

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Experimentální chirurgie

Studijní obor: Experimentální chirurgie



**UNIVERZITA KARLOVA**  
1. lékařská fakulta

MUDr. Eva Koblihová

# **Transplantace hepatocytů u akutního selhání jater v experimentu**

Hepatocyte transplantation in acute liver failure in experiment

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Miroslav Ryska, CSc.

Praha, 2022

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

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

V Praze, 7.2.2022

EVA KOBLIHOVÁ

Podpis:

Identifikační záznam:

Koblihová, Eva. **Transplantace hepatocytů u akutního selhání jater v experimentu.**  
*Hepatocyte transplantation in acute liver failure in experiment.* Praha, 2021. 74 stran, 0  
příloh. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Chirurgická klinika 2.  
LF UK a ÚVN Praha. Vedoucí závěrečné práce: prof. MUDr. Miroslav Ryska, CSc.

## **Úvodní prohlášení**

Všechny pokusy provedené v rámci experimentální části byly schváleny Odbornou komisí na ochranu zvířat proti týrání v Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze. Pro studii byly vypracovány vlastní projekty pokusů, které byly schváleny Odbornou komisí na ochranu zvířat v IKEM a příslušnou resortní komisí MZ ČR, dle platné legislativy. Studie byla podpořena projektem Ministerstva obrany 1012.

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala prof. MUDr. Miroslavu Ryskovi, CSc. za vedení při mém postgraduálním studiu. Dále děkuji prof. MUDr. Ludku Červenkovi, CSc. MBA za dohled nad pokusy. Poděkování patří též MUDr. Ondřeji Ryskovi, Ph.D. a Ing. Ivetě Mrázové za spolupráci při chirurgické části experimentu. Mgr. Zuzaně Huskové, Ph.D. a Mgr. Ondřeji Lukšanovi, Ph.D. děkuji za technickou část pokusů. Prof. MUDr. Zdeňce Vernerové, CSc. děkuji in memoriam za histologické zpracování preparátů. Prof. MUDr. Miroslavu Ryskovi, CSc. a prof. MUDr. Ludku Červenkovi, CSc. MBA děkuji za zajištění finančních prostředků nutných k provedení experimentů a za komentáře k vypracované práci. Plk. doc. MUDr. Radkovi Pohnánovi, Ph.D. děkuji za cenné rady a podporu při vypracování práce. Poděkování patří i paní Zuzaně Šimůnkové a Ing. Zdeňce Vaňourkové, Ph.D. Děkuji také mojí rodině za podporu.

# Obsah

Seznam zkratk	8
Souhrn	9
Abstract	10
1. Úvod	11
1.1 Akutní jaterní selhání	11
1.1.1 Příčiny AJS a epidemiologie	12
1.1.2 Acetaminofen	12
1.1.3 Další příčiny AJS	14
1.2 Patofyziologie AJS	14
1.3 Diagnostika AJS	14
1.4 Léčba AJS	15
1.4.1 Otravy	15
1.4.2 Extrakorporální podpory	15
1.4.2.1 Plazmaferéza	16
1.4.2.2 Jaterní podpurné systémy v léčbě AJS	16
1.4.2.3 Transplantace hepatocytů	18
1.4.2.4 Transplantace jater při AJS	20
2. Cíle práce	24
3. Experimentální část	25
3.1 Akutní jaterní selhání vyvolané podáním TAA: nastavení vhodné dávky u potkanů kmene Wistar a Lewis	25
3.1.1 Metodika	26
3.1.2 Uspořádání experimentu	26
3.1.3 Statistické zhodnocení	28
3.1.4 Výsledky	28
3.1.5 Diskuze	39
3.2 Transplantace hepatocytů zmírňuje průběh akutního jaterního selhání způsobeného podáním TAA u potkanů kmene Lewis	44
3.2.1 Metodika	45
3.2.2 Uspořádání experimentu	48
3.2.3 Statistické zhodnocení	50
3.2.4 Výsledky	51
3.2.5 Diskuze	58

4. Závěr .....	62
5. Seznam vlastních publikací .....	63
6. Seznam literatury .....	65

## Seznam zkratek

AJS	akutní jaterní selhání
ALT	alanin aminotransferáza
APAP	N-acetyl-p-aminophenol
AST	aspartát aminotransferáza
BAL	bioarteficiální, tedy „umělá“ játra (bioartificial liver)
BLI	bioluminiscenční zobrazování (bioluminescent imaging)
CCl <sub>4</sub>	tetrachlormethan neboli chlorid uhličitý
CMV	cytomegalovirus
CYP-450	cytochrom P450
GSH	glutathion
FPSA	Fractionated Plasma Separation and Adsorption
HELLP	Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, Low Platelet Count (hemolýza, elevace jaterních enzymů, nízký počet trombocytů)
HGF	hepatocytový růstový faktor (hepatocyte growth factor)
INR	mezinárodní normalizovaný poměr (international normalized ratio)
i.p.	intraperitoneální podání
luc-Lew-Tg	transgenní potkani nesoucí luciferázový gen (luciferase Lewis transgenic rats)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
MODS	syndrom multiorgánové dysfunkce (multiple organ dysfunction syndrome)
NaCl	chlorid sodný
NH <sub>3</sub>	amoniak
NAC	N-acetylcystein
NAPQI	N-acetyl-p-benzochinonimin
OLT	ortotopická transplantace jater (orthotopic liver transplantation)
PAS	barvení „periodic-acid-Schiff“
p.o.	perorální (per os) podání
TAA	thioacetamid
TAAS	thioacetamid sulfoxid
TGF β1	transformující růstový faktor β1 (transforming growth factor β1)
TNF-α	tumor nekrotizující faktor α (tumor necrosis factor α)
Tx	transplantace



## Souhrn

Akutní jaterní selhání (AJS) je život ohrožující onemocnění s vysokou mortalitou. Jedinou kauzální léčbou je transplantace jater, která je limitovaná nedostatkem dárcovských orgánů. Proto se hledají jiné alternativní metody, které pomohou překlenout dobu čekání na transplantaci či regeneraci jater. Jako slibná metoda se jeví transplantace hepatocytů. Pro naši studii jsme jako vhodný model zvolili thioacetamidem (TAA) indukovaný model AJS u laboratorního potkana. Nejdříve jsme se zaměřili na rozvoj a průběh AJS po podání zvyšující se dávky TAA (od 175 do 700 mg/kg/den) potkanům kmene Wistar a Lewis. Sledovali jsme a vyhodnocovali přežívání, hladiny albuminu, aktivity enzymů alanin aminotransferázy a aspartát aminotransferázy, hladiny bilirubinu a amoniaku v plazmě po dobu 96 hodin. Zajímalo nás také, zda jsou rozdíly v průběhu AJS mezi vybranými kmeny potkanů. Došli jsme k závěru, že potkani kmene Wistar jsou náchylnější na rozvoj AJS vyvolaného podáním TAA v porovnání s kmenem Lewis. V další části práce jsme se zaměřili na léčbu AJS pomocí transplantace hepatocytů. TAA jsme aplikovali i.p. ve dvou injekcích, v souhrnné dávce 525 mg/kg. Tato dávka vede k rozvoji AJS u všech potkanů kmene Lewis, bez léčby umírají během prvních 48 hodin. Z jater samců transgenního kmene luc-Lew-Tg jsme izolovali hepatocyty, které jsme v množství  $2 \times 10^6$  buněk rozpuštěných v 600  $\mu$ l fyziologického roztoku implantovali portální žilou do jater příjemce. Transplantované hepatocyty jsme pozorovali *in vivo*, pomocí neinvazivního bioluminiscenčního zobrazování. Transplantace hepatocytů významně zmírnila průběh AJS způsobeného podáním TAA. To se projevilo lepším přežíváním zvířat a zmenšením rozsahu jaterního poškození.

**Klíčová slova:** akutní jaterní selhání-transplantace hepatocytů-thioacetamid

## **Abstract**

Acute liver failure (ALF) is life-threatening disease with high mortality rate. Orthotopic liver transplantation is the only effective therapy but it is limited with scarcity of donor organs. Other methods are searching for as bridging therapy. Transplantation of hepatocytes seems to be a promising method. We have chosen the chemical model of acute liver failure caused by intraperitoneal (i.p.) application of thioacetamide (TAA) in rats. We wanted to investigate the course of ALF when induced by increasing doses of TAA, ranging from 175 to 700 mg/kg of body weight i.p. per day. Plasma levels of albumin, bilirubin, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase activities and ammonia levels and survival rate were determined. We also examined whether Wistar and Lewis rats exhibit any differences in the course of ALF in response to increasing TAA doses. Our data show that Wistar rats are more susceptible to developing TAA-induced ALF than Lewis rats. In the other part we focused on hepatocyte transplantation in ALF. TAA was administrated i.p. in two injections, in the total amount of 525 mg/kg of body weight. After this dose all Lewis rats developed ALF and without treatment succumbed within first 48 h. Hepatocyte were isolated from transgenic male rat luc-Lwe-Tg in two step collagenase perfusion. Isolated hepatocytes in the amount of  $2 \times 10^6$  cells dissolved in 600  $\mu$ l of physiological saline solution were implanted into the liver via the portal vein. For imaging of transplanted hepatocytes we used non-invasive bioluminescent imaging system. The results show that hepatocyte transplantation can attenuate the course of TAA-induced ALF in Lewis rats. It was reflected by improved survival rate and reduced degree of liver injury.

**Key words: acute liver failure-hepatocyte transplantation-thioacetamide**

# 1. Úvod

## 1.1 Akutní jaterní selhání

Akutní jaterní selhání (AJS) je velmi závažný stav, který se projevuje náhlým rozvojem známek jaterní dysfunkce u jedince bez předchozí anamnézy jaterní choroby. Dochází k výrazné poruše jaterních funkcí v relativně krátkém období. Porucha funkce je důsledkem zániku hepatocytů, ke kterému může dojít z nejrůznějších příčin. AJS je charakterizováno rychlým vznikem koagulopatie ( $\text{INR} \geq 1,5$ ) a encefalopatie spolu s výrazným poškozením jaterních funkcí, především syntetických. Prevalence tohoto onemocnění v různých zemích kolísá, obvykle se uvádí v Evropě a v USA mezi 10-20/100 000 obyvatel. Přesná data u nás ani ve světě k dispozici nejsou, v USA je uváděna incidence 2000 případů za rok. AJS je vzhledem k velké regenerační schopnosti jater potenciálně reverzibilní, nicméně je i nadále spojeno s vysokou mortalitou, která je uváděna mezi 50-90 %, pokud není provedena ortotopická transplantace jater (OLT). V roce 1946 Lucke a Mallory popsali 3 fáze AJS: 1. fáze – prodromální/preikterická, 2. fáze – ikterická a 3. fáze – encefalopatie. Tito a další autoři upozorňují na vztah mezi začátkem ikteru (žloutenky) a rozvojem encefalopatie ve spojitosti s etiologií a prognózou onemocnění. Fulminantní jaterní selhání je charakterizováno intervalem 8 týdnů mezi rozvojem ikteru a nástupem encefalopatie. Skupina z King's College v Anglii definuje v případě AJS interval 8 až 24 týdnů do nástupu encefalopatie. Subakutní jaterní selhání má vyšší pravděpodobnost rozvoje příznaků chronického jaterního onemocnění, kterými jsou ascites a selhání ledvin. Subakutní selhání má nižší incidenci mozkového edému, ale paradoxně vyšší mortalitu než fulminantní forma (Boyer, 2012).

Pro lepší předpověď klinického průběhu, komplikací a prognózy nemocných s AJS vytvořil O'Grady a spol. kategorie AJS: hyperakutní (interval kratší než 7 dní mezi nástupem žloutenky a encefalopatie), akutní (interval 8 až 28 dní) a subakutní jaterní selhání (interval delší než 28 dní). Toto rozdělení vzniklo na základě analýzy 538 případů pacientů v Nemocnici King's College v Londýně. Definice AJS požaduje, aby měl pacient v předchorobí zdravá játra. Ale někteří nemocní s AJS mohou mít doposud nerozpoznané chronické onemocnění jater, např. Wilsonovu nemoc nebo autoimunitní hepatitidu.

Dalším závažným stavem je AJS na chronickém základě. Je charakterizován náhlým zhoršením jaterních funkcí u nemocného s dosud stabilizovaným jaterním onemocněním a vzniká v důsledku působení nového hepatotoxického inzultu. K úmrtí

v důsledku AJS dochází v souvislosti s rozvojem nitrolební hypertenze a s dalším zhoršením průběhu v důsledku sepse a rozvoje multiorgánového selhání (MODS).

### 1.1.1 Příčiny AJS a epidemiologie

Pro stanovení léčby a prognózy AJS je nutná znalost příčiny onemocnění. Existuje mnoho různých příčin AJS, mezi které patří virové infekce, toxiny, léky, kardiovaskulární a metabolická onemocnění (Tab. 1). Podíl jednotlivých příčin se liší geograficky. Celosvětově nejčastější příčinou AJS zůstává hepatitida typu B. V rozvojových zemích převládá hepatitida, v zemích Spojeného Království je AJS nejčastěji způsobeno toxickým působením acetaminofenu (paracetamolu). V místech s výskytem tuberkulózy způsobuje izoniazid léky vyvolané AJS. Ve 14 % případů u dospělých se nepodaří odhalit příčinu AJS, u dětí až v 60 % případů.

**Tab. 1:** Příčiny AJS

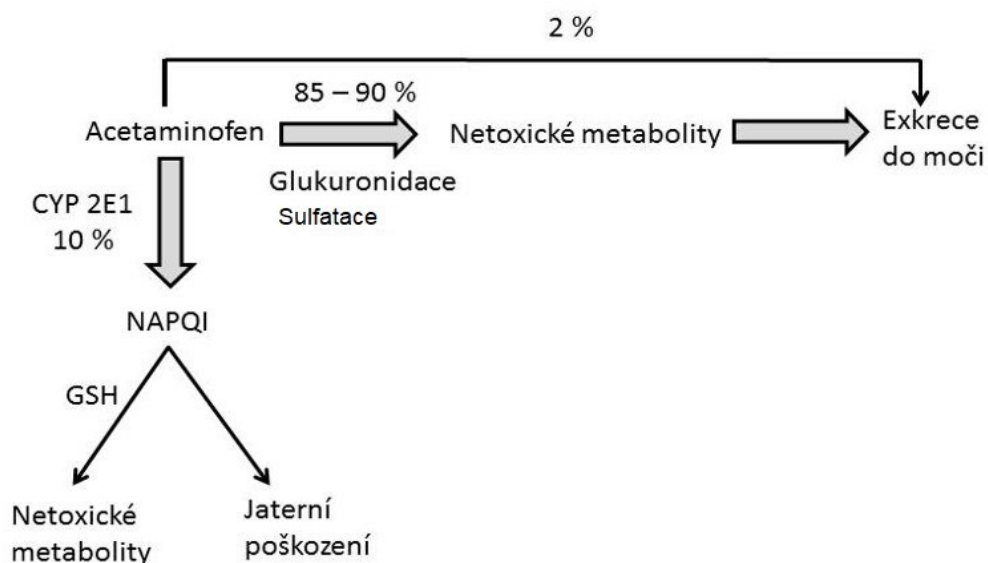
viry	virové hepatitidy typu A, B, C, D, E, virus EB, CMV, herpes simplex virus, influenza typu B
léky	acetaminofen, halotan, izoniazid, valproát, rifampicin, phenytoin, amiodaron, acylpyrin
toxiny	amanita phalloides, afalotoxin, bakteriální toxiny, oragnická rozpouštědla
kardiovaskulární příčiny	pravostranné srdeční selhání, srdeční tamponáda, šok, venookluzivní nemoc, Budd-Chiariho syndrom
metabolické příčiny	Wilsonova choroba, deficit alfa -1- antitrypsinu, dědičná tyrosinémie
AJS v souvislosti s těhotenstvím	akutní steatóza jater, HELLP syndrom
jiné důvody	autoimunitní hepatitida, hypertermie, lymfom, maligní infiltrace jater
kryptogenní	

### 1.1.2 Acetaminofen

Paracetamol nebo také APAP (N-acetyl-p-aminophenol) jsou jiné názvy pro acetaminofen. Ve vyspělých zemích je to volně dostupný a běžně používaný lék na snížení horečky a zmírnění bolesti. V doporučených dávkách se jedná o bezpečný lék, ale vyšší dávky mohou být hepatotoxické a vyvolat AJS (Lancaster et al., 2014). Doporučená dávka pro dospělého člověka je 325–650 mg p.o. každých 4–6 hodin,

maximálně 4 g paracetamolu denně. U pacientů se zvýšeným rizikem hepatotoxicity je denní dávka poloviční, tj. 2 g denně. U dětí je to pak 10–15 mg/kg tělesné hmotnosti každých 4–6 hodin, s maximální dávkou 50–75 mg/kg.

Hepatotoxické účinky acetaminofenu jsou nejčastější příčinou vzniku AJS v Evropě a v USA. Tvoří přibližně 42 % případů AJS. Důvodem je předávkování jak samotným acetaminofenem, tak kombinací acetaminofenu s opioidy. V České republice se jedná o stovky pacientů ročně, se vzestupnou tendencí. Hepatotoxicitu způsobují metabolity acetaminofenu. Při požití doporučené dávky se acetaminofen metabolizuje glukuronidací nebo sulfatací a je vyloučen do moči (obr. 1). Přibližně 2 % se dostanou do moči v nezměněné formě a méně než 10 % je metabolizováno pomocí cytochromu P450 (CYP-450) na reaktivní metabolit N-acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI). Za normálních okolností tento toxický metabolit reaguje se sulfhydrylovými (thiolovými, -SH) skupinami v glutathionu (GSH) a před vyloučením močí je převeden na netoxické metabolity. Dojde-li k předávkování, způsobí přetrvávající NAPQI jaterní poškození. Po vyčerpání veškerého GSH začne NAPQI reagovat s thiolovými skupinami buněčných proteinů, což vede k poškození funkce mitochondrií a k buněčné smrti a také k modulaci vrozeného imunitního systému jater. K mitochondriální dysfunkci při předávkování acetaminofenem dochází následkem poškození mitochondriální membrány. Proteinové adukty ve spojení s NAPQI způsobují oxidativní stres. Uvnitř mitochondrií se formují reaktivní kyslíkové skupiny, které poškozují mitochondriální DNA, otevírají polopropustné póry, zastavují produkci ATP a vyvolávají nekrózu.



**Obr. 1:** Metabolismus APAP v játrech (převzato z: Lancaster et al., 2014)

AJS způsobené podáním APAP má nespecifické symptomy: abdominální bolest, únava, anorexie, teplota. Často probíhá hyperakutně s nástupem encefalopatie do 7 dní od počátku ikteru. Včasná diagnostika a léčba snižuje riziko rozvoje AJS.

### **1.1.3 Další příčiny AJS**

Virové hepatitidy jsou celosvětově nejčastější příčinou AJS. Riziko AJS po akutní hepatitidě A je mezi 0,01 až 0,1 %. Průběh AJS při hepatitidě A je většinou hyperakutní a spontánní uzdravení je relativně vysoké (40-60 %). Riziko rozvoje AJS při hepatitidě typu B je 1 %. Staří pacienti a ženy jsou rizikovou skupinou. Spontánní uzdravení AJS vzniklého po hepatitidě typu B je velmi nízké, pohybuje se mezi 15 až 36 % (Boyer et al., 2012).

Přibližně 11 % případů AJS je následkem požití různých léků. Vyskytuje se častěji u žen (69 %) než u mužů (21 %), a to ve věku kolem 43 let. K lékům, které nejčastěji vyvolávají AJS, patří antituberkulózní léky, sulfonamidy, phenytoin, disulfiram, troglitazon, propylthiouracil, bromfenyc a některé bylinné a výživové doplňky. Okolo 29 % pacientů se spontánně uzdraví, 40 % podstoupí transplantaci a 31 % zemře bez transplantace (Lancaster et al., 2014).

## **1.2 Patofyziologie AJS**

Encefalopatie a nitrolební hypertenze souvisí s alterací hematoencefalické bariéry, akumulací neurotoxických substancí v mozku, s poruchou syntézy a metabolismu neurotransmiterů a s poruchou energetického obratu v mozku. U AJS je poškozena regulace průtoku krve mozkiem. Edém mozku se rozvíjí u 80 % pacientů s encefalopatií IV. stupně a je kombinací edému vazogenního a cytotoxického. Pro AJS je typická porucha metabolismu glykogenu, snížená úroveň glukoneogeneze a zvýšené odbourávání svalové a tukové tkáně.

## **1.3 Diagnostika AJS**

Diagnóza AJS se opírá o typickou anamnézu dle etiologie AJS. V klinickém vyšetření se zaměřujeme na ikterus a známky encefalopatie. Ostatní příznaky, jako je únava, zvracení, bolesti břicha a průjemy, jsou nespecifické. U pacientů s AJS se projevuje

hypotenze a vazodilatace s nízkou systémovou vaskulární rezistencí, ale v časných stádiích může být krevní tlak normální. Charakteristická je hyperventilace, rozvoj oligurie, objevují se známky koagulopatie s možným krvácením do gastrointestinálního traktu.

## **1.4 Léčba AJS**

Léčba AJS vyžaduje multidisciplinární přístup a časný transport nemocného na specializovanou jednotku intenzivní péče. Léčba je podpůrná, v některých případech specifická, dle etiologie AJS.

### **1.4.1 Otravy**

Při otravě paracetamolem se podává aktivní uhlí k redukci vstřebávání paracetamolu a dále antidotum N-acetylcystein (NAC). Jeho hlavním účinkem je zvýšení produkce glutathionu v játrech a také slouží jako zdroj cysteinu (-SH skupin). Kromě toho je známo, že NAC zlepšuje hemodynamickou stabilitu, jaterní clearance a mozkový edém tím, že vychytává volné radikály. NAC se obvykle podává intravenózně. Doporučená zahajovací dávka je 150 mg/kg během 10-30 minut, dále 50 mg/kg během 4 hodin a následně 100 mg/kg v průběhu 16 hodin (celkově 300 mg/kg během 20 hodin). U pacientů přijímaných 10-24 hodin po intoxikaci je užíván 48hodinový režim s úvodní dávkou 140 mg/kg, se sérií udržovacích dávek 70 mg/kg po 4 hodinách. V léčbě NAC se pokračuje, dokud neklesne INR pod 2 (Makin et al., 1997).

Při otravě muchomůrkou zelenou (*Amanita phalloides*) je nutné zabránit dalšímu vstřebávání amanitinu, podpořit jeho vylučování močí a blokovat enterohepatální cirkulaci prováděním výplachů žaludku, aplikací aktivního uhlí v dávce 1 g/kg, dále opakovanými klyzmaty a hydratací. Do 3 dnů po požití je indikovaná plazmaferéza. Antidotem volby je silibinin, který zabraňuje vychytávání amanitinu játry a jeho průniku do hepatocytů (Mas, 2005).

### **1.4.2 Extrakorporální podpory**

Jaterní poškození způsobující AJS cestou endogenních vlivů je většinou časově omezené. Pokud je špatná funkce jater zvládnuta po dobu působení toxinu či infekce, je další prognóza poměrně dobrá. Proto je již desítky let snaha o extrakorporální podporu jaterních funkcí po dobu akutního poškození. Dosavadní metodiky k odstranění exo-

i endotoxinů (hemodialýza, hemoperfuze, výměna plazmy) nebyly specifické, a proto ani příliš účinné.

Transplantace jater přinesla v léčbě AJS velký pokrok, ale vzhledem k rychlému průběhu onemocnění řada pacientů umírá před nalezením vhodného dárce. Stále je tedy snaha alespoň o dočasné nahrazení jaterních funkcí jiným extrakorporálním přístupem. V řadě studií jsou nyní používány systémy bioarteficiálních jater, albuminové dialýzy a systémy kombinující různé techniky. Jejich využití je však doposud problematické a mimo klinické studie nejsou v léčbě AJS paušálně doporučeny.

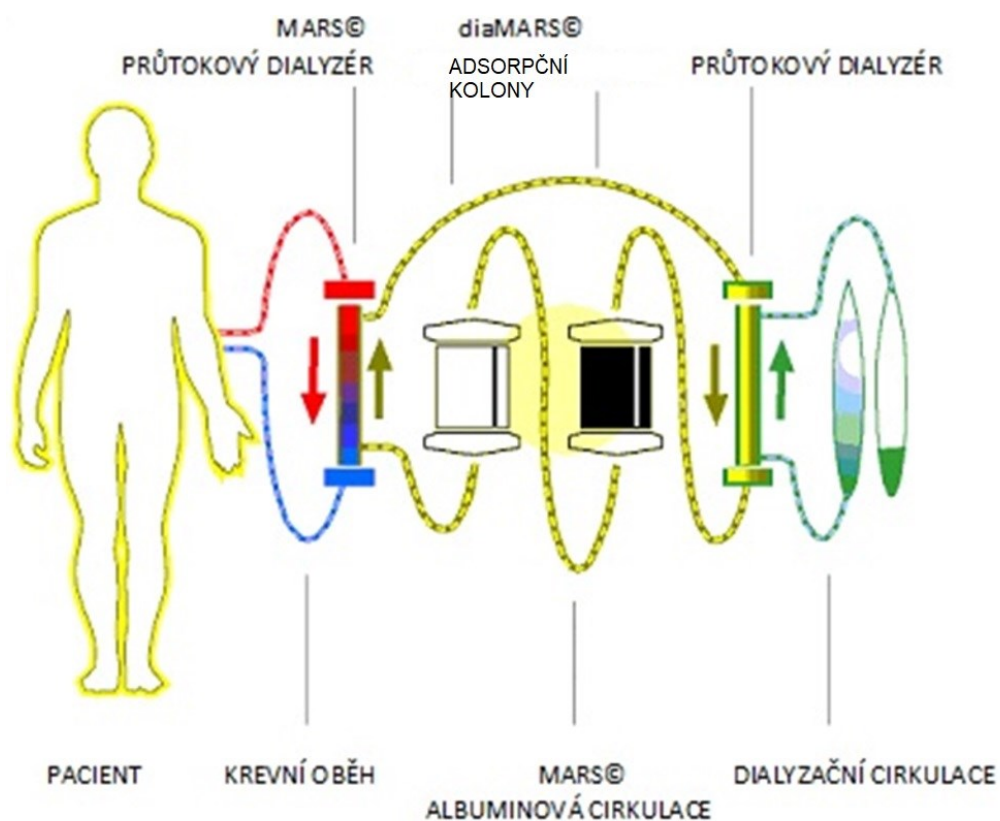
#### **1.4.2.1 Plazmaferéza**

Jedná se o mimotělní terapii, při které jsou z krevní plazmy eliminovány toxické látky. V malé a poměrně heterogenní skupině pacientů léčených touto metodou došlo k poklesu plazmatického amoniaku ( $\text{NH}_3$ ) a zlepšení jaterní encefalopatie. Současně s tím se snížil cerebrální krevní průtok, cerebrální perfuzní tlak, zlepšil se střední arteriální tlak a poklesl srdeční index (Lancaster et al., 2014). Je ale obtížné stanovit přesný vliv plazmaferézy na přežívání pacientů s AJS. Na velké evropské skupině pacientů se ukazuje, že plazmaferéza je přínosnou metodou při léčbě AJS (Lancaster et al., 2014).

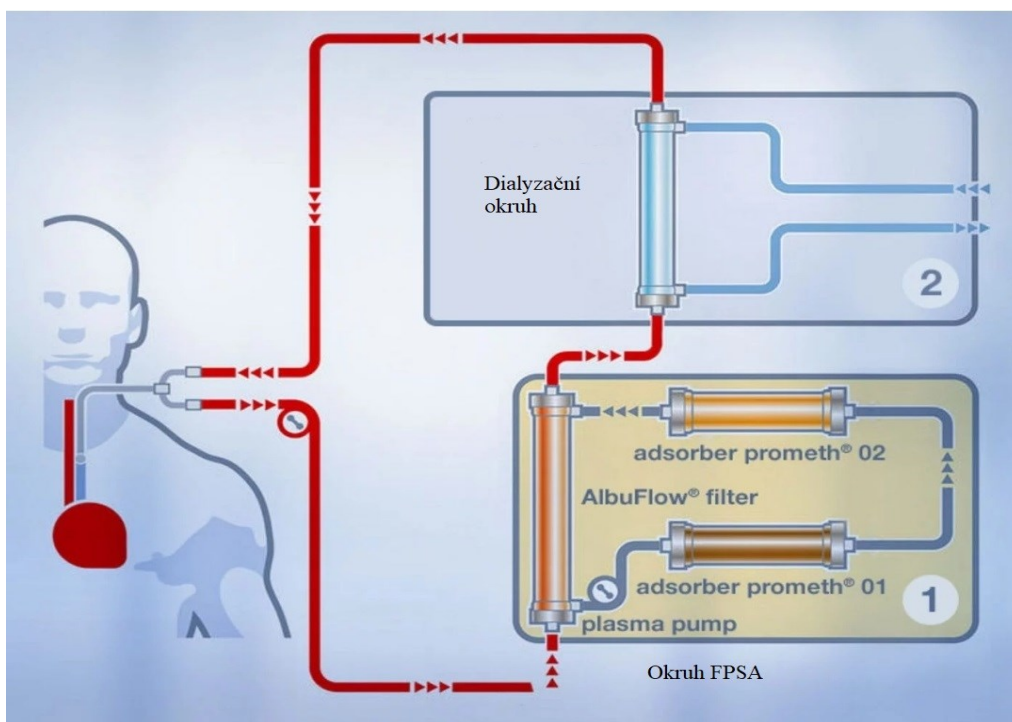
#### **1.4.2.2 Jaterní podpůrné systémy v léčbě AJS**

Tyto systémy se dělí na dvě kategorie: nebiologické a biologické detoxikační systémy. Nebiologické detoxikační systémy zahrnují především plazmaferézu, hemoadsorpci založenou na čištění krve přes aktivní uhlí a dialýzu pomocí albuminu. V Evropě jsou nejčastěji používanými systémem MARS a přístroj Prometheus. MARS (Molecular Adsorbent Recirculation System, Gambro, Švédsko; obr. 2) pracuje na principu albuminové dialýzy s vychytáváním látek vázaných na albumin ve filtrech v kombinaci s dialyzačním přístrojem, kde jsou odstraňovány látky rozpuštěné ve vodě. Přístroj Prometheus (Fresenius Medical Care, Německo; obr. 3) je založen na principu frakcionované plazmatické separace a adsorpce s dialýzou (FPSA). Skládá se z dialyzačního přístroje rozšířeného o modul pro frakcionovanou plazmatickou separaci s albuminovým filtrem a dvěma adsorbery. Pracuje bez nutnosti použití náplně přístroje albuminem a lze na něm samostatně provádět také dialýzu. U přístroje Prometheus byla shledána vyšší redukce plazmatických hladin bilirubinu,  $\text{NH}_3$  a urey (Ročeň, 2010). Ačkoliv jsou tyto metody bezpečné, pacienta s AJS nevyлéčí, pouze pomáhají překlenout dobu do transplantace jater (Standlbauer et al., 2006).





**Obr. 2:** Schéma systému MARS (Gambro, Švédsko)



**Obr. 3:** Schéma systému Prometheus (převzato z informačního letáku Fresenius Medical Care, upraveno)

Druhou kategorií jaterních podpůrných metod představují biologické detoxikační systémy. Tyto systémy obsahující živé jaterní buňky jsou označovány jako „bioarteficiální játra“ (BAL). Mají nejen funkci detoxikační, ale využívají i dalších funkcí hepatocytů. Obsahují náplně s živými buňkami (bioreaktory). Může se jednat o lidské hepatocyty, dále linie hepatoblastomu C3A nebo to mohou být hepatocyty zvířecí (prasečí). Získání lidských hepatocytů je stále obtížné a nelze získat dostatečné množství buněk z tkáňových kultur, proto jsou používány orgány nevhodné k transplantacím, části jater nebo linie hepatoblastomu C3A, u kterého ale mají buňky sníženou funkci. Prasečí hepatocyty mohou být čerstvé nebo kryokonzervované. Nicméně u zvířecích buněk nelze vyloučit přenos zvířecích infekcí na člověka.

Celosvětově existují centra používající modifikované bioreaktory. Nejčastěji jsou uváděny: Hepat Assist (Circe Biomedical, Lexington, MA) - systém s plazmaseparací, perfuzí přes aktivní uhlí, s modulem s kryokonzervovanými prasečími buňkami, MELS (Modular Extracorporeal Liver Support, Hybrid Organ GmbH, Berlín, Německo) s bioreaktorem, dialýzou a modulem albuminové dialýzy, dále ELAD (Extracorporeal Liver Assist Device, VitaGen, La Jolla, CA) používající linii C3A lidského hepatoblastomu, bioreaktor AMC (Amsterdam Medical Center, Nizozemsko) využívající plazmatickou separaci a průchod plazmy bioreaktorem s prasečími hepatocyty. Bioarteficiální systémy byly doposud použity v rámci klinických studií a tyto metody nejsou standardem v léčbě jaterního selhání. V České republice byl bioreaktor použit pouze v experimentu na zvířecím modelu (Ryska M. a spol., 2006, Ryska M. a spol., 2008, Ryska O. a spol., 2008).

### **1.4.2.3 Transplantace hepatocytů**

První záznamy o přenosu jaterních buněk pochází z 60. let 20. století. Zásadním krokem v transplantaci hepatocytů bylo zavedení metody izolace jaterních buněk pomocí perfuze jaterní tkáně roztokem kolagenázy, kterou popsali Berry a Friend v roce 1969 (Berry and Friend, 1969). Tato metoda modifikovaná Seglenem v roce 1976 je používaná dodnes (Seglen, 1976). První úspěšnou transplantaci hepatocytů u člověka provedli Mito a Kusano v roce 1993 (Mito and Kusano, 1993).

Novější klinické studie ukazují, že transplantace hepatocytů se může uplatnit v léčbě AJS, některých vrozených poruch metabolismu i u jaterní cirhózy. U AJS může metabolická podpora ve formě hepatocytů pomoci překlenout období do transplantace

nebo do regenerace vlastních jater. Při ztrátě velké frakce vlastních jaterních buněk mohou transplantované hepatocyty játra znovu osídlit.

Jaterní buňky se izolují perfuzí jaterní tkáně roztokem kolagenázy. Většinou se izolované buňky použijí ihned k transplantaci, ale mohou se i zamrazit a uchovávat. Kryoprezervaci se však snižuje viabilita izolovaných buněk. K transplantaci lze použít hepatocyty autologního, alogenního i xenogenního původu. V posledních letech jsou využívány genově manipulované buňky. Nejčastějším místem přenosu hepatocytů jsou játra a slezina. Byla popsána i jiná cílová místa a orgány, jako peritoneální dutina, interskapulární tuková tkáň, pouzdro ledviny, plicní parenchym či pankreas (Nagata, 2003).

Transplantace hepatocytů do jater se provádí cestou *vena portae* (portální žilou). Játra představují pro přenesené jaterní buňky přirozené prostředí, avšak většina hepatocytů z jater migruje do plic, kde jsou ničeny procesem fagocytózy. Při podání buněk do organismu dochází k hemodynamickým změnám – zvýšení portálního a pulmonálního tlaku s rizikem plicní embolie či trombózy ve větvích *vena portae* (Muraca et al., 2002). Po podání cestou *vena portae* putují hepatocyty do trámců jaterních buněk, aniž by narušovaly strukturu jaterního parenchymu. Dalším vhodným orgánem pro přenos jaterních buněk je slezina. Hepatocyty se podají do *arteria lienalis* nebo přímo do parenchymu sleziny. Část jaterních buněk vycestuje ze sleziny do *vena portae*. Hepatocyty ve slezině nejen přežívají, ale i proliferují a vytvářejí struktury podobné jaterní tkáni. Při podání jaterních buněk do peritoneální dutiny dochází časně k jejich nekróze. Přežívání hepatocytů lze zvýšit jejich ochranou pomocí biokompatibilní membrány ve formě mikrokapsulí, dutých vláken nebo 3D matrice (Smržová a spol., 2000, Ogava et al., 2004).

Podle předpokladů vycházejících např. z proveditelného rozsahu hepatektomie je pro přežití jedince nezbytné nejméně 10-20 % plnohodnotné jaterní tkáně. Toto množství by odpovídalo 150 g (10 %) až 300 g (20 %) jaterního parenchymu, tedy  $3 \times 10^{10}$ , resp.  $6 \times 10^{10}$  hepatocytů (Mito, 1993). Při transplantaci hepatocytů je jich však často podáno mnohem menší množství a s dobrým klinickým úspěchem. Je to dáno jednak tím, že v organismu zůstala zachována funkční masa hepatocytů, a také vzájemným ovlivňováním dárcovských buněk a celého vnitřního prostředí organismu příjemce prostřednictvím různých, zatím ne zcela identifikovaných působků a růstových faktorů (např. hepatocyte growth factor – HGF, transforming growth factor  $\beta 1$  – TGF  $\beta 1$ ). Navíc hepatocyty po transplantaci proliferují (Smržová a spol., 2001).

Největším problémem zůstává nedostatek dárců a nutnost dlouhodobé imunosuprese. Transplantované hepatocyty vyvolávají v hostitelském organismu imunitní reakci. Té se snažíme zabránit nejčastěji imunosupresní léčbou. K dalším alternativním metodám patří například ozáření transplantovaných buněk UVB světlem, imunoadherence s vyvázáním protilátek, blokáda ko-stimulace T-lymfocytů při interakci s antigen prezentujícími buňkami pomocí solubilního proteinu, snížení exprese genů pro MHC glykoproteiny I. třídy, ochrana hepatocytů v mikrokapsulích (Smržová a spol., 2000). Detekci transplantovaných hepatocytů lze provádět na základě sledování biochemických parametrů (jaterní testy, parametry koagulace), hodnot intrakraniálního tlaku, značení jaterních buněk radioaktivními izotopy (indium, technecium) a jejich následným zobrazením scintigrafií (Gupta et al., 1994, Schneider et al., 2003), dále také bioluminiscencí a biopsií tkání.

#### **1.4.2.4 Transplantace jater při AJS**

Transplantace jater zůstává jedinou relativně spolehlivou a prokazatelně účinnou léčbou AJS. Její aplikace je zatížena vyšším rizikem než léčba chronických stavů. Hlavním problémem je nedostatek vhodných dárců orgánů a časová tíseň. Akutní jaterní selhání představuje v Evropě přibližně 10 % všech indikací k transplantaci. Roční přežívání překračuje 80 %. Správné načasování prognózy vývoje AJS je klíčem ke snížení mortality.

Transplantace jater rovněž spotřebovává rozsáhlé zdroje, se kterými je potřeba racionálně nakládat. Kandidát transplantace jater musí mít dostatečnou vitalitu, aby překonal chirurgický zákrok i pooperační období, a nesmí mít progresivní onemocnění, které by výrazně limitovalo jeho přežití. Věk pacienta sám o sobě není rozhodující, nemocní nad 60 let a především nad 65 let však přežívají hůře. Nejvyšší perioperační riziko představuje těžký stav pacienta daný příslušnou pokročilostí jaterního selhání. K posouzení rizika se vyjadřuje tým zahrnující hepatologa, transplantačního chirurga, anesteziologa a transplantační koordinátorku. Ke stanovení letální prognózy spontánního průběhu AJS slouží tzv. „King's College kritéria“ (Boyer et al., 2012), tab. 2.

**Tab. 2:** „King’s College kritéria“ (převzato z: Boyer et al., 2012)

<b>příčina selhání</b>	<b>kritérium</b>
<b>intoxikace paracetamolem</b>	pH < 7,3 nebo protrombinový čas > 100 s a kreatinin > 300 µmol/l s encefalopatií III. a IV. st.
<b>ostatní příčiny</b>	protrombinový čas > 100 s nebo 3 z následujících kritérií: a) věk < 10 nebo > 40 let b) jaterní selhání při non-A, non-B hepatitidě, halotanové hepatitidě, idiosynkrastické lékové reakci c) ikterus předcházející o týden jaterní encefalopatii d) protrombinový čas > 50 s e) bilirubin > 300 µmol/l

Transplantace jater můžeme rozdělit do dvou skupin: transplantace jater od kadaverózního dárce a transplantace jater od živého dárce. Pravděpodobnost získání vhodného časného či urgentního kadaverózního dárce jater závisí na velikosti regionu, v oblasti se 120 milióny obyvatel (například v regionu zemí Eurotransplantu) je 12x větší než v České republice s 10 milióny obyvatel. Obvyklá typizace jaterního štěpu (AB0 kompatibilita a velikost jaterního štěpu) nemusí být striktně dodržena: nestejnospupinová kompatibilita v AB0 systému při výběru kadaverózního dárce výrazně zvyšuje šance nemocného s AJS na provedení urgentní transplantace jater. Také velikost jaterního štěpu nemusí být nepřekonatelnou překážkou. Objem příliš velkého jaterního štěpu z kadaverózního dárce lze pro konkrétního nemocného s AJS zmenšit redukcí, při které se z příliš velkého jaterního štěpu dárce použije vhodný segment, většinou levý jaterní lalok. Tato technika je podobná obvyklé jaterní resekcii a je organizačně nejjednodušší. Pro současnou dobu, která je charakteristická vzrůstající potřebou jaterních štěpů, je však tato technika méně vhodná – část jaterního štěpu zůstane nevyužita. Kromě toho je možné játra rozdělit na dvě nestejně velké části - tzv. „split liver“. Menší část může být transplantována dítěti, větší část je ve stejnou dobu transplantována dospělému. Split je možné provést při odběru v těle dárce před perfuzí nebo později při úpravě odebraného a promytého jaterního štěpu („back table“). Oběma těmito technikám předchází hepatektomie postižených jater příjemce. Při auxiliární transplantaci jater zůstávají postižená játra *in situ* a do dutiny břišní je implantována část jaterního štěpu dárce. Tato technika se provádí v naději, že původní játra zregenerují. Implantovaný segment může pomoci překlenout dobu AJS. Implantovaná část je po obnově funkce vlastních jater

vyjmuta nebo po vynechání imunosuprese postupně regreduje (Shrivastav et al, 2019). Jaterní štěpy z kadaverózního dárce pokrývají v současné době naprostou většinu potřeby urgentních transplantací jater (Ryska et al., 2009).

Na začátku 90. let byla pro potřeby transplantace jater u nejmenších dětí vypracována metodika přenosu jaterního segmentu ze živého dárce – tzv. „living related liver transplantation“. Při této metodě je dárce části jater příbuzný dítěte, většinou jeden z rodičů, nejčastěji matka. Transplantace nevyžaduje čekání na kadaverózního dárce jater, operace je elektivní a sestává z resekce části jater dárce, kterou jsou nahrazena nezvratně postižená játra příjemce. Do současné doby bylo na celém světě provedeno přibližně 1100 těchto výkonů, s minimální mortalitou dárců.

Nedostatek kadaverózních dárců jater (USA, Kanada, Evropa) a náboženské důvody (Japonsko) znemožňující využití kadaverů k odběru orgánů jsou důvodem k tomu, že na některých pracovištích se začíná metoda „living related“ aplikovat i u dospělých. U dárce je provedena modifikovaná pravostranná hepatektomie tak, aby získaný lalok bylo možné perfundovat a použít k implantaci u příjemce. V poslední době na několika pracovištích ve světě začínají přenos jaterního segmentu ze živého dárce aplikovat i urgentně u dětí s AJS (Park et al., 2016).

Při kritickém pohledu na naše současné léčebné možnosti je nutné konstatovat, že transplantace jater není ideální léčebnou metodou u nemocných s AJS (možnost spontánní regenerace jater, potřeba celoživotní imunosuprese atd.). Transplantace jater je vynuceným léčebným postupem, který odpovídá současnému medicínskému poznání.

Z výše uvedeného plyne, že v léčbě nemocného s AJS není problém v metodologii ošetření, ale v neschopnosti překlenout předtransplantační období, kdy je v popředí progresse příznaků AJS. Nebiologické metody (hemoadsorpce, plazmaferéza apod.) nesplnily původní očekávání. Snaze o sestrojení extrakorporálního bioreaktoru, který by byl schopen detoxikovat nemocného s AJS po dobu čekání na vhodný jaterní štěp, bylo a je věnováno nemalé úsilí. Využití xenoperfuze, tj. využití funkčních zvířecích hepatocytů jako náplně bioreaktoru k hemoperfuzi nemocného s AJS, je ve stádiu klinických studií. Problém není spojen pouze s omezenou viabilitou izolovaných hepatocytů, ale i s eventuálním nebezpečím transmise prasečích retrovirů do lidské buňky. Velkou naději skýtá užití lidských hepatocytů izolovaných z nepoužitých jaterních štěpů či z vypěstovaných buněčných linií.

Xenotransplantace – použití jaterního štěpu ze zvířat – je v případě transplantace jater v nedohlednu. Problém není pouze v rovině imunologické a virologické,

ale xenotransplantace jater je limitována i fyziologicky. Peptidy syntetizované ve zvířecích játrech se výrazně liší od lidských, způsobily by fatální změnu onkotického tlaku a koagulačních poměrů, navíc, hladina cholesterolu je u zvířat desetinásobná, vznikla by neřešitelná cholestáza apod. Xenotransplantace jater je proto v současné době zcela nevhodná ke klinické aplikaci (Ryska et al., 2009).

Kontraindikací transplantace jater je multiorgánové selhání a závažná infekce mimo kontrolu antibiotické terapie, zejména infekce plicní. Další kontraindikace spadají do oblasti psychosociální.

Po transplantaci jater se k prevenci jejich odhojení a k léčbě rejekce používají imunosupresiva. Všechna současná klinicky používaná imunosupresiva jsou látky s mohutným farmakologickým účinkem. Zároveň je však jejich užívání spojeno s řadou nežádoucích účinků, především rizikem infekcí a vznikem nádorů. Mnohá z nich mají také nežádoucí účinky metabolické a různé projevy orgánové toxicity. Imunosupresiva se často používají v kombinacích a u většiny příjemců doživotně (Ehrmann a Hůlek, 2010).

## 2. Cíle práce

1. Vytvořit chemický model akutního jaterního selhání (AJS) vyvolaného podáním thioacetamidu (TAA), se stanovením optimální dávky této látky, a porovnat průběh AJS v reakci na různě velkou dávku TAA u dvou kmenů potkanů – Wistar a Lewis.
2. Zjistit, zda transplantace hepatocytů cestou *vena portae* do jater zmírní průběh AJS vyvolaného podáním TAA u potkanů kmene Lewis.



### 3. Experimentální část

#### 3.1 Akutní jaterní selhání vyvolané podáním TAA: nastavení vhodné dávky u potkanů kmene Wistar a Lewis

Jedním z neefektivnějších postupů v léčbě AJS je bezodkladná ortotopická transplantace jater. Tato možnost je však značně limitovaná nedostatkem vhodných dárcovských orgánů. Neustále se hledají další léčebné postupy, např. bioarteficiální játra, které by pomohly překlenout dobu čekání na transplantaci, popř. regeneraci jater (Bonavita et al., 2010, Tritto et al., 2010, Yu et al., 2012, Bañarez et al., 2013). Efektivnost nových metod v léčbě AJS není zatím příliš prokázána (Wu et al., 2010, Bernal and Wendon, 2013). Aby bylo možné zhodnotit léčebný význam těchto postupů, potřebujeme funkční studie na zvířecích modelech. Mnohé již byly provedeny se snahou o vyvinutí optimálního modelu pro studium patofyziologie jaterního selhání, a to jak na velkých zvířatech (psi, kozy, prasata), tak na malých (potkani a myši). K indukci jaterního selhání se vyvíjejí a také používají různé hepatotoxické látky (Butterworth et al., 2009, Ryska et al., 2009, 2012, Tuñon et al., 2009, Kawahara et al., 2010, Pantoflíček et al., 2012, Pražák et al., 2013). S ohledem na různé faktory, jako např. znalosti genomu, dostupnost fyziologických a biochemických měření, životní cyklus zvířat a ekonomickou dostupnost, se jako nejvhodnější modelové zvíře pro experimentální jaterní selhání jeví laboratorní potkan (Zicha et al., 1999, Zicha et al., 2012).

Vzhledem k nárokům na technické dovednosti a k ceně indukce jaterního selhání se ve studiích zaměřených na patofyziologii a nové léčebné postupy při poškození jater doporučuje používat hepatotoxické léky (Butterworth et al., 2009, Tuñon et al., 2009). Mezi tyto látky patří také TAA (Butterworth et al., 2009, Tuñon et al., 2009). TAA je dlouho znám svými hepatotoxickými účinky. Jeho biotransformace na thioacetamid sulfoxid (TAAS) probíhá cestou CYP-450, následnou konverzí přechází na thioacetamid disulfoxid představující značně toxický a reaktivní metabolit. Tyto metabolity se kovalentně váží na jaterní makromolekuly, čímž značně zvyšují produkci reaktivních forem kyslíku, které indukují akutní centrilobulární nekrózu (Koen et al., 2013).

Abychom navodili jaterní selhání u potkanů, podávali jsme intraperitoneálně (i.p.) různé dávky TAA, v jednotlivých nebo ve dvou rozdělených dávkách. Z dostupných studií není zatím známo, zda AJS způsobené podáním TAA je závislé na dávkách tohoto toxinu (Basile et al., 1990, Celik et al., 1999, Pawa et al., 2004, Anbarasu et al., 2012,

Chadipiralla et al., 2012, Farjam et al., 2012, Bautista et al., 2013, Mustafa et al., 2013, Nissar et al., 2013). Jako malá modelová zvířata byli doposud použiti potkaní kmenů Wistar a Lewis, na kterých se hodnotil hepatoprotektivní vliv různých drog a postupů po TAA dependentním AJS (např. bioarteficiální játra, transplantace hepatocytů). Zatím však není známo, zda inbrední Lewis či outbrední Wistar kmeny potkanů mají stejnou senzitivitu k TAA s ohledem na rozvoj jaterního poškození (Mehendale, 2005, Rahman et al., 2005, Kawahara et al., 2010, Nibourg et al., 2012).

Vše výše zmíněné nás vedlo k tomu, abychom se pokusili jednoznačně charakterizovat snadno opakovatelný model AJS u potkanů. Jednak jsme zkoumali vliv zvyšujících se dávek TAA (v rozmezí od 175 do 700 mg/kg tělesné hmotnosti za den podané i.p.) na rozvoj AJS, a dále jsme zjišťovali, zda mezi kmeny potkanů Wistar a Lewis jsou nějaké rozdíly v průběhu AJS v závislosti na vzrůstajících dávkách TAA.

### **3.1.1 Metodika**

#### **Etické schválení, zvířata a chemikálie**

Všechny experimenty byly provedeny v souladu s platnými směrnici IKEM Praha, které jsou ve shodě s Evropskou dohodou o ochraně zvířat. Všechna zvířata použitá v naší studii byla umístěna ve zvěřinci s akreditací České asociace péče o laboratorní zvířata. Použili jsme samce kmenů Wistar a Lewis, kteří byli zakoupeni ve společnostech Charles River Laboratories AnLab, s.r.o. Praha a Velaz, s.r.o. Praha, ve věku 9 týdnů. Před začátkem experimentu byla všechna zvířata aklimatizována v našem viváriu po dobu dvou týdnů, při 12hodinovém světelném režimu, byla krmena normoslanou normoproteinovou dietou (0,45 % NaCl, 19-21 % proteinu, SEMED Praha) a měla volný přístup k vodě. Thioacetamid (Sigma Praha) byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku a v odpovídajících dávkách podáván i.p.

#### **3.1.2 Uspořádání experimentu**

24 hodin před experimentem („-24 h“) byly odebírány vzorky krve (600 µl) z ocasní žíly pro biochemickou analýzu (Fuji Drive-Chem 4000 Analyser). Stanovovali jsme plazmatické koncentrace albuminu, bilirubinu, alanin aminotransferázy (ALT), aspartát aminotransferázy (AST) a amoniaku (NH<sub>3</sub>). Následně byla odebírána krev v intervalech 24, 48 a 96 hodin po prvním podání TAA. Doba sledování v sériích 1 a 2

na konci experimentu byla zvířata usmrcena vysokými dávkami pentobarbitalu.

### **Série 1: Vliv různých dávek TAA podaného v jedné injekci i.p.**

Čerstvě připravený TAA byl injikován i.p. v jedné dávce, v den 0 v 8.00 hodin. Při rozvoji jaterního selhání zvířata trpí nechutenstvím a přijímají tekutiny pouze v malém množství, proto jsme jim každé ráno aplikovali subkutánně 5% roztok glukózy (2 ml/100 g tělesné hmotnosti). Po osmi hodinách jsme pravidelně kontrolovali přežívající zvířata. Tělesná hmotnost byla monitorována každých 12 hodin a krevní vzorky byly odebírány ve výše uvedených intervalech. Zvířata jsme rozdělili do těchto skupin (iniciální n=20 zvířat v každé skupině):

1. Wistar + TAA 175 mg/kg
2. Lewis + TAA 175 mg/kg
3. Wistar + TAA 262,5 mg/kg
4. Lewis + TAA 262,5 mg/kg
5. Wistar + TAA 350 mg/kg
6. Lewis + TAA 350 mg/kg

### **Série 2: Vliv různých dávek TAA podaného ve dvou injekcích i.p.**

Čerstvě připravený TAA byl injikován i.p. ve dvou podáních, v den 0 v 8:00 hodin a tentýž den ve 20:00 hodin. Podle celkové dávky TAA jsme zvířata rozdělili do těchto skupin (iniciální n=20 zvířat v každé skupině):

1. Wistar + TAA 350 mg/kg
2. Lewis + TAA 350 mg/kg
3. Wistar + TAA 525 mg/kg
4. Lewis + TAA 525 mg/kg
5. Wistar + TAA 700 mg/kg
6. Lewis + TAA 700 mg/kg

### **Série 3: Histologické zhodnocení jaterních změn v závislosti na dávkách TAA**

V této sérii byla zvířata usmrcena 24 hodin po podání TAA. Játra jsme vyjmuli, opláchnuli fyziologickým roztokem a umístili do 4% formaldehydu. Histologické řezy byly obarveny hematoxylin-eosinem a Schiffovým barvením (PAS) a naslepo vyhodnoceny semikvantitativním histologickým skóre dle Ishaka et al. (1995). Skóre kvantifikuje tyto

parametry: A – periportální či periseptální nekróza, B – edematická nekróza, C – fokální lytická nekróza, apoptóza či fokální zánět, D – portální zánět. Každý parametr byl hodnocen od 0 (beze změn) do 4 (maximální změny) a konečný index byl stanoven jako suma A + B + C + D. Experimentální skupiny byly následující (n=8 v každé skupině):

1. Wistar + fyziologický roztok
2. Lewis + fyziologický roztok
3. Wistar + TAA 350 mg/kg v jedné dávce
4. Lewis + TAA 350 mg/kg v jedné dávce
5. Wistar + TAA 350 mg/kg ve dvou dávkách
6. Lewis + TAA 350 mg/kg ve dvou dávkách

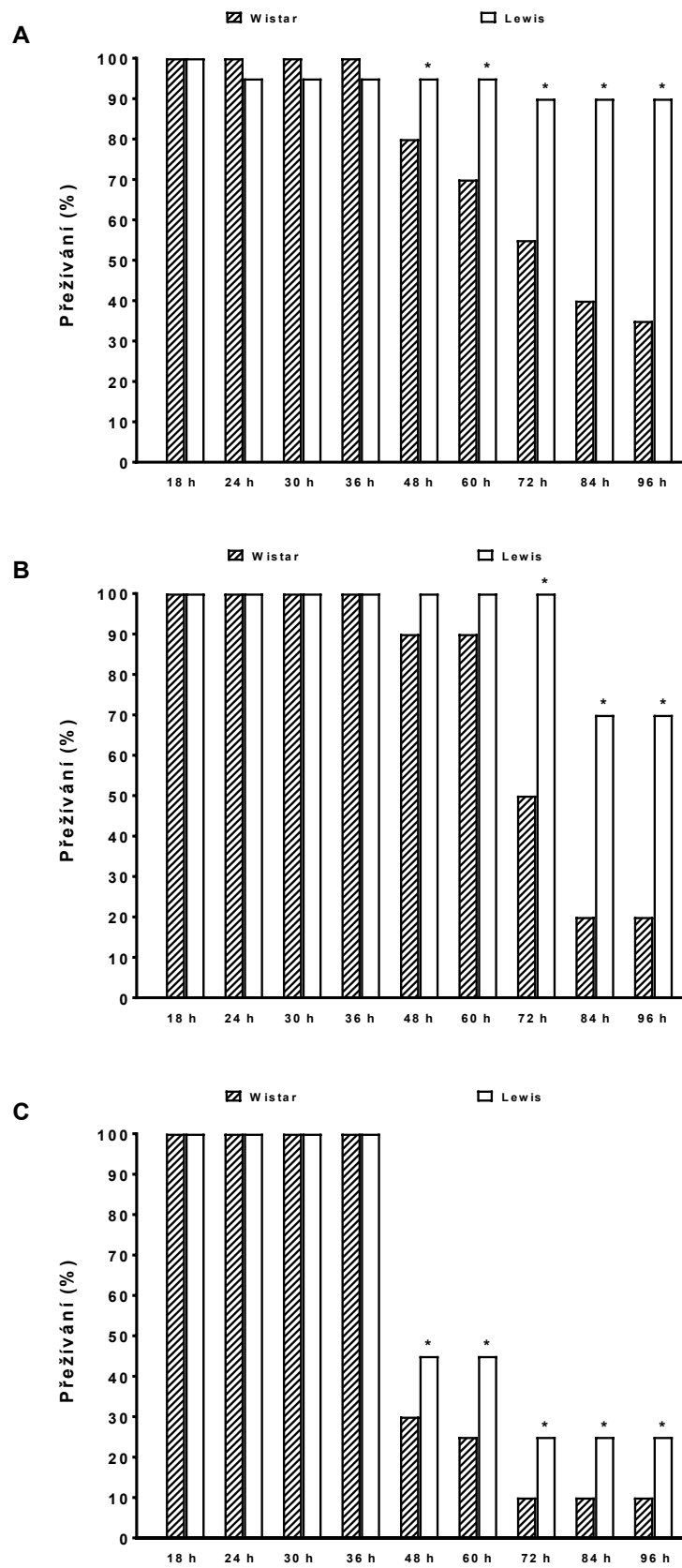
### 3.1.3 Statistické zhodnocení

Statistická analýza dat byla provedena pomocí programu Graph-Pad Prism (Graph Pad Software, San Diego, California, USA). Pro vyhodnocení změn uvnitř skupin byla použita ANOVA pro opakovaná měření a Student-Newman-Keuls test. K porovnání dalších výsledků byl použit Studentův t-test nebo jednocestná ANOVA. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr±SEM. Za statisticky významné byly považovány hodnoty, které překročily 95% hranici pravděpodobnosti ( $p < 0,05$  %).

### 3.1.4 Výsledky

#### Série 1: Vliv různých dávek TAA podaného v jedné injekci i.p.

Graf 1 ukazuje, že podání TAA v jedné injekci vyvolalo na dávce závislé snížení v přežívání u obou kmenů potkanů, Wistar i Lewis. Avšak u kmene Wistar byl patrný mnohem prudší pokles v přežívání ve srovnání s kmenem Lewis. Před podáním TAA nebyly patrné rozdíly v tělesné hmotnosti mezi kmeny Wistar a Lewis (308±3 vs. 315±4 g). Po podání TAA byl u obou kmenů zaznamenán signifikantní pokles v tělesné hmotnosti. 48 hodin po podání TAA v dávkách 262,5 a 350 mg/kg vykazovali potkani kmene Wistar významně větší pokles v tělesné hmotnosti ve srovnání s potkany kmene Lewis (-25±3 a -27±3 vs. -14±2 a -12±2 g,  $p < 0,05$  v obou případech).

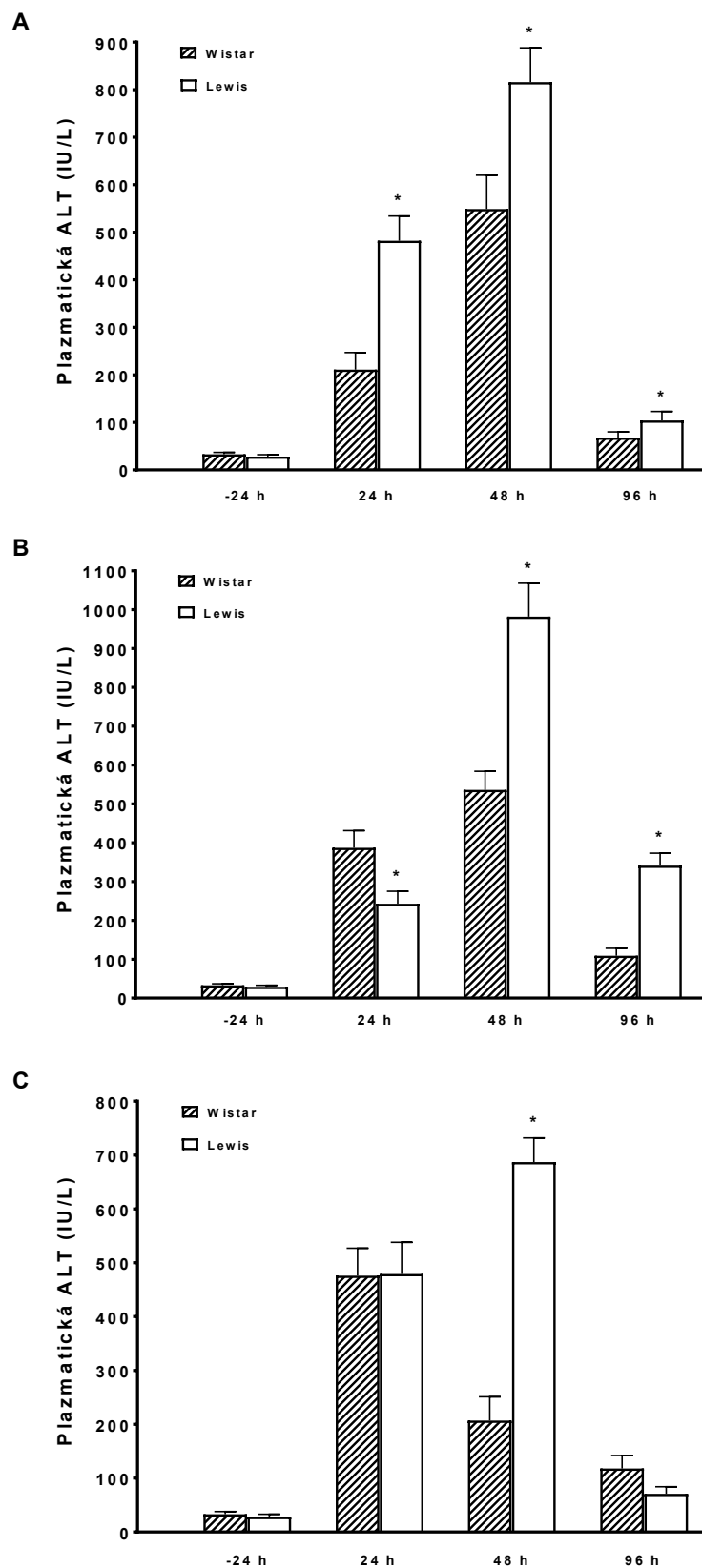


**Graf 1:** Změny v přežívání po i.p. podání TAA v jedné injekci, v dávkách 175 mg/kg/den (A), 262,5 mg/kg/den (B) a 350 mg/kg/den (C); \*p <0,05 Lewis vs. Wistar ve stejném časovém bodě

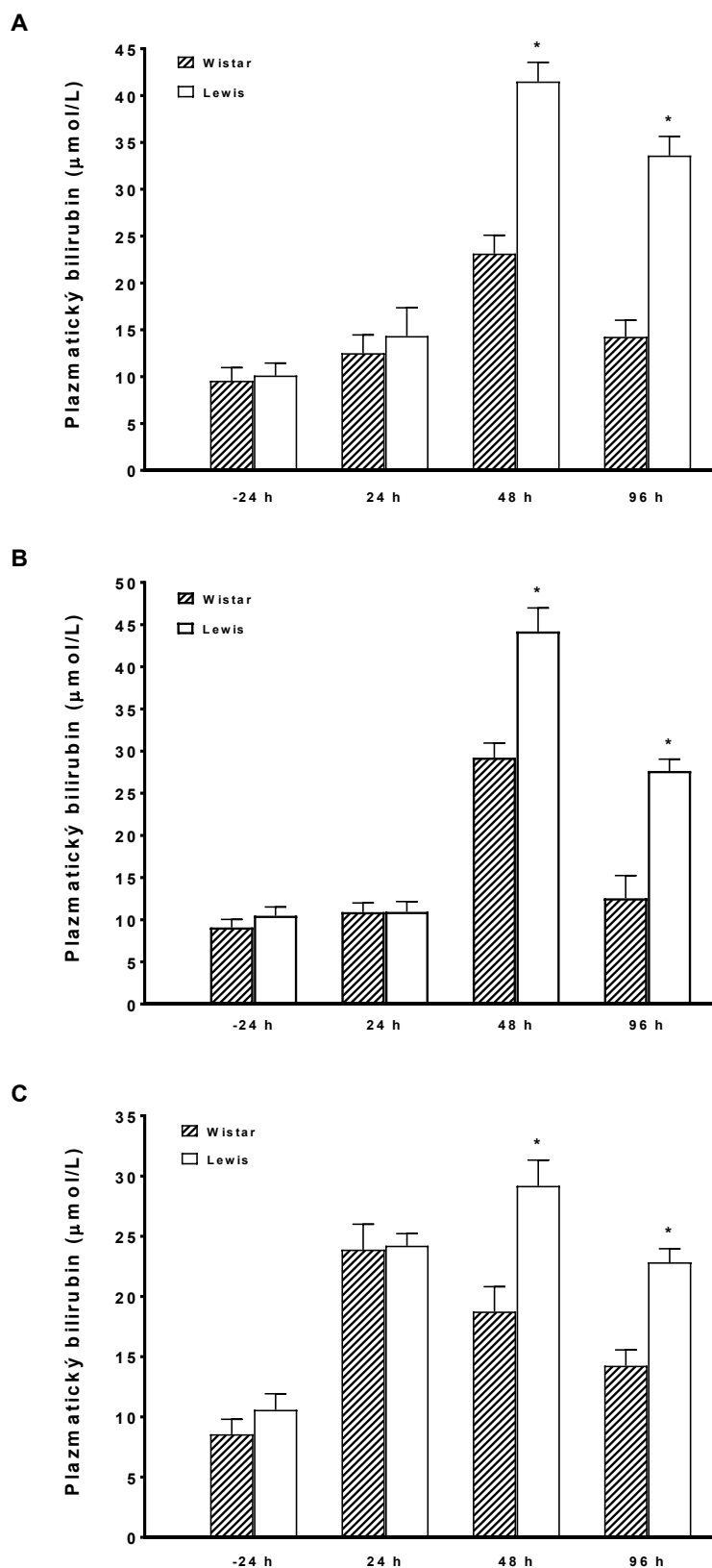
Jak ukazují grafy 2 a 3, výchozí hodnoty („-24 h“) plazmatických aktivit ALT ( $33 \pm 4$  vs.  $28 \pm 4$  IU/l) a hladin bilirubinu ( $9,56 \pm 1,41$  vs.  $10,12 \pm 1,33$   $\mu\text{mol/l}$ ) se mezi kmeny Wistar a Lewis signifikantně nelišily. Všechny tři dávky TAA způsobily signifikantní zvýšení aktivity ALT a hladin plazmatického bilirubinu u obou kmenů. Maximální hodnoty byly zjištěny 48 hodin po podání TAA a nárůst hodnot byl vyšší u kmene Lewis ve srovnání s kmenem Wistar. Změny v aktivitě AST vykazovaly podobný průběh jako u ALT. Vzhledem k obdobnému trendu a faktu, že ALT je specifitější marker jaterních funkcí než AST, hodnoty AST nejsou graficky znázorněny.

Z grafu 4 je patrné, že výchozí hodnoty  $\text{NH}_3$  mezi kmeny Wistar a Lewis se statisticky významně nelišily. Každá ze tří dávek TAA vedla k významnému nárůstu hladin plazmatického  $\text{NH}_3$ , změny u kmene Wistar byly výraznější než u kmene Lewis.

Nezaznamenali jsme signifikantní rozdíly v bazálních hodnotách plazmatického albuminu mezi kmeny Wistar a Lewis ( $29,6 \pm 0,9$  vs.  $31,5 \pm 1,1$  g/l), ani po podání TAA v průběhu celého pokusu.

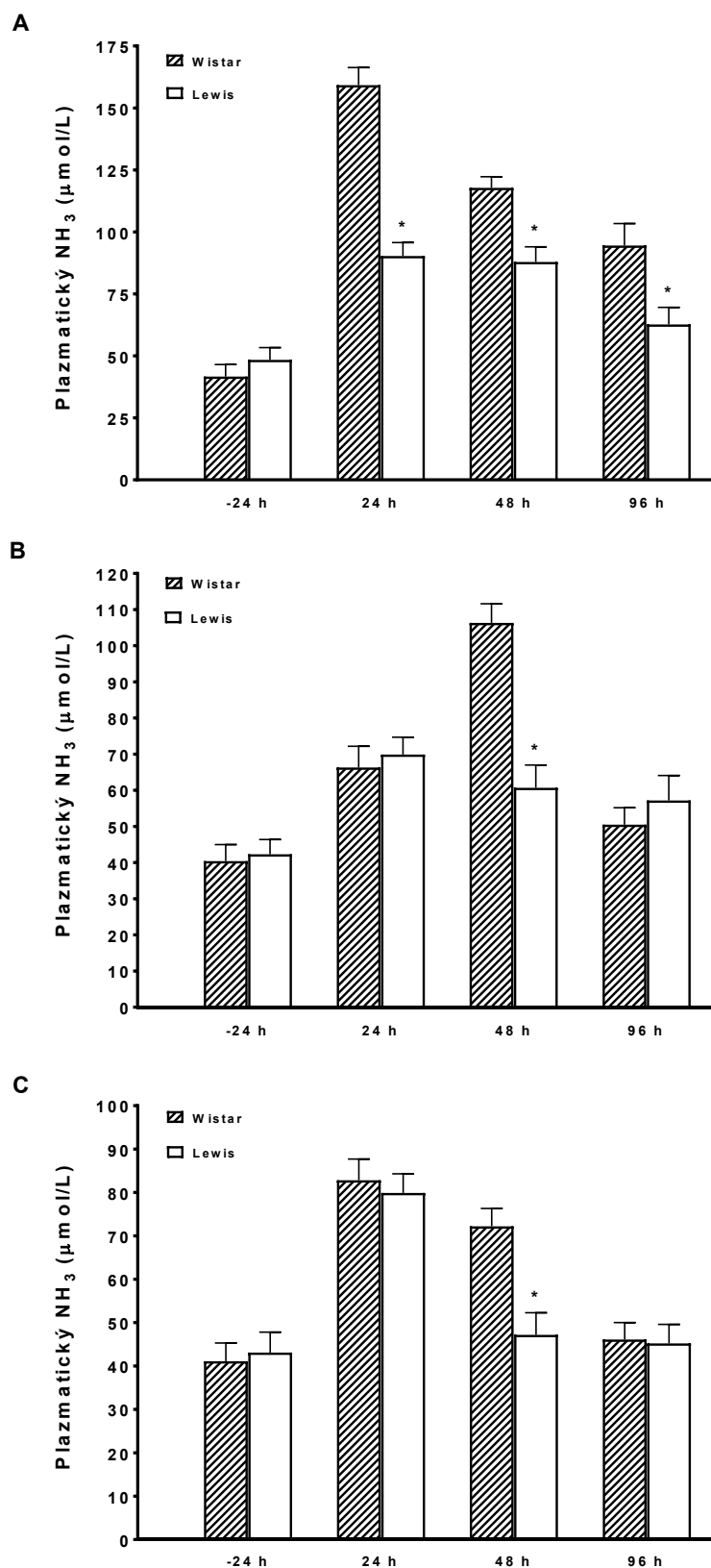


**Graf 2:** Změny v aktivitě plazmatické ALT po i.p. podání TAA v jedné injekci, v dávkách 175 mg/kg/den (A), 262,5 mg/kg/den (B) a 350 mg/kg/den (C); \* $p < 0,05$  Lewis vs. Wistar ve stejném časovém bodě



**Graf 3:** Změny v plazmatických koncentracích bilirubinu po i.p. podání TAA v jedné injekci, v dávkách 175 mg/kg/den (A), 262,5 mg/kg/den (B) a 350 mg/kg/den (C); \* $p < 0,05$  Lewis vs. Wistar ve stejném časovém bodě





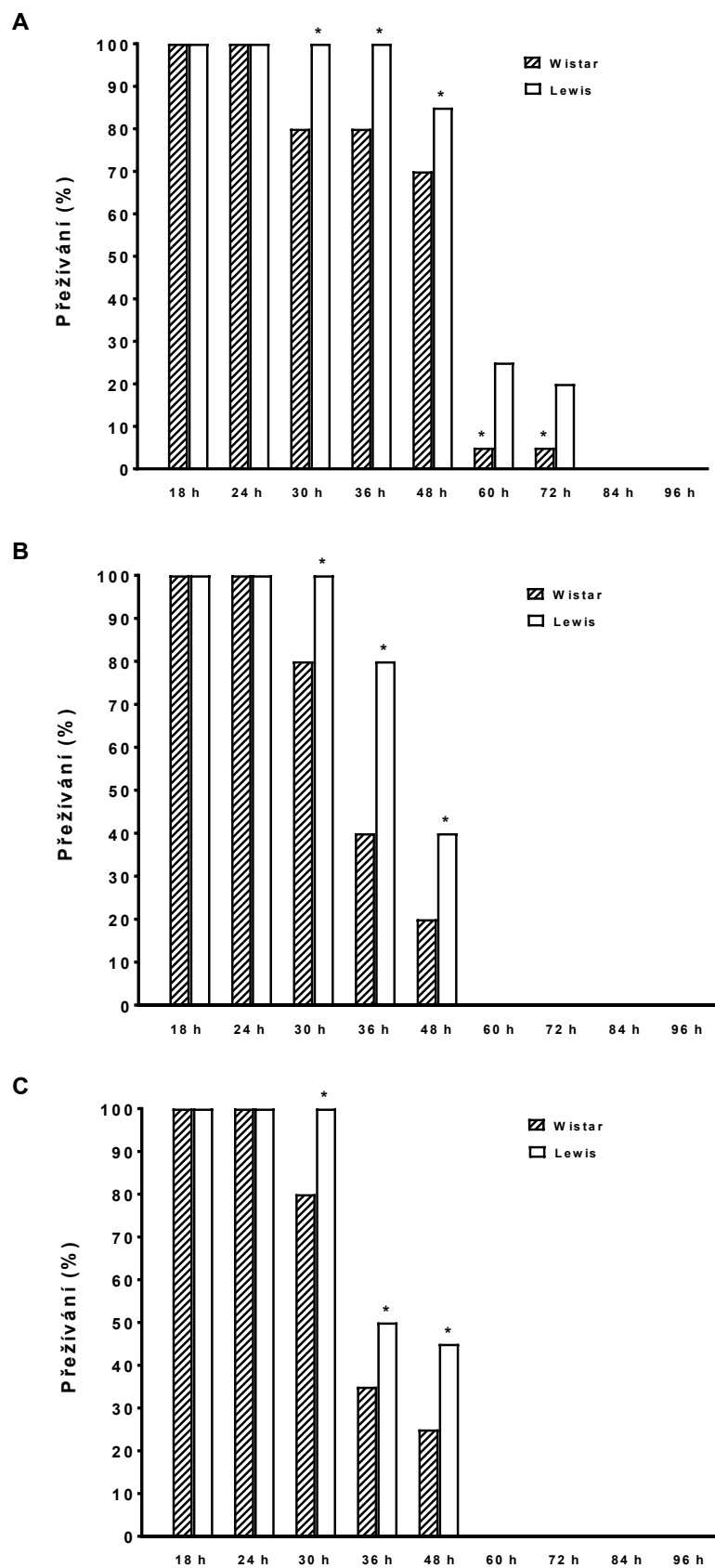
**Graf 4:** Změny v plazmatických hladinách  $\text{NH}_3$  po i.p. podání TAA v dávkách 175 mg/kg/den (A), 262,5 mg/kg/den (B) a 350 mg/kg/den (C); \* $p < 0,05$  Lewis vs. Wistar ve stejném časovém bodě

## **Série 2: Vliv různých dávek TAA podaného ve dvou injekcích i.p.**

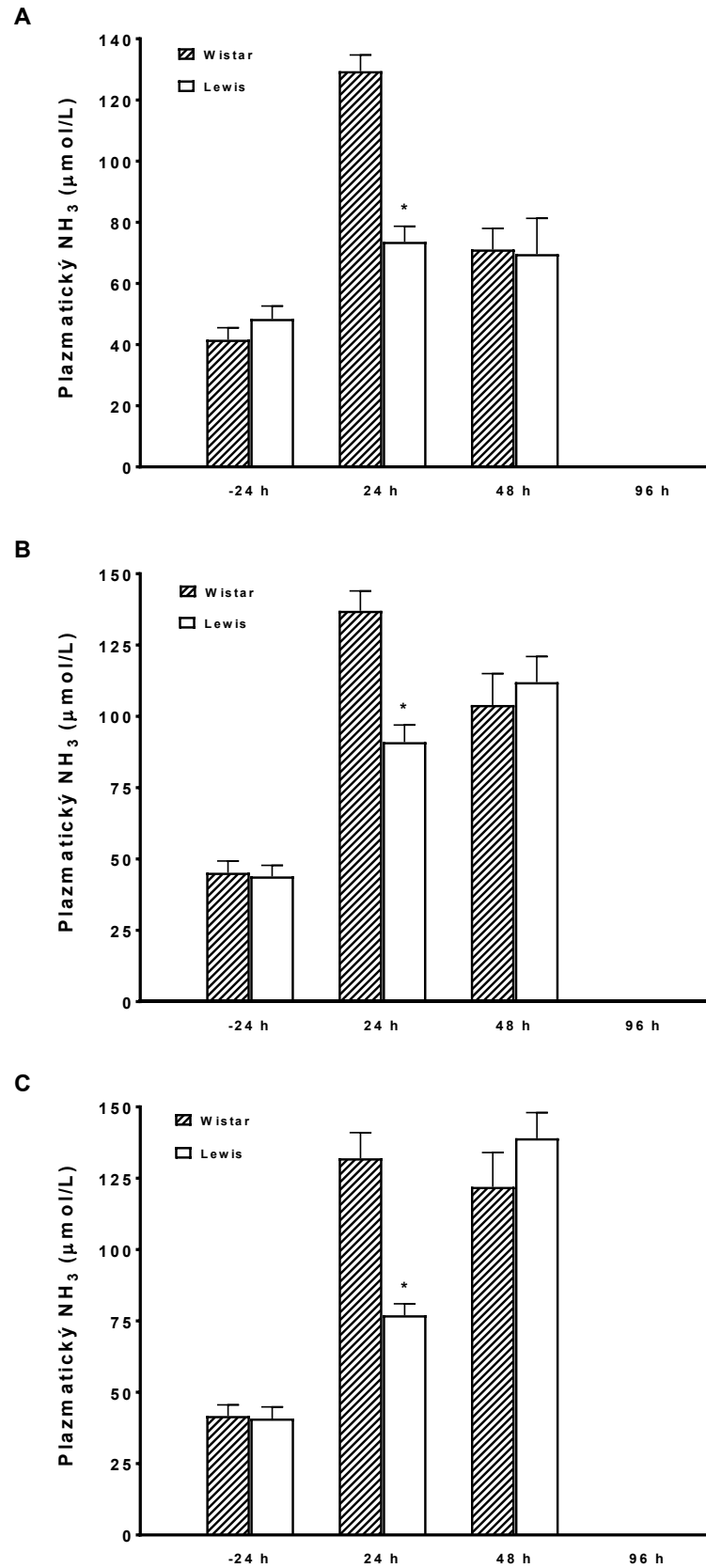
Jak je znázorněno v grafu 5, u zvířat, kterým bylo podáno TAA ve dvou injekcích, kde celková dávka TAA byla rozdělena na dvě stejné dílčí dávky, se v porovnání se sérií 1 výrazně snížilo přežívání, žádné zvíře nepřežilo 96 hodin, a to ani v jedné skupině. Po aplikaci vysokých celkových dávek TAA (525 a 700 mg/kg/den) všechna zvířata zemřela během prvních 48 hodin. A opět, samci kmene Wistar přežívali signifikantně méně než samci kmene Lewis ve stejných časových bodech.

Graf 6 ukazuje, že podání TAA ve dvou injekcích v den 0 vyvolá výrazné zvýšení hladin plazmatického  $\text{NH}_3$  již během prvních 24 hodin. Tento nárůst byl pozorován signifikantně vyšší u kmene Wistar ve srovnání s kmenem Lewis.

Vzhledem k tomu, že změny v plazmatických aktivitách ALT a AST a hladinách bilirubinu po podání dvou injekcí TAA v den 0 vykazovaly stejný trend jako změny v hladinách  $\text{NH}_3$ , nejsou tato data graficky znázorněna.



**Graf 5:** Změny v přežívání po i.p. podání TAA ve dvou injekcích za den, v celkových dávkách 350 mg/kg/den (A), 525 mg/kg/den (B) a 700 mg/kg/den (C); \*p < 0,05 Lewis vs. Wistar ve stejném časovém bodě

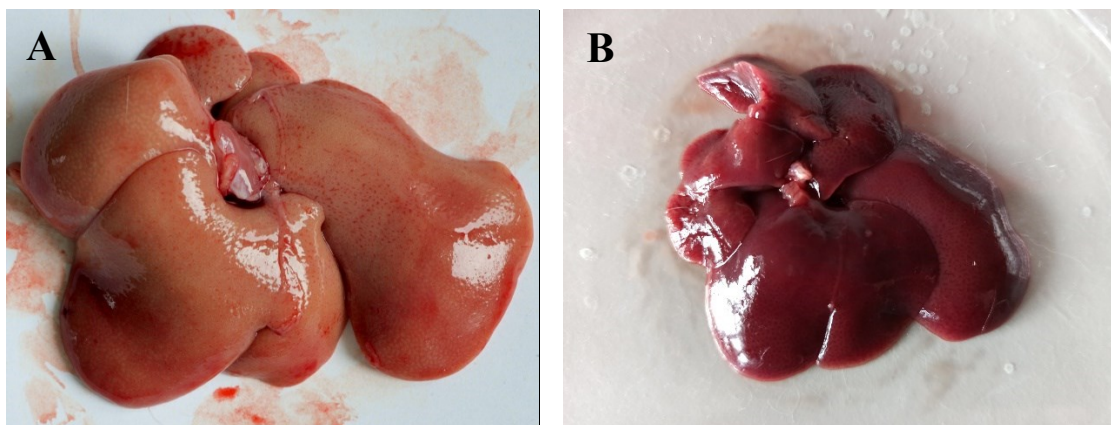


**Graf 6:** Změny v plazmatických hladinách  $\text{NH}_3$  po i.p. podání TAA ve dvou injekcích za den, v celkových dávkách 350 mg/kg/den (A), 525 mg/kg/den (B) a 700 mg/kg/den (C); \* $p < 0,05$  Lewis vs. Wistar ve stejném časovém bodě

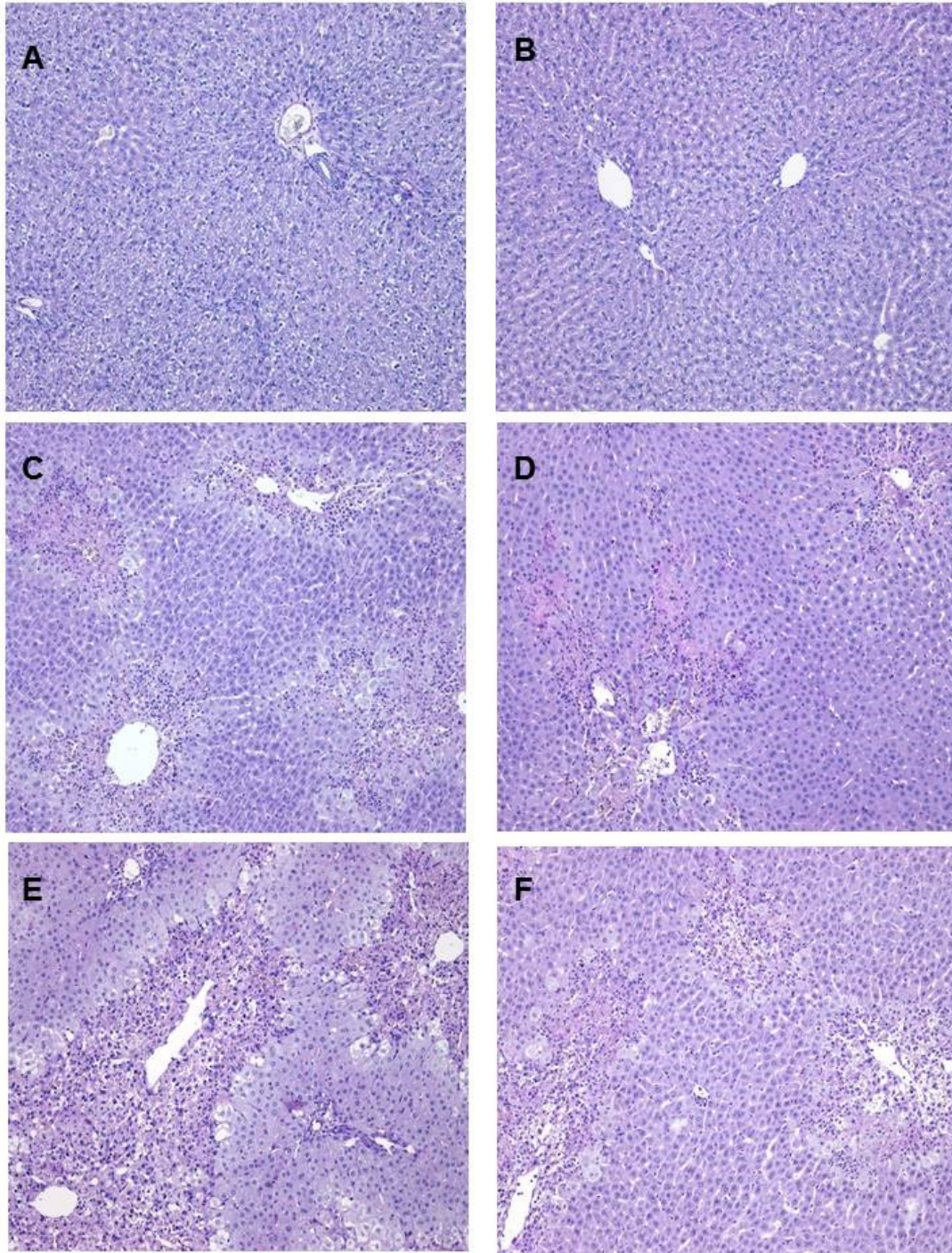
### Série 3: Histologické zhodnocení jaterních změn v závislosti na dávkách TAA

Na obr. 4 jsou vidět játra se známkami AJS a zdravá játra vyjmutá z dutiny břišní. V porovnání se zdravými játry jsou játra selhaných zvířat edematózní. Reprezentativní řezy jaterní tkáně obarvené PAS jsou ukázány na obr. 5. Jsou zde prezentovány vzorky jaterní tkáně kmenů Wistar a Lewis, od skupin, kterým byl i.p. aplikován pouze fyziologický roztok nebo TAA v dávce 350 mg/kg podané v jedné injekci a v dávce 350 mg/kg podané ve dvou injekcích (tedy v celkové dávce 700 mg/kg/den).

Obecně lze říci, že u kmene Wistar jsme zjistili výraznější abnormality v jaterním parenchymu: dystrofické změny hepatocytů, edém a difúzní centrilobulární hemoragické nekrózy se sporadickými formacemi mŕstkových nekróz. Oba kmeny, Wistar i Lewis, kterým byl aplikován pouze fyziologický roztok, měly normální jaterní parenchym, histologické skóre neukázalo žádné změny v jaterním parenchymu potkanů (skóre 0 v obou případech). U samců kmene Wistar s aplikovanou dávkou TAA 350 mg/kg v jedné injekci bylo pozorováno signifikantně vyšší jaterní poškození oproti samcům kmene Lewis (histologické skóre  $6,1 \pm 0,37$  vs.  $3,67 \pm 0,49$ ,  $p < 0,05$ ). Podání TAA v dávce 350 mg/kg ve dvou injekcích vedlo k dalšímu zhoršení jaterního poškození u samců obou kmenů, Wistar i Lewis, histologické skóre bylo opět signifikantně vyšší u kmene Wistar v porovnání s kmenem Lewis ( $7,83 \pm 0,31$  vs.  $5,17 \pm 0,47$ ,  $p < 0,05$ ), ve všech časových bodech.



**Obr. 4:** Explantovaná játra se známkami akutního jaterního selhání (A) a zdravá játra (B). (Zdroj: archiv autorky)



**Obr. 5:** Poškození jater u kmenů Wistar a Lewis po podání TAA: Wistar (**A**) a Lewis (**B**) po i.p. aplikaci fyziologického roztoku; Wistar (**C**) a Lewis (**D**) po i.p. aplikaci TAA v dávce 350 mg/kg v jedné injekci; Wistar (**E**) a Lewis (**F**) po i.p. aplikaci TAA v dávce 350 mg/kg ve dvou injekcích. Stručný histologický popis: **A** (Wistar) – jaterní parenchym s normální architekturou (barvení PAS, zvětšeno 40x). **B** (Lewis) – jaterní parenchym bez patologických změn (PAS, 40x). **C** (Wistar) – edematické koagulační nekrózy zasahující do perivenulární a střední zóny (PAS, 40x). **D** (Lewis) - perivenulární nekrózy se sporadickými mŕstky a fokální nekrózy (PAS, 40x). **E** (Wistar) - mŕstkové perivenulární nekrózy s nepatrným sinusoidálním edémem, sporadické monocelulární nekrózy (PAS, 40x). **F** (Lewis) - fokální perivenulární nekrózy s nepatrnými lymfocytózami, sporadické monocelulární nekrózy (PAS, 40x).

### 3.1.5 Diskuze

Zvyšující se dávky TAA vyvolávají odpovídající snížení v přežívání samců jak kmene Wistar, tak i Lewis, což je prvním důležitým zjištěním vycházejícím z našich experimentů. Nejvyšší dávka TAA slučitelná s přežíváním několika zvířat od začátku do konce pokusu byla shodná u obou kmenů, a to 350 mg/kg/den podaná i.p. v jedné injekci. Za zvláštní pozornost stojí fakt, že podání stejné dávky TAA rozdělené do dvou injekcí způsobilo prudký pokles přežití a žádné zvíře ani z jednoho kmene nepřežilo déle než 72 hodin (srovnání dat v grafech 1C a 5C). Injekce TAA v celkových dávkách 525 a 700 mg/kg/den vyvolaly výrazný pokles v přežívání a ani jedno zvíře kmene Wistar a Lewis se nedožilo 48 hodin. Křivka přežívání byla podobná u obou těchto dávek, což znamená, že maximálního hepatotoxického efektu je dosaženo dávkou 525 mg/kg/den podané ve dvou injekcích. Podání TAA v každé dávce bylo doprovázeno zvyšujícími se hodnotami bilirubinu, ALT, AST a  $\text{NH}_3$  v krevní plazmě s maximálním zvýšením těsně před nástupem smrti. Všechny tyto změny charakteristické pro AJS naznačují, že TAA jistě navozuje stav podobný AJS u lidí (Lee, 2012, Tritto et al., 2012), zároveň jsme shodně ukázali, že zvířecí model pro AJS může vykazovat jisté procento spontánního přežití. Možné příznivé účinky nových terapeutických postupů by měly být hodnoceny za podmínek připomínajících lidská onemocnění (Butterworth et al., 2009, Tuñon et al., 2009). S ohledem na všechna tato fakta a naše nové výsledky můžeme říct, že optimální dávka TAA vedoucí k AJS u potkanů odpovídá 350 mg/kg/den podaná i.p. v jedné injekci.

V této souvislosti stojí za to se krátce zmínit o dalších chemických modelech experimentálního jaterního selhání u zvířat. Přibližně před 25 lety byla stanovena určitá kritéria, která by měl ideální zvířecí model AJS splňovat (Terblanche and Hickman, 1991):

- Reverzibilita – indukované jaterní selhání by mělo být potenciálně reverzibilní.
- Opakovatelnost – stupeň jaterního poškození by měl být standardizován, zejména s ohledem na smrt zvířat.
- Příčina smrti – smrt by měla nastat přímým důsledkem jaterního poškození.
- Terapeutické okno – měl by být dostatečný čas mezi jaterním selháním a smrtí.
- Minimální riziko pro ošetřující osoby – manipulace s poškozujícím toxinem by neměla být riziková.

S ohledem na tyto body se pro vytvoření experimentálního zvířecího modelu AJS nejčastěji používají následující chemikálie:

**Tetrachlormetan** (CCl<sub>4</sub>) = chlorid uhličitý či karbon tetrachlorid

Hepatotoxický efekt tohoto toxinu je znám již mnoho let (Hubner, 1965), ale jeho využití v experimentálních modelech jaterního selhání není příliš časté, protože výsledky byly málo reprodukovatelné a ukázaly se vysoké druhové odchylky (Shi et al., 1997). Kromě toho bylo zjištěno, že podání CCl<sub>4</sub> sice poškozuje játra, ale také podporuje jaterní regeneraci (Weber et al., 2003, Taniguchi et al., 2004). Tetrachlormetan nezpůsobuje masivní jaterní nekrózu, která je charakteristická u lidského AJS. Intoxikace CCl<sub>4</sub> (jak bylo zjištěno u lidí) se týká encefalopatie a pozdního stádia hepatického kómatu (Tuñon et al., 2009). Kromě toho není CCl<sub>4</sub> v játrech zcela metabolizován a jeho nemetabolizované produkty výrazně mění a poškozují plíce a ledviny (Newsome et al., 2000, Tuñon et al., 2009). A navíc, manipulace s CCl<sub>4</sub> je riziková pro osoby, které s ním pracují.

**Acetaminofen** (APAP)

Běžně používaným přípravkem vyvolávajícím jaterní poškození je acetaminofen, známý pod názvem Paracetamol. Ačkoliv je již dlouho známo efektivní antidotum (N-acetylcystein), je předávkování acetaminofenem stále jednou z nejčastějších léky způsobených příčin jaterního selhání, zejména pak v industrializovaném světě (Larson, 2007). Za normálních podmínek je APAP biotransformován v játrech dvěma reakcemi, glukuronidací a sulfatací, po nichž následuje renální exkrece. Je-li APAP přítomen v nadbytku, jsou detoxikační cesty saturovány a APAP je metabolizován CYP-450 oxidázovým enzymatickým systémem na N-acetyl-p-benzochinonimin, extrémně toxickou elektrofilní látku (Jaeschke et al., 2013). Hepatotoxicita acetaminofenu je různá v závislosti na nestálé a proměnlivé aktivitě cesty CYP-450. Ta je například umocněna induktory systému CYP-450, jako je fenobarbital. Předávkování APAP spouští vrozenou imunitní odpověď (Jaeschke et al., 2013, Williams et al., 2014), způsobuje akutní plicní poškození, má nefrotoxické a kardiotoxické účinky (Baudouin et al., 1995, Equia a Materson, 1997, Jaeschke et al., 2013). U zvířat pak vede k náhlému úmrtí vlivem nekontrolovatelné methemoglobinémie (Jaeschke et al., 2013). Hlavním problémem při AJS způsobeným APAP je značná variabilita a řada nepředvídatelných vedlejších účinků této chemikálie.



## **D-Galaktosamin (D-Gal)**

D-Gal patří mezi aminosacharidy. Při jeho přeměně v játrech galaktózovou cestou dochází k úbytku uridinových nukleotidů a k jaterní transkripční blokádě, jejímž výsledkem jsou metabolické změny a hepatická nekróza (Newsome et al., 2000). Hlavní výhodou tohoto modelu je podoba jeho hlavních charakteristik s lidským AJS, jako jsou nárůst enzymatické aktivity v játrech, vzestup plazmatických koncentrací  $\text{NH}_3$ , hypoglykémie, kóma a zvýšení intrakraniálního tlaku (Keppler et al., 1968). Mezi nevýhody pak například patří značné ovlivnění průběhu D-Gal indukovaného AJS anestézií (Newsome et al., 2000). Zatímco u velkých zvířat je tento model poměrně stabilní, u malých zvířat byla prokázána nízká opakovatelnost (myši). Myši byly relativně rezistentní, a to od nízkých až po vysoké dávky D-Gal. Navíc měly variabilní interval mezi podáním D-Gal a smrtí (Rahman et al., 2000). A konečně nesmíme zanedbat ani vysoké náklady na velké množství D-Gal potřebného na rozvoj AJS u velkých zvířat.

Vezmeme-li tedy v úvahu kritéria pro optimální model AJS (Terblanche and Hickam, 1991), informace z již zmíněných studií využívajících k jaternímu selhání jiné chemikálie než jen TAA a naše současné výsledky, jsme přesvědčeni, že AJS vyvolané podáním TAA představuje model, který splňuje všechna výše uvedená kritéria a podobá se lidskému AJS (Bernal et al., 2013). Model AJS vyvolaného podáním TAA je čím dál více využíván v experimentálních studiích, hlavně pak v těch, které hodnotí nové terapeutické postupy v léčbě AJS. Za zmínku stojí například práce Mustafy et al. (2013), ve které se zabývali možným protektivním vlivem antioxidantů na průběhu AJS.

Dalším důležitým zjištěním vyplývajícím z našich studií je neočekávaný rozdíl v reakci na TAA u kmenů Wistar a Lewis. Podle původní hypotézy jsme totiž předpokládali, že outbrední kmen Wistar bude více rezistentní vůči podání TAA a rozvoji AJS na rozdíl od inbredního kmene Lewis. Výsledky jsou ale opačné a nejsme schopni podat dostatečné vysvětlení této odlišnosti mezi oběma kmeny. Důvodem rozhodně nejsou základní jaterní funkce, protože hodnoty biochemických ukazatelů AJS (AST, ALT, bilirubin,  $\text{NH}_3$  a albumin) nebyly u těchto kmenů před zahájením pokusu signifikantně rozdílné. Je ale možné, že je to právě rozdílné genetické pozadí, které určuje průběh první fáze biotransformace xenobiotik v hepatocytech, tedy procesu, který je zprostředkován CYP-450 (Mehendale, 2005, Koen et al. 2013), a to by mohlo být příčinou rozdílné senzibility.

Plazmatické hodnoty ALT, AST a bilirubinu byly signifikantně vyšší u kmene Lewis 48 a 96 hodin po podání TAA v porovnání s kmenem Wistar. Zároveň, ve stejných časových bodech, samci kmene Lewis přežívali signifikantně více než samci kmene Wistar. Pozorovali jsme, že zvířata s nejvyššími koncentracemi  $\text{NH}_3$  naměřenými 24 h po podání TAA umírala nejdříve.

Je nutno přiznat, že hledání ideálního experimentálního modelu AJS stále trvá, v úvahu musí být brány faktory, jako jsou opakovatelnost, adekvátní velikost zvířat, cena zvířat, dostatečné terapeutické okno a minimální riziko pro personál. U velkých zvířat se preferují chirurgické modely AJS (devaskularizace jater u prasat), právě kvůli vysoké opakovatelnosti. Navíc, velikost zvířat umožňuje použití různých bioarteficiálních podpůrných systémů (Butterworth et al. 2009, Ryska et al. 2009, Tuñon et al. 2009, Pražák et al. 2013). Nevýhodou velkých zvířat jsou vysoké náklady na celý experiment, protože ustájení, manipulace a navození jaterního selhání vyžadují zkušený tým výzkumníků. V určitém směru je tedy snazší a levnější využít k experimentálním modelům AJS malá zvířata, potkany a myši, zejména pak k modelům využívajícím chemické látky jako je acetaminofen, galaktosamin, tetrachlormetan a další. S ohledem na tato fakta, hlavně na opakovatelnost navození jaterního selhání a na bezpečnost pro ošetřovatele, se použití TAA jeví jako nejpříjemnější cesta (Mehendale 2005, Butterworth et al. 2009, Tuñon et al. 2009). Jak jsme zmiňovali v úvodu této práce, i když TAA model jaterního selhání je používán více než 30 let (Basile et al. 1990, Celik et al. 1999, Pawa et al. 2004, Rahman et al. 2005, Anbarasu et al. 2012, Chadiprialla et al. 2012, Farjam et al. 2012, Bautista et al. 2013), některé jeho nevýhody nebyly dostatečně řešeny, a to byl důvod k našim studiím.

Tato práce má jisté nedostatky. Prvním nedostatkem naší studie jsou chybějící údaje o změnách v plazmatických a jaterních koncentracích zánětlivých cytokinů (tumor necrosis faktor  $\text{TNF-}\alpha$ , interleukin  $1\text{-}\beta$ , atd.), stejně jako tkáňových markerů oxidativního stresu. Druhým omezením, důležitým hlavně pro farmakokinetiku, je nemožnost stanovení plazmatických hodnot TAA a jeho produktu TASO, který představuje důležitý hepatotoxický metabolit biotransformace TAA. Dále jsme také neanalyzovali CYP-dependentní léky-metabolizující cestu, především expresi a aktivitu enzymu CYP2E. Tyto limitace bohužel nevyhnutelně zužují náhled na komplexní mechanismus zodpovědný za průběh jaterního selhání způsobeného podáním TAA u samců kmenů Wistar a Lewis.

Tato naše studie ukázala, že optimální dávka TAA k vyvolání akutního jaterního selhání je 350 mg/kg/den podaná i.p. v jedné injekci. Dle našich výsledků jsou potkani kmene Wistar více náchylní k rozvoji jaterního selhání vyvolaného podáním TAA než potkani kmene Lewis. Naše zjištění poskytují spolehlivý metodický základ pro další experimenty zaměřené na studium patofyziologie AJS a na vývoj nových terapeutických postupů v léčbě jaterního selhání.

### **3.2 Transplantace hepatocytů zmírňuje průběh akutního jaterního selhání způsobeného podáním TAA u potkanů kmene Lewis**

Hlavními znaky projevujícími se u pacientů s AJS jsou koagulopatie a hepatická encefalopatie, které vznikají následkem ztráty schopnosti hepatocytů syntetizovat koagulační faktory a eliminovat  $\text{NH}_3$ . Léčba AJS zůstává podpůrná, hledání nových přístupů představuje v současné medicíně stále velkou výzvu (Bernal and Wendon, 2013, Lee, 2013, Lee et al., 2012, Saliba and Saumel 2013). Navzdory pokrokům v této oblasti i unikátní regenerační schopnosti jaterních buněk je pouze u 45 % pacientů s AJS patrné spontánní zotavení (Bernal and Wendon, 2013, Lee, 2012, Lee et al., 2013, Saliba and Saumel, 2013). Pro zbylých 55 % pacientů je jediným řešením bezodkladná ortotopická transplantace jater. Nevýhodou ovšem je nedostatek dárcovských orgánů, zejména pak těch, které jsou dostupné ve velmi krátkém časovém období. K dalším problémům patří například invazivní způsob transplantace jater u vážně nemocných pacientů a vysoké náklady (Berg et al., 2011, Bernal and Wendon, 2013, Germani et al., 2012, Yamashiki et al., 2012). Kromě toho je podle existujících prognostických kritérií téměř nemožné předpovědět, kdo se zotaví z AJS bez potřeby transplantace jater sám a kdo tento stav nepřežije (Berg et al., 2011, Bernal and Wendon, 2013, Mao et al., 2014, Włodzimirow et al., 2012, Zhao et al., 2013). Proto je důležité vyvíjet nové techniky, které umožní přežití pacientů do doby, než bude možné provést transplantaci nebo než játra obnoví svoji funkci. Mezi takové techniky patří arteficiální a bioarteficiální jaterní podpory, které se testují více než tři desetiletí (Banares, Booth, Fukumitsu, Pless, Sgroi, Struecker). Jejich účinnost však není dostatečná. Z dosavadních studií vyplývá, že arteficiální prostředky neumožňují uspokojivě nahradit různorodé jaterní funkce a stále nemáme k dispozici takové metody, které by dokázaly podpořit složitý proces jaterní regenerace (Banares et al., 2013, Booth et al., 2012, Fukumitsu et al., 2011, Pless, 2010, Sgroi et al., 2009, Struecker et al., 2014). Musíme ovšem zdůraznit, že AJS je opravdu vzácné onemocnění postihující pouze malou část pacientů. Zatím nejsou k dispozici dostatečně velké studie na pacientech (Banares et al., 2013, Struecker et al., 2014).

Vezmeme-li v úvahu všechna tato fakta, představuje vývoj transplantace (Tx) hepatocytů jeden z nových terapeutických postupů v léčbě AJS (Hughes et al., 2012, Pareja et al., 2014, Sgroi et al., 2009) a to i přesto, že první terapeutické pokusy nebyly úspěšné (Dhawn et al., 2010, Hughes et al., 2012, Pareja et al., 2014, Tritto et al., 2012, Yu et al., 2012). Je tedy potřeba další rozsáhlé preklinické testování (Amano et al., 2011,

Eguchi et al., 1997, Wertheim et al., 2012). Zásadním bodem výzkumu je jednoznačná identifikace a sledování životaschopnosti transplantovaných hepatocytů u příjemce během celé studie. V tomto ohledu je velmi přínosný nedávný vývoj transgenního kmene potkanů „firefly luciferase rat“ – luc-Lew-Tg. Tento kmen byl odvozen od kmene potkanů Lewis, je specifický tím, že exprimuje ubikvitin gen pro luciferázu získaný ze světlušek *Photinus pyralis*. Díky tomu lze prokázat transplantované buňky *in vivo* pomocí bioluminiscenčních zobrazovacích technik (Hakamata et al., 2006), takže je možné opakovaně vyšetřovat stejného příjemce během celé doby trvání studie bez nutnosti usmrcení (Hakamata et al., 2006, Kasahara et al., 2013, Maeda et al., 2013). Dále bylo prokázáno, že imunologická reakce nebo imunosupresivní léčba značně ovlivňují funkci transplantovaných buněk (Kawahara et al., 2010, Loukopoulos et al., 2014, Wu et al., 2010). Díky transgenním „firefly“ potkanům, kteří byli vyvinuti na pozadí inbredního kmene potkanů (Lewis), je možné provádět studie s transplantovanými hepatocyty bez nutnosti posttransplantační imunosuprese (Hakamata et al., 2006, Kasahara et al., 2013, Maeda et al., 2013). Důležitá byla také naše předchozí studie (Koblihová et al., 2014), ve které jsme vyvinuli a charakterizovali vysoce opakovatelný model AJS způsobeného podáním TAA u potkanů kmene Lewis. Tento model považujeme za ideální, zejména pro vývoj nových terapeutických postupů v léčbě AJS.

S ohledem na všechny výše uvedené poznatky jsme se rozhodli zjistit, zda by Tx hepatocytů cestou *vena portae* do jater mohla zmírnit průběh AJS způsobeného podáním TAA u potkanů kmene Lewis. Abychom pronikli hlouběji do procesu přežívání transplantovaných hepatocytů, provedli jsme *in vivo* bioluminiscenční zobrazovací (BLI) analýzu těchto buněk jak u zdravých Lewis potkanů, tak u těch s jaterním selháním.

### 3.2.1 Metodika

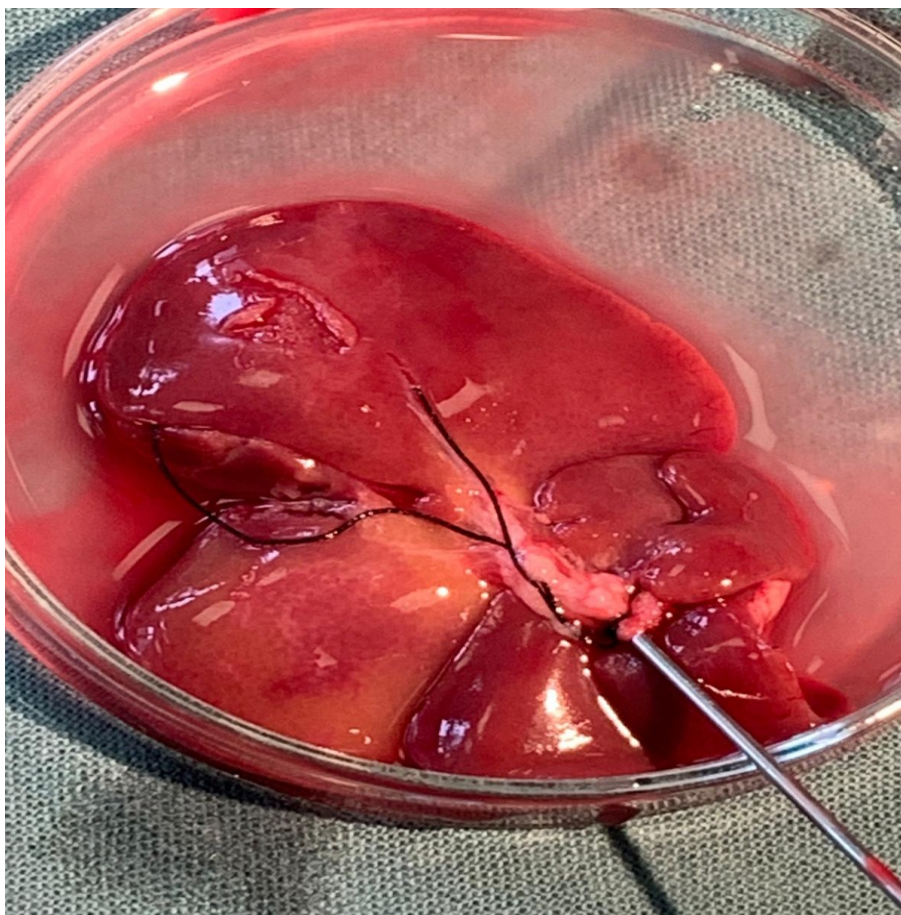
#### **Etický přístup, zvířata, chemikálie, izolace a transplantace hepatocytů**

Všechny experimenty byly provedeny v souladu s platnými směrnici IKEM Praha, které jsou ve shodě s Evropskou dohodou o ochraně zvířat. Všechna zvířata použitá v naší studii byla umístěna ve zvěřinci s akreditací České asociace péče o laboratorní zvířata. Použili jsme samce kmene Lewis, kteří byli zakoupeni ve společnosti Velaz, s.r.o. Praha, ve věku 9 týdnů. Transgenní „firefly“ potkani kmene Lewis byly pořízeny jako chovné páry z Division of Organ Replacement Research, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical School, Tochigi, Japonsko. Vývoj

a charakteristiky inbredního transgenního kmene potkanů luc-Lew-Tg jsou popsány v původní studii Hakamaty a kol. (2006). Před začátkem experimentu byla všechna zvířata aklimatizována v našem viváriu po dobu dvou týdnů, při 12hodinovém světelném režimu, krmena normoslanou normoproteinovou dietou (0,45 % NaCl, 19-21 % proteinu, SEMED Praha) a měla volný přístup k vodě.

Thioacetamid (Sigma, Praha) byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku a v odpovídajících dávkách podán i.p. Čerstvě připravený TAA byl injikován ve dvou stejných dávkách, v den 0 v 8:00 a ve 20:00 hodin, v celkovém množství 525 mg/kg živé hmotnosti. Toto množství bylo zvoleno na základě naší předchozí studie hledající optimální dávku TAA vedoucí k indukci AJS; ukázalo se, že toto množství vede k rozvoji AJS u všech potkanů kmene Lewis a bez léčby zvířata umírají během prvních 48 hodin (Koblihová et al., 2014). Kontrolní zvířata dostala pouze fyziologický roztok, i.p.

Hepatocyty jsme izolovali z jater samců transgenního kmene luc-Lew-Tg o hmotnosti 250–280 gramů, při celkové anestézii (thiopental sodný, 50 mg/kg), abdominální incizí. Pro jejich izolaci jsme použili dvoufázovou kolagenázovou perfuzní metodu (Berry et al., 1991, Garnol et al., 2014, Seglen et al., 1976), jak je ukázáno na obr. 6 a 7. Viabilita izolovaných hepatocytů byla stanovena testem s trypanovou modří (Berry et al., 1991, Garnol et al., 2014, Seglen et al., 1976) a v našich experimentech se pohybovala mezi 93 a 95 %. Izolované hepatocyty z luc-Lew-Tg v množství  $2 \times 10^6$  buněk rozpuštěných v 600  $\mu$ l fyziologického roztoku byly implantovány portální žilou do jater příjemce. Na tomto místě je důležité zmínit, že množství transplantovaných hepatocytů použité v naší studii bylo stanoveno na základě předchozích studií, které úspěšně využily transplantaci hepatocytů jako prostředek při léčbě metabolických defektů na bázi jater (Filippi and Dhawn, 2014). Optimální počet transplantovaných buněk byl vypočítán na  $5 \times 10^6$  buněk/kg tělesné hmotnosti, což představuje přibližně 5 % buněčné hmoty jaterního parenchymu. Bylo prokázáno, že toto množství je dostatečné k obnově jaterních funkcí při metabolických poruchách na bázi jater (Filippi and Dhawn, 2014). V souladu s tímto poznatkem a s ohledem na tělesnou hmotnost zvířat jsme transplantovali právě výše zmíněné množství buněk, tj.  $2 \times 10^6$  hepatocytů. Stejně množství využily také další týmy zabývající se metabolickými poruchami jater a léčbou AJS (Amano et al., 2014, Fukumitsu et al., 2011, Jitraruch et al., 2014, Loukopoulos et al., 2014, Puppi et al., 2014). Neléčená zvířata (bez Tx hepatocytů) dostala pouze 600  $\mu$ l fyziologického roztoku.



**Obr. 6:** Promývání explantovaných jater roztokem obsahujícím kolagenázu. (Zdroj: archiv autorky)



**Obr. 7:** Získaná suspenze hepatocytů, přefiltrovaná přes čtyři vrstvy gázy. (Zdroj: archiv autorky)

### 3.2.2 Uspořádání experimentu

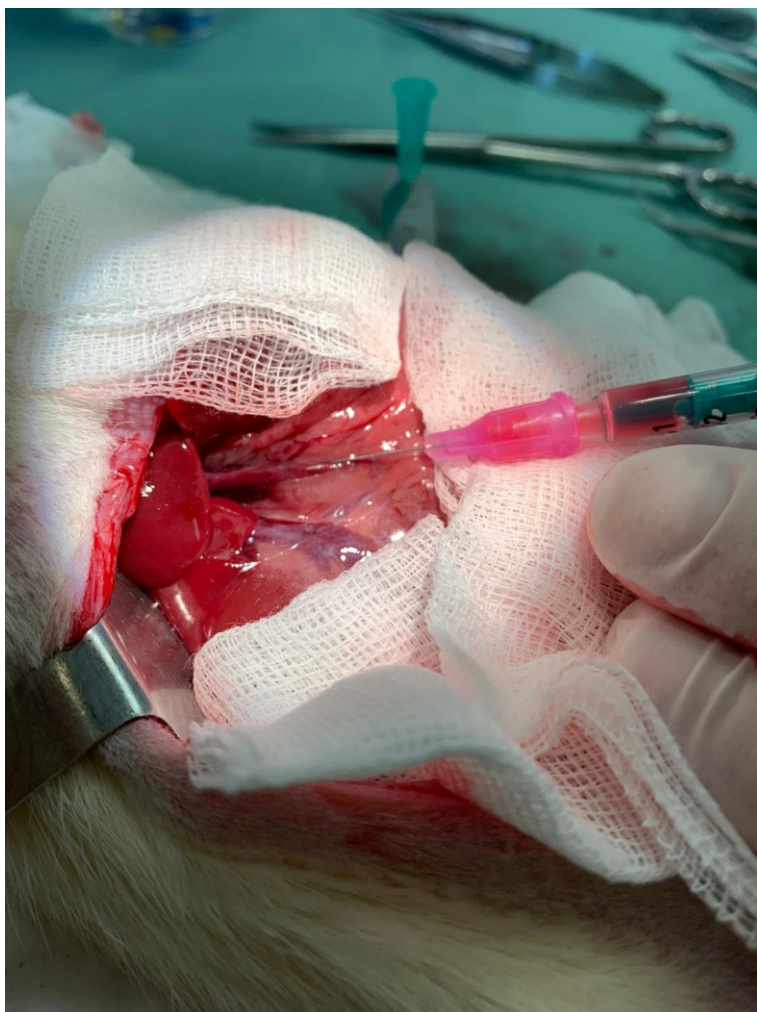
#### **Série 1: Vliv Tx hepatocytů na průběh AJS způsobeného podáním TAA u samců kmene Lewis**

24 hodin před i. p. podáním TAA („-24 h“) byly odebrány vzorky krve (přibližně 200 až 300  $\mu$ l) z ocasní žíly pro biochemické analýzy (Fuji Drive-Chem 4000 Analyser). Stanovovali jsme plazmatické koncentrace albuminu a bilirubinu, aktivity jaterních enzymů ALT a AST a hladiny  $\text{NH}_3$ . Vzorky krve, pro tyto analýzy, byly odebírány v intervalech 24, 48, 72, 96 a 168 hodin po prvním podání TAA. Sledovací perioda této série byla 168 hodin, na konci experimentu byla přeživší zvířata usmrcena předávkováním pentobarbitalem. Jelikož během rozvoje AJS dochází u zvířat k dramatickému snížení příjmu potravy i vody, aplikovali jsme jim každé ráno podkožně 5% roztok glukózy (2 ml/100 g tělesné hmotnosti) jako prevenci dehydratace. Z naší předchozí studie vyplynulo, že právě toto je velmi efektivní podpůrný prostředek (Koblihová et al. 2014). 24 hodin po první aplikaci TAA byla provedena Tx hepatocytů cestou portální žíly (obr. 8). Každých 8 hodin jsme kontrolovali přežívání zvířat a navíc, každých 24 hodin jsme zvířata vážili a odebírali vzorky krve.

Byly použity následující experimentální skupiny (iniciální  $n=20$  zvířat v každé skupině):

1. Lewis + fyziologický roztok + transplantace hepatocytů (Lewis + Tx hepatocytů)
2. Lewis + TAA + fyziologický roztok (Lewis neléčení s AJS)
3. Lewis + TAA + transplantace hepatocytů (Lewis + AJS + Tx hepatocytů)





**Obr. 8:** Podání suspenze hepatocytů do *vena portae*. (Zdroj: archiv autorky)

## **Série 2: Stanovení životaschopnosti hepatocytů po Tx pomocí BLI analýzy**

BLI analýzu transplantovaných buněk izolovaných z kmene luc-Lew-Tg popsali a validovali Hakamata et al. (2006), Kasahara et al. (2013) a Maeda et al. (2013), metoda je považovaná za spolehlivou. Proto jsme tuto techniku použili i v našich experimentech. Transplantované hepatocyty z luc-Lew-Tg jsme pozorovali *in vivo* pomocí přístroje IVIS XR (Caliper, Hopkinton, MA, USA), obr. 9. Potkani byli anestetizováni 2% isofluranem a do femorální žíly jim byl podán D-Luciferin (30 mg/ml; Caliper, Hopkinton, MA, USA) v dávce 50 mg/kg živé hmotnosti. Intenzita signálu byla kvantifikována jako tok fotonů v čase a ve vybrané oblasti (v jednotkách fotony/s/cm<sup>2</sup>), pomocí Living Image software. BLI analýzu jsme prováděli v časech 24, 48, 72, 96 a 168 hodin po Tx hepatocytů. Vyšetřili jsme následující experimentální skupiny (n=8 v každé skupině):

1. Lewis + Tx hepatocytů
2. Lewis s AJS + Tx hepatocytů

Zde musíme zdůraznit, že zvířata použitá v této sérii byla odlišná od těch v sérii 1.



**Obr. 9:** Přístroj IVIS XR (Caliper, Hopkinton, MA, USA). (Zdroj: archiv autorky)

### 3.2.3 Statistické zhodnocení

Statistická analýza dat byla provedena pomocí programu Graph-Pad Prism (Graph Pad Software, San Diego, California, USA). Pro vyhodnocení změn uvnitř skupin byla použita ANOVA pro opakovaná měření a Student-Newman-Keuls test. K porovnání dalších výsledků byl použit Studentův t-test nebo jednocestná ANOVA. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr $\pm$ SEM, pokud není označeno jinak. Za statisticky významné byly považovány hodnoty, které překročily 95% hranici pravděpodobnosti ( $p < 0,05$  %).

### 3.2.4 Výsledky

#### **Série 1: Vliv Tx hepatocytů na průběh AJS způsobeného podáním TAA u samců kmene Lewis**

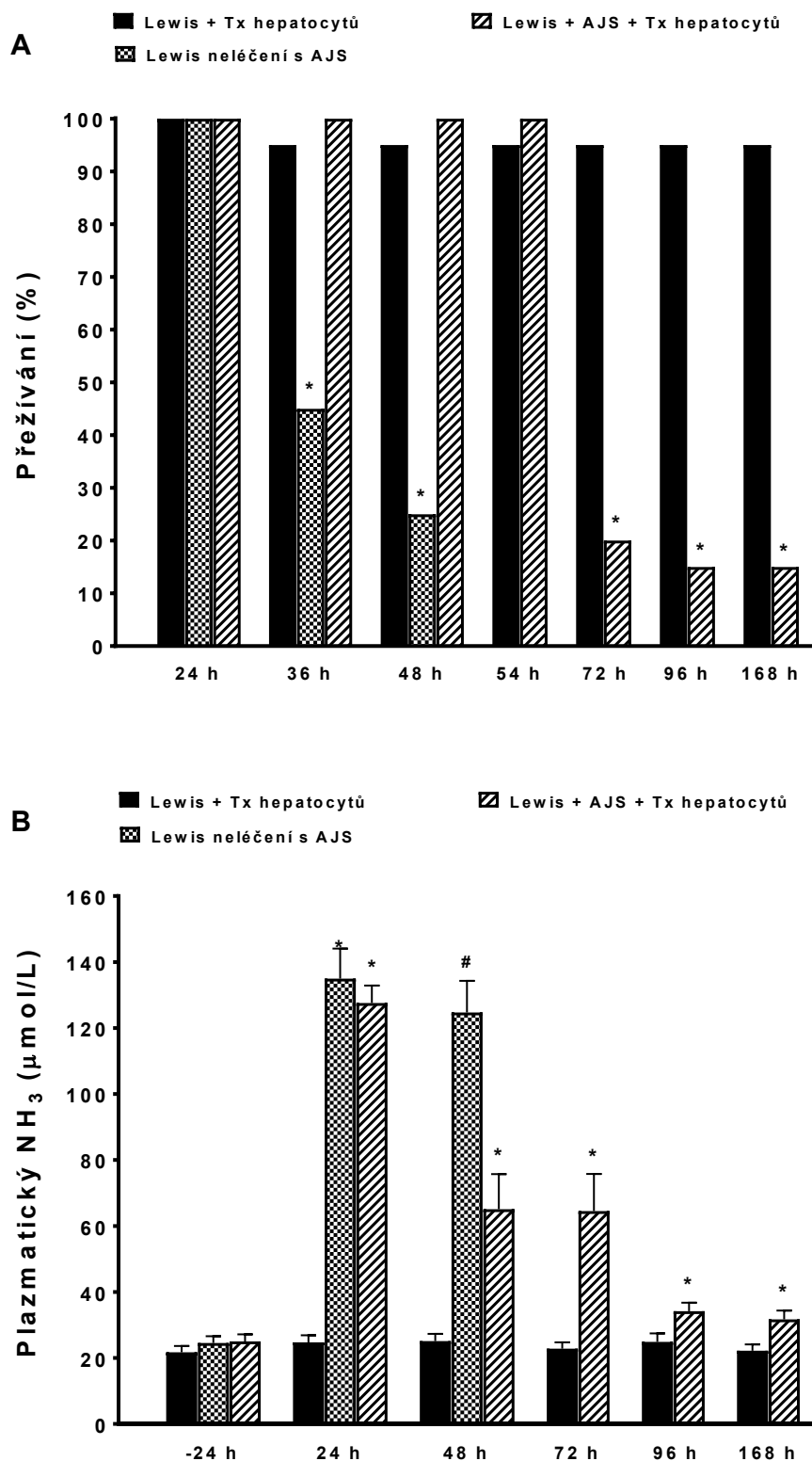
Jak ukazuje graf 7A, podání TAA u skupiny neléčených potkanů kmene Lewis výrazně snížilo přežívání, 48 hodin po podání TAA přežilo pouze 25 % zvířat, žádné zvíře se nedožilo 54 hodin. Transplantace hepatocytů výrazně zvýšila přežívání po aplikaci TAA, všechna zvířata se dožila 54 hodin po podání TAA, po 72 hodinách od podání TAA došlo k velkému poklesu přeživších a konce pokusu se dožilo 15 % zvířat. Jeden zdravý potkan Lewis uhynul během 12 hodin po Tx hepatocytů.

Graf 7B ukazuje plazmatické hladiny  $\text{NH}_3$ . Po 24 hodinách od podání TAA je patrný výrazný nárůst koncentrací  $\text{NH}_3$ . Transplantace hepatocytů vedla u potkanů s AJS k signifikantnímu poklesu koncentrace  $\text{NH}_3$  již v prvních 24 hodinách. U léčených zvířat s AJS, která se dožila konce experimentu (168 hodin po podání TAA), jsme pozorovali pouze mírně vyšší plazmatické koncentrace  $\text{NH}_3$  ve srovnání se zdravými potkany, bez AJS ( $34,2 \pm 2,6$  vs.  $24,9 \pm 2,3$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $p < 0,05$ ).

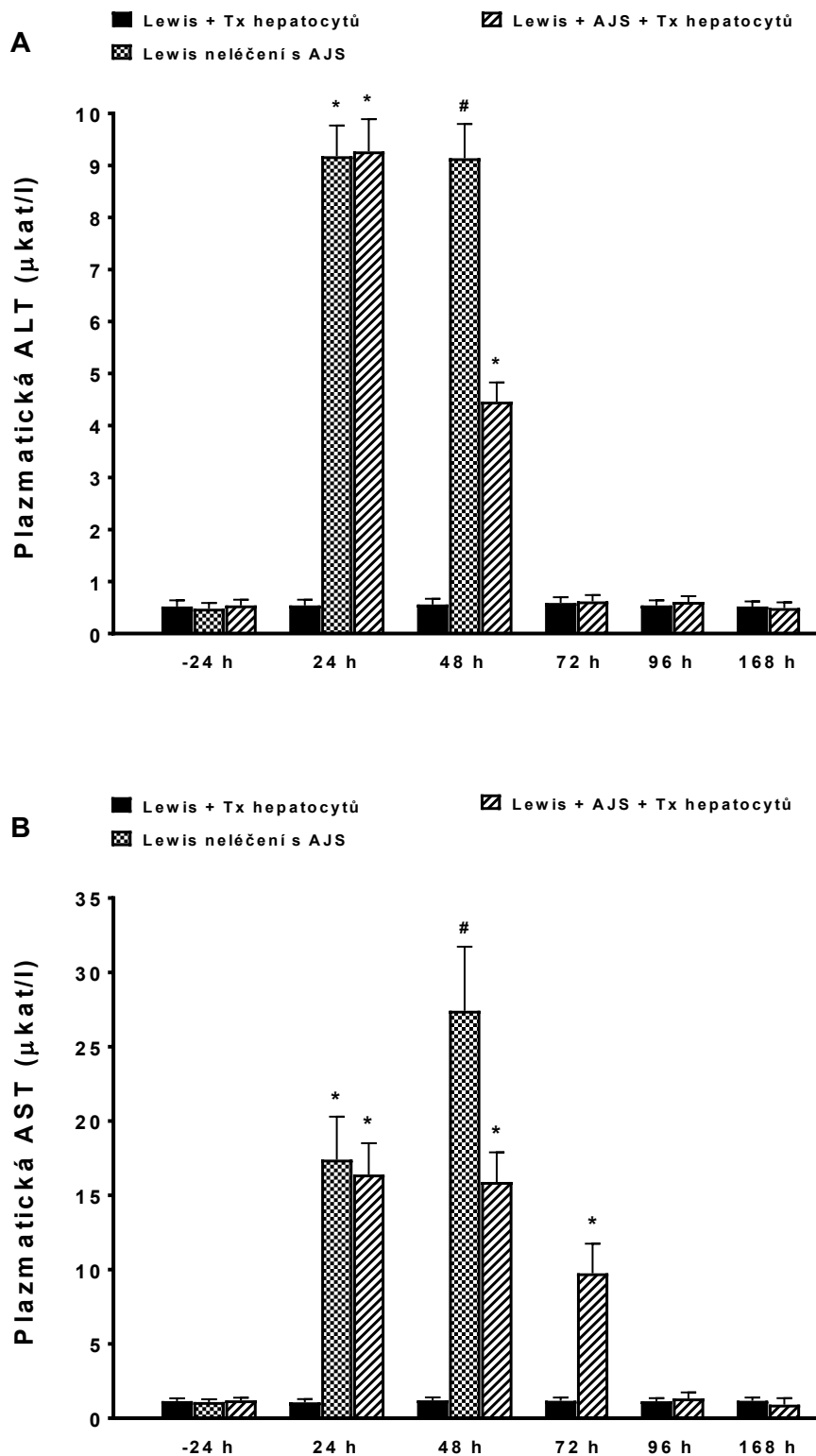
Z grafů 8A a 8B je patrné, že po podání TAA došlo k signifikantnímu zvýšení plazmatické aktivity ALT a AST. Transplantace hepatocytů tento nárůst signifikantně snížila již během prvních 24 hodin. Od 96. hodiny po podání TAA až do konce experimentu nebyly patrné žádné signifikantní rozdíly v aktivitě ALT a AST u potkanů po Tx hepatocytů bez AJS a s AJS.

Podání TAA vyvolalo signifikantní zvýšení plazmatických koncentrací bilirubinu (graf 9A), Tx hepatocytů tento vzestup zmírnila, podobně jako u AST a ALT. Již za 72 hodin po podání TAA jsme nezaznamenali žádné signifikantní rozdíly v plazmatických koncentracích bilirubinu u potkanů po Tx hepatocytů bez AJS a s AJS.

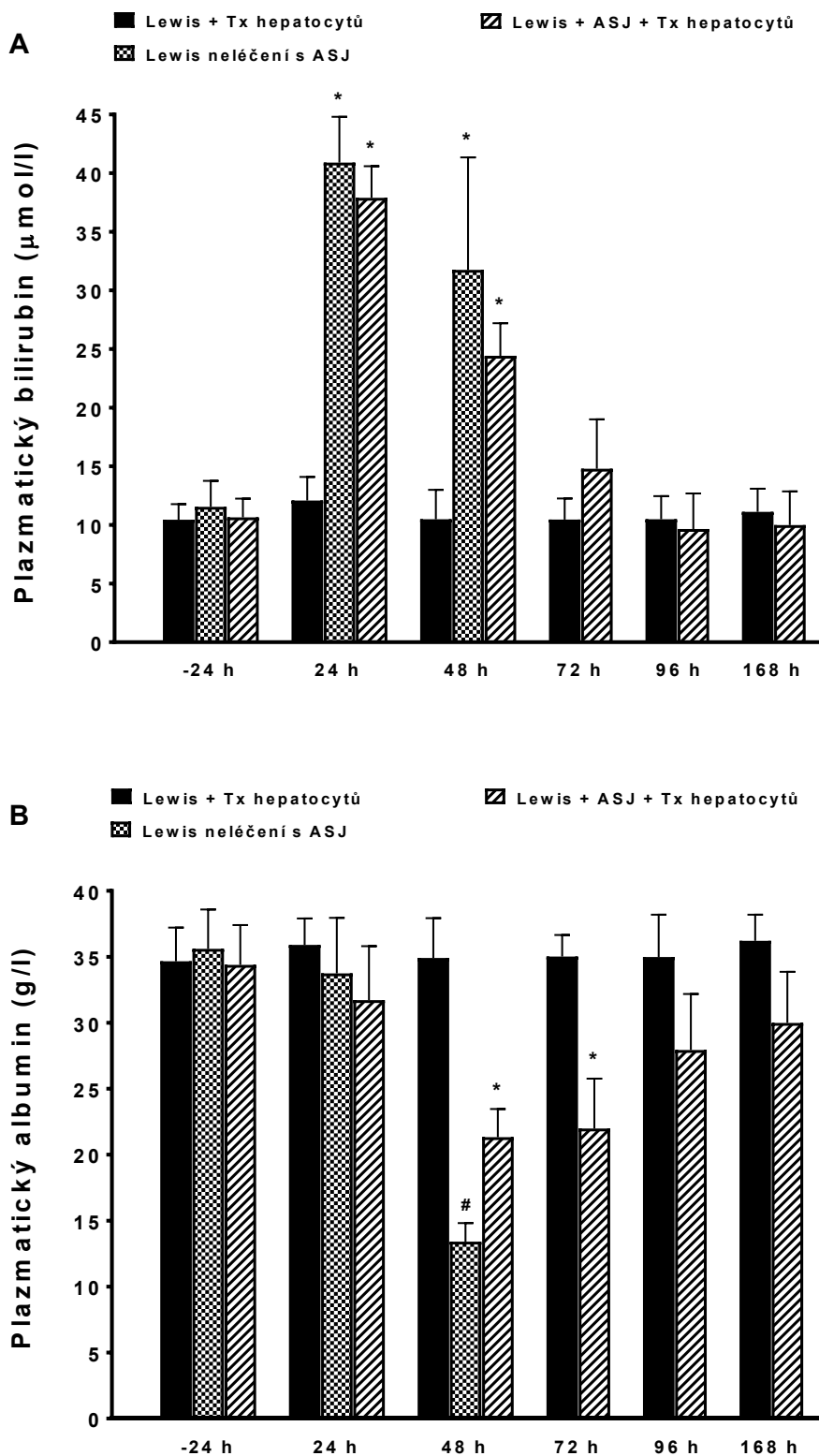
Plazmatické koncentrace albuminu jsou znázorněny v grafu 9B. Podání TAA vyvolalo postupný pokles koncentrací albuminu s minimem patrným 48 hodin po podání TAA ( $13,4 \pm 1,4$  vs.  $34,9 \pm 2,9$  g/l u zdravých zvířat,  $p < 0,05$ ). Transplantace hepatocytů signifikantně zmírnila pokles koncentrací plazmatického albuminu a od 96 hodin po podání TAA nebyly tyto hodnoty signifikantně odlišné od zdravých zvířat.



**Graf 7:** Procento přežívání (**A**) a plazmatická koncentrace NH<sub>3</sub> (**B**) u zdravých potkanů kmene Lewis po transplantaci hepatocytů (Lewis + Tx hepatocytů), u potkanů kmene Lewis s AJS bez léčby (Lewis neléčení s AJS) a u potkanů kmene Lewis s AJS léčených Tx hepatocytů (Lewis + AJS + Tx hepatocytů); \*p < 0,05 vs. Lewis + Tx hepatocytů ve stejném časovém bodě; #p < 0,05 vs. všech ostatních hodnot ve stejném časovém bodě



**Graf 8:** Změny v plazmatické aktivitě ALT (**A**) a AST (**B**) u zdravých potkanů kmene Lewis po transplantaci hepatocytů (Lewis + Tx hepatocytů), u potkanů kmene Lewis s AJS bez léčby (Lewis neléčení s AJS) a u potkanů kmene Lewis s AJS léčených Tx hepatocytů (Lewis + AJS + Tx hepatocytů); \* $p < 0,05$  vs. Lewis + Tx hepatocytů ve stejném časovém bodě; # $p < 0,05$  vs. všech ostatních hodnot ve stejném časovém bodě

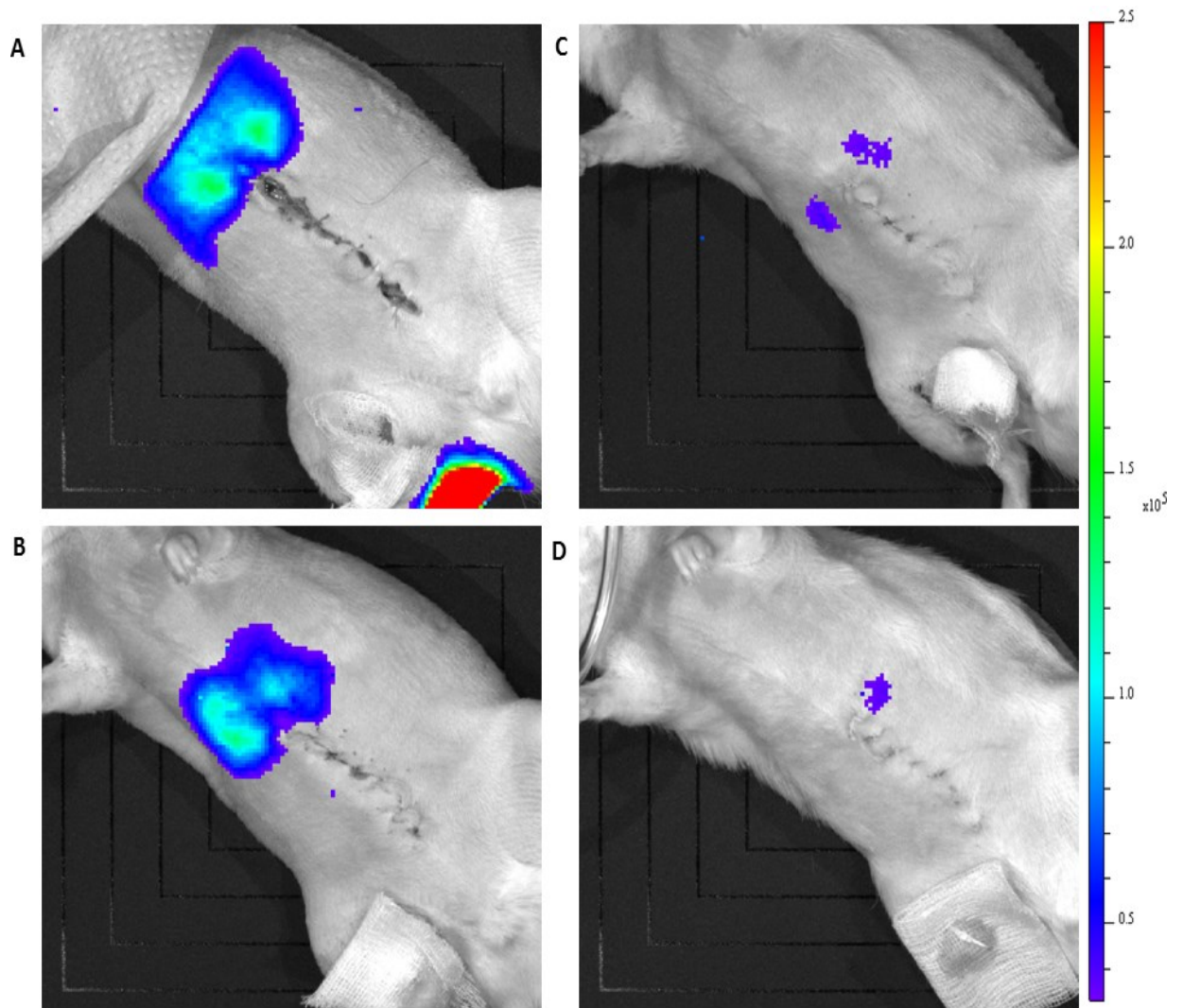


**Graf 9:** Změny v plazmatické koncentraci bilirubinu (A) a albuminu (B) u zdravých potkanů kmene Lewis po transplantaci hepatocytů (Lewis + Tx hepatocytů), u potkanů kmene Lewis s AJS bez léčby (Lewis neléčení s AJS) a u potkanů kmene Lewis s AJS léčených Tx hepatocytů (Lewis + AJS + Tx hepatocytů); \* $p < 0,05$  vs. Lewis + Tx hepatocytů ve stejném časovém bodě; # $p < 0,05$  vs. všech ostatních hodnot ve stejném časovém bodě

## **Série 2: Stanovení životaschopnosti hepatocytů pomocí BLI analýzy po jejich transplantaci**

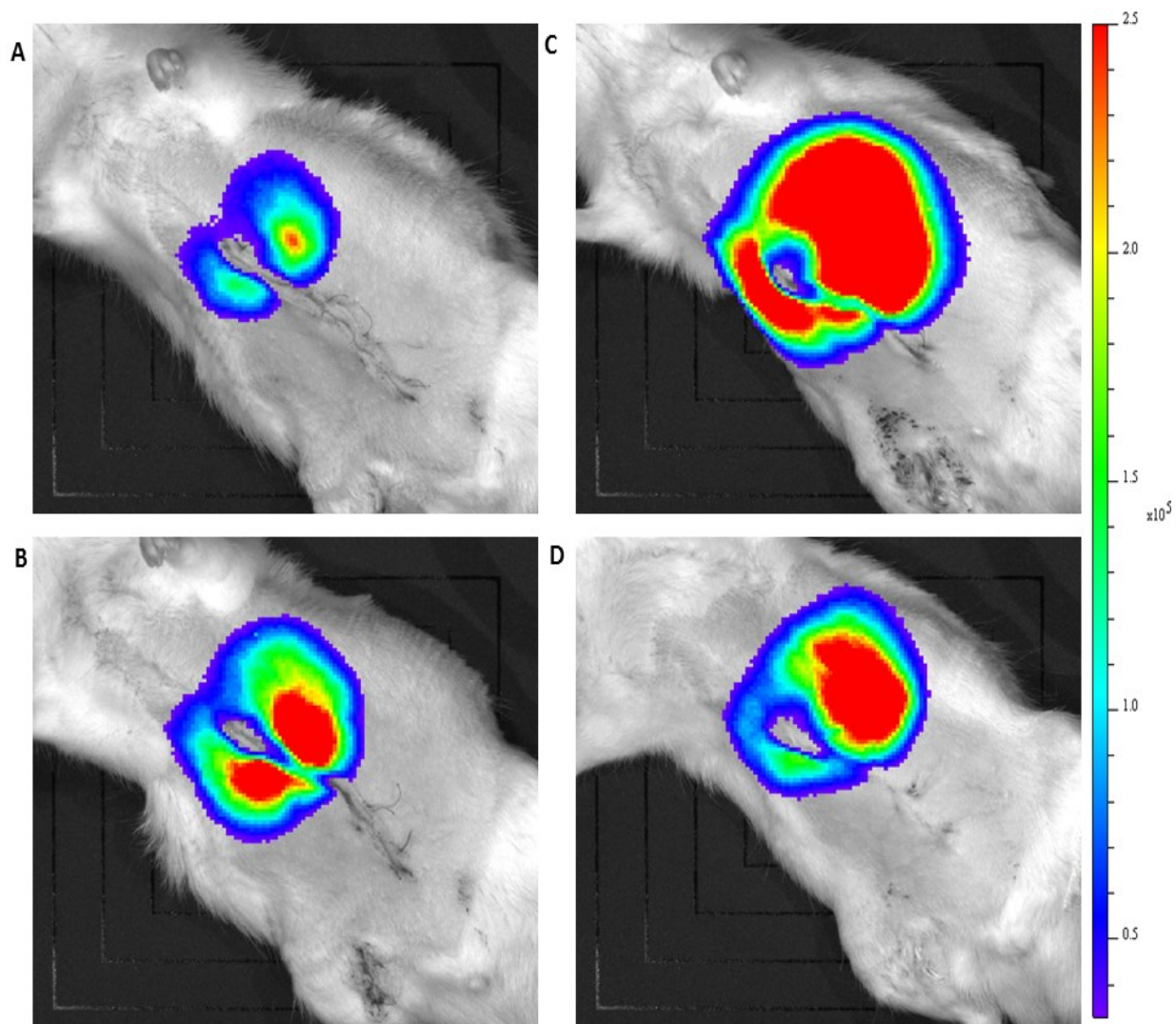
BLI analýza ukázala, že hepatocyty transplantované do jater zdravých Lewis potkanů vykazovaly pouze minimální životaschopnost od počátku experimentu a 72 hodin po Tx hepatocytů již nebyly patrné žádné známky přežívání (obr. 10).

Jinak tomu bylo u potkanů s AJS. Životaschopnost hepatocytů transplantovaných do jater Lewis potkanů s AJS byla 24 hodin po zákroku již dobře potvrditelná (obr. 11A), intenzita signálu dále rostla, a to jak 48 hodin, tak i 72 hodin po Tx (obr. 11B a 11C). Signál odpovídající životaschopným hepatocytům byl detekovatelný až do konce experimentu, tj. 168 hodin po Tx hepatocytů (obr. 11D).



**Obr. 10:** Reprezentativní snímky z *in vitro* BLI analýzy u zdravých potkanů kmene Lewis po Tx hepatocytů v intervalech 24 (A), 48 (B), 72 (C) a 168 (D) hodin po zákroku





**Obr. 11:** Reprezentativní snímky z *in vitro* BLI analýzy u potkanů kmene Lewis s AJS léčených Tx hepatocytů v intervalech 24 (A), 48 (B), 72 (C) a 168 (D) hodin po zákroku

### 3.2.5 Diskuze

Hlavním objevem vyplývajícím z této části naší studie je fakt, že Tx hepatocytů izolovaných z jater potkanů luc-Lew-Tg potkanům kmene Lewis významně zmírnila průběh AJS způsobeného podáním TAA. To se projevilo lepším přežíváním zvířat a zmenšením rozsahu jaterního poškození, což ukazují hodnoty plazmatického ALT, AST, NH<sub>3</sub> a bilirubinu. Je důležité se zde zmínit o plazmatické koncentraci bilirubinu – ikdyž hlavní část tohoto endogenního organického aniontu vzniká v játrech, ze zaniklých červených krvinek, je jeho plazmatická koncentrace stále považována za „zlatý standard“ v hodnocení jaterních funkcí, zejména pak při jaterním poškození způsobeným toxickými látkami (Poynard and Imbert-Bismut, 2012). Dalším naším zjištěním bylo, že Tx hepatocytů obnovila nejen detoxikační, ale i biosyntetické funkce jater: plazmatické koncentrace albuminu se u zvířat přeživších AJS nakonec vrátily na hodnoty, které se signifikantně nelišily od zdravých zvířat. BLI analýza jaterní tkáně jasně ukázala, že v játrech poškozených po podání TAA byly transplantované hepatocyty plně životaschopné v průběhu celého experimentu. Z naší studie je tedy zřejmé, že Tx hepatocytů cestou *vena portae* do jater může zmírnit průběh AJS způsobeného podáním TAA u potkanů kmene Lewis.

Design experimentů byl navržen tak, aby napodobil klinickou situaci: hepatocyty byly transplantovány až poté, co se objevily první příznaky AJS. Toto je velmi důležité, neboť v některých předchozích studiích byly hepatocyty transplantovány ještě před indukcí AJS, převedení takových výsledků do praxe je pak diskutabilní (Amano et al., 2011, Hughes et al., 2012, Sgroi et al., 2009, Struecker et al., 2014). Kromě toho se náš experimentální model velmi podobá tomu klinickému (Butterworth et al., 2009, Ternblache and Hickman, 1991, Tunon et al., 2009). Již dříve jsme dokázali (Koblihová et al., 2014), že akutní jaterní selhání způsobené TAA představuje optimální model, který splňuje většinu požadovaných kritérií (Butterworth et al., 2009, Rahman and Hodgson, 2000).

V tomto ohledu se také musíme zmínit o arteficiálních a bioarteficiálních podpůrných systémech. Jejich cílem je nahradit jaterní funkce do doby, než se buď spontánně obnoví, nebo než se najde vhodný dárcce k transplantaci. Pokusy o jejich vytvoření zatím nepřinesly uspokojivé výsledky (Struecker et al., 2014, Stutchfield et al., 2011). Podle některých metaanalýz (Kjaergard et al., 2003, Struecker et al., 2014) nejsou tyto podpory příliš přínosné u pacientů s AJS. Ačkoliv jsou podpůrné systémy pro akutní

aplikace účinné a bezpečné a mohou zlepšit biochemické markery (Pražák et al., 2013, Ryska et al., 2009, Ryska et al., 2012, Struecker et al., 2014, Stutchfield et al., 2011), zásadně nezlepšují přežívání pacientů s AJS (Pless, 2010, Struecker et al., 2014, Stutchfield et al., 2011). Za hlavní příčinu AJS se původně považovalo selhání jejich detoxikační funkce, a proto se také podpůrné jaterní systémy zaměřovaly na její náhradu. Tato představa se ovšem ukázala chybná (Banares et al., 2013, Selden and Hodgson, 2004). Běžně používané systémy zatím nedokážou plně nahradit rozmanitost a komplexnost jaterních funkcí: detoxikace je mnohem složitější proces, než jen jednoduché odstranění na albumin vázaných toxinů a regulace homeostázy představuje víc než jen normalizaci plazmatických koncentrací elektrolytů, vodíkových iontů a glukózy (Suchý, 2009). Proto se stále hledají jiné možnosti, které by pomohly nahradit narušené jaterní funkce. Transplantace hepatocytů se jeví jako jeden z velmi slibných terapeutických postupů (Pless, 2010).

Zatím byla Tx hepatocytů zkoušena při léčbě vrozených metabolických poruch jater, zejména pak těch, které jsou způsobeny nedostatkem jednoho jaterního enzymu či proteinu (např. Crigler-Najjar syndrom I. typu, Wilsonova nemoc, poruchy cyklu ury). Těmto pacientům byly transplantovány hepatocyty se správnými geny i funkcemi. Aplikace byly relativně úspěšné, minimálně jako překlenovací metoda do doby transplantace (Dhawan et al., 2010, Filippi and Dhawan, 2014, Yu et al., 2012, Waelzlein et al., 2009). Naproti tomu, klinické studie zabývající se Tx hepatocytů u pacientů s AJS přinášejí neuspokojivé výsledky. Předpokládá se, že množství transplantovaných hepatocytů může být dostačující pro nápravu jedné vrozené metabolické poruchy, ale jaterní funkce plně nenahradí (Struecker et al., 2014). Naše naměřená data však ukazují, že Tx hepatocytů v množství, které odpovídá 5 % buněčné hmoty jaterního parenchymu, je dostačující pro zmírnění průběhu AJS vyvolaného podáním TAA u potkanů kmene Lewis. Je nutné zdůraznit, že počet transplantovaných hepatocytů byl v této naší studii navýšen v souladu s předchozími studiemi využívajícími Tx hepatocytů pro léčbu metabolických jaterních onemocnění na počet  $2 \times 10^6$  buněk (Filippi and Dhawan, 2014). Přesné zdůvodnění tohoto počtu transplantovaných hepatocytů je popsáno v kapitole „3.2.1 Metodika“. Dle našich zjištění by Tx hepatocytů mohla být použita jako terapeutická metoda pomáhající překlenout dobu k transplantaci či jaterní regeneraci.

Druhý důležitý poznatek vyplývající z této naší studie se týká BLI analýzy: hepatocyty transplantované do jater potkanů kmene Lewis s AJS vyvolaným podáním

TAA (ne však do jater zdravých zvířat) vykazovaly zřetelnou životaschopnost během celého experimentu, což naznačuje, že tato technika je použitelná a zdá se věrohodná. To je velmi důležité, protože přímá aplikace do jater byla dříve zpochybnována právě z důvodů malé bezpečnosti. Proto byla testována i alternativní cílová místa pro Tx hepatocytů jako např. slezina či peritoneální dutina (Struecker et al., 2014, Waelzlein et al., 2009). Podle některých autorů je Tx hepatocytů do těchto míst bezpečná a vcelku efektivní, ale nepodporuje regeneraci poškozené jaterní tkáně (Struecker et al., 2014, Wertheim et al., 2012, Waelzlein et al., 2009). Zajímavé je také naše zjištění, že hepatocyty transplantované do jater zdravých Lewis potkanů vykazovaly po Tx jen minimální viabilitu a o 72 hodin později již nebyly viabilní. Toto zjištění je podobné nově zkoušenému postupu jaterní podpory, postupu recelularizace decelularizovaných jater. Studie ukazují, že k udržení metabolické aktivity masy hepatocytů mimo jejich původní prostředí je nezbytné nejprve odstranit všechny původní buňky a další antigenní materiál z jater a získat tak neimunogenní extracelulární matrix (decelularizační krok). Pouze pak může být matrix znovu osídlena buňkami a po jejich maturaci mohou být „neo-játra“ použita jako bioreaktor (recelularizační krok) (Arenas-Herrera et al., 2013, Struecker et al., 2014, Yagi et al., 2013). K zachování životaschopnosti transplantovaných hepatocytů je tedy potřeba, aby byl z jater příjemce nejprve odstraněn veškerý buněčný a antigenní materiál a následně lze játra osídlit zdravými buňkami. Jsme si vědomi toho, že naše studie nebyla navržena tak, aby posoudila obdobný postup, a tak interpretace naší BLI analýzy zůstává jen hypotetická. Je zapotřebí dalších experimentů, které by pomohly vysvětlit mechanismy zodpovědné za rozdílnou životaschopnost transplantovaných hepatocytů u zdravých a nemocných (s AJS) potkanů kmene Lewis. Ještě musíme zdůraznit, že BLI analýza byla provedena u jiných skupin, než u kterých byl zkoumán vliv Tx hepatocytů na průběh TAA indukovaného AJS. Separátní skupiny pro jednotlivé série byly použity z důvodu opakované anestézie 2 % isofluranem při BLI analýze, která by mohla negativně ovlivnit hlavní sledovaný výstup (tj. vliv Tx hepatocytů na přežívání při TAA indukovaném AJS). Je důležité uznat, že navzdory výraznému zmírnění průběhu TAA indukovaného AJS díky Tx hepatocytů se konce pokusu dožilo pouze 15 % zvířat. Tento fakt nedokážeme uspokojivě vysvětlit, protože nemáme všechna potřebná data, např. data o životaschopnosti Tx hepatocytů od zvířat, která uhynula během prvních 72 hodin. K objasnění bude potřeba dalších studií zabývajících se tímto tématem.

V této souvislosti bychom rádi zopakovali, proč jsme použili experimentální model TAA indukovaného AJS u potkanů. V naší předchozí studii jsme jednoznačně

prokázali, že tento model splňuje kritéria, která byla nastavena pro ideální zvířecí model AJS (Terblanche and Hickman, 1991), tedy:

- Reverzibilita – indukované jaterní selhání by mělo být potenciálně reverzibilní
- Opakovatelnost – stupeň jaterního poškození by měl být standardizován, zejména s ohledem na smrt zvířat
- Příčina smrti – smrt by měla nastat přímým důsledkem jaterního poškození
- Terapeutické okno – měl by být dostatečný čas mezi jaterním selháním a smrtí
- Minimální riziko pro personál – manipulace s poškozujícím toxinem by neměla být riziková

Jsme si vědomi toho, že se výsledky našich studií týkají pouze jednoho modelu AJS, a to TAA indukovaného AJS. Nicméně Tx hepatocytů byla úspěšně použita v léčbě i jiných chemických modelů AJS, např. D-Gal indukované AJS (Puppi et al., 2014). Věříme, že výsledky našich studií budou aplikovatelné i u jiných modelů AJS, a právě takové experimenty jsou v budoucnu zapotřebí.

## 4. Závěr

Jako model akutního jaterního selhání jsme zvolili chemickou variantu s i.p. podáním látky TAA. Zkoumali jsme vliv dávky TAA v rozmezí od 175 do 700 mg/kg živé hmotnosti za den na rozvoj AJS u laboratorních potkanů. Stanovovali jsme přežívání zvířat, koncentraci plazmatického albuminu, aktivity jaterních enzymů ALT a AST, hladiny bilirubinu a  $\text{NH}_3$  v navazujících časových bodech. Kromě toho nás zajímalo, zda se průběh AJS liší mezi potkany kmene Wistar a Lewis v závislosti na podání různých dávek TAA. Došli jsme k závěru, že potkani kmene Wistar jsou náchylnější na rozvoj AJS vyvolaného podáním TAA ve srovnání s potkany kmene Lewis.

V další části naší práce jsme se věnovali léčbě AJS pomocí Tx hepatocytů. TAA jsme aplikovali tentokrát ve dvou stejných injekcích v celkové dávce 525 mg/kg tělesné hmotnosti. Tato dávka vede k rozvoji AJS u všech potkanů kmene Lewis, bez léčby zvířata umírají během prvních 48 hodin. Hepatocyty jsme izolovali z jater samců transgenního kmene potkanů luc-Lew-Tg. Množství  $2 \times 10^6$  buněk v 600  $\mu\text{l}$  fyziologického roztoku jsme implantovali portální žilou do jater příjemce. Transplantované hepatocyty jsme zobrazovali *in vivo* pomocí přístroje IVIS XR. Transplantace hepatocytů izolovaných z luc-Lew-Tg vedla u potkanů kmene Lewis k významnému zmírnění průběh AJS vyvolaného podáním TAA. To se projevilo lepším přežíváním zvířat a snížením rozsahu jaterního poškození, což ukazují hodnoty plazmatického ALT, AST,  $\text{NH}_3$  a bilirubinu. Přítomnost funkčních transgenních buněk byla detekována v časovém odstupu více než dvou měsíců po Tx hepatocytů.

Výsledky naší práce ukazují, že Tx hepatocytů do jater příjemce může zmírnit průběh TAA indukovaného AJS u potkanů kmene Lewis. Tento závěr by měl být brán v úvahu při vývoji nových terapeutických postupů v léčbě AJS.

## 5. Seznam vlastních publikací

### **Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace s IF**

1. Koblihová E, Lukšan O, Mrázová I, Ryska M, Červenka L. Hepatocyte transplantation attenuates the course of acute liver failure induced by thioacetamide in Lewis rats. *Physiol Res.* 2015; 64(5): 689-700. IF 1.643
2. Koblihová E, Mrázová I, Vernerová Z, Ryska M. Acute liver failure induced by thioacetamide: selection of optimal dosage in Wistar and Lewis rats. *Physiol Res.* 2014; 63(4): 491-503. IF 1.293

### **Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace bez IF**

1. Koblihová E, Ryska M: Transplantace hepatocytů-současný stav. *Bull HPB*, 2005; 13: 3-4

### **Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace s IF**

1. Koblihová E, Mrázová I, Vaňourková Z, Maxová H, Kikerlová S, Husková Z, Ryska M, Froněk J, Vernerová Z. Pharmacological stimulation of Wnt/beta-catenin signaling pathway attenuates the course of thioacetamide-induced acute liver failure. *Physiological Research.* 2020, 19; 69(1): 113-126. IF 1.701
2. Holub M, Bartáková E, Stráníková A, Koblihová E, Arientová S, Blahutová M, Máca J, Ryska M. Calprotectin and Calgranulin C as Biomarkers of Pancreatic Tumors: Baseline Levels and Level Changes after Surgery. *Mediators of Inflammation*, vol. 2019, Article ID 6985703, 11 pages, 2019. IF 3.545
3. Laszikova E, Prazak J, Ryska O, Koblihova E, Tyll T, Ryska M. Fractionated plasmatic separation and adsorption does not alter haemodynamic parameters in experimental acute liver failure. *Neuro Endocrinol Lett.* 2014; 35(4): 280-4. IF 0.799
4. Prazak J, Laszikova E, Pantoflicek T, Ryska O, Koblihova E, Ryska M. Cerebral microdialysis reflects the neuroprotective effect of fractionated plasma separation and adsorption in acute liver failure better and earlier than intracranial pressure: a controlled study in pigs. *BMC Gastroenterol.* 2013, 8; 13: 98. IF 2.212
5. Ryska O, Pantoflicek T, Laszikova E, Prazak J, Koblihova E, Ryska M. Artificial liver support system reduces intracranial pressure more effectively than

bioartificial system: an experimental study. *Int J Artif Organs*. 2012; 35(7): 503-10. IF 1,759

6. Pantoflicek T, Koblihova E, Ryska M. S-adenosylmethionine does not reduce ischaemia-reperfusion injury to a marginal liver graft in an in vivo experiment. *Hepatogastroenterology*. 2012; 59(113): 216-8. IF 0.774

**Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace bez IF**

1. Kasalický M, Koblihová E, Pažin J. SADIS Single anastomosis duodeno-ileal bypass with sleeve gastrectomy as a second step after sleeve gastrectomy. *Rozhl Chir*. 2019; 98(2): 52-57.
2. Kasalický M, Koblihová E, Pažin J. Populární sleeve gastrectomy-tubulizace žaludku v chirurgické léčbě těžké obezity a cukrovky 2. Typu. *Gastroenterologie a hepatologie*, 2018, 72,2,158-163
3. Hána L, Kasalický M, Koblihová E, Suchánek Š, Horažďovský P, Ryska M. Urgentní chirurgické řešení volvulu žaludku při "upside-down stomach syndrome". *Rozhledy v chirurgii*, 2015, vol. 94, s. 531-534.
4. Kasalický M, Koblihová E. Surgery of the hiatal hernia and gastroesophageal reflux disease, Nissen or Toupet? *Rozhl Chir*. 2015; 94(12): 510-5.
5. Koblihová E. 17th colours of Sepsis, Ostrava. *Rozhl Chir*. 2015; 94(4): 177-8.



## 6. Seznam literary

1. **Amano H**, Hino H, Tateno C, Emoto K, Imaoka Y, Yamasaki C, Itamoto T, Tashiro H, Asahara T, Ohda H, Yoshizato K: Therapeutical potential of propagated hepatocyte transplantation in liver failure. *J Surg Res* 167: e29-e37, 2011.
2. **Anbarasu C**, Rajkooor B, Bhat KS, Giridharan J, Arul Amuthan A, Satish K: Protective effect of *Pisonia aculeate* on thioacetamide induced hepatotoxicity in rats. *Asian Pac J Trop Biomed* 2: 511-515, 2012.
3. **Arenas-Herrera JE**, Ko IK, Atala A, Yoo JJ: Decellularization for whole organ bioengineering. *Biomed Mater* 8(1): 014106, 2013.
4. **Bañares R**, Catalina MV, Vaquero J: Liver support systems: will they reach prime time? *Curr Gastroenterol Rep* 15: 312-319, 2013.
5. **Basile AS**, Pannell LP, Jaouni T, Gammal SH, Fales HM, Jones EA, Skolnick P: Brain concentrations of benzodiazepines are elevated in an animal model of hepatic encephalopathy. *Proc Natl Acad Sci* 87: 5263-5267, 1990.
6. **Baudouin SV**, Howdle P, O'Grady JG, Webster NR: Acute lung injury in fulminant hepatic failure following paracetamol poisoning. *Thorax* 50: 399-402, 1995.
7. **Bautista M**, Del Rio Mag, Benedí J, Sánchez-Reus MI, Morales-González JA, Téllez-López AM, López-Orozco M: Effect of dichloromethylene diphosphonate on liver regeneration following thioacetamide-induced necrosis in rats. *World J Hepatol* 27: 379-386, 2013.
8. **Berg CL**, Merion RM, Shearon TH, Olthoff KM, Brown JR. RS, Baker TB, Everson GT, Hong JC, Terrault N, Hayashi PH, Fisher RA, Everhart JE: Liver transplant recipient survival benefit with living donation in the model for end-stage liver disease allocation era. *Hepatology* 54: 1313-1321, 2011.
9. **Bernal W**, Wendon J: Acute liver failure. *N Engl J Med* 369: 2525-2534, 2013.
10. **Berry BM**, Friend DS: High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *J. Cell Biol.*, 1969, 43: 506-520.
11. **Bidani AK**, Polichnowski AJ, Loutzenhiser R, Griffin KA: Renal microvascular dysfunction, hypertension and CKD progression. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 22: 1-9, 2013.
12. **Bonavita AG**, Quaresma K, Cotta-De-Almeida V, Pinto Ma, Saraiva Rm, Alves LA: Hepatocyte xenotransplantation for treating liver disease. *Xenotransplantation* 17: 181-187, 2010.

13. **Booth C**, Soker T, Baptista P, Ross Cl, Soker S, Farooq U, Stratta Rj, Orlando G: Liver bioengineering: current status and future perspectives. *World J Gastroenterol* 18: 6926-6934, 2012.
14. **Boron WF**, Boulpaep EL: *Medical physiology*. Third edition. Philadelphia, PA: Elsevier, 2017. ISBN 0323319734.
15. **Boyer TD**, Manns MP, Sanyal A, Zakim D: *Zakim and Boyer's Hepatology: a textbook of liver disease*. 6th edition. China Elsevier, 2012. ISBN 978-1-477-0881-3.
16. **Boudjema K**, Bachellier P, Wolf P *et al.*: Auxiliary Liver Transplantation and Bioartificial Bridging Procedures in Treatment of Acute Liver Failure. *World J Surg*. 26: 264–274, 2002.
17. **Boyer TD**, Wright T, Manns MP, Zakim D: *Zakim a Boyer's Hepatology*, 2006, 5'th edition, Philadelphia, Saunders Elsevier
18. **Butterworth RF**, Norenberg MD, Felipo V, Ferenci P, Albrecht J, Blei AT: Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver Int* 29: 783-788, 2009.
19. **Celik T**, Uzbay IT, Cinar K, Bozkaya H, Uzunalimoglu O, Yurdaydm C: Combination treatment of hepatic encephalopathy due to thioacetamide-induced fulminant hepatic failure in the rat with benzodiazepine and opioid receptor antagonists. *J Hepatol* 31: 880-886, 1999.
20. **Čertíková Chábová V**, Vernerová Z, Kujal P, Husková Z, Škaroupková P, Tesař V, Kramer HJ, Kompanovska-Jeziarska E, Walkowska A, Sadowski J, Červenka L, Vaněčková I: Addition of ETA receptor blockade increases renoprotection provided by renin-angiotensin system blockade in 5/6 nephrectomized Ren-2 transgenic rats. *Life Sci* 24; 118(2): 297-305, 2014.
21. **Damjanov I**. *Pathophysiology*. 1st ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier, c2009. ISBN 978-1-4160-0229-1.
22. **Eguchi S**, Lilja H, Hewitt WR, Middleton Y, Demetriou AA, Rozga J: Loss and recovery of liver regeneration in rats with fulminant hepatic failure. *J Surg Res* 72: 112-122, 1997.
23. **Eguia L**, Materson BJ: Acetaminophen-related acute renal failure without fulminant liver failure. *Pharmacotherapy* 17: 363-370, 1997.
24. **Ehrmann J**, Hůlek P (eds.): *Hepatologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-3118-6.

25. **Farjam M**, Dehdab P, Abbassnia F, Mehrabani D, Tanideh N, Pakbaz S, Imanieh MH: Thioacetamide-induced acute hepatic encephalopathy in rat: behavioral, biochemical and histological changes. *Iran Red Crescent Med J* 14: 164-170, 2012.
26. **Fillippi C**, Dhawan A: Current status of human hepatocyte transplantation and its potential for Wilson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1315: 50-55, 2014.
27. **Fukumitsu K**, Yagi H, Soto-Gutierrez A: Bioengineering in organ transplantation: targeting the liver. *Transplant Proc* 43: 2137-2138, 2011.
28. **Garnol T**, Endlicher R, Kučera O, Drahota Z, Červinková Z: Impairment of mitochondrial function of rat hepatocytes by high fat and oxidative stress. *Phys Res* 63: 271-274, 2014.
29. **Germani G**, Theocharidou E, Adam R, Karam V, Wndon J, O'Grady J, Burra P, Senzolo M, Mirza D, Castaing D, Klempnauer J, Pollard S, Paul A, Belghiti J, Tsochatzidis E, Burroughs AK: Liver transplantation for acute liver failure in Europe: outcomes over 20 years from the ELTR database. *J Hepatol* 57: 288-296, 2012.
30. **Gupta S**, Lee Ch, Vemuru RP, Bhargava K: Indium labeling of hepatocytes for analysis of short-term biodistribution of transplanted cells. *Hematology* 19(3): 750-7, 1994.
31. **Guyton AC**, Hall JE: Textbook of medical physiology. 10th ed. Philadelphia: Saunders, c2000. ISBN 0-7216-8677-X.
32. **Hall JE**: Guyton and Hall textbook of medical physiology. 13th edition. Philadelphia, PA: Elsevier, 2015. ISBN 978-1-4557-7005-2.
33. **Hakamata Y**, Murakami T, Kobayashi E: "Firefly rats" as an organ/cellular source for long-term in vivo bioluminescent imaging. *Transplantation* 81: 1179-1184, 2006.
34. **Hubner G**: Ultrastructural liver damage caused by direct action of carbon tetrachloride in vivo and in vitro. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 339: 187-197, 1965.
35. **Hughes RD**, Mitry RR, Dhawan A: Current status of hepatocyte transplantation. *Transplantation* 93: 342-347, 2012.
36. **Chadipiralla K**, Reddanna P, Chinta RM, Reddy PVB: Thioacetamide-induced fulminant hepatic failure induces cerebral mitochondrial dysfunction by altering the electron transport chain complexes. *Neurochem Res* 37: 59-68, 2012.
37. **Ishak K**, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, Macsween RNM, Phillips MJ, Portamnn BG, Poulsen H, Scheuer PJ, Schmid

- M, Thaler H: Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 22: 696-699, 1995.
38. **Jaeschke H**, Williams CD, McGill MR, Xie Y, Ramachandran A: Models of drug-induced liver injury for evaluation of phytotherapeutics and other natural products. *Food Chem Toxicol* 55: 279-289, 2013.
  39. **Kasahara N**, Kikuchi T, Doi J, Teratani T, Fujimoto Y, Yasuda Y, Kobayashi E: Luminescence-based assay to screen preservation solutions for optimal ability to maintain viability of rat intestinal grafts. *Transplant Proc* 45: 2486-2490, 2013.
  40. **Kawahara T**, Toso C, Douglas DN, Nourbakhsh M, Lewis JT, Tyrrell DL, Lund GA, Churchill TA, Kneteman NM: Factors affecting hepatocyte isolation, engraftment, and replication in an in vivo model. *Liver Transpl* 16: 974-982, 2010.
  41. **Kepler D**, Lesch R, Reutter W, Decker K: Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp Mol Pathol* 9: 279-290, 1968.
  42. **Kim HJ**, Larson JJ, Lim YS, Kim WR, Pedersen RA, Therneau TM, Rosen CB: Impact of MELD on Waitlist outcome of retransplant candidates. *Am J Transplant* 10: 2652-2657, 2010.
  43. **Kim WR**, Therneau TM, Benson JT, Kremers WK, Rosen CB, Gores GJ, Dickson ER: Deaths on the liver transplant waiting list: an analysis of competing risks. *Hepatology* 43: 345-351, 2006.
  44. **Kjaegard LL**, Liu J, Als-Nielsen B, Gluud C: Artificial and bioartificial support systems for acute and acute-on-chronic liver failure. *JAMA* 289: 217-222.2003.
  45. **Koblihova E**, Mrázová I, Vernerová Z, Ryska M: Acute liver failure induced by thioacetamide: selection of optimal dosage in Wistar and Lewis rats. *Phys Res* 63(4): 491-503, 2014.
  46. **Koen YM**, Sarma D, Hajovsky H, Galeva NA, Williams TD, Staudinger JL, Hanzlik RP: Protein targets of thioacetamide metabolites in rat hepatocytes. *Chem Res Toxicol* 26: 564-574, 2013.
  47. **Koeppen BM**, Stanton BA (eds.): *Berne & Levy physiology*. 6th edition, updated edition. Philadelphia, Pa.: Mosby, Elsevier, 2010. ISBN 978-0-323-07362-2.
  48. **Kujal P**, Čertíková Chábová V, Škaroupková P, Husková Z, Vernerová Z, Kramer HJ, Walkowska A, Kompanowska-Jeziarska E, Sadowski J, Kitada K, Nishiyama A, Hwang Sh, Hammock Bd, Imig Jd, Červenka L. Inhibition of soluble epoxide hydrolase is renoprotective in 5/6 nephrectomized Ren-2 transgenic hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 41(3): 227-37, 2014.

49. **Lancaster EM**, Hiatt JR, Zarrinpar A. Acetaminophen hepatotoxicity: an updated review. *Arch Toxicol.* 89(2): 193-9, 2015.
50. **Larson AM**: Acetaminophen hepatotoxicity. *Clin Liver Dis* 11: 525-548, 2007.
51. **Lata J**, Vaňásek T. *Kritické stavy v hepatologii*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2005. ISBN 80-247-0404-8.
52. **Lee WM**: Acute liver failure. *Semin Respir Crit Care Med* 33: 36-45, 2012.
53. **Lee WM**. Recent developments in acute liver failure. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 26(1): 3-16, 2012.
54. **Lee WM**, Stravitz RT, Larson AM: Introduction to the revised American association for the study of liver diseases position paper on acute liver failure 2011. *Hepatology* 55: 965-967, 2012.
55. **Leist M**, Gantner F, Kunstle G, Bohlinger I, Tiegs G, Bluethmann H, Wendel A: The 55-kD tumor necrosis factor receptor and CD95 independently signal murine hepatocyte apoptosis and subsequent liver failure. *Mol Med* 2: 109-124, 1996.
56. **Loukopoulos I**, Sfiniadakis I, Pillai A, Konstantoulakis M, Androulakis G, Bonatsos V, Zografos G, Paplois A: Mycophenolate mofetil and sirolimus in hepatocyte transplantation in an experimental model of toxic acute liver failure. *J Invest Surg* 27: 205-213, 2014.
57. **Maeda M**, Kasahara N, Doi J, Iijima Y, Kikuchi T, Teratani T, Kobayashi E: A luminance-based heart chip assay for assessing the efficacy of graft preservation solutions in heart transplantation in rats. *Heart Asia* 17: 7-14, 2013.
58. **Mao SA**, Glorioso JM, Nyberg SL: Liver regeneration. *Transl Res* 163: 352-362, 2014.
59. **Makin A**, Williams R. Acetaminophen-induced acute liver failure. In: *Acute Liver Failure*. First edition. Lee WM, Williams R. Cambridge, UK. Cambridge University Press 1997; 32-42.
60. **Mas A**. Mushrooms, amatoxins and the liver. *J Hepatol* 42: 166-169, 2005.
61. **Mehendale HM**: Tissue repair: an important determinant of final outcome of toxicant-induced injury. *Toxicol Pathol* 33: 41-51, 2005.
62. **Mito M**, Kusano M: Hepatocyte transplantation in man. *Cell Transplant* 2: 65-74, 1993.
63. **Muraca M** et al.: Intraportal hepatocyte transplantation in the pig: A hemodynamic and histopathological study. *Transplantation* 73(6): 890-6, 2002.

64. **Mustafa HN**, Awdan SAE, Hegazy GA: Protective role of antioxidants on thioacetamide-induced acute hepatic encephalopathy: biochemical and ultrastructural study. *Tissue Cell* 45: 350-362, 2013.
65. **Nagata H**, Ito M, Shirota Ch, Edge A, McCowan TC, Fox IJ: Route of Hepatocyte Delivery Affects Hepatocyte Engraftment in the Spleen. *Transplantation* 76(4): 732-4, 2003.
66. **Newsome PN**, Plevris JN, Nelson LJ, Hayes PC: Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation. *Liver Transpl* 6: 21-31, 2000.
67. **Nibourg GAA**, Chamuleau RAFM, van der Hoeven TV, Maas MAW, Ruiters AFC, LAMERS WH, Elferink RPJO, van Gulik TM, Hoekstra R: Liver progenitor cell line hepaRG differentiated in a bioartificial liver effectively supplies liver support to rats with acute liver failure. *PLoS ONE* 7: e38778, 2012.
68. **Nissar AU**, Farrukh MR, Kaiser PJ, Rafiq RA, Afnan Q, Bhushan S, Adil HS, Subhash BC, Tasdug SA: Effect of N-acetylcysteine, an organosulfur compound from Allium plants, on experimentally induced hepatic profibrogenic events in Wistar rat. *Phytomedicine* 20: 828-833, 2013.
69. **Ogawa K**, Borenstein J, Tanaka K, Vacanti JP: The generation of functionally differentiated, three-dimensional hepatic tissue from two-dimensional sheets of progenitor small hepatocytes and nonparenchymal cells. *Transplantation*, 77(12): 1783-9, 2004.
70. **Pantoflicek T**, Koblihova E, Ryska M: S-adenosylmethionine does not reduce ischemia-reperfusion injury to a marginal liver graft in an in vivo experiment. *Hepatology* 59: 216-218, 2012.
71. **Pareja E**, Corés M, Gómez-Lechón J, Maupoey J, Juan Fs, López R, Mir J: Current status and future perspectives of hepatocyte transplantation. *Cir Esp* 92: 74-81, 2014.
72. **Park GH**, Song GW, Moon DB, Lee SG. A review of current status of living donor liver transplantation. *Hepatobiliary Surg Nutr* 5(2): 107–117, 2016.
73. **Pawa S**, Ali S: Liver necrosis and fulminant hepatic failure in rats: protection by oxyanionic form of tungsten. *Biochim Biophys Acta* 1688: 210-222, 2004.
74. **Pless G**: Bioartificial liver support systems. *Methods Mol Biol* 640: 511-523, 2010.
75. **Prazak J**, Laszickova E, Pantoflicek T, Ryska O, Koblihova E, Ryska M: Cerebral microdialysis reflects the neuroprotective effect of fractional plasma separation and adsorption in acute liver failure better and earlier than intracranial pressure: a controlled study in pigs. *BMC Gastroenterol* 13: 98, 2013.

76. **Puppi J**, Modo M, Dhawan A, Lehec SC, Mitry RR, Hughes RD: Ex vivo magnetic resonance in a rat model of acute liver failure. *Cell Transplant* 23: 329-343, 2014.
77. **Rahman TM**, Diakanov I, Selden C, Hodgson H: Co-transplantation of encapsulated HepG2 and rat Sertoli cells improves outcome in a thioacetamide induced rat model of acute hepatic failure. *Transpl Int* 18: 1001-1009, 2005.
78. **Rahman TM**, Hodgson HJF: Animal models of acute hepatic failure. *Int J Exp Path* 81: 145-157, 2000.
79. **Ročeň M**, Kieslichová E, Merta D, Uchytlová E, Pavlová Y, Čáp J, Trunečka P: The effect of Prometheus device on laboratory markers of inflammation and tissue regeneration in acute liver failure management. *Transplant Proc* 42(9): 3606-11, 2010.
80. **Ryska M**, Kieslichová E, Pantoflíček T, Ryska O, Koblihová E, Tcherentsová E: Bioeliminace v léčbě akutního selhání jater v experimentu na velkém laboratorním zvířeti. *Čes Slov Gastroent Hepatol* 60: 157-162, 2006.
81. **Ryska M**, Lásziková E, Pantoflíček T, Kieslichová E, Ryska O, Pražák J, Koblihová E, Skibová J: Biologická a nebiologická eliminační léčba akutního selhání jater. Experimentální práce na velkém laboratorním zvířeti. *Čas Lék Čes* 147: 367–375, 2008.
82. **Ryska O**, Pantoflíček T, Lásziková E, Pražák J, Ryska M: Současný význam biologických a nebiologických eliminačních metod v léčbě akutního selhání jater. *Rozhl Chir* 87: 291-296, 2008.
83. **Ryska M**, Laszikova E, Pantoflicek T, Ryska O, Prazak J, Koblihova E: Fractionated plasma separation and adsorption significantly decreases intracranial pressure in acute liver failure: experimental study. *Eur Surg Res* 42: 230-235, 2009.
84. **Ryska O**, Pantoflicek T, Laszikova E, Prazak J, Koblihova E, Ryska M: Arterficial liver support system reduces intracranial pressure more effectively than bioarteficial system: an experimental study. *Int J Artl Organs* 35: 503-510, 2012.
85. **Saliba F**, Saumel D: Acute liver failure. *J Hepatol* 59: 6-9, 2013.
86. **Seglen PO**: Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13: 29-83, 1976.
87. **Selden C**, Hodgson H: Cellular therapies for liver replacement. *Transpl Immunol* 12: 273-288, 2004.
88. **Sgroi A**, Serre-Beinier V, Morel P, Buhler L: What clinical alternatives to whole liver transplantation? Current status of artificial devices and hepatocyte transplantation. *Transplantation* 87: 457-466, 2009.

89. **Shi Z**, Wakil Ae, Rockey DC: Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine response. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(20): 10663-8, 1997.
90. **Shrivastav M**, Rammohan A, Reddy MS, RelaM: Auxiliary partial orthotopic liver transplantation for acute liver failure. *Ann R Coll Surg Engl* 101: e71–e72, 2019.
91. **Schneider A**, Attaran M, Klaus FG, Bleck JS, Winkler M, Manns MP, Ott M: Intraportal Infusion of 99 m Technetium – Macroaggregated Albumin Particles and Hepatocytes in Rabbits: Assessment of Shunting and Portal Hemodynamics Changes. *Transplantation* 75(3): 296-302, 2003.
92. **Smržová J**, Lata J, Šimánek V, Ulrichová J.: Bioarteficiální játra – alternativa v léčbě akutního jaterního selhání. *Vnitřní lékařství* 4: 218-224, 2000.
93. **Smržová J**, Ulrichová J, Dítě P, Lata J: Transplantace hepatocytů-současný stav a výhledy do budoucna, *Vnitr Lek.* 47(11):790-6, 2001.
94. **Struecker B**, Raschozok N, Sauer IM: Liver support strategies: cutting-edge technologies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11: 166-176, 2014.
95. **Standlbauer V, Krisper P**, Aigner R, et al. Effect of extracorporeal of liver support by MARS and Prometheus on serum cytokines in acute-on. chronic liver failure. *Crit Care* 10(6): R169, 2006.
96. **Stutchfield BM**, Simpson K, Wigmore SJ: Systemic review and meta-analyses of survival following extracorporeal liver support. *Br J Surg* 98: 623-631, 2011.
97. **Suchy FJ**: Hepatobiliary function. In: *Medical Physiology*. Boron WF, Boulpaep et al (eds 2nd edition), Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, 2009, pp 980-1008.
98. **Taniguchi M**, Takeuchi T, Nakatsuka R, Watanabe T, Sato K: Molecular process in acute liver injury and regeneration induced by carbon tetrachloride. *Life Sci* 75: 1539-1549, 2004.
99. **Terblanche J**, Hickman R: Animals models of fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci* 36: 770-774, 1991.
100. **Tritto G**, Davies NA, Jalan R: Liver replacement therapy. *Semin Respir Crit Care Med* 33: 70-79, 2012.
101. **Tuñón MJ**, Alvarez M, Culebras JM, Gonzáles-Gallego J: An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutical strategies in acute hepatic failure. *World J Gastroenterol* 15: 3086-3098, 2009.
102. **Yagi H**, Fukumitsu K, Fukuda K, Kitago M, Shinoda M, Obara H, Itano O, Kawachi S, Tanabe M, Coudriet Gm, Piganelli Jd, Gilbert Tw, Soto-Gutierrez A,



- Kitagawa Y: Human-scale whole-organ bioengineering for liver transplantation: a regenerative medicine approach. *Cell Transplant* 22: 231-241, 2013.
103. **Yamashiki N**, Sugawara Y, Tamura S, Nakayama N, Oketani M, Umeshita K, Uemoto S, Mochida S, Tsubouchi H, Kokudo N: Outcomes after living donor liver transplantation for acute liver failure in Japan: results of a nationwide survey. *Liver Transpl* 18: 1069-1077, 2012.
104. **Yu Y**, Fischer JE, Lillegard JB, Rodysil B, Amiot B, Nyberg SL: Cell therapies for liver diseases. *Liver Transpl* 18: 9-21, 2012.
105. **Vaněčková I**, Kujal P, Husková Z, Vaňourková Z, Vernerová Z, Čertíková Chábová V, Škaroupková P, Kramer H, Tesař V, Červenka L: Effects of combined endothelin A receptor and renin-angiotensin system blockade on the course of end-organ damage in 5/6 nephrectomized Ren-2 hypertensive rats. *Kidney and Blood Press Res* 35: 382-392, 2012.
106. **Waelzlein JH**, Puppi J, Dhawan A: Hepatocyte transplantation for correction of inborn errors of metabolism. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18: 481-488, 2009.
107. **Weber LW**, Boll M, Stampfl A: Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol* 33: 105-136, 2003.
108. **Wertheim JA**, Baptista PM, Soto-Gutierrez A: Cellular therapy and bioartificial approaches to liver replacement. *Curr Opin Organ Transplant* 17: 235-240, 2012.
109. **Williams CD**, Bajt ML, Sharpe MR, McGILL MR, Farhood A, Jaeschke H: Neutrophil activation during acetaminophen hepatotoxicity and repair in mice and humans. *Toxicol Appl Pharmacol* 275(2): 122-33, 2014.
110. **Wlodzimirow KA**, Eslami S, Chamuleau RAFM, Nieuwoudt M, Abu-Hanna A: Prediction of poor outcome in patients with acute liver failure – systematic review of prediction models. *PLoS ONE* 7: e50592, 2012.
111. **Wu Z**, Han M, Chen T, Yan W, Ning Q: Acute liver failure: mechanisms of immune-mediated liver injury. *Liver Int* 30: 782-794, 2010.
112. **Zhao P**, Wang C, Liu W, Chen G, Liu X, Wang X, Wang B, Yu L, Sun Y, Liang X, Yang H, Zhang F: Causes and outcomes of acute liver failure in China. *PLoS One* 8: e80991, 2013.
113. **Zicha J**, Kunes J: Ontogenetic aspects of hypertension development: analyses in the rat. *Physiol Rev* 79: 1227-1282, 1999.

114. **Zicha J**, Dobešová Z, Vokurková M, Rauchová H, Hojná S, Kadlecová M, Behulika M, Vaněčková I, Kuneš J: Age-dependent salt hypertension in Dahl rats: fifty years of research. *Physiol Res* 61 (Suppl 1): S35-S87, 2012