



Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce

Transplantace tenkého střeva v experimentu

MUDr. Michal Kudla

Praha 2009

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

Školící pracoviště: Klinika transplantační chirurgie

Institut klinické a experimentální medicíny

Autor: MUDr. Michal Kudla

Školitel: Prof. MUDr. Miloš Adamec, CSc.

Oponenti: Prof. MUDr. Jaroslav Hejnal, Dr.Sc.
Klinika kardiovaskulární chirurgie IKEM
Víteňská 1958/9
140 21 Praha 4

Doc. MUDr. Pavel Kohout, PhD.
II.interní klinika
Fakultní Thomayerova nemocnice s poliklinikou
Víteňská 800
140 59 Praha 4-Krč

MUDr. Jaroslav Špatenka, CSc.
Transplantační centrum Fakultní nemocnice v Motole
V úvalu 84
150 06 Praha 5

Obsah

OBSAH	1
SOUHRN	5
1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY	6
2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE.....	7
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	8
3.1 První fáze experimentální práce - Technika transplantace tenkého střeva u potkana.....	8
3.1.1 Odběr štěpu tenkého střeva.....	8
3.1.2 Transplantace štěpu tenkého střeva se systémovou žilní drenáží	9
3.1.3 Skupiny.....	10
3.1.4 Výsledky	10
3.1.5 Závěr	11
3.2 Druhá fáze experimentální práce - Ovlivnění akutní rejekce tenkého střeva podáním gemcitabinu	12
3.2.1 Úvod.....	12
3.2.2 Materiál a metody.....	12
3.2.2.1 Skupiny.....	12
3.2.2.2 Transplantace tenkého střeva	12
3.2.2.3 Histologie.....	12
3.2.3 Výsledky	13
3.2.4 Diskuze	13
3.2.5 Závěr	13
3.3 Třetí fáze experimentální práce- Technika rekonstrukce lymfatických cév v modelu transplantace tenkého střeva u potkana	14
3.3.1 Úvod.....	14
3.3.2 Materiál a metody.....	14
3.3.2.1 Skupiny.....	14
3.3.2.2 Transplantace tenkého střeva s primární rekonstrukcí lymfatických cév	14
3.3.3 Výsledky	16
3.3.4 Závěr	17
3.4 Čtvrtá fáze- preklinická- Chirurgická technika odběru tenkého střeva pro transplantaci	18
3.4.1 Úvod.....	18
3.4.2 Materiál a metody.....	18
3.4.2.1 Charakteristika skupiny	18
3.4.3 Histologické vyšetření	18
3.4.4 Chirurgická technika odběru tenkého střeva	18
3.4.5 Výsledky	19
3.4.6 Diskuze	20
3.4.7 Závěr	20
4 ZÁVĚRY DIZERTAČNÍ PRÁCE.....	21
5 LITERATURA.....	22

6	VLASTNÍ PUBLIKAČNÍ AKTIVITA.....	28
6.1	Články s IF ve vztahu k dizertační práci	28
6.2	Články bez IF ve vztahu k dizertační práci	28
6.3	Přednášky a postery s abstraktem ve vztahu k dizertační práci	28
6.4	Kapitoly v monografiích	29
6.5	Články s IF bez vztahu k dizertační práci	29
6.6	Články bez IF bez vztahu k dizertační práci	29
6.7	Přednášky a postery s abstraktem bez vztahu k dizertační práci.....	30

Souhrn

Transplantace tenkého střeva (small bowel transplantation– SBT) představuje logickou alternativu k definitivní totální parenterální výživě u pacientů s chronickým střevním selháním. V České republice nebyla dosud SBT provedena. Úspěšnému zahájení programu transplantace střeva nevyhnutelně předchází provedení bazálních experimentů a nabytí zkušeností s transplantacemi na zvířecích modelech.

V dizertační práci detailně popisuji chirurgickou techniku transplantace tenkého střeva u potkana. Podařilo se mi dosáhnout srovnatelných výsledků, co se týká operačních časů i přežívání zvířat, s daty publikovanými ve světové literatuře. V druhé části mého experimentu jsem se snažil ovlivnit výskyt akutní rejekce střeva podáváním cytostatika gemcitabinu. Při zvoleném dávkování ale k potlačení rejekce nedošlo. Ve třetí části dizertační práce popisuji chirurgickou techniku rekonstrukce lymfatických cév v modelu SBT u potkana, která by mohla přinést zlepšení výsledků SBT. V poslední, preklinické, části mé práce popisuji první zkušenosti s chirurgickou technikou odběru štěpu tenkého střeva od kadaverózního dárce.

Summary

The small bowel transplantation (SBT) represents reasonable alternative to ultimate total parenteral nutrition of the patient suffering from terminal stage of chronic bowel failure. To date, the small bowel transplantation was not carried out in the Czech Republic. The initial experimental research and gaining experience with transplantations on animal models are inevitable before successful commencement of small bowel transplantation programme.

In my dissertation thesis I am in full details describing the surgical technique of small bowel transplantation in rat.

In comparison with the published data I have succeed to reach rather similar results of operating time and survival of the experimental animals.

In the second part of my experiment I tried to influence the acute rejection of the small bowel graft occurrence by administration of cytostatic agent gemcitabin. The chosen dosage of the remedy did not suppress the rejection.

In the third part I am describing the surgical technique of lymphatic vessels reconstruction in SBT rat model, which might lead to improvement of the SBT outcome.

The last part of my dissertation thesis is preclinical. I am describing the initial experience with surgical technique of small bowel graft harvesting from cadaverous donor.

1. Úvod do problematiky

Transplantace tenkého střeva (small bowel transplantation– SBT) představuje logickou alternativu k definitivní totální parenterální výživě u pacientů s chronickým střevním selháním. Považuje se za život zachraňující zákrok u pacientů se střevním selháním, kteří nemohou být již dále léčeni standardními postupy.

Transplantace střeva je indikována u pacientů s chronickým ireverzibilním střevním selháním, kde lze očekávat smrt do jednoho roku při totální parenterální výživě (total parenteral nutrition- TPN). Ke střevnímu selhání může v zásadě dojít třemi hlavními cestami: a) ztrátou absorpční kapacity (resekce střeva, syndrom krátkého střeva), b) neschopností zajistit normální střevní funkci (dysfunkce enterocytů) a c) ztrátou motility střeva (chronická střevní pseudoobstrukce).

Transplantace střeva může být uskutečněna jako izolovaná transplantace, kdy je přenesen pouze štěp střeva, nebo v kombinaci s jinými nitrobřišními orgány (játra, žludek, pankreas).

V období od 1.dubna 1985 do 31. května 2007 bylo podle posledního registru provedeno 1720 transplantací střeva. V USA bylo provedeno 75,5% transplantací. V České republice nebyla dosud provedena žádná transplantace tenkého střeva.

Institut klinické a experimentální medicíny (IKEM) v Praze představuje vzhledem ke své tradici a zkušenostem s transplantacemi ostatních orgánů pracoviště schopné provádět v budoucnu transplantace tenkého střeva. Před plánovaným klinickým zavedením SBT je však důležité vytvoření experimentálního základu. Nezbytným předpokladem k provedení experimentální SBT je zvládnutí mikrochirurgické techniky transplantace a dosažení odpovídajícího přežívání zvířat. Zlepšení výsledků SBT je možné dosáhnout snížením výskytu rejekce a prodloužením přežití zvířat. Možnou cestou se jeví jednak zkoušení dalších imunosupresivních léků a také zdokonalení chirurgické techniky SBT např. rekonstrukcí lymfatických cév. V klinické SBT je nutným předpokladem úspěšné transplantace získání kvalitního štěpu odebraného při multiorgánovém odběru.

2. Cíle dizertační práce

Cílem **první fáze** experimentální práce a také základním předpokladem pro provádění dalších studií bylo dokonalé zvládnutí mikrochirurgické techniky transplantace tenkého střeva u potkana. Tato metodika nebyla dosud v České republice prováděna a nebyla v české odborné literatuře popsána. Použili jsme modifikovaný model heterotopické SBT s portokavální žilní drenáží, kdy jsme proximální konec štěpu střeva slepě uzavřeli a distální konec vyvedli jako terminální ileostomii.

Ve druhé fázi experimentu byla testována terapeutická efektivita cytostatika gemcitabinu při léčbě akutní rejekce po transplantaci střeva. K tomu nás vedly nadějně výsledky dříve publikovaných studií, které popisovaly imunosupresivní efekt gemcitabinu po transplantaci srdce a ledvin.

Ve třetí fázi experimentální práce jsme se zaměřili na zvládnutí mikrochirurgické techniky transplantace lymfatických cév v modelu transplantace střeva u potkana. Dvě doposud publikované práce prokázaly delší přežití potkanů s rekonstrukcí lymfatik. Dokonalé zvládnutí této techniky je předpokladem dalšího studia tohoto pozitivního efektu.

Ve čtvrté fázi experimentu jsme se zaměřili na technické zvládnutí odběru tenkého střeva u kadaverózního dárce. Tato preklinická část mé práce je součástí přípravy programu transplantace tenkého střeva na našem pracovišti.

3. Experimentální část

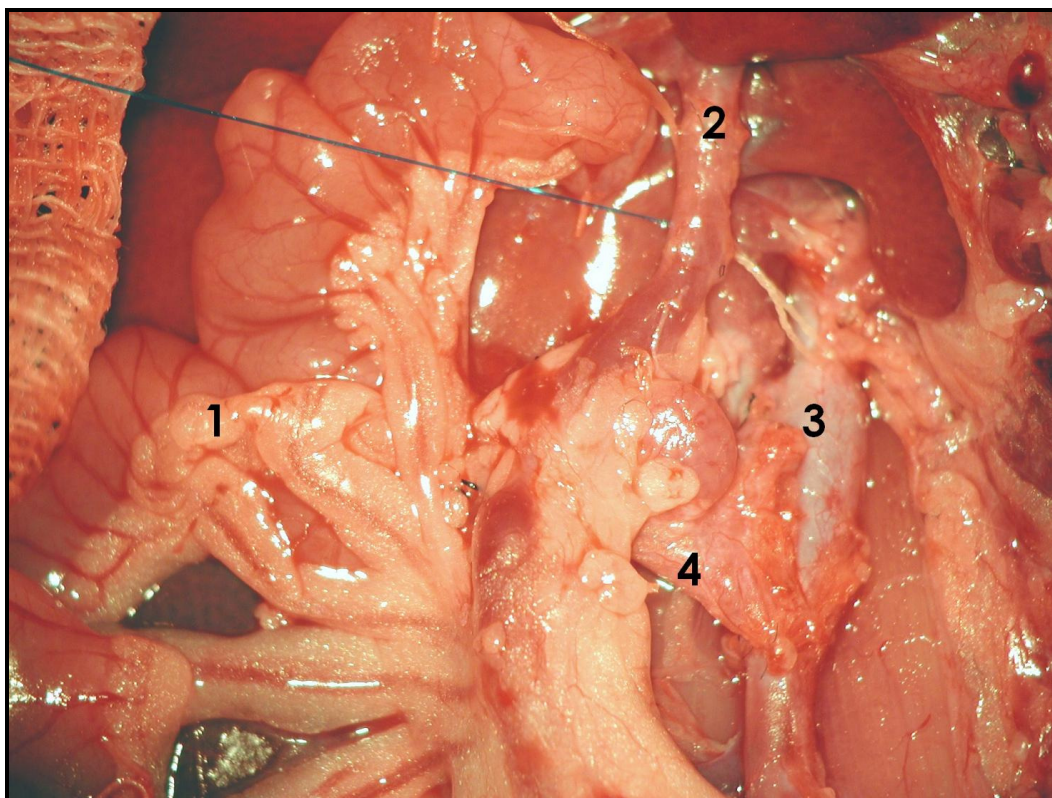
3.1 První fáze experimentální práce - Technika transplantace tenkého střeva u potkana

3.1.1 Odběr štěpu tenkého střeva

K celkové anestezii používáme směs ketaminu a chlorpromazinu. Operaci provádíme pod operačním mikroskopem ÖPMI 9FC, Carl Zeis, Germany se zvětšením v rozmezí 12,5-20x.

Do dutiny břišní pronikneme střední laparotomií. Kličky tenkého střeva zabalíme do teplého vlhkého čtverce a odsuneme vpravo kraniálně. Nůžkami opatrně oddělíme bezcévné blány, které spojují tenké a tlusté střevo. Mezi podvazy přerušíme vasa ileocolica, vasa colica media a vasa colica dextra. Tímto se oddělí tlusté střevo od tenkého.

Následuje uvolnění vena portae. Kličky tenkého střeva, stále zabalené v teplém vlhkém čtverci, přesuneme na levou stranu zvířete. Tímto manévrem se zobrazí vena portae se svým větvením v porta hepatis. Přerušíme vena pylorica a oddělíme portální žílu od okolních tkání (hlavně od pankreatu) v rozsahu od jaterního hilu k odstupu vena lienalis, kterou též mezi podvazy přerušíme. Nyní si určíme potřebnou délku střevního štěpu. V našem experimentu v závislosti na cévním zásobení šlo o 7- 10cm proximálního jejuna. Přerušíme mezi ligaturami radix mezenteria tak, aby zůstalo zachováno cévní zásobení pro střevní štěp. V další fázi odběru se zaměříme na preparaci břišní aorty, kterou tupě oddělíme od okolního tuku a od souběžně probíhající vena cava caudalis. Začínáme asi 2cm nad bifurkací aorty a postupujeme kraniálně až k odstupu arteria mesenterica cranialis (amc). Kraniálně od odstupu amc obejdeme aortu (ještě před odstupem truncus coeliacus) a připravíme se na její podvaz. Nyní štěp tvoří 7-10cm proximálního jejuna na cévní stopce, tvořené vena portae a amc s částí abdominální aorty, a je připraven k perfuzi konzervačním roztokem (obr.1). Podvážeme silonovou ligaturou břišní aortu nad bifurkací, další ligaturu umístíme na aortu nad odstupem amc. Tenkou jehlu zavedeme opatrně do aorty a pomalu propláchneme střevní štěp heparinizovaným fyziologickým roztokem. Kvalitu perfuze hodnotíme makroskopicky mírou odbarvení cév v mezenteriu. K dokonalému promytí štěpu obvykle postačí 3-4 ml roztoku.

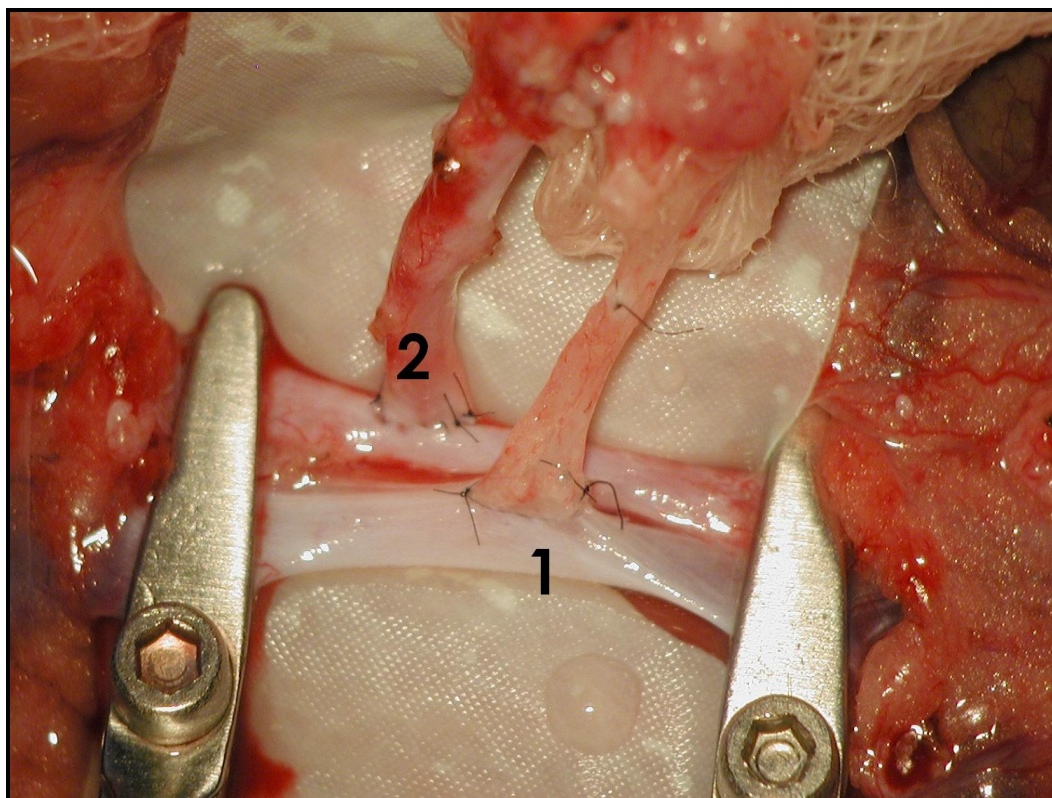


Obr. 1- Pohled na štěp před perfuzí ochranným roztokem (1 – střevní štěp, 2 – vena portae, 3 – aorta, 4 – arteria mesenterica cranialis)

3.1.2 Transplantace štěpu tenkého střeva se systémovou žilní drenáží

K celkové anestezii používáme stejnou kombinaci anestetik jako při odběru. Do dutiny břišní pronikneme střední laparotomií. Postupně pomocí tamponů uvolníme aortu a dolní dutou žílu v oblasti mezi bifurkací a odstupem renálních cév. Postačí uvolnit úsek o délce 2 cm. Štěp zabalený do chladného vlhkého čtverce orientujeme tak, aby nedošlo k přetočení štěpu a ani k útlaku mesenteria. Nyní na uvolněný úsek příjemcovských cév naložíme mikrosvorku a provedeme nejprve incisi na aortě. Založíme dva pólové stehy, které vyvěsíme a poté provedeme dle zásad mikrochirurgické techniky pokračovacím stehem nejprve suturu zadní strany tepenné anastomózy a poté tím samým vláknem i přední stěnu

Po dokončení tepenné anastomózy vybereme místo pro žilní anastomózu na v.cava inferior tak, aby nedošlo k rotaci portální žíly. Žilní anastomózu provádíme stejným způsobem jako tepennou (obr. 2). Po jejím dokončení povolíme nejprve kaudální cévní svorku, potom kraniální a dojde k reperfusi střevního štěpu. Po povolení svorky končí doba tzv. studené ischemie, která začala při proplachu cév dárce perfusním roztokem. Manipulační čas představuje dobu od vyjmutí štěpu z chladného konzervačního roztoku do povolení cévní svorky. Zkontrolujeme průchodnost anastomóz a kvalitu prokrvení celého střevního štěpu. Nyní podvážeme orální konec střeva a aborální konec fixujeme v pravém podbřišku ke kůži jednotlivými stehy (prolen 7-0) jako terminální stomii. Dutinu břišní uzavřeme ve dvou vrstvách.



Obr. č. 2 Dokončení obou cévních anastomóz (1 – žilní, 2 – tepenná), stav před reperfuzí

3.1.3 Skupiny

Po zvládnutí základů mikrochirurgické techniky byli potkani rozděleni do 2 skupin po 11 přeživších zvířatech. Ve skupině A byli zařazeni potkani transplantovaní v roce 2003 a ve skupině B potkani transplantovaní v roce 2004. Sledovali jsme délku dárcovské operace, délku příjemcovské operace a délku manipulačního času (tzn. čas provedení anastomóz).

3.1.4 Výsledky

Výsledky ukazuje tabulka 1. Ve skupině A zemřeli kvůli krvácení bez zjištění příčiny při pitvě 2 příjemci, 0. resp. 2. pooperační den;. Ve skupině B zemřel 1 příjemce kvůli krvácení z anastomóz 0. pooperační den. Úspěšnost transplantace byla ve skupině A 81,8% a ve skupině B 91%.

	počet zvířat	doba dárcovské operace	délka transplantace	manipulační čas
skupina A	11	93,0'	67'	41,6'
skupina B	11	77,8'	50,2'	33,5'
P	Ns	<0,05	<0,001	<0,001

Tab. č. 1 Zhodnocení trvání dárcovské a příjemcovské operace a manipulačního času v obou skupinách

3.1.5 Závěr

Zvládnutí mikrochirurgické techniky transplantace tenkého střeva u potkana je základním předpokladem pro provádění dalších studií. V námi popsaném modelu transplantace jsme dosáhli srovnatelných výsledků s ostatními autory, jak v přežívání zvířat, tak i v délce manipulačního času.

3.2 Druhá fáze experimentální práce - Ovlivnění akutní rejekce tenkého střeva podáním gemcitabinu

3.2.1 Úvod

Gemcitabine (2'2'-difluorodeoxycytidine, dFdC) patří mezi pyrimidinové antimetaboly. Původně byl vyvinut jako antivirotikum. Díky své cytotoxicitě je používán jako adjuvantní lék proti některým solidním nádorům. V posledních několika letech se objevily experimentální studie popisující imunosupresivní účinek dFdC po allogenní transplantaci srdce, ledvin a jater na zvířecím modelu. Toto nás vedlo k vyzkoušení účinku gemcitabinu v prevenci akutní rejekce po transplantaci střeva u potkana.

3.2.2 Materiál a metody

3.2.2.1 Skupiny

Zvířata jsme rozdělili do čtyř skupin (tab.2)

skupina	počet zvířat	kombinace kmenů	imunosuprese
A	6	BN→ LEW	žádná
B	6	BN→ LEW	tacrolimus 1mg/kg/den
C	6	BN→ LEW	gemcitabine 100ug/kg/den
D	6	BN→ LEW	gemcitabine 150ug/kg/den

Tabulka č. 2- Rozdělení zvířat do experimentálních skupin

3.2.2.2 Transplantace tenkého střeva

Průběh transplantace tenkého střeva byl detailně popsán v kapitolách 3.1.1 a 3.1.2. Za technicky úspěšnou transplantaci jsme považovali přežití příjemců po dobu minimálně 3 dnů.

3.2.2.3 Histologie

Histologické preparáty byly vyhodnoceny patologem 3. a 7.den podle stupně rejekce (Tab.3).

stupeň rejekce	histologický nález
0- žádné známky rejekce	nepřítomnost zánětlivých buněk v lamina propria a intraepiteliálně
	žádné známky kryptitidy
	žádné změny architektury klků
1- mírná rejekce	přítomnost zánětlivých buněk v lamina propria
	žádné epiteliální změny
	mírná kryptitida
2- střední rejekce	žádné změny architektury klků
	nález mezi stupněm 1 a 3
	povrchní změny v architektuře klků
3- těžká rejekce	destrukce epitelu až do výše 1/2 klků
	transmurální infiltrace lymfocyty a ostatními elementy
	destrukce epitelu zasahující více než do 1/2 klků

Tabulka č. 3– Grading akutní rejekce střeva

3.2.3 Výsledky

Výsledky přehledně ukazuje tabulka 4.

skupina	imunosuprese	3.den	7.den	p (7.den)
A	žádná	0, 0, 0, 0, 0, 0	1, 1, 2, 2, 3, 3	
B	FK506 1mg/kg/den	0, 0, 0, 0, 1, 1	0, 0, 0, 0, 0, 0	< 0,01 vs. A, C, D
C	dFdC 100µg/kg/den	0, 0, 0, 0, 0, 0	1, 2, 2, 2, 2, 3	ns vs. A, D
D	dFdC 150µg/kg/den	0, 0, 0, 0, 1, 1	1, 2, 2, 2, 2, 2	ns vs. A, C

Tab.č. 4. Histologické nálezy rejekce v jednotlivých skupinách (0-žádná rejekce, 1-mírná rejekce, 2- střední rejekce, 3-těžká rejekce)

3.2.4 Diskuze

V našem modelu jsme zvolili dávkování gemcitabinu 100 a 150 µg/kg/den. Ve všech dosud publikovaných studiích bylo použito účinného dávkování právě v tomto intervalu. Nižší hodnoty nevykazují dostatečný imunopresivní efekt. Vyšší hodnoty nemají své opodstatnění pro vysoký výskyt infekčních komplikací. Zatímco dFdC nebyl schopen zabránit rozvoji akutní rejekce ani v jednom z uvedených dávkování, tacrolimus spolehlivě zamezil vzniku akutní rejekce střevního štěpu. V naší studii jsme standardně nemonitorovali hladiny tacrolimu, protože jsme vycházeli z dávkování užitého v jiných studiích. Bylo by vhodné vyzkoušet dFdC v kombinaci s jiným imunopresivem, které bylo prokázáno jako efektivní v modelu transplantace srdce.

3.2.5 Závěr

Gemcitabine v námi vyzkoušeném dávkování není schopen zabránit rozvoji akutní rejekce v allogenním modelu transplantace tenkého střeva u potkana.

3.3 Třetí fáze experimentální práce- Technika rekonstrukce lymfatických cév v modelu transplantace tenkého střeva u potkana

3.3.1 Úvod

Tenké střevo disponuje velmi dobře vyvinutým lymfatickým systémem, který vedle základních funkcí zajišťuje i resorpci tekutin a tuků ze střeva. Díky obrovskému slizničnímu povrchu a kontaktu s infekčním střevním obsahem je lymfatický systém tenkého střeva dobře vyvinutý.

Model transplantace tenkého střeva se současnou rekonstrukcí lymfatických cest může být vhodným modelem pro studium významu lymfatických cév při orgánových transplantacích.

3.3.2 Materiál a metody

3.3.2.1 Skupiny

Zvířata jsme rozdělili do pěti skupin (tab. 5).

Skupina	počet zvířat	rekonstrukce lymfatik	imunosuprese
A	6	NE	žádná
B	6	ANO	žádná
C	6	NE	FK 506 1mg/kg/den
D	5	ANO	FK 506 0,15mg/kg/den
E	5	NE	FK 506 0,15mg/kg/den

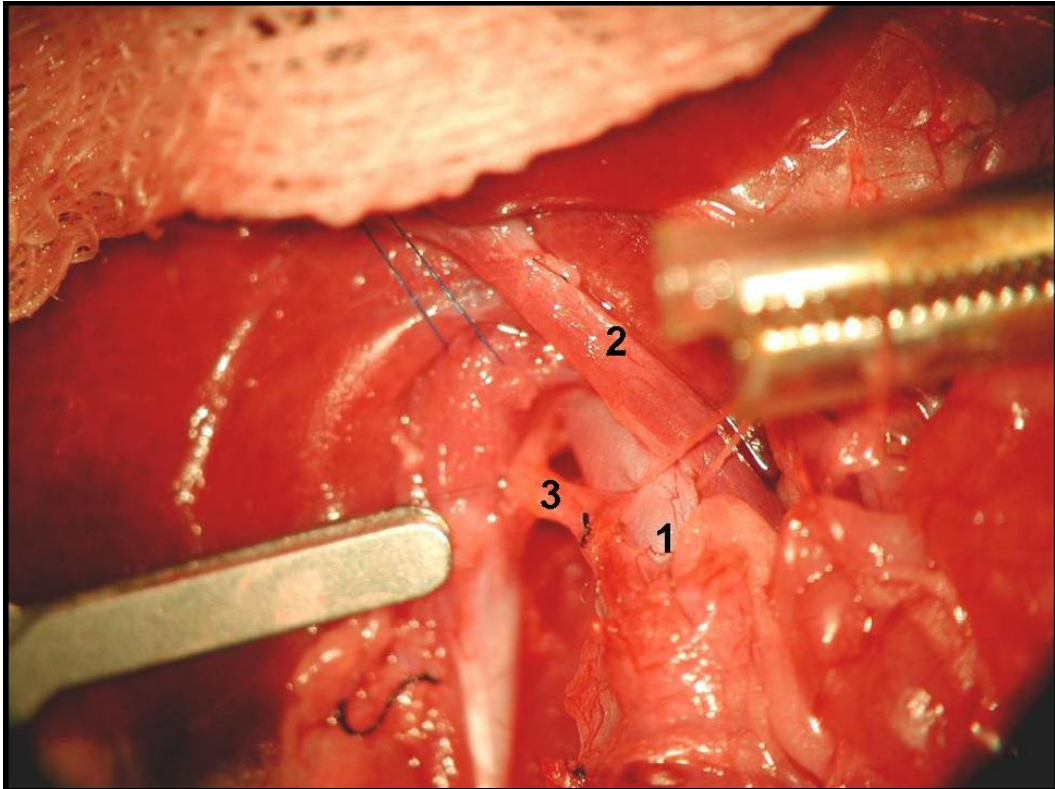
Tabulka č.5 – Charakteristika jednotlivých experimentálních skupin

3.3.2.2 Transplantace tenkého střeva s primární rekonstrukcí lymfatických cév

OPERACE DÁRCE

Operace dárce se v několika bodech odlišuje od postupu při izolované transplantaci tenkého střeva. Počáteční fáze operace, poloha zvířete, použitá anestezie a použité instrumentarium, je shodná s postupem uvedeným v kapitole 3.1.1. Po uvolnění kaudální části aorty kraniálně od bifurkace aorty, uvolnění vena portae a oddělení orálního a aborálního konce jejuna přistoupíme k preparaci lymfatických cév. Pracujeme pod maximálně možným zvětšením mikroskopu. Nejprve opatrně oddělíme aortu od retroperitonea až těsně pod odstup arteria mesenterica cranialis, vyhledáme a mezi ligaturami přerušíme oba trunci lumbales a lymfatický kolektor levé ledviny. Ductus thoracicus preparujeme z pravé strany zvířete. Podvážeme pravou renální tepnu (odstupuje obvykle v úrovni a.mesenterica cranialis) a lymfatický kolektor pravé ledviny. Dále tupě uvolníme aortu od retroperitonea kraniálně až za odstup arteria celiaca. Zde musíme dbát zvýšené opatrnosti, abychom neporanili cysternu chyli, která je fixována k dorzální straně aorty v místě odstupu arteria mesenterica cranialis a ductus thoracicus, který běží po dorsolaterální straně aorty. Kraniálně od odstupu arteria celiaca oddělíme tupě ductus thoracicus od aorty a dále jej preparujeme až k jeho průchodu bránicí. Podvazujeme drobné lumbální tepénky odstupující z aorty. V další fázi podvážeme arteria celiaca společně

s příslušnými lymfatickými. V závěrečné fázi tupě uvolníme od retroperitonea segment aorty i z levé strany. Nyní je štěp připraven k proplachu konzervačním roztokem a je tvořen 7-10cm dlouhým segmentem jejuna s příslušným mesenteriem, vena portae, segmentem aorty od bifurkace kraniálně k odstupe a. celiaca a lymfatickými cévami sbírajícími lymfu ze střevního štěpu a vyúsťujícími do ductus thoracicus (obr. 3).



Obr. č. 3- Stav před perfuzí , uvolněná aorta (1), vena portae (2) a ductus thoracicus (3)

Podvážeme aortu kraniálně od bifurkace a kraniálně od odstupe a.celiaca. Zavedeme perfusní kanylu do aorty nad bifurkací a přerušíme vena portae těsně u vstupu do jater a zahájíme perfuzi cca 3-4ml heparinizovaného fyziologického roztoku. Množství roztoku (obvykle 3-4ml) závisí na kvalitě perfuze, kterou hodnotíme jednak makroskopickým vzhledem střevního štěpu a dále čírostí roztoku odtékajícího cestou v. portae ze střeva. Po skončení perfuze přerušíme aortu v místě zavedené kanyly a kraniálně od podvazu aorty pod bránicí, vyjmeme štěp a umístíme ho do chladného fyziologického roztoku a zvíře utratíme v souladu s Projektem pokusu.

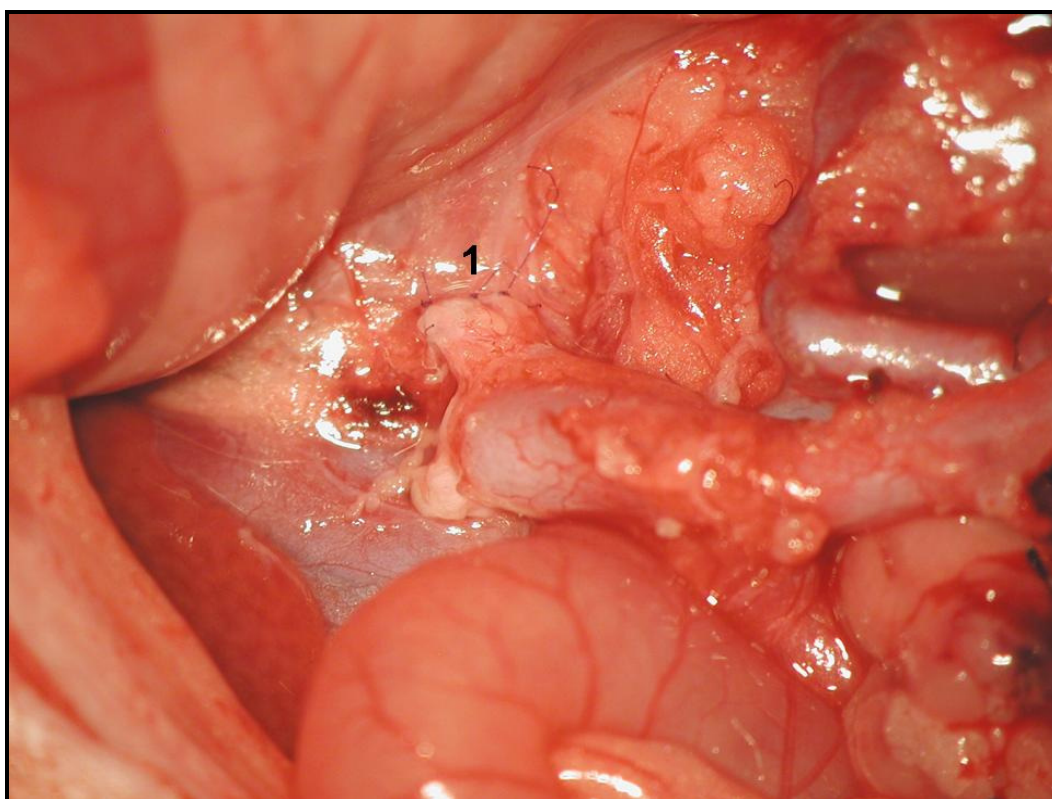
Preparace lymfatických cév prodlouží odběr střevního štěpu v průměru o 45 až 60 minut.

OPERACE PŘÍJEMCE

Počáteční fáze transplantace se neliší od postupu detailně popsaného v kapitole 3.1.2. K rekonstrukci lymfatických cév přistoupíme až po dokončení tepenné i žilní anastomózy a po reperfuzi transplantovaného střeva. Opět pracujeme pod největším možným zvětšením mikroskopu. Tupě si uvolníme cysternu chyli kaudálně od odstupe arteria mesenterica cranialis z aorty. Na její ventrální straně provedeme krátký podélný řez, který se díky retrakci stěny stane oválným. Vysušíme operační pole od vytékající lymfy, abychom

neztratili přehlednost. Nyní provedeme anastomózu mezi dárcovským ductus thoracicus a cysternou chyli příjemce. Používáme steh Vicryl 10-0 nebo 11-0 a dbáme na to, aby sutura nebyla pod napětím, a aby nedošlo k rotaci ductus thoracicus. Jako první zakládáme steh na pravý horní okraj otvoru v cysterna chyli a dále pokračujeme proti směru hodinových ručiček jednotlivými stehy, které uzlíme vně anastomózy. Před založením posledních dvou stehů si překontrolujeme ještě průchodnost anastomózy tenkou kanylou. Obvykle postačuje 4-6 jednotlivých stehů. Anastomóza nemusí být zcela vodotěsná, protože tlak v lymfatickém systému je podstatně nižší než v tepenném i žilním systému a případné drobné netěsnosti se brzy spontánně uzavřou. Během šití je vhodné operační pole i lumen ductus thoracicus průběžně proplachovat, aby nedošlo ke slepení stěn a k následné stenóze anastomózy (obr. 4). Na závěr můžeme ještě připojit adaptační steh kraniálního podvázaného konce dárcovské aorty k retroperitoneu, čímž snížíme tah v lymfo-lymfatické anastomóze.

Rekonstrukce lymfatických cév prodlouží dobu transplantace o 30-45 minut.



Obr. č. 4- Stav po dokončení tepenné, žilní a lymfatické (1) anastomózy

3.3.3 Výsledky

Skupina	Tacrolimus- IS	Lymfatika	Histologie 3.den	Histologie 7.den
A	0	0	0,0,0,0,0,0	1,1,2,2,3,3
B	0	ANO	0,0,0,0,0,0	1,1,2,2,2,2
C	1mg/kg/den	0	0,0,0,0,1,1	0,0,0,0,0,0
D	0,15mg/kg/den	ANO	0,0,0,0,0,0	1,1,1,1,2
E	0,15mg/kg/den	0	0,0,0,0,1	1,1,1,2,2

Tabulka č.7- Histologické nálezy-rekonstrukce lymfatik (0- žádná rejekce, 1- mírná rejekce, 2- střední rejekce, 3- těžká rejekce

3.3.4 Závěr

Uvedený model transplantace tenkého střeva s rekonstrukcí lymfatických cév na potkanovi ukazuje, že mikrochirurgická primární rekonstrukce odtoku lymfy je reprodukovatelná a technicky možná. Je základem pro další experimenty a po vysvětlení a pochopení mechanismu pozitivního efektu na přežití štěpů nalezne pravděpodobně své uplatnění i v klinické transplantaci střeva.

3.4 Čtvrtá fáze- preklinická- Chirurgická technika odběru tenkého střeva pro transplantaci

3.4.1 Úvod

Vzhledem k zamýšlenému zahájení programu klinické transplantace střeva jsme se zaměřili na dokonalé zvládnutí chirurgické techniky odběru střevního štěpu.

3.4.2 Materiál a metody

3.4.2.1 Charakteristika skupiny

Uskutečnili jsme odběr tenkého střeva celkem u šesti kadaverózních dárců, kteří splňovali kritéria pro multiorgánový odběr. Charakteristiku skupiny ukazuje tabulka č. 8.

Dárce	Pohlaví	Věk	Příčina smrti
1	Ž	68	subarachnoidální krvácení
2	Ž	56	subarachnoidální krvácení-ruptura aneurysmatu
3	M	32	maligní edém mozku-hypoxické poškození mozku
4	M	71	kraniotrauma
5	Ž	61	CMP krvácivá
6	Ž	58	asfyxie

Tab.č. 8- Charakteristika skupiny kadaverózních dárců k odběru tenkého střeva

3.4.3 Histologické vyšetření

U vzorků jsme hodnotili stupeň jejich morfologického poškození podle Parkovy klasifikace, jak ukazuje tabulka č.9.

stupeň poškození	histologický nález
0	normální nález
1	poškození klků pouze na jejich vrcholu
2	nález mezi 1 a 3
3	výrazné poškození architektiky klků dosahující až k jejich bazi

Tab. č.9 Ischemické poškození střevní sliznice

3.4.4 Chirurgická technika odběru tenkého střeva

Střední laparotomií od processus xyphoideus k symfyse si vytvoříme dostatečný přístup do dutiny břišní. Nejprve provedeme důkladnou revisi celé břišní dutiny. Preparací v retroperitoneu a uvolněním kolon descendens včetně hepatální flexury si ozřejmíme a

připravíme k pozdější kanylaci subrenální úsek aorty a dolní duté žíly. Mezi ligaturami přerušíme dolní mesenterickou tepnu. Kocherovým manévrem mobilizujeme duodenum a ozřejmíme z laterální strany odstup horní mezenterické tepny (AMS- arteria mesenterica superior) a subhepatální průběh dolní duté žíly. Uvolníme proximální část horní mezenterické tepny v rozsahu 3-5cm, abychom zjistili případný odstup akcesorní pravé jaterní tepny. Kraniálně od horní mezenterické tepny si obejdeme aortu a připravíme se na případné okamžité zahájení perfuze orgánů (např. při oběhové nestabilitě pacienta). V případě multiorganového odběru, jehož součástí je i odběr jater, je třeba aortu obejít těsně pod bránicí. Skeletizujeme mezenterium v oblasti ileocékálního přechodu a podvážeme větve vasa ileocolica jdoucí k céku, zachováme odstup pro terminální ileum. Závěsnou ligaturou si označíme kaudální konec střevního štěpu těsně před ileocékálním přechodem. Podvážeme a mezi ligaturami přerušíme vasa colica dextra a vasa colica media. Deliberujeme D3 úsek duodena a 1. jejunální kličku, kde si opět závěsnou ligaturou označíme proximální konec štěpu. Dalším krokem je preparace proximálního úseku vena portae, která vzniká soutokem vena mesenterica superior a vena lienalis. Podvazujeme drobné žíly jdoucí do vena mesenterica superior z duodena a z pankreatu. Střevní štěp nyní tvoří celé tenké střevo od první jejunální kličky až k oblasti terminálního ilea na cévní stopce tvořené arteria mesenterica superior a vena portae. Nyní jsme připraveni ke společné perfuzi ledvin a tenkého střeva. Po celkovém podání heparinu (250j/ kg) infrarenálně zakanylujeme aortu a dolní dutou žílu. Zaskokujeme či podvážeme aortu nad odstupem arteria mesenterica superior a zahájíme společnou perfuzi střeva a ledvin roztokem Custodiolu. Obvyklé množství spotřebovaného perfuzního roztoku činí 3-5 litrů a je závislé na dokonalé kvalitě perfuze štěpu tenkého střeva, která se projeví odbarvením mezenteria i střevní stěny. Po skončení perfuze zvyklým způsobem explantujeme obě ledviny. Lineárním staplerem či mezi ligaturami přerušíme proximální a distální konec střevního štěpu, odebereme horní mezenterickou tepnu včetně terčíku aorty a přerušíme horní mezenterickou žílu v oblasti soutoku s v. lienalis a štěp vyjmeme a umístíme do roztoku Custodiolu.

Po naložení svorky na aortu a po zahájení perfúze začíná doba studené ischemie orgánu.

3.4.5 Výsledky

Studená ischemie	JEJUNUM		ILEUM	
	stupeň poškození	průměr	stupeň poškození	průměr
1hod	0,1,0,0,0,0	0,1	0.0.0.0.0.0	0
6hod	2,2,3,2,2,2	2,1	1,1,2,1,0,2	1,1
9hod	2,2,2,3,2,2	2,1	0,2,2,2,1,1	1,3
12hod	3,3,2,2,3,2	2,5	3,2,1,2,2,2	2
24hod	3,3,2,2,3,2	2,5	2,2,3,2,2,2	2,1

Tab. č. 10 Výsledky histologie- konzervační poškození

3.4.6 Diskuze

Hlavním cílem naší práce bylo dokonalé zvládnutí techniky odběru štěpu tenkého střeva z kadaverózního dárce v rámci přípravy klinického programu transplantace střeva na našem pracovišti. Dalším cílem bylo zjistit, zda se liší citlivost jejunu a ilea k ischemickému poškození. Má to význam jednak pro volbu úseku střeva při odběru střeva pro příbuzenskou transplantaci a také je udáván vyšší výskyt rejekcí u orgánů postižených ischemicko-reperfusním poškozením. Z našich výsledků vyplývá, že není rozdíl v senzitivitě na ischemické poškození jednotlivých úseků tenkého střeva (jejunum vs. ileum). Dále jsme zjistili, že po uplynutí 6 hodinové studené ischemie již nedochází k tak rychlému prohloubení morfologických změn střeva. Tento výsledek je překvapivý, protože naše předchozí pokusy na potkaních ukazují výrazný nárůst ischemického poškození mezi šestou a devátou hodinou, proto jsme volili i časy odběrů vzorků s důrazem na 9.hodinu. V klinice se udává doba studené ischemie pro transplantaci tenkého střeva v rozmezí 6-12hodin.

3.4.7 Závěr

Zvládli jsme chirurgickou techniku odběru tenkého střeva pro transplantaci z kadaverózního dárce, která je nezbytným předpokladem k provedení klinické transplantace tenkého střeva. Neprokázali jsme rozdíl v citlivosti na ischemické poškození mezi jejunem a ileem.

4 Závěry dizertační práce

V první fázi experimentální práce jsme zvládli mikrochirurgickou techniku transplantace tenkého střeva u potkana, což je základním předpokladem pro provádění dalších studií. V námi popsaném modelu transplantace jsme dosáhli srovnatelných výsledků s ostatními autory, jak v přežívání zvířat, tak i v délce manipulačního času.

Ve druhé fázi experimentu jsme zjistili, že cytostatikum gemcitabine v námi vyzkoušeném dávkování není schopno zabránit rozvoji akutní rejekce v allogenním modelu transplantace tenkého střeva u potkana.

Ve třetí fázi experimentální práce jsme zvládli mikrochirurgickou techniku transplantace lymfatických cév v modelu transplantace střeva u potkana. Je tím vytvořen základ pro další experimenty a po vysvětlení a pochopení mechanismu pozitivního efektu rekonstrukce lymfatických cév na přežití štěpů nalezne pravděpodobně své uplatnění i v klinické transplantaci střeva.

Ve čtvrté fázi experimentu jsme si osvojili techniku odběru tenkého střeva z kadaverozního dárce. Neprokázali jsme rozdíl v citlivosti na ischemické poškození mezi jejunem a ileem. Tato část je jedním z posledních kroků před chystaným zavedením klinické transplantace tenkého střeva na našem pracovišti.

5 Literatura

1. Carrel, A. The transplantation of organs. A preliminary communication. *JAMA*, 1905; 45: 1645-6.
2. Lillehei, R., Goot, B., Miller, F.: The psychological response of the small bowel of the dog to ischemia including prolonged in vitro preservation of the bowel with successful replacement and survival. *Ann Surg*, 1959, 150: 543- 60.
3. Monchik, GJ., Russell, PS.: Transplantation of small bowel in the rat: technical and immunological considerations. *Surgery*, 1971, 70: 693-702.
4. Kort, WJ., Westbroek, DL., MacDicken, I., Lameijer, LD. Orthotopic total small bowel transplantation in the rat. *Eur Surg Res*. 1973;5(2):81-9.
5. Deltz, E., Thiede, A. Possibilities of small bowel transplantation. *Dtsch Med Wochenschr*. 1986 Jan 31;111(5):163-6.
6. Szymula von Richter, TP., Baumeister, RG., Hammer, C. Microsurgical reconstruction of the lymphatic and nerve system in small bowel transplantation: the rat model, first results. *Transpl Int*. 1996;9 Suppl 1:S286-9.
7. Lillehei, RC., Idezuki, Y., Feemster, JA., Dietzman, RH., Kelly, WD., Merkel, FK., Goetz, FC., Lyons, GW., Manax, WG.. Transplantation of stomach, intestine, and pancreas: experimental and clinical observations. *Surgery*. 1967 Oct;62(4):721-41.
8. Braun, F., Broering, D., Faendrich, F. Small intestine transplantation today. *Langenbecks Arch Surg*. 2007; 392: 227-38.
9. Vianna, RM., Mangus, RS., Tector, AJ. Current status of small bowel and multivisceral transplantation. *Adv Surg*. 2008; 42: 129-50.
10. Goulet, O. Intestinal transplantation *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 1999; 2: 315-21.
11. Buchman, AL., Scolapio, J., Fryer, J. AGA technical review on short bowel syndrome and intestinal transplantation. *Gastroenterology*, 2003, 124(4): 1111-34.
12. Ruiz, P., Kato, T., Tzakis, A. Current Status of Transplantation of the Small Intestine. *Transplantation* 2007, 83: 1-6.
13. Vianna, R. M., Mangus, R. S., Hector, A. J. Current status of small bowel and multivisceral transplantation. *Adv Surg* 2008, 42: 129-150.
14. Data z registru United network for organ sharing. <http://www.unos.org>.
15. Grant, D., Abu-Elmagd, K., Reyes, J., Tzakis, A., Langnas, A., Fishbein, T., Goulet, O., Farmer, D. 2003 Report of the Intestinal Transplant Registry- A New Era Has Dawned. *Ann Surg*, 2005, 241: 607-13.
16. Fishbein, T.M., Gondolesi, G.E., Kaufman, S.S. Intestinal transplantation for gut failure. *Gastroenterology* 2003, 124(6): 1615-28.
17. Platz, K.P., Braun, F., Fändrich, F., Kremer, B., Mueller, A.R. Il-2 antagonists: the European perspective. *Transplant Proc* 2005, 37(4): 1783-4.
18. Tzakis, AG., Kato, T., Nishida, S., Levi, DM., Tryphonopoulos, P., Madariaga, JR., De Faria, W., Nery, JR., Regev, A., Vianna, R., Miller, J., Esquenazi, V., Weppler, D., Ruiz, P. Alemtuzumab (Campath-1H) combined with tacrolimus in intestinal and multivisceral transplantation. *Transplantation* 2003, 75: 1512-17.
19. Fishbein, TM., Florman, S., Gondolesi, G., Schiano, T., LeLeiko, N., Tschernia, A. Intestinal transplantation before and after the introduction of sirolimus. *Transplantation* 2002, 73(10): 1538-42.

20. Turner, D., Martin, S., Ngan, BY., Grant, D., Sherman, PM. Anastomotic ulceration following small bowel transplantation. *Am J Transplant* 2006, 6(1): 236-40.
21. Paramesh, AS., Grosskreutz, C., Florman, SS., Gondolesi, GE., Sharma, S., Kaufman, SS., Fishbein, TM. Thrombotic microangiopathy associated with combined sirolimus and tacrolimus immunosuppression after intestinal transplantation. *Transplantation* 2004, 77(1): 129-31.
22. Behrend, M. Adverse gastrointestinal effects of mycophenolate mofetil: aetiology, incidence and management. *Drug Safety* 2001, 24(9): 645-63.
23. Wu, T., Abu-Elmagd, K., Bond, G., Nalesnik, MA., Randhawa, P., Demetris, AJ. A schema for histologic grading of small intestine allograft acute rejection. *Transplantation* 2003, 75(8): 1241-48.
24. Ruiz, P., Weppler, D., Nishida, S., Kato, T., Selvaggi, G., Levi, D., Bejarano P, Khaled A, Tryphonopoulos P, Tuteja S, Garcia M, Tzakis A. International grading scheme for acute rejection in small bowel transplantation: implementation and experience at the University of Miami. *Transplant Proc* 2006, 38(6): 1683-4.
25. Mueller, AR., Pascher, A., Platz, KP., Braun, F., Fandrich, F., Reyes, N. Immunosuppression following intestinal transplantation. *Transplant Proc* 2004, 36(2): 325-28.
26. Pascher, A., Radke, C., Dignass, A., Schulz, RJ., Veltzke-Schlieker, W., Adler, A., Sauer, IM., Platz, K., Klupp, J., Volk, HD., Neuhaus, P., Mueller, AR. Successful infliximab treatment of steroid and OKT3 refractory acute cellular rejection in two patients after intestinal transplantation. *Transplantation* 2003, 76(3): 615-18.
27. Abu-Elmagd, KM., Zak, M., Stamos, JM., Bond, GJ., Jain, A., Youk, AO., Ezzelarab, M., Costa, G., Wu, T., Nalesnik, MA., Mazariegos, GV., Sindhi, RK., Marcos, A., Demetris, AJ., Fung, JJ., Reyes, JD. De novo malignancies after intestinal and multivisceral transplantation. *Transplantation* 2004, 77: 1719-25.
28. Nishida, S., Kato, T., Burney, T., Levi, D., Nery, J., Madariaga, J., Mittal, N., Weppler, D., Ruiz, P., Tzakis, A. Rituximab treatment for posttransplantation lymphoproliferative disorder after small bowel transplantation. *Transplant Proc* 2002, 34: 957.
29. Míšek, I., Červený, Č., Knotek, Z. Chov a využití pokusných zvířat. Institut celoživotního vzdělávání, Praha, 1999: 99-104.
30. Unthank, JL., Bohlen, HG. Lymphatic pathways and role of valves in lymph propulsion from small intestine. *Am J Physiol* 1988, 254: 389-98.
31. Kudla, M., Janotová, D. Experimentální model transplantace lymfatických cév. *Rozhl Chir* 2005, 84: 422-25.
32. Zhong, R., Grant, D., Sutherland, F., Wang, P., Chen, H., Lo, S., Stiller, C., Duff, J. Refined technique for intestinal transplantation in the rat. *Microsurgery* 1991, 12: 268-74.
33. Murase, N., Demetris, AJ., Furuya, T., Todo, S., Fung, JJ., Starzl, TE. Comparison of the small intestine after multivisceral transplantation with the small intestines transplanted with portal or caval drainage. *Transplant Proc* 1992, 24: 1143-44.
34. Schraut, WH., Abraham, VS., Lee, KW. Portal versus caval venous drainage of small bowel allografts: Technical and metabolic consequences. *Surgery* 1986, 99: 193-98.

35. Ozcay, N., Fryer, J., Grant, D., Freeman, D., Garcia, B., Zhong, R. Budesonide, a locally acting steroid, prevents graft rejection in a rat model of intestinal transplantation. *Transplantation* 1997, 63: 1220-25.
36. Kawabe T, Nakai T, Okuno K, Shindo K, Yasutomi M. Small bowel transplantation in rats using a venous cuff technique. *Microsurgery*. 1998;18(5):344-47.
37. Nakao A, Mitsuoka N, Shen SD, Tanaka N, Kobayashi E. Rat small intestinal transplantation: a comparison of the cuff and hand-suture methods. *Acta Med Okayama*. 2000; 54(6): 259-64.
38. Lopes, MF., Cartucho, DJ., Cabrita, AM., Patricio, JA. Techniques of intestinal transplantation in rat. *Microsurgery* 1998, 18: 424-29.
39. Bergamo, C., Baraldini, V., Gianotti, L., Socci, C., Braga, M., DiCarlo, V. First steps of a new team in small bowel transplantation in rats. *Transplant Proc* 1994, 26: 1568.
40. Kaye, SB. Gemcitabine: current status of phase I and II trials. *J Clin Oncol* 1994, 12: 1527-31.
41. Philip PA, Zalupski MM, Vaitkevicius VK, Arlauskas P, Chaplen R, Heilbrun LK, Adsay V, Weaver D, Shields AF. Phase II study of gemcitabine and cisplatin in the treatment of patients with advanced pancreatic carcinoma. *Cancer*. 2001; 92: 569-77
42. Lee SM, James LE, Qian W, Spiro S, Eisen T, Gower NH, Ferry DR, Gilligan D, Harper PG, Prendiville J, Hocking M, Rudd RM. Comparison of gemcitabine and carboplatin versus cisplatin and etoposide for patients with poor-prognosis small cell lung cancer. *Thorax*. 2009; 64: 75-80.
43. Heinemann V. Role of gemcitabine in the treatment of advanced and metastatic breast cancer. *Oncology*. 2003; 64: 191-206
44. Pasetto, LM., D'Andrea, MR., Falci, C., Monfardini, S. Gemcitabine in advanced biliary tract cancers. *Crit Revi in Oncol Hematol* 2007; 61: 230-42.
45. Hussain M, Vaishampayan U, Smith DC. Novel gemcitabine-containing triplets in the management of urothelial cancer. *Semin Oncol*. 2002; 29(1 Suppl 3): 20-4.
46. Fruscella E, Gallo D, Ferrandina G, D'Agostino G, Scambia G. Gemcitabine: current role and future options in the treatment of ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2003; 48: 81-8.
47. Huang P, Chubb S, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W. Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res*. 1991; 51: 6110-7.
48. Margreiter, R., Fischer, M., Roberts, K., Schmid, T., Hittmair, A., Schirmer, M., Geisen, F., Tiefenthaler, M., Konwlinka, G. Gemcitabine- a novel immunosuppressive agent- prevents rejection in a rat cardiac transplantation model. *Transplantation* 1999, 68: 1051-53.
49. Jung, F., Wilker, S., Maas, E., Brendel, MD., Grimm, H., Korom, S. Gemcitabine in models of acute and accelerated rejection. *Transplant Proc* 2002, 34: 1420-21.
50. Jeske, HC., Oberladstätter, J., Schneeberger, S., Hittmair, A., Klima, G., Obrist, P., Ollinger, R., Roberts, K., Schubert, H., Steurer, W., Margreiter, R. Gemcitabine with cyclosporine or with tacrolimus exerts a synergistic effect and induces tolerance in the rat. *Transplantation* 2003, 76: 1046-52.
51. Mergental, H., Kriz, J., Honsova, E., Kudla, M., Pantoflicek, T., Tcherentsova, K., Kocik, M., Saudek, F., Ryska, M. Gemcitabine does not prevent acute rejection of the transplanted liver in rats. *Transpl Int* 2005, 17: 687-91.

52. McDiarmid, SV., Farmer, DG., Kuniyoshi, JS., Robert, M., Khadavi, M., Shaked, A., Busutil, RW. The correlation of intragraft cytokine expression with rejection in rat small intestine transplantation. *Transplantation* 1994, 58: 690-97.
53. Plunkett, W., Huang, P., Gandhi, V. Preclinical characteristics of gemcitabine. *Anticancer Drugs* 1995, 6 (Suppl 6):7-13.
54. Ricordi, C., Murase, N., Rastellini, C., Behboo, R., Demetris, AJ., Starzl, TE. Indefinite survival of rat islet allografts following infusions of donor bone marrow without cytoablation. *Cell Transplant* 1996, 5: 53-55.
55. Pepper, MS., Skobe, M. Lymphatic endothelium: morphological, molecular and functional properties. *J Cell Biol* 2003, 163: 209-13.
56. Mayerson, HS. The lymphatic system. *Sci Am.* 1963 Jun;208:80-90.
57. Nikles, SA., Heath, TJ. Pathways of lymph flow through intestinal lymph nodes in the horse. *Anat Record* 1992, 232: 126-32.
58. Azzali, G., Gatti, R., Orlandini, G. Macrophage migration through the endothelium in the absorbing peripheral lymphatic vessel of the small intestine. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1990, 22: 273-80.
59. Schmid- Schönbein, GW. Microlymphatics and lymph flow. *Physiol Rev* 1990, 70: 987-1028.
60. Tsuchiya, M., Oda, M. Recent advances in organ microcirculation research. *Int Angiol* 1987, 6: 253-70.
61. Barrowman, JA. Gastrointestinal lymph and lymphatics in Dingle, JT., Gordon, JL. *Research monographs in cell and tissue physiology.* Elseviers Science publishers 1985.
62. Loiterman, DL., Bleicher, MA. Chylous ascites: An etiology of peritonitis in infancy. *J Pediatr Surg* 1985, 20: 538-40.
63. Waldmann, TA., Steinfeld, JL., Dutcher, TF., Davidson, JO., Gordon, RS. The role of the gastro-intestinal system in idiopathic hypoproteinemia. *Gastroenterology* 1961, 41: 197-207.
64. Browse, NL., Wilson, NM., Russo, F., Al-Hassan, H., Allen, DR. Aetiology and treatment of chylous ascites. *Br J Surg* 1992, 79: 1145-50.
65. Wilk P, Karipineni R, Dreiling DA, Danese C. Studies of the effects of blockage of intestinal lymphatics. III. Temporary isolation of lymphedematous bowel from intestinal continuity. *Am J Gastroenterol.* 1975; 63: 400-3.
66. Battistini, C., de Franco, S., Experimental mesenteric microlymphaticovenous anastomoses. In Olszewski, W. *Handbook of Microsurgery* 1984, CRC Press, Boca Raton, Florida, Vol II: 157.
67. Ji, RC. Characteristics of lymphatic endothelial cells in physiological and pathological conditions. *Histol Histopathol.* 2005; 20:155-75.
68. Danese, C., Howard, JM., Bower, R. Regeneration of lymphatic vessels: a radiographic study. *Ann Surg* 1962, 156(1): 61-70.
69. Greco, KV., Lara, PF., Oliveira- Filho, RM., Greco, RV., Sudo- Hayashi, LS. Lymphatic regeneration across an incisional wound: Inhibition by dexamethasone and aspirin, and acceleration by a micronized purified flavonoid fraction. *Eur J Pharmacol* 2006, 551: 131-42.
70. Bellman, S., Oden, B. Regeneration of surgically divided lymph vessels; an experimental study on the rabbit's ear. *Acta Chir Scand* 1959, 116: 99-113.

71. Göltner, E., Gass, P., Haas, JP., Schneider, P. The importance of volumetry, lymphoscintigraphy and computer tomography in the diagnosis of brachial edema after mastectomy. *Lymphology* 1988, 21: 134-43.
72. Olszewski, W. On the pathomechanism of development of postsurgical lymphedema. *Lymphology* 1973, 6: 35-51.
73. Altorfer J, Clodius L. Chronic experimental lymphedema of the extremities pathological changes. *Experientia*. 1976;32(7):823-4.
74. Földi, E., Földi, M. Physiologie und Pathophysiologie des Lymphgefäßsystems in Földi, M., Kubik, S. *Lehrbuch der Lymphologie*. G. Fischer, Stuttgart, Jena, New York 1993: 219.
75. Goot, B., Lillehei, RC., Miller, FA. Mesenteric lymphatic regeneration after autografts of small bowel in dogs. *Surgery* 1960, 18:571-75.
76. Kocandrlje, V., Houttuin, E., Prohaska, J.V. Regeneration of the lymphatic system after transplantation of the small intestine. *Rozhl Chir*. 1966; 45: 261-5.
77. Schier, F., Üner, A., Waldschmidt, J. Microlymphography of spontaneous lymph vessel anastomosis in small bowel transplantation in the rat. *J Pediatr Surg* 1991, 26: 1239-42.
78. Schmid, T. Koeroezsi, G., Klima, G., Margreiter, R. Lymphatic regeneration after small bowel transplantation. *Transplant Proc* 1990, 22: 2060-61.
79. Olivier, Cl., Rettori, R., Olivier, C., Camilleri, JP. Interruption of lymphatic vessels and its consequences in total homotransplantation of the small intestine and right side of colon in man. *Lymphology* 1972, 5: 24-31.
80. Stamford, WP., Hardy, MA. Fatty acid absorption in jejunal autograft and allograft. *Surgery* 1974, 75: 496-502.
81. Rotman, N., Michot, F., Hay, JM., Fagniez, PL. Lymphatic regeneration following intestinal transplantation in the pig. In Deltz, E., Thiede, H., Hamelman, H. *Small bowel transplantation : Experimental and clinical fundamentals*. Springer Verlag, Berlin 1986: 34.
82. Kalima, TV. Experimental lymphatic obstruction in the ileum. *Ann Chir Gynaecol Fenn* 1970, 59: 187-201.
83. Popielski, L. Zur Physiologie des Plexus Coeliacus (Experimentelle Untersuchungen). *Arch Anat Physiol* 1903: 338-60.
84. Sigalet, DL., Kneteman, NM., Fedorak, RN., Kizilisik, AT., Thomso, AB.. Intestinal function following allogenic small intestinal transplantation in the rat. *Transplantation* 1992, 53: 264-71.
85. Pirenne, J., Williams, JG., Kim, S., Fryer, J., Benedetti, E., Hakim, NS., Médot, M., Najarian, JS., Gruessner, RWG., Dunn, DL. Importance of lymphoid tissue for survival of small bowel allografts. *Transplant Proc* 1995, 27: 1359-60.
86. Schraut, WH., Lee, KK., Sitrin, M. Recipient growth and nutritional status following transplantation of segmental small-bowel allografts. *J Surg Res* 1987, 43: 1-9.
87. Macpherson, AJ., Smith, K. Mesenteric lymph nodes at the center of immune anatomy. *J Exp Med* 2006, 203: 497-500.
88. Worbs, T., Boke, U., Yan, S., Hoffmann, MW., Hintzen, G., Bernhardt, R., Förster, R, Pabst, O. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med* 2006, 203: 519-27.

89. Macpherson, AJ., Uhr, T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 2004, 303: 1662-65.
90. Kanokogi, H., Ko, S, Kanehiro, H., Hisanaga, M., Tatekawa, Y., Kanamura, T., Okayama, J., Nakajima, Y. Immune responses of graft mesenteric lymph node in small bowel transplantation. *J Surg Res* 2004, 116: 269-76.
91. Adams, RH., Alitalo, K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, 8: 464-78.
92. Kellersman, R., Zhong, R., Kryochi, H., Garcia, B., Grant, DR. Reconstruction of the intestinal lymphatic drainage after small bowel transplantation. *Transplantation* 2000, 69: 10-16.
93. Murase, N., Demetris, AJ., Matsuzaki, T., Yagihashi, A., Todo, S., Fung, J., Starzl, TE. Long survival in rats after multivisceral versus isolated small bowel allotransplantation under FK506. *Surgery* 1991, 110: 87-98.
94. Kim, PC., Levy, GA., Craig, M., Cullen, J., Cohen, Z. Characterisation of immune responses in different lymphoid compartments during small intestinal allograft rejection. *Am J Surg* 1990, 159: 161-6.
95. Murase N, Demetris AJ, Kim DG, Todo S, Fung JJ, Starzl TE: Rejection of multivisceral allografts in rats: a sequential analysis with comparison to isolated orthotopic small- bowel and liver grafts. *Surgery* 1990, 108: 880-89.
96. Benoit JN, Zawieja DC: Gastrointestinal lymphatics. In: Johnson LR, ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*. New York : Raven Press, 1994: 1669.
97. Park, PO., Wallander, J., Tufveson, G., Haglund, U. Cold ischemia and reperfusion injury in model of small bowel transplantation in the rat. *Eur Surg Res* 1991, 23: 1-8.
98. Boros, P, Bromberg JS. New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant*. 2006, 6: 652-58.
99. Baláž, P., Matia, I., Jackanin, S., Pomfy, M., Froněk, J., Ryska, M. Morphological changes of small bowel graft in Wistar rats after preservation injury. *Bratisl Lek Listy*. 2004; 105: 62-64.

6 Vlastní publikační aktivita

6.1 Články s IF ve vztahu k dizertační práci

Kudla M., Kriz J, Janotova D, Girman P, Mergental H, Kocik M, Honsova E, Adamec M. The effect of gemcitabine in the treatment of rejection in experimental small intestine transplantation. Folia Biol (Praha). 2005;51(3):82-4. **IF 0,719.**

Mergental H, Kriz J, Honsova E, Kudla M., Pantoflicek T, Tcherentsova K, Kocik M, Saudek F, Ryska M. Gemcitabine does not prevent acute rejection of the transplanted liver in rats. Transpl Int. 2005 Jan;17(11):687-91. **IF 1,797**

6.2 Články bez IF ve vztahu k dizertační práci

Kudla M., Baláž P, Oliverius M, Adamec M. Chirurgická technika odběru tenkého střeva pro transplantaci. Rozhl Chir. 2007; 86(6):297-9.

Kudla M., Baláž P, Adamec M. Transplantace tenkého střeva. Čas. Lék. Čes., 2005; 144: 438-440.

Kudla M., Janotová D. Experimentální model transplantace lymfatických cév. Rozhl. Chir.,2005; 84(8): 422-425.

Kudla M. Ischemické a reperfuční poškození štěpu tenkého střeva. Bulletin HPB,2001;9(1):12-13.

Oliverius M, Balaz P, Kudla M., Valsamis A, Cap J, Adamec M. Small bowel graft revascularization in experiment. Bratisl Lek Listy. 2009;110(2):65-8.

Baláž P, Kudla M., Lodererová A, Oliverius M, Adamec M. Preservation injury of the small bowel graft in clinical small bowel transplantation. Bratisl Lek Listy. 2007;108(12):516-8.

Baláž P, Kudla M., Lodererová A, Oliverius M, Adamec M. Preservation injury to the human small bowel graft: jejunum vs. ileum. Ann Transplant. 2007;12(1):15-8.

Baláž P, Kudla M., Adamec M. Small bowel transplantation in experimental and clinical medicine. Bratisl Lek Listy, 2005; 106 (6-7): 193-195.

Baláž P, Kudla M., Matia I, Froněk J, Ryska M. Model of small bowel transplantation with systemic venous drainage in rats. Ann Transplant. 2003;8(4):36-8.

6.3 Přednášky a postery s abstraktem ve vztahu k dizertační práci

Kudla M., Oliverius M., Baláž P., Valsamis A., Adamec M. Transplantace tenkého střeva. XXIV. kongres Společnosti klinické výživy a intenzivní metabolické péče, 2-3/08, Hradec Králové

Kudla M., Baláž P., Janotová D. Gemcitabine does not prevent acute rejection of the transplanted small bowel in rats. IX. International Small Bowel transplantation Symposium, Brussels, 7/2005, Belgium.

Kudla M., Baláž P, Adamec M. Transplantace tenkého střeva- současný stav ve světě a v ČR. XI. Symposium o morfologii a funkci střeva, 4/2005, Staré Splavy.

Kudla M., Janotová D. Model rekonstrukce lymfatických cév při allogenní transplantaci tenkého střeva u potkana. IV. Český chirurgický kongres s mezinárodní účastí, 9/2004, Hradec Králové, Pardubice.

Baláž P, Kudla M, Lodererová, A, Oliverius M, Adamec M. Human small bowel graft procurement and evaluation of the preservation injury in clinical experimental study. Xth International Small Bowel Transplant Symposium, Santa Monica, 8/07, USA.

Baláž P, Kudla M, Matia I. Preservation injury of the jejunal grafts and its modulation by Custodiol (HTK) and University of Wisconsin (UW) perfusion solutions in Wistar rats. IX. International Small Bowel transplantation Symposium, Brussels, 7/2005, Belgium.

Baláž P, Kudla M, Oliverius M, Matia I, Adamec M, Pomfy M. Experimentální transplantace tenkého střeva- naše zkušenosti. 6.kongres České transplantáčnické společnosti, 10/2004, Praha.

6.4 Kapitoly v monografiích

Kudla M. Transplantace lymfatických cév. In Baláž P, Mergental H a spol. Transplantace v experimentu. Praha: Galén, 2006. Kapitola 2.7, s. 113-117. ISBN 80-7262-366-4.

Kudla M, Janoušek L, Peregrin J.H. Chirurgické komplikace po transplantaci ledvin a jejich řešení. In Viklický O, Janoušek L, Baláž P. Transplantace ledviny v klinické praxi. Praha. Grada, 2008. Kapitola 10, s. 153-172. ISBN 978-80-247-2455-3.

6.5 Články s IF bez vztahu k dizertační práci

Roubicek T, Bartlova M, Krajickova J, Haluzikova D, Mraz M, Lacinova Z, Kudla M, Teplan V, Haluzik M. Increased production of proinflammatory cytokines in adipose tissue of patients with end-stage renal disease. Nutrition. 2009 Jul-Aug;25(7-8):762-8. **(IF v r. 2008 2,28)**

Teplan V, Schüch O, Racek L, Lecian D, Haluzik M, Kudla M, Vitko S. Asymmetric dimethylarginine in obesity after renal transplantation. J Ren Nutr 2008; 18(6):513-20. **IF 1,565.**

Zelenka J, Leníček M, Muchová L, Jirsa M, Kudla M, Balaž P, Zadinová M, Ostrow JD, Wong RJ, Vítek L. Highly sensitive method for quantitative determination of bilirubin in biological fluids and tissues. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2008 Mar 18; **IF 2,935.**

Gbelcová H, Leníček M, Zelenka J, Knejzlík Z, Dvoráková G, Zadinová M, Poucková P, Kudla M, Balaz P, Ruml T, Vítek L. Differences in antitumor effects of various statins on human pancreatic cancer. Int J Cancer. 2008 Mar 15;122(6):1214-21. **IF 4.693**

Teplan V, Schüch O, Racek J, Siroka R, Haluzik M, Kudla M, Vitko S. Asymmetric dimethylarginine and adiponectin after renal transplantation: role of obesity. J Ren Nutr. 2008 Jan;18(1):154-7. **IF 1,565**

6.6 Články bez IF bez vztahu k dizertační práci

Kudla M, Baláž P, Sixta B, Oliverius M. Endoskopická transgastrická drenáž pseudocysty pankreatu jako příčina pozdní perforace střeva. Rozhl Chir. 2006; 85(6):290-2.

- 6.7 Přednášky a postery s abstraktem bez vztahu k dizertační práci
Kudla M, Janoušek L, Brůžková I, Bartošová K, Adamec M. Odběr ledvin ze žijícího dárce za účelem transplantace. XIV. Pražské chirurgické dny 2007, Praha
- Kudla M, Paděra J, Oliverius M, Adamec M. Krytí defektu břišní stěny u pacientky po opakovaných nitrobřišních operacích. XIII. Pražský chirurgický den 2006, Praha
- Kudla M, Janoušek L, Adamec M, Trunečka P. Polycystosa jako indikace k transplantaci jater. XXXIII. Májové hepatologické dny 2005, 5/2005, Karlovy Vary.