015.pdf>
- [37] LOCKE, J. E., D. L. SEGEV, D. S. WARREN, F. DOMINICI, C. E. SIMPKINS a R. A. MONTGOMERY. Outcomes of kidneys from donors after cardiac death: implications for allocation and preservation. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* [online]. 2007, **7**(7), 1797–1807. ISSN 1600-6135. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-6143.2007.01852.x
- [38] ALONSO, A., J. G. BUITRON, M. GOMEZ, A. FERNÁNDEZ GARCIA, C. FERNÁNDEZ RIVERA, J. OLIVER, M. LOPEZ, C. TRESANCOS a F. VALDES. Short- and long-term results with kidneys from non-heart-beating donors. *Transplantation Proceedings*. 1997, **29**(1–2), 1378–1380. ISSN 0041-1345.
- [39] DOMÍNGUEZ-GIL, Beatriz, Bernadette HAASE-KROMWIJK, Hendrik VAN LEIDEN, James NEUBERGER, Leen COENE, Philippe MOREL, Antoine CORINNE, Ferdinand MUEHLBACHER, Pavel BREZOVSKY, Alessandro Nanni COSTA, Rafail ROZENTAL, Rafael MATESANZ a EUROPEAN COMMITTEE (PARTIAL AGREEMENT) ON ORGAN TRANSPLANTATION. COUNCIL OF EUROPE (CD-P-TO). Current situation of donation after circulatory death in European countries. *Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation* [online]. 2011, **24**(7), 676–686. ISSN 1432-2277. Dostupné z: doi:10.1111/j.1432-2277.2011.01257.x

- [40] GAGANDEEP, S., L. MATSUOKA, R. MATEO, Y. W. CHO, Y. GENYK, L. SHER, J. CICCARELLI, S. ASWAD, N. JABBOUR a R. SELBY. Expanding the donor kidney pool: utility of renal allografts procured in a setting of uncontrolled cardiac death. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* [online]. 2006, **6**(7), 1682–1688. ISSN 1600-6135. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01386.x
- [41] HOOGLAND, E. R. P., M. G. J. SNOEIJIS, B. WINKENS, M. H. L. CHRISTAANS a L. W. E. VAN HEURN. Kidney transplantation from donors after cardiac death: uncontrolled versus controlled donation. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* [online]. 2011, **11**(7), 1427–1434. ISSN 1600-6143. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03562.x
- [42] SOLA, Ricard, Antonio ALARCÓN, Carlos JIMÉNEZ a Antonio OSUNA. The influence of delayed graft function. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* [online]. 2004, **19 Suppl 3**, iii32-37. ISSN 0931-0509. Dostupné z: doi:10.1093/ndt/gfh1012
- [43] OPELZ, Gerhard a Bernd D??HLER. Multicenter Analysis of Kidney Preservation: *Transplantation* [online]. 2007, **83**(3), 247–253. ISSN 0041-1337. Dostupné z: doi:10.1097/01.tp.0000251781.36117.27
- [44] BELZER, F. O., B. S. ASHBY, P. F. GULYASSY a M. POWELL. Successful seventeen-hour preservation and transplantation of human-cadaver kidney. *The New England Journal of Medicine* [online]. 1968, **278**(11), 608–610. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJM196803142781108
- [45] BELZER, F. O. a J. H. SOUTHARD. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*. 1988, **45**(4), 673–676. ISSN 0041-1337.
- [46] FURUKORI, M., N. MATSUNO, L. T. MENG, T. SHONAKA, Y. NISHIKAWA, K. IMAI, H. OBARA a H. FURUKAWA. Subnormothermic Machine Perfusion Preservation With Rewarming for Donation After Cardiac Death Liver Grafts in Pigs. *Transplantation Proceedings* [online]. 2016, **48**(4), 1239–1243. ISSN 1873-2623. Dostupné z: doi:10.1016/j.transproceed.2015.12.076
- [47] BRUINSMA, Bote G., Tim A. BERENDSEN, Maria-Louisa IZAMIS, Martin L. YARMUSH a Korkut UYGUN. Determination and extension of the limits to static cold storage using subnormothermic machine perfusion. *The International Journal of Artificial Organs* [online]. 2013, **36**(11), 775–780. ISSN 1724-6040. Dostupné z: doi:10.5301/ijao.5000250
- [48] BONCOMPAGNI, E., E. GINI, A. FERRIGNO, G. MILANESI, E. GRINGERI, S. BARNI, U. CILLO, M. VAIRETTI a I. FREITAS. Decreased apoptosis in fatty livers submitted to

subnormothermic machine-perfusion respect to cold storage. *European journal of histochemistry: EJH*. 2011, **55**(4), e40. ISSN 2038-8306.

- [49] HOYER, Dieter P., Anja GALLINAT, Sandra SWOBODA, Jeremias WOHLSCHLÄGER, Ursula RAUEN, Andreas PAUL a Thomas MINOR. Subnormothermic machine perfusion for preservation of porcine kidneys in a donation after circulatory death model. *Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation* [online]. 2014, **27**(10), 1097–1106. ISSN 1432-2277. Dostupné z: doi:10.1111/tri.12389
- [50] HOFFMANN, Tanja a Thomas MINOR. New Strategies and Concepts in Organ Preservation. *European Surgical Research* [online]. 2015, **54**(3–4), 114–126. ISSN 1421-9921, 0014-312X. Dostupné z: doi:10.1159/000369455
- [51] ISSELHARD, W., J. WITTE, H. DENECKE, M. BERGER, J. H. FISCHER a H. MOLZBERGER. Function and metabolism of canine kidneys after aerobic ischemia by retrograde persufflation with gaseous oxygen. *Research in Experimental Medicine. Zeitschrift Fur Die Gesamte Experimentelle Medizin Einschliesslich Experimenteller Chirurgie*. 1974, **164**(1), 35–44. ISSN 0300-9130.
- [52] WEBER, D. a L. C. TUNG. [Preservation of porcine livers by retrograde oxygen persufflation]. *Zeitschrift fur experimentelle Chirurgie, Transplantation, und kunstliche Organe: Organ der Sektion Experimentelle Chirurgie der Gesellschaft fur Chirurgie der DDR*. 1986, **19**(4), 217–220. ISSN 0232-7295.
- [53] ROLLES, K., J. FOREMAN a D. E. PEGG. Preservation of ischemically injured canine kidneys by retrograde oxygen persufflation. *Transplantation*. 1984, **38**(2), 102–106. ISSN 0041-1337.
- [54] ROLLES, K., J. FOREMAN a D. E. PEGG. A pilot clinical study of retrograde oxygen persufflation in renal preservation. *Transplantation*. 1989, **48**(2), 339–342. ISSN 0041-1337.
- [55] ISSELHARD, W., M. BERGER, H. DENECKE, J. WITTE, J. H. FISCHER a H. MOLZBERGER. Metabolism of canine kidneys in anaerobic ischemia and in aerobic ischemia by persufflation with gaseous oxygen. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*. 1972, **337**(2), 87–106. ISSN 0031-6768.
- [56] ISSELHARD, W., H. DENECKE, W. STELTER, M. BERGER, D. SACHWEH, J. WITTE a J. H. FISCHER. Function and metabolism of canine kidneys after aerobic ischemia by orthograde persufflation with gaseous oxygen. *Research in Experimental Medicine. Zeitschrift Fur Die Gesamte Experimentelle Medizin Einschliesslich Experimenteller Chirurgie*. 1973, **159**(4), 288–297. ISSN 0300-9130.
- [57] TRECKMANN, Jürgen W., Andreas PAUL, Stefano SAAD, Julia HOFFMANN, Karl-Heinz WALDMANN, Christoph E. BROELSCH a Manfred NAGELSCHMIDT. Primary organ function of warm ischaemically damaged porcine kidneys after retrograde oxygen persufflation. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of*

*the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* [online]. 2006, **21**(7), 1803–1808. ISSN 0931-0509. Dostupné z: doi:10.1093/ndt/gfl066

- [58] TRECKMANN, Jürgen, Manfred NAGELSCHMIDT, Thomas MINOR, Fuat SANER, Stefano SAAD a Andreas PAUL. Function and quality of kidneys after cold storage, machine perfusion, or retrograde oxygen persufflation: results from a porcine autotransplantation model. *Cryobiology* [online]. 2009, **59**(1), 19–23. ISSN 1090-2392. Dostupné z: doi:10.1016/j.cryobiol.2009.03.004
  
- [59] MOLÁČEK, Jiri, Václav OPATRŇY, Roman MATĚJKA, Jan BAXA a Vladislav TŘEŠKA. Retrograde Oxygen Persufflation of Kidney - Experiment on an Animal. *In Vivo (Athens, Greece)*. 2016, **30**(6), 801–805. ISSN 1791-7549.
  
- [60] TRECKMANN, Jürgen, Thomas MINOR, Stefano SAAD, Arzu OZCELIK, Massimo MALAGÓ, Christoph Erich BROELSCH a Andreas PAUL. Retrograde oxygen persufflation preservation of human livers: a pilot study. *Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* [online]. 2008, **14**(3), 358–364. ISSN 1527-6473. Dostupné z: doi:10.1002/lt.21373

## 5 Přednášková a publikační činnost autora

### 5.1 Přednášky

**Opatrný V.,** Kural T., Daum O., Třeška V.: Objemný, extragastricky rostoucí, gastrointestinální stromální tumor – kazuistika a stručný přehled problematiky GIST, Postgraduální lékařské dny, 4.-6.2. 2014

**Opatrný V.,** Šulc R., Třeška V.: Dislokovaný jícnový stent jako příčina ileózní NPB – kazuistika, XIV. Dny mladých chirurgů, Seč u Chrudimi, 5.-6.6. 2014

**Opatrný V.,** Šulc R., Třeška V.: Aneuryzma vena poplitea, Postgraduální lékařské dny, Plzeň 12.2. 2015

**Opatrný V.,** Matějka R., Hes O., Moláček J., Třeška V.: Perfuze ledvinného štěpu od nebijícího dárce pomocí ihned zahájené mechanické pulzatilní perfuze – experiment na malém zvířeti, Studentská vědecká konference, Plzeň 22.4. 2015

**Opatrný V.,** Třeška V., Moláček J., Čertík B., Čechura M., Šulc R., Houdek K.: Akutní končetinová ischemie – algoritmus diagnostiky a léčby, Večer chirurgické kliniky Plzeň 13.5. 2015

**Opatrný V.,** Třeška V., Moláček J., Reischig T.: Program nebijících dárců na Chirurgické klinice FN Plzeň, Postgraduální lékařské dny, Plzeň 9.-11.2. 2016

**Opatrný V.,** Třeška V., Moláček J., Reischig T.: Program nebijících dárců na Chirurgické klinice FN Plzeň, 56. studentská vědecká konference, Plzeň 13.4. 2016

**Opatrný V.,** Matějka R., Hes O., Moláček J., Třeška V.: Perfuze ledvinného štěpu od nebijícího dárce pomocí ihned zahájené mechanické pulzatilní perfuze – experiment na malém zvířeti, VI. český transplantační kongres, Brno, 31.10. - 1. 11.2016 (3. místo v soutěži autorů do 35 let)

**Opatrný V.,** Třeška V., Moláček J., Čertík B., Čechura M., Šulc R., Houdek K., Zeithaml J.: Akutní končetinová ischemie – algoritmus diagnostiky a léčby, Postgraduální lékařské dny, Plzeň, 7.-9.2. 2017

**Opatrný V.,** Houdek K., Šulc R., Čertík B., Moláček J., Třeška V.: Léčba žilních aneurysmat dolních končetin – přehled literatury a 3 kazuistiky, 42. Angiologické dny Praha, 24.2.-25.2.2017

**Opatrný V.,** Matějka R., Hes O., Moláček J., Třeška V.: Perfuze ledvinného štěpu od dárce po nezvratné zástavě oběhu pomocí ihned zahájené mechanické pulzatilní perfuze – experiment na zvířeti, 57. studentská vědecká konference Plzeň, 17.5. 2017

**Opatrný V.:** Zajímavé kazuistiky, Multioborový seminář – tepenná onemocnění v našem regionu – společná řešení, Prášily 22.9. 2017

**Opatrný V.,** Moláček J.: Novinky v cévní chirurgii – současný pohled na diagnostiku a léčbu onemocnění cév, IV. kongres praktických lékařů v Plzni, 24.-25.11. 2017

Šmíd D., Skalický A., **Opatrný V.**, Zeithaml J., Kubačková D.: Chirurgická léčba vředové choroby gastroduodena, 14. vzdělávací a GE dny, Karlovy Vary, 9.-10.12. 2016

Šmíd D., Geiger J., Veselý V., Šafránek J., Doležal J., Polák M., **Opatrný V.**, Třeška V.: Karcinom žaludku – naše zkušenosti, 40. česko-slovenský chirurgický kongres s mn. účastí, 6. kongres chirurgie jater, žlučových cest a pankreatu, Plzeň, 11.-13.9.2013

Šmíd D., Novák P., Fichtl J., **Opatrný V.**, Bludovský D.: Cerebral salt wasting syndrom (CSWS) – nezvyklá kazuistika z chirurgického pracoviště, Postgraduální lékařské dny, 4.-6.2.2014

Čertík B., Třeška V., Moláček J., Čechura M., Šulc R., Houdek K., **Opatrný V.**, Zeithaml J.: Téměř 2000 karotických endarterektomií v lokoregionální anestézii na CHK v Plzni, VII. Sjezd ČSKVCH, Praha, 14. - 15.11. 2016

Moláček J., Třeška V., Houdek K., Čertík B., Duras P., Baxa J., **Opatrný V.**: Early and late failure of EVAR – surgical and endovascular solution, 65th International Congress of the ESCVS, Bělehrad – SRBSKO, 21.-24.4. 2016

Moláček J., Čertík B., **Opatrný V.**, Reischig T.: Duální transplantace ledvin – pohled chirurga, VI. Český transplantační kongres, Brno, 31.10.-1.11. 2016

Moláček J., Třeška V., Houdek K., Čertík B., Duras P., Baxa J., **Opatrný V.**: Early and late failure of EVAR – surgical and endovascular solution, 6th Munich Vascular Conference 2016, Mnichov – SRN, 1.-3.12.2016

## 5.2 Publikace

**Opatrný V.**, Moláček J., Třeška V., Matějka R., Hes O.: Perfusion of a kidney graft from a DCD (donation after cardiac death) donors based on immediately started pulsatile machine perfusion – an experimental study on a small animal, Transplantation Proceedings, přijato k publikaci, vyjde 06/18 **IF 0.908**

**Opatrný V.**, Třeška V., Moláček J., Tupý R.: Gigantické aneuryzma abdominální aorty a pánevních tepen, Rozhl. Chir., 2016, roč. 95, č. 3, s. 123-125

**Opatrný V.**, Šulc R., Moláček J., Třeška V., Čertík B., Houdek K., Zeithaml J.: Aneuryzma vena poplitea, Rozhl. Chir., 2017, roč. 96, č. 2, s. 88-91.

Třeška V., Duras P., Mírka H., Skalický T., Vyčítal O., Brůha J., **Opatrný V.**, Liška V., Sutnar A.: Transarteriální chemoembolizace pomocí „drug eluting beads“ (TACE DEB) u nemocných s radikálně neodstranitelným hepatocelulárním karcinomem (HCC), Rozhl. Chir., 2014, roč. 93, č. 2, s. 63-69

Moláček J., Třeška V., Baxa J., **Opatrný V.**: Neurogení tumory retroperitonea, Rozhl. Chir., 2014, roč. 93, č. 5, s. 274-277

Šmíd D., Novák P., Fichtl J., **Opatrný V.**, Bludovský D.: Cerebral salt wasting syndrom (CSWS) – nezvyklá kazuistika z chirurgického pracoviště, Rozhl. Chir., 2014, roč. 93, č. 11, s. 549-553

Moláček J., **Opatrný V.**, Matějka R., Baxa J., Třeška V.: Retrograde Oxygen Persufflation of Kidney – Experiment on an Animal, In Vivo. 2016 11-12;30(6):801-805. **IF 0,953**

Moláček J., Brůha J., Baxa J., **Opatrný V.**, Třeška V.: Extragenitální Mülleriánský karcinosarkom infiltrující dolní dutou žílu – kazuistika, Rozhl. Chir., 2016, roč. 95, č. 1, s. 45-47

Třeška V., Reischig T., Hasman D., Čertík B., Moláček J., Šulc R., Čechura M., Kielberger L., Houdek K., **Opatrný V.**: Dárci ledvin po nezvratné zástavě oběhu (DCD) – zkušenosti jednoho centra, Rozhl. Chir., 2016, roč. 95, č. 4, s. 147-150

Moláček J., Třeška V., Čertík B., Čechura M., Šulc R., **Opatrný V.**, Reischig T.: Duální transplantace ledvin – zkušenosti jednoho centra, Rozhl. Chir., 2017, roč. 96, č. 7, s. 291-295

Černá M., **Opatrný V.**, Nosek J., Geiger J., Třeška V., Boudová L., Buriánek V.: Koincidence lymfomu tračníku a biliárního ileu – kazuistika, Rozhl. Chir., 2016, roč. 95, č. 9, s. 377-382

Moláček J., Třeška V., Čertík B., Čechura M., Šulc R., **Opatrný V.**, Reischig T.: Klady a rizika duální transplantace ledvin, Čas. Lék. čes., 2017, 156, 361-363

Moláček J., Třeška V., Čertík B., Čechura M., Šulc R., **Opatrný V.**, Reischig T.: Duální transplantace ledvin – zkušenosti jednoho centra, Rozhl. Chir., 2017, roč. 96, č. 7, s.291-295



## 6 Přílohy

### 6.1 Seznam obrázků

- Obr. 1 - Schéma průběhu odběru kontrolovaného dárce
- Obr. 2 – Experimentální perfuzor vlastní konstrukce
- Obr. 3 - Retrogradní oxygenová persuflace ledviny
- Obr. 4 - Intraarteriální perfúze
- Obr. 5 - Stav po opětovné transplantaci štěpu
- Obr. 6 - Bioptický vzorek IIIA (stav po transplantaci u skupiny s ROP)
- Obr. 7 - Bioptický vzorek IIIB (stav po transplantaci u skupiny s intraarteriální perfúzí)
- Obr. 8 - Svorka na ledvinné stopce
- Obr. 9 - Perfuzní katetr v břišní aortě
- Obr. 10 - Žilní katetr v dolní duté žíle, teplotní čidlo v parenchymu ledviny
- Obr. 11 - Explantovaná ledvina, vlevo promytá mechanicky, vpravo hydrostatickým tlakem
- Obr. 12 – In-situ perfuze pravé ledviny u prasete domácího
- Obr. 13 – Snímání teploty perfundované ledviny termokamerou
- Obr. 14 – Snímání teploty perfundované ledviny termokamerou
- Obr. 15 – Vypreparovaný hilus levé ledviny s cévní svorkou
- Obr. 16 – Ledvina po obnovení průtoku krve, do močovodu zavedený katetr
- Obr. 17 – Dobře promytý parenchym ledviny
- Obr. 18 – Horší promytí ledvinného parenchymu
- Obr. 19 – Nativní parenchym ledviny

### 6.2 Seznam tabulek

- Tab. 1 – Skupiny DCD dle původní MK z roku 1995
- Tab. 2 - Modifikované kategorie DCD
- Tab. 3 – Transplantace od DCD v letech 2011-2015 v zemích Eurotransplantu
- Tab. 4 – Transplantace od DCD dle země v r. 2015
- Tab. 5 – Transplantační aktivita v ČR od roku 2006–2015
- Tab. 6 - Hladina urey v mmol/l u jednotlivých zvířat v časech 0-120 min.

- Tab. 7 – Histologické vyhodnocení odebraných vzorků
- Tab. 8 - Hodnocené parametry u jednotlivých zvířat
- Tab. 9 – Statistické vyhodnocení naměřených hodnot
- Tab. 10 – Naměřené veličiny u skupiny A a B
- Tab. 11 – Statistické vyhodnocení naměřených veličin
- Tab. 12 – Histologické vyhodnocení odebraných vzorků
- Tab. 13 – Naměřené laboratorní parametry v 6. hodině po obnovení průtoku
- Tab. 14 – Statistické zhodnocení laboratorních parametrů v 6. hodině po obnovení průtoku
- Tab. 15 - Hodnoty průtoku ledvinou v ml/min v jednotlivých časových intervalech
- Tab. 16 - Hodnoty perfuzního tlaku v mmHg v jednotlivých časových intervalech
- Tab. 17 - Hodnoty cévního rezistence v jednotlivých časových intervalech
- Tab. 18 - Hodnoty naměřené teploty v parenchymu v jednotlivých časových intervalech
- Tab. 19 – Hodnoty sledovaných markerů poškození ledvinného parenchymu
- Tab. 20 - Hodnoty uvedených markerů v čase 0 až 6 hodin

### 6.3 Seznam grafů

- Graf 1 - Hladina urey v mmol/l u jednotlivých zvířat v časech 0-120 min.
- Graf 2 - Vyjádření kvality propláchnutí ledvin Fisherova exaktního testu pro čas I.
- Graf 3 - Vyjádření kvality propláchnutí ledvin Fisherova exaktního testu pro čas II.
- Graf 4 -Vyjádření kvality propláchnutí ledvin Fisherova exaktního testu pro čas III.
- Graf 5 - Maximální průtok v ml/min u jednotlivých skupin
- Graf 6 - Pokles teploty ve st. C v průběhu perfuze u jednotlivých skupin
- Graf 7 - Histologické hodnocení proplachu štěpů dle škály 1-4
- Graf 8 – Porovnání maximálního průtoku v obou skupinách (ml/min)
- Graf 9 – Porovnání poklesu teploty v obou skupinách (st. C)
- Graf 10 – Porovnání diurezy po obnovení průtoku ledvinou mezi oběma skupinami (ml)
- Graf 11 - Porovnání diurezy po obnovení průtoku ledvinou mezi oběma skupinami (ml)
- Graf 12 – Výsledky histologického vyšetření vzorku po perfuzi (I), odečtené hodnoty na stupnici 1-4

Graf 13 – Porovnání průměrů laboratorních hodnot v 6. hodině obnovení průtoku

Graf 14 – Srovnání hodnot průtoku ledvinou v ml/min v čase mezi oběma skupinami

Graf 15 - Srovnání hodnot perfúzního tlaku v mmHg v čase mezi oběma skupinami

Graf 16 - Srovnání hodnot cévní rezistence uvnitř orgánu v čase mezi oběma skupinami

Graf 17 - Srovnání hodnot teploty uvnitř orgánu ve °C v čase mezi oběma skupinami

Graf 18 – Vývoj markeru NGAL v plazmě v čase 0-6 u skupiny A

Graf 19 - Vývoj markeru NGAL v čase 0-6 u skupiny B

Graf 20 – Vývoj markeru pi-GST v moči v čase 0-6 u skupiny A

Graf 21 – Vývoj markeru pi-GST v moči v čase 0-6 u skupiny B