

**Univerzita Karlova**  
**1. lékařská fakulta**  
Autoreferát disertační práce



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**1. lékařská fakulta**

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

## **Hepatocyte transplantation in acute liver failure in experiment**

MUDr. Eva Koblíhová

2022

***Vnitřní strana obálky:***

**Doktorské studijní programy v biomedicině**  
*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Zdeněk Krška, Dr.Sc.

Školící pracoviště: Chirurgická klinika 2.LF UK a ÚVN Praha

Školitel: prof. MUDr. Miroslav Ryska, CSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

## Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
1. Úvod.....	6
2. Hypotézy a cíle práce.....	6
3. Materiál, metodika a výsledky.....	7
3.1 Akutní jaterní selhání vyvolané thioacetamidem: nastavení vhodné dávky u potkanů kmene Wistar a Lewis .....	7
3.1.1 Úvod.....	7
3.1.2 Materiál a metodika.....	8
3.1.3 Výsledky .....	9
3.1.4 Diskuze.....	15
3.2 Transplantace hepatocytů zmírňuje průběh akutního jaterního selhání způsobeného podáním thioacetamidu u potkanů kmene Lewis .....	16
3.2.1 Úvod.....	16
3.2.2 Materiál a metodika.....	17
3.2.3 Výsledky .....	19
3.2.4 Diskuze.....	19
4. Závěr .....	24
5. Literatura.....	25
6. Seznam publikací.....	28

## Abstrakt

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 neinvasivního 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

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. 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).

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). Ve 14 % případů u dospělých se nepodaří odhalit příčinu AJS, u dětí až v 60 % případů.

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

Transplantace jater zůstává jedinou relativně spolehlivou a prokazatelně účinnou léčbou AJS. Hlavním problémem je nedostatek vhodných dárců orgánů a časová tíseň. Proto se hledají jiné alternativní metody, které pomohou překlenout dobu čekání na transplantaci či regeneraci jater.

## 2. Hypotézy a 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. Materiál, metodika a výsledky

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

##### 3.1.1 Úvod

Jedním z nejefektivnějších 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). Aby bylo možné zhodnotit léčebný význam těchto postupů, potřebujeme funkční studie na zvířecích modelech. S ohledem na různé faktory 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 potkani 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.

### **3.1.2 Materiál a metodika**

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 byla 96 hodin, 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. 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**

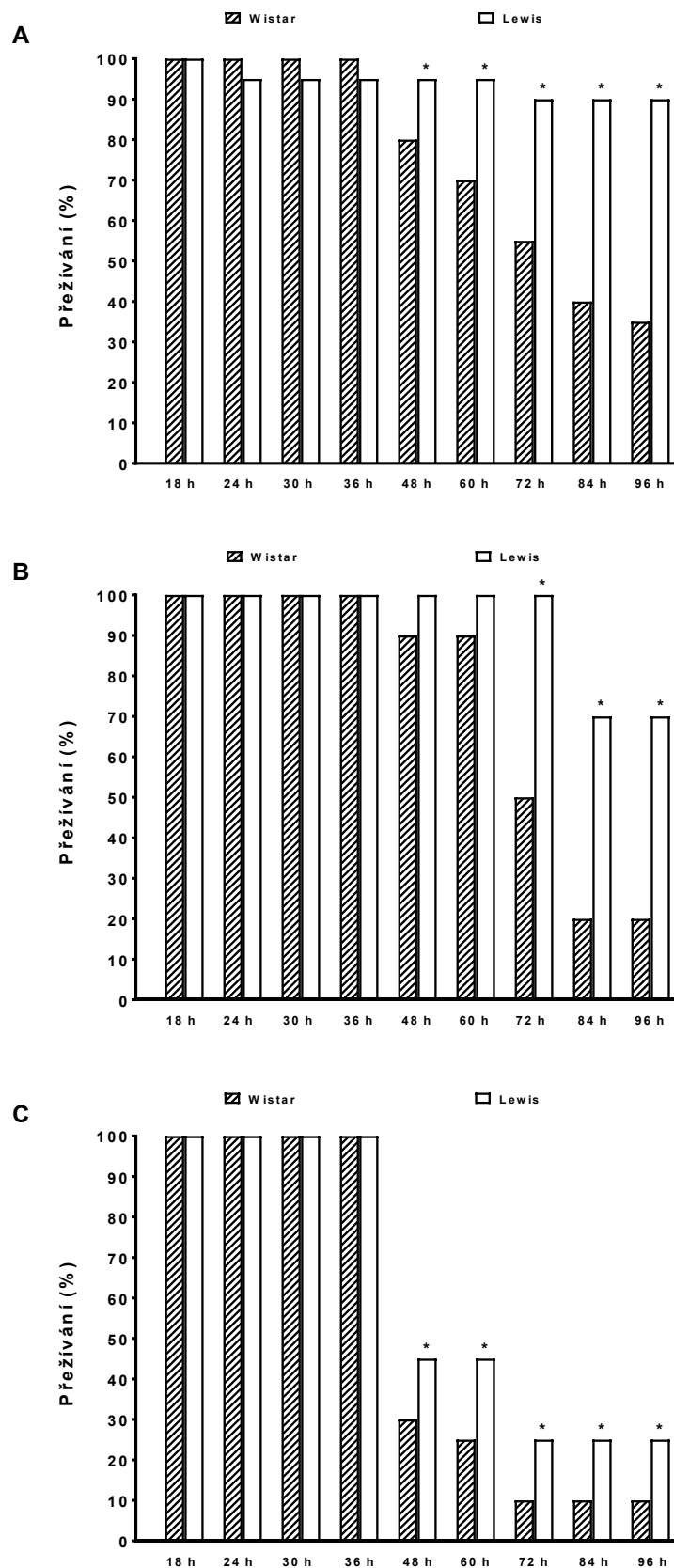
V této sérii byla zvířata usmrcena 24 hodin po podání TAA. Játra jsme vyjmuli, opláchli fyziologickým roztokem a umístili do 4 % formaldehydu. Histologické řezy byly obarveny hematoxylin-eosinem a Schiffovým barvením (PAS) a naslepo vyhodnoceny semikvantitativním histologickým skóre dle Ishaka et al. (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 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 ( $308 \pm 3$  vs.  $315 \pm 4$  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 ( $-25 \pm 3$  a  $-27 \pm 3$  vs.  $-14 \pm 2$  a  $-12 \pm 2$  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

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.

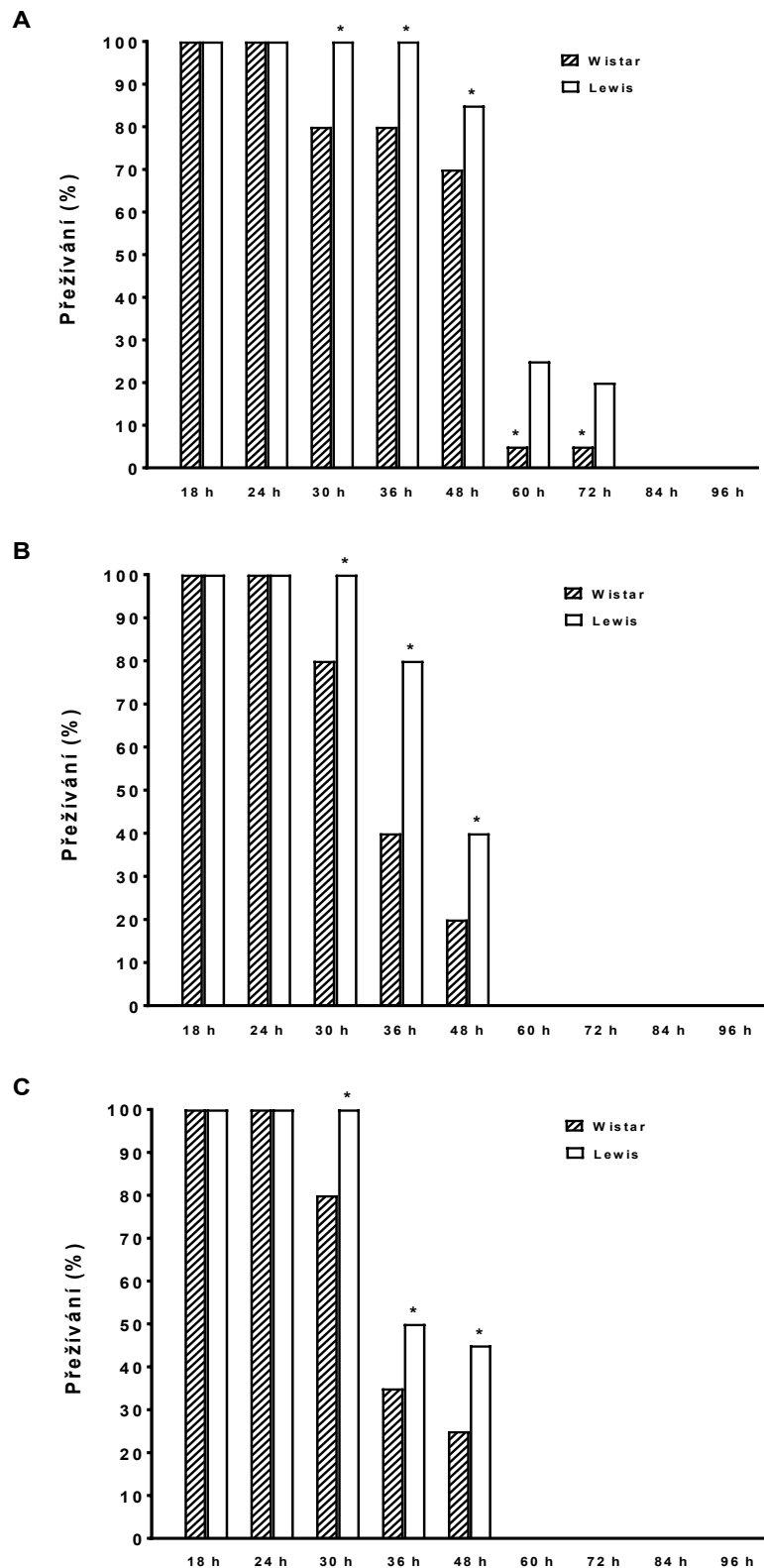
Výchozí hodnoty  $\text{NH}_3$  mezi kmeny Wistar a Lewis se statisticky významně nelišily. Každá ze tří dávek TAA vedla k významnému nárůstu hladin plazmatického  $\text{NH}_3$ , změny u kmene Wistar byly výraznější než u kmene Lewis.

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.

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

Jak je znázorněno v grafu 2, 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.

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.

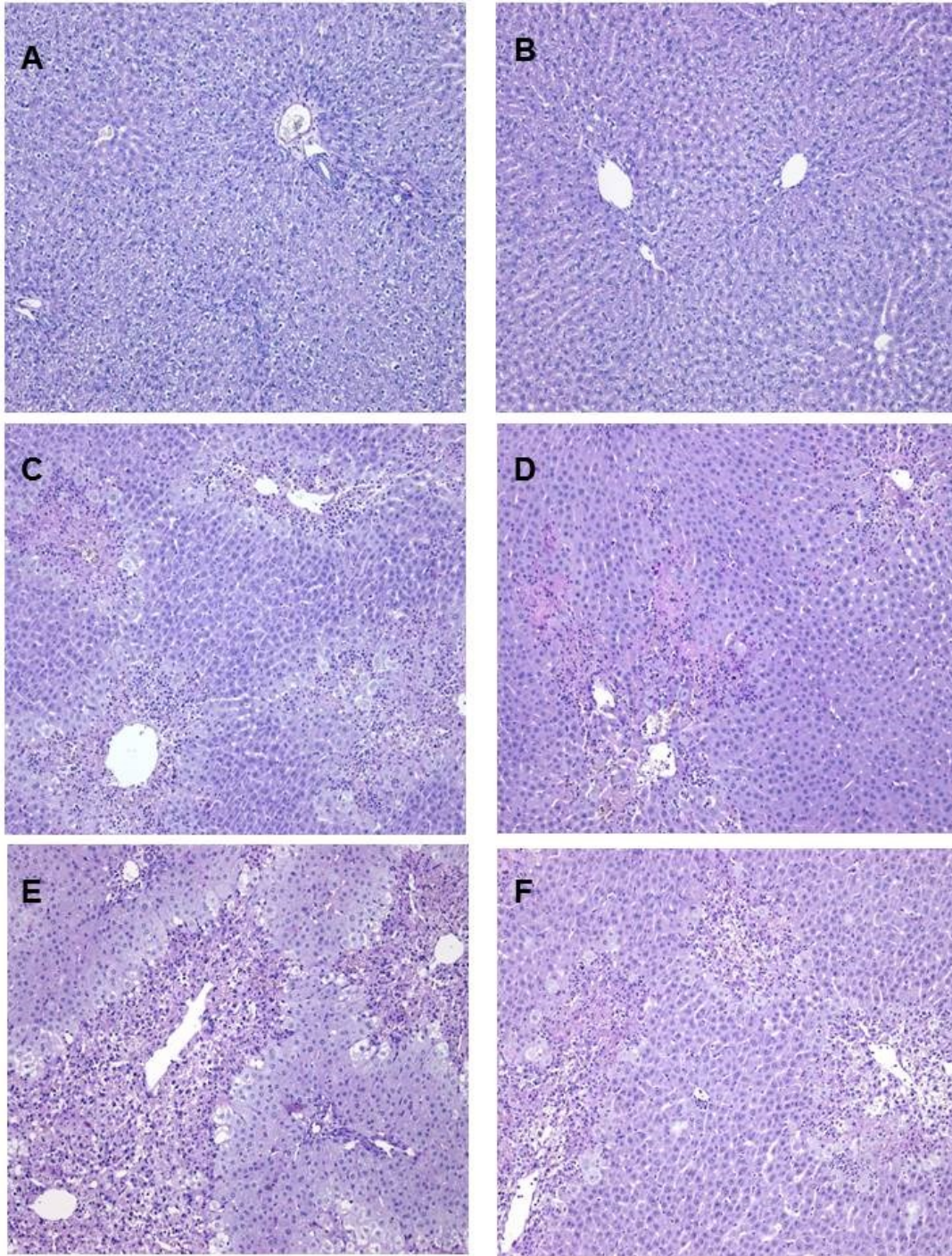


**Graf 2:** Změny v přežívání po i.p. podání TAA ve dvou injekcích za den, v celkových dávkách 350 mg/kg/den (A), 525 mg/kg/den (B) a 700 mg/kg/den (C); \*p <0,05 Lewis vs. Wistar ve stejném časovém bodě

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

Reprezentativní řezy jaterní tkáně obarvené PAS jsou ukázány na obr. 1. 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 nekroz. 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.1:** 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 můstky a fokální nekrózy (PAS, 40x). **E** (Wistar) - můstkové perivenulární nekrózy s nepatrným sinusoidálním edémem, sporadické monocelulární nekrózy (PAS, 40x). **F** (Lewis) - fokální perivenulární nekrózy s nepatrnými lymfocytózami, sporadické monocelulární nekrózy (PAS, 40x).

### 3.1.4 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. 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.

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.

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

### **3.2.1 Úvod**

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. 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.

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). Zásadním bodem výzkumu je jednoznačná identifikace a sledování životaschopnosti transplantovaných hepatocytů u příjemce během celé studie. V tomto ohledu je velmi přínosný 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).

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.

### 3.2.2 Materiál a metodika

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). 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. 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

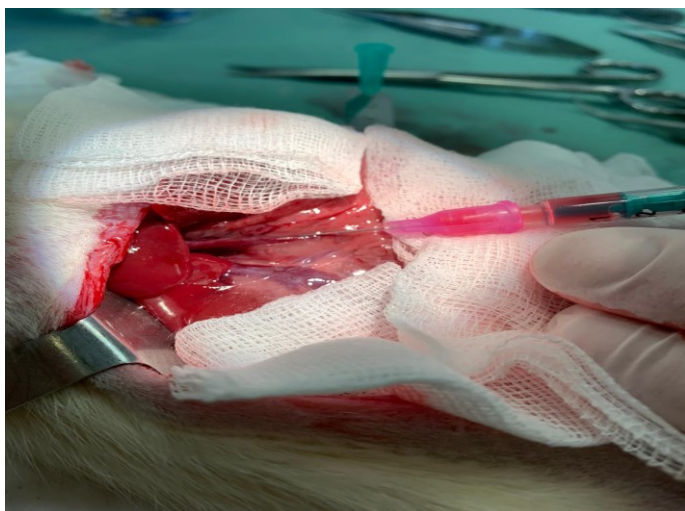
dostatečné k obnově jaterních funkcí při metabolických poruchách na bázi jater (Filippi and Dhawn, 2014). V souladu s tímto poznatkem a s ohledem na tělesnou hmotnost zvířat jsme transplantovali právě výše zmíněné množství buněk, tj.  $2 \times 10^6$  hepatocytů. Neléčená zvířata (bez Tx hepatocytů) dostala pouze 600  $\mu$ l fyziologického roztoku.

### **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. 24 hodin po první aplikaci TAA byla provedena Tx hepatocytů cestou portální žíly (obr. 2). 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. 2:** 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). 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.

### **3.2.3 Výsledky**

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

Jak ukazuje graf 3A, 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.

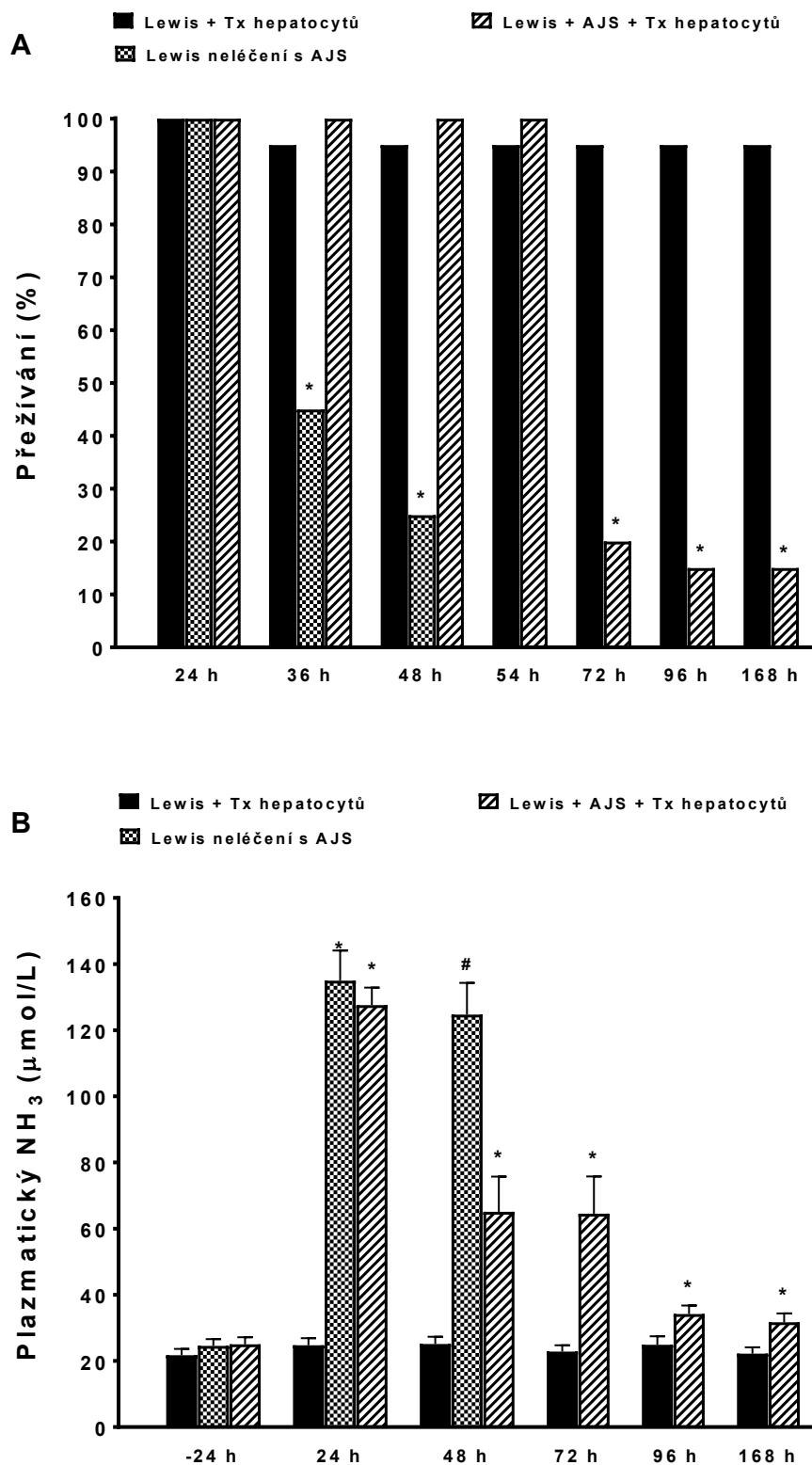
Graf 3B ukazuje plazmatické hladiny NH<sub>3</sub>. Po 24 hodinách od podání TAA je patrný výrazný nárůst koncentrací NH<sub>3</sub>. Transplantace hepatocytů vedla u potkanů s AJS k signifikantnímu poklesu koncentrace NH<sub>3</sub> již v prvních 24 hodinách. U léčených zvířat s AJS, která se dožila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

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, 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.

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.

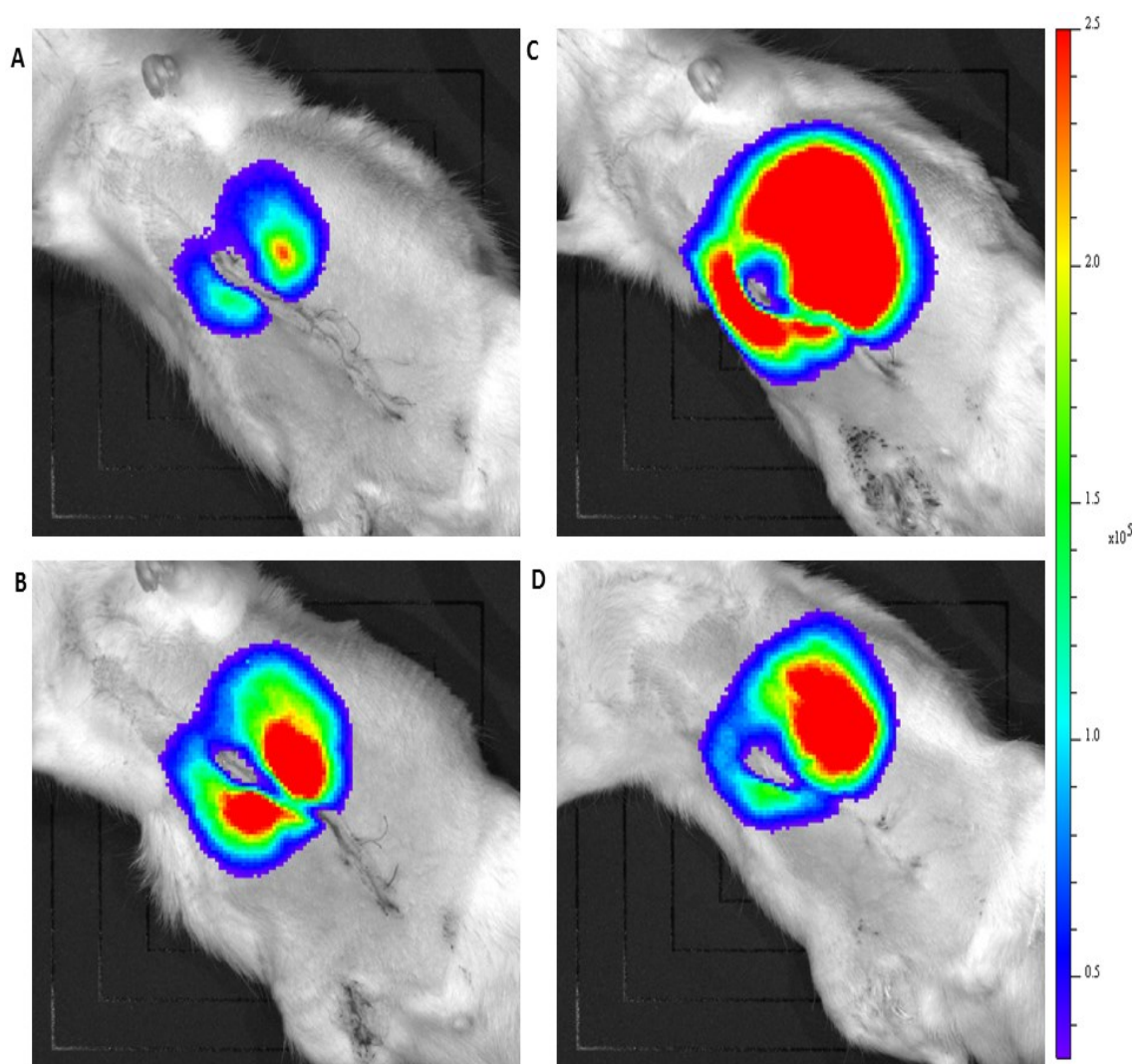


**Graf 3:** Procento přežívání (A) a plazmatická koncentrace NH<sub>3</sub> (B) u zdravých potkanů kmene Lewis po transplantaci hepatocytů (Lewis + Tx hepatocytů), u potkanů kmene Lewis s AJS bez léčby (Lewis neléčení s AJS) a u potkanů kmene Lewis s AJS léčených Tx hepatocytů (Lewis + AJS + Tx hepatocytů);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

## 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.

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. 5A), intenzita signálu dále rostla, a to jak 48 hodin, tak i 72 hodin po Tx (obr. 5B a 5C). Signál odpovídající životaschopným hepatocytům byl detekovatelný až do konce experimentu, tj. 168 hodin po Tx hepatocytů (obr. 5D).



**Obr. 5:** 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

### 3.2.4 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. 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. 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. 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. 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.

#### 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. Literatura

1. **Anbarasu C**, Rajkopper 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.
2. **Bañares R**, Catalina MV, Vaquero J: Liver support systems: will they reach prime time? *Curr Gastroenterol Rep* 15: 312-319, 2013.
3. **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.
4. **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.
5. **Bernal W**, Wendon J: Acute liver failure. *N Engl J Med* 369: 2525-2534, 2013.
6. **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.
7. **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.
8. **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.
9. **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.
10. **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.
11. **Garnol T**, Endlicher R, Kučera O, Drahotka Z, Červinková Z: Impairment of mitochondrial function of rat hepatocytes by high fat and oxidative stress. *Phys Res* 63: 271-274, 2014.

12. **Hall JE**: Guyton and Hall textbook of medical physiology. 13th edition. Philadelphia, PA: Elsevier, 2015. ISBN 978-1-4557-7005-2.
13. **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.
14. **Hughes RD**, Mitry RR, Dhawan A: Current status of hepatocyte transplantation. *Transplantation* 93: 342-347, 2012.
15. **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.
16. **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.
17. **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.
18. **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.
19. **Lee WM**: Acute liver failure. *Semin Respir Crit Care Med* 33: 36-45, 2012.
20. **Lee WM**. Recent developments in acute liver failure. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 26(1): 3-16, 2012.
21. **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.
22. **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.
23. **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.
24. **Mehendale HM**: Tissue repair: an important determinant of final outcome of toxicant-induced injury. *Toxicol Pathol* 33: 41-51, 2005.

25. **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.
26. **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.
27. **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 prefibrogenic events in Wistar rat. *Phytomedicine* 20: 828-833, 2013.
28. **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.
29. **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.
30. **Rahman TM**, Hodgson HJF: Animal models of acute hepatic failure. *Int J Exp Path* 81: 145-157, 2000.
31. **Saliba F**, Saumel D: Acute liver failure. *J Hepatol* 59: 6-9, 2013.
32. **Seglen PO**: Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13: 29-83, 1976.
33. **Tritto G**, Davies NA, Jalan R: Liver replacement therapy. *Semin Respir Crit Care Med* 33: 70-79, 2012.
34. **Tuñón MJ**, Alvarez M, Culebras JM, González-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.
35. **Yu Y**, Fischer JE, Lillegard JB, Rodysil B, Amiot B, Nyberg SL: Cell therapies for liver diseases. *Liver Transpl* 18: 9-21, 2012.

## 6. Seznam publikací

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

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

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

1. Koblíhová 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, Koblíhová 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, Koblíhova 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, Koblíhova 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, Koblíhova 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.