

KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

a

INSTITUT KLINICKÉ A EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Téma: Transplantace tenkého střeva v experimentu

Doktorand: MUDr. Michal Kudla
Studijní program: Postgraduální doktorské studium v biomedicině
Oborová rada: 10 - Experimentální chirurgie
Fakulta: 1.lékařská fakulta Karlovy univerzity
Školící pracoviště: Klinika transplantační chirurgie
Vídeňská 1958/9, 140 21 Praha 4
Školitel: Prof. MUDr. Miloš Adamec, CSc.

Praha 2009

Obsah

Obsah.....	1
Poděkování.....	5
Zkratky použité v textu.....	6
1. Úvod do problematiky.....	7
1.1 Úvod.....	7
1.2 Historie transplantace střeva.....	7
1.2.1 Historie transplantace střeva v experimentu.....	7
1.2.2 Historie SBT v klinice.....	8
1.3 Indikace a kontraindikace k SBT.....	9
1.4 Typy transplantací.....	11
1.5 Klinické výsledky.....	14
1.6 Imunosuprese po SBT.....	15
1.7 Komplikace po transplantaci střeva.....	16
1.7.1 Chirurgické komplikace.....	16
1.7.2 Rejekce štěpu.....	17
1.7.2.1 Akutní rejekce.....	17
1.7.2.2 Chronická rejekce.....	18
1.7.3 Infekce.....	18
1.7.4 Potransplantační lymfoproliferativní onemocnění.....	19
2. Cíle dizertační práce.....	20
3. Experimentální část.....	21
3.1 První fáze experimentální práce - Technika transplantace tenkého střeva u potkana.....	21
3.1.1 Anatomie tenkého střeva u potkana.....	21
3.1.2 Cévní zásobení střeva u potkana.....	22
3.1.3 Lymfatická drenáž tenkého střeva u potkana.....	22
3.1.4 Modely transplantace tenkého střeva u potkana.....	23
3.1.4.1 Heterotopická SBT.....	24
3.1.4.2 Ortotopická SBT se systémovou žilní drenáží.....	24
3.1.4.3 Ortotopická SBT s portální žilní drenáží.....	24
3.1.4.4 SBT s použitím „cuff technique“.....	25
3.1.4.5 Obnovení kontinuity trávicího traktu.....	25
3.1.5 Odběr štěpu tenkého střeva.....	25
3.1.6 Transplantace štěpu tenkého střeva se systémovou žilní drenáží.....	29
3.1.7 Pooperační péče.....	35
3.1.8 Skupiny.....	35
3.1.9 Výsledky.....	36
3.1.10 Diskuze.....	37
3.1.11 Závěr.....	38
3.2 Druhá fáze experimentální práce - Ovlivnění akutní rejekce tenkého střeva podáním gemcitabinu.....	39
3.2.1 Úvod.....	39
3.2.2 Materiál a metody.....	39
3.2.2.1 Zvířata.....	39
3.2.2.2 Skupiny.....	40

3.2.2.3	Transplantace tenkého střeva.....	40
3.2.2.4	Pooperační péče.....	40
3.2.2.5	Histologie.....	40
3.2.2.6	Statistická analýza	43
3.2.3	Výsledky.....	43
3.2.4	Diskuze	43
3.2.5	Závěr.....	45
3.3	Třetí fáze experimentální práce- Technika rekonstrukce lymfatických cév v modelu transplantace tenkého střeva u potkana	46
3.3.1	Úvod	46
3.3.2	Význam lymfatického systému.....	47
3.3.2.1	Fyziologické funkce lymfatického systému	47
3.3.2.2	Mikrocirkulace v intersticiu	47
3.3.2.3	Imunologické funkce	48
3.3.3	Anatomické základy.....	48
3.3.3.1	Lymfatické kapiláry.....	48
3.3.3.2	Lymfatické kolektory	49
3.3.3.3	Lymfo- venózní spojky	49
3.3.4	Odtok lymfy ze střeva u potkana.	49
3.3.5	Patofyziologie lymfatického systému.....	49
3.3.5.1	Patogeneze lymfedému.....	49
3.3.5.2	Lymfedém tenkého střeva	50
3.3.5.3	Reakce lymfatických cév na jejich přerušení.....	51
3.3.5.3.1	Regenerační schopnost lymfatických cév	51
3.3.5.3.2	Spontánní regenerace lymfatických cév po transplantaci tenkého střeva..	52
3.3.6	Materiál a metody.....	53
3.3.6.1	Zvířata.....	53
3.3.6.2	Skupiny	53
3.3.6.3	Transplantace tenkého střeva s primární rekonstrukcí lymfatických cév.....	53
3.3.6.4	Pooperační péče.....	57
3.3.6.5	Histologie.....	57
3.3.6.6	Statistické zhodnocení.....	57
3.3.7	Výsledky.....	57
3.3.8	Diskuze	58
3.3.9	Závěr.....	61
3.4	Čtvrtá fáze- preklinická- Chirurgická technika odběru tenkého střeva pro transplantaci.....	62
3.4.1	Úvod	62
3.4.2	Materiál a metody.....	62
3.4.2.1	Charakteristika skupiny	62
3.4.2.2	Histologické vyšetření	63
3.4.2.3	Chirurgická technika odběru tenkého střeva.....	63
3.4.3	Výsledky.....	66
3.4.4	Diskuze	67
3.4.5	Závěr.....	68
4.	Závěry dizertační práce	69
5.	Literatura.....	70

6.	Vlastní publikační aktivita.....	81
6.1	Články s IF ve vztahu k dizertační práci	81
6.2	Články bez IF ve vztahu k dizertační práci	81
6.3	Přednášky a postery s abstraktem ve vztahu k dizertační práci	82
6.4	Kapitoly v monografiích.....	83
6.5	Články s IF bez vztahu k dizertační práci	84
6.6	Články bez IF bez vztahu k dizertační práci	84
6.7	Přednášky a postery s abstraktem bez vztahu k dizertační práci	85

Poděkování

Chtěl bych poděkovat všem, kteří mi pomohli při vzniku této práce, zvláště pak:

Prof. MUDr. Milošovi Adamcovi CSc., mému školiteli a přednostovi Kliniky transplantační chirurgie IKEM, který mi poskytl odbornou pomoc, dostatek času i prostoru při uskutečňování všech potřebných experimentů. Byl i tím, kdo mě motivoval a posouval vpřed zvláště v dobách, kdy jsem již pomalu přestával věřit, že bych tuto práci mohl dokončit.

Prof. Dr. Dr. med. Rüdigerovi Baumeisterovi, přednostovi Kliniky plastické chirurgie a chirurgie ruky, Klinikum Grosshadern, München, který mi umožnil strávit jeden nezapomenutelný rok v Institutu pro chirurgický výzkum při Univerzitní klinice v Mnichově a který mě přivedl k tématu rekonstrukce lymfatických cév.

MUDr. Janu Křížovi PhD., MUDr. Ivanu Matiovi PhD., MUDr. Peterovi Girmanovi PhD. a MUDr. Štefanovi Kukurovi, kolegům a kamarádům, kteří byli prvními čtenáři této práce a kteří mi pomáhali zvláště při korekturách této dizertační práce.

Nesmím zapomenout ani na prof. MUDr. Miroslava Rysku, CSc., pod kterým jsem tuto práci zahajoval a který byl mým prvním školitelem a ani na všechny své kolegy z Kliniky transplantační chirurgie IKEM, kteří mě zastupovali v době, kdy jsem prováděl experimenty.

Zvláštní dík patří celé mé rodině, která mě neúnavně podporovala v dobách vzniku této práce.

Zkratky použité v textu

Ab- protilátka

AIDS- syndrom získané imunodeficiencie

amc- arteria mesenteria cranialis

AMS- arteria mesenteria superior

ATG- antilymfocytární globulin

CMV- cytomegalovirus

CyA- cyklosporin A

dFdC- 2'2'- difluorodeoxycytidine

EBV- virus Epstein- Barrové

GVHR- graft versus host disease reaction- reakce štěpu proti hostiteli

HIV- virus lidské imunodeficiencie

IFN- γ - interferon γ

IL2- interleukin 2

IL6- interleukin 6

i.m.- intramuskulární aplikace

MLNs- mezenterální lymfatické uzliny

ns- bez statistické významnosti

OKT3- monoklonální protilátka anti-CD3

PTLD- potransplantační lymfoproliferativní onemocnění

SBS- short bowel syndrom- syndrom krátkého střeva

SBT- small bowel transplantation- transplantace tenkého střeva

SIRS- systemic inflammatory response syndrome - syndrom systémové zánětové odpovědi organismu

TNF- α - tumor necrosis factor alfa

TPN- total parenteral nutrition- úplná parenterální výživa

Tx- transplantace

VMS- vena mesenteria superior

1. Úvod do problematiky

1.1 Úvod

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.

U dětí, které tvoří více než polovinu příjemců, indikace zahrnují především syndrom krátkého střeva, primární poruchy střevní motility a enzymatické defekty střevní sliznice. U dospělých představuje nejčastější indikaci k transplantaci střeva neadaptibilní syndrom krátkého střeva po subtotální či totální resekcii. Pacienti odkázaní na totální parenterální výživu bez onemocnění jater jsou kandidáty izolované transplantace střeva. Pacienti s ireverzibilním střevním selháním a současným onemocněním jater jsou indikováni k život zachraňující kombinované transplantaci jater a střeva. Sporné zůstává načasování transplantace. Pokročilé formy onemocnění jsou spjaty s horšími výsledky a s vysokou mortalitou na čekací listině vlivem progredujícího jaterního selhání nebo infekčních komplikací. Z tohoto důvodu by měli být kandidáti k transplantaci střeva včas zařazeni na čekací listinu.

Postupné zlepšování výsledků transplantace střeva dává naději, že se tato metoda brzy stane standardním způsobem léčby pacientů s ireverzibilním střevním selháním.

1.2 Historie transplantace střeva

1.2.1 Historie transplantace střeva v experimentu

První zmínky o experimentální transplantaci tenkého střeva se datují do počátku minulého století, kdy Alexis Carrel provedl první transplantaci segmentu střeva u psa (1).

Mezi další průkopníky transplantace střeva počítáme Lilleheie, který roku 1959 poprvé popsal metodiku ortotopické transplantace střeva u psa (2). Transplantaci střeva u potkana publikovali jako první Monchik a Russell v roce 1971, kteří uskutečnili heterotopickou SBT se systémovou žilní drenáží (3). O dva roky později provedl Kort se spolupracovníky první ortotopickou transplantaci střeva s portální žilní drenáží (4). V roce 1986 popsali Deltz a

Thiede první dvoudobou transplantaci střeva (v 1. době heterotopická SBT, ve 2. době po 3 týdnech odstranění původního nativního střeva a ortotopická lokalizace transplantovaného štěpu) (5). Szymula von Richter v roce 1996 poprvé rekonstruoval lymfatické a nervové pleteně v modelu SBT na potkanovi (6).

V současné době se většina experimentů provádí na potkanovi či na myši. Důvodem jsou jednak přesně imunologicky definované inbrední kmeny, které slouží k imunologickým studiím, dále relativní jednoduchost chovu a manipulace se zvířaty. V neposlední řadě i ekonomické aspekty, které favorizují potkany a myši před většími zvířaty.

1.2.2 Historie SBT v klinice

Zřejmě první transplantace tenkého střeva u člověka byla provedena Detterlingem v Bostonu v roce 1964, kdy však příjemce zemřel 12 hodin po transplantaci. První publikovaná klinická SBT se datuje do roku 1967 (7). Do roku 1970 bylo uskutečněno celkem 7 SBT. Vlivem nedokonalé imunosuprese však nejdelsí přežití příjemce činilo pouze 76 dní. Tyto špatné výsledky zapříčinily odklon od metody SBT. Výrazného pokroku a delšího přežívání pacientů bylo dosaženo až rozvojem dokonalejší imunosuprese.

V období mezi lety 1985 a 1990 bylo provedeno 15 izolovaných transplantací střeva s užitím cyklosporinu. V této době byla transplantována i nejdéle doposud žijící pacientka (Paříž 1989). Další důležité historické mezníky představuje provedení 1. multiviscerální transplantace (Pittsburgh 1983), první transplantace ze žijícího dárce (Kiel 1987), první kombinovaná transplantace játra a střeva (Ontario, 1988)(8). Dalšího výrazného zlepšení výsledků SBT bylo docíleno se zavedením tacrolimu do klinické praxe. Toto imunosupresivum zůstává dodnes základem téměř všech imunosupresivních schémat po transplantaci střeva. Největší světová centra také díky němu v současné době dosahují přes 80% 1-ročního přežívání pacientů i štěpů (9).

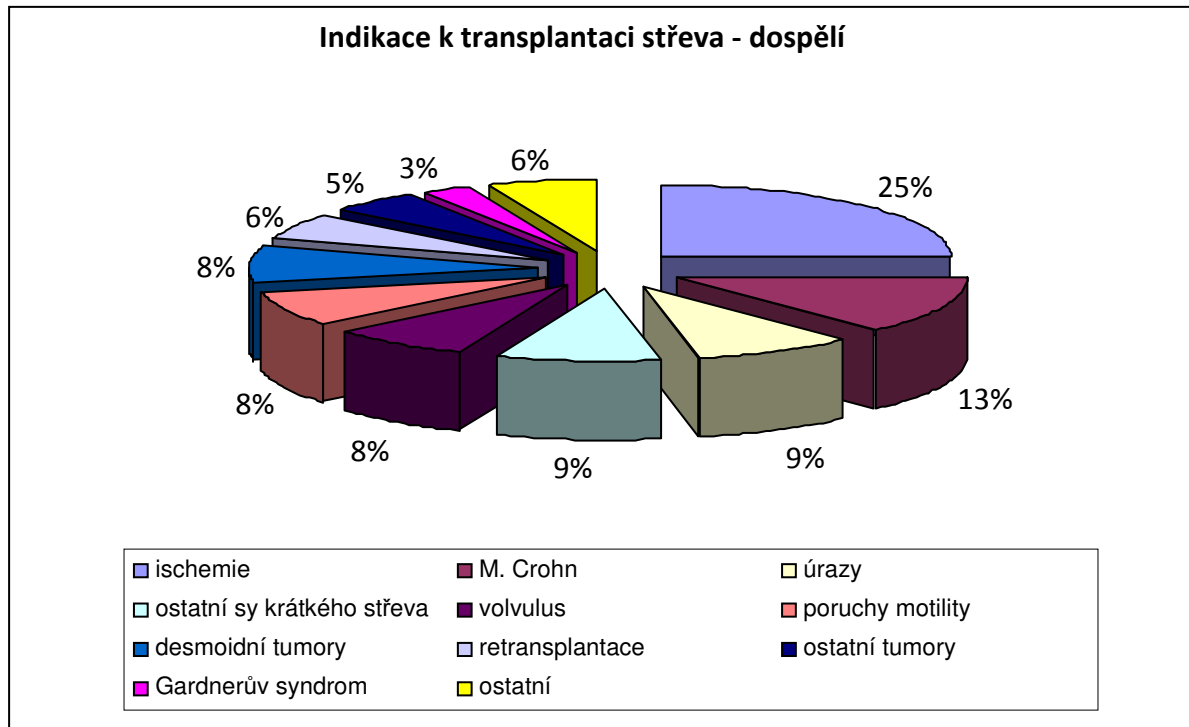
1.3 Indikace a kontraindikace k SBT

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). Střevní selhání je definováno jako neschopnost střeva udržet pozitivní nutriční a/nebo tekutinovou a elektrolytovou bilanci. Chronický stav střevního selhání je dán neschopností adaptačního potenciálu střeva udržet tuto bilanci v budoucnu.

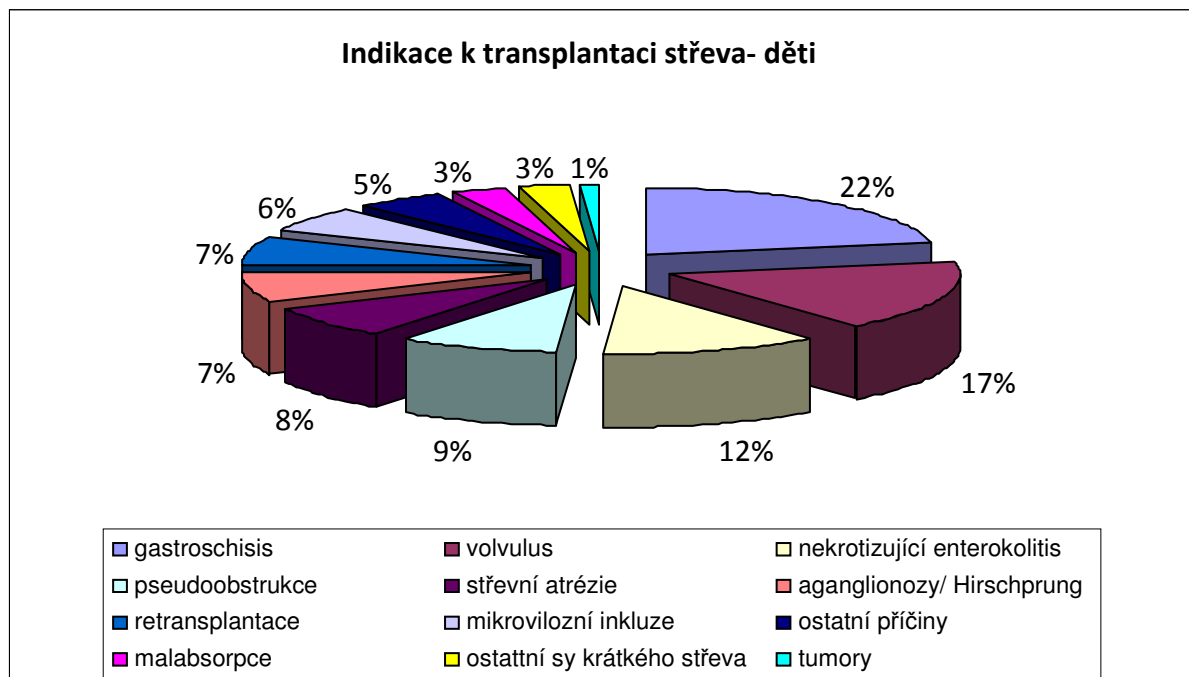
Ke střevnímu selhání může v zásadě dojít třemi hlavními cestami: a) ztrátou absorpční kapacity (resekce střeva, syndrom krátkého střeva), b) neschopností zajistit normální střevní funkci (dysfunkce enterocytů) a c) ztrátou motility střeva (chronická střevní pseudoobstrukce) (10).

Etiologie střevního selhání je rozmanitá. Příčiny můžeme pro jednoduchost rozdělit na anatomické (kvantitativní) a funkční (kvalitativní). Nejčastější příčinou střevního selhání představuje syndrom krátkého střeva (short bowel syndrome- SBS). Anatomický syndrom krátkého střeva je dán nedostatečnou délkou střeva – a to vlivem primárního onemocnění nebo následkem chirurgických resekcí. Důležitým faktorem je přítomnost či nepřítomnost ileocékální chlopně. Je známo, že u dětí s ileocékální chlopní stačí 10-20cm tenkého střeva a bez chlopně 60cm. U dospělých je třeba 50cm respektive 100cm v závislosti na přítomnosti ileocékální chlopně. Intaktní kolon v návaznosti na tenké střevo může být stejně důležité jako přítomnost či absence ileocékální chlopně (11). Funkční syndrom krátkého střeva je způsoben neadekvátní střevní funkcí, která je důsledkem neuromuskulárních nebo slizničních onemocnění, přičemž délka střeva může být zachována. Mezi nejčastější takovoto onemocnění patří volvulus, gastroschizis, nekrotizující enterokolitida, střevní atrézie, střevní polypóza, Hirschprungova nemoc, trombózy mezenterických cév, Crohnova choroba, desmoidní tumory, střevní adheze nebo úrazy. Indikace k transplantaci střeva u dospělých a u dětí jsou uvedeny na obrázku 1 (12).

Kontraindikace k transplantaci střeva jsou v zásadě shodné s kontraindikacemi k transplantaci ostatních solidních orgánů. Absolutní kontraindikací příjemce SBT představuje těžká infekce (sepsa, pneumonie), multiorgánové selhání, maligní onemocnění nebo metastázy, pokročilá kardiopulmonální onemocnění, HIV- pozitivita nebo AIDS, přítomnost jiných závažných onemocnění, u kterých nelze předpokládat zlepšení po transplantaci a dále při nespolupráci pacienta nebo opatrovníka. Mezi relativní kontraindikace příjemce SBT patří maligní střevní tumory, pozitivní cross-match, anamnéza systémové mykózy, těžká neurologická či imunologická onemocnění.



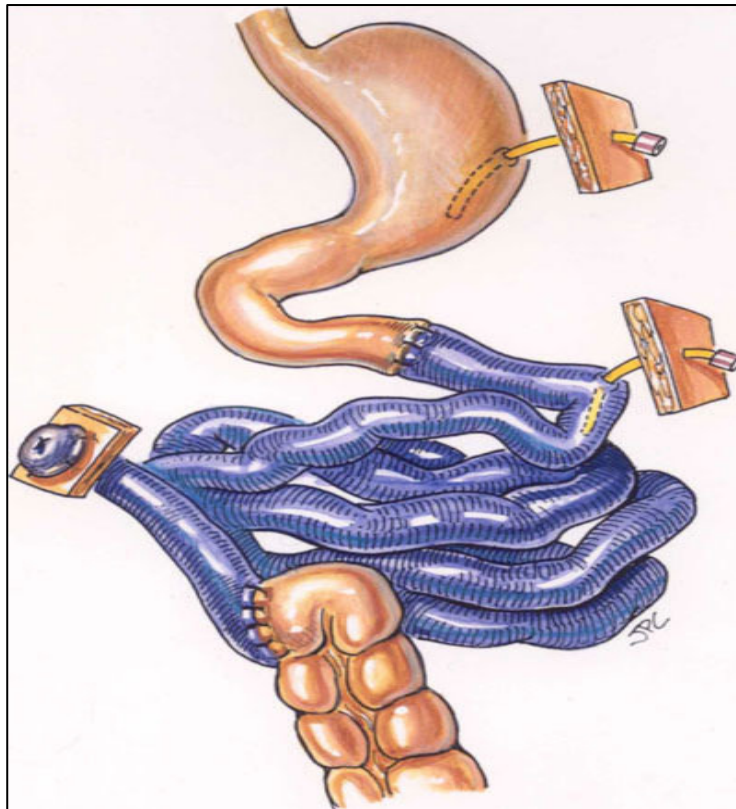
Obr. 1a- Indikace k transplantaci střeva u dospělých



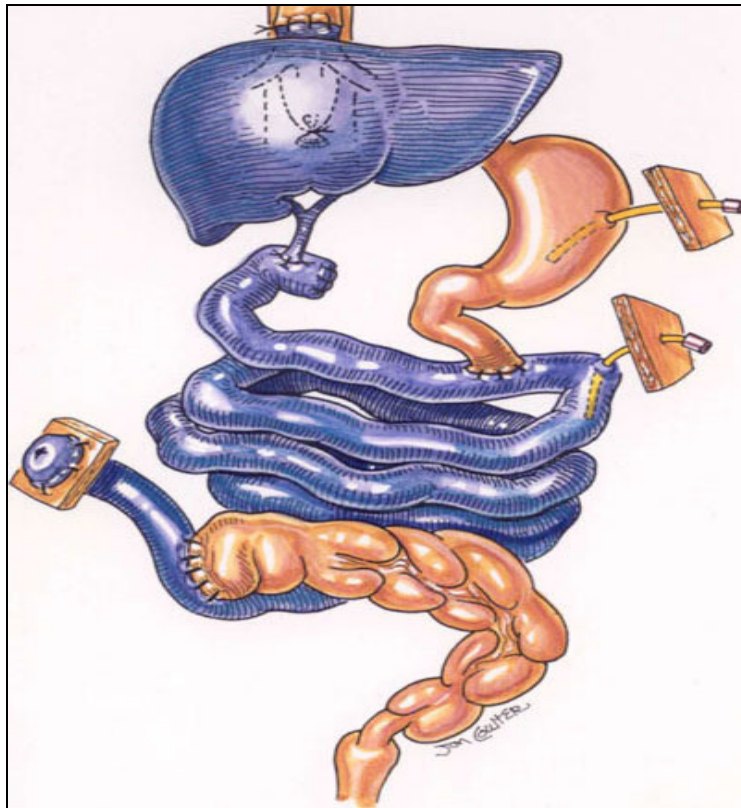
Obr. 1b- Indikace k transplantaci střeva u dětí

1.4 Typy transplantací

Transplantace střeva může být uskutečněna jako izolovaná transplantace, kdy je přenesen pouze štěp střeva, nebo v kombinaci s jinými nitrobřišními orgány (játra, žaludek, pankreas) (Obr. 2). U pacientů se střevním selháním je často přítomen komplex patologických stavů břišních orgánů, který si vyžaduje jejich náhradu. Izolovaná transplantace střeva je transplantací tenkého střeva s nebo bez tlustého střeva a je častěji prováděna u dospělých pacientů (55% vs. 37% pediatrických pacientů). Dalším typem je kombinovaná transplantace střeva spolu s játry, která je uskutečňována en bloc nebo odděleně a častěji je prováděna u dětí (50% vs. 21% u dospělých pacientů). Multiviscerální typ transplantace se častěji provádí ve skupině dospělých (24% vs. 13% pediatrických pacientů; Obr. 3).



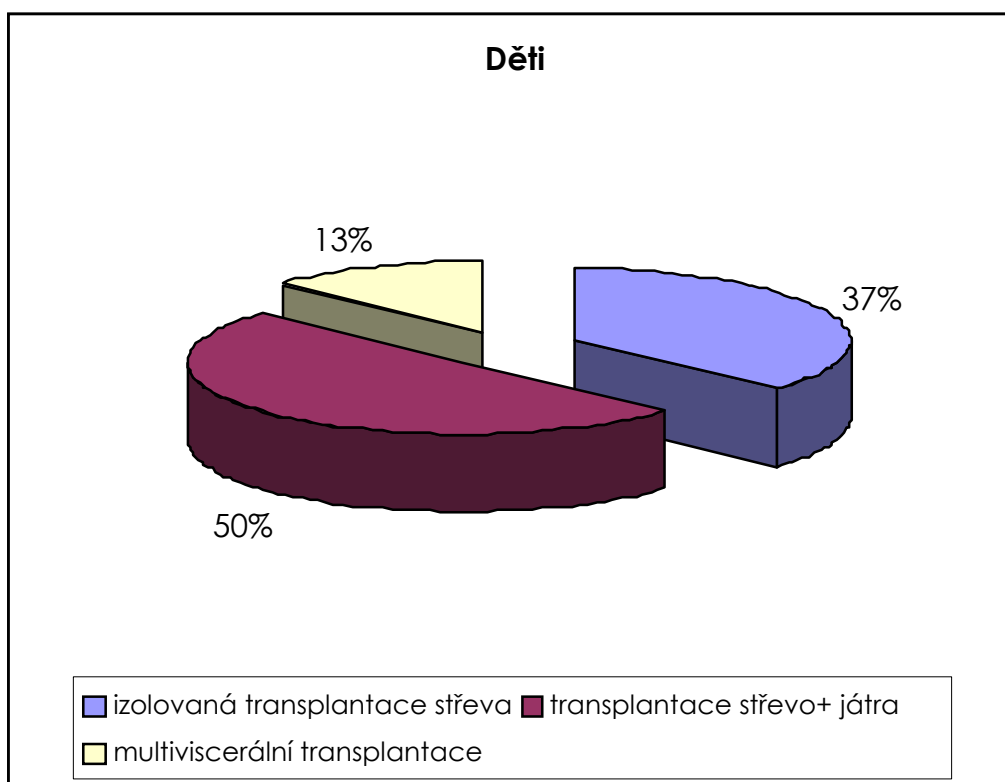
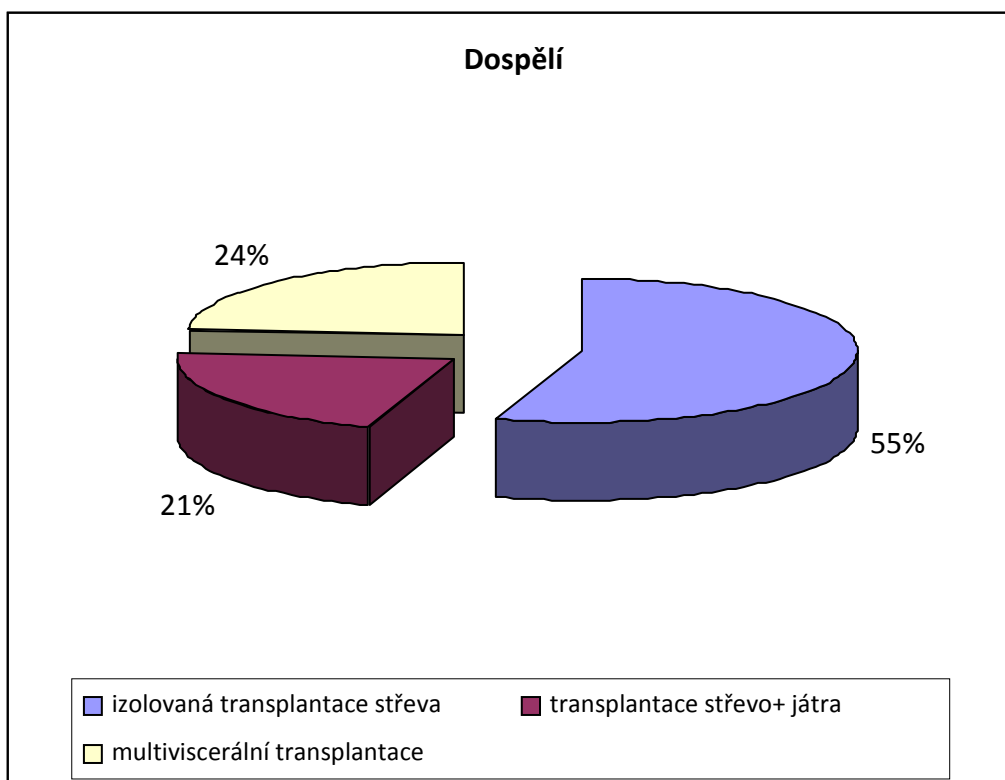
Obr. 2a- Schéma izolované transplantace tenkého střeva



Obr. 2b- Schéma kombinované transplantace tenké střevo+ játra



Obr. 2c- Schéma multiviscerální transplantace

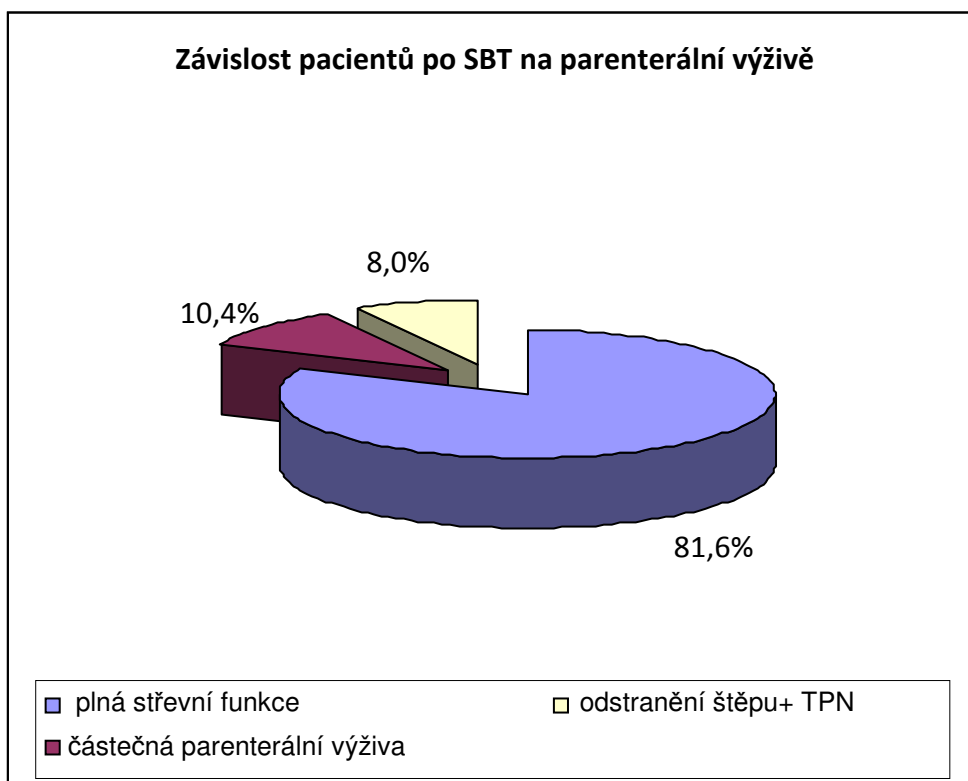


Obr. 3- Podíl jednotlivých typů transplantací u dospělých a u dětí

1.5 Klinické výsledky

V období od 1.dubna 1985 do 31. května 2007 bylo podle posledního registru provedeno 1720 transplantací střeva (13). Z tohoto počtu činilo 746 izolovaných transplantací střeva, 594 kombinovaných transplantací střeva a jater a 380 multiviscerálních transplantací. Z tohoto počtu přežívá 909 pacientů, nejdéle přežívá pacientka 18 let po transplantaci střeva. V USA bylo provedeno 75,5% transplantací (do roku 2007 celkem 1519 SBT v USA (14)), v Evropě 19,1%, v Asii 1,4% a v ostatních zemích 4%. Šedesát jedno procento pacientů bylo ve věku do 18 let. Věkové rozmezí příjemců činilo 1,2 měsíce až 67,8 let. Z žijících dárců bylo získáno celkem 32 štěpů.

Z pacientů, kteří přežili po SBT déle než 6 měsíců, 81,6% bylo bez nutnosti parenterální výživy, 10,4% potřebovalo částečnou parenterální výživu při ponechaném střevním štěpu a 8% pacientům byl střevní štěp odstraněn a byli opět odkázáni na TPN (Obr. 4).



Obr. 4- Závislost pacientů na parenterální výživě po transplantaci střeva, kteří přežili déle než 6 měsíců

V období 1998-2003 činilo 1-roční přežití štěpů/pacientů 65%/77% pro izolované Tx střeva, 59%/60% pro kombinovanou Tx střeva+ játra a 61%/66% pro multiviscerální Tx. Přežití bylo statisticky významně vyšší u pacientů, kteří na transplantaci čekali doma ve

srovnání s hospitalizovanými pacienty. Jedno-roční přežití štěpů při srovnání těchto skupin činilo 70%/51% pro izolované Tx střeva ($p < 0,001$), 64%/50% pro kombinovanou Tx střeva a jater ($p = 0,018$) a 71%/48% ($p = 0,01$) pro multiviscerální Tx. Jedno-roční přežití pacientů transplantovaných „z domova“ oproti pacientům, kteří museli být před transplantací hospitalizováni se udává 78%/72% pro izolované Tx střeva ($p = 0,03$), 67%/51% pro kombinovanou Tx střeva+ játra ($p = 0,008$) a 76%/54% ($p = 0,011$) pro multiviscerální Tx. V letech 2001-2003 bylo 71% pacientů voláno k transplantaci z domova oproti 52% pacientům v období 1985- 2001 (15).

V posledních letech došlo opět k výraznému zlepšení výsledků (tab. č. 1)

Věk (roky)	1- roční přežívání pacientů (%)
< 1	67
1 až 5	80
6 až 10	86
11 až 17	94
>18	84

Tab. 1- Jednoleté přežívání pacientů s transplantovaným střevem ze všech amerických center v letech 2003-2004 v závislosti na věkové skupině příjemců (data z Annual Report of the US Organ Procurement and Transplantation Network and the Scientific Registry of Transplant Recipients)

1.6 Imunosuprese po SBT

Počáteční nezdary transplantace střeva byly způsobeny častým výskytem nezvládnutelné rejekce. Příjemci byli proto léčeni velkým množstvím imunosupresivních látek ve vysokých dávkách, které měly zabránit rozvoji akutní rejekce. Tato snaha však vedla k častým infekcím a většímu výskytu malignit (16).

Existují 2 milníky ve vývoji nových imunosupresivních léků ve vztahu k SBT. Prvním bylo objevení tacrolimu, které výrazně zlepšilo přežívání pacientů i střevních štěpů. V současné době tvoří tacrolimus základ téměř všech imunosupresivních protokolů po SBT (15). Dalším významným krokem je použití indukční imunosupresivní terapie, která umožňuje snížit hladiny tacrolimu a tím redukovat nefrotoxicitu tohoto kalcineurinového inhibitoru. Mezi nejčastěji používané indukční látky patří protilátka proti interleukin-2 receptoru (anti IL2-R; basiliximab, daclizumab), antilymfocytární globulin (ATG) a anti-CD 52 protilátka (Campath-1) (17, 18).

Zajímavých výsledků bylo dosaženo při kombinaci tacrolimu se sirolimem, kdy došlo k dalšímu významnému zlepšení přežití štěpů i příjemců (19). Sirolimus však způsobuje zhoršené hojení rány, vyšší výskyt insuficience anastomóz v časném pooperačním období a

vyšší počet trombotické mikroangiopatie (20, 21). Mykofenolát mofetil může být použit jako přidatné imunosupresivum, ale jeho nežádoucí gastrointestinální účinky a vyšší výskyt bakteriálních infekcí limitují jeho užití (22). V současné době se hledají nové méně toxické imunosupresivní léky, zavádějí se imunosupresivní protokoly bez použití kortikosteroidů a hledá se způsob udržení hladiny chimerických buněk dárce, které by umožnily trvalé připojení štěpu. Přehled nejčastěji používaných imunosupresivních látek po SBT je uveden v tabulce 2.

Látka	způsob účinku	vedlejší účinky
Alemtuzumab (Campath)	anti CD52 monoklonální Ab	lymfocytopenie, infekce
Thymoglobulin (ATG)	polyklonální Ab proti T- buňkám	lymfocytopenie, infekce
Basiliximab (Simulect)	chimerická monoklonální Ab anti-CD 25	Alergická reakce
Daclizumab (Zenapax)	humanizovaná monoklonální Ab anti-CD 25	Alergická reakce
Orthoclone (OKT3)	anti CD3 monoklonální Ab	Alergická reakce, infekce
Infiximab (Remicade)	monoklonální Ab anti TNF-alfa	Infekce
Tacrolimus (Prograf)	kalcineurinový inhibitor	neuro+ nefrotoxicita, hypertenze, diabetes
Sirolimus (Rapamun)	inhibitor mTOR	poruchy hojení ran, hyperlipidemie, anemie, leukopenie, trombocytopenie, infekce
Mykofenolát mofetil (Cell Cept)	inhibitor syntézy purinů	gastrointestinální příznaky, anemie, leukopenie, trombocytopenie, infekce
Prednisolon (Prednison)	nespecifický protizánětlivý účinek	infekce, obezita, kardiovaskulární onemocnění, glaukom, osteoporóza, hyperlipidémie, diabetes, Cushingův syndrom

Tabulka 2- Přehled imunosupresivních látek používaných v současné době po transplantaci střeva (Ab- protilátka)

1.7 Komplikace po transplantaci střeva

Četné časně i pozdní komplikace po transplantaci střeva jsou příčinou toho, že SBT stále nepatří mezi standardní metodu léčby střevního selhání. Na jedné straně střevo představuje největší imunologický orgán s bohatou výbavou imunokompetentních buněk vyžadující silnější imunosupresi, na druhé straně střevní obsah není nikdy sterilní a příjemce je ohrožen infekcí s následným rozvojem sepse se všemi fatálními důsledky pro štěp i pro příjemce.

1.7.1 Chirurgické komplikace

Chirurgické komplikace nebývají časté a jsou převážně způsobeny technickou chybou při konstrukci cévní nebo střevní anastomózy a projeví se obvykle v časném potransplantačním období a vyžadují většinou chirurgický zákrok s revizí anastomózy. Pooperační poruchy motility lze léčit farmakologicky a jako prevence slouží časná mobilizace pacienta současně se zahájením enterální výživy.

1.7.2 Rejekce štěpu

Rejekce střevního štěpu představuje jeden z nejzávažnějších problémů po SBT. V posledních letech se podařilo vlivem nových imunopresivních látek významně snížit výskyt a hlavně závažnost akutní rejekce, čímž se do popředí dostává problém dříve opomíjené chronické rejekce.

1.7.2.1 Akutní rejekce

Akutní rejekce způsobí ztrátu 56,3 % štěpů po SBT a je příčinou 11, 2% úmrtí pacientů po SBT (15). Stále probíhá dosud neúspěšná snaha o nalezení dostatečně specifického a současně senzitivního markeru ke stanovení akutní rejekce střeva. Monitorování funkčních parametrů (např. citrulin, serotonin, D-xylosa) a imunologických parametrů (např. IL-2R, TNF-alfa, IL-6, IFN- gamma) jsou pouze doplňující vyšetření, která doposud nenahradila histologické vyšetření štěpu. Navíc klinické projevy akutní rejekce, jako jsou průjmy, bolesti břicha, horečka nebo ileus jsou nespecifické a projeví se až s odstupem několika dní po prvních histologických známkách rejekce. Také proto zůstává zlatým standardem ke stanovení diagnózy rejekce histologické vyšetření sliznice střeva provedené na základě etážových biopsií. Rejekce totiž může nestejně postižovat pouze určité segmenty střevního štěpu. Endoskopický přístup ke štěpu v celém rozsahu je technicky limitován, a proto může dojít k přehlédnutí rejekce, která je lokalizovaná pouze v proximálním jejunu. Přítomnost nekrotických oblastí sliznice nebo ztráta architektury klků svědčí pro přítomnost rejekce. Dále bývá přítomna apoptóza buněk krypt, známky kryptitidy a endotelialitidy. Stupně akutní rejekce po transplantaci střeva ukazuje tabulka 3.

stupeň akutní rejekce	histologický nález
hraniční nález (borderline)	krypty s minimálním epiteliálním poškozením, minimální místní zánětlivá infiltrace, < 6 apoptotických buněk na 10 krypt, žádné slizniční ulcerace
mírná (mild)	mírné zánětlivé infiltrace lokalizované s aktivovanými lymfocyty, krypty s mírným poškozením epitelu > 6 apoptotických buněk na 10 krypt, žádné slizniční ulcerace
střední (mederate)	slizniční ulcerace v lamina propria, krypty s difúzním poškozením epitelu, vzestup počtu apoptotických buněk, možná mírná až střední intimální arteritida, žádné slizniční ulcerace
těžká (severe)	podobné známky jako střední skutní rejekce, ale přítomnost slizničních ulcerací možný výskyt těžké nebo transmuralní intimální arteritidy

Tabulka 3- Stupně akutní rejekce po transplantaci tenkého střeva (23, 24)

Léčba akutní rejekce musí být zahájena okamžitě po jejím diagnostikování, protože její progresse vede k mikroperforacím střeva a následné peritonitidě. Antirejekční léčba spočívá většinou v bolusovém podání metylprednisolonu v dávce 0,5-1g/den po dobu 3 dnů. Kortikosteroid-rezistentní rejekce vyžaduje podání protilátek (např. ATG a OKT3 nebo infiximab) (25, 26). Antirejekční léčba je většinou následována snahou o udržení vyšších hladin imunosupresiv, což na druhé straně přináší vyšší riziko výskytu infekcí, tacrolimem indukované nefrotoxicity a potransplantačního lymfoproliferativního onemocnění. Těžké, na léčbu nereagující rejekce vyžadují odstranění štěpu z důvodu peritonitidy z četných spontánních střevních mikroperforací.

1.7.2.2 Chronická rejekce

Ve srovnání s akutní rejekcí je diagnostika a léčba chronické rejekce komplikovanější. Klinický obraz probíhá pod příznaky chronických průjmů s následnou malabsorpcí a hubnutím. Diagnostický standard opět představuje histologické vyšetření. Někdy bývá nutné provedení otevřeného odběru vzorku střeva v celé jeho tloušťce. Současný pohled na léčbu chronické rejekce není jednotný. V pokročilých stádiích chronické rejekce bývá nutná explantace štěpu.

1.7.3 Infekce

Riziko infekce po SBT je vysoké a je spojeno s nutností výrazné imunoprese, která má za cíl zabránit vzniku akutní rejekce. Podle mezinárodního registru připadá 46% příčin úmrtí pacientů po SBT na sepsi (15). Hlavně oportunní infekce, jako CMV, EBV, kandidové a aspergillové infekce jsou příčinou vážné morbidity s fatálními důsledky pro příjemce. CMV enteritidu je možné léčit dlouhodobým podáváním gancikloviru nebo CMV imunoglobulinů. Orální profylaktická léčba (val)gancyklovirem je používána u rizikových pacientů (CMV negativní příjemce, CMV pozitivní dárce) a u pacientů s podezřením na CMV infekci. Pacienti s bakteriální peritonitidou, kteří nereagují na antibiotickou léčbu, by měli být léčeni antimykotiky. Indikace k antimykotické léčbě jsou: a) těžká bakteriální infekce, atypická nebo virová infekce, sepse nebo SIRS, b) infekce nereagující na antibiotickou léčbu, c) dlouhodobá antibiotická léčba, d) těžká rekurentní rejekce, kortikorezistentní rejekce, e) retransplantace, f) těžká jinak nevysvětlitelná imunodeficience. EBV infekce je spjata s potransplantačním lymfoproliferativním onemocněním (PTLD). EBV infekce musí být léčena vysokými dávkami gancikloviru.

1.7.4 Potransplantační lymfoproliferativní onemocnění

Potransplantační lymfoproliferativní onemocnění (PTLD) představuje závažnou komplikaci po transplantaci střeva (27). Zajímavé je, že výskyt PTLD, které je definováno jako výskyt jednoznačné malignity, zůstává i přes zavedení stále účinnější imunopresivní léčby stejný a jeho četnost kolísá mezi 6 a 8% (15). Incidence preneoplastických stadií PTLD (hyperplázie plazmocytů, polyklonální lymfoproliferativní změny) zůstává špatně definovaná. PTLD se nejčastěji objeví 25 měsíců po transplantaci. Vyšší riziko vzniku PTLD představuje indukční imunopresivní léčba, léčba OKT3 a multiviscerální typ transplantace. Ve srovnání s transplantacemi ostatních solidních orgánů představuje střevo nejčastější místo výskytu časných PTLD změn. PTLD představuje diagnostický problém, protože v biopsii štěpu jsou velmi často též přítomny zánětlivé buňky a je obtížné odlišit časná stadium PTLD od akutní rejekce. Rituximab představuje velmi účinnou formu léčby některých forem PTLD (28). V posledních letech významně poklesla mortalita na PTLD (12).

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. Potkana jako vhodné laboratorní zvíře jsme vybrali ze 4 důvodů:

- 1) jedná se o zvíře, které lze relativně snadno chovat a lze s ním jednoduše manipulovat
- 2) většina experimentálních prací je dnes prováděna na myších nebo potkanech
- 3) existují přesně definované inbrední kmeny, a tak je možné dosáhnout reprodukovatelnosti dosažených výsledků
- 4) náklady na chov i provádění experimentu jsou relativně nízké.

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- preklinické jsme se zaměřili na technické zvládnutí odběru tenkého střeva u kadaverózního dárce. Tato část je součástí přípravy programu klinické transplantace tenkého střeva na našem pracovišti.

Veškerá manipulace se zvířaty (1.-3. studie) probíhala v souladu se schváleným Projektem pokusu podle § 12 vyhlášky č. 311/97 Sb., o chovu a využití pokusných zvířat (povolení č. 23 / 2004 udělené hlavním hygienikem ČR).

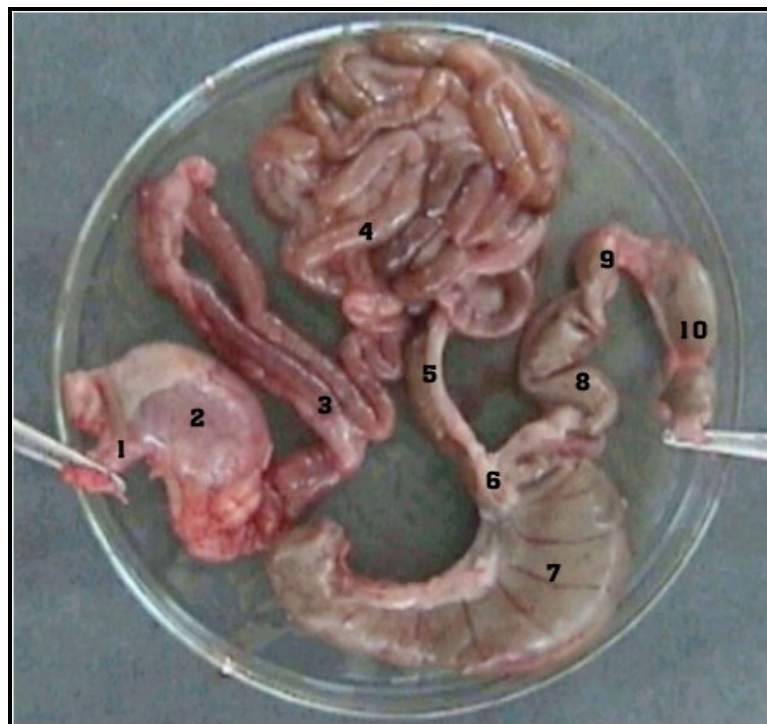
Projekt pro 4. studii byl schválen etickou komisí s multicentrickou působností při IKEM a FTNSP pod č.j. 477/04.

3. Experimentální část

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

3.1.1 Anatomie tenkého střeva u potkana

Tenké střevo se skládá z duodena, které plynule přechází do jejuna a ilea a tvoří asi 75% celé délky trávicí trubice. U potkana jejunum a ileum měří celkem 70-90 cm. Tenké střevo leží ve střední a kaudální části peritoneální dutiny, laterálně a kraniálně je ohraničeno tlustým střevem. Lumen tenkého střeva se distálním směrem zužuje. Kranální část- jejunum- tvoří 2/5 délky tenkého střeva a začíná v oblasti flexura duodenojejunalis a jeho lumen činí maximálně 1 cm v průměru, zatímco distální část- ileum- je široké okolo 5 mm. Díky bohatým slizničním řasám má jejunum tlustší stěnu a též větší plochu sliznice. Přechod jejuna do ilea není anatomicky ohraničený. Tenké střevo je složeno z kliček, které jsou zavěšené na mezenteriu (obr. 5).



Obr. 5- Trávicí trakt u potkana

1- jícen, 2-žaludek, 3-duodenum, 4-jejunum, 5-ileum, 6-sacculus rotundus (lymfatická tkáň v oblasti ileocékalního přechodu), 7-caecum, 8-colon ascendens, 9-colon transversum, 10-colon descendens.

Mezenterium tvoří peritoneální vychlipku, která odstupuje ze zadní části stěny břišní (radix mesenteria). Obsahuje bohatou síť krevních a lymfatických cév a nervové pleteně a upíná se na tenké střevo tak, že svými listy ho obaluje a tím vytváří serózní obal stěny tenkého střeva (tunica serosa).

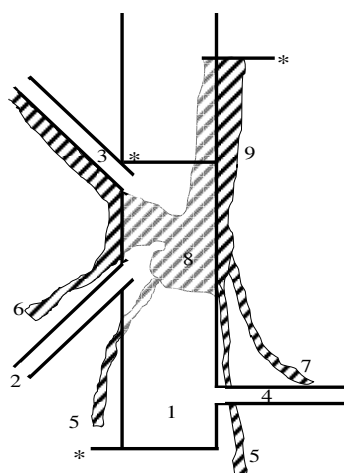
3.1.2 Cévní zásobení střeva u potkana

Arteriální zásobení tenkého střeva pochází z arteria mesenterica cranialis (AMC). Jde o druhou větev abdominální aorty, po odstupu arteria coeliaca. Z AMC odstupují větve pro pankreas (arteria pancreaticoduodenalis caudalis), pro tenké střevo (arteriae jejunales), pro ileum a pro tlusté střevo (arteria ileocolica). Tepny tenkého střeva probíhají v mesenteriu, kde se bohatě větví a spojují do oblouků, tzv. arkád, ze kterých potom odstupují malé přímé větve (vasa recta), které pokračují až do stěny střeva. Tepenné arkády v mesenteriu tvoří bohatý kolaterální systém tepenného zásobení střeva, který je důležitý vzhledem k pohyblivosti střevních kliček a jejich intenzivní činnosti při trávení. Arkády probíhají odlišně v jejunu a ileu. Zatímco arteriae jejunales tvoří většinou jen jednu arkádu, větve pro ileum vytváří 2 až 4 řady těchto arkád. V místě odstupu AMC odstupuje levá renální tepna a těsně kaudálně z druhé strany odstupuje pravá renální tepna, na které je třeba dávat pozor při odběru střevního štěpu. Dále z břišní aorty odstupuje arteria testicularis, resp. ovarica, arteriae lumbales a těsně nad bifurkací aorty odstupuje arteria mesenterica caudalis, která svými větvemi (arteria colica sinistra a arteria rectalis cranialis) zásobuje kolon a rektum. Žíly probíhají spolu se stejnojmennými tepnami a spojují se do vena mesenterica cranialis. Ta poté po soutoku s vena lienalis tvoří kmen vena portae, do kterého se vlévají ještě vena pylorica a vena coronaria ventriculi. Vena portae přivádí krev bohatou na živiny do jater (29).

3.1.3 Lymfatická drenáž tenkého střeva u potkana

V každém střevním klku se nachází ve sliznici několik slepě končících centrálních lymfatických cév, jejichž počet je druhově specifický. U potkana se udává počet 3-10 cév (30). Při bázi klku se klkové cévy sbíhají a vytváří široký sinus, ze kterého vybíhají 2-3 menší lymfatické cévy, které pronikají přes lamina muscularis mucosae a v submukóze vytváří lymfatickou pleteně. Ve slizničních a podslizničních lymfatických cévách se nevyskytují žádné chlopně a lymfa se může odsud odvádět pouze pomocí kontrakcí střevní stěny. V tunica muscularis vzniká ještě jeden lymfatický systém, který je chaběji vyvinut než předchozí a je taktéž bez chlopní a není s ním anatomicky ani funkčně propojen. Oba systémy se spojují až v mesenteriu a tvoří zde větší kolektory, které již obsahují chlopně a vykazují spontánní rytmické stahy. V mesenteriu probíhají 2-3 lymfatické kolektory spolu s tepnou a žilou.

Kolektory ze střeva běží v mesenteriu do spádových lymfatických uzlin, které se nachází podél arteria mesenterica cranialis. Zde se spojují a vytváří mohutný kmen, tzv. truncus intestinalis, který je pevně srostlý s AMC a není od ní ani při nejjemnější preparaci oddělitelný. Truncus intestinalis se na dorzální straně aorty spojuje se dvěma trunci lumbales a lymfatickým kolektorem vedoucím lymfu z levé ledviny a vytváří cysternu chyli. Tato ve svém dalším průběhu přijímá lymfu z truncus coeliacus a vytváří ductus thoracicus, který na dorzální straně aorty prochází bránicí do hrudníku (31) (obr. 6).



Obr. 6- 1- aorta abdominalis, 2- arteria mesenterica cranialis, 3- arteria celiaca, 4- arteria renalis lat. sin., 5- truncus lumbalis, 6- truncus intestinalis, 7- lymfatický kolektor levé ledviny, 8- cysterna chyli, 9- ductus thoracicus

* místo přerušení aorty, resp. ductus thoracicus při odběru (viz. kapitoly 3.1.5 a 3.3.6.3)

3.1.4 Modely transplantace tenkého střeva u potkana

První heterotopickou transplantaci střeva u potkana provedli Monchik a Russel v roce 1971 (3). V dalších letech došlo k rozvoji techniky SBT, jak ukazuje tabulka 4.

Autor	Rok	Model
Monchik, Russel	1971	heterotopická SBT se systémovou žilní drenáží
Kort	1973	Ortotopická SBT s portální drenáží
Schraut	1983	heterotopická SBT s portální žilní drenáží
Deltz, Thiede	1985	dvoustupňová SBT (1.heterotopická, 2.ortotopická)
Wallander	1988	"cuff technika" cévních anastomóz
Szymula	1996	rekonstrukce lymfatických cév

Tabulka 4- Vývoj experimentálních modelů transplantace střeva u potkana

3.1.4.1 Heterotopická SBT

V tomto modelu je vlastní střevo ponecháno in situ a transplantát není přímo začleněn do trávicího traktu příjemce. Žilní drenáž ze štěpu je obnovena napojením na vena cava caudalis. Tento model slouží hlavně k imunologickým studiím. Výhodou představuje relativní technická jednoduchost operace (ve srovnání s dalšími typy). Další výhodou je, že exkludovaný štěp je snadno přístupný slizničním biopsiím. Tento model však nemůže být považován za fyziologický, jako ortotopická SBT, protože transplantovaný štěp je nefunkční.

3.1.4.2 Ortotopická SBT se systémovou žilní drenáží

V tomto modelu je tenké střevo příjemce odstraněno v celém rozsahu a na jeho místo je napojen střevní štěp dárce. Žilní drenáž je obnovena anastomózou vena portae dárce na vena cava caudalis příjemce. Tento model je oproti výše uvedenému spojen s vyšší mortalitou. Zručný operatér však může dosáhnout úspěšnost operace přes 85% (32). Tento model má oproti výše uvedenému dvě významné výhody. Štěp je vystaven normálnímu intraluminárnímu prostředí, které zahrnuje živiny, gastrointestinální šťávy a bakterie. Prospívání příjemce je zcela závislé na funkční integritě střevního štěpu. Ortotopická SBT proto slouží hlavně ke studiu fyziologických procesů v transplantovaném štěpu (funkční testy, růst zvířete a metabolické pochody).

3.1.4.3 Ortotopická SBT s portální žilní drenáží.

Tato technika se od předchozí liší pouze provedením žilní drenáže štěpu, která je uskutečněna anastomózou dárcovské a příjemcovské vena portae. Doba zasvorkování portální žíly delší než 15 minut může být pro zvíře letální díky žilnímu městnání za svorkou. Tento model představuje fyziologickou cestu žilní drenáže tenkého střeva. V mnoha studiích však nebylo prokázáno zvýhodnění této techniky před systémovou žilní drenáží. (33,34). Ortotopická SBT s portální žilní drenáží je proto vyhrazena pro speciální účely, jako je

například studium farmakokinetiky léků, které jsou metabolizovány během svého prvního průchodu játry (35).

3.1.4.4 SBT s použitím „cuff technique“

Standardní chirurgický model s ručně šitými cévními anastomózami patří mezi náročné mikrochirurgické techniky vyžadující trénink a jsou zvláště pro začátečníky zatíženy velkým procentem neúspěchů. Proto byla vyvinuta tzv. „cuff“ technika, která představuje jednoduchou a rychle zvládnutelnou alternativu ke klasické ručně šité anastomóze. Je určena hlavně pro vědce, u kterých není hlavním cílem zvládnutí mikrochirurgické techniky transplantace. Základem této metody je použití polyetylenových trubiček vhodného průměru, které se nasadí na cévy dárce a příjemce. Je popsáno mnoho modelů, některé používají tuto techniku na obě anastomózy (tepennou i žilní) nebo pouze na žilní (36, 37).

3.1.4.5 Obnovení kontinuity trávicího traktu

Po úspěšném provedení cévních anastomóz existuje několik způsobů drenáže střevního obsahu štěpu:

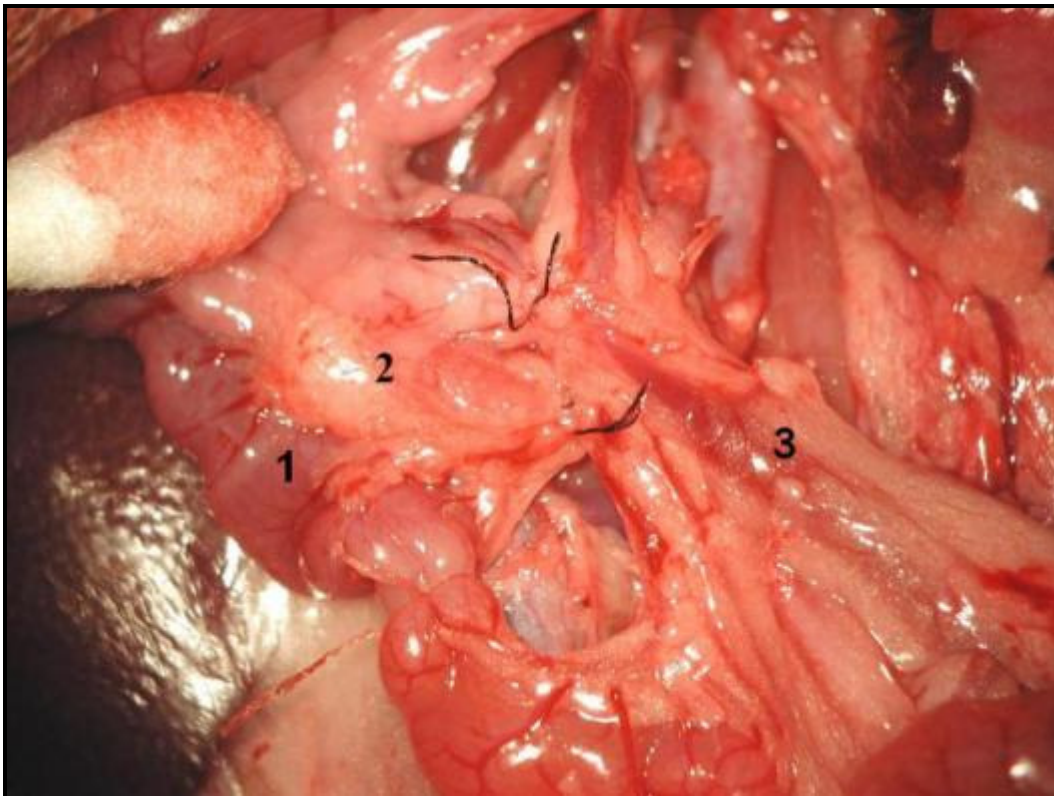
- a. oba konce se vyvedou jako terminální stomie
- b. orální konec štěpu se vyvede jako terminální stomie a aborální konec se napojí na ileum příjemce
- c. orální konec se uzavře a distální konec se napojí na ileum příjemce
- d. orální konec se uzavře a distální konec se vyvede jako terminální stomie

3.1.5 Odběr štěpu tenkého střeva

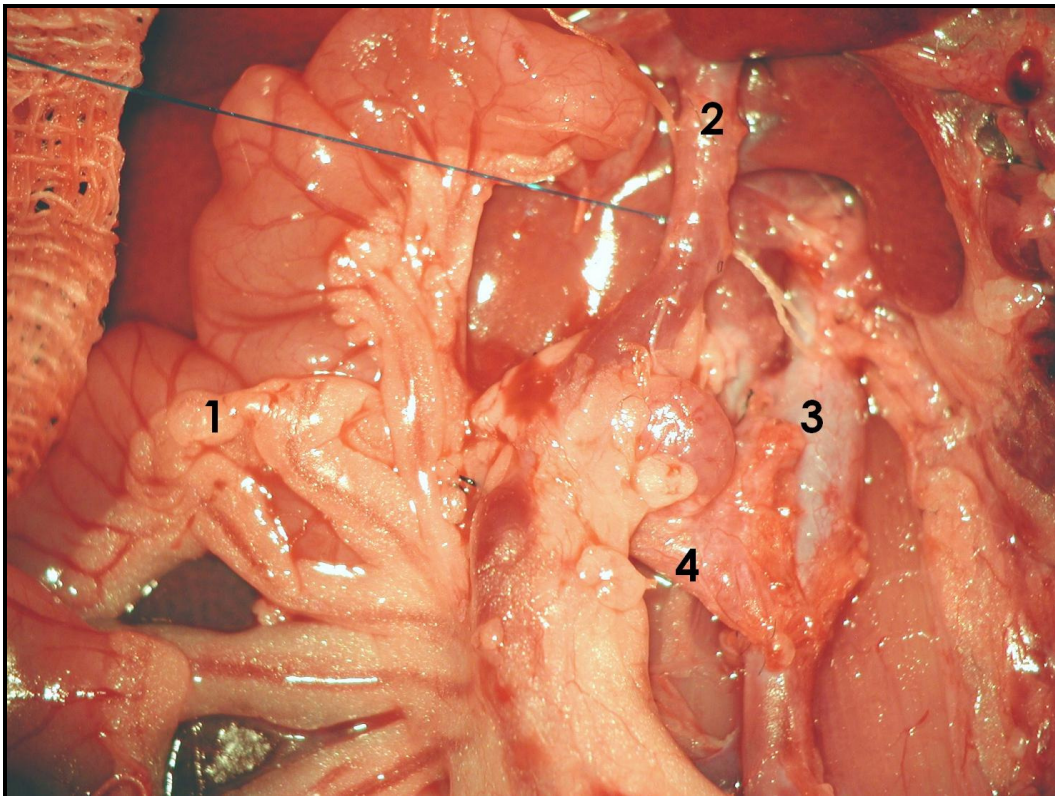
K celkové anestezii jsme použili směs ketaminu v dávce 10mg/kg i.m. (Narkamon 1%, Léčiva, Praha) a chlorpromazinu v dávce 2,5mg/kg i.m. (Plegomasin 0,5%, Egis Pharmaceuticals Ltd., Budapest, Maďarsko). Při odeznívání účinku po 60-90 minutách jsme podali intramuskulárně 1/3 původní dávky této směsi. Potkana s oholenou přední břišní stěnou jsme umístili na podložku s lehce extendovanými končetinami. Operaci jsme prováděli pod operačním mikroskopem ÖPMI 9FC, Carl Zeis, Germany se zvětšením v rozmezí 12,5-20x.

Do dutiny břišní jsme pronikli střední laparotomií, která u dárce může být rozšířena ještě oboustranným subkostálním řezem. Kličky tenkého střeva jsme zabalili do teplého vlhkého čtverce a odsunuli 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, přičemž dáváme pozor, aby nedošlo k torzi závěsu tenkého střeva s následnou teplou ischemií a možnému poškození štěpu tenkého střeva. Tímto manévrem se zobrazí vena portae se svým větvením v porta hepatis. Přerušíme vena pylorica a opatrně tupě tampónky oddělíme portální žílu od okolních tkání (hlavně od pankreatu) v rozsahu od jaterního hilu k odstupu vena lienalis, kterou též mezi podvazy přerušíme (Obr. 7, 8). 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.

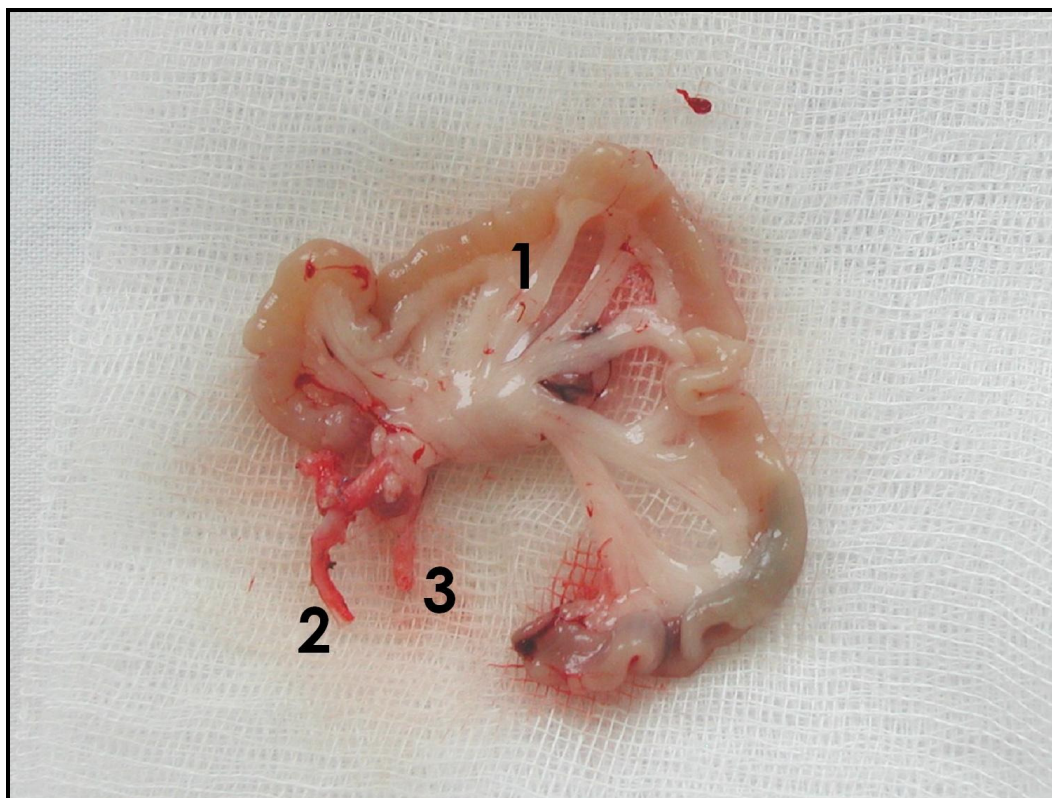


Obr. 7- Uvolňování v. portae od pankreatu (1 – duodenum, 2 – pankreas, 3 – vena portae)



Obr. 9- Pohled na štěp před perfuzí ochranným roztokem (1 – střevní štěp, 2 – vena portae, 3 – aorta, 4 – arteria mesenterica cranialis)

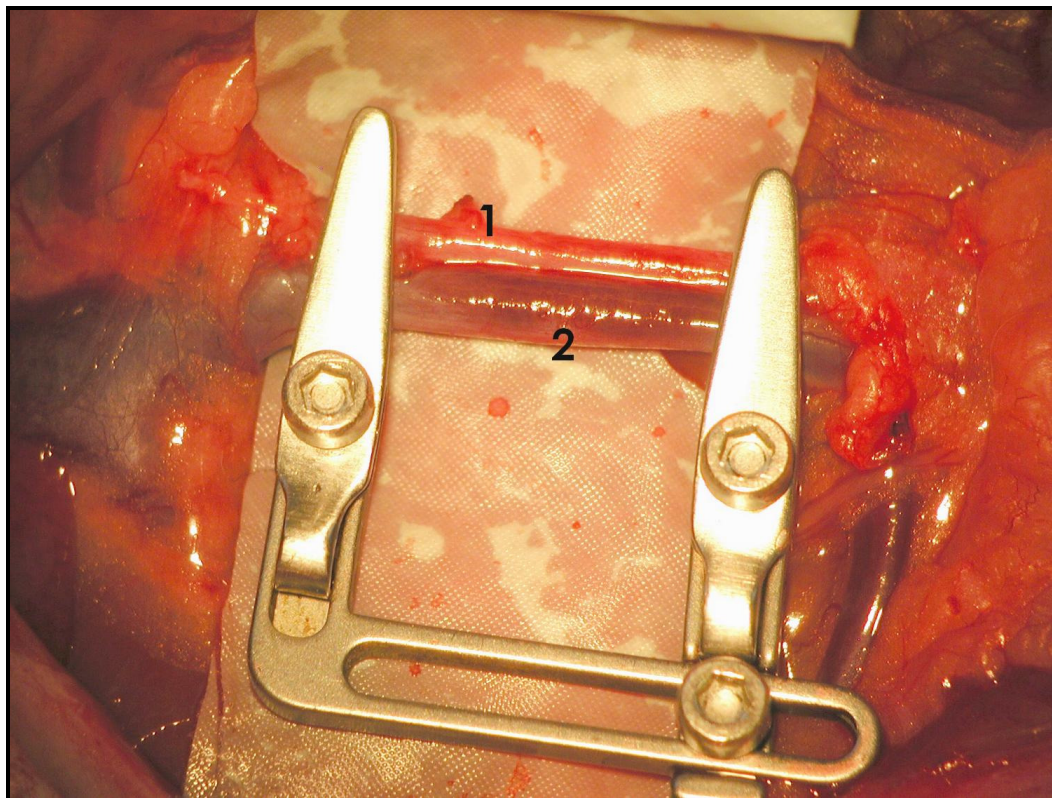
Podvážeme silonovou ligaturou břišní aortu nad bifurkací, další ligaturu umístíme na aortu nad odstupem amc. Tenkou jehlu zavedeme opatrně do aorty, abychom nepoškodili protilehlou stěnu tepny a pomalu propláchneme střevní štěp heparinizovaným fyziologickým roztokem o teplotě 4°C. Roztok obsahuje 100 IU Heparinu v 1 ml. Pro usnadnění odtoku žilní krve ze štěpu přerušíme portální žílu těsně před jejím vstupem do jaterního hilu. Kvalitu perfuze hodnotíme makroskopicky mírou odbarvení cév v mezenteriu. K dokonalému promytí štěpu obvykle postačí 3-4 ml roztoku. Po skončení perfuze přerušíme aortu v místě zavedení jehly a kraniálně od ligatury nad odstupem a amc a štěp vyjmeme z těla (Obr. 10) a umístíme do fyziologického roztoku o teplotě 4°C. Zvíře utratíme v souladu s Projektem pokusu.



Obr. 10 - Celkový pohled na střevní štěp po promytí ochranným roztokem (1 – střevní štěp, 2- aorta s odstupem amc, 3 – vena portae)

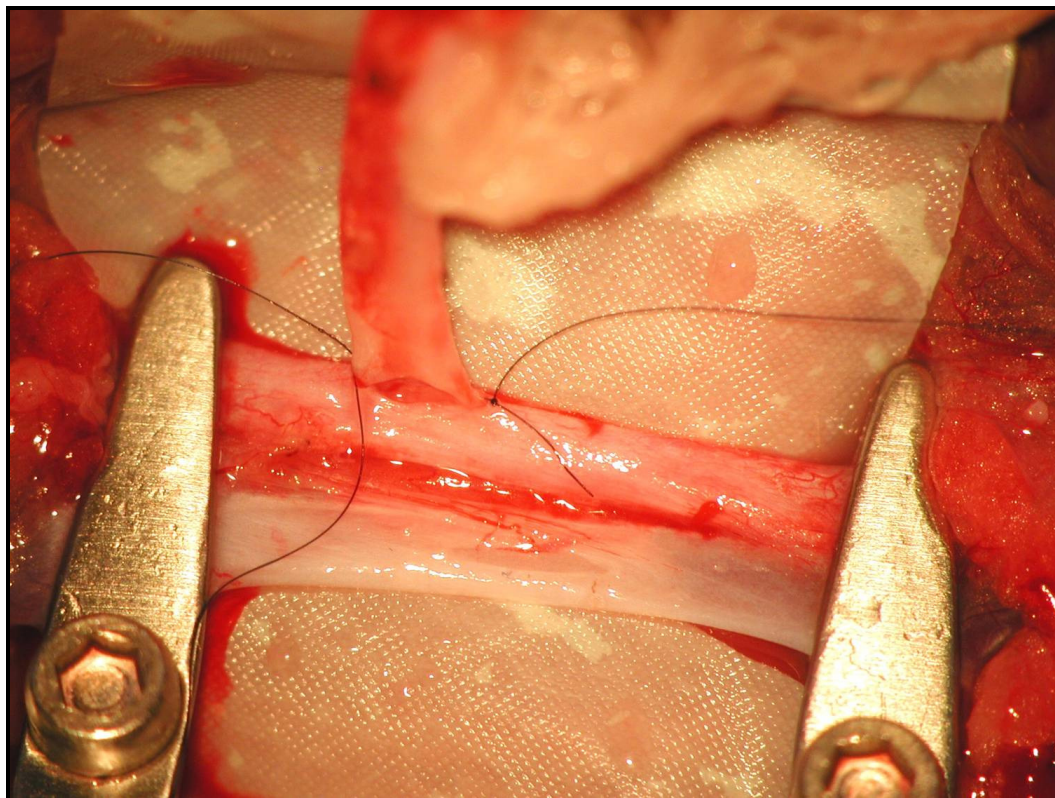
3.1.6 Transplantace štěpu tenkého střeva se systémovou žilní drenáží

K celkové anestezii jsme použili stejnou kombinaci anestetik jako při odběru. Do dutiny břišní pronikneme střední laparotomií. Po revizi dutiny břišní zvíře umístíme tak, aby hlava směřovala k levé ruce operátora a ocas k pravé ruce. Vlastní kličky tenkého střeva obalíme teplým vlhkým čtvercem a odsuneme na levou stranu zvířete. Postupně pomocí tamponů uvolníme aortu a dolní dutou žílu v oblasti mezi bifurkací a odstupem renálních cév. Postačí uvolnit úsek o délce 2 cm. Lumbální cévy podvazujeme nebo ošetřujeme koagulací. K přehlednosti se vyplatí oddělit od sebe vena cava caudalis a břišní aortu a cévy podložit pruhem plastu. Nyní přistoupíme k přípravě štěpu. Je důležité štěp správně orientovat, aby nedošlo k torzi cévní stopky s fatálními důsledky pro příjemce. 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, kterou vypláchneme heparinizovaným fyziologickým roztokem (Obr.11).

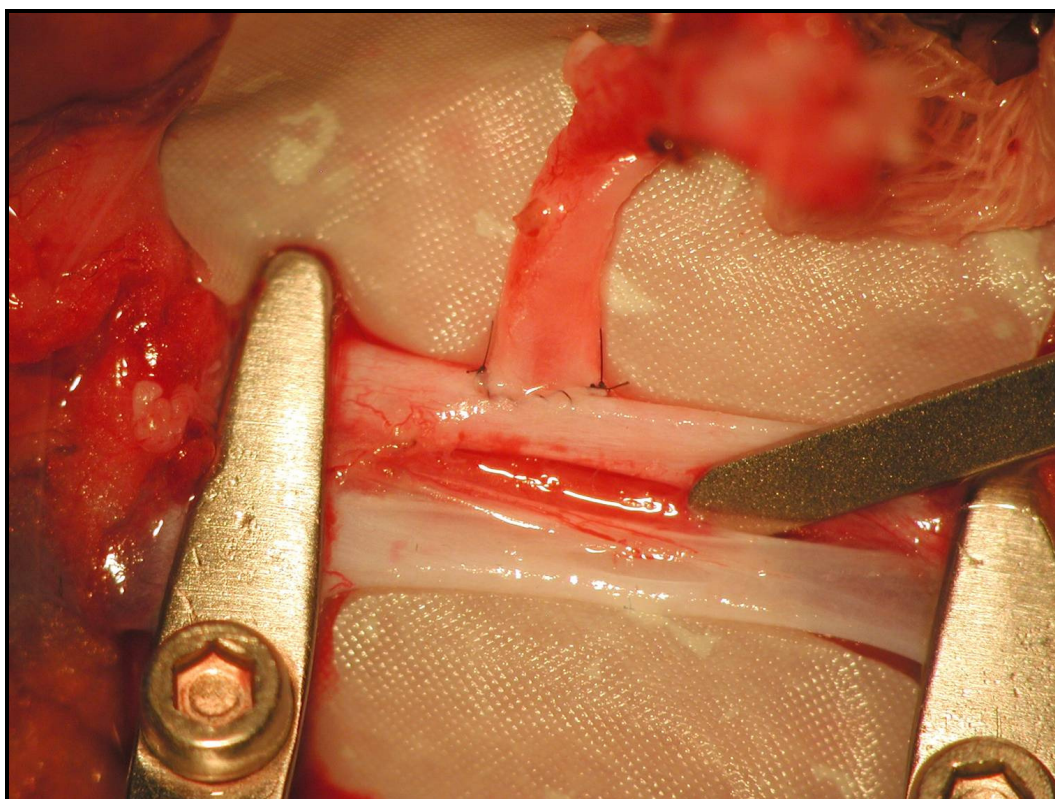


Obr. č. 11 Svorka na aortě (1) a v.cava caudalis (2)

Založíme dva pólové stehy (Nylon 9-0), které vyvěsíme a poté provedeme dle zásad mikrochirurgické techniky pokračovacím stehem nejprve futuru zadní strany tepenné anastomózy a poté tím samým vláknem i přední stěnu (Obr. 12).

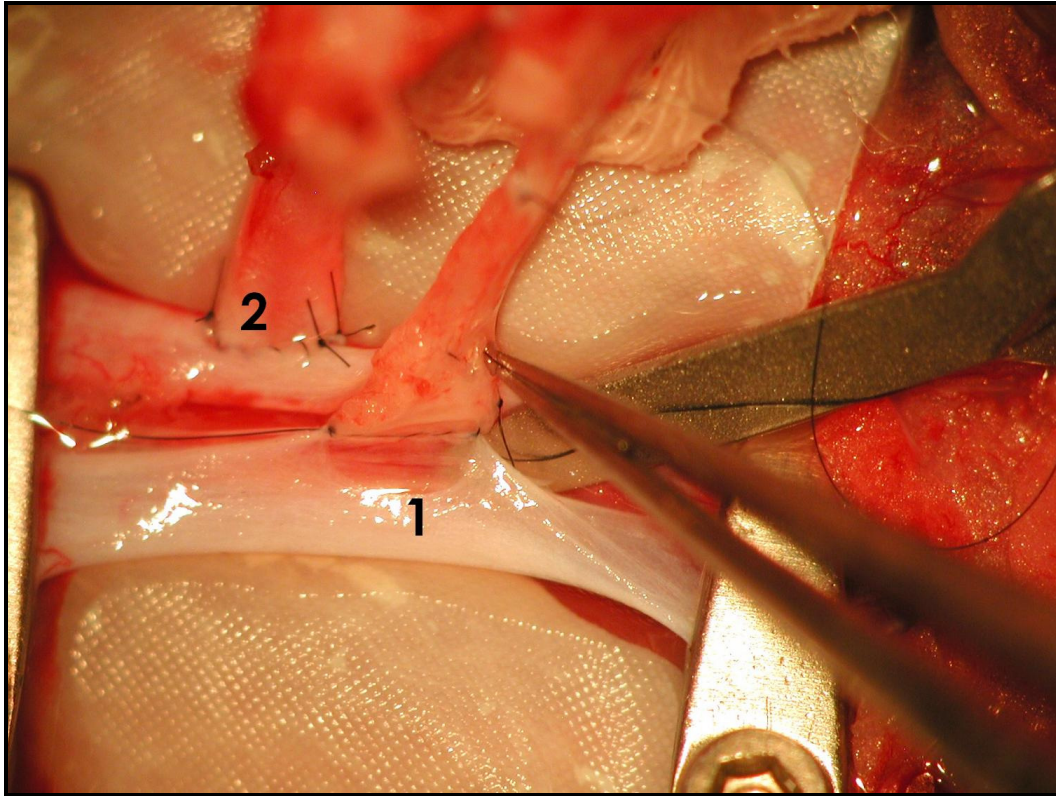


Obr. č. 12 Založení polových stehů tepenné anastomózy

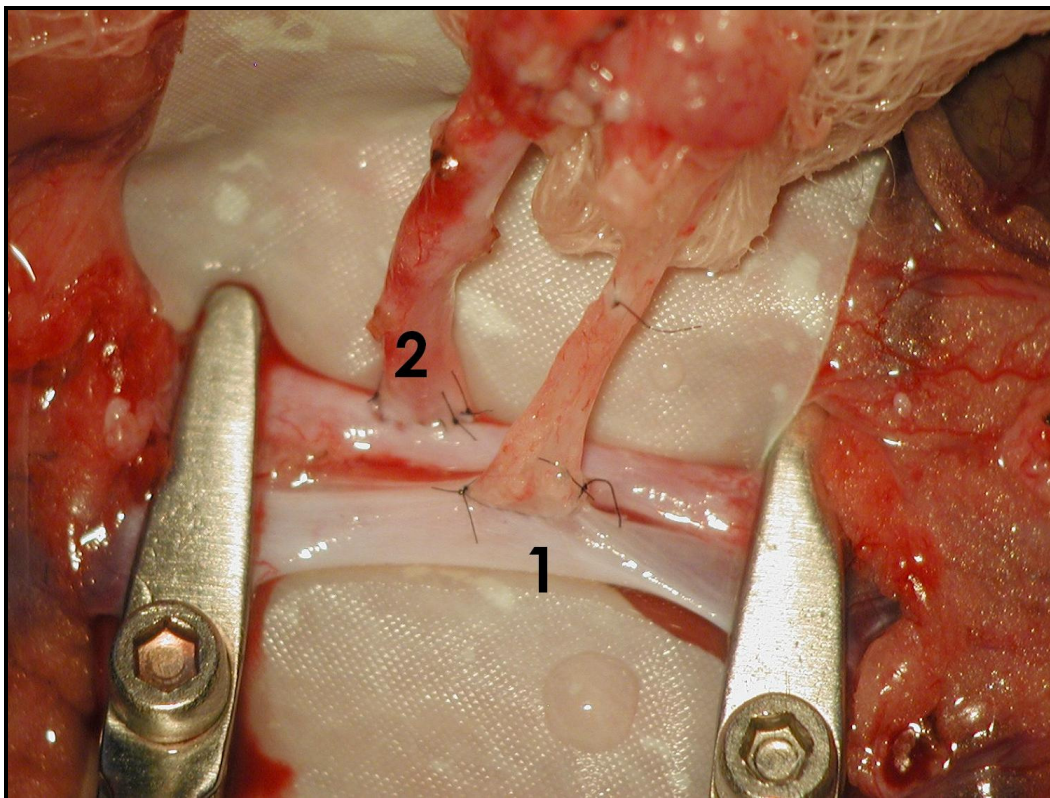


Obr. č. 13 Dokončená tepenná anastomóza

Po dokončení tepenné anastomózy (Obr. 13) vybereme místo pro žilní anastomózu na v.cava inferior tak, aby nedošlo k rotaci portální žíly, jejímu útlaku tepennou anastomózou a aby anastomóza nebyla pod tahem. Žilní anastomózu provádíme stejným způsobem jako tepennou (Obr. 14, 15).

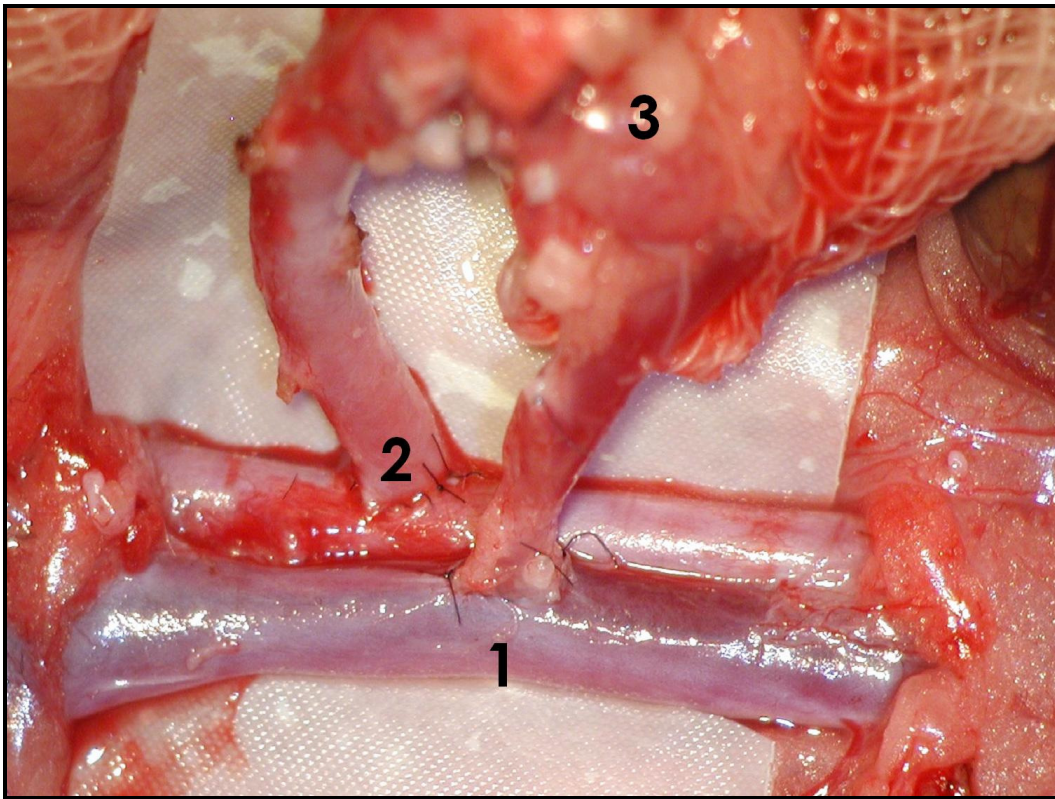


Obr. č. 14 Zhotovená zadní strana žilní anastomózy (1) a dokončená tepenná anastomóza (2)

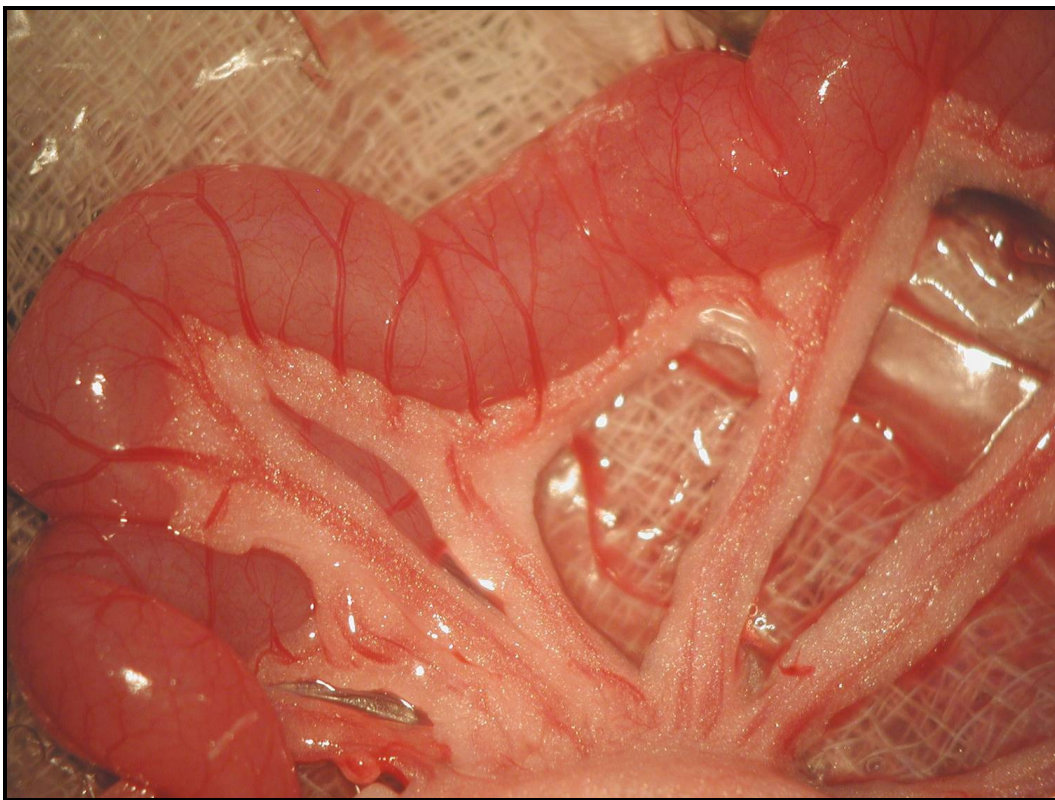


Obr. č. 15 Dokončení obou cévních anastomóz (1 – žilní, 2 – tepenná), stav před reperfuzí

Po jejím dokončení povolíme nejprve kaudální cévní svorku, potom kraniální a dojde k reperfuzi střevního štěpu (Obr. 16, 17). 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. Cévní anastomozy jemně stlačíme teplým tamponkem a pokud je to třeba, přidáme ještě přídatné stehy. 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. Po kontrole krvácení ještě dutinu břišní vypláchneme teplým fyziologickým roztokem a dutinu břišní uzavřeme ve dvou vrstvách (Obr. 18).



Obr. č. 16 Stav po reperfuzi (1 – žilní anastomóza, 2 – tepenná anastomóza, 3 – střevní štěp)



Obr. 17 Detail střeva po reperfuzi



Obr. č. 18 Celkový pohled na zvíře po skončení operace, stomie v pravém podbřišku (1)

3.1.7 Pooperační péče

Ihned po operaci přeneseme zvíře do vyhřívaného boxu, kde se během 30-45 minut probere z narkózy. Přístup k vodě mají potkani zajištěn ihned po operaci a standardní granulovou stravu dostávají 1. pooperační den. Zvířata denně vážíme, sledujeme jejich zdravotní stav. Třetí a sedmý den provádíme proplach jejunostomie fyziologickým roztokem jako prevenci její obstrukce. Pooperační bolest tlumíme analgetiky v souladu s Projektem pokusu.

3.1.8 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).

3.1.9 Výsledky

Výsledky ukazují tabulky č. 5 a 6. Ve skupině A zemřeli 2 příjemci; 1 kvůli krvácení 0. den a druhý 2. den, bez zjištění příčiny při pitvě. 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	67	42
skupina B	11	78	50	34
P	NS	<0,05	<0,001	<0,001

Tab. 5 Zhodnocení trvání dárcovské, příjemcovské operace a manipulačního času v obou skupinách. Hodnoty jsou vyjádřené v minutách.

Kód zvířete	čas operace dárce	manipulační čas	čas operace příjemce		čas operace dárce	manipulační čas	čas operace příjemce
A1	85	32	66	B1	100	35	56
A2	80	43	61	B2	55	34	54
A3	75	47	62	B3	75	37	51
A4	80	46	65	B4	85	39	53
A5	90	36	68	B5	80	32	45
A6	113	40	65	B6	65	32	50
A7	105	37	52	B7	61	33	51
A8	95	39	65	B8	90	33	51
A9	115	42	95	B9	80	29	39
A10	105	55	80	B10	80	36	50
A11	80	41	58	B11	85	28	52

Tab. č. 6 Trvání operace a manipulační časy u jednotlivých zvířat. Hodnoty jsou vyjádřené v minutách

3.1.10 Diskuze

Transplantace tenkého střeva u potkana představuje časově i technicky velmi náročný operační výkon. Předpokladem úspěchu je dokonalé zvládnutí mikrochirurgické techniky cévních anastomóz, použití vhodného modelu transplantace a zkrácení doby tvorby cévních anastomóz (manipulační čas). Monchik a Russel ve své průkopnické práci dosahují manipulační čas mezi 35 a 60 minutami (3). Pooperační mortalita v průběhu prvních 4 dnů dosahuje 19,7% a padá na vrub trombózy anastomóz, operační ztrátě krve a pooperačnímu krvácení. K tomu se ještě přidávají tzv. „neoperační“ komplikace způsobené komplikacemi s narkózou nebo komplikace vzniklé po biopsii. Autoři používají heterotopickou transplantaci celého tenkého střeva s portokavální venózní drenáží s vyvedením obou konců střeva jako terminálních stomií. Experimentální práce z posledních let kladou důraz na zkrácení manipulačního času. Bylo prokázáno, že manipulační čas delší než 45 minut výrazně snižuje nebo znemožňuje přežití transplantovaného zvířete (35, 36). Tento údaj potvrdily i naše výsledky. Výhody, nevýhody a možnosti využití jednotlivých modelů SBT jsou diskutovány v kapitole 3.1.4. Náš model vychází z původní práce Monchika a Russela. Použili jsme však pouze segment tenkého střeva v délce 7-10 cm, který pro další imunologické studie plně postačuje a snižuje riziko dalších komplikací (útlak orgánů v dutině břišní, riziko rozvoje ileózního stavu...). Podvázání orálního konce štěpu střeva ještě zrychluje výkon a při předpokládané době přežití zvířete 1 týden (takto byly koncipovány všechny naše studie) představuje optimální řešení. Pokud by zvířata přežívala déle, je vhodnější vyvést orální konec jako terminální stomii a distální konec ponechat též jako terminální stomii (model Monchika a Russela) nebo ho napojit end to side na terminální ileum příjemce. Tento postup však prodlužuje operační čas a dále zvyšuje riziko možných komplikací spojených se střevní anastomózou (dehiscence anastomózy, krvácení). Velmi důležité pro přežití je zvládnutí chirurgické techniky a s tím související dosažení optimálního manipulačního času. Přežití potkanů ve většině studií kolísá od 83 do 89% (38,39). Většina úmrtí nastává v časném potransplantačním období a proto se obvykle za technicky úspěšnou SBT považuje doba přežití potkana 3 a více dnů. Po této době se riziko příčiny úmrtí následkem technické chyby významně snižuje. Mezi nejčastější příčiny úmrtí v prvních dnech patří krvácení z anastomóz a trombóza cév. Poměrně často se však ani při pitvě neodhalí příčina smrti a v těchto případech jde nejspíše o následek komplikací spojených s anestesií, následek větší krevní ztráty při operaci (ztráta více než 2 ml bývá již fatální), kterou se v průběhu operace podaří zvládnout nebo podchlazení zvířete při dlouhotrvajícím výkonu. Proto je velmi důležité zkrátit operační čas na co nejkratší dobu, vyvarovat se krevním ztrátám a během anestezie zvíře neustále zahřívát (svlažování dutiny břišní vlažným fyziologickým roztokem, zabalení nativního střeva do teplých roušek a umístění zvířete na vyhřívanou podložku bezprostředně

po operaci). Rovněž je velmi důležité co nejméně manipulovat s vlastním střevem a hlavně zabránit torzi jeho cévní stopky. K dosažení dobrých výsledků jsou nezbytné mikrochirurgické zkušenosti. Studie Bergama ukazuje, že je nezbytný minimálně 7- týdenní intenzivní trénink (39). V práci však není uvedeno s jakými předchozími mikrochirurgickými zkušenostmi operatěři do studie vstupovali. Z vlastní zkušenosti se domnívám, že tento čas postačuje pro experimentátora, který již bezpečně ovládá základy mikrochirurgické techniky a v tomto čase se pouze seznamuje s problematikou SBT. Pro úplného začátečníka tato doba se nezdá dostačující. Nicméně v této práci autoři ukazují zlepšení přežití z 0% na začátku pokusu na konečných 83,3% a zkrácení manipulačního času z 60,2 na 41,2 minut. Práce Lopese též vykazuje počáteční přežití 0% před zahájením výcviku (38). Na konci bylo již dosaženo přežití 89% zvířat. Nejdůležitějším faktorem v přežití je vedle dobře technicky provedených cévních anastomóz hlavně manipulační čas. Jeho doba by neměla překročit 45 minut, po této době dochází k ireverzibilním změnám na střevě příjemce a následné smrti příjemce. V naší studii jsme po zvládnutí počátečních úskalí techniky SBT zařadili 11 přeživších potkanů transplantovaných v roce 2003, a do další skupiny potkany, které jsme transplantovali o rok později a zajímaly nás doby trvání odběru, transplantace a manipulační čas. Ve všech parametrech došlo ke statisticky významnému zlepšení. Současně bylo dosaženo i vyhovujícího přežívání zvířat v obou skupinách. Dosažené výsledky jsou v souladu s dříve publikovanými výsledky ostatních autorů.

3.1.11 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 antimetabolity. Původně byl vyvinut jako antivirotikum. Díky své cytotoxicitě je používán jako adjuvantní lék proti některým solidním nádorům (pankreas, nemalobuněčný plicní karcinom, karcinom ovaria, nádory prsu, cholangiogenní karcinom, karcinom žlučníku a nádory močového měchýře) (40, 41, 42, 43, 44, 45, 46). Po svém vstupu do buněk je fosforylován pomocí deoxycytidin-kinasy (dCK) na di- a trifosfát (47). Hlavní účinný produkt představuje trifosfát dFdC, který začleněním do DNA způsobuje inhibici tvorby nové DNA a způsobuje buněčnou smrt. Mezi nejzávažnější nežádoucí účinky gemcitabinu patří hematologická toxicita, která je dána vysokou koncentrací dCK v lymfocytech. Výskyt nehematologických vedlejších nežádoucích účinků není častý a příznaky jsou mírné. V posledních několika letech se objevily experimentální studie popisující imunosupresivní účinek dFdC po allogenní transplantaci srdce, ledvin a jater na zvířecím modelu (48, 49, 50, 51). 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 Zvířata

Jako dárci byli použiti dospělí inbrední samci kmene Brown- Norway (BN). Hmotnost dárců se pohybovala v rozmezí 160 až 310 gramů. Jako příjemci byli použiti dospělí inbrední samci kmene Lewis (LEW), jejichž hmotnost činila 200 až 380 gramů. Zvířata pocházela od firmy Charles River, Sulzfeld, Německo. Dvanáct hodin před operací byla dárčům i příjemcům odejmuta potrava. Přístup k vodě byl umožněn až do začátku operace. Veškerá manipulace se zvířaty před zahájením pokusu, v jeho průběhu a po jeho skončení probíhala v souladu s Projektem pokusu podle § 12 vyhlášky č. 311/97 Sb., o chovu a využití pokusných zvířat (povolení č. 23 / 2004 udělené hlavním hygienikem ČR).

3.2.2.2 Skupiny

Zvířata jsme rozdělili do čtyř skupin (tab.7). Tacrolimus (Fujisawa, GmbH, Mnichov, Německo) jsme podávali 1x denně intramuskulárně. Gemcitabine (Gemzar, Lilly France S.A., Suresnes, Francie) jsme podávali 1x denně subkutánně.

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. 7- Rozdělení zvířat do experimentálních skupin

3.2.2.3 Transplantace tenkého střeva

Průběh transplantace tenkého střeva byl detailně popsán v kapitolách 3.1.5 a 3.1.6. Za technicky úspěšnou transplantaci jsme považovali přežití příjemců po dobu minimálně 3 dnů.

3.2.2.4 Pooperační péče

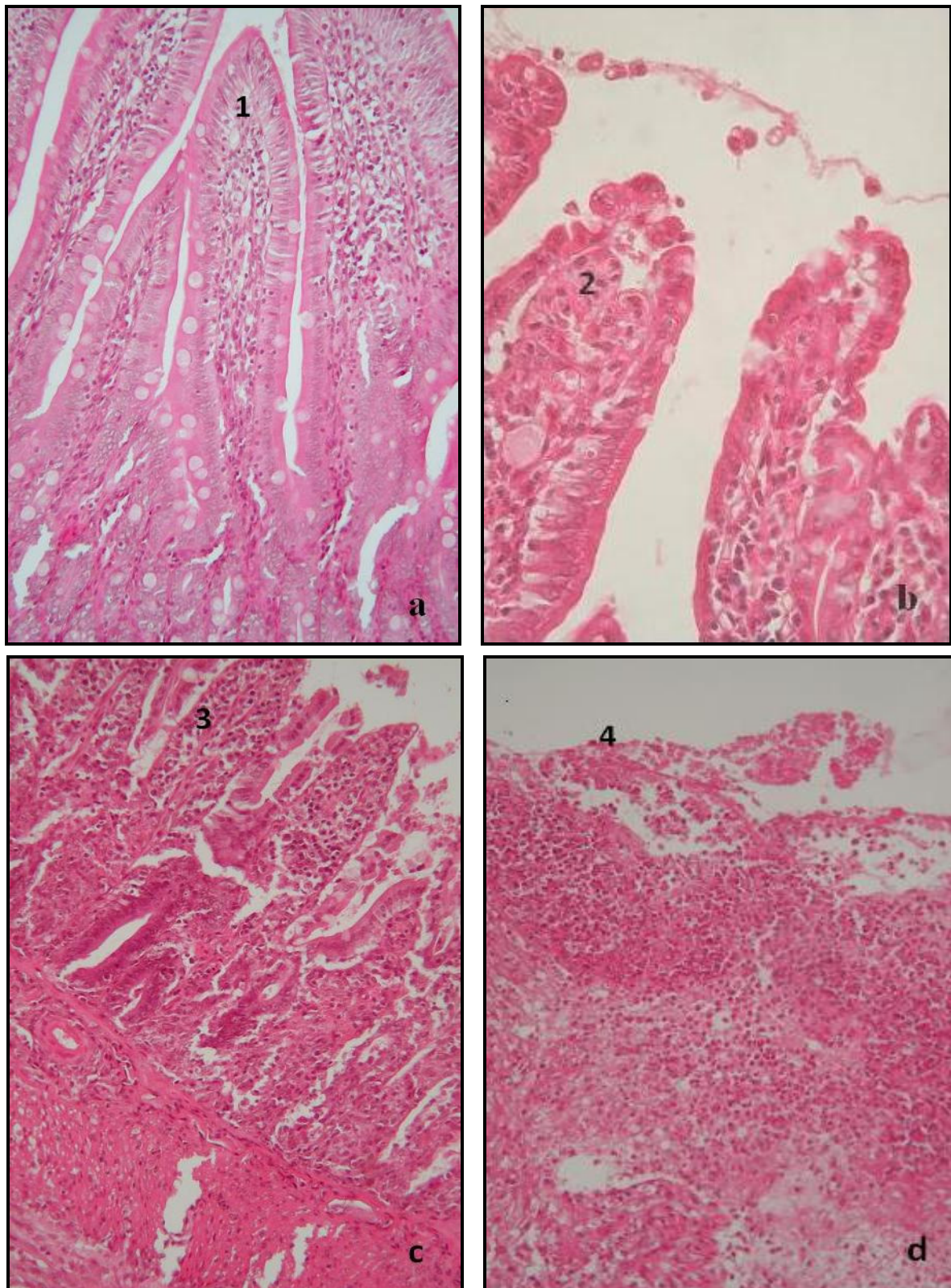
Po operaci byla zvířata ihned umístěna do vyhřívaných klecí s přístupem k vodě. Standardní laboratorní stravu obdržela zvířata 1. pooperační den. Každý den jsme potkany vážili a sledovali jejich zdravotní stav. U skupin B, C a D jsme denně zvířatům aplikovali imunosupresi. Třetí pooperační den jsme v celkové anestezii po uvolnění terminální jejunostomie odebrali 1 cm dlouhý vzorek jejunu (minimálně 0,5 cm od konce vývodu) na histologické vyšetření a opět vytvořili novou terminální jejunostomii. Současně jsme propláchli lumen střeva fyziologickým roztokem jako prevenci proti jeho obstrukci. Zvířata byla utracena v celkové anestezii 7. pooperační den, kdy jsme provedli odběr střeva dárce i příjemce na histologické vyšetření.

3.2.2.5 Histologie

Vzorky střeva v celé tloušťce stěny fixované 24 hodin v 10% neutrálním formalinu byly zalaty do parafinových bločků, ze kterých byly připraveny 5 µm řezy, které byly obarveny hematoxylin eosinem. Histologické preparáty byly vyhodnoceny patologem podle stupně rejekce (52) (tab. 8).

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. 8– Grading akutní rejekce střeva



Obr. č. 19 Histologický nálezn jednotlivých stupňů rejeckce: a) bez známek rejeckce (1- normální architektónika klků), b) mírná rejeckce (2- zánětlivé buňky v lamina propria), c) střední rejeckce (3- destrukce epitelu až do ½ klků), d) těžká rejeckce (destrukce epitelu přesahující ½ klků). Hematoxylin-eosin, zvětšení 200x

3.2.2.6 Statistická analýza

Ke statistickému zhodnocení jsme použili χ^2 test.

3.2.3 Výsledky

Výsledky přehledně ukazuje tabulka 9. Do studie byla zařazena pouze zvířata po technicky úspěšné transplantaci. Třetí den byly pouze u dvou zvířat ve skupinách B a D nalezeny známky mírné rejekce, u ostatních zvířat nebyly objeveny žádné známky rejekce. Sedmý den ve vzorcích skupiny A (bez imunosuprese) se vyskytovala rejekce všech 3 stupňů, přičemž její četnost byla rozložena rovnoměrně po 2. Ve skupině B (tacrolimus) nebyly nalezeny žádné rejekční změny. Ve skupině C (nižší dávka gemcitabinu) byly diagnostikovány 4x známky střední rejekce a po jednom nálezu mírné a těžké rejekce. Ve skupině D (vyšší dávka gemcitabinu) jsme našli v 5 případech známky střední rejekce a pouze v jednom případě známky mírné rejekce. Statisticky významných rozdílů ($p < 0,01$) bylo dosaženo pouze ve srovnání rejekčních změn 7. den po transplantaci u skupiny B vzhledem k ostatním skupinám (A, C, D). V tenkém střevě příjemce nebyly zaznamenány žádné morfologické změny.

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

Tab.č. 9. Histologické nálezy rejekce v jednotlivých skupinách (0-žádná rejekce, 1-mírná rejekce, 2- střední rejekce, 3-těžká rejekce)

3.2.4 Diskuze

Výsledky transplantace tenkého střeva doposud nedosahují takových úspěchů jako transplantace ostatních solidních orgánů. Překážky zamezující zlepšení výsledků představují mimo jiné rejekce a potransplantační infekce. V posledních téměř dvou desítkách let se stal tacrolimus základem většiny terapeutických schémat po SBT. Nicméně stále trvá snaha o nalezení ještě účinnějšího imunosupresiva či imunosupresiva stejného účinku s menšími nežádoucími účinky. Jednu z možných cest představuje prozkoumání imunosupresivního efektu i léků původně vyvinutých k jinému účelu.

Aktivní metabolity gemcitabinu (di- a hlavně trifosfát dFdC), které vznikají fosforylací dFdC v lymfocytech pomocí deoxycytidin kinázy, blokují tvorbu DNA v lymfocytech. Tím brání

jejich proliferaci, což má za následek imunosupresivní efekt gemcitabinu (53). Imunosupresivní efekt dFdC v modelu orgánových transplantací poprvé publikoval Margreiter v roce 1999 (48). Margreiterova studie ukazuje, že antiproliferační účinek gemcitabinu na T-lymfocyty in vitro je přímo úměrný jeho koncentraci v lymfocytech. Ve své in vivo studii zkoumal vliv různého dávkování dFdC (0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 300, 600, 6000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$) na přežití srdečních štěpů v modelu heterotopické transplantace srdce u potkana. Délka přežití štěpů byla závislá na dávce dFdC. Nejdelšího přežití dosáhl při dávkování 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$. Zvýšená dávka 125 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$ již nevedla k zlepšenému přežití štěpů. Všechna zvířata léčená 150, 300, 600 a 6000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$ zemřela s funkčními štěpy bez známek rejekce na pneumonii. Leukopenie závislá na dávce se objevila u všech zvířat ve všech skupinách, avšak reverzibilní byla pouze u zvířat léčených dávkou nižší než 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$. Zvířata léčená dávkou 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$ a vyšší vykazovala pokles hmotnosti větší než 10%. Jaterní testy a hodnota kreatininu zůstaly u všech zvířat po celou dobu pokusu beze změny.

Jeske navázal na práci Margreitera a zkoumal efekt gemcitabinu v kombinaci s kalcineurinovým inhibítorem (cyklosporin A, tacrolimus) v modelu akutní rejekce po heterotopické transplantaci srdce u potkana (50). Účinná prevence akutní rejekce a dlouhodobé přežívání štěpů ($>100\text{dnů}$) bylo dosaženo při podávání 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$ dFdC v kombinaci s 1 a 5 $\text{mg}/\text{kg}/\text{den}$ cyklosporinu A a dále ve skupině se 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$ dFdC v kombinaci s 0,02 $\text{mg}/\text{kg}/\text{den}$ tacrolimu. Současné podávání dFdC a kalcineurinového inhibítora nezvýšilo hematotoxicitu dFdC a neovlivňovalo hladinu kalcineurinového inhibítora. Na rozdíl od předchozí studie Margreitera Jeske nepozoroval vyšší výskyt infekčních komplikací při podávání 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$ dFdC.

Imunosupresivní efekt gemcitabinu později potvrdil též Jung, který použil model akutní rejekce po transplantaci srdce a ledvin u potkana. Účinná dávka v tomto modelu činila 130 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$ pro srdce a 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$ pro ledvinu (49).

Po těchto slibných výsledcích jsme se rozhodli pro vyzkoušení imunosupresivního efektu dFdC v experimentálním modelu akutní rejekce po transplantaci jater a po transplantaci střeva. V práci Mergentala bylo použito modelu akutní rejekce jaterního štěpu po allogenní transplantaci u potkana. Byla srovnána skupina bez imunosuprese, dále skupina léčená dFdC v dávce 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$ a skupina léčená cyklosporinem A v dávce 2,5 $\text{mg}/\text{kg}/\text{den}$. V histologických nálezech ve skupině bez imunosuprese byl nález těžké rejekce, ve skupině s dFdC střední a ve skupině s cyklosporinem nebyly přítomny žádné známky rejekce. Tyto výsledky ukazují, že gemcitabine působí imunosupresivně i v modelu transplantace jater, ale není dostatečně účinný ve srovnání se standardním imunosupresivem (cyklosporinem A) (51).

V našem modelu jsme zvolili dávkování gemcitabinu 100 a 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$. 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 (54). 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

Až na několik málo výjimek disponují všechny tkáně a vnitřní orgány dobře vyvinutým lymfatickým systémem. Existuje malá, ale přesto významná část plasmatických bílkovin a tekutin z kapilár probíhající v intersticiu, která je prostřednictvím lymfatického systému resorbována a opět přiváděna do krevního oběhu. Tato resorpční funkce lymfatického systému nemůže být žádným jiným systémem nahrazena. Také některé buňky podílející se na imunitní obraně organismu využívají lymfatické cévy jako transportní cestu mezi krví, lymfatickými uzlinami a tkáněmi.

Vzhledem k významu lymfatických cév se nabízí otázka, do jaké míry jsou funkce lymfatického systému schopny po provedení orgánové transplantace regenerovat. Během transplantace dojde vždy k přerušení lymfatické drenáže štěpu, která na rozdíl do tepenného a žilního zásobení není během transplantace opět chirurgicky obnovena. Lymfatický systém disponuje velmi dobrými regeneračními možnostmi, které však jsou limitované, především pokud jsou přerušeny velké lymfatické kolektory. Nedostatečně zregenerovaný lymfatický systém vede v průběhu několika měsíců až let k jeho chronické dekompenzaci s rozvojem otoku tkání. Spontánně vzniklé lymfatické anastomózy mezi dárcovským orgánem a příjemcem nejsou funkčně plnohodnotné. Také není dosud zcela známo, jaký vliv má přerušení cirkulace lymfocytů na imunologické procesy v transplantovaném orgánu.

Abychom mohli alespoň částečně odpovědět na tyto otázky, je nezbytné mít k dispozici zvířecí model transplantace orgánu se současnou obnovou lymfatické drenáže. 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.

Z výše uvedeného vyplývá, že model transplantace tenkého střeva se současnou rekonstrukcí lymfatických cest může být vhodným modelem pro studium významu lymfatických cév při orgánových transplantacích.

3.3.2 Význam lymfatického systému

3.3.2.1 Fyziologické funkce lymfatického systému

Lymfatický systém doplňuje funkce krevního systému. Reguluje bilanci tekutin a usnadňuje transport proteinů v intersticiu. Dále se významně podílí na recirkulaci imunokompetentních buněk v organismu (55).

3.3.2.2 Mikrocirkulace v intersticiu

Lymfatický systém představuje významný transportní systém pro tekutiny. Jeho úkolem je odvádět intersticiální tekutinu z tkání zpět do krevního oběhu. Zvláště důležitý je odvod proteinů rozpuštěných v intersticiální tekutině. Toto je nejdůležitější úloha lymfatických cév, která nemůže být dostatečně nahrazena žádným jiným mechanismem. Bez této transportní funkce lymfatických cév stoupá nepřetržitě koncentrace bílkovin v intersticiu, což vede k narůstání edému tkání, které se později stávají nefunkčními.

Na začátku krevních kapilár je hydrostatický tlakový rozdíl mezi kapilárou a intersticiem větší než koloidně-osmotický. Tento gradient vede k přestupu tekutiny do intersticia. Při poklesu tohoto rozdílu v dalším průběhu kapilár a při současném vzestupu koloidně-osmotického tlaku vlivem narůstající koncentrace plasmatických proteinů dochází k reabsorpci filtrované tekutiny zpět do cévního lumen. V tkáních zůstává pouze asi 1% tekutiny. Kapiláry však nejsou pro plasmatické proteiny zcela nepropustné, a tak se dostává do intersticia společně s filtrovanou tekutinou také malé množství těchto proteinů. Pro tyto filtrované proteiny však neexistuje žádný efektivní transportní systém zpět do cévního lumen. Pomocí izotopových vyšetření bylo možné prokázat, že až 50% celkové koncentrace proteinů v plazmě je během jednoho dne přefiltrována z krve do intersticia a odtud zpět přivedena pomocí lymfatického systému do krevního oběhu (56).

Z tohoto vyplývá, že tepny, žíly a lymfatické cévy tvoří jeden funkční celek, který slouží k zajištění homeostázy uvnitř tkání. Lymfatické cévy se nalézají až na několik málo výjimek (např. chrupavka, čočka, rohovka) ve všech vnitřních orgánech. Lymfatický systém při transplantacích není možné a priori považovat za nedůležitý.

3.3.2.3 Imunologické funkce

Lymfatický systém je anatomicky i funkčně těsně provázán s imunitním systémem.

Představuje drenážní systém nejen pro intersticiální tekutinu, ale také pro buňky a jiné částice, které mohou být potenciálně toxické. Jde o infekční částice, bakterie nebo parazity, nebo o cizí tělesa, která pronikla do organismu (např. pigmenty). Společně s intersticiální tekutinou se dostávají do lymfatických kapilár, odkud jsou transportovány lymfatickým systémem do regionálních lymfatických uzlin, které jsou osídleny makrofágy, které se podílejí na efektivní filtraci protékající lymfy a na jejím imunologickém dohledu (57).

Další těsné spojení lymfatického a imunitního systému spočívá v tom, že imunokompetentní buňky po reakci s antigenem ve tkáních cestou lymfatických cév vcestují do regionálních lymfatických uzlin, kde spolu s dalšími specializovanými buňkami indukují imunitní odpověď (58). Ke vzniku imunitní odpovědi je nutná spolupráce mezi různými buněčnými subpopulacemi. Výsledkem je proliferace vybraných antigen-specifických buněk. Tyto interakce mezi buňkami a následná proliferace probíhají ve vysoce diferencované lymfatické tkáni lymfatických uzlin, která vytváří vhodné mikroprostředí. Imunokompetentní buňky potom opět opouští lymfatické uzliny a přes krevní oběh se dostávají zpět do periferních tkání. Tento děj se může několikrát po sobě opakovat.

Tkáně a k nim příslušející spádové lymfatické uzliny tak vytváří imunologicky jednotný systém. Lymfatické cévy v tomto systému fungují jako transportní cesta.

3.3.3 Anatomické základy

Lymfatické cévy jsou ve svém průběhu morfologicky i funkčně rozděleny na lymfatické kapiláry a lymfatické kolektory, jejichž rozdílná stavba odpovídá rozdílným funkčním požadavkům, které jsou na ně kladeny.

3.3.3.1 Lymfatické kapiláry

Lymfatické kapiláry se podobají endotelizovaným trubicím a jsou od okolní tkáně ohraničeny chabě vyvinutou bazální membránou a začínají jako slepě ukončené cévy. Ve srovnání s krevními kapilárami mají větší průměr (5-10 μm), na příčném řezu nepravidelný tvar a ve své stěně nemají přítomny hladké svalové buňky (59). K posunu lymfy tak dochází pasivně působením zevních sil, mezi které patří například pulsace cév, svalové kontrakce, pohyby střeva, dechové exkurze nebo stlačení kůže.

3.3.3.2 Lymfatické kolektory

Lymfatické kolektory vznikají soutokem několika lymfatických kapilár, mají větší průměr a hladkou svalovinu ve své stěně. Jejich obvod je pravidelný kruhový a nejsou na rozdíl od kapilár pevně spojeny kolageními vlákny k okolním tkáním, ale jsou oproti svému okolí volně pohyblivé. Obsahují v pravidelných intervalech chlopně, které zabraňují zpětnému toku lymfy. Proud lymfy je zabezpečen kontrakturou hladkých svalových vláken a je nezávislý od zevních vlivů. Během kontrakce jsou distální chlopně uzavřeny a proximální otevřeny. Koordinace kontrakcí je do jisté míry autonomní, ale může být modulována autonomním nervovým systémem.

3.3.3.3 Lymfo- venózní spojky

Lymfatické kolektory z obou dolních končetin a z břicha tvoří v úrovni odstupů arteria mesenterica superior cysternu chyli, která představuje rozšířený začátek ductus thoracicus, který probíhá za hrudní aortou a ústí v angulus venosus sinister (soutok v. subclavia l. sin a v. jugularis interna l. sin.). Takto se dostává lymfa prakticky z celého těla zpět do krevního oběhu s výjimkou lymfy z pravé horní končetiny a z pravé poloviny obličeje, která ústí jako ductus lymphaticus dexter do angulus venosus dexter. Za fyziologických podmínek jsou to pouze tato 2 místa, kde se lymfa dostává do krevního oběhu. V některých případech, většinou za patologických stavů, je možné při lymfangiografii prokázat distálně uložené lymfo- venózní anastomózy, které jsou při normálních situacích uzavřené nebo pouze dočasně otevřené (59).

3.3.4 Odtok lymfy ze střeva u potkana.

Podrobně popsáno v kapitole 3.1.3.

3.3.5 Patofyziologie lymfatického systému

3.3.5.1 Patogeneze lymfedému

Za fyziologických podmínek odpovídá objem lymfy, která je odvedena z tkání stejnému množství vytvořenému filtrací v tkáních. Patologicky zvýšená tvorba intersticiální tekutiny může vést k edému, pokud za časovou jednotku více tekutiny vznikne než je organismus prostřednictvím lymfatických cév schopen odvést. Je známo, že transportní kapacita

lymfatického systému je omezena. Otoky také vznikají za patologické situace, kdy je při normální produkci intersticiální tekutiny snížena transportní kapacita lymfatického systému. Tyto otoky označujeme jako lymfedém. Příčinou snížené transportní kapacity může být například přerušení kontinuity velkých lymfatických kolektorů nebo když jsou insuficientní chlopně nebo pokud je snížena schopnost spontánních rytmických kontrakcí kolektorů.

Nabízí se otázka, zda jsou orgánové lymfatické kolektory po transplantaci schopny znovu obnovit svou funkci a zda, podobně jako je tomu u končetin, nedostatečná regenerace lymfatických kolektorů může vést k funkčním poruchám v postiženém orgánu.

3.3.5.2 Lymfedém tenkého střeva

Vedle základní úlohy lymfatického systému, kterou je odvod bílkovin a tkáňového moku z intersticia, mají ještě lymfatické cévy další funkci, a to odvádět vstřebanou tekutinu a živiny ze střevního lumen. Jedná se zvláště o lipidy ve formě chylomiker a bílkoviny rozpustné v tucích (60). Lymfatický systém tenkého střeva je obdařen velkou kapacitní rezervou. Více než polovina veškeré lymfy z těla vzniká v břišních orgánech (61). Bazální produkce lymfy činí 1ml/kg/hod. Po jídle bohatém na tuky však stoupá až na 200ml/kg/hod (62). Porucha transportu lymfy ze střeva má svůj klinický obraz a popisuje se jako lymfangiektázie a byla prvně popsána v roce 1961 (63). Klinické symptomy se manifestují v různé míře a v závislosti na věku pacienta. Zatímco u dětí stojí v popředí podvýživa a retardace růstu, u dospělých v klinickém obraze dominují hlavně hypoalbuminemické otoky, průjmy a steatorea. Ve všech případech se v histologickém nálezu objevuje obraz rozšířených lymfatických cév v tenkém střevě, které jsou dle tíže postižení omezeny buď jen na centrální klkovou lymfatickou cévu nebo postihuje celou střevní stěnu včetně serosy. V biochemickém nálezu převládá různě vyjádřená hypoalbuminemie, hypogamaglobulinemie a lymfopenie. Při těžkém průběhu jsou sníženy i hodnoty cholesterolu a lipoproteinů. Tyto nálezy vznikají jako důsledek ruptury nebo zvýšené propustnosti dilatovaných lymfatických cév, které vedou ke ztrátě lymfy do střevního lumen.

Existuje mnoho patologických stavů, které vedou ke sníženému odtoku lymfy ze střeva. U dětí převládají různé vývojové vady lymfatického systému, u dospělých se manifestují zánětlivá a hlavně maligní onemocnění, která postihují mesenterální nebo retroperitoneální lymfatické uzliny (64).

Shodný klinický obraz nemoci je možno vyvolat experimentálně podvazem nebo sklerotizací lymfatických cév v mezenteriu tenkého střeva. Je možné potom pozorovat patologický odtok lymfy přes spontánní lymfo-venózní anastomózy v portálním oběhu jater (65, 66).

3.3.5.3 Reakce lymfatických cév na jejich přerušení

3.3.5.3.1 Regenerační schopnost lymfatických cév

Mnohými klinickými i experimentálními studiemi byla zkoumána schopnost regenerace lymfatického systému po jeho poranění.

Je zřejmé, že lymfatické kapiláry mají neomezenou schopnost regenerace. Mohou vyrůst z již existujících lymfatických cév nebo jsou také schopné novotvorby a prorůstání do granulační i nádorové tkáně (67).

Oproti tomu lymfatické kolektory mají jen velmi limitovanou schopnost regenerace. Pouze při jednoduchém přerušení kolektoru, kdy oba konce zůstanou v kontaktu, dochází ve většině případů k obnově kontinuity (68, 69). V některých případech není po několika měsících již patrné místo po poranění, častěji však zůstává původní místo stenotické. Pokud však dojde ke ztrátě segmentu, není úplná obnova kolektoru možná. V těchto případech se lymfa odvádí již dříve přítomnými nebo nově vytvořenými kolaterálami. Pokud tyto kolaterály nejsou dostatečně kapacitní, vyraží z distálního konce přerušeno kolektoru nové větve, které vytvoří spojení s proximálním koncem, avšak pouze za předpokladu, že se zde již nevytvořila jizva (70). Tyto nově vytvořené anastomózy mají však výrazně nižší kapacitu. Je to dáno jednak menším průměrem a dále chyběním hladké svaloviny, která je zodpovědná za posun lymfy.

Pokud je odvod lymfy z končetiny závislý pouze na nově vytvořených anastomózách, dojde k rozvoji sekundárního lymfedému (71). Charakteristický je časový průběh výskytu lymfedému. Po experimentálně navozeném lymfatickém bloku na stehně u psa, dojde nejprve k rychlému pooperačnímu rozvoji lymfedému na postižené končetině. Tento otok postupně v průběhu několika týdnů zmizí v závislosti na nově vytvořených anastomózách, které uzávěr překlenou. Následuje latentní období, které může trvat až několik let, během něhož není lymfedém prokazatelný. Poté se opět objeví a již se neztratí a bez léčby stále progreduje (72, 73). Příčinou znovuobjevení lymfedému je nepoměr mezi potřebou odvodu lymfy z končetiny a omezenou transportní kapacitou nově vytvořených anastomóz. Toto vede k rozvoji insuficience i ostatních lymfatických cév, u kterých jsou prokazatelné všechny známky dekompenzace. Lymfograficky je prokazatelná dilatace kolektorů s insuficiencí chlopní a retrográdním tokem.

Závěr těchto studií jasně ukazuje, že lymfatický blok není možné plnohodnotně překlenout spontánně vytvořenými anastomózami, a že je třeba jejich dostatečný počet k zabránění rozvoje progresivní insuficience a dekompenzace (74).

3.3.5.3.2 Spontánní regenerace lymfatických cév po transplantaci tenkého střeva

Chování lymfatických cév po transplantaci orgánů bylo sledováno výlučně při transplantaci střeva. Hlavním důvodem je, že lymfatické cévy tenkého střeva hrají významnou úlohu při vstřebávání tekutin a tuků ze střeva a jejich dobrá funkce má velký význam pro střevní transplantát. Všechny studie ukazují v zásadě stejnou regenerační schopnost lymfatických cév jako experimentální práce provedené při blokádě odtoku lymfy z končetiny u psa (viz. výše). Od prvního pooperačního dne po transplantaci tenkého střeva je možné prokázat všechny příznaky lymfostázy v transplantátu (75, 76). V histologickém obraze dominují rozšířené lymfatické cévy v celé střevní stěně. Lymfangiografické vyšetření ukáže rozšíření lymfatických kolektorů v mesenteriu, retrográdní tok zpět do střevní stěny a chybějící odtok lymfy z transplantátu. Po několika hodinách po operaci dochází také ke spontánnímu uzávěru přerušovaných lymfatických cév a tím je znemožněna prostá drenáž lymfy do dutiny břišní (77, 78).

Tři až čtyři dny po autologní transplantaci dochází v mesenteriu v okolí sutury k vypuštění většího množství drobných lymfatických cév, které postupně anastomozují s lymfatickým systémem příjemce. Po allogenní transplantaci je tento proces o 1 až 2 týdny opožděn, pravděpodobně vlivem rejekce (76, 79). Nově vytvořené anastomózy se postupně rozšiřují, zatímco známky lymfostázy se ztrácejí. Lymfograficky je možné prokázat odtok lymfy ze střeva do ductus thoracicus příjemce. Je možné též prokázat přenos mastných kyselin a chylomiker z transplantovaného střeva (80).

Úplná regenerace truncus intestinalis, který je největším lymfatickým kolektorem tenkého střeva, nebyla žádnou studií prokázána. Důkaz pouze částečné regenerace lymfatického systému přináší práce Rotmana, který prokázal ještě 210 dní po autotransplantaci tenkého střeva odtok lymfy nejen do ductus thoracicus, ale také přes lymfo-venózní anastomózy do portální žíly a jater (81). K tomuto stavu za fyziologických podmínek nedochází a je pozorován při lymfostáze (82).

Nedostatečně zregenerovaný lymfatický systém se vlivem vysokých nároků na transport lymfy chronicky dekompenzuje, což vede k otoku tkání. V případě tenkého střeva může dojít k jeho funkčnímu poškození.

3.3.6 Materiál a metody

3.3.6.1 Zvířata

Jako dárci byli použiti dospělí inbrední samci kmene Brown- Norway (BN). Hmotnost dárců se pohybovala v rozmezí 160 až 300 gramů. Jako příjemci byli použiti dospělí inbrední samci kmene Lewis (LEW), jejichž hmotnost činila 200 až 380 gramů. Zvířata pocházela od firmy Charles River, Sulzfeld, Německo. Dvanáct hodin před operací byla dárcům i příjemcům odejmuta potrava. Přístup k vodě byl umožněn až do začátku operace. Veškerá manipulace se zvířaty před zahájením pokusu, v jeho průběhu a po jeho skončení probíhala v souladu s Projektem pokusu podle § 12 vyhlášky č. 311/97 Sb., o chovu a využití pokusných zvířat (povolení č. 23 / 2004 udělené hlavním hygienikem ČR).

3.3.6.2 Skupiny

Zvířata jsme rozdělili do pěti skupin (tab. 10). Prograf (Tacrolimus, Fujisawa, GmbH, Mnichov, Německo) jsme podávali 1x denně intramuskulárně.

skupina	počet zvířat	rekonstrukce lymfatických cév	imunoprese
A	6	NE	žádná
B	6	ANO	žádná
C	6	NE	tacrolimus 1mg/kg/den
D	5	ANO	tacrolimus 0,15mg/kg/den
E	5	NE	tacrolimus 0,15mg/kg/den

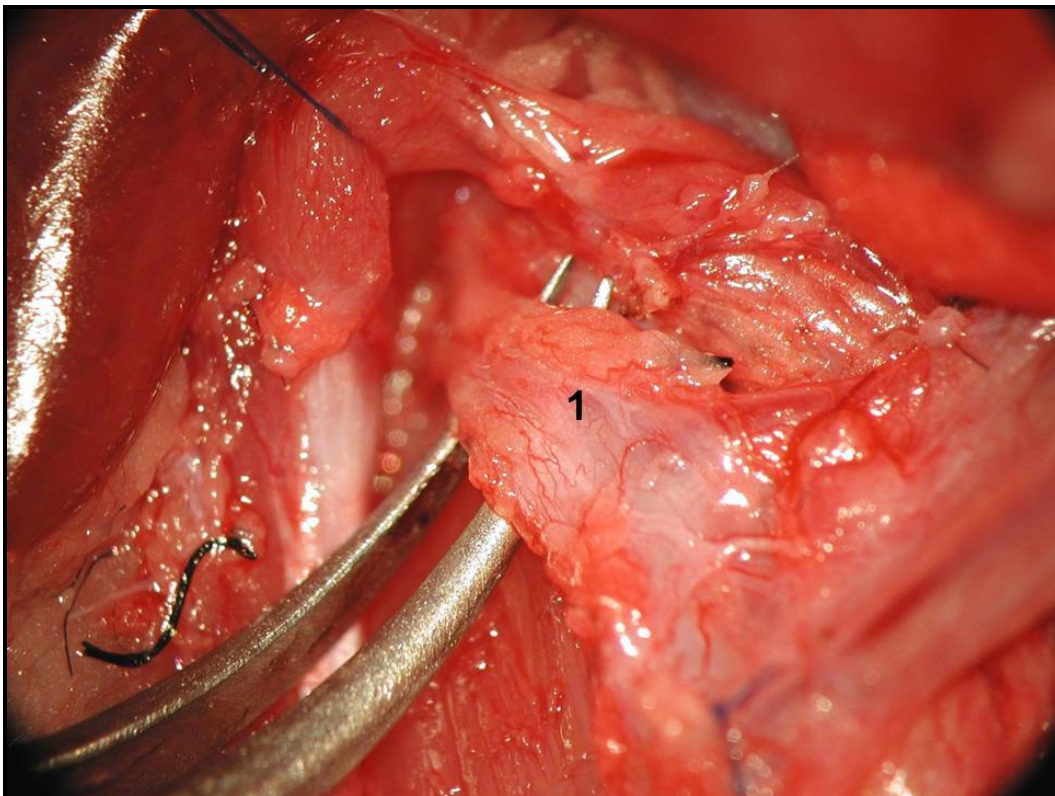
Tabulka 10 – Charakteristika jednotlivých experimentálních skupin

3.3.6.3 Transplantace tenkého střeva s primární rekonstrukcí lymfatických cév

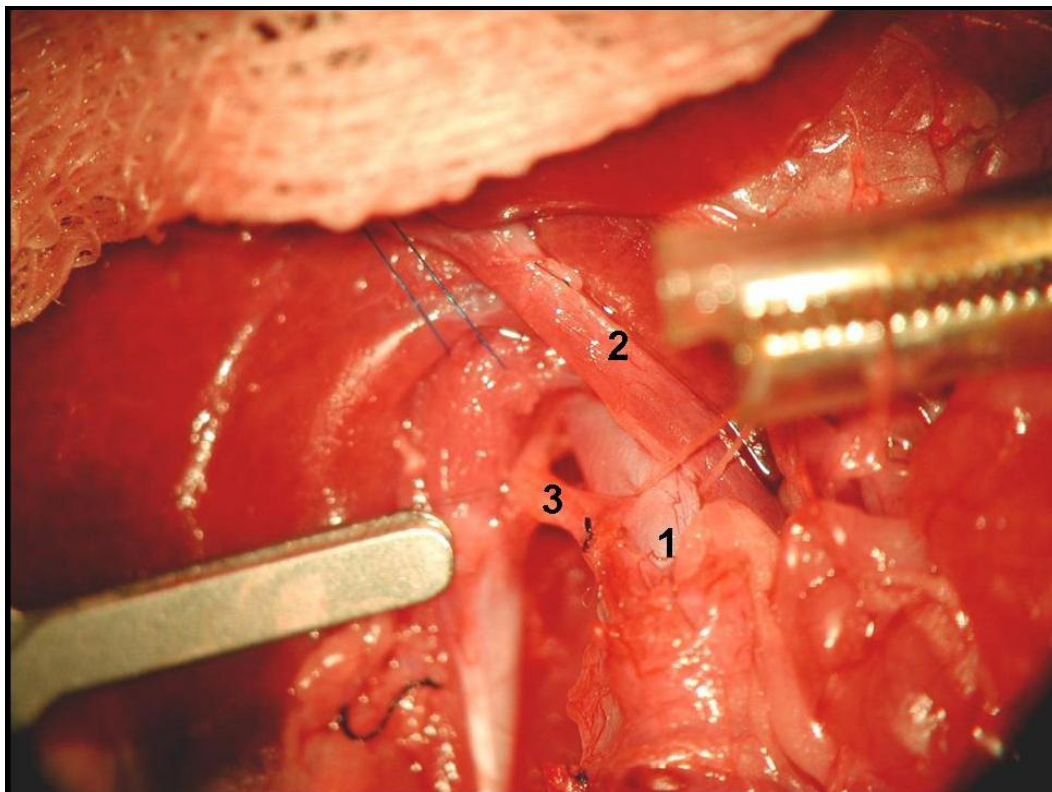
OPERACE DÁRCE

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 3.1.5. Po uvolnění kaudální části aorty kraniálně od bifurkace aorty, uvolnění vena portae a oddělení orálního a aborálního konce jejunu 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 (obr. 20). 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 odstupu a. celiaca a lymfatickými cévami sbírajícími lymfu ze střevního štěpu a vyústujícími do ductus thoracicus (obr. 21).



Obr. č. 20- Detail ductus thoracicus (1)



Obr. č. 21- Stav před perfuzí, uvolněná aorta (1), vena portae (2) a ductus thoracicus (3)

Podvážeme aortu kraniálně od bifurkace a kraniálně od odstupu 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.

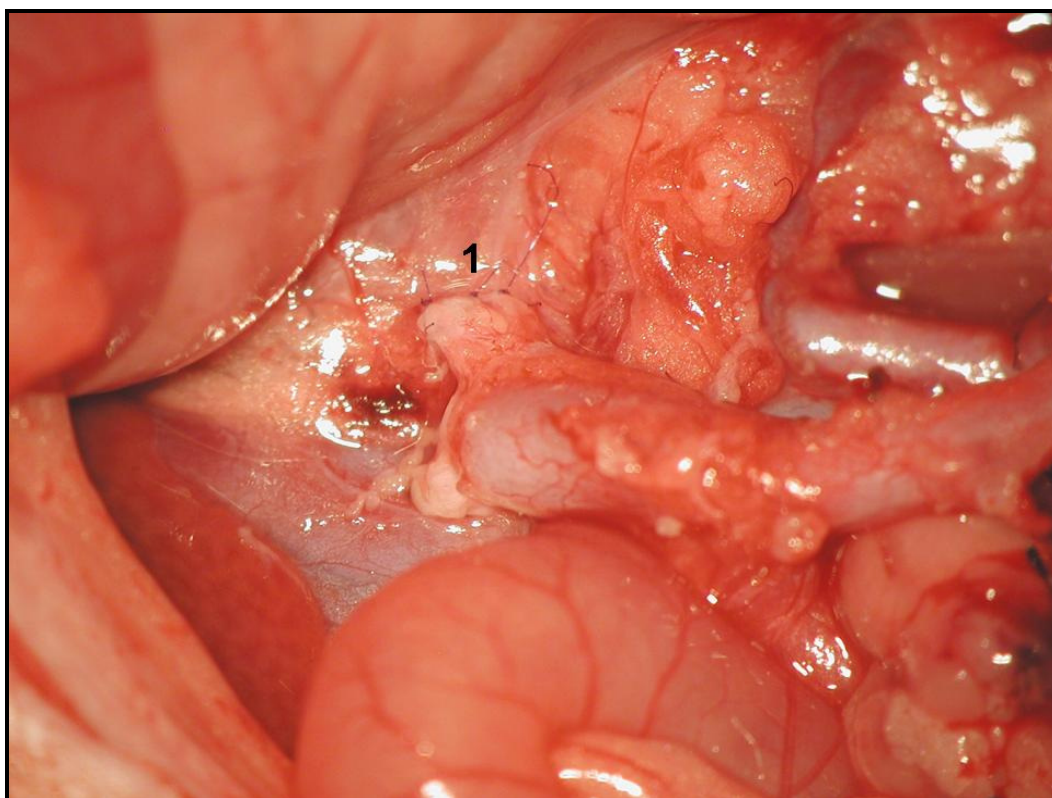
Preparace lymfatických cév prodlouží odběr střevního štěpu v průměru o 45 až 60 minut.

OPERACE PŘÍJEMCE

Počáteční fáze transplantace se neliší od postupu detailně popsaného v kapitole 3.1.6. 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 odstupu 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 (obr. 22). 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. 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. 22- Stav po dokončení tepenné , žilní a lymfatické (1) anastomózy

3.3.6.4 Pooperační péče

Po operaci byla zvířata umístěna do vyhřívaných klecí s přístupem k vodě. Standardní laboratorní potravu obdržela zvířata 1. pooperační den. Každý den jsme potkany vážili a sledovali jejich zdravotní stav. U skupin C, D a E jsme 1x denně zvířatům aplikovali imunosupresi. Třetí pooperační den jsme v celkové anestezii po uvolnění terminální jejunostomie odebrali 1cm dlouhý vzorek jejunu (minimálně 0,5cm od konce vývodu) na histologické vyšetření a opět vytvořili novou terminální jejunostomii. Současně jsme propláchli lumen střeva fyziologickým roztokem jako prevenci proti jeho obstrukci. Zvířata byla utrácena v celkové anestezii předávkováním anestetik 7. pooperační den, kdy jsme provedli odběr střeva dárce i příjemce na histologické vyšetření.

3.3.6.5 Histologie

Vzorky střeva v celé tloušťce stěny jsme fixovali v 10% neutrálním formalinu a dále byly standardní metodou vyrobeny parafinové bločky. Pět mikrometrů tenké řezy byly obarveny hematoxylin eosinem a preparáty byly vyhodnoceny patologem podle stupně akutní rejekce (Tab.8).

3.3.6.6 Statistické zhodnocení

Ke statistickému zhodnocení jsme použili Kruskal- Wallisův test.

3.3.7 Výsledky

U všech operovaných zvířat byla pooperačně zjištěna dobrá průchodnost lymfatické anastomózy a ani po skončení pokusu (7.den) nebyla u žádného zvířete s rekonstrukcí lymfatických cév (na rozdíl od zvířat skupiny A,C,E) pozorována dilatace lymfatických cév štěpu, což je nepřímá známka dobré průchodnosti lymfatické anastomózy. Histologické nálezy přehledně ukazuje tabulka č. 11. Ve vzorcích příjemcovského střeva nebyla pozorována 7. pooperační den žádná patologie ani v jednom preparátu, stejně tak nebyly pozorovány významnější změny v biopsických vzorcích odebraných 3. pooperační den. Sedmý pooperační den byly zaznamenány ve skupině A 2 případy mírné, 2 případy středně těžké a 2 případy těžké rejekce; ve skupině B 2 případy mírné a 4 případy středně těžké rejekce; ve skupině C nebyly pozorovány žádné známky rejekce; ve skupině D byly zaznamenány 4 případy mírné a pouze 1 případ středně těžké rejekce; ve skupině E se vyskytly 3 případy mírné a 2 případy středně těžké rejekce. Mezi jednotlivými skupinami (vyjma kontrolní skupiny C- zvířat léčených plnou dávkou imunosuprese) není statisticky významný rozdíl.

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	1,1,1,1,2
E	0,15mg/kg/den	0	0,0,0,0,1	1,1,1,2,2

Tabulka 11 - Histologické nálezy-rekonstrukce lymfatik (0- žádná rejekce, 1- mírná rejekce, 2- střední rejekce, 3- těžká rejekce)

3.3.8 Diskuze

V průběhu orgánové transplantace dochází k přerušení cévního, nervového a lymfatického zásobení orgánu. K obnově tepenného a žilního zásobení u tenkého střeva musí dojít nejpozději do 6-12 hodin od přerušení krevního oběhu v těle dárce. Údaje o důsledcích přerušení nervových a lymfatických pletení nejsou dostatečně prozkoumány. Střevo si zachovává schopnost peristaltiky i po přerušení nervového zásobení, což je dáno přítomností autonomních nervových pletení ve stěně střevní. Transplantované střevo nepotřebuje k posunu chymu žádné nervové spojení s příjemcem. Některé sekreторické a absorpční funkce však bývají po denervaci střeva ovlivněny. Více než 100 let je známo, že přerušení sympatických nervových vláken vedoucích ke střevu způsobí těžké průjmy (83). Ztráta sympatiku vede ke zvýšení sekrece vody a chloridů z krypt. Sigalet zjistil, že po transplantaci střeva dochází ke snížení absorpční kapacity střeva a ke zvýšení střevní permeability, a to bez závislosti na patologických změnách střevní sliznice nebo na přítomnosti rejekce (84). Pozorované změny autoři vysvětlují jako důsledek denervace střeva. Další pozorování podporující tuto hypotézu však zatím nejsou k dispozici.

Pirenne ve své studii ukazuje, že ztráta lymfatik, kterou dosáhl mesenterální lymfadenektomií, sice chrání před reakcí štěpu proti hostiteli (GVHR), ale současně urychluje rozvoj akutní rejekce a snižuje přežití zvířat (85). V dosud provedených studiích zabývajících se dlouhodobými funkčními výsledky střevního štěpu po transplantaci byla prokázána malabsorpce tuků a zvýšená střevní propustnost pro manitol a polyethylen- glykol (84,86). Vzhledem k tomu, že se tyto změny vyskytují i po autologní transplantaci, není tento nálezh možné přičítat imunologickým faktorům, ale změny jsou způsobeny buď následkem denervace střeva nebo následkem nedostatečné regenerace lymfatických cév.

Mezenterální lymfatické uzliny (MLNs) jsou považovány za velmi významné místo imunitní odpovědi organismu. Hrají klíčovou úlohu v indukci tolerance na potravinové proteiny a brání průniku střevních bakterií do systémového lymfatického systému (87).

Worbs prokázal, že dendritické buňky s navázaným antigenem, které migrují ze střešní stěny do lymfatických uzlin, mohou vyvolat toleranci T-lymfocytů sídlících v MLNs (88). Antigen ze střeva se může dostat do systémového oběhu buď přímo přes střešní kapiláry do portálního řečiště nebo prostřednictvím dendritických buněk přes Payerské plaky do mezenteriálních lymfatických uzlin. Hlavní cestu vzniku tolerance T- buněk představuje presentace antigenu navázaného na dendritické buňky v mezenteriálních lymfatických uzlinách, ačkoliv je možný též vznik tolerance T- buněk přímo v játrech. B- buňky jsou aktivovány střevními dendritickými buňkami a recirkulují lymfou a krví a vrací se zpět do střešní stěny, kde produkují imunoglobuliny (89). Kanakogi ukázal, že MLNs ve střevním štěpu mají nezastupitelnou úlohu při vyvolání imunitní odpovědi organismu a to hlavně prostřednictvím cirkulujících leukocytů obsažených v MLNs štěpu (90).

Lymfatický systém je důležitou měrou zapojen do imunitní obrany organismu. Lymfocyty a antigen presentující dendritické buňky cestují z periferních tkání pomocí lymfatických cév do lymfatických orgánů, ve kterých se odehrává obrana organismu proti patogenům a cizorodým antigenům (91). Přerušением lymfatických cév dojde k významnému ovlivnění tohoto procesu.

Ve srovnání se standardní SBT, rekonstrukce lymfatických cév prodlužuje především dobu operace dárce, a to v průměru o 45- 60 minut. Je to způsobeno nutností důsledné preparace lymfatických cév a zabránění jejich poranění, které by znesnadnilo jejich následnou rekonstrukci. Operaci příjemce prodlouží vytvoření lymfo-lymfatické anastomózy pouze o 30-45 minut. Zde je třeba zabránit rotaci ductus thoracicus a napětí v anastomóze, které by obě vedly ke snížené průchodnosti lymfo-lymfatické spojky. Doba studené ischemie, která je velmi důležitá pro životnost štěpu, a ani manipulační čas (doba od vyjmutí štěpu z chladného konzervačního roztoku do znovuoobnovení krevního průtoku štěpem) nejsou při rekonstrukci lymfatických cév nijak prodlouženy.

Doposud existují pouze 2 práce zabývající se významem rekonstrukce lymfatických cév po experimentální transplantaci tenkého střeva (6, 92). V obou případech bylo prokázáno statisticky významné prodloužení přežití zvířat s provedenou lymfo- lymfatickou anastomózou léčených subterapeutickou dávkou cyklosporinu A. Ve skupině bez použité imunosuprese však rozdíly nebyly zaznamenány.

Szymula jako první ukazuje významné prodloužení přežití potkanů s provedenou rekonstrukcí lymfatických cév léčených cyklosporinem A po dobu prvních 5 pooperačních dní (6).

Kellersman ve své práci rozdělil potkany po transplantaci tenkého střeva na 4 skupiny dle dávky použité imunosuprese (CyA v dávce 0, 2, 5 a 10 mg/kg/den) podávané od 0. do 6 pooperačního dne (92). V každé skupině sledoval význam lymfatické anastomózy, který hodnotil délkou přežití zvířat. Ve skupinách léčených nejnižší i nejvyšší dávkou cyklosporinu a

ve skupinách bez použité imunosuprese se vliv provedené rekonstrukce lymfatických cév neprojevil v délce přežití zvířat. Ale ve skupině zvířat léčených subterapeutickou dávkou cyklosporinu prokázal statisticky významně delší přežívání potkanů s provedenou lymfatickou anastomózou. V histologickém nálezu stý pooperační den byl u přeživších zvířat nalezen významný rozdíl pouze v rozsahu slizničních erozí, avšak nikoliv ve ztrátě pohárkových buněk, krvácení do klků, lymfatické infiltraci, vaskulitidě či kryptitidě.

Na rozdíl od těchto dvou prací jsme použili jako imunosupresivum jiný kalcineurinový inhibitor- tacrolimus- který je v současné době základem prakticky všech imunosupresivních schémat po klinické transplantaci střeva. Dále jsme jako měřítko významu rekonstrukce lymfatických cév zvolili histologické známky akutní rejekce 7. pooperační den. V obou předchozích studiích byla sledována hlavně doba přežití zvířat a byl použit model chronické rejekce po SBT. V naší studii jsme použili model heterotopické transplantace střeva, zatímco v předchozích studiích byl použit model ortotopické SBT. Histologické vyšetření v práci Kellersmana bylo provedeno až na konci pokusu a v práci Szymuly o histologickém vyšetření není zmínka vůbec. Takže chybí srovnání výsledků histologie v prvním týdnu po transplantaci. Dalším možným vysvětlením neprokázání nižšího výskytu rejekce při rekonstrukci lymfatik může být fakt, že podaná subterapeutická dávka tacrolimu byla příliš nízká a přiblížila se prakticky skupině bez imunosupresivní léčby, kde pozitivní efekt nebyl v žádné práci prokázán. Murase zjistil, že dávka tacrolimu 0,32mg/kg/den není schopná vyvolat přijetí transplantovaného střeva, zatímco dávka 0,64mg/kg/den tento účinek již má (93).

Existuje několik možných vysvětlení pozitivního efektu rekonstrukce lymfatických cév popsaných v předchozích studiích. Patrně se jedná o kombinaci několika vlivů. Provedení rekonstrukce lymfatických cév v časném potransplantačním období chrání sliznici střevního štěpu cestou redukce lokální akumulace zánětlivých mediátorů uvnitř střevních klků. Tím dochází ke zmenšení intersticiálního edému, který se objevuje v průběhu rejekce (94). Akumulace zánětlivých mediátorů zvyšuje poškození sliznice, a tím způsobuje i porušení střevní bariery a usnadňuje průnik infekce. Dilatace lymfatik a edém klků jsou hlavními morfologickými nálezy při akutní i chronické rejekci střevního štěpu transplantovaného standardní chirurgickou technikou (tzn. bez použití lymfatické rekonstrukce) (95). Lymfatická drenáž redukuje zánětlivé poškození a spolupůsobí při regeneraci sliznice. Dalším pozitivním efektem je imunologický vliv lymfatické rekonstrukce. Střevní lymfatika tvoří transportní mechanismus pro migraci buněk ze střevního štěpu (96). Jedná se převážně o leukocyty a dendritické buňky, které mohou snadno vcestovat do lymfatických orgánů příjemce a tam ovlivnit imunitní odpověď po transplantaci ve smyslu rozvoje tolerance. Tento předpoklad však vyžaduje ověření v dalších experimentech.

3.3.9 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

Úspěšný výsledek jakékoliv orgánové transplantace je dán souhrnou mnoha faktorů, počínaje správně zvolenou indikací příjemce orgánu, přes dobrou kvalitu dárcovského orgánu, technické provedení odběru orgánu, bezchybnou perfuzi vhodně zvoleným konzervačním roztokem, co možná nejkratší dobu studené ischémie a manipulačního času, vyvarování se vzniku teplé ischémie, až po následnou časnou i pozdní pooperační péči o příjemce. Všechny tyto faktory jsou velmi důležité v konečném výsledku SBT.

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. 12. Po odběru a perfuzi roztokem Custodiolu celého tenkého střeva s cévním zásobením jsme odebrali celkem 5 kusů 10 cm dlouhých vzorků jejunu (skupina A) a 5 kusů 10 cm dlouhých vzorků ilea (skupina B). Všechny vzorky jsme skladovali v roztoku Custodiolu při teplotě 4°C po dobu 1, 6, 9, 12 a 24 hodin (čas studené ischémie). Ze vzorků jejunu i ilea jsme po dané době studené ischémie odebrali vzorek střevní stěny v celé tloušťce k histologickému vyšetření.

Projekt byl schválen etickou komisí s multicentrickou působností při IKEM a FTNSP pod č.j. 477/04.

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. 12- Charakteristika skupiny kadaverózních dárců k odběru tenkého střeva

3.4.2.2 Histologické vyšetření

Po příslušné době studené ischémie jsme vzorky fixovali v 10% formalínu, zalili do parafinových bločků a následně vytvořili 3-5 μ m silné řezy, které jsme obarvili hematoxylin-eosinem. U vzorků jsme hodnotili stupeň jejich morfologického poškození podle Parkovy klasifikace, jak ukazuje tabulka č.13 (97).

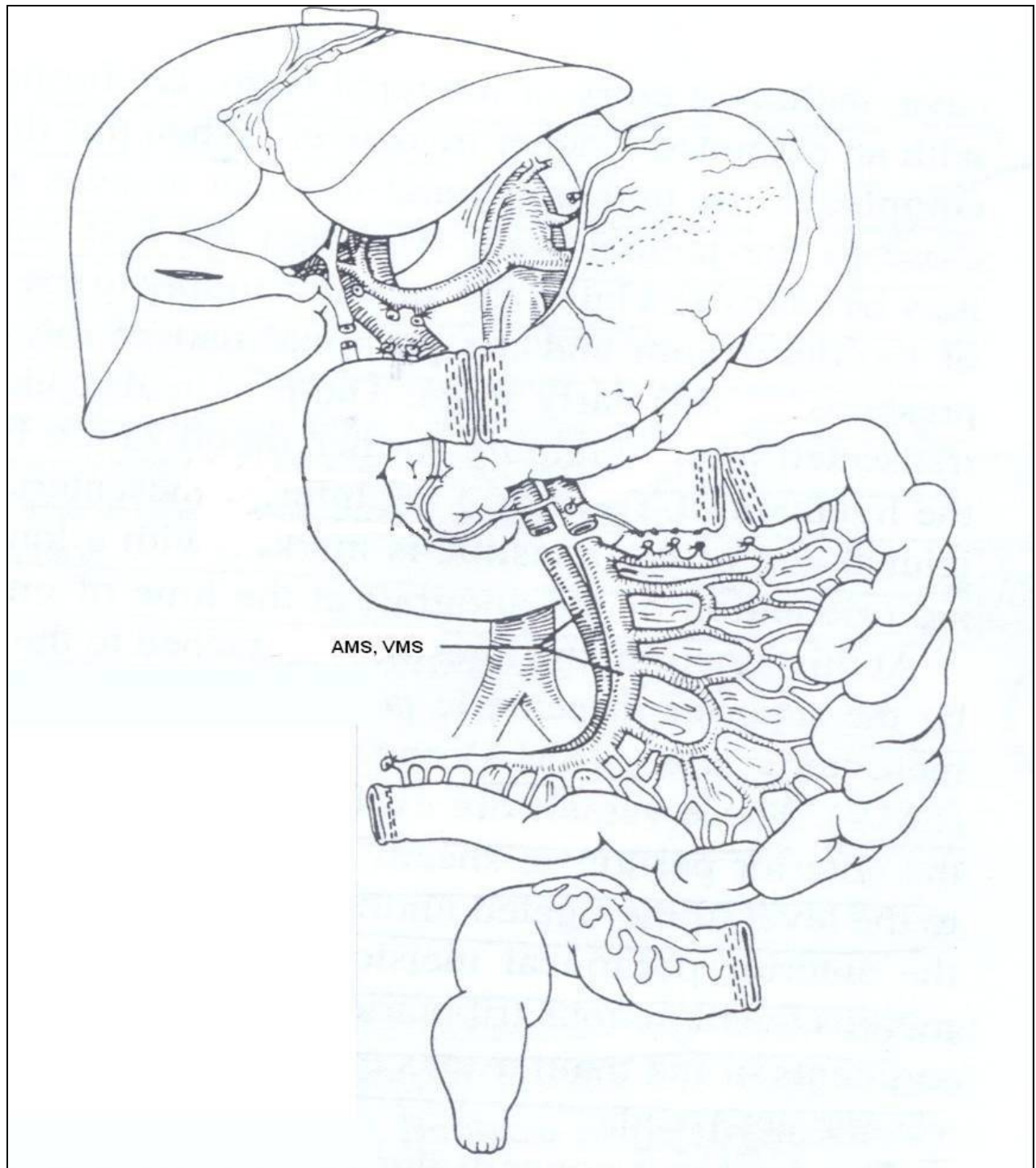
stupeň poškození	histologický nález
0	Normální nález
1	poškození klků pouze na jejich vrcholu
2	nález mezi 1 a 3
3	výrazné poškození architektiky klků dosahující až k jejich bazi

Tab. č.13 Ischemické poškození střevní sliznice

3.4.2.3 Chirurgická technika odběru tenkého střeva

Odběr střeva k transplantaci je většinou součástí multirgánového odběru, kdy se vedle střeva z dutiny břišní ještě odebírají játra, slinivka břišní a ledviny. Je to dáno tím, že se většinou jedná o mladého dárce. Kritéria pro dárce střeva jsou podstatně přísnější než například kritéria pro izolovaného dárce ledvin.

V naší pilotní studii jsme prováděli odběr pouze u pacientů, u kterých byl indikován izolovaný odběr ledvin a v žádném případě nesmělo dojít ke zhoršení kvality odebíraných ledvin.

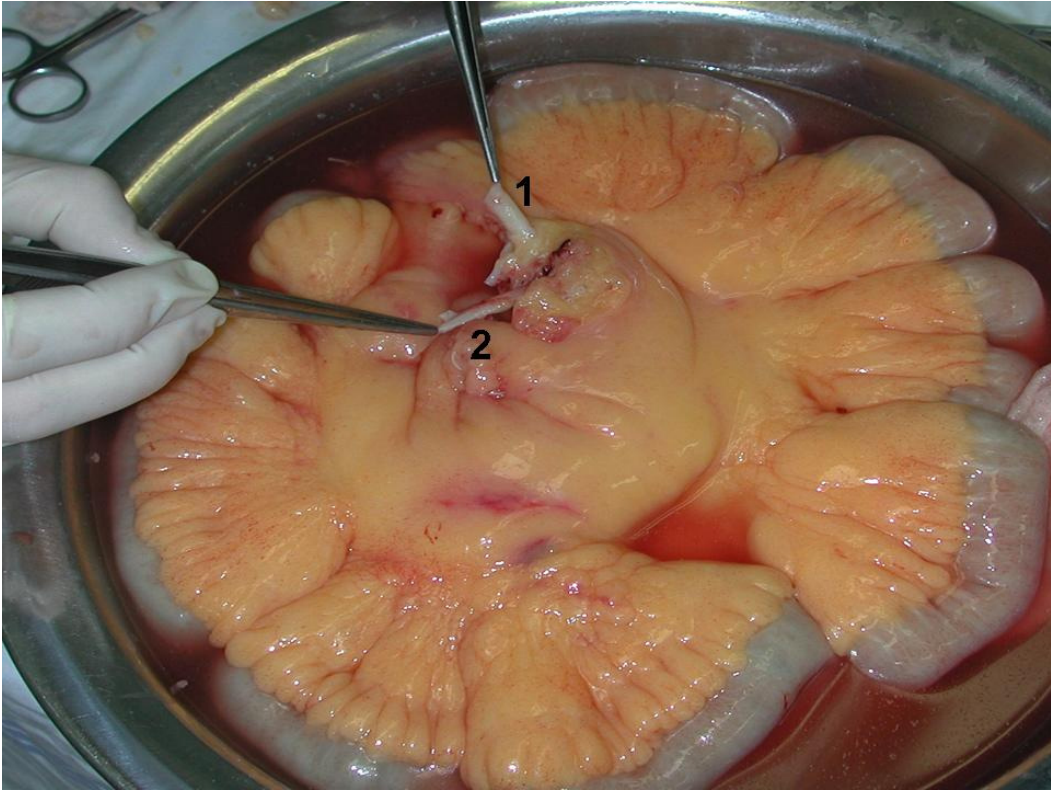


Obr. č. 23 Schéma střevního štěpu

Střední laparotomií od processus xyphoideus k symfyse si vytvoříme dostatečný přístup do dutiny břišní. Nejprve provedeme důkladnou revisi celé břišní dutiny k odhalení případné malignity dárce či jiných skutečností, které by kontraindikovaly odběr. Tenké střevo zabalíme do vlhké teplé roušky a během odběru se snažíme s ním co nejméně manipulovat, protože tenké střevo je orgán extrémně citlivý na veškeré inzulty, které by mohly mít pro transplantaci fatální důsledky pro příjemce. 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 mezenterickou 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 perfuse orgánů (např. při oběhové nestabilitě pacienta). V případě multiorgánového 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 odstupy 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 (obr. 23). Nyní jsme připraveni ke společné perfuzi ledvin a tenkého střeva. Po celkovém podání heparinu (250j/ kg) infrarenálně zakanylujeme aortu a dolní dutou žílu. Zastavíme 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 (obr. 24).

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



ERROR: stackunderflow
OFFENDING COMMAND: ~

STACK: