

3. lékařská fakulta
Univerzity Karlovy

Diplomová práce na téma:

**Bioeliminační metody v léčbě akutního selhání jater
u laboratorního miniprasete**

autor: Ondřej Ryska

školitel: MUDr. Tomáš Pantoflíček

Souhrn

Úvod: Biologické eliminační metody by mohly efektivně léčit nemocné s akutním selháním jater (ASJ) v době, kdy čekají na transplantaci či po dobu, než dojde ke spontánní regeneraci jaterního parenchymu.

Cíl studie: Zhodnotit účinek biologické eliminační metody – perfuzi plazmy přes izolované živé hepatocyty (BAL) u akutního selhání jater v experimentu na minipraseti.

Metodika: U 10 miniprasta byl proveden chirurgický model ASJ technikou devaskularizace (portokovální anastomóza). Tyto jsme poté léčili metodou BAL. Průběh ASJ jsme monitorovali prostřednictvím laboratorních a hemodynamických parametrů včetně intrakraniálního tlaku. Výsledky jsme porovnali s kontrolní skupinou miniprasat s ASJ bez léčby.

Výsledky: Při srovnání léčené a neléčené skupiny jsme pozorovali rozdíl pouze v sérových koncentracích bilirubinu, kdy ve 3. hodině ASJ byl statisticky významný ($p < 0.05$) v neprospěch skupiny s BAL (9,8 vs. 17.7 mmol/l), v 6. a 9. hodině byl statisticky významný ($p < 0.05$) ve prospěch skupiny BAL (18,1 vs. 13.1, 22.9 vs. 13,2) a rozdíl hodnot ve 12. hodině byl statisticky nevýznamný (22.8 vs. 16.2). Hodnoty ICP ve skupině léčené BAL a ve skupině kontrolní se v průběhu experimentu statisticky významně nelišily.

Závěry: Prokázali jsme funkčnost zapojení bioeliminační metody (BAL) u námi vytvořeného chirurgického modelu ASJ. Dosáhli jsme iniciální 85% viability čerstvých izolovaných prasečích hepatocytů a jejich přežívání po celou dobu, kdy byl bioreaktor použit k léčbě. Vyjma koncentrace bilirubinu naše výsledky neprokázaly signifikantní změny hodnot laboratorních ukazatelů ASJ. Naměřené hodnoty nitrolebního tlaku se statisticky významně nelišily ve skupině s léčbou akutního selhání jater napojením na BAL a v kontrolní skupině.

Klíčová slova: akutní jaterní selhání – miniprase – bioartificial liver - monitorace – intrakraniální tlak

Summary

BAL in the treatment of experimental acute liver failure in minipigs.

Aim of the study: To evaluate bioartificial liver (BAL) in the treatment of acute liver failure in the experiment.

Methods: 10 minipigs weight 25 – 30 kilograms with experimental acute liver failure (ALF) by surgical devascularization with portocaval by-pass were treated by BAL. The biochemical and hemodynamical parameters of ALF including intracranial pressure (ICP) were measured. The results were compared to control group without BAL treatment.

Results: To compare plasma bilirubin there was significant difference between experimental and control groups at the 3. hour to favourite non-BAL group (9.8 vs. 17.7 mmol/l), and in 6. and 9. hours to favourite BAL group of minipigs (18.1 vs. 13.1, 22.9 vs. 13,2). The difference at 12.hour was non-significant (22.8 vs. 16.2). The value of ICP in both groups was no significant.

Conclusion: We proved the functionality of BAL on our own surgical model of ALF. We reached initial 85 % viability of fresh isolated porcine hepatocytes and their survival in the time of BAL treatment. Bilirubin plasma concentration has significantly changed to compare both groups. ICP values were changed no significantly.

Key words: acute liver failure – minipig – bioartificial liver – intracranial pressure

Úvod

Akutní selhání jater (ASJ) představuje v klinické medicíně velmi závažné onemocnění s vysokou mortalitou. Je ve většině případů charakterizováno rychlým výpadkem jaterních funkcí s rozvojem žloutenky, koagulopatie a encephalopatie (1). Onemocnění dále progreduje až do multiorgánového selhání. Při konzervativní terapii dosahuje přežití vzhledem k výskytu fatálních infekčních komplikací pouhých 10 – 40 % (2). Jedinou současnou metodou, která zlepšuje přežití je ortotopická transplantace jater. Akutní provedení tohoto výkonu však naráží na nedostatek kadaverózních jaterních štěpů. V době, po kterou pacient čeká na vhodného dárce jaterního štěpu či po kterou může dojít nebo dochází k spontánní regeneraci jaterního parenchymu, je pacient stále akutně ohrožen na životě. Současné možnosti, jak pacienta přes toto období převést (tzv. „bridging“), jsou limitovány. V posledních letech proto dochází k rozvoji biologických i nebiologických eliminačních metod, které by umožňovaly efektivnější bridging, a tím zlepšily šanci nemocného s ASJ přežít. Jednou z možností, která byla vyzkoušena jak experimentálně (3, 4), tak i klinicky (5-9), je použití tzv. bioartificiálních jater (BAL), která využívají perfuzi plazmy pacienta přes izolované živé hepatocyty. Cílem této studie je popsat účinek metody BAL při léčbě ASJ u velkého laboratorního zvířete.

Metodika

Model ASJ

Pro naše účely jsem použili tzv. chirurgický model ASJ provedený na laboratorním dospělém minipraseti váhy 25 - 30 kg. Před operací zvíře lačnilo 12 hodin. Po premedikaci (ketamin, atropine, azaperon) byla zavedena kanyla do žíly na uchu a byl proveden intravenózní úvod (ketamin, metomidat) do anestezie. Po endotracheální intubaci jsme zvíře relaxovali (pipecuron) a řízeně ventilovali směsí kyslíku a oxidu dusného. Anestézie byla doplňována opakovanými dávkami fentanylu a etomidatu i.v. K prevenci tromboembolie jsme podávali heparin, k prevenci stresového vředu famotidin intravenózně. K antibiotické profylaxi jsme užívali amoxicilin. Po úvodu do celkové anestézie jsme zavedli katétr 18G do a.femoralis k přímému měření krevního tlaku. Do femorální žíly jsme zavedli dvoucestný katétr 7Fr pro podávání léků a infuzí. Na krku jsme vypreparovali pravou v. jugularis interna a zavedli Swan - Ganz katétr 7Fr s termistorem k měření hemodynamických parametrů.

Laparotomii jsme vedli ve střední čáře od processus xiphoideus až do podbřišku. Po vypreparování průběhu v. portae a v. cava inf. jsme našli portokavální spojku end-to-side. Poté jsme ligovali a.hepatica comm. nebo její větve. K pooperačnímu sledování jsme založili

epicystostomii a choledochostomii. Operační výkon jsme ukončili zavedením pojistného drénu do dutiny břišní a vyvedením gastrostomie k odsávání žaludečního obsahu. Operační ránu jsme uzavřeli v jedné vrstvě, miniprase jsme přeložili na bok, ponechali na operačním stole zaintubované a zahřívali jsme jej.

Po uzavření laparotomie jsme zavedli intrakraniálně v temporoparietální oblasti čidlo ke kontinuálnímu měření intrakraniálního tlaku (ICP) (obr. 1).



Obr. 1. - Laboratorní minipig po operaci se zavedeným čidlem na měření ICP

Pro vyloučení vlivu samotné operace na klinický průběh ASJ jsme vytvořili kontrolní skupinu, u které byla provedena identická příprava včetně cévních přístupů a po provedení laparotomie a zavedení epicystostomie a gastrostomie jsme operační ránu uzavřeli se založením pojistného drénu (11).

Izolace hepatocytů a naplnění bioreaktoru

Pro izolaci hepatocytů jsme zvolili metodu jaterní perfuze (10) s následnou centrifugací. Při odběru jater jsme vypreparovali a kanylovali portální žílu. Jaterní artérii jsme spolu s celým

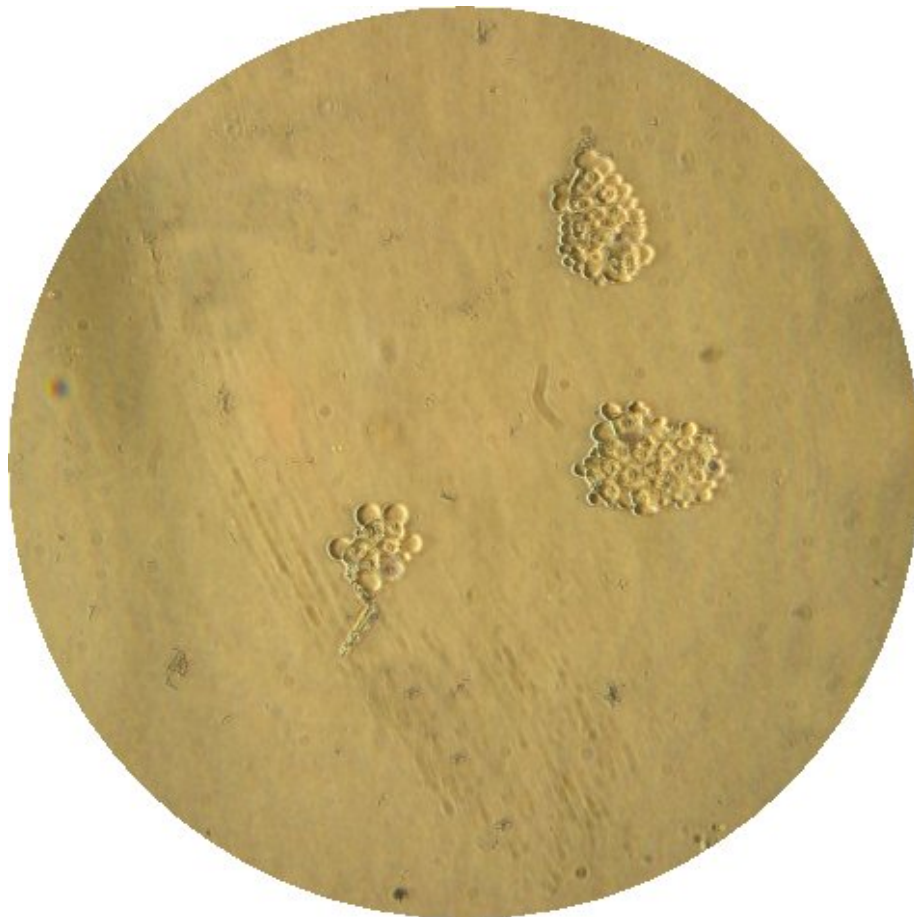
hepatoduodenálním ligamentem ligovali. Těsně před odběrem jsme punkcí vypustili obsah žlučníku. Játra jsme in vivo perfundovali 37°C teplým fyziologickým roztokem v celkovém objemu 4.000 ml.

Vyjmutá játra jsme postupně perfundovali třemi iontovými roztoky, orientačně nazvanými A,B,C, které byly syceny směsí karbogenu (95% O₂ a 5% CO₂) a jejich pH jsme následně upravili na 7.4. Perfuzi iontovým roztokem A stabilizovaným ethylenglykoltetraoctovou kyselina (EGTA) v celkovém objemu 1.500 ml jsme již prováděli in vitro ve vodní lázni zahřáté na teplotu 37°C (obr. 2.). Následovala 30 minutová perfuze roztokem B s uzavřeným okruhem pod tlakem 30 mm vodního sloupce. Tento roztok obsahoval již kolagenázu (Colagenasa cruda, aktivita 1000). Poté jsme játra perfundovali 1.000 ml roztoku C (Krebs - Henseleitovo medium), který byl zchlazen na 4 °C a obsahoval spolu s glukózou i rozpuštěný bovinní sérový albumin. Tím došlo k deaktivaci kolagenázy. Teplá ischémie celkově nepřesahovala 55 minut.



Obr. 2. – Perfuze jater cestou v. portae in vitro ve vodní lázni

Po poslední perfuzi jsme mechanicky rozrušili jaterní pouzdro tak, aby se parenchym lépe uvolnil do média. Vzniklou suspenzi hepatocytů jsme následně filtrovali a postupně třikrát centrifugovali rychlostí 500 otáček za minutu při stálém chlazení na 4 °C. Tímto postupem jsem získali suspenzi izolovaných jaterních buněk, které se spontánně začali situovat do charakteristických shluků (obr.3). Viabilitu hepatocytů jsem hodnotili mikroskopicky po obarvení methylenovou modří.



Obr. 3 – Suspenze izolovaných hepatocytů po opakované centrifugaci

Poté jsme suspenzi hepatocytů naplnili bioreaktor, který jsme předtím promyli 2.000 ml fyziologického roztoku a důkladně odvzdušnili. Bioreaktor jsme po naplnění uložili do termoboxu při teplotě 4°C až do doby jeho zapojení do přístroje (obr. 4).



Obr. 4 –Kapsle bioreaktoru naplněná hepatocyty a zchlazená na 4 °C

Pooperační péče a monitorování

Po operačním výkonu jsme zvíře zahřívali a řízeně ventilovali směsí kyslíku se vzduchem s FiO_2 0.5. Trvale jsme podávali intravenózní analgosedaci s využitím farmak s převážně mimojaterní cestou eliminace. Používali jsme kombinaci propofolu, remifentanilu a medetomidinu. Podávali jsme krystaloidní a koloidní roztoky, k forsírování diurézy poté bolusově furosemid. Při poklesu hladiny glukózy v krvi pod hodnotu 3.5 mmol/l jsme podávali hypertonickou glukózu v kontinuální infuzi s cílem udržet normoglykémii (3.3 – 4.9

mmol/l). Při poklesu středního arteriálního tlaku (MAP) pod 60 mm Hg jsme nasazovali noradrenalin v kontinuální infuzi.

V pravidelných intervalech jsme odebírali krevní vzorky na stanovení vnitřního prostředí, hodnot iontů, glykémie, krevního obrazu, parametrů hemokoagulace, jaterních testů a sérového kreatininu (11). Kontinuální monitorace intrakraniálního tlaku byla zahájena ihned po operaci.

Sledování hemodynamických parametrů

Během operace jsme monitorovali EKG, krevní tlak, tepovou frekvenci, střední arteriální tlak (MAP), centrální venózní tlak (CVP), střední tlak v plicnici (MPAP), tlak v zaklínění (PCWP), termodiluční technikou srdeční výdej (CO), tělesnou centrální a periferní teplotu. Měřili jsme hodinovou diurézu. Byl kalkulován srdeční index (CI) a indexovaná systémová cévní rezistence (SVRI).

Počátek terapie BAL

Nástup ASJ jsme zaznamenali v čase poklesu glykémie pod hodnoty 3.5 mmol/l. Tento moment byl počátkem otevření tzv. terapeutického okna a napojením bioreaktoru. V první fázi zapojení byla pouze z krve zvířete filtrována plazma, která byla zatím skladována v rezervoáru přístroje. Poté byl samotný bioreaktor, naplněný suspenzí živých hepatocytů, umístěn do terciálního okruhu přístroje O. liver Performer firmy Rand, Itálie (obr. 5).



Obr. 5 – Příklad přístroje O. liver Performer (fy Rand, Itálie) se zapojením bioreaktoru

Monitoraci hodnot jednotlivých laboratorních ukazatelů ASJ a hodnot ICP jsme prováděli po celou dobu operace, rozvoje ASJ a léčby BAL až do doby exitu zvířete.

Získané hodnoty laboratorních vyšetření v průběhu léčby ASJ připojením na BAL, jsme porovnali s parametry kontrolní skupiny, tedy skupiny zvířat, u které bylo vyvoláno ASJ, a která nebyla na BAL napojena (12).

Experiment jsme ukončili po uplynutí 12 hodin od uvolnění svorky na v.portae po našití porto-kavální anastomózy podáním 20 ml 5 % roztoku KCl a bolusu Thiopentalu.

Následovala relaparotomie, revize dutiny břišní, odebrání vzorku jater a sleziny k histologickému vyšetření a kontrola polohy všech katetrů.

Údaje byly statisticky zpracovány pomocí T-testu, Mann-Whitneyovým neparametrickým testem použitím tabulátoru EXCEL a QUATRO a testem Wilcoxon. Za statisticky významnou byla považována hodnota $p < 0.05$.

Materiál

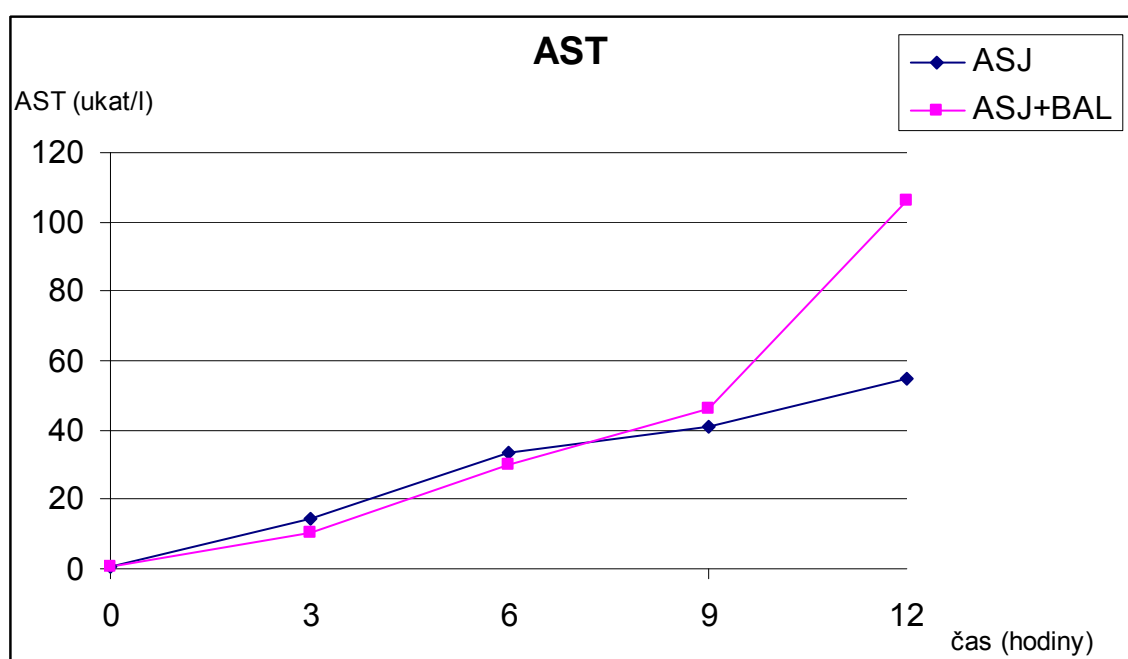
K provedení experimentu jsme použili 14 miniprasat váhy 25 – 30 kg, u kterých jsme vyvolali ASJ chirurgickou devaskularizací. Z tohoto celkového množství byla 4 zvířata nehodnotitelná a ze studie jsme je proto vyřadili: jedno pro významné krvácení do dutiny břišní po provedení ASJ, dvě pro kardiopulmonální dekompenzaci při předoperačně nepoznané konstriktivní perikarditidě a jedno pro nestandardní ovlivnění ICP při jeho prudkém vzestupu.

Výsledky

U skupiny 10 zařazených zvířat se ASJ rozvinulo v průměru za 2 hod. 7 min. od provedené devaskularizace jater (48 min. – 3 hod 16 min.) a korespondovalo s nástupem hypoglykémie pod hodnoty 3.5 mmol/l. Léčba ASJ napojením zvířete na BAL byla zahájena v průměru po 2 hod. 21 min. (1 hod. – 3 hod.45 min.) a trvala v průměru 5 hod. 43 min. (3 hod.25 min. – 8 hod. 10 min.).

Získané průměrné hodnoty vybraných laboratorních ukazatelů ASJ zvířat s ASJ léčených pomocí BAL jsem srovnali s průměrnými hodnotami laboratorních ukazatelů kontrolní skupiny, tedy skupiny bez napojení na BAL (12). Vše je shrnuto v tabulkách grafech č.1-4.

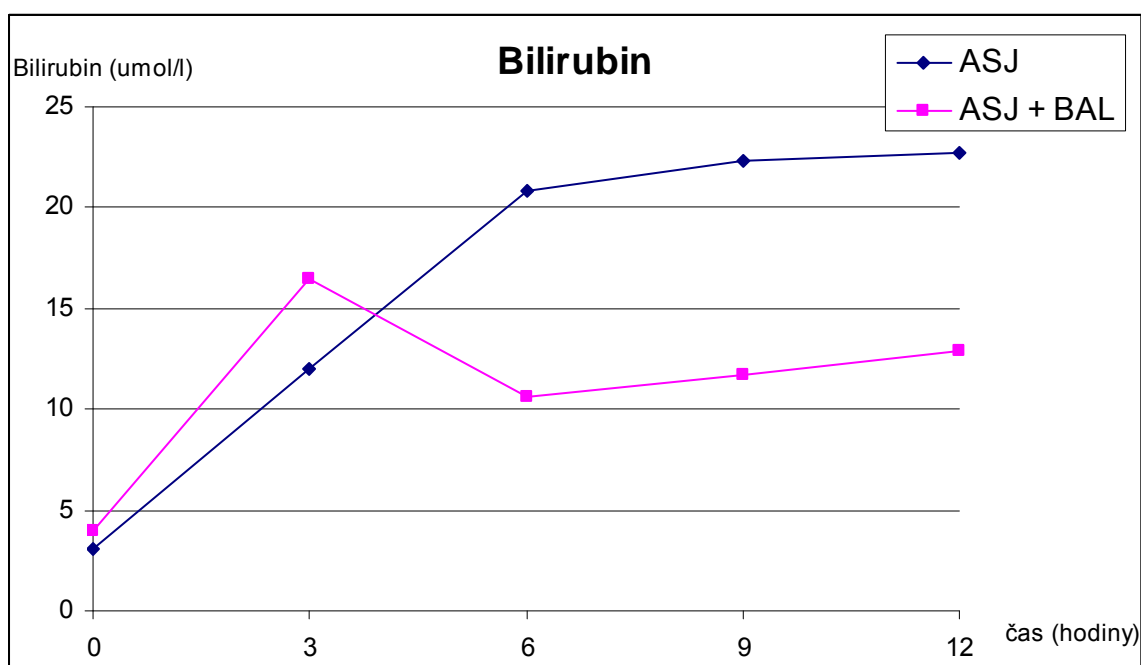
Čas (hod)	0	3	6	9	12
AST (μkat/l)	ns.	ns.	ns.	ns.	ns.
ASJ	0.83 ± 0.29	14.37 ± 35.55	33.44 ± 39.96	40.88 ± 41.34	54.94 ± 43.22
ASJ-BAL	0.814 ± 0.47	10.50 ± 7.82	30.13 ± 15.76	46.20 ± 41.20	106,40 ± 146.40



Tabulka a Graf č. 1 – Srovnání průměrných hodnot AST u laboratorních zvířat léčených pomocí BAL s kontrolní skupinou, včetně směrodatné odchylky.

ns. – neliší se, $p < 0.01$ – statisticky významná rozdílnost průměrných hodnot

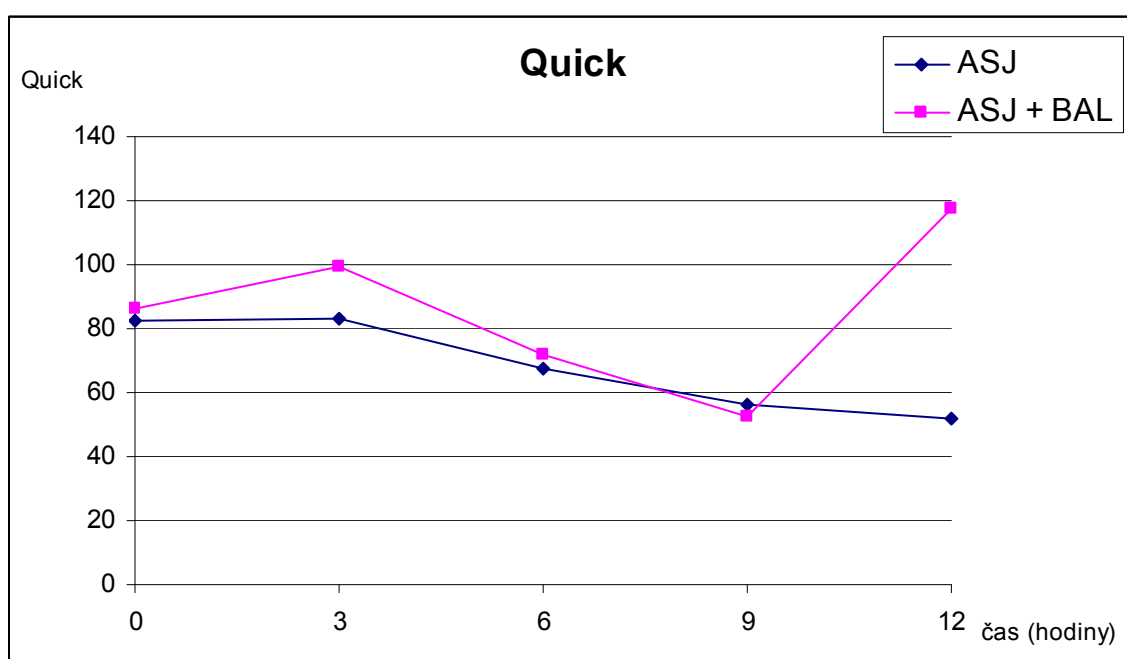
Čas (hod)	0	3	6	9	12
Bilirubin (mmol/l)	ns,	Ns.	s.	s.	s.
ASJ	3.03 ± 0.96	11.97 ± 6.09	20.86 ± 12.35	22.29 ± 16.41	37.4 ± 14.57
ASJ-BAL	4.01 ± 1.38	16.44 ± 6.78	10.60 ± 3.18	11.75 ± 4.42	12.88 ± 4.59



Tabulka a Graf č. 2 – Srovnání průměrných hodnot Bilirubinu u laboratorních zvířat léčených pomocí BAL s kontrolní skupinou, včetně směrodatné odchylky.

ns. – neliší se, $p < 0.01$ – statisticky významná rozdílnost průměrných hodnot

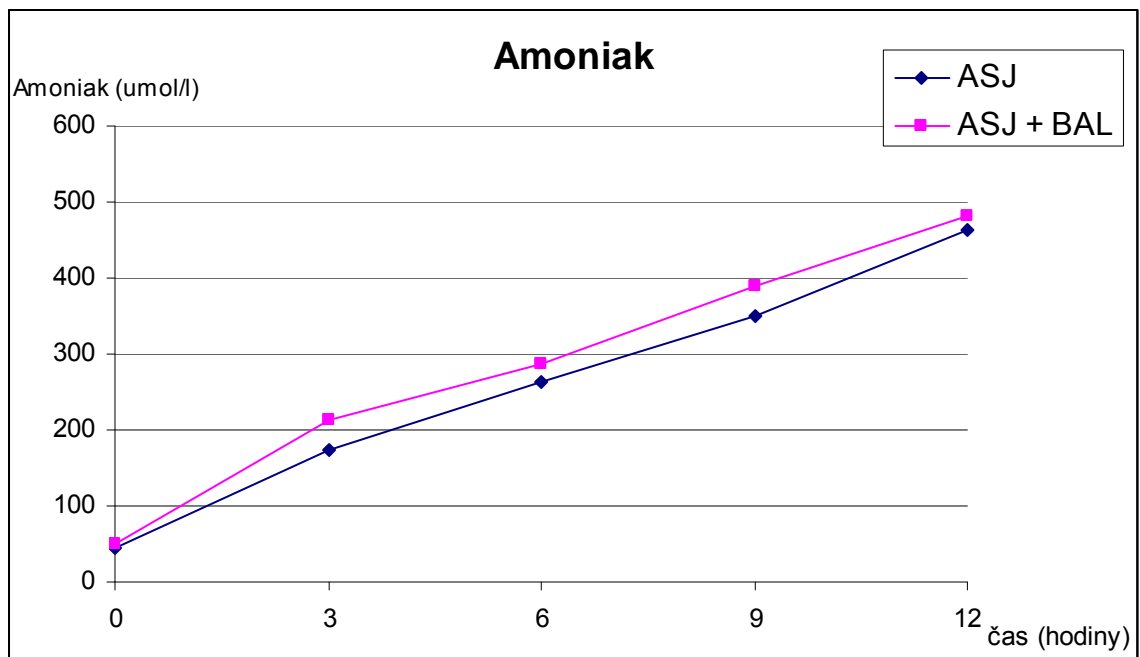
Čas (hod)	0	3	6	9	12
Quick (s)	ns.	ns.	ns.	ns.	ns.
ASJ	82.40 ± 11.41	83.30 ± 13.06	67.40 ± 17.03	56.00 ± 27.48	51.60 ± 21.52
ASJ-BAL	86.00 ± 42.55	99.11 ± 30.48	71.93 ± 72.78	52.30 ± 71.29	117.47 ± 154.28



Tabulka a Graf č. 3 – Srovnání průměrných hodnot Quick u laboratorních zvířat léčených pomocí BAL s kontrolní skupinou, včetně směrodatné odchylky.

ns. – neliší se, $p < 0.01$ – statisticky významná rozdílnost průměrných hodnot

Čas (hod)	0	3	6	9	12
Amoniak (μmol/l)	ns.	ns.	ns.	ns.	ns.
ASJ	44.80 ± 19.25	173.80 ± 61.22	264.30 ± 93.05	350.70 ± 159.49	463.40 ± 178.47
ASJ-BAL	49.63 ± 21.14	212.20 ± 97.09	288.04 ± 93.54	390.02 ± 212.96	480.58 ± 206.43



Tabulka a Graf č. 4 – Srovnání průměrných hodnot amoniaku u laboratorních zvířat léčených pomocí BAL s kontrolní skupinou, včetně směrodatné odchylky.

ns. – neliší se, $p < 0.01$ – statisticky významná rozdílnost průměrných hodnot

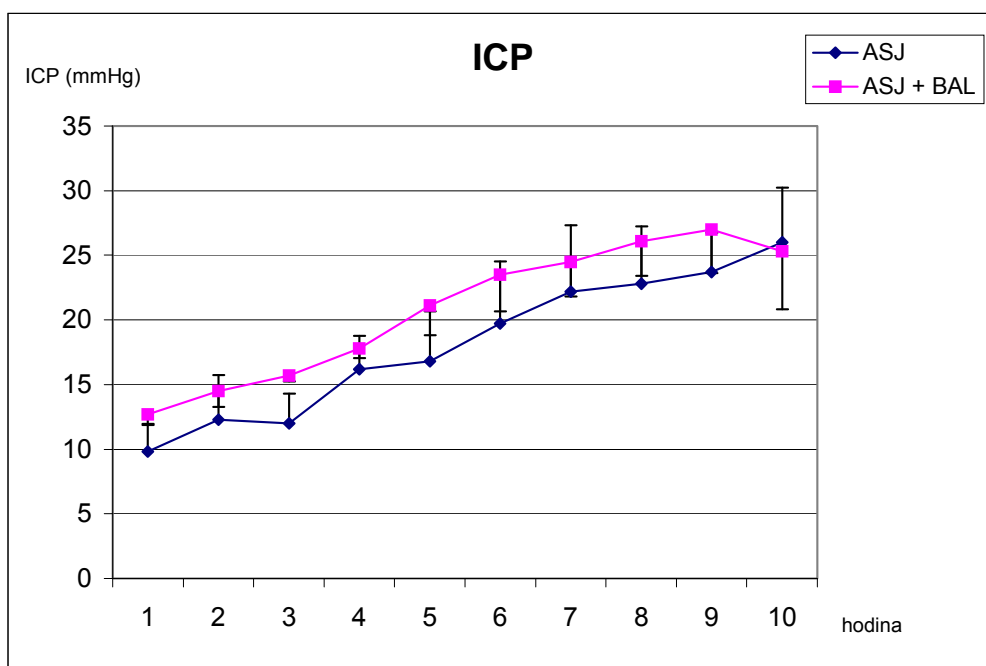
Viabilitu hepatocytů jsem měřili na několika úrovních. Před plněním bioreaktoru tvořil podíl živých hepatocytů průměrně $85 \% \pm 4.5$. Po zapojení bioreaktoru do systému jsme posuzovali viabilitu dle srovnání hodnot parciálního tlaku kyslíku naměřených před a po průchodu bioreaktorem. Rozdíl byl signifikantně významný v 1. – 3. a 5. hodině perfuze ($p < 0.05$), ve 4. a 6. hodiny je signifikantně nevýznamný (tab.č.5).

hodina po napojení	1	2	3	4	5	6
před bioreaktorem	59.84	52.39	55.44	49.73	59.39	53.59
za bioreaktorem	30.71	42.37	44.62	43.20	43.30	49.40
Rozdíl	29.12	10.02	10.82	6.54	16.09	4.20

Tabulka č. 5 – Průměrné hodnoty parciálního tlaku kyslíku před bioreaktorem a za ním v průběhu perfuze (v mm Hg sloupce)

Kontinuální sledování ICP bylo součástí monitorovacího protokolu. Srovnání hodnot v obou skupinách je znázorněno v tabulce č. 4 a na grafu č. 1. Rozdíl v průběhu ASJ je statisticky nevýznamný.

hodina	1	3	6	9	10
ASJ	9.8 ± 1.8	12.0 ± 1.1	19.7 ± 7.0	23.7 ± 8.3	26.0 ± 11.0
ASJ + BAL	12.7 ± 6.6	15.7 ± 7.3	23.5 ± 15.3	27.0 ± 8.6	25.3 ± 11.2



Tabulka č. 6 a graf č. 5 – Srovnání hodnot ICP ve skupině zvířat s ASJ léčeným pomocí BAL a v kontrolní skupině

Ze statistického zpracování hodnot jednotlivých laboratorních ukazatelů ASJ v obou skupinách, tj. ve skupině léčené pomocí BAL a ve skupině kontrolní bez léčby, vyplývá, že významného rozdílu bylo dosaženo pouze v koncentraci bilirubinu, kdy v 0.hodině jsou průměrné hodnoty v obou skupinách prakticky totožné (3.1 vs. 3.8 mmol/l), ve 3. hodině je rozdíl statisticky významný ($p < 0.05$) v neprospěch skupiny s BAL (9.8 vs. 17.7 mmol/l), rozdíl hodnot v 6. a 9. hodině je statisticky významný ($p < 0.05$) ve prospěch skupiny BAL (18.1 vs. 13.1, 22.9 vs. 13.2) a rozdíl hodnot ve 12. hodině je opět statisticky nevýznamný (22.8 vs. 16.2).

Hodnoty ICP ve skupině léčené BAL a ve skupině kontrolní se v průběhu experimentu statisticky významně nelišily.

Diskuse

Celá problematika využití metody BAL v experimentu se sestává z několika částí:

- 1) vhodný model ASJ
- 2) zdroj hepatocytů a jejich izolace
- 3) funkční extrakorporální systém cirkulace s bioreaktorem (BAL)
- 4) monitorace, zpracování výsledků a zhodnocení efektivity léčby

Model ASJ

V experimentu existuje celé řada modelů ASJ, které se dají využít k lepšímu pochopení patofyziologie onemocnění a k testování jednotlivých metod léčby. Kritéria pro ideální model ASJ jsou následující (13):

- 1) Indukované selhání jater by mělo být reverzibilní
- 2) Model musí být reprodukovatelný
- 3) Poškození jater by mělo vést ke smrti zvířete podobně jako v klinice
- 4) Musí být vytvořeno dostatečně velké terapeutické okno
- 5) Případné použití toxinů nesmí představovat riziko pro personál

Dle typu provedení lze modely ASJ rozdělit na chemické a chirurgické. K vytvoření ASJ pomocí chemických látek byla vyzkoušena celá řada toxinů: thioacetamid, nitrosaminy, halogenová anestetika (14). Posledních 30 let však naprosto jednoznačně převládá předávkování galactosaminem nebo acetoaminophenem. Příklady některých chemických modelů použitých u laboratorního prasete a jejich výhody či nevýhody shrnují tabulky č. 7,8.

	Kalpana (15)	Henne-Bruns (16)	Miller (17)
Druh zvířete	Prase	„cross-bred pig“	prase (samci)
počet	14	12	54
váha	8-15	10-17	15-25
Látka	galactosamin	acetaminophen	acetaminophen
Dávka	1.0 g/kg	0.5-2.0 g/kg	1.1 g/kg
potvrzení ASJ	hypoglykemie, JFT, kratinin, biopsie	JFT, krevní plyny, biopsie	JFT, biopsie,
Přežití	77-86h	58,3% zemřelo do 4,8h*	9,02-18,7h*

Tab. č. 7 - Chemické modely ASJ

(JFT – jaterní funkční testy, * neprokázán hepatotoxický účinek)

Galactosamin	-	+
	interakce s halothanem chybí klinický ekvivalent vysoké náklady	reversibilita předpokládané účinky
Acetaminophen	-	+
	špatná reprodukovatelnost nestálé terapeutické okno vedlejší účinky nevysvětlený pokles hematokritu	reversibilita klinická podobnost

Tab. č. 8 - Výhody a nevýhody chemických metod ASJ

U chirurgických modely ASJ se vyskytují v zásadě dva možné přístupy. Jde o totální hepatektomii (HEP) nebo o modely devaskularizační. U metody totální hepatektomie existuje mnoho pochybností. Model je ireverzibilní a celkový klinický obraz neodpovídá běžnému ASJ. Další nevýhodou je krátké terapeutické okno. Změny biochemických markerů se totiž objeví teprve 2-4 hodiny před smrtí. Asi největším nedostatkem tohoto modelu je absence nekrotické jaterní tkáně v organismu. Bylo potvrzeno, že v porovnání s modelem hepatektomie jeví devaskularizační model známky zvýšené hladiny transamináz. Tento fakt byl vysvětlen právě přítomností nekrotizujících hepatocytů v organismu (18). Z ohledem na tyto nedostatky je anhepatický model spíše v pozadí zájmu.

Postup u devaskularizačního modelu je tvořena dvěma fázemi. Nejdříve je provedena portokavální anastomosa (PCA) a následuje podvaz aa.hepaticae (HAL) (19). Tento základní postup je dále rozvíjen ve smyslu různé časové periody mezi oběma fázemi a způsobem provedení HAL. Velkou nevýhodou tohoto modelu je jeho ireverzibilita. Té se lze částečně vyhnout metodou, kdy jsou jaterní tepny místo podvazu jen komprimovány po určitou dobu (tab. č. 9,10).

	Filipponi (20)	Tonnesen (18)	Filipponi (21)	Hanid (19)	de Groot z
počet	-	-	11	34	15
váha	40	35-40	27-35	18-20	28-33
operace	HEP	1.HEP 2.PCA+HAL	PCA +70% HEP	PCA+HAL	PCA
kontrola	-	-	samotná PCA, samotná 70% HEP	laparotomie	komprese HA (4h)
anestézie	propofol, fentanyl	50% N ₂ O	halothan	-	-
potvrzení ASJ	KF	pH, bilirubin, ALT	AST, bilirubin	bilirubin, AST	KF
přežití (hod ± SE)	16.9 ± 5.38	1. 16.0 ± 0.9 2. 18.6 ± 1.1	30.0	9.1	20-50

Tab. č. 9 - Chirurgické modely ASJ (HA – a.hepatica, KF – koagulační faktory)

Totální hepatektomie	-	+
	velké chirurgické trauma ireverzibilita absence nekrotických hepatocytů	prakticky žádné
Devaskularizace	-	+
	chirurgické trauma částečná ireverzibilita	reprodukovatelnost dostatečné terapeutické okno Nízké náklady

Tab. č.10 - Výhody a nevýhody chirurgických metod ASJ

Pro náš experiment jsme zvolili model devaskularizační s provedením PCA a HAL v jedné době pro jeho jednoduchost, snadnou reprodukovatelnost a nízké náklady na provedení. Závažné poškození jater je běžně provázeno metabolickými poruchami. Výrazná hypoglykémie je důsledkem porušené glukoneogeneze, neschopnosti mobilizovat zásoby jaterního glykogenu a zvýšené hodnoty cirkulujícího inzulínu. U našeho modelu se v průměru po 2 hodinách od operace miniprase dostalo do prohlubující se hypoglykémie pod hodnoty 3.5 mmol/l. Tento stav jsme zaznamenali jako nástup ASJ. Hypertonickou glukózu jsme podávali kontinuálně proto, abychom se vyhnuli prudkému zvýšení glykémie při podávání bolusovým, které stimuluje uvolnění inzulínu. Použitý experimentální model u miniprase prokázal standardní nástup ASJ po provedené jaterní devaskularizaci a portokavální anastomóze (11). V praxi to znamenalo předvídatelnost doby, do které bylo nutno provést přípravu suspenze izolovaných hepatocytů a naplnění bioreaktoru. Celý postup s vytvořením modelu ASJ a napojením zvířete na extrakorporální cirkulaci s bioreaktorem tak bylo možné jednoduše časově rozvrhnout. Pravdou je, že námi zvolený model ASJ je ireverzibilní. Cílem studie bylo však popsat vliv léčby systému BAL na biochemické a hemodynamické parametry stejně tak jako na hodnoty ICP. Doba přežití zvířete nebyla proto pro výsledek důležitá.

Izolace hepatocytů

Jaterní buňky jsem izolovali pomocí metody jaterní perfuze (10) s následnou centrifugací. Tuto metodu jsem zvolili především pro její snadnou proveditelnost a malou náročnost na technické vybavení. Někteří autoři používají metodu izolace s následným mražením podle Maganta (25), které si po rozmražení ponechávají poměrně vysokou viabilitu dosahující 70 – 80 %. Ta však velmi rychle klesá pod 40 % (26). Ani množství použitých hepatocytů k naplnění bioreaktoru není u různých autorů totožné a pohybuje se řádově od 10^9 po 10^{10} bez závislosti na váze experimentálního zvířete (3-6,24).

Po provedení izolace dosahovala průměrná viabilita hepatocytů 85 %. Tuto hodnotu jsme považovali v souladu s literárními údaji za dostatečnou (23,24). Mikroskopicky hodnotit procento živých hepatocytů v samotném bioreaktoru během terapie je nemožné. Proto jsem viabilitu ověřili pomocí konzumce kyslíku v plazmě při průchodu bioreaktorem.

V hodinových intervalech jsem prováděli vyšetření parciálního tlaku kyslíku ze vzorku odebraných před a po průchodu bioreaktorem. Získaná data potvrzují, že v průběhu terapie, tj. po průměrnou dobu 5 hod. 43 min. (3 hod. 25 min. – 8 hod. 10 min.) si hepatocyty

životaschopnost uchovaly v průměru prvních 5 hodin. Potom soudě podle výrazně snížené konzumce kyslíku se jejich viabilita se snižovala.

Systém BAL

Námi použitý systém se skládal s třídimenzionálního biorekatoru zapojeného do okruhu extrakorporálního podpůrného systému přístroje O. liver performance fy Rand (27) s plazmafiltrací, hemofiltrací a integrovaným oxygenátorem. Vzhledem k malému průtoku kanylovaných cév byla rychlost plazmafiltračního okruhu 150 ml/min. V nezávislém okruhu s oxygenátorem, zahřívačem plazmy a biorektorm byla rychlost průtoku 50 ml/min. Samotný bioreaktor byl naplněn 200 ml suspenze obsahující 80 gramů izolovaných hepatocytů v souladu s výrobcem. Okamžitě po naplnění byl bioreaktor zchlazen na 4°C a uchován při této teplotě do doby použití. Tím byly aktivně sníženy metabolické nároky jaterních buněk, které si tak zachovaly vyšší viabilitu. Doba terapie trvala v průměru 5 hodin a 43 minut, což jsem považovali v souladu s literárními zdroji (27-29) za dostatečné. K volbě uvedených komponentů BAL nás nutily především následující důvody:

- 1 – snadná dostupnost živých čerstvých porcinních hepatocytů,
- 2 – relativní jednoduchost jejich izolace s dosažením vysoké viability,
- 3 – provedení pilotního pokusu, jež by byl srovnatelný s již publikovanými výsledky experimentálních studií,
- 4 – volba metody, která by mohla být srovnávána s již publikovanými klinickými studii a potencionálně aplikovatelná v klinickém experimentu.

Monitorace a výsledky

Výsledky našeho měření jsme zpracovávali standardním srovnáváním dvou souborů nezávislých výběrů. A to oboustranným a jednostranným testem nulové hypotézy oproti hypotéze alternativní na obvyklé hladině významnosti 0.05.

V případě hodnot plazmatických AST, ALT a hodnot Quickova času není na dané hladině významnosti statisticky významný rozdíl mezi skupinou kontrolní a skupinou léčenou BAL, což odpovídá našim předpokladům před započítím experimentu.

Naproti tomu u hodnot plazmatického bilirubinu jednostranný test H_0 proti alternativní hypotéze předpokládající, že hodnoty u léčeného prasete budou nižší než u kontrolní skupiny vyvrací platnost nulové hypotézy a tudíž potvrzuje platnost alternativní hypotézy – ovšem pouze u měření po 6ti a 9ti hodinách – neboli, nulovou hypotézu lze zamítnout a výsledek je

statisticky významný pro rozdíl hodnot hladin bilirubinu u léčené a kontrolní skupiny, a to po šesti a devíti, nikoliv po dvanácti hodinách léčby.

V případě hodnot plazmatického amoniaku, oproti původnímu předpokladu, není na dané hladině významnosti statisticky významný rozdíl mezi léčenou a kontrolní skupinou. Tento výsledek je patrně ovlivněn nedostatkem údajů především u léčené, ale i kontrolní skupiny, obdobně lze chápat nesignifikantnost výsledků měření hodnot bilirubinu po dvanácti hodinách)

Z naměřených hodnot laboratorních ukazatelů ASJ ve skupině BAL a z jejich srovnání s kontrolní skupinou lze učinit následující závěry:

- 1) aktivita AST, koncentrace amoniaku a hodnota Quickova času se signifikantně nelišily v obou skupinách,
- 2) koncentrace bilirubinu byla signifikantně nižší ve skupině s léčbou pomocí BAL, a to v 6. a 9. hodině ve prospěch skupiny s BAL, ve 3. hodině naopak v její neprospěch
- 3) naměřené hodnoty ICP se v obou skupinách signifikantně nelišily, i když po 9. hodině nelze trend naměřených hodnot posuzovat pro blížící se ukončení experimentu.

Ve většině experimentálních studií autoři prokazují snížení hladin amoniaku, koncentrace bilirubinu a hodnot nitrolebního tlaku u skupiny léčených BAL (3,4). Cuervas-Mons se spoluautory uvádí v randomizované studii s 53 zvířaty signifikantně delší přežívání a snížení ICP při léčbě ASJ pomocí BAL ve srovnání s kontrolní skupinou (4). K experimentu však použili model s parciální resekci jaterního parenchymu, který vede k 86 % mortalitě v průběhu prvních 4 dnů. Při léčbě bioreaktorem s použitím 0.6×10^9 hepatocytů došlo v některých časových bodech k signifikantnímu snížení sérových hladin bilirubinu a protrombinu, k signifikantnímu zvýšení glykémie a albuminu. Celkově však signifikantních rozdílů v sérových hladinách AST, laktát dehydrogenázy, bilirubinu, albuminu, glukózy a protrombinu dosaženo nebylo. ICP byl u bioreaktorem léčené skupiny nižší. Po léčbě bioreaktorem byla mortalita 56 % ve srovnání s kontrolní skupinou, kde dosáhla 88 %. Všechna zvířata exitovala v průběhu prvních 3 dní.

Výrazně lepších výsledků dosáhl Sheil se spolupracovníky (5). Provedli obdobný experiment na skupině 5 miniprasat s použitím systému BALLS (bioartificial liver support) s hepatocyty v množství 2.5×10^{10} s viabilitou cca 30 hodin, v kombinaci s dialýzou. Konstatovali snížení hladin amoniaku, aminových kyselin a ICP v léčené skupině.

Obdobného zlepšení laboratorních ukazatelů ASJ u prasat s ASJ dosáhl Sosef (28)

a Naka (29), kteří pozorovali signifikantního prodloužení života a snížení hladiny amoniaku. Zvýšené hodnoty bilirubinu vysvětlují důsledkem jeho extrahepatické konjugace. K experimentu však použili hepatektomovaná zvířata, kdy rozvoj a především průběh ASJ není srovnatelný s průběhem ASJ u člověka.

Skutečnost, proč jsme v naší sestavě nedosáhli literárně uváděného signifikantního zlepšení většiny laboratorních ukazatelů ASJ a hodnot ICP, je možné vysvětlit řadou faktorů, které ovlivňují výsledek pokusu:

1) Fyziologická nejednotnost jednotlivých laboratorních zvířat jejich rozdílné reakce na stres z operačního zákroku.

2) Viabilita hepatocytů, která postupně v průběhu perfuze bioreaktoru plazmou klesá. Dle sledované konzumce kyslíku nedosahovalo požadovaná životnost celých 6 hodin terapie.

3) Použité množství hepatocytů v suspenzi mohlo být vzhledem k váze experimentálního zvířete s ASJ nedostatečné. V tomto bodě jsme byli omezeni výrobními parametry bioreaktoru, u kterého hrozí při pokusu o naplnění větším množstvím buněk ucpání kapilár. I když není mezi autory doposud shody, množství viabilních hepatocytů v bioreaktoru považujeme za zásadní a námi použitých 80 gramů v suspenzi za nedostatečné (30, 31). Z těchto důvodů považujeme v souladu s názorem Sheila a spol. (5) velikost použitého bioreaktoru za nevyhovující.

4) Monitorace měla být prováděna po delší dobu. Zde je omezující ireverzibilita námi zvoleného modelu. Ten se ovšem na druhé straně na rozdíl od modelů hepatektomovaných zvířat (28) daleko více blíží klinickému průběhu ASJ s vyplavením vasoaktivních substancí a ostatních toxických látek z nekrotických částí jater do oběhu nemocného. Výběr parametrů k monitoraci průběhu ASJ před i po nasazení léčby považujeme v souladu s literaturou (26-30) za vhodný. Měření hodnot intrakraniálního tlaku považujeme za zásadní vzhledem ke skutečnosti, že především ovlivnění této hodnoty by mělo mít finálně vliv na hodnocení metody BAL jak v experimentu (24), tak i v klinice (32).

Závěr

Celá tato práce se skládala z několika dílčích problematik. Předně se nám podařilo vytvořit funkční, reprodukovatelný a klinicky relevantní model ASJ u laboratorního miniprasete. Dále se nám podařilo provést izolaci prasečích jaterních buněk, kdy jsem dosáhli iniciální 85% viability čerstvých hepatocytů a jejich prokázané přežívání po téměř celou dobu, kdy byly

použity v bioreaktoru. Poté se nám podařilo prokázat funkčnost zapojení eliminační metody – biologických „umělých jater“ (BAL). Vyjma koncentrace bilirubinu naše výsledky neprokázaly signifikantní změny hodnot laboratorních ukazatelů ASJ. Naměřené hodnoty nitrolebního tlaku se statisticky významně nelišily ve skupině s léčbou akutního selhání jater pomocí BAL a ve skupině s akutním selháním jater bez napojení na BAL. Získané zkušenosti umožňují v experimentální práci s BAL dále pokračovat obzvláště směrem k technickému rozšíření kapacity bioreaktoru pro prasečí hepatocyty.

Literatura

- 1 - Bernuau J, Rueff B, Bernhamou JP: Fulminant and subfulminant liver failure. Definitions and causes. *Semin Liver Dis* 6: 97-106, 1986
- 2 - Trey C, Davidson CS: The management of fulminant hepatic failure. *Prog Liver Dis*, 3, 1970: 282 - 298
- 3 – Flendrig LM, Calise F, Di Florio E et al: Significantly improved survival time in pigs with complete liver ischemia treated with a novel bioartificial liver. *Int J Artif Organs*, 22, 1999: 701 - 708
- 4 – Cuervas-Mons V, Colás A, Rivera JA et al: In vivo efficacy of a bioartificial liver improving spontaneous recovery from fulminant hepatic failure: a controlled study in pigs. *Transplantation* 69, 2000: 337- 344
- 5 – Sheil AGR, Sun J, Wang L et al: A biodialysis systém for liver support tested in a porcine hepatic failure model. *Aust N Z J Surg*, 70, 2000: 127 – 131
- 6 – Gerlach JC, Encke J, Hole O et al: Bioreactor for a large scale hepatocyte in vitro perfusion. *Transplantation* 58, 1994: 984 - 988
- 7 - Horslen SP, Hammel JM, Fristoe LW et al: Extracorporeal liver perfusion using human and pig livers for acute liver failure. Extracorporeal liver perfusion using human and pig livers for acute liver failure. *Transplantation*, 70, 2000: 1472 - 1478
- 8 - Levy MF, Crippin J, Sutton S et al: Liver allotransplantation after extracorporeal hepatic support with transgenic (hCD55/hCD59) porcine livers. Clinical results and lack of pig-to-human transmission of the porcine endogenous retrovirus. *Transplantation*, 69, 2000: 272 - 280
- 9 - Rozga J, Holzman MD, Ro MS et al: Development of a hybrid bioarteficial liver. *Artif Organs* 21, 1993: 502 – 511

- 10 – Selen, PO: Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* 1976;13:29 -83
- 11 - Ryska M, Kieslichová E, Pantoflíček T, Ryska O, Zazula R, Skibová J: Model akutního selhání jater u miniprasete z hlediska chirurga a anesteziologa. *Rozhl Chir*, 2004, 83: 436 – 442
- 12 – Ryska M, Kieslichová E, Pantoflíček T, Ryska O, Zazula R, Skibová J, Hájek M: Devascularization Surgical Model of Acute Liver Failure in Minipigs. *Eur Surg Res*, 2004, 36: 179 -184
- 13 - Terblanche,J., Hickman,R.: Animal models of fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci.* 36, 1991:770-774
- 14 - Smith,JS., Harrison,GG.: The effects of multiple anesthetics on the livers of rats subjected to microsomal enzyme induction. A preliminary report. *S Afr Med J* 47, 1973:797-799
- 15 - Kalpana.K., Ong,HS.,Soo,KC., et al.: An improved model of galactosamin-induced fulminant hepatic failure in the pig. *J Surg Res* 82,1999:121-130
- 16 - Henne-Bruns,D., Artwohl,J., Broelsch,C., et al.: Acetaminophen-induced acute hepatic failure in pigs: Controversial results to other animal models *Res Exp Med* 188,1988:463-472
- 17 - Miller,DJ., Hickman,R.,Fratter,R., et al.: An animal model of fulminant hepatic failure: A feasibility study. *Gastroenterology* 71,1976:109-113
- 18 - Tonnesen,K.: Experimental liver failure. A comparison between hepatectomy and hepatic devascularization in the pig. *Acta Chir Scand* 143,1997:271-277
- 19 - Hanid,MA., Mackenzie,RL., Jenne,RE, et al.:Intracranial pressure in pigs with surgically induced acute liver failure. *Gastroenterology* 76,1979:123-131
- 20 - Filipponi,F., Boggi,U.,Meacci,L.,et al.: A new technique for total hepatectomy in the pig for testing liver support devices. *Surgery* 125, 1999:448-455
- 21 - Filipponi,F., Fabbri,LP., Marsili,M., et al.: A new surgical model of acute liver failure in the pig: Experimental procedure and analysis of liver injury. *Eur Surg Res* 23,1991:58-64
- 22 - de Groot,GH., Reuvers,CB., Schalm,SW., et al.: A reproducible model of acute hepatic failure by transient ischemia in the pig. *J Surg Res* 42,1987:92-100
- 23 – Selen, PO: Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* 1976;13:29 -83
- 24 – Khalili (tm), Navarro A, Ting P et al: Bioartificial liver treatment prolongs survival and lowers intracranial pressure in pigs with fulminant hepatic failure. *Artif Organs* 25, 2001: 566 – 570
- 25 - Maganto P, Cienfuegos JA, Santamaria L et al: Cryopreservation and transplantation of hepatocytes: an approach for culture and clinical application. *Cryobiology* 25, 1988: 311 - 314

- 26 - Cuervas-Mons V, Colás A, Rivera JA et al: In vivo efficacy of a bioartificial liver improving spontaneous recovery from fulminant hepatic failure: a controlled study in pigs. *Transplantation* 69, 2000: 337- 344
- 27 – Borra M, Galavotti D, Bellini C et al: Advanced technology for extracorporeal liver support system devices. *Int J Artif Organs* 25, 2002: 939 – 949
- 28 – Sosef MN, Abrahamse LSL, Van de Kerkhove MP et al: Assessment of the AMC – bioartificial liver in the anhepatic pig. *Transplantation* 73, 2002: 204 – 209
- 29 – Naka S, Takeshita K, Yamamoto T et al: Bioartificial liver support system using porcine hepatocytes entrapped in a three – dimensional hollow fiber module with collagen gel: an evaluation in the swine acute liver failure model. *Artif Organs* 23, 1999: 822 – 828
- 30 - Busse B, Smith MD, Gerlach JC: Treatment of acute liver failure: hybrid liver support. A critical overview. *Langenbeck's Arch Surg*, 384, 1999: 588 – 599
- 31 - Hayes PC, Lee A: What progress with artificial livers ? *Lancet* 358, 2001: 1286 - 1287
- 32 - O'Grady JG, Alexander GJ, Hayllar KM et al: Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 97, 1989: 439 – 445.