

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Plzni
Chirurgická klinika

Dizertační práce

MUDr. Richard Pálek

2021

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Plzni



MUDr. Richard Pálek

**MOŽNOSTI REKONSTRUKCE PORTÁLNÍHO ŘEČIŠTĚ V RÁMCI
CHIRURGICKÉHO ŘEŠENÍ POKROČILÉHO KARCINOMU PANKREATU –
EXPERIMENT NA VELKÉM ZVÍŘETI**

Doktorandská dizertační práce

Školitel: prof. MUDr. Václav Liška, Ph.D.

Chirurgická klinika

2021

1 Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval 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 Plzni, 12.3.2021

2 Poděkování

Chtěl bych poděkovat všem, kteří se podíleli na vzniku této práce a také všem, kteří mi byli oporou po dobu postgraduálního studia. Předně děkuji svému školiteli prof. MUDr. Václavu Liškovi, Ph.D., a to nejen za možnost zabývat se touto aktuální tematikou, za vedení a podporu v průběhu studia, ale i za předávání cenných klinických zkušeností. Děkuji prof. MUDr. Vladislavu Třeškovi, DrSc. za možnost pracovat na Chirurgické klinice v Plzni a za jeho podporu experimentální práce. Dále děkuji svému spoluškoliteli prof. MUDr. et Mgr. Zbyňku Tonarovi, Ph.D. za jeho cenné odborné připomínky a konzultace. Mé poděkování patří všem, kteří spolupracovali na samotném experimentu a jeho etablování. Za optimalizaci anestezie děkuji prof. MUDr. Janu Benešovi, Ph.D., MUDr. Lence Haidingerové a Bc. Ondřeji Brzoňovi. Děkuji doc. MUDr. Hynku Mírkovi, Ph.D. a MUDr. Kristýně Bajcurové, Ph.D. za zajištění ultrasonografie v rámci experimentu. Dále děkuji Mgr. Bc. Patriku Mikovi za provedení histologického vyšetření, doc. Ing. Janu Vimmrovi, Ph.D. a Ing. Aleně Jonášové, Ph.D. za realizaci matematických modelů. Děkuji Ing. Petru Hoškovi, Ph.D. za provedení statistické analýzy a Renatě Michálkové za biochemické vyšetření krevních vzorků. Mgr. Bc. Vladislavě Mlejnkové Dvořákové, MUDr. Jáchymu Rosendorfovi a širokému kolektivu pregraduálních studentů děkuji za dlouhodobou spolupráci nejen na tomto experimentu. Déle také děkuji MUDr. Ladě Eberlové, Ph.D. za odborné konzultace, Lence Jettlebové za zpracování obrázků a MUDr. Haně Šustkové za korekturu textu. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině a partnerce Lucii za jejich podporu a trpělivost v průběhu studia.

Obsah

1	PROHLÁŠENÍ	1
2	PODĚKOVÁNÍ.....	2
3	SEZNAM ZKRATEK	6
4	ÚVOD.....	8
5	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
5.1	ANATOMIE PANKREATU	9
5.1.1	<i>Cévní zásobení pankreatu.....</i>	<i>10</i>
5.1.2	<i>Lymfatická drenáž pankreatu</i>	<i>11</i>
5.1.3	<i>Inervace pankreatu</i>	<i>12</i>
5.2	FYZIOLOGIE PANKREATU	12
5.2.1	<i>Exokrinní pankreas.....</i>	<i>12</i>
5.2.2	<i>Endokrinní pankreas.....</i>	<i>15</i>
5.3	TUMORY PANKREATU.....	17
5.3.1	<i>Tumory endokrinní části pankreatu</i>	<i>17</i>
5.3.2	<i>Tumory exokrinní části pankreatu</i>	<i>19</i>
5.3.3	<i>Ostatní tumory pankreatu</i>	<i>19</i>
5.4	KARCINOM PANKREATU.....	20
5.4.1	<i>Patogeneze karcinomu pankreatu – prekurzorové léze</i>	<i>20</i>
5.4.2	<i>Patogeneze karcinomu pankreatu – molekulární patologie</i>	<i>22</i>
5.4.3	<i>Etiologie karcinomu pankreatu</i>	<i>24</i>
5.5	OVLIVNITELNÉ RIZIKOVÉ FAKTORY	24
5.5.1.1	<i>Neovlivnitelné rizikové faktory.....</i>	<i>27</i>
5.5.2	<i>Epidemiologie karcinomu pankreatu</i>	<i>29</i>
5.5.2.1	<i>Incidence</i>	<i>29</i>
5.5.2.2	<i>Mortalita</i>	<i>29</i>
5.5.3	<i>Diagnostika karcinomu pankreatu</i>	<i>30</i>
5.5.3.1	<i>Zobrazovací metody</i>	<i>31</i>
5.5.3.2	<i>Biomarkery.....</i>	<i>32</i>
5.5.3.3	<i>Screening.....</i>	<i>33</i>
5.5.4	<i>Staging karcinomu pankreatu</i>	<i>33</i>
5.5.4.1	<i>TNM klasifikace.....</i>	<i>33</i>
5.5.4.2	<i>Resekabilita</i>	<i>36</i>
5.6	LÉČBA KARCINOMU PANKREATU	38
5.6.1	<i>Chirurgická léčba.....</i>	<i>38</i>
5.6.1.1	<i>Chirurgické výkony.....</i>	<i>38</i>
5.6.1.2	<i>Radikalita výkonu.....</i>	<i>42</i>
5.6.1.3	<i>Cévní resekce</i>	<i>44</i>

5.6.1.4	Lymfadenektomie.....	54
5.6.1.5	Optimalizace chirurgické léčby.....	57
5.6.2	Onkologická léčba	62
5.6.2.1	Paliativní chemoterapie.....	62
5.6.2.2	Adjuvantní chemoterapie	64
5.6.2.3	Neoadjuvantní chemoterapie	66
5.6.3	Lokální terapie	67
6	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	68
6.1	CÍLE	68
6.2	METODIKA.....	69
6.2.1	<i>Legislativa</i>	69
6.2.2	<i>Experimentální skupiny</i>	69
6.2.3	<i>Imunokompatibilita dárců a příjemců štěpu</i>	69
6.2.4	<i>Premedikace a celková anestezie</i>	70
6.2.5	<i>Odběr cévních štěpů</i>	71
6.2.6	<i>Hemipankreatoduodenektomie a rekonstrukce vena portae</i>	71
6.2.7	<i>Pooperační péče a sledování</i>	74
6.2.8	<i>Histologické vyšetření</i>	75
6.2.9	<i>Matematické modelování</i>	76
6.2.10.	<i>Statistická analýza</i>	81
6.3	VÝSLEDKY.....	82
6.3.1	<i>Přežití zvířat</i>	82
6.3.2	<i>Trombóza vena portae</i>	82
6.3.3	<i>Parametry portálního řečiště</i>	82
6.3.4	<i>Analýza biochemických parametrů</i>	85
6.3.5	<i>Histologické vyšetření</i>	87
6.3.5.1	<i>Struktura žilních štěpů před implantací</i>	87
6.3.5.2	<i>Struktura štěpů po implantaci</i>	89
6.3.5.3	<i>Ostatní kvalitativní histologické změny</i>	91
6.3.6	<i>Matematické modelování</i>	91
6.4	DISKUZE	100
6.5	ZÁVĚR	108
7	POUŽITÁ LITERATURA	109
8	SOUHRN	135
9	SUMMARY	136
10	VĚDECKÉ VÝSTUPY AUTORA	137
10.1	PUBLIKACE V PERIODICÍCH S IMPAKT FAKTOREM	137
10.2	PUBLIKACE V OSTATNÍCH PERIODICÍCH	139

10.3	KNIHY, KAPITOLY V KNIHÁCH	141
10.4	VYBRANÉ PŘEDNÁŠKY A POSTERY	142
10.5	KOPIE NEJVÝZNAMNĚJŠÍCH PRACÍ V HEPATOPANKREATOBILIÁRNÍ PROBLEMATICE	145

3 Seznam zkratek

AHC	arteria hepatica communis
AHP	arteria hepatica propria
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AL	arteria lienalis
AMS	arteria mesenterica superior
ANOVA	analýza rozptylu (analysis of variance)
BMI	body mass index
CA 19-9	karbohydrátový antigen 19-9
CT	výpočetní tomografie (computed tomography)
DFI	bezpříznakové přežití (disease-free survival)
DUSG	dopplerovská ultrasonografie
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EUS	endoskopická ultrasonografie
FR	fyzilogický roztok
IGF	inzulinu podobný růstový faktor (insulin like growth factor)
IOPN	intraduktální onkocytická papilární neoplazie
IPMN	intraduktální papilární mucinózní neoplazie
ISGPS	International Study Group of Pancreatic Surgery
ITPN	intraduktální tubulopapilární neoplazie
MCN	mucinózní cystická neoplazie
MR	magnetická rezonance
OS	celkové přežití (overall survival)
PanIN	pankreatická intraepiteliální neoplazie
PARP inhibitor	inhibitor poly(ADP-ribóza)polymerázy
PET/CT	pozitronová emisní tomografie v kombinaci s CT
PTFE	polytetrafluorethylen
RRT	relativní čas setrvání částic (relative residence time)
RTc	čas setrvání částic (residence time)
TAVM	časově zprůměrovaný rozsah rychlosti (time-averaged velocity magnitude)

TAWSS	časově zprůměrované smykové napětí na stěně (time-averaged wall shear stress)
TC	truncus coeliacus
UICC	Union for International Cancer Control
VCI	vena cava inferior
VCS	vena cava superior
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
VL	vena lienalis
VMS	vena mesenterica superior
VP	vena portae
5-FU	5-fluorouracil

4 Úvod

Karcinom pankreatu je agresivní nádorové onemocnění, které je v rozvinutých zemích jednou z nejčastějších příčin úmrtí na maligní choroby (1). Do této pozice se řadí nejen z důvodu rostoucí incidence, ale i vzhledem k pokrokům v léčbě ostatních nádorových onemocnění (2). Pro prognózu pacientů je zásadní, zda je tumor v době diagnózy resekabilní. Radikální resekce totiž zůstává jedinou potenciálně kurativní léčbou. Vzhledem k absenci časných symptomů je bohužel u 80–90 % pacientů diagnóza stanovena až ve stadiu lokálně pokročilého nebo metastatického onemocnění (3,4). Nadějí pro zvýšení podílu pacientů indikovaných k chirurgické léčbě je neoadjuvantní chemoterapie, jejíž uplatnění v posledních letech stoupá (5).

Vzhledem k anatomickým poměrům karcinom pankreatu často invaduje do okolních cévních struktur, zejména do vena portae (VP) a vena mesenterica superior (VMS). Odstranění tumoru i za cenu žilní resekce je ve specializovaných pracovištích v současné době doporučeným postupem (6). V některých případech musí být postižená část žíly nahrazena interponovaným štěpem. Existuje několik typů těchto štěpů, přičemž zatím nejčastěji jsou využívány autologní žilní štěpy. Jejich odběr však dále zatěžuje pacienta při i tak náročném operačním výkonu. Výhodné se zdá využití alogenních žilních štěpů, které již publikovalo několik zahraničních center (7–9). Není však jasné, jakého anatomického původu by měly tyto alogenní žilní štěpy být. V rámci klinické praxe se nabízí využití štěpů ze systémového řečiště, tedy pánevních žil, nebo samotné VP, které lze získat při odběru orgánů k transplantaci. Systémové řečiště a řečiště VP se však funkčně odlišují a je pravděpodobné, že odlišné budou i jejich biomechanické vlastnosti, které by mohly výsledky rekonstrukce ovlivnit (10,11). Cílem prezentovaného experimentu bylo v rámci zvířecího modelu hemipankreatoduodenektomie vyhodnotit, který ze zmíněných původů alogenních žilních štěpů je v této indikaci vhodnější.

Význam optimální metodiky rekonstrukce VP/VMS s minimalizací rizika trombotizace může v budoucnu růst, a to vzhledem k úspěchům moderních režimů adjuvantní chemoterapie a již zmíněnému potenciálu neoadjuvantní léčby na zvýšení množství pacientů indikovaných k radikální resekci (5).

5 Teoretická část

5.1 Anatomie pankreatu

Pankreas je orgán uložený v retroperitoneu v úrovni prvního a druhého lumbálního obratle mezi duodenálním ohbím a hilem sleziny. U dospělého člověka je 15–20 cm dlouhý a váží 75–100 gramů. Z chirurgického pohledu lze rozlišit hlavu, krček, tělo a ocas pankreatu.

Hlava pankreatu je lokalizována v ohbí duodena dorzálně za úponem mesocolon transversum. Za hlavou pankreatu se nachází dolní dutá žíla (vena cava inferior, VCI), obě renální žíly a pravá renální tepna. Krček pankreatu je krátký, přibližně dvoucentimetrový segment. Přímo za krčkem pankreatu pak prochází VP, která zde vzniká soutokem VMS a lienální žíly (vena lienalis, VL). Poblíž tohoto soutoku se také připojuje dolní mezenterická žíla do VL. Někdy je přítomen společný soutok obou mezenterických žil a VL, který pak dává vznik VP. Vlevo od VMS probíhá paralelně horní mezenterická tepna (arteria mesenterica superior, AMS). Z hlavy pankreatu pokračuje processus uncinatus, který se obtáčí kolem pravého laterálního okraje VMS a končí přibližně na úrovni mezi touto žilou a AMS. Žilní drenáž z oblasti hlavy pankreatu zajišťují drobné žilní větve, které vstupují do VP a VMS na pravé laterální a zadní straně. Přední strana portální žíly je většinou bez žilních vstupů. V průběhu resekce pankreatu lze tedy většinou proniknout mezi VP a krček pankreatu. Tento krok však není možný, pokud v tomto místě tumor pankreatu invaduje do VP. Na zadní hraně hlavy pankreatu a dále skrz ni probíhá ductus choledochus, ústící do duodena v oblasti Vaterské papily.

Tělo a ocas pankreatu leží před VL a lienální tepnou. Do VL vstupuje velké množství drobných žilních větví z pankreatu. V případě provedení slezinu šetřící distální pankreatektomie musí být tyto žilní větve bezpečně přerušeny. Přední strana pankreatu je kryta peritoneem a je součástí zadní stěny omentální burzy.

Pro pochopení anatomie pankreatického vývodu (ductus pancreaticus) je nutná znalost embryonálního vývoje pankreatu. Pankreas vzniká splynutím ventrálního a dorzálního pupenu. Vývod z menšího ventrálního pupenu se připojuje do ductus choledochus, vývod většího dorzálního pupenu je drénován do duodena. Ventrální pupen po rotaci směrem doprava a kolem zadní strany duodena splývá s dorzálním

pupenem. Ventrální pupen se tak stává spodní částí hlavy pankreatu a tvoří processus uncinatus, dorzální pupen tvoří tělo a ocas pankreatu. Většinou se vývody obou pupenů v pankreatu spojují a ventrální vývod ústí jako hlavní pankreatický vývod (ductus pancreaticus Wirsungi) s ductus choledochus na papilla duodeni major (Vateri). Vývod z dorzálního pupenu neboli akcesorní pankreatický vývod navíc většinou ústí na papilla duodeni minor (Santorini) asi 2 cm proximálně od Vaterské papily. Naopak asi ve třetině případů tento vývod samostatné vyústění do duodena nemá. Asi u 10 % případů nedojde ke spojení obou pankreatických vývodů, pak je většina pankreatické tkáně drénována přes papilla Santorini a pouze část hlavy pankreatu přes Vaterskou papilu. Tento stav je označován jako pancreas divisum (12–15).

5.1.1 Cévní zásobení pankreatu

Tepenné zásobení pankreatu je zajištěno tepennými větvemi odstupujícími z truncus coeliacus (TC) a z AMS. Arteria gastroduodenalis vydává větve zvané arteriae pancreaticoduodenales superiores anteriores et posteriores. Z AMS pak odstupují arteriae pancreaticoduodenales inferiores anteriores et posteriores. Zmíněné skupiny větví se spojují a tvoří arkády ze kterých odstupují četné cévy vyživující hlavu pankreatu a duodenum. Z tohoto důvodu není možné resekovat hlavu pankreatu a nezpůsobit devaskularizaci duodena. Pokud má být duodenum zachováno, musí být ponechán alespoň lem pankreatu obsahující zmíněné arkády. Tělo a ocas pankreatu jsou zásobeny větvemi z arteria lienalis (AL), která probíhá na zadním horním okraji pankreatu, a arteria pancreatica inferior. Druhá jmenovaná probíhá rovnoběžně s AL o něco níže, a je větví AMS. Obě zmíněné tepny jsou pak spojeny třemi větvemi a vznikají tak arkády v těle pankreatu, zodpovědné za jeho bohaté cévní zásobení. Žilní řečiště do jisté míry kopíruje tepenné zásobení. Žíly většinou probíhají blíže povrchu pankreatu. Drenáž z horní části hlavy pankreatu směřuje přímo do VP, z dolní části pak do VMS. Z těla a ocasu pankreatu pak krev odtéká do VL (12,15).

5.1.2 Lymfatická drenáž pankreatu

Lymfatická drenáž je zajištěna hustou sítí lymfatických cév a uzlin. I proto je karcinom pankreatu často spojen s pozitivitou lymfatických uzlin a častou lokální rekurencí. Bylo navrženo několik klasifikací lymfatických uzlin pankreatu. Např. Cubilla rozdělil uzliny do pěti skupin podle jejich lokalizace v okolí pankreatu (16). Jedná se o horní, dolní, přední, zadní a lienální skupinu uzlin. Do uzlin horní skupiny se dostává lymfa z přední i zadní strany horní části hlavy a těla pankreatu. Uzliny dolní skupiny pak sbírají lymfu z přední i zadní strany kaudální části pankreatu. Lienální skupina uzlin dostává lymfu z oblasti ocasu pankreatu. Přední a zadní skupina uzlin pak drénuje přední, respektive zadní stranu hlavy pankreatu. Standring pak zjednodušila tuto klasifikaci a uzliny rozdělila pouze na skupinu drénující hlavu a krček pankreatu a skupinu drénující tělo a ocas (17). V oblasti hlavy pankreatu je lymfatický systém komplexnější, což odpovídá jejímu tepennému zásobení. Lymfa z této oblasti odtéká cestou uzlin uložených podél arteriae pancreaticoduodenales, podél AMS a podél arteria hepatica communis (AHC). Některé lymfatické cévy z této oblasti také vedou do uzlin uložených paraaortálně a podél TC (17). Studie potvrzují, že by neměla existovat komunikace mezi pankreatem a lymfatickými uzlinami žaludku. Nebývají totiž přítomné metastázy karcinomu pankreatu do lymfatických uzlin podél malé či velké kurvatury žaludku. Dále bylo zjištěno, že lymfatické cévy z oblasti hlavy a těla pankreatu nevstupují do oblasti ocasu pankreatu a do lineálních uzlin. Naopak lymfa z oblasti ocasu ale může být drénována do uzlin pro tělo pankreatu. Některé lymfatické cévy se dokonce vlévají přímo do ductus thoracicus, nebo do něj vstupují prostřednictvím paraaortálních uzlin. Lymfatika pankreatu dále komunikují s uzlinami v mesocolon transversum a v mezenteriu. Tumory těla a ocasu pankreatu pak často metastazují do těchto uzlin a v případě ocasu pankreatu také do hilu sleziny (18).

Znalost lymfatické drenáže pankreatu je důležitá pro porozumění doporučením ohledně rozsahu lymfadenektomie při chirurgickém řešení karcinomu pankreatu. V současnosti doporučená chirurgická nomenklatura a doporučovaný rozsah lymfadenektomie je uveden v části lymfadenektomie. Lymfatický systém může být dále důležitý i u akutní a chronické pankreatitidy, kdy jeho obstrukce může zhoršovat závažnost a zvyšovat sklon k rekurencím (12,19).

5.1.3 Inervace pankreatu

Na inervaci pankreatu se podílejí vlákna sympatiku a parasympatiku, která regulují sekreci jeho endokrinní i exokrinní části. Sympatikus sekreci obou částí stimuluje a parasympatikus ji naopak tlumí (20). Dále se uplatňují i neurony produkující somatostatin, vazoaktivní intestinální peptid nebo jiné aminy a peptidy. Funkce těchto neuronů není zcela jasná, ale pravděpodobně mají také vliv na endokrinní i exokrinní část. Pankreas je také bohatě zásoben senzitivními nervy zodpovědnými za silnou bolest v případě akutní či chronické pankreatitidy a pokročilých nádorů pankreatu (12). Intervenční blokády senzitivních vláken na úrovni plexus coeliacus pak mohou být využity k úlevě od silné chronické bolesti (21). V souvislosti s karcinomem pankreatu umožňuje bohatá inervace šíření tumoru podél nervových vláken. Jedná se o tzv. perineurální invazi. Karcinom pankreatu má ze všech solidních tumorů nejvyšší prevalenci perineurální invaze, která je spojena s vyšším rizikem rekurence a kratším celkovým přežitím (overall survival, OS) (22).

5.2 Fyziologie pankreatu

Z funkčního hlediska se pankreas dělí na exokrinní a endokrinní část. Exokrinní část pankreatu v podobě acinárních buněk tvoří 75–90 % objemu celého orgánu. Endokrinní část, tedy hormonálně aktivní buňky uspořádané do Langerhansových ostrůvků, pak u dospělého člověka zabírají kolem 2 % objemu pankreatu. Zbytek pankreatu tvoří extracelulární matrix, cévy a pankreatické vývody. Exokrinní i endokrinní část pankreatu je řízena komplexním neurohumorálním systémem, který navíc koordinuje součinnost obou částí (23,24).

5.2.1 Exokrinní pankreas

Exokrinní část pankreatu produkuje pankreatickou šťávu, které vytvoří kolem 2 litrů denně. Jedná se o sekret acinárních (serózních) buněk a buněk pankreatických vývodů, který je bezbarvý, izotonický, alkalický a obsahuje řadu převážně inaktivních trávicích enzymů. Jednotlivé aciny jsou formovány hroznovitě seskupenými acinárními buňkami, které jsou polarizované a při své apikální straně, kterou naléhají na lumen acinu, obsahují četná zymogenní granula. Na rozdíl od buněk endokrinní části pankreatu nejsou acinární buňky specializované a každá acinární buňka tak produkuje

všechny typy enzymů. Poměr enzymů v pankreatickém sekretu je regulován podle složení stravy. Duktální část exokrinního pankreatu tvoří vsunuté (interkalární) vývody, které jsou napojené na lumina acinů a vystylají je centroacinární buňky, následně pak intralobulární vývody (vystlané kubickým epitelem), interlobulární vývody (vystlané cylindrickým epitelem) a slinivkové vývody (ductus pancreaticus Wirsungii a ductus pancreaticus accessorius, vystlané cylindrickým epitelem) (24,25).

Rozlišují se amylolytické, proteolytické, lipolytické a nukleolytické enzymy.

Pankreatická amyláza je uvolňována v aktivní formě, její úlohou je štěpení škrobu a glykogenu na jednoduché cukry (např. glukóza, maltóza, dextriny). Tyto jednoduché cukry pak již mohou být vstřebávány aktivním transportem přes kartáčový lem enterocytů.

Proteolytické enzymy jsou uvolňovány ve formě proenzymů, jejichž aktivaci zajišťují další enzymy. Trypsinogen je aktivován na trypsin enterokinázou, kterou produkují buňky duodenální sliznice. K aktivaci tedy dochází až mimo pankreas v tenkém střevě. Trypsin je pak zodpovědný za aktivaci ostatních proteolytických enzymů pankreatu (chymotrypsin, elastáza, karboxypeptidáza A a B) a také některých lipolytických (kolipáza, fosfolipáza). Proteolytické enzymy štěpí vazby mezi aminokyselinami tvořícími trávené proteiny. Jednotlivé aminokyseliny nebo dipeptidy jsou pak vstřebávány enterocyty.

Mezi **lipolytické enzymy** se řadí pankreatická lipáza, která štěpí neutrální tuky na monoacylglyceroly a volné mastné kyseliny. Pro zvýšení její aktivity je však nezbytná kolipáza, která je také uvolňována z pankreatu. Další lipolytické enzymy jsou pak fosfolipáza štěpící fosfolipidy, a cholesterolesteráza podílející se na štěpení cholesterolu. Hydrolyzované tuky jsou pak v lumen tenkého střeva zabudovány do micel a v této formě transportovány k povrchu enterocytů. K trávení tuků jsou nezbytné žlučové kyseliny, které jednak zajišťují emulgaci tuků a jednak tvoří povrch samotných micel.

Nukleolytické enzymy jsou deoxyribonukleáza a ribonukleáza, štěpící DNA, respektive RNA, na jednotlivé nukleotidy (26,27).

Centroacinární buňky a další buňky pankreatických vývodů přidávají do pankreatické šťávy vodu a elektrolyty včetně bikarbonátu, který je zodpovědný za zvýšení pH pankreatické šťávy. Pankreatická šťáva tak neutralizuje kyselý chymus

ze žaludku, což chrání stěnu tenkého střeva a vzniká optimální pH pro funkci pankreatických enzymů (12,26).

Pankreatická sekrece je regulována podle přijímané potravy neurohumorálně, a to ve třech fázích. Cefalická fáze je spouštěna čichovými a vizuálními podněty a je zodpovědná za 10–20 % pankreatické sekrece stimulované příjmem potravy. Vstupem tráveniny do žaludku a jeho roztažením je spuštěna fáze gastrická, která se pojí s 15–25 % sekrece pankreatu při jídle. Největší vliv má fáze intestinální, která je stimulována tráveninou vstupující do duodena a proximálního jejunu, odpovídá za 60–70 % pankreatické sekrece. Cefalická a gastrická fáze jsou zprostředkovány cestou parasympatiku a ovlivňují zejména sekreci trávicích enzymů, méně sekreci bikarbonátu. Intestinální fáze je regulována jak neurálně, tak humorálně, a stimuluje sekreci pankreatické šťávy bohaté na enzymy i bikarbonát. Sekretin a cholecystokinin jsou hlavní hormony humorální regulace. Sekretin produkují buňky proximálního jejunu v reakci na příchod kyselého chymu ze žaludku. Působí hlavně na buňky vývodů a zvyšuje tak sekreci pankreatické šťávy s vysokou koncentrací bikarbonátu. Cholecystokinin vzniká v epitelových buňkách duodena a proximálního jejunu stimulovaných přítomností peptidů a mastných kyselin. Je zodpovědný za stimulaci acinárních buněk. Oba zmíněné hormony navíc potencují svou sekreci navzájem (24). Na regulaci se podílejí i další hormony, jako gastrin produkovaný G buňkami sliznice žaludečního antra a vazoaktivní intestinální peptid, který má pleiotropní efekt a uplatňuje se i jako neurotransmitter (28,29). Pankreatickou sekreci tlumí somatostatin přímým působením na tkáň pankreatu a nepřímo inhibicí sekrece výše zmíněných hormonů. Inhibiční efekt má i glukagon a pankreatický polypeptid. Tyto hormony vznikají v endokrinní části pankreatu a budou blíže popsány dále. Exokrinní část pankreatu je tak ovlivňována i buňkami endokrinní části (24).

Pankreatická šťáva odchází z oblasti acinů skrze vsunuté vývody spojující se do intralobulárních vývodů, ve kterých je dosaženo finální koncentrace elektrolytů a šťáva pak pokračuje přes interlobulární pankreatické vývody do slinivkových vývodů. V případě opakovaných zánětů, jizvení či obstrukce pankreatikolity může dojít k poškození vývodného systému, a tím i k destrukci exokrinní části pankreatu a její insuficienci. Insuficience exokrinního pankreatu se může objevit i po chirurgických výkonech (24,30). Lehčí a středně těžká insuficience bývají kompenzovány, nebo se projeví sníženým vstřebáváním vitamínů rozpustných v tucích. Těžkou insuficienci

pak doprovází steatorea, ke které většinou dochází až při poklesu sekrece pankreatické lipázy pod 10 % normální produkce (31).

5.2.2 Endokrinní pankreas

Pankreas obsahuje dohromady kolem jednoho milionu Langerhansových ostrůvků. Každý ostrůvek se skládá z tří až čtyř tisíc endokrinně aktivních buněk. Lze rozlišit pět základních typů těchto buněk: alfa buňky produkující glukagon, beta buňky produkující inzulin, delta buňky produkující somatostatin, epsilon buňky produkující ghrelin a PP buňky, které tvoří pankreatický polypeptid. Každý z těchto typů buněk je specializovaný na produkci zmíněných hormonů, která dominuje, v menším množství však produkují i další hormony (12).

Inzulin je nejvíce prozkoumaným hormonem pankreatu. Ve formě proinzulinu vzniká v endoplazmatickém retikulu beta buněk, skládá se z alfa a beta řetězce, které jsou navzájem spojeny dvěma disulfidickými můstky a spojovacím C-peptidem. Proinzulin je skladován v Golgiho aparátu ve formě granul. Odštěpením C-peptidu vzniká samotný inzulin. Sekreci inzulinu lze rozdělit na dvě fáze. V první fázi je z beta buněk přechodně uvolňován uskladněný inzulin. K této fázi dochází pouhých několik minut po vzestupu glykemie a trvá přibližně deset minut. Pokud je stimul k sekreci inzulinu dostatečně intenzivní nebo pokud trvá dostatečně dlouho, nastává druhá fáze. V této fázi se jedná o postupné uvolňování nově syntetizovaného inzulinu (12,32). K vrcholu uvolňování inzulinu v rámci druhé fáze dochází po dvou až třech hodinách a sekrece trvá, dokud není dosaženo normoglykemie (33,34). Na regulaci beta buněk se kromě glykemie podílí i neurální podněty, ostatní hormony pankreatu a intestinální hormony zvané inkretiny. Perorální podání glukózy je tak silnějším podnětem k sekreci inzulinu než intravenózní aplikace. Z tohoto důvodu je k diagnostice diabetes mellitus využíván orální glukózový toleranční test. Kromě již uvedených mechanismů je sekrece inzulinu ovlivňována i plazmatickou hladinou některých aminokyselin (32). Úlohou inzulinu je snížení glykemie, k čemuž dochází inhibicí glukoneogeneze a usnadněním transportu glukózy do buněk. Inzulin dále inhibuje glykogenolýzu a beta oxidaci mastných kyselin a stimuluje proteosyntézu. Pankreas vykazuje poměrně velkou funkční rezervu pro produkci inzulinu. V normálním stavu tak lze resekovat až 80% tkáně pankreatu bez rizika rozvoje diabetu. V případě postižení tkáně

pankreatu, např. chronickou pankreatitidou, může být riziková i resekce menší části orgánu (12).

Glukagon produkovaný v alfa buňkách má opačný efekt než inzulin. Podporuje glykogenolýzu a glukoneogenezi v játrech a vede tedy k hyperglykemii. Hlavním regulátorem je opět hladina glukózy, která při vysokých hodnotách blokuje syntézu glukagonu a při nízkých hodnotách naopak stimuluje. V případě diabetu způsobeného insuficiencí pankreatu tedy hrozí rozvoj hypoglykemie v důsledku nedostatku glukagonu (32).

Somatostatin, produkovaný delta buňkami, je kromě pankreatu tvořen ve střevě, v hypotalamu a i jinde v centrální nervové soustavě (35). Má významnou regulační funkci jako inhibitor endokrinní a exokrinní sekrece, motility gastrointestinálního traktu a je regulátorem neurotransmise. Bylo objeveno pět typů receptorů pro somatostatin. Analog somatostatinu octreotid se váže jen na některé z těchto receptorů a má delší biologický poločas než somatostatin. Je proto využíván k prevenci vzniku a léčbě pankreatických a enterálních píštělí (12,36).

Ghrelín je kromě epsilon buněk pankreatu produkován ve velkém množství v oblasti fundu žaludku. Tento hormon stimuluje sekreci růstového hormonu. Jeho hladina bývá zvýšena u obézních jedinců a je označován jako orexigenní. Ghrelín dále inhibuje působení inzulinu na hepatocyty a odpověď beta buněk na inkretiny a glukózu. Je tedy schopný regulovat odpověď buněk Langerhansových ostrůvků na hormonální a nutriční stimuly (37).

Sekrece **pankreatického polypeptidu** PP buňkami pankreatu je ovlivňována jednak složením tráveniny a jednak neurálně. Trávenina vede ke zvýšení sekrece sekretinu a cholecystokininu, které pak mají přímo vliv na PP buňky. Významnější spouštěč sekrece pankreatického polypeptidu je však stimulace prostřednictvím nervus vagus. Sledování plazmatické hladiny pankreatického polypeptidu tak může být využita jako ověření úspěšně provedené vagotomie či přítomnosti diabetické autonomní neuropatie (12). Dále pankreatický polypeptid pozitivně reguluje expresi inzulinových receptorů na hepatocytech a tím metabolismus glukózy. V případě pankreatické insuficience v důsledku rozsáhlé resekce či chronické pankreatitidy pak může dojít kromě snížení sekrece inzulinu i k oslabení citlivosti hepatocytů k inzulinu z důvodu nedostatku inzulinových receptorů. Může se tak rozvinout tzv. pankreatogenní diabetes mellitus, také označovaný jako typ 3c (38,39). U pacientů s tímto typem

diabetu pak vede aplikace pankreatického polypeptidu ke snížení spotřeby inzulínu (38).

Kromě zmíněných pěti základních hormonů pankreatu vzniká v buňkách Langerhansových ostrůvků množství dalších proteinů. Příkladem může být **amylin** a **pankreastatin**, nebo neuropeptidy **serotonin** a **vazoaktivní intestinální peptid**. Podílejí se zejména na regulaci endokrinní i exokrinní části pankreatu a dalších částí gastrointestinálního traktu.

Zastoupení jednotlivých typů buněk v Langerhansových ostrůvcích závisí na lokalizaci v rámci pankreatu. Ostrůvky v oblasti hlavy pankreatu obsahují větší poměr PP buněk a méně alfa buněk. V oblasti těla a ocasu pankreatu je poměr opačný. Při hemipankreatoduodenektomii tak může být odstraněno až 95 % PP buněk. Toto může být důvodem proč je po hemipankreatoduodenektomii vyšší incidence intolerance glukózy v porovnání s resekcí stejného objemu ocasu a těla pankreatu při distální pankreatektomii. Poměr typů endokrinních buněk v ostrůvcích vysvětluje i typickou lokalizaci některých endokrinních tumorů pankreatu (12,40).

5.3 Tumory pankreatu

Nádory pankreatu se dělí podle jejich původu na tumory vycházející z buněk exokrinní, nebo endokrinní části. Vzácněji se pak objevují sekundární tumory, mezenchymální tumory, nebo lymfomy. Tumory odvozené z endokrinních buněk jsou méně časté, jedná se pouze přibližně o 5 % všech malignit pankreatu. Jsou to méně agresivní nádory v porovnání s duktálním adenokarcinomem pankreatu a pětileté OS pacientů s touto diagnózou se udává kolem 42 % (41–43). Naopak duktální adenokarcinom tvoří kolem 90 % všech malignit pankreatu (43,44). Tento tumor je typický svým agresivním chováním, pětileté OS je pouze kolem 6 % (43,45).

5.3.1 Tumory endokrinní části pankreatu

Endokrinní neboli neuroendokrinní tumory pankreatu lze rozdělit na dobře diferencované s nízkou proliferační aktivitou, které se chovají benigně a dále na tumory špatně diferencované s vysokou proliferační aktivitou, chovající se maligně (46). Endokrinní tumory se také dělí podle produkce hormonů na tumory funkční a nefunkční. Funkční tumory se manifestují klinickými syndromy, u většiny tumorů však

tyto symptomy chybí a jsou tedy označovány jako nefunkční. Většina nefunkčních tumorů této skupiny má maligní potenciál, mohou nekontrolovaně růst a metastazovat. Nefunkční neuroendokrinní tumory jsou nejčastěji náhodným nálezem, nebo se v pokročilejších stádiích manifestují podobně jako adenokarcinom pankreatu bolestmi a úbytkem na váze. Endokrinní tumory pankreatu se většinou vyskytují pouze sporadicky. U 10–30 % pacientů jsou pak součástí jiných onemocnění. Nejčastěji se jedná o MEN I syndrom, kdy jsou diagnostikovány u 40–80 % pacientů s tímto onemocněním (12). Jedná se o hereditární syndrom charakterizovaný výskytem endokrinních tumorů příštítných tělísek, duodena, pankreatu a hypofýzy (47). Dále se endokrinní tumory pankreatu objevují u 10–15 % pacientů se syndromem von Hippel Lindau (48). K tomuto syndromu dochází v důsledku mutace tumor supresorového genu VHL a jsou pro něj typické tumory sítnice, centrálního nervového systému, ledvin, nadledvin a pankreatu (49).

Nejčastějším funkčním endokrinním tumorem pankreatu je **inzulinom**, tumor odvozený z beta buněk pankreatu. Buňky tohoto tumoru produkují inzulin a dochází tak k manifestaci v podobě hypoglykemií. Pouze kolem 10% inzulinomů jsou maligními tumory (12,50).

Gastrinom je další z endokrinních tumorů, buňky tohoto tumoru produkují gastrin a dochází ke klinické manifestaci v podobě Zollinger-Ellisonova syndromu. Pacienti jsou postiženi výskytem mnohočetných peptických vředů v důsledku nadměrné produkce kyselé žaludeční šťávy. Gastrinom s maligním chováním, kdy dochází k metastazování do lymfatických uzlin a jater, se vyskytuje ve zhruba 50 % případů.

VIPom je tumor z buněk produkujících vazoaktivní intestinální peptid. Klinickým projevem jsou těžké průjmy, které vedou k dehydrataci a iontovému rozvratu. Tumor je většinou lokalizovaný v distální části pankreatu a často je v době diagnózy již rozšířen mimo pankreas.

Dalším tumorem endokrinního původu je **glukagonom** způsobující v důsledku nadměrné produkce glukagonu diabetes v kombinaci s nekrolytickým migrujícím erytémem.

Somatostatinom se manifestuje rozvojem žlučových konkrementů v důsledku cholestázy, diabetem kvůli snížené produkci inzulinu a steatoreou z důvodu snížené sekrece pankreatických enzymů a žluči (12).

5.3.2 Tumory exokrinní části pankreatu

Nádory s původem v exokrinních buňkách pankreatu jsou dle WHO klasifikace aktualizované v roce 2019 rozděleny na skupinu tumorů benigních a premaligních lézí a na skupinu maligních nádorů (51).

Mezi benigní tumory je řazen **serózní cystadenom**. Léze premaligní, nebo také léze s maligním potenciálem, jsou: **pankreatická intraepiteliální neoplazie (PanIN)**, **intraduktální papilární mucinózní neoplazie (IPMN)**, **intraduktální tubulopapilární neoplazie (ITPN)**, **intraduktální onkocytická papilární neoplazie (IOPN)** a **mucinózní cystická neoplazie (MCN)**. Tyto léze se mohou chovat benigně, ale mohou i progredovat v maligní tumor (51).

Nejčastějším maligním tumorem exokrinní části je **duktální adenokarcinom pankreatu**, který tvoří kolem 90 % všech malignit pankreatu (43,44). Existuje několik podtypů duktálního adenokarcinomu pankreatu jako např. adenoskvamózní, koloidní či medulární karcinom. Dále se mezi maligní tumory řadí karcinomy z acinárních buněk. Jedná se o **cystadenokarcinom z acinárních buněk** a smíšené karcinomy, jako je např. smíšený acinární duktální karcinom nebo smíšený acinární neuroendokrinní karcinom. **Pankreatoblastom** je maligním nádorem vyskytujícím se dominantně u dětí, u dospělých je velmi vzácný (52). Posledním maligním tumorem exokrinní části je pak **solidní pseudopapilární neoplazie** (také známým jako solidní pseudopapilární tumor či papilární cystická neoplazie). Tento tumor se vyskytuje častěji v oblasti těla a ocasu pankreatu a nejčastěji postihuje mladé ženy ve 3. a 4. dekádě života. Pokud se vyskytne u mužů, je to ve vyšším věku a chová se agresivněji (53).

5.3.3 Ostatní tumory pankreatu

Kromě zmíněných tumorů se mohou v pankreatu vyskytnout i **mezenchymální tumory** jako lymfangiom, lipom nebo solitární fibrózní tumor. Dále jsou v pankreatu popisovány **lymfomy** (difuzní velkobuněčný B-lymfom, folikulární lymfom, MALT lymfom a T-buněčné lymfomy) a samozřejmě **sekundární nádory** (54). Sekundární nádory lze dělit na ty, které do pankreatu prorůstají (např. karcinom žaludku, duodena, žlučových cest či příčného tračníku) a ty které do pankreatu hematogenně metastazují (př. karcinomy plic, gastrointestinálního traktu, ledvin, prsů či maligní melanom) (55).

Metastázy pankreatu jsou však v porovnání s primárními tumory pankreatu vzácnější (56).

5.4 Karcinom pankreatu

5.4.1 Patogeneze karcinomu pankreatu – prekurzorové léze

Duktální adenokarcinom pankreatu vzniká z epiteliálních buněk pankreatických vývodů. Ke vzniku karcinomu dochází pravděpodobně postupným procesem hromadění buněčných změn. Předpokládá se, že karcinom vzniká z prekurzorových lézí, kterých je v současnosti udáváno celkem pět typů a byly již výše zmíněny (PanIN, IPMN, ITPN, IOPN, MCN). Kromě PanIN lézí, které lze diagnostikovat pouze mikroskopicky, je možné všechny ostatní zmíněné léze pozorovat pomocí zobrazovacích metod (57).

PanIN je léze ne větší než 0,5 cm, charakterizovaná buněčnými a architektonickými atypii epitelu pankreatických vývodů. Podle stupně atypii se PanIN dělí na low-grade (dříve označovaný jako PanIN-1 a PanIN-2) a na high-grade (dříve PanIN-3) (58). Low-grade PanIN léze jsou často náhodně diagnostikovány u osob starších padesáti let, naopak high-grade PanIN léze jsou často spojeny s duktálním adenokarcinomem. Přes 92 % low-grade lézí již obsahuje mutaci KRAS a počet KRAS mutovaných alel pak stoupá směrem k high-grade lézím (59). Pojí se i s dalšími mutacemi a od IPMN se mikroskopicky liší velikostí a kratšími papilami, kterých je i méně (57).

IPMN léze jsou cystické, velikosti alespoň 1 cm a nacházejí se v hlavním pankreatickém vývodu či v jeho větvích. Většinou se jedná o solitární léze, ale až ve 40 % případů mohou být vícečetné. IPMN se dělí na podtypy podle rizika malignizace, podle lokalizace a podle typu obsažených buněk. Rozlišuje se low-grade IPMN s nízkým stupněm dysplazie a high-grade IPMN s vysokým stupněm dysplazie. IPMN z hlavního vývodu pankreatu (main duct-type IPMN) vychází z jeho epitelu a často způsobuje jeho dilataci. Tato léze obsahuje buňky s vysokým stupněm dysplazie a často doprovází duktální adenokarcinom. Druhým typem dle lokalizace je IPMN vedlejšího vývodu (branch duct-type IPMN), který nezpůsobuje dilataci vývodů a pojí se s menším rizikem malignizace. Podle typu buněk, které v lézi dominují,

pak lze odlišit gastrický, intestinální a pankreatobiliární typ IPMN (60,61). Intestinální a pankreatobiliární typ IPMN je často u lézí z hlavního vývodu a je více rizikový oproti gastrickému, který je častější u IPMN vedlejšího vývodu (62). Také IPMN je spojena s mutací KRAS, která je přítomna u 30–80 % lézí a frekvence mutovaných alele opět stoupá směrem k více rizikovým IPMN (63). Vyšší riziko progresu v karcinomu je také u lézí větších než 3 cm a v případě klinických symptomů v podobě bolestí a hubnutí (64).

ITPN má charakter solidního útvaru bez cystické složky, většinou je v době diagnózy větší než 1 cm a obturuje pankreatický vývod. Jedná se o vzácnou lézi, která doprovází méně než 1 % nádorů exokrinního pankreatu (65,66). Ovšem více než polovina těchto lézí je spojena s adenokarcinomem pankreatu (65).

IOPN je samostatná jednotka, dříve spadající pod IPMN. Jedná se o cystickou lézi, často větší než 1 cm a často lokalizovanou v hlavním pankreatickém vývodu (67). Většinou jsou tyto léze kategorizovány jako high-grade a 60 % jich je spojeno s adenokarcinomem pankreatu (68). IOPN obsahuje buňky s onkocytickými znaky, které jsou pak přítomné i v samotném adenokarcinomu spojeném s touto lézí (67).

MCN je cystická léze obsahující epiteliální buňky produkující mucin. Typicky se jedná o solitární ložiska, která mohou být unilokulární nebo multilokulární (69). Tato léze je obtížně odlišitelná od IPMN a to pouze díky přítomnosti ovariálního stromatu, které je pro MCN charakteristické (70). Na rozdíl od IPMN nebývá MCN spojená s pankreatickým vývodem. Pomocí pouhé cytologie nelze MCN od IPMN odlišit. Až dvacetkrát častěji je MCN diagnostikována u žen oproti mužům, a častěji je lokalizována v oblasti těla nebo ocasu pankreatu (69). Maximálně 16 % těchto lézí je spojených s invazivním karcinomem a méně často malignizují v porovnání s IPMN. Pokud dojde k progresi v invazivní karcinomu jedná se nejčastěji o tubulární adenokarcinom (71). Mohou se ale objevit i jiné typy jako např. adenoskvamózní, koloidní či nediferencovaný karcinom (72).

Bližší zkoumání těchto prekurzorových lézí a znalost jejich chování má potenciál v možnostech časnější diagnózy karcinomu pankreatu, která je pro jeho léčbu zásadní. Rozlišení uvedených prekurzorů je rovněž podstatné vzhledem k jejich spojitosti s různými histologickými typy karcinomu pankreatu (57).

5.4.2 Patogeneze karcinomu pankreatu – molekulární patologie

Akumulací genetických či epigenetických alterací může docházet k progresi výše uvedených premaligních lézí v karcinomu pankreatu (43). Ve většině případů dochází k postupnému rozvoji karcinomu z lézí low-grade PanIN progredujících v high-grade PanIN a následně v samotný karcinom. Méně častý je pak vznik karcinomu v terénu cystických neoplazií, jako je např. IPMN. IPMN však karcinom pankreatu může jen doprovázet a mít odlišný genetický profil poukazující na rozdílný vývoj (73). Patogeneze karcinomu pankreatu není zatím zcela objasněna a vyžaduje další detailnější zkoumání (74).

U 10 % pacientů s karcinomem pankreatu se jedná o hereditární výskyt. Zbýlých 90 % jsou pak tumory sporadické (43). Hereditární karcinom se vyskytuje u pacientů, kteří mají některý z vrozených syndromů spojených s vyšším rizikem vzniku karcinomu pankreatu. S vyšším rizikem se pojí Peutz-Jeghersův syndrom, familiární adenomatózní polypóza, syndrom familiárního melanomu, hereditární nepolypózní kolorektální karcinom a hereditární karcinom prsu a ovaria (75). Tyto syndromy se týkají 15–20 % pacientů s hereditárním karcinomem pankreatu (76). Např. u pacientů s Peutz-Jeghersovým syndromem je riziko vzniku karcinomu pankreatu až 132krát vyšší oproti normální populaci (77). Další možností hereditárního karcinomu pankreatu je zvýšené riziko u pacientů s hereditární pankreatitidou a cystickou fibrózou. U těchto onemocnění dochází k chronickému zánětu a fibrotické přestavbě tkáně pankreatu a následně ke zvýšenému riziku vzniku malignity (75). Poslední a nejpočetnější skupinou pacientů s hereditárním výskytem jsou pacienti s familiárním karcinomem pankreatu. Definiční familiárního karcinomu pankreatu splňují pacienti, kteří mají dva nebo více příbuzných prvního stupně s tímto onemocněním a nemají žádný z výše uvedených hereditárních syndromů (75). Pokud má pacient 2 takovéto příbuzné, je u něj 6,4krát vyšší riziko rozvoje karcinomu pankreatu oproti ostatní populaci. Pokud má pacient takové příbuzné 3, je riziko dokonce 32krát vyšší (78).

Hereditární karcinomy pankreatu se pojí např. s mutacemi genů BRCA1, BRCA2, PALB2, APC a DNA mismatch repair genů (MLH1, MSH2), které jsou charakteristické pro jednotlivé hereditární syndromy a onemocnění (43). Familiární karcinom zatím nebyl definován stran přítomných genetických aberací. Nejčastěji pozorovanou mutací je však mutace genu BRCA2, která je pozorována u 15–17 %

pacientů s familiárním karcinomem pankreatu (79,80). Mutace genu PALB2 je druhou nejčastější známou mutací s výskytem u 3,1–3,7 % pacientů (81,82). Zbývá tak odhalit genetickou podstatu familiárního karcinomu pankreatu asi u 80 % postižených rodin (75). Jsou známé i některé mutace podílející se na patogenezi jak hereditárních, tak i sporadických karcinomů (KRAS, CDKN2A, TP53 a SMAD4) (83). Mutace v genu KRAS je přítomna téměř u všech prekurzorových lézí a také karcinomu pankreatu. CDKN2A, TP53 a SMAD4 jsou tumor supresorové geny u kterých byla prokázána role v progresi lézí PanIN. Méně často mutované geny u karcinomu pankreatu jsou pak např. MLL3, TGFBR2 a ATM. Průměrně je u karcinomu pankreatu přítomno 50–80 non-silent mutací, časté jsou i strukturní chromozomální aberace a epigenetické alterace (43).

Znalost těchto genetických charakteristik a dědičných predispozic může být klíčová pro časnou diagnostiku. Pacienti se známým vyšším rizikem by totiž mohli být včas zařazeni do screeningu. Význam však může mít genetická charakteristika karcinomu pankreatu i pro léčbu a prognózu. Např. některé maligní tumory s prokázanou mikrosatelitní nestabilitou v důsledku defektních DNA mismatch repair genů vykazují výrazně lepší odpověď na imunologickou léčbu (84). U karcinomu pankreatu jsou sice mutace mismatch repair genů vzácné, ale i tak je doporučeno testování jejich přítomnosti u pacientů s pokročilým onemocněním. Jako potenciální léčba se pak nabízí protilátka pembrolizumab, která je schválena pro léčbu malignit s přítomností těchto mutací (85). Dalším příkladem možného využití genetické charakteristiky je přítomnost mutací BRCA a PALB2 u karcinomu pankreatu. Takové tumory jsou senzitivní k PARP inhibitorům (inhibitory poly(ADP-ribóza)polymerázy), které inhibicí reparačních mechanismů buňky zvyšují účinnost alkylační chemoterapie (86,87). Mutace v genech pro regulátory chromatinu (např. MLL, MLL2, MLL3, ARID1A) jsou spojeny s delším OS, zatímco ztráta supresorového genu SMAD4 vykazuje kratší OS. Přes velký počet známých mutací u karcinomu pankreatu se pravděpodobně mutované geny podílejí na několika zásadních signálních drahách jako jsou např.: Wnt/Notch, TGF- β a systémy reparace DNA (88). Cílení na tyto dráhy v rámci léčby by mělo být efektivnější než cílení na jednotlivé mutace. Důkazem je např. již zmíněná efektivita PARP inhibitorů u tumorů s BRCA mutacemi. I znalosti méně častých mutací u karcinomu pankreatu pak může pomoci v identifikaci těchto drah. Velký význam má celogenomové sekvenování, díky kterému bylo prokázáno

množství mutací u karcinomu pankreatu, a které by mělo pomoci dalšímu hlubšímu porozumění patogenezi tohoto onemocnění (89). Potenciální terapeutické cíle byly identifikovány u více než třetiny karcinomů pankreatu. V případě zahrnutí i KRAS a TP53 mutací, se jedná až o 97 % karcinomů (90). Personalizovaná léčba by tak mohla v budoucnu výrazně ovlivnit prognózu pacientů s karcinomem pankreatu (43).

5.4.3 Etiologie karcinomu pankreatu

Karcinom pankreatu vzniká jednak v důsledku výše uvedených dědičných predispozic a jednak v důsledku genetických alterací získaných v průběhu života. Patogeneze tohoto onemocnění je komplexní a množství různých výše popisovaných genetických alterací podporuje předpoklad, že pro vznik karcinomu pankreatu je potřeba více faktorů působících v navazujících krocích. U některých pacientů např. chronický zánět pankreatu v kombinaci s environmentálními faktory, jako je abusus alkoholu a kouření, vede k somatickým mutacím a dediferenciaci buněk pankreatu v maligní buňky. U pacientů s dědičnými předpoklady je pak potřeba méně kritických kroků při patogenezi karcinomu pankreatu a riziko vzniku malignity je tak vyšší (91).

Bylo identifikováno několik rizikových faktorů, které lze rozdělit jako ovlivnitelné a neovlivnitelné. Je možné i rozdělení na faktory environmentální (většinou ovlivnitelné) a osobní charakteristiky (neovlivnitelné) (92).

5.5 Ovlivnitelné rizikové faktory

Mezi ovlivnitelné rizikové faktory se řadí kouření tabáku, konzumace alkoholu, obezita, dietní faktory, infekce a expozice toxinům.

Nejvýznamnějším ovlivnitelným faktorem je kouření tabáku. Jeho kauzální spojitost s karcinomem pankreatu je oficiálně uznávána i společností International Agency for Research on Cancer (93). U kuřáků je obecně riziko vzniku karcinomu pankreatu téměř dvakrát vyšší oproti nekuřákům. Riziko pak roste s dobou kouření a s množstvím vykouřených cigaret za den (94). U exkuřáků se riziko postupně snižuje, ale dle studie na evropské populaci zůstává zvýšené po dobu alespoň 5 let od zanechání kouření (95). Jiná studie na nizozemské populaci udává srovnání rizika po vynechání kouření s rizikem u nekuřáků až po 20 a více letech (96). Podle britské

studie z roku 2011 bylo u mužů 26,2 % karcinomů pankreatu spojených s kouřením, u žen tomu tak bylo v 31 % případů (96). Karcinogeny uvolňované při kouření tabáku se dostávají do kontaktu s buňkami pankreatu nepřímo krevní cestou a pravděpodobně také expozicí tkáně pankreatu duodenálnímu obsahu a žluči. K této expozici může docházet v oblasti hlavy pankreatu, kde je také nejčastější výskyt karcinomu (97). Studie na skupině pacientů s hereditární pankreatitidou poukazuje na možné interakce mezi genetickou výbavou jedince a environmentálními faktory, kdy u kuřáků vznikl karcinom pankreatu dvakrát častěji a ve výrazně nižším věku oproti nekuřákům (98).

Z mnohých studií vyplývá, že riziko vzniku karcinomu pankreatu je vyšší u osob, které ve velké míře konzumují alkohol (99–101). Možným vysvětlením je role alkoholu při rozvoji chronické pankreatitidy. Metabolizováním alkoholu vznikají pro buňky toxické látky jako je acetaldehyd a reaktivní kyslíkové radikály. Tyto metabolity kromě ovlivnění exokrinní i endokrinní funkce pankreatu aktivují hvězdicovité buňky nacházející se v pankreatu. Jedná se o buňky typu myofibroblastů, které jsou takto nazývány vzhledem ke svému tvaru. Mohou se vyskytovat v klidové nebo aktivované formě. Právě po jejich aktivaci jsou následně zodpovědné za fibrotizaci pankreatu a navíc indukují uvolnění prozánětlivých mediátorů. Může tak docházet k poškození buněčných organel a ke genetickým alteracím vedoucím ke karcinogenezi (94). Monocentrické studie i velké meta-analýzy se shodují v závěru, že nižší až střední míra konzumace alkoholu není spojena s vyšším rizikem, ale je tomu tak až u silných konzumentů (100). Jako dávka, u které již je riziko zvýšené, bývá udávána konzumace více než 45 nebo 60 gramů etanolu za den. Nejvyšší riziko bylo prokázáno u osob konzumujících destiláty (102,103). Rahman v další studii poukazuje na zvýšené riziko i u slabých a středních konzumentů alkoholu, kteří jsou zároveň kuřáky (104).

Dalším z ovlivnitelných environmentálních faktorů je obezita. Předpokládá se několik možných mechanismů, kterými se obezita podílí na zvyšování rizika výskytu karcinomu pankreatu. Obezita je často spojena s nedostatečnou tělesnou aktivitou, nezdravým stravováním a životním stylem a pravděpodobně také se zatím neobjasněnými genetickými faktory. Adipocyty mohou uvolňovat potenciální karcinogeny, jako jsou adipokiny, inzulinu podobný růstový faktor (insulin like growth factor, IGF) a vaskulární endotelový růstový faktor (vascular endothelial growth factor, VEGF) (105). Obezita je spojena s chronickým zánětem, který se také podílí

na karcinogenezi (106). Vliv obezity či vyšší hodnoty body mass indexu (BMI) na zvýšení rizika vzniku karcinomu pankreatu dokazuje několik meta-analýz. U obézních žen i mužů je toto riziko signifikantně vyšší (107,108) a byla prokázána i vyšší mortalita obézních pacientů s karcinomem pankreatu (109). Studie na 110 jedincích pak dokládá vztah mezi prekancerózami pankreatu, steatózou pankreatu, podkožním a viscerálním tukem a BMI. Dle této studie existuje navíc korelace mezi počtem lézí PanIN a procentem viscerálního tuku (110).

Dietní faktory mají prokázaný, jak vliv na zvýšení rizika vzniku karcinomu pankreatu, ale zároveň i naopak mají prokázaný vliv protektivní. Mezi riziková jídla se řadí červené maso (zejména upravované při vysokých teplotách), konzervované maso, potraviny bohaté na cholesterol, smažená jídla a další potraviny obsahující nitrosaminy. Konzumace červeného masa může dle provedené meta-analýzy zvyšovat riziko rozvoje karcinomu pankreatu o 48 %. Naopak potraviny bohaté na antioxidanty jako zejména ovoce a zelenina snižují riziko o 38 % (111). V jedné ze studií na evropské populaci však vliv konzumace červeného nebo konzervovaného masa na riziko vzniku karcinomu pankreatu nebyl prokázán, naopak bylo identifikováno jako rizikové drůbeží maso (112). Britská studie z roku 2016 pak dokazuje nižší mortalitu na karcinom pankreatu u pacientů, kteří jedí málo masa nebo jsou vegetariáni či vegani (113).

Dále je také zmiňována asociace mezi infekčními onemocněními a vyšším rizikem karcinomu pankreatu. Vyšší riziko bylo pozorováno u pacientů s hepatitidou C a zejména pak s hepatitidou B (114,115). Ve studiích zohledňujících i ostatní rizikové faktory jako diabetes či obezita je však zvýšené riziko méně výrazné nebo nebylo prokázáno vůbec (116,117). Role virové hepatitidy při vzniku karcinomu pankreatu není zcela jasná a dle některých autorů se tak jedná pouze o koincidenci (117). Je tedy potřeba dalších studií, které by vliv hepatitidy B a C na vznik karcinomu pankreatu detailněji objasnily. Z dalších infekčních agens je udáváno vyšší riziko u pacientů s CagA (cytotoxin asociovaný gen A) negativním kmenem *Helicobacter pylori* (118,119). Rovněž je zkoumán vliv *Enterococcus faecalis* na progresi chronické pankreatitidy a vzniku karcinomu pankreatu (120).

Profesní vystavení některým látkám, jako je např. nikl, kadmium či arzen, má dle publikovaných studií vliv na vyšší riziko karcinomu pankreatu, a to cestou zvyšování nestability DNA. Naopak selen by měl riziko snižovat vzhledem k možnosti

zvýšení aktivity proteinu p53 a roli selenoproteinů v neutralizaci reaktivních kyslíkových radikálů (94).

5.5.1.1 Neovlivitelné rizikové faktory

Mezi neovlivitelné faktory se řadí: pohlaví, věk, příslušnost k etnické skupině, krevní skupina, diabetes mellitus a již zmíněná rodinná historie a genetické faktory.

Karcinom pankreatu je onemocnění častěji se vyskytující v mužské populaci. U mužů je udávaná incidence celosvětově 5,5 případů na 100 000, u žen pak 4 případy na 100 000 (121). Rozdíl v incidenci podle pohlaví se liší mezi rozvojovými státy a vyspělými zeměmi. Ve vyspělých zemích je incidence karcinomu pankreatu u mužů 8,5 případů na 100 000, zatímco u žen pouze 5,6 na 100 000. V případě rozvojových zemí je rozdíl výrazně menší, a to 3,3 případů na 100 000 u mužů, a 2,4 na 100 000 u žen (92). Vliv reprodukčních faktorů u žen však nebyl prokázán jako příčina těchto rozdílů (122,123). Jako nejpravděpodobnější příčina se tak udává odlišný životní styl, a to konkrétně častější kouření a konzumace alkoholu u mužů. Není však vyloučeno, že existují i doposud neobjevené genetické faktory vysvětlující odlišnou incidenci u mužů a žen (94).

Karcinom pankreatu je onemocnění zejména starší populace, většina pacientů je starších 50 let, výskyt před 40. rokem věku je vzácný (124). Riziko výskytu je nejvyšší mezi 60 a 80 lety s mediánem věku v době diagnózy 71 let (121). Důvod výskytu hlavně ve vysokém věku není zcela jasný, ale je možné, že od vzniku premaligní léze či zánětu pankreatu trvá poměrně dlouho, než dojde k malignizaci (94). Dle studie na více než 13 000 pacientech s karcinomem pankreatu pak byl prokázán o 13–14 měsíců vyšší průměrný věk pacientů s lokálně pokročilým karcinomem pankreatu (stadia T3, T4) v době diagnózy oproti pacientům s T1 tumory, což naopak poukazuje na rychlou progresi již maligních lézí (125).

Rozdílná incidence karcinomu pankreatu u různých etnických skupin byla doložena mnoha studii (126–128). Afroameričané mají vyšší riziko vzniku oproti kavkazské rase. Nejnižší riziko je pak u Asiatů (94). Rozdílnou incidenci nelze vysvětlit pouze ovlivnitelnými faktory, jako je již zmíněné kouření, konzumace alkoholu a stravovací návyky (129). Vliv mají zřejmě genetické odlišnosti, které mohou vést k vyššímu riziku vzniku získaných mutací. Příkladem je rozdílná schopnost detoxikace tabákových produktů (130,131). Studie porovávající onkogenní mutace mezi Číňany,

Japonci a obyvateli západních zemí prokázaly rozdílné exprese genů KRAS a p53 (132). Genetické odlišnosti mohou pravděpodobně vysvětlit i odlišné přežití podle rasy, kdy u Asiatů je pozorováno delší OS oproti ostatním etnikům (94).

Mnoha studii byla prokázána souvislost mezi krevními skupinami a některými typy malignit včetně karcinomu pankreatu. Antigeny AB0 systému se totiž nenacházejí pouze na povrchu erytrocytů, ale také na některých dalších normálních i patologických buňkách (133,134). Studie se shodují, že nižší riziko vzniku karcinomu pankreatu mají lidé se skupinou 0 oproti ostatním skupinám (A, B, AB) (135,136). Stran prognózy a významu krevní skupiny nejsou výsledky jednoznačné, pouze podle některých studií existuje korelace mezi krevní skupinou 0 a delším OS (137,138). Jiné studie tuto souvislost neprokázaly (139,140). Není však znám patofyziologický proces, který by dostatečně vysvětloval vliv krevních skupin na vznik a chování karcinomu pankreatu. Provedená meta-analýza dokumentuje asociaci rizika vzniku karcinomu pankreatu se séropozitivitou *Helicobacter pylori* u pacientů s krevními skupinami A, B a AB. Tato spojitost naopak nebyla pozorována u pacientů s krevní skupinou 0. Hypotézou je, že by krevní skupina mohla ovlivňovat chování *Helicobacter pylori* přítomností antigenů v mucinu gastrointestinálního traktu (141).

V posledních dekádách bylo prokázáno, že dlouhotrvající chronická pankreatitida je rizikovým faktorem vzniku karcinomu pankreatu (142). Tato asociace byla potvrzena neohledě na etiologii samotné chronické pankreatitidy, tedy jak u osob s alkoholickou, tak i hereditární pankreatitidou (142). Významně vyšší riziko je však až u pacientů s chronickým zánětem trvajícím 30–40 let. U pacientů s chronickou pankreatitidou trvajícím 10 nebo 20 let je riziko vyšší pouze o 1,8 %, respektive o 4 % (143).

Dalším známým faktorem je diabetes mellitus 2. typu, který po delší době trvání zvyšuje riziko vzniku karcinomu pankreatu (144,145). Bylo však zjištěno, že u 74–88 % pacientů s karcinomem pankreatu, kteří mají rovněž diabetes, byl diagnostikován diabetes maximálně o 2 roky dříve než k diagnóze karcinomu (146). Vysvětlením je, že mezi oběma onemocněními existuje oboustranná závislost. Nejenže je diabetes mellitus rizikovým faktorem pro vznik karcinomu pankreatu, ale i karcinom pankreatu může být příčinou diabetu. Přesné mechanismy tohoto ovlivňování nejsou zatím známy. Diabetes mellitus je tak zároveň rizikovým faktorem i potenciálním

diagnostickým markerem. Rozvoj diabetu ve vyšším věku totiž může upozornit na možné riziko rozvoje karcinomu (147).

5.5.2 Epidemiologie karcinomu pankreatu

5.5.2.1 Incidence

Celosvětově je karcinom pankreatu 14. nejčastějším maligním onemocněním ale zároveň je 7. nejčastější příčinou úmrtí na malignitu (45). Rozdíl mezi jeho incidencí a mortalitou je bohužel minimální. V ekonomicky rozvinutých zemích je v současnosti dokonce 4. nejčastější příčinou úmrtí ze všech malignit (1). Dle odhadů databáze GLOBOCAN bylo ve světě za rok 2018 diagnostikováno přes 450 000 nových případů (121). Nejvyšší incidence karcinomu pankreatu je v Evropě (7,7 případů na 100 000 obyvatel) a v Severní Americe (7,6 případů na 100 000 obyvatel). Naopak nejméně případů v přepočtu na obyvatele pak vykazuje Afrika (2,2 na 100 000). Incidence tohoto onemocnění se zvyšuje, což dokládá studie na datech z USA (2). Mezi lety 1973 a 2014 rostla incidence ročně o 1,03 %. V roce 2030 by tak karcinom pankreatu mohl být až 2. nejčastější příčinou úmrtí na maligní nádorová onemocnění, a to i vzhledem k pokrokům v léčbě ostatních malignit a ke stárnutí populace (2).

5.5.2.2 Mortalita

Mortalita se také liší podle geografických oblastí. Nejvíce úmrtí odpovídá zemím s nejvyšší incidencí, tedy např. 7,6 úmrtí na 100 000 obyvatel v západní Evropě a 6,5 na 100 000 v Severní Americe, zatímco v západní Africe to bylo ve stejném období pouze 2,1 úmrtí na 100 000 obyvatel. Počty úmrtí jen o málo nižší než je incidence dokládají, že se jedná o velmi agresivní maligní onemocnění (45). Karcinom pankreatu je navíc v důsledku absence časných symptomů u 80–90 % pacientů diagnostikován až ve stadiu neresekabilního tumoru (4). Pokročilost tumoru v době diagnózy je zcela zásadním faktorem, který ovlivňuje přežívání pacientů s karcinomem pankreatu. Pětileté OS je kolem pouhých 6 %, jednotlivé studie uvádějí hodnoty mezi 2–9 % (4,45). Délka přežití se prodlužuje v případě, že rozsah tumoru umožňuje radikální chirurgickou léčbu. V tomto případě se pak pětileté OS udává mezi 7–27 % (45). Specializovaná centra udávají pětileté OS po provedení radikální

chirurgické resekce mezi 20–25 % (148,149). Vliv na prodloužení OS má v takových případech i adjuvantní chemoterapie (5). Naopak pacienti s lokálně pokročilými tumory přežijí průměrně 6–11 měsíců a pacienti se vzdálenými metastázami pak pouze 2–6 měsíců (45).

Pro porovnání – neuroendokrinní tumory pankreatu vykazují výrazně lepší OS, a to i v případě neoperabilních stádií (150). Srovnání pětiletého OS u karcinomu pankreatu a neuroendokrinních tumorů je prezentováno v tabulce č. 1 dle Rawla (94).

Tabulka č. 1: Pětileté OS pacientů s diagnózou karcinomu pankreatu nebo neuroendokrinního tumoru, převzato z Rawla et al. (94).

Klinické stadium	Karcinom pankreatu	Neuroendokrinní tumory pankreatu
IA	14 %	61 %
IB	12 %	61 %
II	7 %	52 %
III	3 %	41 %
IV	1 %	16 %

5.5.3 Diagnostika karcinomu pankreatu

Klinické symptomy u pacientů s karcinomem pankreatu bývají jednak nespecifické a jednak se většinou rozvíjejí až v pokročilých stadiích onemocnění (151). Ikterus je ze všech známých klinických příznaků spojený s nejvyšším rizikem, i tak ale zůstává jeho specificita velmi nízká. Dle studie na britské populaci je riziko přítomnosti karcinomu pankreatu u pacientů nad 40 let s nově vzniklým ikterem 4 % (152). Pouze u 30 % pacientů s karcinomem pankreatu byl však dle uvedené studie ikterus zaznamenán (152). Ostatní uváděné příznaky jsou ještě méně specifické, lze uvést např. hubnutí, bolesti břicha, bolesti zad, dyspepsii, nechutenství a nově vzniklý diabetes mellitus (151).

5.5.3.1 Zobrazovací metody

Klíčovou roli v diagnostice karcinomu pankreatu hrají zobrazovací metody. Výpočetní tomografie (CT) je nejčastěji využívanou modalitou u pacientů s podezřením na toto onemocnění. Vzhledem k nižší ceně a lepší dostupnosti oproti magnetické rezonanci (MR) je dvoufázové CT doporučenou metodou první volby (153).

Dvoufázové kontrastní CT břicha je vyšetření umožňující posoudit jak samotný parenchym pankreatu a případný tumor, tak okolní tepny a portální řečiště, což umožňuje zhodnotit lokoregionální rozsah a vyjádřit se k resekabilitě tumoru. CT je zároveň schopno odhalit případné jaterní metastázy (153). Senzitivita CT v detekci karcinomu pankreatu se uvádí mezi 76–96 % (154–156). Nejčastěji je karcinom pankreatu na CT patrný jako hypodenzní masa navazující na parenchym pankreatu. Sekundárními znaky jsou pak dilatace pankreatického vývodu nebo jeho nepravidelný průměr a atrofie pankreatu periferně od překážky působící obstrukci vývodu. Pokud je tumor lokalizován v hlavě pankreatu, může působit obstrukci hlavního pankreatického vývodu i žlučovodu. V takovém případě se hovoří o tzv. příznaku dvou vývodů (*double duct sign*) (157). Sekundární znaky jsou častější u větších tumorů (nad 2 cm). Méně často může být tumor i izodenzní s parenchymem pankreatu, a to zejména u tumorů menších (méně než 2 cm). Podle CT izodenzní tumory bývají většinou dobře diferencované a mají menší podíl nekrózy (157,158). I samotné sekundární znaky na CT by měly vzbudit podezření a mělo by být doplněno další vyšetření jako např. MR nebo pozitronová emisní tomografie v kombinaci s CT (PET/CT), které mohou detekovat i dle CT izodenzní tumory (151).

MR je oproti CT přínosnější při zobrazení vlastní tkáně pankreatu. Při využití difuzně vážených obrazů se dostává senzitivita detekce karcinomu pankreatu na 96–98 % (159). Své uplatnění má tedy MR v zobrazování tumorů pankreatu, které nejsou patrné na CT, dále v charakterizaci nejasných jaterních ložisek, která bývají často detekována na CT a není jasné, zda se jedná o benigní léze či metastázy karcinomu pankreatu. Samozřejmě má pak MR uplatnění u pacientů, u kterých je kontrastní CT kontraindikováno, jako jsou těžké alergie na kontrastní látku nebo renální insuficience. Předmětem zkoumání zůstává potenciální schopnost MR rozlišit karcinom pankreatu od některých forem chronické či autoimunitní pankreatitidy (151).

PET/CT s využitím fluorodeoxyglukózy má přínos zejména v detekci vzdálených metastáz. Je schopné detekovat metastázy, které nebyly rozpoznány na CT či MR vyšetření (160). Při posouzení lokoregionálního rozsahu tumoru je PET/CT stejně jako MR méně přesné a metodou první volby pro staging karcinomu pankreatu je tedy dvoufázové kontrastní CT (151).

Endoskopická ultrasonografie (EUS) má výhodu v kombinaci detailního zobrazení s možností odběru bioptického nebo cytologického vzorku. EUS však musí být prováděno zkušeným endoskopistou a i přesto mohou být nálezy více ovlivněny vyšetřujícím v porovnání s výše zmíněnými zobrazovacími metodami. Přínosná je možnost detekce malých lézí pankreatu, které nejsou patrné ani při MR vyšetření. EUS může také pomoci při stagingu karcinomu pankreatu. Zejména metastatické postižení lymfatických uzlin je pomocí EUS dobře vyšetřitelné (161). Využití samotné EUS ke stagingu však není podloženo dostatkem dat (162). Pokročilé metodiky EUS, jako je kontrastní EUS, elastografie či konfokální laserová endomikroskopie mohou pomoci ve vyšetřování solidních či cystických lézí pankreatu (163).

5.5.3.2 Biomarkery

Byla zkoumána řada biomarkerů, zejména v krevním séru, ale i v pankreatické šťávě nebo dokonce v dechu, které by mohly pomoci v diagnostice karcinomu pankreatu (45). Markerem s nejvyšší specificitou je CA 19-9 (karbohydrátový antigen 19-9). Sérová hladina CA 19-9 vykazuje pro karcinom pankreatu senzitivitu 79–81 % a specificitu 82–90 % (164). CA 19-9 se uplatňuje zejména v monitorování efektu systémové léčby v neoadjuvantním režimu, nebo u pacientů s metastatickým onemocněním. Dále může tento marker poukazovat na rekurenci karcinomu pankreatu. Předoperačně zvýšená hladina předoperačně je pak také spojena s vyšším rizikem R1 resekce a může predikovat kratší OS. Využití v rámci primární diagnostiky je však limitováno zvýšením hladiny tohoto markeru při biliární obstrukci obecně (165). Z ostatních potenciálně využitelných markerů lze jmenovat např. CEA (karcinoembryonální antigen) nebo CA 125 (karbohydrátový antigen 125), které mohou být u karcinomu pankreatu zvýšené, ale jsou výrazně méně specifické (45).

5.5.3.3 Screening

Vzhledem k tomu, že je karcinom pankreatu v 80–90 % případů v době diagnózy již neresekabilní, nabízí se otázka možností časnější diagnózy (4). Celoživotní riziko vzniku karcinomu pankreatu je kolem 1 %, tedy nízké na to, aby byl opodstatněný plošný screening celé populace (166). Dle mezinárodního konsorcia pro screening karcinomu pankreatu jsou však podskupinou vhodnou ke screeningu pacienti splňující definici familiárního karcinomu pankreatu (167,168). Zmíněné konsorcium doporučuje se započít s screeningem u těchto pacientů po 50. roce věku nebo ve věku o 10 let nižším, než ve kterém byl karcinom diagnostikován u nejmladšího příbuzného. Doporučenými zobrazovacími metodami vhodnými pro screening je MR a EUS. Pokud při vyšetření nejsou nalezeny žádné podezřelé léze, mělo by být opakováno v ročních intervalech. V případě, že jsou detekována nepodezřelá cystická ložiska, je doporučeno opakování vyšetření v 6–12měsíčních intervalech. Pokud je nalezeno solidní ložisko, které není indikováno k odstranění, nebo jsou odhaleny striktury hlavního pankreatického vývodu, je doporučený interval vyšetřování 3 měsíce (167,168).

Dle provedené meta-analýzy byl skutečně u vysoce rizikových pacientů, zařazených do screeningového programu prokázán vyšší podíl kurativních resekcí a delší OS (169). Toto naznačuje slibný přínos screeningem u vybraných skupin pacientů. Zohledněno však musí být i riziko zvýšení obav a úzkosti pacientů zařazených do takového programu (169).

5.5.4 Staging karcinomu pankreatu

5.5.4.1 TNM klasifikace

Posouzení rozsahu tumoru je kromě indikace vhodné léčby důležité i pro predikci prognózy a umožňuje také stratifikaci pacientů v rámci klinických studií (170). Staging karcinomu pankreatu vychází z TNM klasifikace zhoubných novotvarů dle společností UICC (Union for International Cancer Control) a AJCC (American Joint Committee on Cancer). Tento skórovací systém je založen na parametrech, jako je velikost tumoru, jeho vztah k okolním cévám a orgánům a přítomnost uzlinových nebo vzdálených metastáz (170). TNM klasifikace zhoubných novotvarů byla

pro karcinom pankreatu ve svém 6. a 7. vydání shodná, ke změnám ale došlo v rámci 8. vydání z roku 2017 (171). Kategorie T1 dříve zahrnovala tumory ohraničené na pankreas o velikosti do 2 cm v průměru. Nově je tato kategorie charakterizována pouze velikostí tumoru a podle tohoto parametru je dále rozdělena na podkategorie T1a (tumory do 0,5 cm), T1b (tumory od 0,5 do 1 cm) a T1c (tumory od 1 do 2 cm). T1 tumory jsou označeny jako minimálně invazivní a měly by být spojeny s lepší prognózou. Tumory T2 byly dříve definovány jako nádory větší než 2 cm a zároveň ohraničené na pankreas, tumory T3 pak jako prorůstající mimo pankreas bez postižení TC nebo AMS. Vzhledem k obtížnému předoperačnímu zhodnocení šíření tumoru mimo pankreas jsou v současnosti i stadia T2 a T3 definována pouze velikostí. T2 jsou tumory velikosti 2–4 cm, T3 jsou pak tumory větší než 4 cm. Jako T4 byly dle předchozího vydání klasifikace hodnoceny takové tumory, které postihovaly výše zmíněné tepny a byly tak hodnoceny jako neresekabilní. Vzhledem k nutnosti objektivního stagingu už není resekabilita v této klasifikaci posuzována a jako T4 jsou označovány všechny tumory postihující uvedené tepny nebo AHC neohledě na jejich velikost. Podle postižení regionálních lymfatických uzlin byly dříve tumory klasifikovány jako N0 v případě, že nebyla postižena žádná uzlina, nebo jako N1, pokud byla prokázána metastáza v 1 nebo více uzlinách. Nyní do kategorie N1 spadá postižení 1–3 lymfatických uzlin a do nové kategorie N2 postižení 4 nebo více uzlin. Pokud je přítomna vzdálená metastáza nebo více metastáz, je onemocnění kategorizováno jako M1, v opačném případě jako M0 (170,171). TNM klasifikace a změny v rámci jejího posledního vydání jsou graficky znázorněny v tabulce č. 2. Rozdělení do jednotlivých klinických stadií (stadium I–IV) na základě 8. vydání TNM klasifikace je uvedeno v tabulce č. 3.

Tabulka č. 2: Přehled změn ve stagingu karcinomu pankreatu mezi 7. a 8. vydáním TNM klasifikace zhoubných novotvarů společnostmi UICC a AJCC (170)

	7. vydání (2009)	8. vydání (2017)
T1	tumor ohraničený na pankreas ≤ 2 cm	tumor ≤ 2 cm
T1a	-	tumor ≤ 0,5 cm
T1b	-	tumor > 0,5 cm a < 1 cm
T1c	-	tumor > 1 cm a ≤ 2 cm
T2	tumor ohraničený na pankreas > 2 cm	tumor > 2 cm a ≤ 4 cm
T3	tumor prorůstající mimo pankreas bez postižení TC nebo AMS	tumor > 4 cm
T4	tumor postihující TC nebo AMS (neresekabilní)	tumor postihující TC, AMS a / nebo AHC
N0	bez postižení lymfatických uzlin	bez postižení lymfatických uzlin
N1	postižení lymfatických uzlin	postižení 1–3 lymfatických uzlin
N2	-	postižení ≥ 4 lymfatických uzlin
M0	bez vzdálených metastáz	bez vzdálených metastáz
M1	vzdálené metastázy	vzdálené metastázy

Tabulka č. 3: Přehled klinických stádií karcinomu pankreatu určených na základě TNM klasifikace (172).

Stadium IA	T1a – T1c	N0	M0
Stadium IB	T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	N0
Stadium IIB	T1 – T3	N1	M0
Stadium III	jakékoli T	N2	M0
	T4	jakékoli N	M0
Stadium IV	jakékoli T	jakékoli N	M1

5.5.4.2 Resekabilita

Vzhledem k zásadní roli chirurgické léčby, která v kombinaci s adjuvantní chemoterapií může jako jediná vést k dlouhodobému přežití pacientů, je stěžejní rozhodnutí, zda se jedná o tumor resekabilní a zda jej tedy lze chirurgicky radikálně odstranit (162,170). Toto posouzení je do jisté míry možné již předoperačně, nejlépe na základě CT vyšetření (151). Rozhodující je vztah tumoru k okolním cévám a orgánům a případné vzdálené metastázy. Tumory jsou kategorizovány jako resekabilní, hraničně resekabilní nebo neresekabilní (173).

Zjednodušeně lze říci, že resekabilní tumory jsou takové, které nejsou v kontaktu s přilehlými tepnami a neovlivňují výrazně lumen VMS nebo VP. Hraničně resekabilní tumory mohou ovlivňovat lumen zmíněných žil, ale technicky umožňují rekonstrukci proximálního i distálního konce dané žíly. Dále se může jednat o tumory, které jsou v kontaktu s okolními tepnami (AMS, AHC) do poloviny jejich obvodu. Za neresekabilní jsou považovány tumory, které ve větší míře ovlivňují okolní tepny, aortu nebo dolní dutou žílu. Neresekabilní jsou i tumory, které postihují VP nebo VMS a není technicky možné tuto cévu zrekonstruovat (např. kavernomatózní přestavba VP) (173).

Vzhledem k tomu, že přesná kritéria resekability a zejména hraničně resekabilních tumorů se dle doporučení jednotlivých společností částečně odlišovala, byla tato kritéria dle mezinárodního konsenzu společnosti International Association of Pancreatology v roce 2017 sjednocena (174). Kritérium resekability karcinomu pankreatu totiž rozhoduje jednak o léčebných modalitách a současně i o kategorizaci v rámci klinických studií (174).

Podle uvedeného mezinárodního konsenzu z roku 2017 jsou jako tumory resekabilní považovány takové, které nejsou v kontaktu s VMS, nebo ji pouze z jedné strany zužují. Zároveň nesmí být tumor v kontaktu s AMS, s TC ani s AHC. Hraničně resekabilní tumory jsou rozděleny na 2 podkategorie. Do první podkategorie patří tumory, které ovlivňují pouze okolní žíly. Jedná se o tumory, které jsou v kontaktu s více než 180 stupni obvodu VP nebo VMS nebo tuto žílu oboustranně zužují či okludují, tento kontakt však nesmí zasahovat pod úroveň spodního okraje duodena. Do druhé podkategorie hraničně resekabilních tumorů jsou řazeny tumory, které ovlivňují okolní arterie a případně i současně žíly podle definice v předešlé podkategorii. Ovlivněním tepen je myšlen kontakt s AMS a TC do poloviny

jejich obvodu bez vzniku deformity nebo stenózy. Dále jsou do této druhé podkategorie zahrnuty tumory, které jsou v kontaktu s AHC, ovšem bez přesahu na arteria hepatica propria (AHP) nebo TC. Tumory neresekabilní jsou potom buď tumory se vzdálenými metastázami, nebo tumory lokálně pokročilé. Lokálně pokročilými tumory jsou takové, které způsobují oboustranné zúžení či okluzi VP nebo VMS zasahující pod úroveň spodního okraje duodena, tumory v kontaktu s více než 180 stupni obvodu AMS a TC, tumory v kontaktu s AHC s přesahem i na AHP nebo TC a také tumory v kontaktu s aortou nebo invadující do aorty (174).

Popsaná kritéria resekability jsou založena čistě na anatomických údajích. V klinické praxi je ovšem potřeba posoudit více faktorů týkajících se konkrétního pacienta a také chování onemocnění. Kromě anatomických kritérií resekability tak byla stanovena i biologická a podmíněná kritéria resekability. Tato kritéria byla původně navržena již v roce 2008, ale byla postupně modifikována (175). Podle biologických kritérií resekability je v současné době za hraničně resekabilní karcinom pankreatu označován takový, který jednak splňuje kritéria anatomická a současně je klinický nález podezřelý z přítomnosti vzdálených metastáz, které však nejsou potvrzené. Tímto podezřením se rozumí sérová hladina CA 19-9 vyšší než 500 IU/ml nebo přítomnost metastatického postižení lymfatických uzlin diagnostikované biopsicky nebo pomocí PET/CT (174). Hladina CA 19-9 v provedených studiích korelovala se stagingem a prognózou (176,177). Bylo také prokázáno, že pozitivita lymfatických uzlin zhoršuje prognózu nehledě na staging nebo resekabilitu. Pacienti s anatomicky resekabilním tumorem ale pozitivními uzlinami mají horší prognózu oproti pacientům bez postižených uzlin (178).

Podmíněná kritéria se řídí celkovým stavem pacienta (performance status) charakterizovaným pomocí skóre společnosti Eastern Cooperative Oncology Group (tzv. ECOG performance status). Pokud je skóre 2 nebo více, je již tumor hodnocen jako hraničně resekabilní (174). Skóre 2 je přiděleno pacientům, kteří nemohou vykonávat žádné pracovní aktivity, jsou však schopni ambulantního ošetřování, jsou schopni se o sebe postarat, a více než polovinu bdělého času tráví mimo lůžko. Vyšší skóre je přiřazováno pacientům s výraznějším omezením (179).

Posouzení resekability nejen podle anatomických kritérií je podstatné pro výběr optimální léčebné strategie. Biologická kritéria umožňují alespoň z části posoudit

chování tumoru, podmíněná kritéria pak schopnost pacienta zvládnout příslušnou léčbu (180).

5.6 Léčba karcinomu pankreatu

Radikální chirurgická resekce je v současné době jedinou možností potenciálně kurativní léčby pacientů s karcinomem pankreatu (3). Ovšem, jak již bylo uvedeno, jen u minima pacientů (10–20 %) je v době diagnózy onemocnění ve stadiu resekovatelného tumoru (4). Nepochybný přínos má také onkologická léčba. Je prokázáno, že adjuvantní chemoterapie zlepšuje OS pacientů s touto diagnózou. Nedávné studie naznačují, že i neoadjuvantní chemoterapie či chemo-radioterapie může být přínosná u některých pacientů s primárně neresekovatelnými či hraničně resekovatelnými tumory. U pacientů s neoperabilními tumory nebo s relapsem onemocnění pak lze využít chemoterapii v paliativním režimu (5).

5.6.1 Chirurgická léčba

Kromě chirurgické léčby s kurativním záměrem se v rámci péče o pacienty s karcinomem pankreatu uplatňují i paliativní operační výkony. Jedná se zejména o spojkové operace u pacientů s pokročilými tumory způsobujícími jinak neřešitelnou obstrukci žlučových cest nebo duodena (181). Tato kapitola je však zaměřena na resektivní výkony pro karcinom pankreatu.

5.6.1.1 Chirurgické výkony

Pro indikaci chirurgické léčby karcinomu pankreatu je nutné posouzení nejen resekovatelnosti tumoru, ale současně i jeho anatomické lokalizace. Nejčastěji je karcinom pankreatu lokalizován v oblasti hlavy, krčku nebo processus uncinatus pankreatu (65 % případů) (182). Tyto tumory mohou infiltrovat okolní tkáň, nejčastěji pak distální část ductus choledochus nebo duodenum a Vaterskou papilu (183). Takto uložené tumory lze technicky řešit provedením hemipankreato-duodenektomie (184). Samotný výkon a jeho možné modifikace budou popsány dále.

U asi 15 % pacientů bývá karcinom lokalizován v oblasti těla nebo ocasu pankreatu (182). V tomto případě je pak možným řešením distální pankreatektomie. V rámci tohoto výkonu je resekována distální část pankreatu (tělo a ocas) při protnutí

žlázy vlevo od osy portální a horní mezenterické žíly (185). Současně s tělem a ocasem pankreatu a přilehlou lymfatickou tkání bývá resekována i slezina. Slezinu šetřící distální pankreatektomie je doporučena většinou jen v případě benigních onemocnění pankreatu (186). Některé studie sice uvádějí, že slezina by mohla být ponechána i u vybraných pacientů s karcinomem pankreatu, u kterých je tumor ohraničený na pankreas a není podezření na postižení lymfatických uzlin v hilu sleziny (187). V současné době však není dostatek dat, která by tento koncept podpořila a splenektomie je tak standardní součástí distální pankreatektomie pro karcinom pankreatu (188).

U malé skupiny pacientů může být pankreas postižen difúzně a jediným řešením je pak totální pankreatektomie (182,184). Tento výkon může být indikován i v případě pokročilých tumorů, nebo pokud je tumor uložen v oblasti proximálního těla pankreatu. Dále v úvahu připadají situace, kdy je zbylá část pankreatu významně postižena zánětem nebo je pankreas příliš měkký či atrofický a nelze bezpečně zkonstruovat pankreato-jejuno anastomózu (184,189). Provedením totální pankreatektomie je však zcela vyřazena exokrinní i endokrinní funkce pankreatu. Dochází tak k diabetu, který je obtížně kompenzovatelný a bývá doprovázený závažnými hypoglykemiemi. Pacienti jsou ohroženi i malnutricí (189). Také vzhledem k udávané vyšší pooperační morbiditě a mortalitě by měla být indikace totální pankreatektomie pečlivě zvážena (190).

Historický vývoj hemipankreatoduodenetomie

Již na začátku 20. století byly dokumentovány výkony v podobě excize duodena a pankreatu pro periampulární tumory. Známým německým chirurgem je Kausch, který v roce 1912 provedl resekci většiny duodena spolu s částí pankreatu (191). Ovšem až americký chirurg Whipple v roce 1935 publikoval první případ, kdy úspěšně zresekoval celé duodenum a velkou část hlavy pankreatu (192). Původně Whipple popisoval zákrok rozdělený na 2 operace, kdy při prvním výkonu provedl gastro-jejuno anastomózu, podvaz ductus choledochus a cholecysto-gastro anastomózu. Za 3 až 4 týdny byla v rámci druhé operace provedena resekce hlavy pankreatu a duodena. Pankreatický vývod byl podvázán bez obnovení kontinuity mezi pankreatem a jejunem. Pankreato-jejuno anastomóza byla považována za příliš rizikovou. Whipple tedy demonstroval, že tok pankreatické šťávy do střeva není

nezbytný pro přežití pacienta, ovšem zaslepení pankreatického vývodu vedlo k vysoké incidenci pankreatických píštělí (192). Hunt pak v roce 1941 prokázal, že pankreato-jejuno anastomóza může být poměrně bezpečná a snižuje riziko vzniku pankreatických píštělí (193). Tento koncept byl poté převzatý i Whipplem, který dále svůj výkon modifikoval provedením choledocho-jejuno anastomózy namísto původně volené cholecysto-gastro anastomózy, a to z důvodu prevence ascendentní infekce žlučových cest (194). Dále pak Whipple doporučil provedení hemipankreatoduodenektomie v rámci jedné operace (191). Neopomenutelnou modifikací ještě zůstává ponechání pyloru, které navrhli Traverso a Longmire jako prevenci dumping syndromu a refluxu způsobujícího ulcerace v oblasti anastomózy (195,196). Dumping syndrom je způsoben příliš rychlým posunem hyperosmolární tráveniny ze žaludku do tenkého střeva při absenci pyloru. Může se projevit gastrointestinálními i vazomotorickými symptomy v podobě zvracení, průjmů nebo až celkového kolapsu z náhle vzniklé hypovolemie. S větším odstupem po jídle může docházet k rozvoji hypoglykemie (197).

Modifikace hemipankreatoduodenektomie

V současné době se hovoří o dvou základních modifikacích hemipankreatoduodenektomie vzhledem k ponechání či resekci pyloru. Klasická Whipleova operace znamená resekci duodena, hlavy pankreatu a cholecystektomii následovanou konstrukcí pankreato-jejuno anastomózy, choledocho-jejunoanastomózy a gastro-jejuno anastomózy. V rámci výkonu je resekováno i antrum žaludku s pylorem, a proto tato operace bývá nazývána i jako pylorus-resecting pancreato-duodenectomy. Druhou variantou je pylorus šetřící hemipankreatoduodenektomie (pylorus-preserving pancreatoduodenectomy – PPPD, nebo pylorus-preserving Whipple – PPW), která se od Whippleovy operace liší právě ponecháním žaludečního antra a pyloru (198). V případě ponechání pyloru může docházet ke komplikacím ve smyslu opožděného vyprazdňování žaludku (delayed gastric emptying) (199). Dle recentních studií však nebyly prokázány signifikantní rozdíly mezi oběma metodami v pooperační mortalitě a morbiditě (198,199). Volba mezi těmito variantami tedy záleží na zkušenostech chirurga s tím, že resekce pyloru je nutná v případě jeho postižení tumorem nebo v případě infiltrace tumoru do proximální části duodena (184,185).

Další modifikace hemipankreatoduodenektomie jsou možné v rámci rekonstrukční fáze. Anastomóza mezi pahýlem pankreatu a gastrointestinálním traktem může být zkonstruována jako pankreato-jejuno anastomóza, která je v současné době častěji volenou variantou, nebo jako pankreato-gastro anastomóza (200). Pankreato-jejuno anastomóza pak nabízí dvě základní varianty provedení. První z nich je anastomóza technikou duct-to-mucosa (201). Tento princip prvně popsal Cattle a Warren v 50. letech minulého století (202). Nejprve je k jejunu sero-muskulárními stehy přišita zadní hrana pahýlu pankreatu s jeho kapsulou. Následně je s drobným otvorem v jejunu sešit samotný pankreatický vývod. Na závěr je s jejunem sešita i přední hrana pankreatu. Vzniká tak anastomóza o 2 vrstvách, přičemž vnitřní vrstva spojuje samotný pankreatický vývod se střevním lumen (202). Duct-to-mucosa anastomóza má možné technické variace, jednu z nich navrhl Blumgart, kdy pro suturu přední a zadní strany pahýlu využívá U stehy procházející celou tloušťkou pankreatu (203). U duct-to-mucosa anastomózy může být dále využita drenáž ve formě ztraceného drénu, který se po několika dnech z oblasti anastomózy spontánně dislokuje, nebo ve formě zevní drenáže, která je vyvedena skrze stěnu jejunu a břišní stěnu na povrch těla a odstraňuje se po několika týdnech. Druhou variantou pankreato-jejuno anastomózy je zanoření konce pahýlu pankreatu do jejunu neboli tzv. invaginační technika. Tato anastomóza se konstruuje jako end-to-end nebo end-to-side spojka a bývá využívána např. v případě pankreatického vývodu o malém průměru (200). Pankreato-gastro anastomóza pak může být konstruována se zanořením pahýlu pankreatu, nebo jako obdoba zmíněné duct-to-mucosa anastomózy. V případě druhé varianty mohou být opět využity i obě formy drenáže (200).

Biliodigestivní rekonstrukce je v porovnání s rekonstrukcí kontinuity pankreatu poměrně standardizovaná. Provádí se hepatiko-jejuno anastomóza end-to-side. Pro obnovení kontinuity žaludku se konstruuje gastro-jejuno anastomóza, a to v případě, že byla provedena klasická pankreatoduodenektomie. Pokud byl pylorus ponechán, jedná se dle správné terminologie o duodeno-jejuno anastomózu (204). Všechny uvedené anastomózy se konstruují postupně od proximálního konce jejunu, po jeho předchozím zaslepení v místě resekce. Nejbliže k tomuto konci jejunu je vytvořena pankreato-jejuno anastomóza, o přibližně 10–20 cm dále hepatiko-jejuno anastomóza a v dostatečné vzdálenosti (Blumgart uvádí 50 cm) pak gastro-

či duodeno-jejuno anastomóza, která může být umístěna retrokolicky či antekolicky (204). Některá pracoviště konstruuji dále ještě tzv. Braunovu anastomózu, spojující stranou ke straně (side-to-side) přívodnou a odvodnou část jejunu v blízkosti gastro-jejuno anastomózy (205). Braunova anastomóza zabraňuje postupu žluči a pankreatické šťávy do žaludku přes gastro-jejuno anastomózu. Je diskutován vliv konstrukce této anastomózy na snížení rizika opožděného vyprazdňování žaludku (206).

Bezpečnost hemipankreatoduodenektomie

Ještě v 60. letech dosahovala mortalita po hemipankreatoduodenektomii 20–40 % a pooperační morbidita 40–60 % (207). Díky pokroku v chirurgii a perioperační péči byla postupně mortalita snížena na 3–5 %. Morbidita ovšem zůstává po tomto technicky náročném výkonu i nadále poměrně vysoká, a to kolem 40 % i ve specializovaných centrech (208–210). V posledních 2 dekádách bylo prokázáno, že právě centralizace péče do pracovišť provádějících dostatečný počet výkonů přispívá k nižší míře mortality a ke zmírnění fatálních dopadů pooperačních komplikací. Ve specializovaných pracovištích je kromě optimalizované chirurgické léčby přínosný multidisciplinární přístup s adekvátní perioperační péčí, specializovanou pooperační léčbou na jednotce intenzivní péče a vhodným managementem pooperačních komplikací. Zvláště přínosná je možnost řešit většinu komplikací radiointervenčně místo operačně. To vše vedlo postupně také k posunu hranic resekability a umožnilo provádění rozsáhlých výkonů, jako jsou cévní nebo multiviscerální resekce (173,211).

5.6.1.2 Radikalita výkonu

V rámci chirurgické léčby maligních tumorů je podstatným faktorem, zda je provedená resekce radikální, tedy zda byl tumor odstraněn kompletně. Rozlišují se R0 resekce, kdy byl nádor odstraněn celý a ani jeho mikroskopické části nezasahují do resekčního okraje. Naopak o R1 resekci se jedná v případě, kdy byl tumor odstraněn pouze makroskopicky, ale zbyly právě jeho mikroskopické části. V případě karcinomu pankreatu se procento provedených R0 resekcí v publikované literatuře výrazně odlišuje, jsou udávány hodnoty v rozmezí 0–83 % (212). Důvodem takto rozdílných hodnot byla rozdílná kritéria definující R0 resekci.

Evropská kritéria definovala negativní resekční okraj jako absenci maligních buněk ve vzdálenosti do 1 mm od okraje (milimetrový bezpečnostní lem). Americká kritéria se pak spokojila s tím, že buňky nezasahovaly do samotného resekčního okraje (žádný bezpečnostní lem) (213). Délka OS u pacientů po R0 resekci se napříč studii výrazně lišila, a to právě z důvodu odlišných kritérií (214). Tato kritéria se však začala sjednocovat a např. společnost International Study Group of Pancreatic Surgery (ISGPS) doporučila alespoň milimetrový bezpečnostní lem a vyšetření 7 okrajů (v případě hemipankreatoduodenektomie), aby mohla být splněna kritéria R0 resekce (212). Mezi zmíněných 7 vyšetřovaných okrajů patří: přední a zadní strana pankreatu, mediální strana neboli oblast průchodu VMS, okraj v místě průchodu AMS, dále pak resekční linie pankreatu, žlučového stromu a střeva. Novější studie pak již doložily signifikantně delší průměrné OS u pacientů, kteří podstoupili R0 resekci (31–41 měsíců) oproti pacientům s R1 resekci (17–27 měsíců) (214). R1 resekce je negativní prognostický marker dlouhodobého přežití pacientů po resekci karcinomu pankreatu (212). Vyšetření resekčních okrajů má prognostický význam i pro bezpříznakové přežití (disease-free survival, DFI) (162). Při požadavku milimetrového bezpečnostního lemu a vyšetření dostatečného počtu okrajů je dle posledních studií četnost R0 resekci mezi 20–40 % (162,215). Nutno zmínit, že v porovnání s lokálně pokročilými neresekabilními tumory, umožňuje i R1 resekce prodloužení OS (216).

Jamieson a Delpero ve svých studiích hodnotili radikalitu resekce ještě podrobněji. Zaměřili se na význam jednotlivých posuzovaných okrajů u hemipankreatoduodenektomie (217,218). Jamieson okraje rozděluje na mobilizační, mezi které řadí přední a zadní stranu pankreatu a okraje transekční, kam patří zbylé z výše uvedených. Prokázal, že pozitivita pouze mobilizačních okrajů byla spojena s delším OS oproti pacientům, kteří měli pozitivní transekční okraj nebo okraje (217). Delpero pak zjistil, že pozitivita zadního okraje (mobilizační okraj), neměla dopad na délku DFI (218). Je tedy patrné, že jednotlivé okraje mohou mít odlišný prognostický význam, což by mohly detailněji objasnit budoucí studie (215). Již dnes je známo, že okraje v místě průchodu VMS a AMS jsou nejčastější lokalizací zachycené positivity, což má význam pro hojně diskutovanou techniku mesopankreatické excize (219), která bude rozebrána v samostatné části totální mesopankreatické excize.

5.6.1.3 Cévní resekce

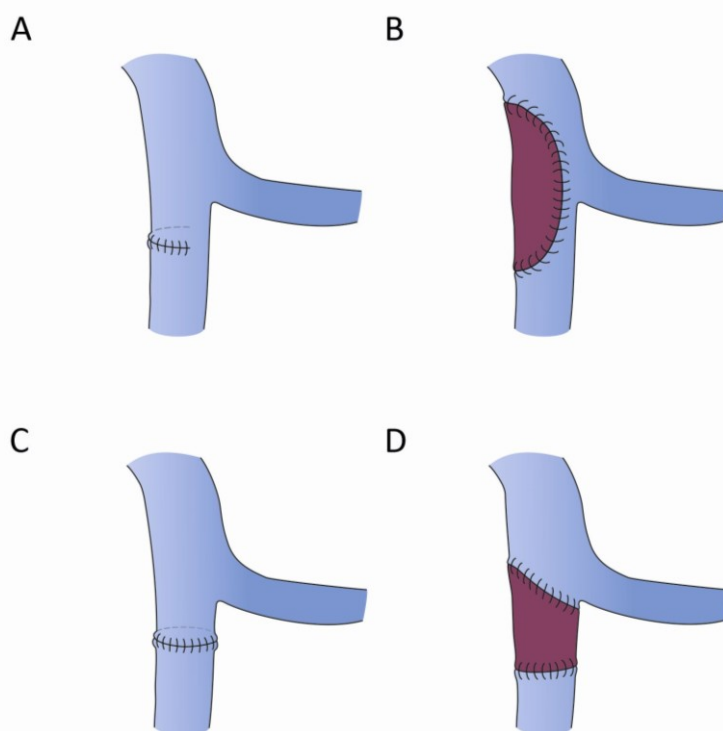
Karcinom pankreatu se vzhledem ke své agresivitě často šíří v retroperitoneu a postihuje žilní nebo tepenné řečiště, nervové plexy a lymfatické uzliny. Vzhledem k anatomickým poměrům a nejčastější lokalizaci karcinomu v oblasti hlavy pankreatu bývá z žilních struktur postižena zejména VP nebo VMS. Z tepen pak nejčastěji tumor naléhá či invaduje do AMS, AHC či TC (220,221). Vzhledem k průběhu AMS je pak její izolované postižení bez současného postižení VMS nepravděpodobné. S cílem umožnit i u těchto pacientů resekci tumoru byly navrženy postupy kombinující uvedené výkony na pankreatu s resekci přilehlých žil či tepen (221).

Resekce žilního řečiště

Historicky byly tumory postihující VP a VMS považovány za neresekabilní. Prvním, kdo zresekoval postiženou VMS při hemipankreatoduodenektomii, byl Moore v roce 1951 a demonstroval tak technickou proveditelnost takového výkonu (222). Zpočátku se však jednalo pouze o ojedinělé operace a trvalo několik desetiletí, než byla resekce karcinomu pankreatu en-bloc s infiltrovanou žilní stěnou přijata specializovanými centry za standardní výkon (173). Systematická review z posledních dekád potvrzují, že morbidita a mortalita chirurgických výkonů pro karcinom pankreatu s nebo bez resekce žilního řečiště je ve specializovaných pracovištích srovnatelná (220,223). Ve studiích byly zahrnuty všechny výkony jako jsou hemipankreatoduodenektomie, distální pankreatektomie a totální pankreatektomie. Zhou ve své meta-analýze, do které bylo zařazeno 661 pacientů s výkonem na pankreatu a resekci žilního řečiště pro karcinom, neprokazuje ani rozdíl v pětiletém OS oproti pacientům bez nutnosti žilní resekce (220). Nelze říci, že shodné závěry prezentují všechny studie. Jedna z meta-analýz zaznamenala mírně zvýšené riziko perioperačních komplikací u pacientů s žilní resekci (224). Je však prokázáno delší OS u pacientů, kteří podstoupili hemipankreatoduodenektomii s žilní resekci oproti pacientům s paliativní léčbou, kterým nebyl tumor resekován (225). Tento výsledek byl prokázán i ve studii na japonské populaci osob starších 70 let (226). Resekce žilního řečiště v rámci chirurgické léčby karcinomu pankreatu tak nabízí pacientům s hraničně resekabilními tumory delší OS (227).

Již v rámci předoperačního vyšetření by měla být případná infiltrace tumoru do portálního řečiště zhodnocena. Proximální část řečiště má zpravidla dostatečný průměr, aby mohla být provedena bezpečná rekonstrukce bez významného zúžení lumen žíly. Problematictější jsou tumory uložené distálně, které postihují VMS nízko pod jejím soutokem s VL. Průměr VMS je zde užší, což může být limitací pro provedení adekvátní rekonstrukce (173,212). Resekce VP/VMS by měla být provedena, jen pokud perioperačně nelze žilní stěnu od tumoru bezpečně oddělit. Neměla by být prováděna pouze za účelem dosažení širšího bezpečnostního lemu (228).

Samotná technika resekce a rekonstrukce žíly závisí na lokalizaci místa, kde tumor adhezuje či invaduje do stěny žíly a na rozsahu postižení. Společnost ISGPS klasifikuje žilní resekce v této indikaci do 4 kategorií, které jsou prezentovány na obrázku č. 1 (212).



Obrázek č. 1: Možnosti rekonstrukce VP/VMS podle rozsahu její resekce. (A) Přímá sutura po tangenciální resekci malého rozsahu. (B) Patch využitý k rekonstrukci v případě resekce větší části žilní stěny. (C) Anastomóza end-to-end po resekci celého segmentu žíly, kdy bylo možné volné sblížení obou konců se srovnatelným průměrem. (D) Rekonstrukce pomocí interponátu v případě resekce dlouhého segmentu žíly, nebo v případě konců s výrazně odlišnými průměry.

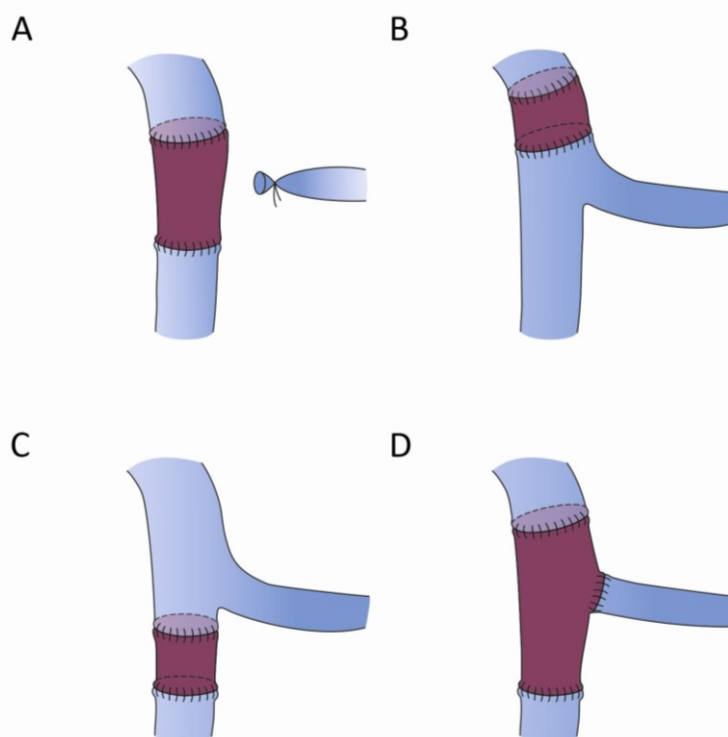
V případě že je postižená oblast malá, může být dostačující tangenciální resekce žíly. Pro rekonstrukci pak lze zvolit primární sešití defektu nebo suturu pomocí záplaty (patch), která bývá vytvořena z autologního žilního štěpu (229). Rekonstrukce musí být provedena tak, aby nevznikla hemodynamicky významná stenóza (230,231). Dostačující žilní drenáž tenkého střeva by pak měla být v průběhu výkonu klinicky zhodnocena (173). Pokud není tangenciální resekce dostatečná, je potřeba resekovat celý segment žíly. Aby byla umožněna následná rekonstrukce pomocí end-to-end anastomózy bez přílišného napětí, může být provedena mobilizace pravého tračníku a mezenteria, což umožní sblížení konců VP/VMS. Dále může sblížení obou konců cévy dopomoci i mobilizace jater a přerušování vstupu VL (229,232). V případě, že je však resekovaný segment žíly dlouhý a není možné bezpečné sblížení obou konců, je potřeba k rekonstrukci využít interponovaný štěp. Tyto štěpy jsou využívány za účelem prevence napětí v místě cévní anastomózy, prevence stenózy rekonstruované žíly a umožňují adekvátní rekonstrukci v případě odlišného průměru konců VMS a VP (7).

Podle anatomické lokalizace resekovaného úseku žíly pak může být interponát umístěn a) mezi konec VMS a VP, b) mezi 2 konce VP, c) mezi 2 konce VMS, d) mezi konec VMS a VP s implantací VL (obrázek č. 2) (233).

Nejčastěji jsou za tímto účelem volené autologní žilní štěpy. Ve většině případů se jedná se o štěpy z vena renalis sinistra nebo vena saphena magna (233,234). Výhodou vena renalis sinistra je její průměr, který je blízký průměru VP. Další výhodou je poměrně snadná dostupnost této žíly po rozšíření Kocherova manévru, nevyžadující další incizi, a dále fakt, že vzhledem k přítomnosti gonadální žíly není potřeba rekonstrukce vena renalis sinistra po její resekci (234). Dalšími možnostmi jsou: vena jugularis interna, vena femoralis superficialis, vena iliaca externa nebo vena mesenterica inferior (229,235).

Jako interponát lze využít i syntetické cévní protézy z polytetrafluorethylenu (PTFE), jejichž mechanické vlastnosti a šroubovitá opora na vnějším obvodu by měly dopomoci udržet dobrou průchodnost štěpu umístěného do portálního řečiště o velkém průtoku ale nízkém tlaku (229). PTFE štěpy jsou však spojeny se zvýšeným rizikem infekčních komplikací. V případě výskytu pooperační pankreatické píštěle u pacienta se syntetickou cévní protézou v oblasti VP/VMS je vysoké riziko pooperačního krvácení či dlouho trvající komplikovaně řešitelné infekce protézy (173). Uvádí se

i vyšší riziko trombotických uzávěrů při využití PTFE interponátů v porovnání s ostatními možnostmi rekonstrukce (236,237). V omezeném počtu případů byly k rekonstrukci využity i štěpy z peritonea, ligamentum falciforme, bovinního perikardu, nebo arteriální štěpy (238–241). Data týkající se výsledků těchto posledně uvedených štěpů jsou však pro malý počet pacientů limitována.



Obrázek č. 2: Umístění interponátu při rekonstrukci VP/VMS. (A) mezi VMS a VP bez implantace VL, (B) mezi 2 konce VP, (C) mezi 2 konce VMS, (D) mezi VMS a VP s implantací VL

I autologní žilní štěpy, které jsou k náhradě VP/VMS využívány nejčastěji, se pojí s jistými nevýhodami. Některé autologní štěpy nemusí mít dostatečný průměr odpovídající průměru VP a tento nepoměr v místě anastomózy pak může vést k trombóze štěpu. Preparace autologních štěpů pak může vyžadovat další incizi, prodlužuje operační čas a pacienti jsou vystaveni riziku komplikací v místě odběru štěpu, jako je vznik hematomu a infekčních komplikací (9,233). V případě odběru štěpu vena femoralis nebo vena iliaca externa hrozí rozvoj otoku příslušné dolní končetiny

nebo vznik hluboké žilní trombózy (9). Odběr štěpu levé renální žíly by pak neměl být prováděn u pacientů s renální dysfunkcí. Po odběru štěpu levé renální žíly byl v pooperačním období pozorován přechodný vzestup kreatininu u pacientů bez známé renální insuficience (242).

Alternativou k autologním štěpům, by mohly být kadaverózní alogenní žilní štěpy, které by měly eliminovat uvedené nedostatky a rizika. Bylo publikováno několik prací, které použití těchto štěpů dokumentují, jedná se však zatím o využití v několika málo centrech. Největší soubory pacientů s rekonstrukcí VP/VMS pomocí alogenních žilních štěpů publikoval Zhang X. M. (42 pacientů), Kleive (42 pacientů), Meniconi (11 pacientů) a Yamamoto (11 pacientů) (7–9,243). Zhang Q. a Bacalbasa pak popisují použití alografitů pouze u 3 a u 1 pacienta (233,244). Téměř všichni uvedení autoři popisují využití alografitů vena iliaca či vena femoralis. Výjimkou jsou Zhang Q., který popisuje náhradu pomocí štěpu VP u 3 pacientů a Yamamoto, který alespoň u 1 z pacientů také využil štěp VP, u dalších pacientů není anatomický původ alografitů přesně specifikován (9,233).

Ideální možnost rekonstrukce VP/VMS pomocí interponovaného štěpu zatím není definována (7). Z uvedených typů štěpů se jeví jako slibné alogenní štěpy, u kterých je zmiňováno nejméně nevýhod. Dosud však existuje pouze omezené množství dat o jejich použití. Dále se nabízí otázka, jakého anatomického původu by tyto alogenní štěpy měly být. Portální řečiště a řečiště VCI se fyziologicky odlišují, jsou charakterizovány jinými venózními tlaky a odlišnou poddajností cévní stěny (10,11). Není tedy jasné, zda by měl alogenní žilní štěp pocházet z řečiště VP nebo z řečiště VCI a zda tento původ může mít vliv na hemodynamiku VP/VMS po její rekonstrukci.

U uvedených žilních resekcí a zejména v případě totální pankreatektomie musí být bráno v potaz zachování adekvátní žilní drenáže žaludku. V případě hemipankreatoduodenektomie může být VL podvázána a drenáž žaludku zůstává zachována cestou vena coronaria ventriculi a cestou kolaterál přes venae gastricae breves. U totální pankreatektomie pro karcinom je však často provedena splenektomie a žilní drenáž žaludku tak může být výrazně narušena, zvláště pokud je zároveň zresekován i vstup vena coronaria ventriculi do VP. Existují pak 2 možná řešení nedostatečné žilní drenáže žaludku. První možností je distální resekce žaludku či dokonce subtotální gastrektomie s cílem předejít dlouhotrvajícím komplikacím

charakteru pozdního vyprazdňování žaludku či dokonce ischemii žaludku vyžadující operační revizi. Druhou možností je reimplantace vena coronaria ventriculi do VP a vyhnutí se resekci žaludku (173,245).

Strasberg navrhl operační techniku pro karcinomy uložené v oblasti krčku pankreatu, které postihují soutok VMS, VP a VL (246). V takovém případě nemůže být pankreas protnutý v úrovni krčku pankreatu, jako je tomu při standardní hemipankreatoduodenektomii. Strasberg popisuje postup, kdy je nejprve izolována VMS pod pankreatem a VP nad pankreatem, následně je uvolněna horní hrana pankreatu těsně vpravo vedle místa, kde se k ní shora přikládá AL. V případě, že lze v této úrovni oddělit od zadní strany pankreatu VL, je tato žíla protnuta cévním staplerem. Ve stejné úrovni, tedy asi 2 cm vlevo od krčku pankreatu, je pak protnut i pankreas. V případě, že nelze v uvedené oblasti pankreas od VL bezpečně oddělit, jsou obejity obě struktury a Strasberg nejprve postupně od přední strany protíná pankreas a po identifikaci VL ji podvazuje a protíná, případně i s malým zbytkem pankreatické tkáně. Po tomto kroku je krček pankreatu oddělen od dorzálně probíhající AMS. Následně jsou přerušeny VMS pod pankreatem a VMS nad pankreatem a resekce tumoru je dokončena. Rekonstrukce VP/VMS je pak provedena přímou end-to-end anastomózou nebo pomocí interponovaného žilního štěpu. Strasberg v případě potřeby vložení interponátu využívá štěp vena femoralis superficialis. Popsaný výkon Strasberg nazývá Whipple at Splenic Artery (WATSA) Procedure. Ve své publikaci z roku 2012 prezentuje provedení u prvních 10 pacientů s nulovou pooperační mortalitou (246). Metoda mimo jiné poukazuje na možnost podvazu VL bez její rekonstrukce při ponechání sleziny. Dojde k rozvoji kolaterálního řečiště, které je však odlišné než v případě levostranné portální hypertenze (246,247).

Trombotický uzávěr zrekonstruované VP/VMS je většinou udáván v rozmezí 7–18 % případů v průběhu prvního roku po výkonu (228,237,248,249). Glebova ve své studii na více než 170 pacientech s rekonstrukcí VP/VMS při resekci karcinomu pankreatu rozlišuje časnou pooperační trombózu spojenou pravděpodobně s technickými aspekty rekonstrukce a pozdní pooperační trombózu spojenou s rekurencí tumoru (237). Jednoleté OS pacientů s trombotickým uzávěrem v místě žilní rekonstrukce bylo kratší oproti pacientům bez trombotického uzávěru. Dlouhodobé OS však bylo pro obě skupiny srovnatelné. Tyto výsledky naznačují, že příčinou mortality z dlouhodobého hlediska je spíše rekurence onemocnění

než trombotický uzávěr žilní rekonstrukce. Za předpokladu prodloužení celkového přežití pacientů po resekci karcinomu pankreatu díky moderním chemoterapeutickým režimům pak může do budoucna stoupat význam technicky správně provedené žilní rekonstrukce s minimalizací rizika časných trombotických komplikací. Dále Glebova poukazuje na fakt, že postižení VP/VMS perioperačně hodnocené jako infiltrace tumorem může být pouze benigní desmoplastická reakce cévní stěny (237). Dle publikovaných prací u čtvrtiny až poloviny resekátů nebyla histologicky zastižena infiltrace tumoru do stěny resekované žíly (250,251). Vzhledem ke kratšímu přežití pacientů s histologicky potvrzenou infiltrací resekované žíly pak mohou zejména pacienti se zmíněnou benigní desmoplastickou reakcí profitovat z technicky správně provedené žilní rekonstrukce. Obecně by byla přínosná možnost perioperačního rozlišení tumorózního či benigního postižení žilní stěny. Bylo by tak možné vytipovat pacienty, u kterých je optimální technika rekonstrukce zvláště důležitá (237). Nutno také uvést, že časný uzávěr žilní rekonstrukce VP/VMS je spojen se 40% mortalitou (236).

Dle dostupné literatury neexistuje konsenzus stran indikace pooperační antikoagulace a jejího typu po rekonstrukci žilního řečiště při řešení karcinomu pankreatu (236,249). Např. Strasberg po výše popsané rekonstrukci VP/VMS využívá k pooperační antikoagulaci kontinuální intravenózní podávání heparinu v dávce 500–700 IU za hodinu po dobu 7 dní (246). Dalšími autory je zmiňováno využití nízkomolekulárního heparinu, warfarinu nebo antiagregační léčby v podobě kyseliny acetylsalicylové nebo klopidogrelu. Studie na více než 300 pacientech s karcinomem pankreatu, u kterých byla provedena rekonstrukce žilního řečiště, neprokázala rozdíl v mortalitě ani morbiditě mezi skupinou s pooperační antikoagulací nebo bez ní. I v této studii však bylo potvrzené vyšší riziko trombotického uzávěru při rekonstrukci s využitím syntetického štěpu (236). Zda bude podána pooperační antikoagulační léčba po rekonstrukci žilního řečiště u pacientů s karcinomem pankreatu, tak v současné době záleží na rozhodnutí operátora (252).

Kromě hemipankreatektomie s žilní resekcí lze za účelem radikálního odstranění karcinomu pankreatu provádět i multiorgánové resekce. Společně s resekci pankreatu může být provedena např. resekce žaludku, tlustého střeva nebo epinefrectomie či resekce ledviny (253). Jedná se o výkony s vyšší perioperační morbiditou, ale perioperační mortalita ani OS nejsou dle několika publikovaných studií

negativně ovlivněny (231,253,254). Recentní review z roku 2018 pak poukazuje na vyšší perioperační mortalitu (10 % pacientů po multiviscerálních resekcích oproti 4 % pacientů po standardních resekcích) (255). Asi u 20 % takových výkonů bývá nutná i žilní resekce. Žilní resekce v těchto případech nezvyšují významně riziko komplikací. Multiviscerální resekce by měly být metodou volby pouze pro vybrané pacienty ve specializovaných centrech. Tyto výkony nabízejí šanci kurativní resekce u pacientů, kteří by byli jinak léčeni jako pacienti s neresekabilním nálezem (255). U pacientů adekvátně indikovaných k multiviscerální resekcije pak doporučeno její provedení i v případě nutnosti žilní resekce (173). Předpokládá se přínos dalších studií u pacientů s multiorgánovým postižením, vzhledem ke zvyšujícímu se uplatnění neoadjuvantní léčby. Ta by mohla i u pacientů s přesahem karcinomu na okolní orgány pomoci vytipovat jedince s potenciálem většího přínosu multiorgánové resekce (255).

V současné době je resekce žilního řečiště v rámci chirurgické léčby karcinomu pankreatu doporučenou metodou ve specializovaných centrech. Takové výkony by měly být prováděny s cílem kompletního odstranění tumoru. Tento postoj je mezinárodně uznáván a takto zní i doporučení společnosti ISGPS (6,256).

Resekce tepenného řečiště

První, kdo provedl tepennou resekci v rámci viscerální chirurgie, byl Appleby v 50. letech minulého století. Jednalo se o resekci TC společně s gastrektomií a distální pankreatektomií pro pokročilý karcinom žaludku. V rámci tohoto výkonu nemusel být TC rekonstruován, protože AHP dostávala krev z AMS přes arteriae pancreaticoduodinales a arteria gastroduodenalis (257). Resekce AMS či TC v rámci léčby karcinomu pankreatu jsou pak dokumentovány od 70. let minulého století (231,250,254). Stejně jako v případě žilního řečiště byla i resekce tepen popsána u hemipankreatoduodenektomie, distální pankreatektomie i totální pankreatektomie (221). Některé resekce vyžadují adekvátní rekonstrukci tepenného řečiště, v určitých případech, jako je např. distální pankreatektomie s resekcí TC, naopak není rekonstrukce nutná (258). Publikace jednotlivých center udávají vysokou morbiditu po tepenných resekcích v rámci výkonů na pankreatu, a to 30–100 % (259–261). Mortalita se dle literatury pohybuje také v širokém rozpětí, konkrétně mezi 0–45 %. Dle provedené meta-analýzy je u pacientů s karcinomem pankreatu až pětikrát vyšší riziko perioperačního úmrtí v případě výkonů kombinovaných s arteriální resekcí oproti

výkonům bez resekce tepenného řečiště (262). Z těchto důvodů bývá obecně postižení AMS a TC (zejména pak AH) považováno za kontraindikaci k primárnímu resekcímu výkonu. U vybraných pacientů však lze resekci tepenného řečiště provést. Zejména díky stále častěji využívané neoadjuvantní chemoterapii se rozšiřuje okruh pacientů, kteří mohou podstoupit radikální resekci i přes původně lokálně pokročilý nález (258,263).

Častějšími výkony jsou resekce TC nebo AH oproti méně častým resekcím AMS (6,258). Stran samotné operační techniky je doporučována resekce TC až po jeho odstup z aorty (264,265). AL a arteria gastrica sinistra mohou být většinou ponechány podvázané bez rekonstrukce, u některých pacientů je pak nutná splenektomie. Nezbytná je však rekonstrukce AHC či AHP. V případě její nedostatečné délky, kdy nelze zkonstruovat end-to-end anastomózu, lze využít arteriální štěp z některé z tepen TC (nejčastěji AL) nebo žilní štěp (266). Zachování arteriální perfuze jater je však zásadní a mělo by být po výkonu kontrolováno pravidelnými vyšetřeními dopplerovskou ultrasonografií (DUSG). V případě selhání tepenné perfuze jater je nutné rychlé řešení tak, aby nedošlo k rozvoji ischemie, nekrotizace a infekčních komplikací spojených s vysokou úmrtností. Významným rizikem jsou v takovém případě i komplikace v oblasti zrekonstruovaných žlučových cest (267,268).

Od ostatních tepenných resekcí se poněkud odlišuje distální pankreatektomie s resekcí TC, označovaná jako modifikovaná Applebyho operace. V rámci tohoto zákroku je resekován distální pankreas, slezina a TC s AHC za současného zachování AHP, která je pak plněna krví z AMS cestou arteria gastroduodnalis. V případě, že nemá cesta přes arteria gastroduodnalis dostatečný průtok, lze předoperačně provést embolizaci AHC za účelem rozvoje dostatečného kolaterálního toku. Modifikovaná Applebyho operace tak umožňuje radikální resekci tumorů těla nebo ocasu pankreatu infiltrujících TC nebo AHC (258). Systematické review zahrnující 240 pacientů po tomto výkonu zjistilo 90denní mortalitu 3,5 % (269). Morbidita však zůstává vysoká a navíc další práce hodnotící pacienty z 20 center ve 12 evropských zemích prokázala výrazně vyšší mortalitu 16,4 % (270). Výkon je tedy spojen s rizikem závažných komplikací a měl by být prováděn jen ve specializovaných centrech.

Poměrně vzácná je resekce AMS. V dokumentovaných případech byl většinou k její náhradě použit žilní štěp z vena saphena. Jedná se o náročný výkon, často kombinovaný s resekcí VP/VMS. Mortalita v průběhu hospitalizace dosahuje

20 % a medián OS 11 měsíců je srovnatelný s přežitím při paliativní léčbě moderními chemoterapeutickými režimy (271).

V případě podezření na infiltraci tepenného řečiště by měl být vždy zvolen tzv. *artery first* přístup. Tato operační strategie umožňuje včasné posouzení, zda je postižení tepenného řečiště skutečně přítomno, zda je případná resekce možná a jak dlouhý úsek tepny by bylo potřeba resekovat. Nejčastěji se tento přístup uplatňuje při podezření na infiltraci AMS a umožňuje vyhodnocení ještě před provedením jakéhokoli nevratného kroku (258). Preparaci AMS lze provést např. po otevření retroperitonea v oblasti Treitzova ligamenta (ligamentum suspensorium duodeni), poté lze postupovat po tepně centrálně až k jejímu odstupu z aorty. Existují však i další doporučené postupy k ozřejmění případné infiltrace AMS, jako je preparace z její pravé strany či supramezokolický přístup (272–274). Obdobnou evaluaci lze provést i při podezření na infiltraci TC či AHC, není však oficiálně definována. Případné ohledání TC může být v některých případech obtížné bez předchozího protnutí žaludku či duodena (258).

Některé nálezy s postižením tepenného řečiště mohou splňovat výše uvedenou definici hraničně resekabilního tumoru. I v těchto případech by však měla být nejprve indikována neoadjuvantní chemoterapie. V případě, že po dokončení této léčby nedošlo k progresi onemocnění, měla by být provedena explorace. Díky tomuto postupu může kolem 30 % pacientů s původně neresekabilním tumorem podstoupit radikální resekci (275,276). Studie zkoumající moderní režimy neoadjuvantní léčby dokonce udává sekundární resekabilitu až 60 % u původně neresekabilních nálezů (263). Pacienti, u kterých byla díky neoadjuvantní léčbě následná resekce možná, pak mohou mít srovnatelné OS s pacienty s primárně resekabilním nálezem (275).

Resekce tepenného řečiště není z důvodu prokázané vyšší pooperační morbiditity standardně doporučována. Měla by být indikována pouze u vysoce selektovaných pacientů po zvážení možných přínosů a rizik a za předpokladu provedení ve specializovaných centrech. Standardně by měla být v případě postižení tepenného řečiště nejprve indikována neoadjuvantní chemoterapie (173). Pacienti se stabilním onemocněním nebo s pozitivní odpovědí na neoadjuvantní léčbu by pak mohli z tepenných resekcí profitovat (6).

Kombinované cévní resekce

Technicky možné jsou i výkony zahrnující současně žilní i tepenné resekce. Těchto výkonů však bylo provedeno malé množství a nejsou dostupná vypovídající data o přínosu pro pacienty. Stejně jako u tepenných resekcí se tedy nejedná o standardně doporučené výkony, ale měly by být individuálně zváženy. Nesmí být opomenuto vysoké riziko dopadu na kvalitu života, která by případně mohla i limitovat adjuvantní chemoterapii (173).

5.6.1.4 Lymfadenektomie

Postižení lymfatických uzlin a jeho rozsah u pacientů s karcinomem pankreatu má dopad na jejich OS. Studie na 7685 pacientech z USA s resekovaným karcinomem pankreatu prokázala, že odstranění více než 20 uzlin je spojeno s delším OS oproti případům, kdy bylo odstraněno 11–19 lymfatických uzlin. Delší OS bylo u pacientů s větším počtem odstraněných uzlin prokázáno neohledně na pozitivitu těchto uzlin (277). Další dostupné studie poukazují na klesající OS při stoupajícím počtu pozitivních lymfatických uzlin (278). Z tohoto důvodu jsou také v rámci 8. vydání stagingu karcinomu pankreatu uvedeny 2 kategorie pro pozitivitu lymfatických uzlin (N1, N2) (170).

Adekvátní lymfadenektomie je důležitou součástí multimodální léčby karcinomu pankreatu (279). Ve snaze definovat adekvátní lymfadenektomii porovnávalo několik randomizovaných studií výsledky u pacientů s rozšířenou lymfadenektomií oproti pacientům se standardní lymfadenektomií. Délka OS se však mezi skupinami nelišila a pacienti podstupující rozšířenou lymfadenektomii vykazovali v některých studiích vyšší pooperační morbiditu (280–282). Rozšířená lymfadenektomie se také může pojit se zhoršením kvality života, kdy jsou pacienti postiženi chronickými průjmy a s nimi spojeným úbytkem hmotnosti (282). Přínos rozšířené lymfadenektomie na OS nebyl prokázán a studie doporučují provádění standardních lymfadenektomií (283,284). Nutno zmínit, že nedostatkem uvedených prací mohla být odlišná definice rozšířené a standardní lymfadenektomie v jednotlivých centrech (279).

V současnosti se společnost ISGPS kloní k používání nomenklatury lymfatických uzlin pankreatu podle společnosti Japan Pancreas Society (279,285). Tato nomenklatura je prezentována v tabulce č. 4.

Společnost ISGPS se dále shodla na definici standardní lymfadenektomie u hemipankreatoduodenektomie pro karcinom pankreatu (279). Standardní lymfadenektomie by měla postihnout skupiny uzlin suprapylorických, v horní a přední skupině podél arteria hepatica communis, podél ductus choledochus a ductus cysticus, vpravo laterálně podél AMS proximálně i distálně, na přední i zadní straně horní i spodní části hlavy pankreatu. Byla definována i standardní lymfadenektomie v případě distální pankreatektomie, která by měla postihnout uzliny ve skupinách: podél TC (pouze v případě tumorů těla pankreatu), v hilu sleziny (ty bývají odstraněny spolu se slezinou), podél proximální i distální části AL a podél spodní hrany pankreatu. Takto definované lymfadenektomie by měly poskytnout alespoň 15 lymfatických uzlin, což by mělo být dostatečné množství k adekvátnímu stagingu tumoru. Sjednocená definice standardní lymfadenektomie by měla umožnit srovnání výsledků jednotlivých studií. Definitivní rozhodnutí o míře lymfadenektomie však může být perioperačně ovlivněno s ohledem na faktory konkrétního pacienta (279).

Tabulka č. 4: Přehled nomenklatury peripankreatických lymfatických uzlin podle Japan Pancreas Society (285).

Peripankreatické lymfatické uzliny	
číselné označení	skupina uzlin
5	suprapylorické uzliny
6	infrapylorické uzliny
7	uzliny podél arteria gastrica sinistra
8a	uzliny v horní a přední skupině podél AHC
8p	uzliny podélně za AHC
9	uzliny kolem TC
10	uzliny v hilu sleziny
11p	uzliny podél proximální části AL
11d	uzliny podél distální části AL
12a	uzliny podél AHP
12p	uzliny podél VP
12b	uzliny podél ductus choledochus
12c	uzliny podél ductus cysticus
13a	uzliny na zadní straně horní části hlavy pankreatu
13b	uzliny na zadní straně dolní části hlavy pankreatu
14p	uzliny podél proximální AMS
14d	uzliny podél distální AMS
15	uzliny podél arteria colica media
16	paraaortální uzliny
17a	uzliny na přední straně horní části hlavy pankreatu
17b	uzliny na přední straně dolní části hlavy pankreatu
18	uzliny podél dolního okraje pankreatu

5.6.1.5 Optimalizace chirurgické léčby

Ve snaze o další optimalizaci výsledků chirurgické léčby pacientů s karcinomem pankreatu bylo zkoumáno množství léčebných modalit a postupů. Již vhodná indikace pacientů k chirurgickému zákroku má zásadní význam. Rizikové faktory u pacientů podstupujících resekci karcinomu pankreatu lze stratifikovat jako faktory ve vztahu k samotnému pacientovi (např. věk, obezita, ostatní komorbidity apod.) a faktory ve vztahu k tumoru (staging, biologické chování tumoru). Zkušenost pracoviště vyplývající z množství prováděných výkonů je dalším důležitým faktorem (162). Byl prokázán vztah mezi počtem provedených výkonů v daném centru a perioperační mortalitou u rizikových chirurgických výkonů (286). Data jedné ze studií poukazují na 50% rozdíl v riziku mortality při porovnání pracovišť s nejvyššími a nejnižšími počty výkonů. Jedná se o studii srovnávající německá pracoviště, do které byli zařazeni pacienti po resekci pankreatu operovaní mezi lety 2009 a 2014 (287).

Podle několika monocentrických studií neovlivňuje vyšší věk pacientů jejich dlouhodobé celkové přežití po hemipankreatoduodenektomii, pokud jsou k výkonu adekvátně indikováni (288,289). Ani větší prospektivní randomizované studie neprokázaly, že by samotný věk byl nezávislým prognostickým faktorem OS u pacientů po resekci karcinomu pankreatu (290,291). Pouze věk pacienta bez zvážení výše uvedených rizikových faktorů by tak neměl být důvodem k neindikování chirurgické léčby karcinomu pankreatu (162).

I přes snížení mortality v posledních dekádách na již zmíněných 3–5 % zůstává hemipankreatoduodenektomie spojená s vysokou mírou morbidit pohybuje se kolem 40 % (208,209). Mezi typické komplikace, které se mohou vyskytnout po hemipankreatoduodenektomii se řadí pankreatické píštěle, opožděné vyprazdňování žaludku, krvácení, biliární leak a další méně specifické komplikace, jako jsou např. nitrobřišní či ranné infekce (12,292). K opožděnému vyprazdňování žaludku dochází u 20–40 % operovaných (293). Ve většině případů se tato komplikace řeší konzervativně, musí však být vyloučena obstrukce gastrointestinálního traktu (12). Krvácení lze rozdělit na perioperační a pooperační. Ke krvácivým komplikacím dochází u méně než 10 % pacientů, ale jsou příčinou pooperačního úmrtí až ve 44 % případů. V průběhu operace může dojít k větším krevním ztrátám zejména při preparaci VP. Příčinou pooperačního krvácení v prvních 24 hodinách po výkonu bývá technické selhání podvazu některé z cév. Ke krvácení s delším odstupem po operaci může dojít

z důvodu digesce cév retroperitonea, jako je např. pahýl arteria gastroduodenalis, v důsledku biliárního a pankreatického leaku. Ošetření krvácení lze provést radiointervenčně nebo chirurgicky (294). Níže bude podrobněji rozebrána problematika pooperačních pankreatických píštělí, které jsou nejčastější závažnou komplikací nejen po hemipankreatoduodenektomii, ale i po ostatních resekčních výkonech na pankreatu (295).

Pooperační pankreatické píštěle

Společnost ISGPS v roce 2016 aktualizovala svou předchozí definici pankreatických píštělí z roku 2005. Dle nové definice je za pankreatickou píštěl považován stav, kdy drenáž odvádí tekutinu s více než třikrát vyšší hladinou amylázy oproti sérové hladině. Píštěle dříve klasifikované jako typ A jsou nyní označovány vzhledem k absenci klinického dopadu jako biochemický leak. Píštěle typu B a C jsou takové, jejichž řešení vyžaduje odbočení od standardní pooperační péče. B píštěle vyžadují buď ponechání drénu po dobu delší než 3 týdny, nebo zavedení nové drenáže perkutánně či endoskopicky. Píštěle typu C jsou takové, které je nutné řešit reoperací nebo způsobí selhání jednoho či více orgánů či úmrtí (296).

Pankreatické píštěle (tedy typ B a C) se po hemipankreatoduodenektomii i distální pankreatektomii vyskytují u přibližně 20 % případů. V rámci prevence byla posuzována technika anastomózy pankreatu na gastrointestinální trakt i technika transekce nebo uzávěru pankreatu při distální pankreatektomii. Nebyl prokázán rozdíl v četnosti píštělí u anastomóz pankreatu na jejunum nebo na žaludek (297,298). Studie poukazují na vyšší četnost intraabdominálních kolekcí v případě volby pankreato-jejuno anastomózy (299,300). U pankreato-gastro anastomózy jsou naopak uváděny nevýhody v podobě vyšší incidence opožděného vyprazdňování žaludku, rizika obstrukce pankreatického vývodu přerůstáním žaludeční sliznice, horší exokrinní funkce pankreatu a atrofie jeho pahýlu. Vliv na četnost pankreatických píštělí nemá ani užití stentu nebo technika konstrukce anastomózy. V současnosti tedy není žádný doporučený typ pankreatické anastomózy, který by byl podložen lepšími výsledky. Rozhodnutí by mělo záležet na zkušenostech pracoviště a chirurga a také na perioperačním zhodnocení tak, aby byla anastomóza při šití dobře dostupná a nebyla ischemizována (162,200,301).

V případě distální pankreatektomie nebyl prokázán rozdíl v incidenci píštělí při staplerové resekci nebo při ručně přešitém pahýlu pankreatu (302). Riziko nesnižuje ani překrytí arteficiálními fibrinovými materiály. Byl však prokázán vliv překrytí resekční linie autologní vaskularizovanou tkání, jako je např. ligamentum teres nebo omentum. V případě využití autologních tkání byla snížena incidence pankreatických píštělí, a to zejména typu B a C, které mají klinický dopad (303). Dále bylo prokázáno snížení rizika pankreatických píštělí, pokud je před distální pankreatektomií pomocí endoskopie do oblasti Oddiho svěrače injikován botulotoxin, čímž dojde ke snadnějšímu odtoku pankreatické šťávy do duodena. Studie však zatím proběhla jen na malém počtu pacientů (304). Aplikace somatostatinových analog perioperačně a v časném pooperačním období prokazatelně snižuje riziko vzniku pooperačních pankreatických píštělí po chirurgických zákrocích na pankreatu. Efekt ovšem nebyl statisticky signifikantní v případě posouzení pouze klinicky významných píštělí a nebyla snížena celková mortalita. Vzhledem k cenové dostupnosti a absenci závažných vedlejších účinků je ale aplikace somatostatinových analog doporučena (305). Ve vztahu k pankreatickým píštělím je diskutováno i využívání drénů. Předpokládalo se, že profylaktická intraperitoneální drenáž je přínosná vzhledem k možnosti odvést případný pankreatický leak. Studie z posledních let ovšem poukázaly na shodnou pooperační morbiditu i mortalitu v případě využití či nevyužití profylaktické drenáže (306,307).

Drenáž žlučových cest

Jak bylo uvedeno, většina karcinomů pankreatu vychází z oblasti hlavy pankreatu a může se tak projevit obstrukcí žlučových cest. Předpokládalo se, že cholestáza může negativně ovlivnit jaterní funkce a zvýšit perioperační mortalitu. Zajištění derivace žluči stentáží žlučových cest při ERCP se tak stala běžnou praxí u pacientů s obstrukcí žlučových cest před plánovanou resekci karcinomu pankreatu. V Nizozemsku provedená prospektivní randomizovaná studie však prokázala, že rutinní stentáž žlučových cest je spojena s vyšší perioperační morbiditou (308). Rutinní stentáž žlučových cest tak není doporučena. Do studie byli zahrnuti pacienti se sérovou hladinou bilirubinu 40–250 $\mu\text{mol/l}$. Doporučení tedy nelze aplikovat na pacienty s vyšší hodnotou bilirubinu a samozřejmě zůstává indikace k zajištění derivace žluči u pacientů s cholangitidou. Dále by měla být derivace zajištěna

i u pacientů, kteří nemohou operaci podstoupit do 2 týdnů, což jsou i pacienti indikovaní k neoadjuvantní chemoterapii (309).

Miniinvazivní chirurgie

Miniinvazivní chirurgické výkony (laparoskopie a robotická chirurgie) jsou spojeny s méně závažným operačním traumatem, umožňují rychlejší rekonvalescenci a kratší dobu hospitalizace. V rámci léčby karcinomu pankreatu však v současné době nejsou dostupná dostatečně vypovídající data o přínosu miniinvazivní chirurgie. Studie z Evropy i USA poukazují, že kolem 30 % distálních pankreatektomií pro karcinom pankreatu je indikováno k miniinvazivnímu výkonu, konvertováno k otevřenému výkonu je pak 19–27 % případů (310,311). Devadesátidenní mortalita miniinvazivní distální pankreatektomie je dle uvedených studií mezi 2 a 3 %. Délka hospitalizace je kratší oproti otevřené distální pankreatektomii a celkové přežití se mezi oběma typy operačního přístupu neliší. Miniinvazivní hemipankreatoduodenektomie je technicky náročný výkon, který je prováděn výrazně méně často než distální pankreatektomie. Operační čas je u tohoto výkonu delší oproti otevřenému přístupu. Byla prokázána kratší doba hospitalizace, to však za cenu častějšího znovupřijetí k hospitalizaci (312). Miniinvazivní přístup je tak v rámci chirurgie karcinomu pankreatu u vybraných pacientů proveditelnou modalitou. Zejména v případě tumorů hlavy pankreatu však doposud nebyl prokázán signifikantní přínos (313).

Totální mesopankreatická excize

Jak bylo zmíněno v části o radikalitě výkonu, R1 resekce je u pacientů s karcinomem pankreatu negativním prognostickým markerem celkového přežití (212). R0 resekci určených dle současně doporučené definice, bývá ale dosaženo pouze u 20–40 % výkonů (162). Nejčastější je pozitivita detekována na mediálním okraji (či mediální straně pankreatu) v místě průchodu VMS (314). Lokální rekurence je pak prvním příznakem relapsu onemocnění po předchozí chirurgické resekci u 20–50 % pacientů (315). Perineurální invaze je prokazatelně spojena s vyšším rizikem rekurence a horší prognózou pacientů po resekci karcinomu pankreatu (316). Incidence perineurální invaze je u karcinomu pankreatu jedna z nejvyšších v porovnání s ostatními malignitami, studie ji udávají u 77–79 % resekátů (316–318).

Za účelem dosažení vyšší radikality byly navrženy již zmíněné rozšířené lymfadenektomie, které však neprokázaly přínos pro dlouhodobé celkové přežití (283,284). V posledních letech je pak hojně diskutována technika totální mesopankreatické excize. Tato technika nemá za cíl rozšíření lymfadenektomie, ale odstranění retropankreatické tkáně obsahující nervové plexy, a tím pádem zvýšení procenta R0 resekcí (213).

Termín mesopankreas prvně definoval Gockel jako perineurální lymfatickou tkáň lokalizovanou dorzálně za hlavou pankreatu a zasahující až za VMS a AMS (319). Za pankreatem a v okolí zmíněných cév se nachází tuková tkáň obsahující krevní a lymfatické cévy, lymfatické uzliny a nervová vlákna. Z hlediska jejího embryonálního původu se většina autorů shoduje na jejím označení pojmem mesopankreas. Jednotliví autoři se však v přesné definici mesopankreatu rozcházejí (213). Agrawal ve své anatomicko-patologické studii poukazuje na absenci peritoneálních nebo fibrózních listů, které by struktury mesopankreatu ohraničovaly, a termín meso- tedy nepovažuje za správný (320). Dále upozorňuje na nemožnost kompletního odstranění této tkáně, a to právě z důvodu absence ohraničení vrstvou pojivové tkáně. Retropankreatická oblast je místem splynutí mesoduodenum dorsale a zadního listu retroperitonea (Treitz's fusion fascia), přechází svým obsahem, jako jsou zmíněné cévy a nervové plexy, v para-aortickou oblast. Absence anatomických hranic této oblasti tak může souviset se šířením maligních buněk ve zmíněných oblastech (320).

Bylo prokázáno, že odstranění mesopankreatu při hemipankreato-duodenektomii pro karcinom pankreatu zvyšuje procento R0 resekcí (321–323). Autor Xu v rámci prospektivní studie na 58 pacientech dále prokázal i nižší incidenci lokální i celkové rekurence a delší bezpříznakové přežití u pacientů po totální mesopankreatické excizi oproti pacientům po konvenční hemipankreato-duodenektomii (323). Rozdílné jsou ovšem publikované operační postupy mesopankreatické excize (213). Inoue ve své publikaci klasifikuje mesopankreatickou excizi do 3 úrovní a provádí ji u posledních 2 úrovní společně s resekci části proximálního mesojejuna, což odůvodňuje odstupem proximálních jejunálních arterií z AMS ve stejné oblasti jako odstupují arteriae pancreaticoduodenales inferiores (324). Tzv. první stupeň mesopankreatické excize je definován odstraněním tkání laterálně a dorzálně od VMS. První stupeň umožňuje ponechat nervový plexus kolem AMS bez nutnosti preparace na levé straně AMS a umožňuje ponechat mesojejunum.

Tento stupeň excize Inoue volí u diagnóz, u kterých není obecně indikována lymfadenektomie, tedy např. u premaligních lézí nebo u sekundárních tumorů pankreatu. Excize druhého stupně se odlišuje podvazem arteriae pancreaticoduodenales inferiores při jejich odstupu na dorzální straně AMS, kde často odstupují jako společný kmen s jejunálními arteriemi. Je tak nutná resekce i příslušné části mesojejuna. Druhý stupeň excize autor indikuje u periampulárních maligních tumorů, karcinomu distálních žlučových cest a duodena. Třetí stupeň excize zahrnuje navíc resekci neurálního plexu po pravé polovině obvodu AMS, a to en-bloc se zbytkem preparátu. Opět je resekována i příslušná část mesojejuna. Tento poslední stupeň je pak indikován právě u invazivního karcinomu pankreatu či u pokročilého karcinomu distálních žlučových cest (324).

5.6.2 Onkologická léčba

Karcinom pankreatu je v porovnání s ostatními malignitami, jako je např. kolo- rektální karcinom nebo karcinom prsu, vůči chemoterapii poměrně refrakterní. I tak se však chemoterapie uplatňuje v léčbě všech stadií karcinomu pankreatu. Resekce tumoru v kombinaci s adjuvantní chemoterapií je jedinou potenciálně kurativní léčbou. Většina pacientů má však již v době diagnózy lokálně pokročilý tumor nebo vzdálené metastázy a jedinou možností léčby je tak paliativní chemoterapie. I po resekci tumoru však u velké části pacientů dojde k recidivě a jsou pak léčeni paliativní chemoterapií. Stále více se také uplatňuje chemoterapie neoadjuvantní, a to zejména v případě hraničně resekabilních nebo lokálně pokročilých tumorů. Lepší odpověď na chemoterapii byla zaznamenána u moderních agresivních režimů léčby, ovšem tyto mohou být indikovány pouze u pacientů v dobrém celkovém stavu (3,5).

5.6.2.1 Paliativní chemoterapie

U pacientů se vzdálenými metastázami, s lokálně pokročilými tumory nebo v případě rekurence bývá indikována paliativní chemoterapie. Studie publikovaná v roce 1997 porovnávala pacienty léčené v paliativním režimu gemcitabinem oproti pacientům léčeným 5-fluorouracilem (5-FU) (325). Bylo prokázáno, že gemcitabin umožnil prodloužit medián celkového přežití

z 4,4 měsíců u 5-FU na 5,7 měsíců a jednoleté celkové přežití bylo prodlouženo ze 2 % na 18 %. Gemcitabin byl také tolerován lépe než 5-FU. Výsledky naznačují, že u některých pacientů je odpověď na léčbu gemcitabinem výraznější, ale bohužel nebyla nalezena cesta, jak tyto pacienty identifikovat. Gemcitabin se tak stal standardem paliativní léčby (5,325). Byly zkoumány i terapeutické režimy kombinující gemcitabin např. s cisplatinou, oxaliplatinou nebo kapecitabinem. Žádné z uvedených kombinací však nevykazovaly lepší výsledky než gemcitabin v monoterapii (5,326). Až v roce 2011 byly publikovány výsledky studie srovnávající efekt chemoterapie FOLFIRINOX (kombinace leukovorinu, irinotekanu, oxaliplatinu a 5-FU) u pacientů s metastatickým karcinomem pankreatu oproti gemcitabinu (327). Tato studie prokázala významně delší celkové přežití po aplikaci FOLFIRINOXu a to s mediánem 11,1 měsíců oproti 6,8 měsícům v případě gemcitabinu (327). Dále pak byl prokázán výraznější efekt terapie kombinující gemcitabin s nab-paklitaxelem (nanoparticle albumin-bound paklitaxel – nanočástice paklitaxelu vázané na albumin) oproti samotnému gemcitabinu (328). Nab-paklitaxel byl vyvinutý za účelem snížení toxicity, ale bylo prokázáno, že např. v léčbě karcinomu prsu je také účinnější (329). I tak se však oba posledně zmíněné chemoterapeutické režimy pro paliativní léčbu (FOLFIRINOX a nab-pakli-taxel/gemcitabin) pojí s významnou toxicitou a měly by být nabízeny pacientům v dobrém celkovém stavu. FOLFIRINOX je pak indikován zejména u pacientů s hodnotou ECOG performance status 0 a 1 bez limitujících komorbidit, zatímco nab-paklitaxel-gemcitabin může být indikován i u některých pacientů s ECOG performance status 2 (3).

I při indikaci zmíněných agresivních protokolů léčby dochází u většiny pacientů již v průběhu paliativní léčby nebo po jejím dokončení, k progresi onemocnění (3). Většinou jsou tito pacienti v horším celkovém stavu, ale část z nich je schopná podstoupit chemoterapii druhé linie (5). Doposud bylo dokončeno jen omezené množství studií zabývajících se druhou linií léčby. Při její indikaci záleží na chemoterapeutickém režimu, který byl podáván v rámci první linie léčby. U pacientů léčených v první linii chemoterapií na bázi gemcitabinu se jeví jako nejvýhodnější irinotekan či oxaliplatinu, a to buď v monoterapii nebo v kombinaci s 5-FU a leukovorinem. Naopak u pacientů, kterým byl v první linii podáván FOLFIRINOX, se jeví jako vhodná terapie druhé linie léčba na bázi gemcitabinu (330,331). Chemoterapie druhé linie je tolerována pacienty, kteří si udrželi dobrý celkový stav

nehledě na progresi onemocnění po první linii léčby. Medián přežití po progresi onemocnění po první linii léčby se v posledních desetiletích prodloužil z 2–3 měsíců na 4–5 měsíců. Dle studií z posledních let pak dokonce i na více než 6 měsíců (3,332,333).

5.6.2.2 Adjuvantní chemoterapie

Bez adjuvantní chemoterapie dochází po předchozí chirurgické léčbě s kurativním záměrem k relapsu onemocnění a úmrtí až u 90 % pacientů (334). Již studie ze 70. let prokázala benefit pro pacienty, kteří po resekci karcinomu pankreatu podstoupili konkomitantní chemo-radioterapii na bázi 5-FU oproti pacientům, kteří byli pooperačně pouze sledováni (335). Studie ESPAC-1, do které byli randomizováni pacienti mezi lety 1994–2000, pak sice nepotvrdila přínos chemo-radioterapie, ale prokázala přínos adjuvantní chemoterapie 5-FU po R0 i R1 resekci (3,336). Přínos oproti samotné observaci po resekci karcinomu pankreatu byl prokázán i při adjuvantním podávání gemcitabinu (337). Při porovnání gemcitabinu s 5-FU v rámci studie ESPAC-3 pak nebyly prokázány významné rozdíly v celkovém přežití, ale terapie 5-FU byla spojena se závažnějšími nežádoucími účinky (338). Gemcitabin se tak stal adjuvantní léčbou preferovanou většinou onkologů (5).

Studie ESPAC-3 dále přinesla i výsledky týkající se načasování adjuvantní chemoterapie. Nebyl prokázán rozdíl v celkovém přežití mezi pacienty, u kterých byla zahájena adjuvantní léčba do 8 týdnů po operaci, a pacienty, u kterých byla chemoterapie zahájena mezi 8. a 12. týdnem. Horší výsledky však byly zaznamenány u pacientů, kteří nedokončili všechny plánované chemoterapeutické cykly (339). Adjuvantní chemoterapie by tak měla být odložena až do období 12 týdnů po operaci, pokud není pacient v dostatečně dobrém stavu, aby absolvoval všechny cykly (5).

Přínos gemcitabinu byl dále zkoumán, a to i v kombinované terapii s capecitabinem. Recentní studie ESPAC-4 publikovaná v roce 2017 srovnávala monoterapii gemcitabinem s kombinovanou terapií gemcitabin-kapecitabin (291). Kombinovaná terapie byla prokázána jako účinnější, přičemž pacienti vykazovali pětileté OS 28,8 %, oproti 16,3 % v případě monoterapie. Nutno podotknout, že do souboru byli zařazeni pacienti, z nichž 80 % bylo hodnoceno jako N1 a 60 % jako R1 (nebyl splněný 1 mm bezpečnostní okraj). V rámci zmírnění dopadů toxicity podávané kombinované chemoterapie byla dávka capecitabinu v případě potřeby

snižována. V případě kombinované terapie tak bylo sice zaznamenáno více případů komplikací spojených s toxicitou oproti monoterapii gemcitabinem, ovšem tyto komplikace byly ve většině případů zvládnuté právě snížením dávky capecitabinu (291). Kombinovaná adjuvantní chemoterapie gemcitabin-capecitabin je tak od roku 2017 doporučena společností American Society of Clinical Oncology (ASCO) u pacientů s potenciálně kurabilními nádory pankreatu (340).

V současné době jsou vyhodnocovány moderní chemoterapeutické režimy jako je např. mFOLFIRINOX (modifikovaný FOLFIRINOX – liší se od FOLFIRINOXu pozměněním dávky jednotlivých složek za účelem snížení toxicity). Randomizovaná prospektivní studie na 493 pacientech srovnávající adjuvantně podávaný mFOLFINOX nebo gemcitabin prokázala delší DFI (21,6 měsíců oproti 12,8 měsícům) a delší OS (medián celkového přežití 54,4 měsíců oproti 35 měsícům) pro skupinu, které byl podán mFOLFIRINOX (341). Nutno uvést, že mFOLFIRINOX byl spojen s vyšší toxicitou (75,9 % případů toxicity 3. a 4. stupně) ve srovnání s gemcitabinem (52,9 % případů toxicity 3. a 4. stupně) (341). ASCO tak doporučuje mFOLFIRINOX u všech pacientů po resekci karcinomu pankreatu, kteří nepodstoupili neoadjuvantní chemoterapii a kteří jsou v dobrém celkovém stavu bez zvýšených rizik toxicity (342).

Dalším z moderních režimů je gemcitabin kombinovaný s nab-paklitaxelem. Studie APACT srovnávající adjuvantní podání nab-paklitaxelu s gemcitabinem oproti samotnému gemcitabinu u karcinomu pankreatu poukazuje na delší bezpříznakové přežití v případě kombinované léčby. K hodnocení celkového přežití však zatím nejsou data kompletní (343).

Vzhledem k možnostem několika uvedených režimů adjuvantní chemoterapie by měl při její indikaci hrát roli celkový stav pacienta. Toto platí zejména pro výběr první linie léčby (5). Springfield ve svém review uvádí, že pacienti s ECOG skóre nula nebo jedna by měli být indikováni k adjuvantní terapii mFOLFIRINOX, pokud však mají např. chronické průjmy, diabetickou neuropatii nebo závažné onemocnění srdce v anamnéze, měl by být indikován gemcitabin s capecitabinem. Pro pacienty s ECOG skóre dva je pak v první linii vhodný samotný gemcitabin. Druhá linie léčby by pak měla být vybrána na základě odpovědi na léčbu první linie a podle případné toxicity (5).

5.6.2.3 Neoadjuvantní chemoterapie

Neoadjuvantní chemoterapie je léčbou zejména pro pacienty s hraničně resekabilními a také lokálně pokročilými tumory. Její uplatnění se však zkoumá i v případě primárně resekabilních tumorů. Neoadjuvantní režimy jsou stále více využívány vzhledem k vysokému procentu neresekabilních tumorů v době diagnózy a vzhledem ke komplikacím po resekcích výkonech na pankreatu. Oproti adjuvantním režimům je také neoadjuvantní terapie lépe tolerována. Cílem neoadjuvantní terapie je kromě downstagingu tumoru i odstranění cirkulujících nádorových buněk a mikro-metastáz. Měla by se také zvýšit pravděpodobnost R0 resekce. Pacienti, u kterých karcinom pankreatu progreduje i v průběhu neoadjuvantní chemoterapie, pravděpodobně nebudou profitovat ani z chirurgické léčby. Nevýhodou může být naopak toxicita neoadjuvantní terapie, která může zhoršovat výsledky chirurgické léčby (344).

Není ovšem stále dostatek dat z prospektivních randomizovaných studií hodnotící skutečný přínos neoadjuvantní chemoterapie (3). První randomizovaná studie zkoumající přínos neoadjuvantní chemoterapie byla předčasně zastavena vzhledem k malému množství pacientů a její výsledky nebyly statisticky signifikantní (345). Probíhající studie ESPAC 5-F zkoumá přínos neoadjuvantní chemoterapie u pacientů s hraničně resekabilním karcinomem pankreatu. Dle průběžných výsledků bylo prokázáno významně delší OS pacientů, kteří podstoupili neoadjuvantní léčbu oproti pacientům indikovaných primárně k resekcii (jednoleté OS 77 % oproti 40 %) (346).

Pro neoadjuvantní terapii může být využita např. chemoterapie na bázi gemcitabinu, nebo FOLFIRINOX. Několik center ve svých publikacích uvádí vysoká procenta resekability i u původně lokálně pokročilých tumorů po terapii FOLFIRINOXem (263,347). Jedno z center dokonce uvádí až 60% resekabilitu u pacientů, kterým byl neoadjuvantně podáván FOLFIRINOX, a to i přes to, že 50 % zařazených pacientů mělo původně neresekabilní tumory z důvodu vzdálených metastáz (263). Důležité je zmínit, že efekt neoadjuvantní léčby nelze posuzovat pouze na základě zobrazovacích metod, ale důležitý je multidisciplinární přístup a provedení chirurgické explorační. V případě, že nejsou jasné známky progresu onemocnění po neoadjuvantní léčbě, měla by být indikována právě chirurgická explorační (3).

V současnosti probíhají i studie hodnotící vliv neoadjuvantní chemoterapie u primárně resekabilních tumorů. Jedná se o studii NEOPAC, která srovnává neoadjuvantní léčbu gemcitabinem s oxaliplatinou následovanou adjuvantním podáním gemcitabinu proti samotné adjuvantní terapii gemcitabinem (348). Studie NEOPA pak srovnává neoadjuvantní chemoradioterapii s primární chirurgickou léčbou (349). Je tedy možné, že se prokáže přínos neoadjuvantní léčby i v terapii primárně resekabilních nádorů.

5.6.3 Lokální terapie

Pacientů s hraničně resekabilním či s lokálně pokročilým karcinomem pankreatu je poměrně velké procento, studie uvádějí 30–40 % všech diagnostikovaných (334). V případě, že nedojde po neoadjuvantní léčbě k progresi tumoru a zároveň tumor není resekabilní, existuje několik možností tzv. lokální ablační terapie s cílem zmenšení tumoru, snížení jeho viability či s cílem lokální symptomatické léčby. Mezi metody lokální ablační terapie patří např. ireverzibilní elektroporace, radiofrekvenční ablace, stereotaktická radioterapie (SBRT – stereotactic body radiation) nebo silný fokusovaný ultrazvuk (HIFU – high intensity focused ultrasound). Vzhledem k absenci randomizovaných studií však doposud nelze adekvátně posoudit přínos těchto modalit. Mohlo by se ale do budoucna jednat o další možnosti terapie u pacientů s lokálně pokročilými tumory (3). Některé z uvedených metod mohou být využity i u pacientů s lokální rekurencí karcinomu pankreatu (350).

6 Experimentální část

6.1 Cíle

Cílem dizertační práce bylo:

1. etablovat experimentální model hemipankreatoduodenektomie s rekonstrukcí VP na velkém zvířeti
2. porovnat mikroskopickou strukturu alogenních žilních štěpů VP a VCI použitých k rekonstrukci VP v rámci tohoto modelu
3. posoudit případné rozdíly v chování těchto štěpů, které by mohly ovlivnit kvalitu rekonstrukce VP
4. pomocí matematického modelování identifikovat technické faktory, které mají vliv na rozvoj trombózy VP v rámci její rekonstrukce

6.2 Metodika

6.2.1 Legislativa

Experiment byl proveden dle platné legislativy a s povolením Ministerstva zemědělství České republiky. Byly dodrženy stávající předpisy a směrnice pro chov a vědecké využití zvířat v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb., upraveným vyhl. č. 207/2009 Sb., s následným výkladem k vyhlášce č. 39/2009 Sb.

6.2.2 Experimentální skupiny

Jako experimentální zvíře bylo zvoleno prase domácí (*Sus scrofa domesticus*), plemeno Přeštické černostrakaté prase pro jeho anatomickou a fyziologickou podobnost člověku a dobré zkušenosti s tímto plemenem v rámci předchozích experimentů na našem pracovišti. Byla využita zdravá zvířata obou pohlaví o hmotnosti 24–36 kg.

Zvířata byla rozdělena na dvě skupiny příjemců allogenních žilních štěpů a na jednu skupinu dárců těchto štěpů. Vzhledem ke korelaci s humánní chirurgií, byly v rámci experimentu místo termínů vena cava caudalis a cranialis u prasete použity termíny z humánní anatomie, tedy VCI a vena cava superior (VCS). U zvířat ze skupin příjemců (skupina VP a VCI) byla provedena pylorus šetřící hemipankreatoduodenektomie s resekcí portální žíly. Ve skupině VP (n=13) byl k rekonstrukci VP využit alogenní štěp VP, ve skupině VCI (n=13) byl pak využit štěp VCI. Každé zvíře ze skupiny dárců (n=13) poskytlo 1 štěp VP a 1 štěp VCI.

6.2.3 Imunokompatibilita dárců a příjemců štěpu

Za účelem minimalizace dopadů případné imunologické nekompatibility zvířat byli vždy oba příjemci testováni s příslušným dárcem formou standardních krevních křížových zkoušek. Odstředěním nesrážlivé krve byly odděleny erytrocyty testovaných zvířat a ty byly následně rozpuštěny jednak ve fyziologickém roztoku a jednak v autologní krevní plazmě. Uvedené roztoky erytrocytů příjemců pak byly smíchány s plazmou dárců. Stejným principem byly smíchány i erytrocyty dárců s plazmou příjemců. V případě, že po odstředění těchto směsí nedošlo k aglutinaci u žádné

kombinace, byl výsledek křížové zkoušky hodnocen jako negativní. Metodika křížové zkoušky byla ověřena na vzorcích humánní krve dvou nekompatibilních skupin, u kterých došlo k aglutinaci. Všechna experimentální zvířata však pocházela z jednoho chovu a všechny provedené zkoušky byly negativní, čímž byla prokázána kompatibilita krevních skupin. K provedení křížových zkoušek bylo překročeno i přesto, že při klinickém využití allogenních cévních štěpů se běžně tato zkouška neprovádí. V rámci experimentu však bylo vhodné eliminovat potenciální riziko i klinicky nevýznamné nekompatibility.

6.2.4 Premedikace a celková anestezie

Před uvedením do celkové anestezie byla zvířata premedikována intramuskulární aplikací 10 mg/kg ketaminu (Narkamon; Spofa a.s., Praha, Česká republika), 5 mg/kg azaperonu (Stresnil; Jannssen Pharmaceutica NV, Beerse, Belgie) a 1 mg atropinu (Atropin Biotika; Hoechst Biotika, Martin, Slovenská republika). Po premedikaci byla kanylována periferní žíla na ušním boltci zvířete. Následně byla zvířata uvedena do celkové anestezie intravenózní aplikací bolusu 2–3 mg/kg propofolu (Propofol 1%, Fresenius Kabi Norge AS, Halden, Norsko). Celková anestezie pak byla udržována kontinuálním intravenózním podáváním propofolu v dávce 5–10 mg/kg/hod. K zajištění analgezie byl kontinuálně intravenózně aplikován fentanyl v dávce 1–2 µg/kg/hod (Fentanyl Torrex, Chiesi CZ s.r.o., Praha, Česká republika). Dýchací cesty byly zajištěny při úvodu do anestezie orotracheální intubací a zvířata byla v průběhu anestezie mechanicky ventilována směsí medicijního vzduchu a kyslíku. Celkový stav zvířete a jeho fyziologické funkce byly monitorovány v průběhu výkonu sledováním klinického stavu pomocí elektrokardiografie, měřením saturace krve kyslíkem pomocí pulzní oxymetrie, měřením parciálního tlaku oxidu uhličitého ve vydechovaném vzduchu a měřením tělesné teploty. V průběhu operačního výkonu byly zvířatům podávány krystaloidní roztoky typu Hartmannův roztok (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Německo) a Plasma-Lyte (Baxter Healthcare Ltd., Compton, Velká Británie). Před začátkem chirurgického výkonu byl zvířatům jako antibiotická profylaxe podán amoxicilin s kyselinou klavulonovou v dávce 1,2 g a tato dávka byla v průběhu výkonu opakována každé 2 hodiny (Augmentin, GlaxoSmithKline, Slovakia s.r.o., Bratislava, Slovenská republika).

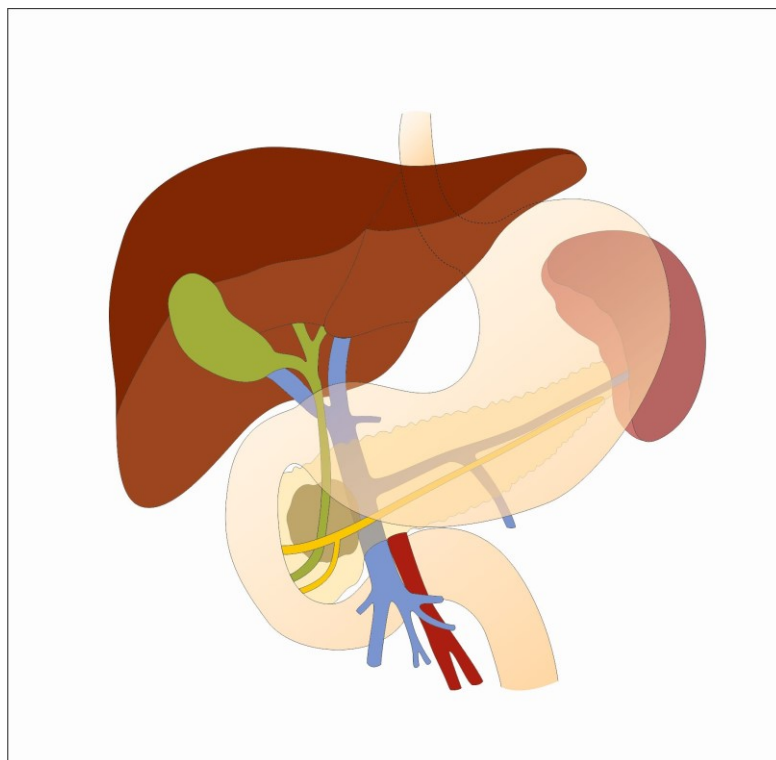
6.2.5 Odběr cévních štěpů

Alogenní žilní štěpy byly odebrány z jedinců zařazených do skupiny dárců. Po úvodu do celkové anestezie probíhal odběr štěpů za aseptických podmínek. Byla provedena střední laparotomie a byl vypreparován dostatečně dlouhý úsek VP a VCI. Zvířatům bylo intravenózně aplikováno 20 000 IU heparinu (Heparin, Zentiva Group a.s., Praha, Česká republika). Následně byly vyjmuty vypreparované úseky VP a VCI, které byly po propláchnutí ve fyziologickém roztoku (FR) s heparinem (20 000 IU heparinu/ 1l FR) skladovány v roztoku o shodném složení při teplotě kolem 8° C po dobu 24–48 hodin. Po odebrání cévních štěpů bylo zvíře usmrceno v hluboké celkové anestezii intravenózní aplikací kardioplegického roztoku.

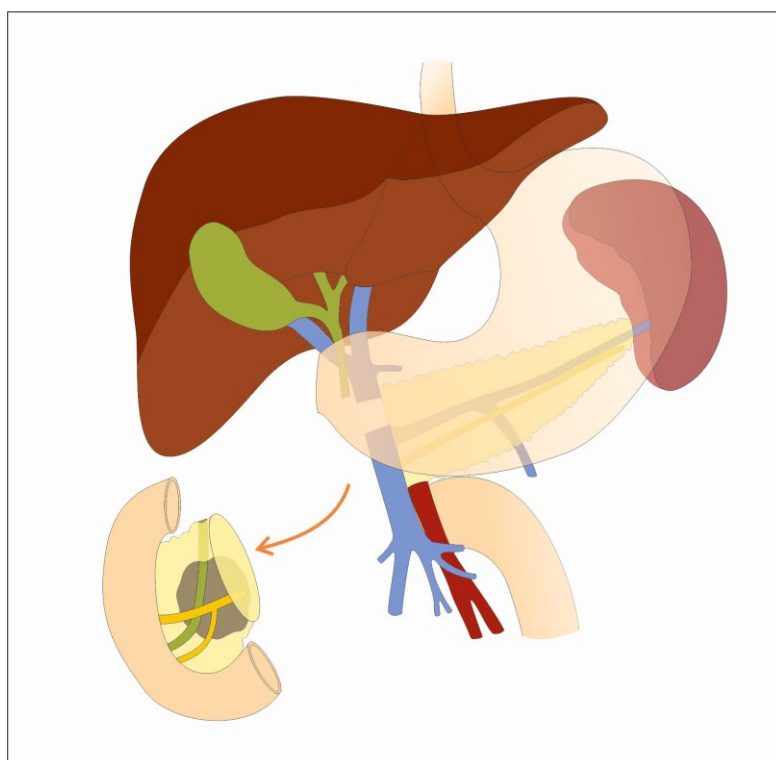
6.2.6 Hemipankreatoduodenektomie a rekonstrukce vena portae

Zvířatům ze skupin příjemců (skupina VP a VCI) byl po úvodu do celkové anestezie nejprve implantován port-a-cath (ProPort Plastic Venous Access System, Deltec, Smiths Medical Deutschland GmbH, Grasbrunn, Německo) do podkoží na pravé straně krku s katétre zavedeným cestou vena jugularis dextra do VCS. Port-a-cath byl využíván v pooperačním období k podávání infuzní terapie, intravenózní premedikaci a odběrům krevních vzorků. Jeho použití tak umožnilo minimalizaci stresu zvířete. Následně byla provedena střední laparotomie a samotná pylorus šetřící hemipankreatoduodenektomie, která probíhala podle standardního protokolu. Jedinou odlišností bylo ponechání žlučníku, a tím pádem protnutí žlučových cest na úrovni ductus choledochus. K tomuto kroku bylo přistoupeno za účelem eliminace žlučového leaku vzhledem k poměrně gracilním žlučovým cestám u prasete domácího. Výkon je schematicky znázorněn na obrázku č. 3A, B a C. Po protnutí žlučových cest byl proveden Kocherův manévr, tedy mobilizace duodena a hlavy pankreatu. Byla vypreparována a následně protnuta arteria gastroduodenalis. Část D3 a D4 duodena byla uvolněna od VMS, AMS a také v oblasti Treitzova ligamenta. Proximální jejunum bylo protnuto asi 20 cm za Treitzovým ligamentem a proximální část duodena byla protnuta přibližně 1 cm distálně od pyloru. Následně byl vyjmutý celý preparát obsahující duodenum, hlavu pankreatu a proximální jejunum. Samotná resekce VP byla provedena až v následujícím kroku vzhledem k absenci tumoru pankreatu a nutnosti dokumentace anatomie portálního řečiště před resekci.

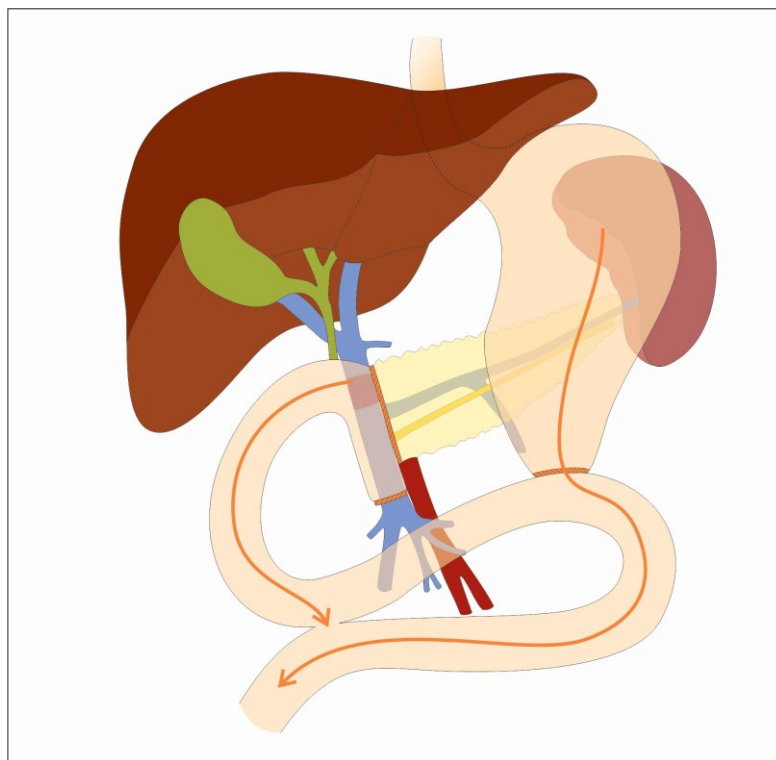
Zvířeti bylo intravenózně podáno 100 IU heparinu/kg jako prevence trombotických komplikací po uzavření VP. Po 3 minutách od podání heparinu byly uzavřeny VMS a VL těsně před jejich soutokem. VP byla uzavřena před jejím vstupem do jaterního hilu a 2–3cm úsek VP byl resekován. Předem odebraný alogenní žilní štěp VP nebo VCI byl vyjmut z FR a upraven na vhodnou délku. Tento štěp byl pak použit jako interponát k rekonstrukci resekované VP. Dvě end-to-end anastomózy byly zkonstruovány pokračujícím cévním stehem. Jako šicí materiál byl využit monofilamentní polypropylenový steh síly 5–0 (Ethicon Inc., Johnson & Johnson s.r.o., Praha, Česká republika). Ještě před samotnou resekcí VP byl pomocí posuvného měřidla změřený průměr VP, VMS a VL a byla pořízena fotodokumentace portálního řečiště. Po provedené rekonstrukci pak byla změřena délka štěpu, průměr obou anastomóz a opět průměr VP, VMS a VL. Znovu byla pořízena i fotodokumentace zrekonstruované VP, která umožnila pozdější vytvoření geometrického modelu. V rámci rekonstrukce kontinuity gastrointestinálního traktu byla zkonstruována pankreatiko-jejuno anastomóza end-to-side umístěná cca 2 cm od zaslepeného konce proximálního jejunu. Vzhledem k měkké konzistenci pankreatu a tenkému pankreatickému vývodu u prasete byla zvolena invaginační technika. Přibližně 10 cm distálně od této anastomózy byla provedena choledocho-jejuno anastomóza end-to-side. Žaludek byl napojen na jejunum formou duodeno-jejuno anastomózy asi 30 cm distálně od anastomózy žlučových cest. Jako poslední pak byla zkonstruována entero-entero anastomóza side-to-side dle Brauna jako prevence vstupu žluči a pankreatické šťávy do žaludku. Laparotomie byla následně uzavřena a zvířata byla po vyvedení z celkové anestezie extubována.



Obrázek č. 3A: Příklad lokalizace tumoru v oblasti hlavy pankreatu.



Obrázek č. 3B: Schematické znázornění resekátu odebraného při hemipankreatoduodenektomii. V rámci experimentu nebyla oproti standardní hemipankreatoduodenektomii provedena cholecystektomie.



Obrázek č. 3C: Rekonstrukce VP interponovaným štěpem a obnovení kontinuity gastrointestinálního traktu pomocí pankreatiko-jejuno anastomózy, choledocho-jejuno anastomózy, duodeno-jejuno anastomózy a jejuno-jejuno anastomózy dle Brauna.

6.2.7 Pooperační péče a sledování

Po dokončení výkonu a nabytí vědomí byla zvířata přesunuta do vyhřívaných kotců, kde měla neomezený přístup k vodě. Perorální příjem stravy byl postupně navyšován vzhledem k rozsahu výkonu na gastrointestinálním traktu. Zvířata byla denně monitorována s cílem odhalení případných komplikací po výkonu. Celková délka sledovacího období činila 4 týdny. Prvních 7 dní byla zvířatům denně cestou port-a-cath podávána infuze 250 ml 5% glukózy a 250 ml Hartmanova roztoku (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Německo). Zvířatům bylo v prvním týdnu také jednou denně intravenózně aplikováno 40 mg pantoprazolu (Nolpaza, KRKA Slovensko, s.r.o., Bratislava, Slovenská republika). Od začátku druhého pooperačního týdne do konce sledovacího období byl již pantoprazol ve stejné dávce přidáván do potravy. Byly prováděny pravidelné odběry krevních vzorků a to před operací (1), v průběhu výkonu těsně před resekci VP (2), ihned po rekonstrukci VP (3), dvě hodiny po rekonstrukci VP (4) a dále pak 7. (5), 14. (6), 21. (7) a 28. (8) pooperační den. Odebrané vzorky krve byly využity k biochemickému stanovení sérové hladiny následujících jaterních a ledvinných markerů – aspartátaminotransferázy (AST),

alaninaminotransferázy (ALT), γ -glutamyltransferázy (GGT), alkalické fosfatázy (ALP), bilirubinu, urey a kreatiniu. V perioperačním a pooperačním období byla dále prováděna DUSG, a to před operací (1), po operaci (2) a následně 7. (3), 14. (4), 21. (5) a 28. (6) pooperační den (Ultrasound Scanner BK Medical, Pro Focus 2202). V rámci těchto vyšetření byla měřena rychlost toku krve ve VP, VMS, VL a v místě implantovaného žilního štěpu. Dále byl měřen průměr VP, VMS, VL, cévních anastomóz a samotného štěpu. Na konci sledovacího období, tedy 28. pooperační den byla zvířata opět uvedena do celkové anestezie, byla revidována dutina břišní, vypreparována rekonstruovaná VP a její úsek včetně interponovaného štěpu byl resekován a uložen v 10% formalínu. Zvířata byla následně v hluboké celkové anestezii usmrcena intravenózní aplikací kardioplegického roztoku.

6.2.8 Histologické vyšetření

Histologicky vyšetřeny byly jednak úseky VP s interponovaným štěpem odebrané na konci experimentu, a jednak zbytky samotných štěpů, které nebyly využity k rekonstrukci. Účelem vyšetření bylo charakterizovat žilní stěnu nativní VP a VCI prasete domácího a dále zdokumentovat morfologické změny, ke kterým došlo v průběhu 4 týdnů po implantaci alogenních štěpů těchto cév do portálního řečiště.

Všechny odebrané žilní vzorky byly rozstříženy podélně ve směru toku krve a napnuty na korek tak, aby byla minimalizována jejich deformace v průběhu fixace a aby byla zachována orientace cévy ve smyslu proximálního a distálního konce žíly. Vzorky byly nejprve fixovány v 10% neutrálním pufovaném formalínu a následně zpracovány do parafínových bločků. Z bločků pak byly připraveny 3 μ m řezy. Vzorky byly krájeny v rovině rovnoběžné k podélné ose cévy tak, aby byly na řezu zastiženy obě anastomózy, celá délka interponovaného štěpu a i části VP příjemce. K přehlednému vyšetření bylo využito barvení hematoxylinem a eozinem a barvení Verhoeffovým hematoxylinem a zeleným trichromem. Byla vyšetřena přítomnost trombů, infiltrace lymfocyty, integrita endoteliální vrstvy a vytvoření neointimy. Dále byla provedena specifická barvení ke kvalitativnímu i kvantitativnímu vyšetření konkrétních struktur cévní stěny. Barvení pikrosiriovou červení a následné vyšetření v kruhově polarizovaném světle umožnilo vyšetření kolagenu typu I a II (Direct Red 80, Sigma Aldrich, Munich, Německo). K vyšetření elastických vláken bylo využito barvení orceinem podle Tanzera (Bowley Biochemical Inc., Danvers, MA, USA).

Imunohistochemické barvení hladkosvalového aktinu pak bylo provedeno k rozlišení hladkosvalových buněk a kontraktálních myofibroblastů v cévní stěně (Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin, Clone 1A4, DakoCytomation, Glostrup, Dánsko, ředění 1 : 500). Ke kvantifikaci uvedených struktur (kolagen typu I a II, elastin a kontraktální buňky) byla provedena stereologická analýza. Jejím principem bylo určení plošného podílu daných struktur ve vyšetřovaném poli histologického řezu. Plošný podíl struktury byl určen pomocí bodové testovací mřížky v systému Stereologer (Stereology Resource Center, Inc., Chester, MD, USA). Princip spočívá v sečtení bodů mřížky, které protínají cílovou strukturu, jako např. buňky pozitivní na hladkosvalový aktin. Tento počet je pak vydělen celkovým počtem bodů mřížky a je získána hodnota plošného podílu vyjádřená v procentech. K vyšetření plošného podílu konkrétní struktury v cévní stěně je také potřeba definovat oblast zájmu, ve které se tento podíl u jednotlivých vzorků stanovuje. V případě žilních preparátů v tomto experimentu však nebyly jednotlivé vrstvy žilní stěny vždy jednoznačně rozlišitelné. V případě vzorků nativních štěpů VP byla definována oblast zájmu v šíři od luminální strany žíly až po vrstvu podélně orientované hladké svaloviny v tunica adventitia. Průměrná šíře oblasti zájmu pak byla u vzorků v případě nativní VP 91 μm . V případě nativního štěpu VCI však byla oblast zájmu stanovena v šíři od luminální strany až po zřetelnou vrstvu elastinu v tunica adventitia. Tato vzdálenost měřila průměrně 275 μm . V případě vzorků žilních štěpů odebraných 4 týdny po implantaci nebylo možné bezpečně definovat vnější hranici oblasti zájmu. Šíře oblasti zájmu byla tedy u štěpů po implantaci stanovena na 600 μm od luminální strany. Tato vzdálenost odpovídala vzdálenosti od luminální strany po vrstvu elastických vláken u štěpu, který měl nejtenčí stěnu ze všech vyšetřovaných. V případě stanovení širší oblasti zájmu by se zvyšovalo riziko nepřesnosti analýzy.

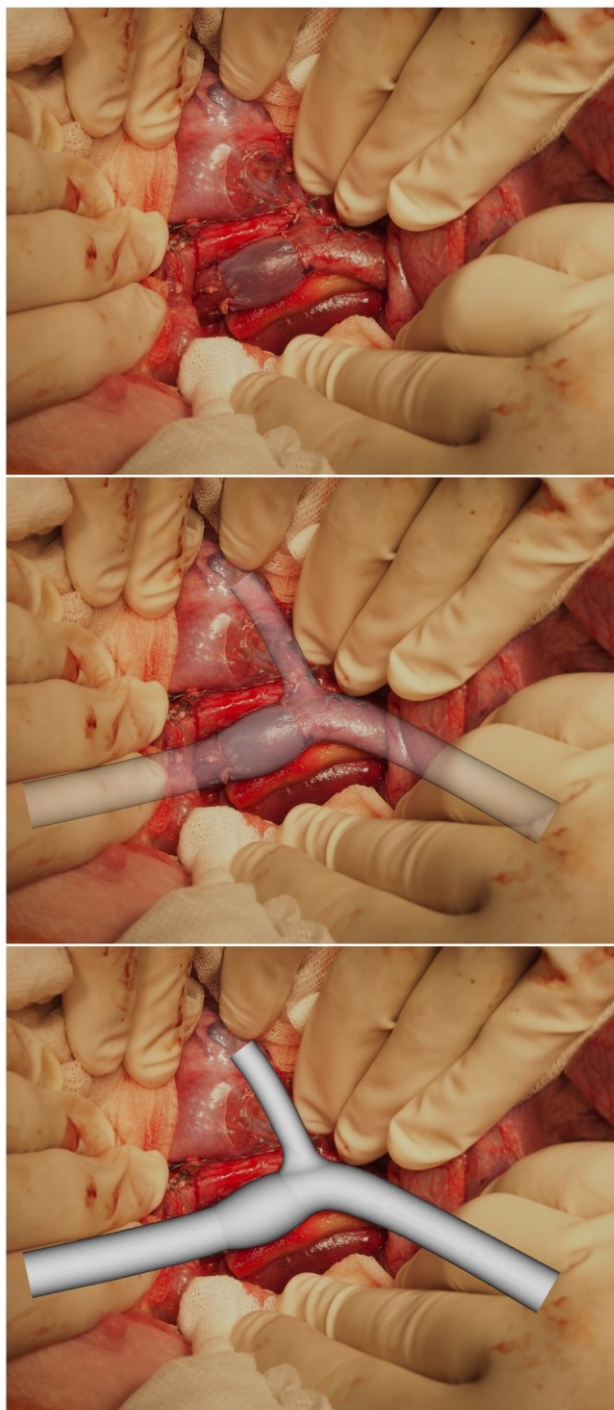
6.2.9 Matematické modelování

Pro posouzení hemodynamiky v portálním systému po jeho rekonstrukci interponovaným štěpem bylo provedeno několik matematických modelů. Do této analýzy bylo zařazeno 5 zvířat ze skupiny VP (VP-9 – VP-13) a 5 zvířat ze skupiny VCI (VCI-9 – VCI-13). Všechny modely portálního řečiště byly vytvořeny na základě skutečné geometrie zaznamenané díky perioperačnímu měření a na perioperačních fotografiích (obrázek č. 4). Pro každé zvíře pak byly vytvořeny

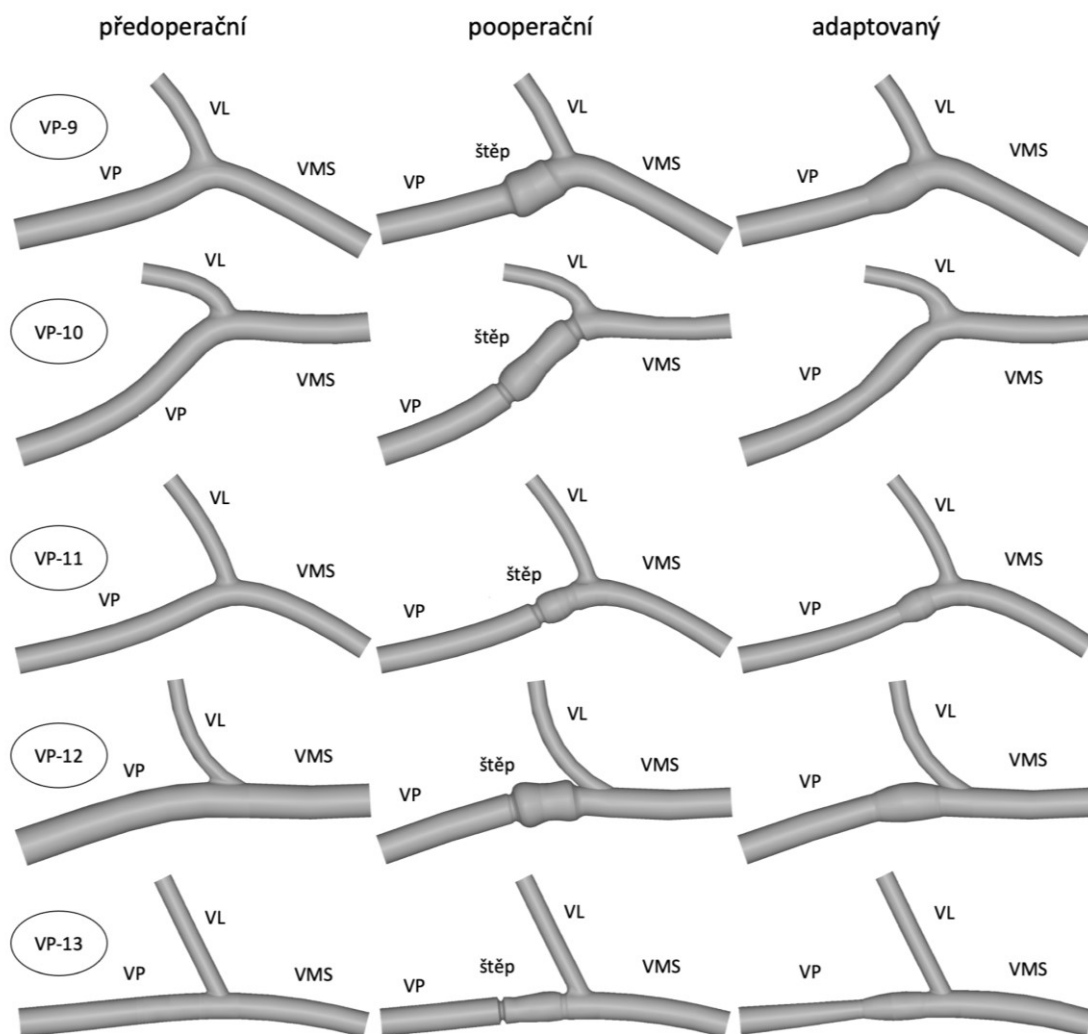
3 modely. Jednalo se vždy o model *předoperační* (data z perioperačního měření a z fotografií pořízených před resekci VP), model *pooperační* (data z perioperačního měření a z fotografií pořízených ihned po resekci VP) a model *adaptovaný* (data z pooperačních DUSG předpoklad částečné adaptace geometrie štěpu dle nálezů na konci experimentu). Celkem tak bylo vytvořeno 30 matematických modelů portálního řečiště (15 pro skupinu VP a 15 pro skupinu VCI) (obrázek č. 5). Matematický popis toku krve v portálním řečišti byl vytvořen na základě Navier-Stokesovy rovnice charakterizující proudění nestlačitelné newtonovské tekutiny. Zohledněny byly i periodické fluktuace toku krve naměřené DUSG. Přítoky simulující VMS a VL byly charakterizovány na základě dat naměřených DUSG u jednoho ze zvířat ze skupiny VCI (VCI-12). Tato data byla použita jako referenční pro všechny modely. Rychlosti proudění krve ve VMS a VL byly tedy vztaženy proporčně k rychlostem naměřeným u zvířete VCI-12 tak, aby byla umožněna korelace jednotlivých modelů a aby celkové zhodnocení vlivu geometrie zrekonstruovaného řečiště na proudění krve bylo nezávislé na hemodynamice konkrétního zvířete.

Pro základní zobrazení vlastností toku krve ve vytvořených modelech byl zvolen parametr *time-averaged velocity magnitude* (TAVM). Tato metodika umožnila zobrazení průměrných rychlostí proudění v jednotlivých částech portálního řečiště. Výsledky jsou vyobrazeny na podélném řezu vedeném středem cévy. Cílem matematického modelování však bylo i vyhodnotit riziko vzniku trombózy v portálním řečišti. Byly tedy využity i další parametry. *Time-averaged wall shear stress* (TAWSS) je parametr umožňující popis smykového napětí na stěně cévy. Toto napětí působí protékající krev na endotel cévy. Příliš vysoké i příliš nízké hodnoty TAWSS jsou známkou narušené hemodynamiky a jsou často primární příčinou poškození endotelu (351). Dalším markerem narušení fyziologického proudění krve je parameter *relative residence time* (RRT). Tento parametr popisuje dobu setrvání částic na určitém místě, což v tomto případě odpovídá místům s větší tendencí ke stagnaci krve (352). RRT se ale vyjadřuje pouze k bezprostřední blízkosti cévní stěny. Byl tak využit i parametr, který popisuje dobu setrvání částic v celém lumen cévy. Jedná se o metodu virtuálního inkoustu, v rámci které je geometrický model cévy vyplněn virtuálním inkoustem o dané koncentraci C , je modelováno jeho vymývání, tedy postupný pokles koncentrace virtuálního inkoustu v jednotlivých částech řečiště.

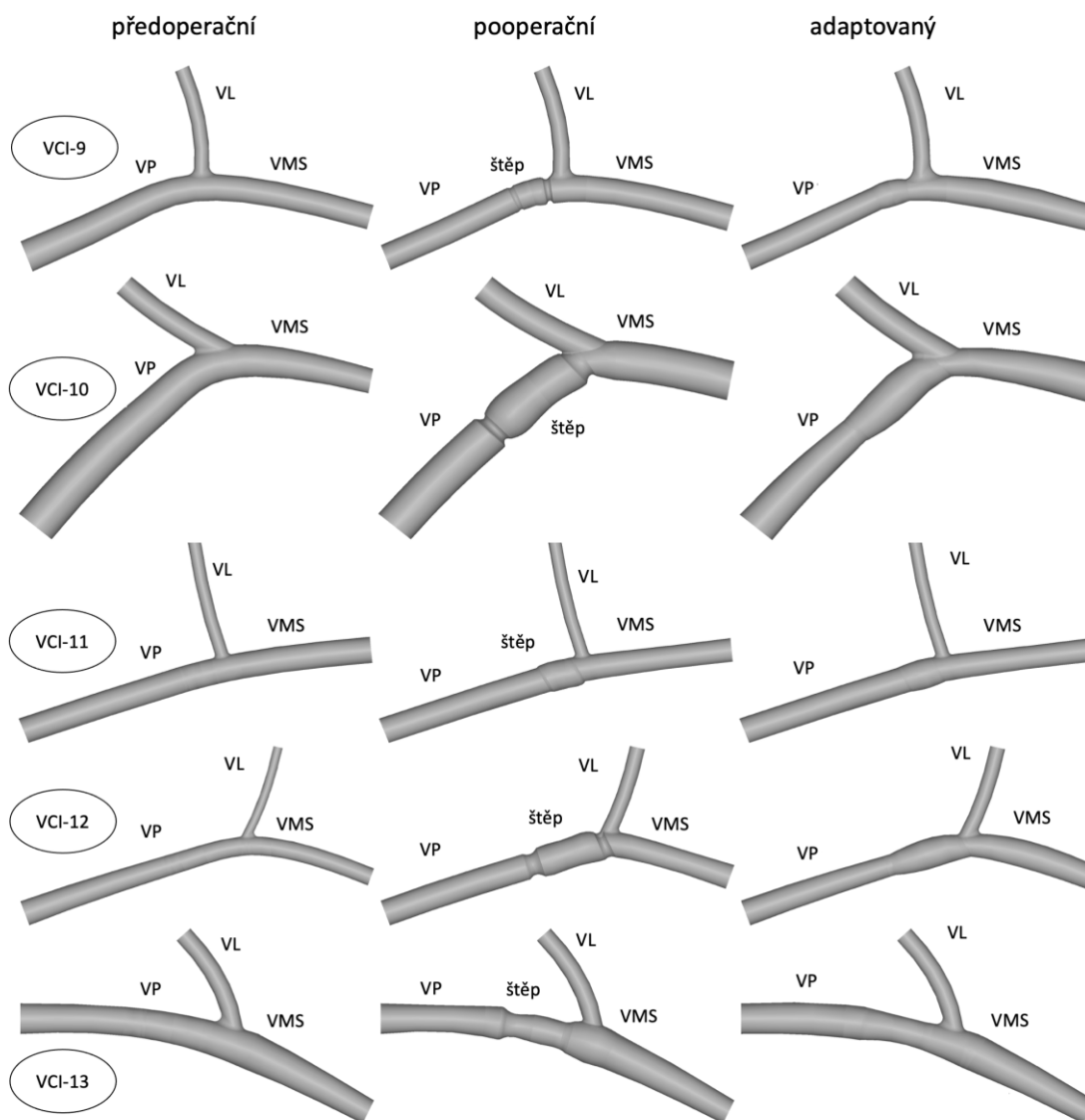
Pokles pod hraniční hodnotu C_{crit} pak umožňuje stanovit čas setrvání částic (*residence time*, RT_c). Takto je možné lépe identifikovat místa napříč průměrem cévního lumen s pomalou rychlostí toku a stagnací, která jsou náchylná k agregaci krevních elementů, a tedy riziková pro rozvoj trombózy.



Obrázek č. 4: Pořízené fotografie a perioperačně naměřené rozměry byly využity k přípravě geometrických modelů portálního řečiště u jednotlivých prasat.



Obrázek č. 5A: Souhrn geometrických modelů portálního řečiště před resekci VP (předoperační), časně po rekonstrukci (pooperační) a s časovým odstupem od rekonstrukce (adaptovaný). Jedná se o rekonstrukce u zvířat ze skupiny VP.



Obrázek 5 B: Obdobné rekonstrukce jako na obrázku č. 6A, ale v případě zvířat ze skupiny VCI. Na obrázku č. 6A i B je patrná různá míra odklonu osy VMS a VP. Např. zvířata PV-13 a IVC-11 s téměř jednotnou osou VMS a VP, naopak např. u zvířat PV-9 a IVC-10 je odklon osy VMS a VP výrazný.

6.2.10 Statistická analýza

Výsledky biochemických parametrů a matematického modelování byly analyzovány s ohledem na jednotlivé časové body a na příslušnost zvířat k dané experimentální skupině (VP či VCI) pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) opakovaných měření. Vzhledem k absenci některých hodnot průměrů cév a rychlostí krevního toku, které se nepodařilo při DUSG vyšetřeních naměřit, nebyla pro tyto parametry ANOVA opakovaných měření vhodná. Byl tedy využit následující postup, kdy k analýze celkového rozdílu mezi oběma skupinami přes celé sledovací období byly naměřené hodnoty vždy pro každý časový bod převedeny na z-skóre. Tato z-skóre z jednotlivých časových bodů pak byla sloučena (tedy brána jako nezávislá pozorování bez ohledu na čas odběru) a rozdíly v jejich hodnotách mezi jednotlivými skupinami byly testovány pomocí Mann-Whitney U testu. Pro vyhodnocení časového vývoje proměnných byly jejich hodnoty převedeny na z-skóre přes všechny dostupné časové body v rámci každého zvířete. Z-skóre pak byla sloučena v rámci každého časového bodu napříč zvířaty a s využitím Kruskal-Wallis ANOVA a Spearmanovy korelace byl hodnocen vývoj těchto z-skóre v čase. Kruskal-Wallis ANOVA umožnila zhodnotit, zda jsou hodnoty mezi časovými body významně nesejné, zatímco Spearmanova korelace umožnila odhalit signifikantní trendy růstu či poklesu hodnot v čase. Časový vývoj byl hodnocen jednak pro zvířata z obou skupin dohromady, ale také pro každou skupinu samostatně. Rozdíly ve výsledcích kvantitativní histologické analýzy mezi skupinami byly vyhodnoceny za využití Mann-Whitney U testu. K porovnání obou skupin ve smyslu změn žilní stěny nativního štěpu po jeho implantaci byla použita dvoufaktorová ANOVA s interakcemi. Všechny uváděné p hodnoty jsou pro oboustranné testy a hladina významnosti byla nastavena jako $\alpha = 0.05$. Statistické zpracování a testování bylo provedeno s využitím software STATISTICA data analysis software system (Version 12; StatSoft, Inc, 2013; www.statsoft.com).

6.3 Výsledky

6.3.1 Přežití zvířat

Hemipankreatoduodenektomie s rekonstrukcí VP alogenním žilním štěpem byla provedena u 26 prasat. Devatenáct zvířat přežilo po celou dobu experimentu (4 týdny), z toho ve skupině VP přežilo 8 zvířat a ve skupině VCI pak 11 jedinců. Celkem 7 zvířat uhynulo předčasně z důvodů perioperačních komplikací (5 ve skupině VP a 2 ve skupině VCI). Dvě zvířata uhynula v souvislosti s trombózou extrahepatální části VP, ke které došlo časně po rozsáhlém operačním výkonu (zvíře VP-4 uhynulo bezprostředně po výkonu, zvíře VCI-3 pak první pooperační den). Další 3 z prasat uhynula také v časném pooperačním období, přičemž u 2 zvířat se jednalo o úmrtí z důvodu oběhového selhání (VP-11 první pooperační den, VP-5 druhý pooperační den) a u 1 zvířete pak o důsledek krvácivých komplikací (VCI-5 první pooperační den). Poslední 2 zvířata pak uhynula s delším odstupem od výkonu, a to v důsledku gastrektázie (VP-9 osmnáctý pooperační den) a v důsledku objemné pankreatické pseudocysty (VCI-10 dvanáctý pooperační den).

6.3.2 Trombóza vena portae

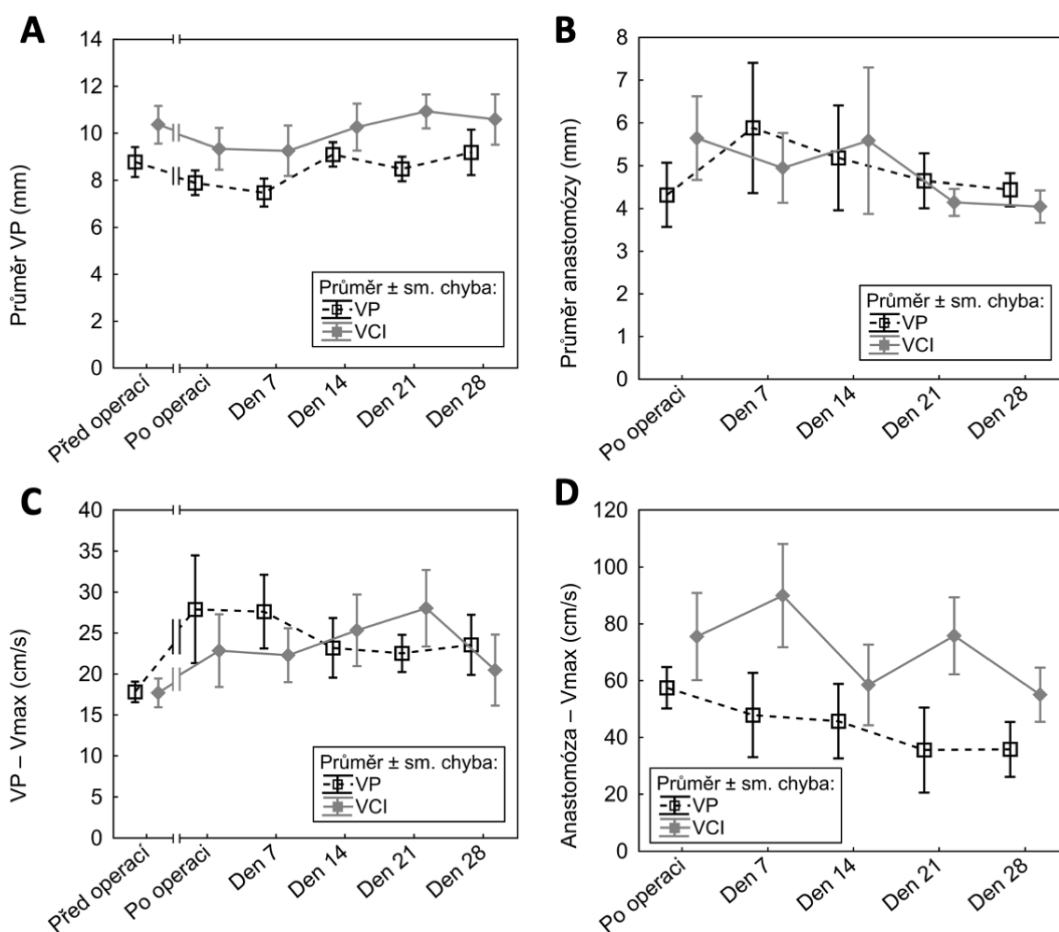
K trombotizaci extrahepatální části VP došlo celkem u 5 zvířat, tedy u 19,2 % ze všech 26 operovaných jedinců. Jednalo se o 4 zvířata ze skupiny VP a 1 zvíře ze skupiny VCI. Jak bylo zmíněno výše, celkem dvakrát se tato trombóza podílela na časném úhynu zvířat. Zbývá 3 zvířata přežila s trombózou VP po celou dobu experimentu a trombóza byla odhalena při DUSG vyšetřeních nebo v průběhu odběru žilního štěpu na konci experimentu.

6.3.3 Parametry portálního řečiště

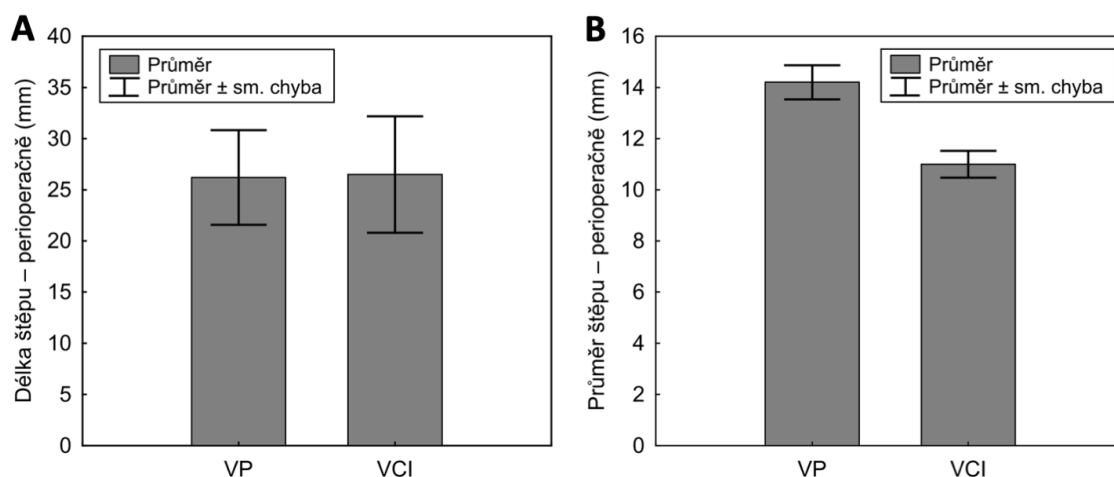
DUSG vyšetření odhalilo větší průměr kmene VP ve skupině VCI oproti skupině VP ($p=0.002$). Tento rozdíl však byl přítomný již v rámci předoperačního vyšetření. Časový vývoj této hodnoty nevykazoval ani stoupající ani klesající tendenci a mezi skupinami se neodlišoval ($p>0.05$) (obrázek č. 6A). Průměr v oblasti anastomózy měl tendenci ke zužování ve skupině VCI ($p=0.034$) a naopak tendenci k rozšiřování

ve skupině VP ($p=0.048$) (obrázek č. 6B). Absolutní hodnoty průměru v oblasti anastomózy však nebyly mezi skupinami signifikantně odlišné ($p>0.05$). Oblast anastomózy byla z důvodů limitace DUSG vyšetření definována jako oblast nejužšího místa zrekonstruované VP. Rychlost proudění krve v oblasti anastomózy byla vyšší u skupiny VCI oproti skupině VP ($p=0.008$) (obrázek č. 6D). U obou skupin byl zaznamenán nárůst rychlosti proudění krve ve VP po rekonstrukci žilním štěpem (měřeno distálně od implantovaného štěpu ve směru toku krve) ($p=0.019$) (obrázek č. 6C). Ostatní, pomocí DUSG naměřené, průměry žilního řečiště a rychlosti proudění nevykazovaly statisticky signifikantní rozdíly mezi skupinami a nebyly pozorovány ani statisticky signifikantní trendy ve smyslu růstu či poklesu jejich hodnot v čase.

Délka žilních štěpů využitých k rekonstrukci VP se mezi jednotlivými zvířaty lišila, její hodnoty však byly srovnatelné mezi oběma skupinami. Byly použity štěpy o délce 14–43 mm (průměrná hodnota 25,3 mm). Ve skupině VP se jednalo o štěpy dlouhé 20–43 mm (průměrná hodnota 26,2 mm) a ve skupině VCI o štěpy dlouhé 14–40 mm (průměrná hodnota 24,4 mm) (obrázek č. 7A). Perioperační přímé měření prokázalo větší průměr štěpů VP v porovnání se štěpy VCI ($p=0.006$). U štěpů VP byl naměřený průměr po jejich naší 12–16 mm (průměrná hodnota 14,2 mm) zatímco u štěpů VCI byl průměr 9–12 mm (průměrná hodnota 11 mm) (obrázek č. 7B). Perioperační průměry štěpů byly měřeny v polovině jejich délky, tedy ve stejné vzdálenosti od obou anastomóz. Jiné statisticky signifikantní rozdíly nebyly v rámci perioperačního měření zaznamenány. Hodnoty naměřené perioperačně posloužily k vytvoření geometrických modelů portálního řečiště.



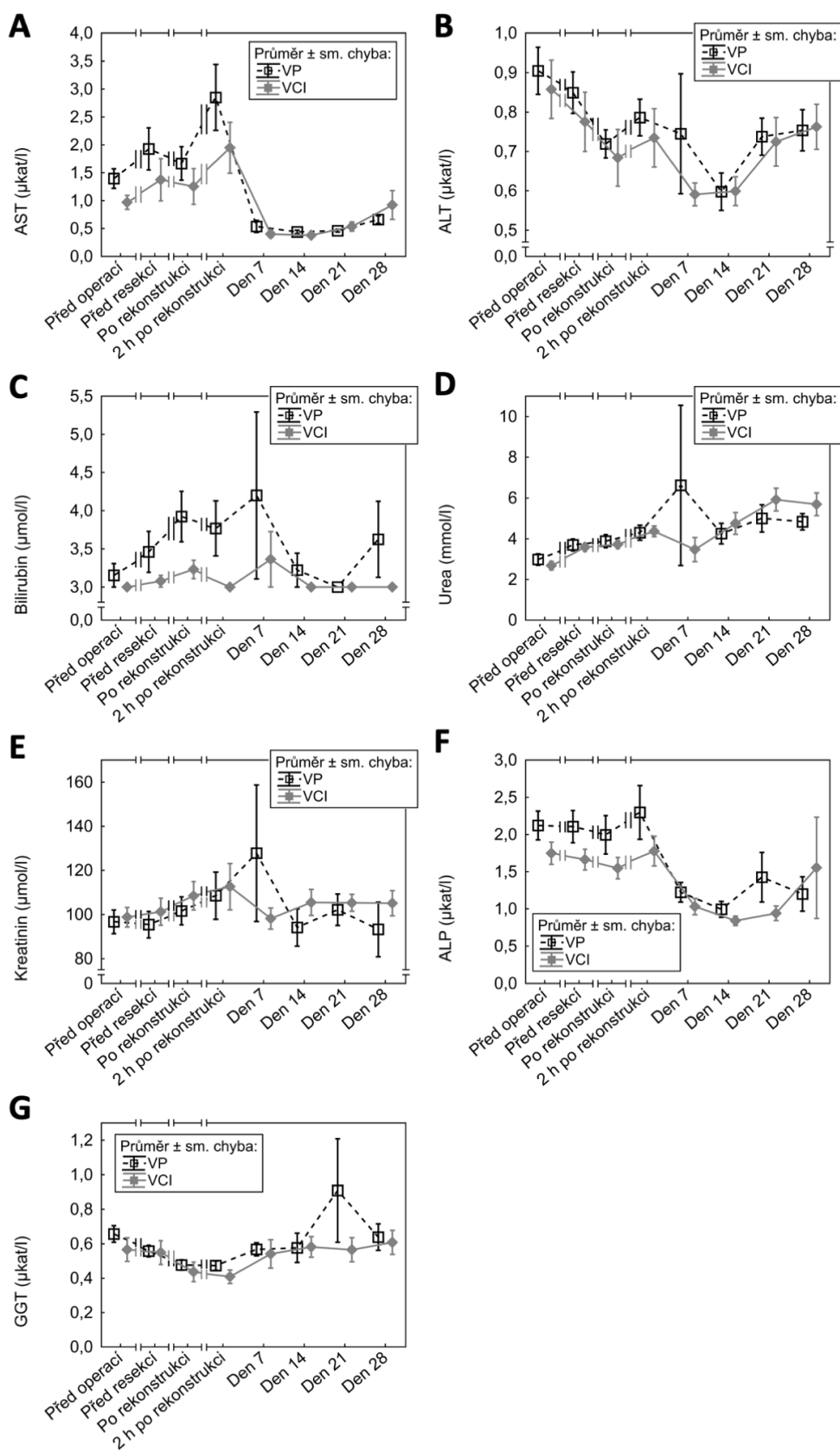
Obrázek č. 6: Výsledky DUSG. A: Průměr portální žíly byl větší ve skupině VP. B: Průměr v oblasti anastomózy měl tendenci ke zužování ve skupině VCI, zatímco ve skupině VP průměr narostl v prvním týdnu po operaci. C: U obou skupin významně narostla v prvním týdnu po výkonu rychlost proudění krve ve VP distálně za interponovaným štěpem. D: Rychlost proudění krve v oblasti anastomózy byla vyšší u skupiny VCI.



Obrázek č. 7: A: Délky interponovaných žilních štěpů byly v obou skupinách srovnatelné. B: Perioperačně měřený průměr stanovený ve středu délky štěpu byl větší u štěpů ve skupině VP.

6.3.4 Analýza biochemických parametrů

Naměřené hodnoty biochemických markerů byly vyhodnoceny za celé perioperační a pooperační období a byly porovnány mezi skupinami. Sérová hladina AST stoupla 2 hodiny po rekonstrukci VP srovnatelně u obou skupin. V průběhu prvního pooperačního týdne pak došlo k její normalizaci (obrázek č. 8A). Hodnoty ostatních sledovaných markerů jaterního postižení (ALT, GGT, ALP, bilirubin) nevykazovaly po celou dobu experimentu významné odchýlení od fyziologických hodnot. Sérové hladiny urey a kreatininu neprokázaly ovlivnění renálních funkcí v průběhu experimentu. Při srovnání hodnot všech sledovaných markerů mezi oběma experimentálními skupinami nebyly prokázány žádné statisticky signifikantní rozdíly ($p > 0.05$). Výsledky biochemické analýzy jsou prezentovány v příložených grafech (obrázek č. 8).

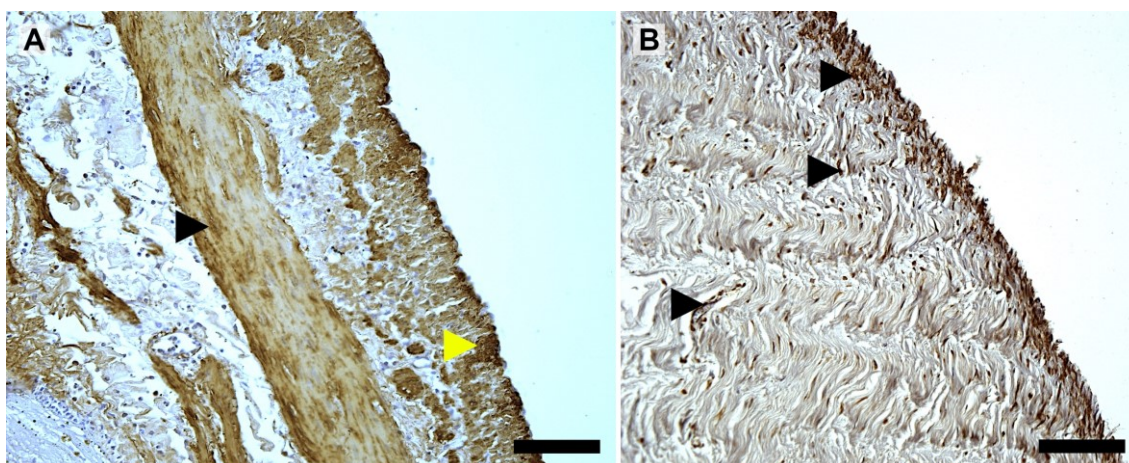


Obrázek č. 8: Výsledky biochemické analýzy neprokázaly statisticky signifikantní rozdíly mezi skupinou VP a VCI.

6.3.5 Histologické vyšetření

6.3.5.1 Struktura žilních štěpů před implantací

Kvalitativní i kvantitativní histologické vyšetření prokázalo rozdíly ve stavbě žilní stěny štěpů VP a VCI před jejich implantací. Nativní štěpy VP obsahovaly souvislou vrstvu hladké svaloviny, která chyběla u štěpů VCI (obrázek č. 9). Toto pozorování bylo potvrzeno výsledkem kvantitativní analýzy, podle které byl plošný podíl buněk pozitivních na hladkosvalový aktin vyšší u štěpů VP oproti štěpům VCI ($p=0.005$). Naopak nativní štěpy VCI obsahovaly více kolagenu typu I a III oproti štěpům VP ($p=0.006$). Množství elastinu nebylo mezi oběma druhy štěpů statisticky významně odlišné ($p>0.05$). Výsledky kvantitativního hodnocení stavby nativních štěpů jsou prezentovány v příložené tabulce č. 5.



Obrázek č. 9: Stěna nativních žilních štěpů VP (A) a VCI (B) před jejich implantací. Imunohistochemické barvení monoklonální protilátkou proti hladkosvalovému aktinu (pozitivní reakce hnědě). Měřítko = 100 μm , lumen cévy vždy na pravé straně. A: Ve stěně VP byla pozorována souvislá vrstva buněk pozitivních na hladkosvalový aktin (černá šipka). Tyto buňky se nacházely i subendoteliálně (žlutá šipka). B: V případě štěpu VCI nebyla zastížena souvislá vrstva buněk pozitivních na hladkosvalový aktin, ale tyto buňky se nacházely v žilní stěně ojedinelé a kvantitativně byl ve štěpu VCI prokázán jejich menší plošný podíl oproti štěpu VP.

Tabulka č. 5: Plošné podíly jednotlivých složek stěny štěpů VP a VCI před. a po jejich implantaci. Procento před závorkou vyjadřuje medián hodnoty, v závorce je uvedeno mezikvartilové rozpětí.

Štěpy před implantací		kolagen I a III	elastin	hladkosvalový aktin
VP	medián (Q1-Q3)	7 % (5–11 %)	13 % (8–17 %)	41 % (38–43 %)
VCI	medián (Q1-Q3)	22 % (16–30 %)	15 % (13–21 %)	6 % (5–10 %)
p hodnota (Mann-Whitney U test)		p=0.006	p>0.05	p=0.005

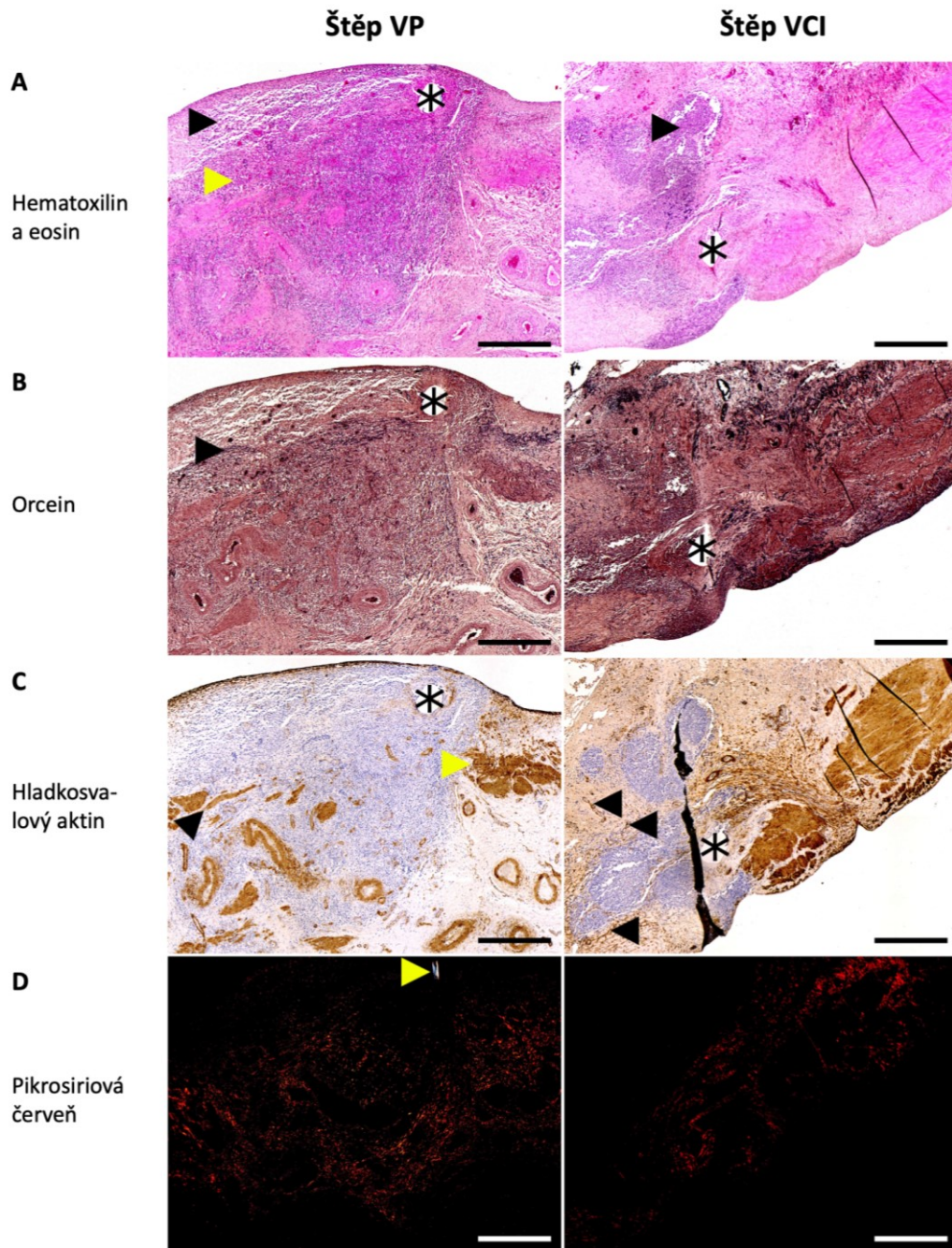
Štěpy po implantaci		kolagen I a III	elastin	hladkosvalový aktin
VP	medián (Q1-Q3)	13 % (12–19 %)	4 % (3–9 %)	15 % (10–19 %)
VCI	medián (Q1-Q3)	15 % (14–20 %)	6 % (4–7 %)	5 % (4–12 %)
p hodnota (Mann-Whitney U test)		p>0.05	p>0.05	p>0.05

6.3.5.2 Struktura štěpů po implantaci

Při vyšetření štěpů explantovaných na konci experimentu, tedy 4 týdny po jejich implantaci již nebyl ve složení jejich stěny pozorován žádný signifikantní rozdíl. Tedy plošné podíly kolagenu, elastinu ani hladkosvalového aktinu nebyly mezi skupinami statisticky signifikantně odlišné ($p > 0.05$). Data plošných podílů jednotlivých struktur ve štěpech na konci experimentu jsou opět prezentována v tabulce č. 5.

Štěpy tedy v průběhu 4 týdnů po implantaci prodělaly strukturální změny. Struktura stěny štěpů VP a VCI odebraných na konci experimentu je prezentována na přiloženém obrázku č. 10. Bylo provedeno srovnání charakteru stěny štěpů před implantací a na konci experimentu. Vývoj podílu jednotlivých struktur na stavbě stěny štěpů je patrný jednak z tabulky č. 5 a jednak z grafů na obrázku č. 11. V případě štěpů VP došlo v období po jejich implantaci k vymizení souvislé vrstvy hladkosvalových buněk a snížil se i plošný podíl buněk pozitivních na hladkosvalový aktin ($p = 0.008$). Změny v podílu kolagenu typu I a III a elastinu nebyly u štěpů VP statisticky signifikantní ($p > 0.05$).

U štěpů VCI došlo v průběhu 4 týdnů k poklesu podílu elastinu v jejich stěně ($p = 0.008$). Při kvalitativním vyšetření bylo pozorováno, že štěpy VCI obsahovaly na konci experimentu více buněk pozitivních na hladkosvalový aktin oproti stavu před jejich implantací, rozdíl plošného podílu hladkosvalového aktinu v rámci kvantitativní analýzy však nebyl statisticky signifikantní ($p > 0.05$). Také změna podílu kolagenu typu I a III u štěpů VCI v průběhu období po jejich implantaci nebyla statisticky signifikantní ($p > 0.05$). Podíl kolagenu se však na konci experimentu, na rozdíl od výchozího stavu, u štěpů VP a VCI statisticky signifikantně nelišil.



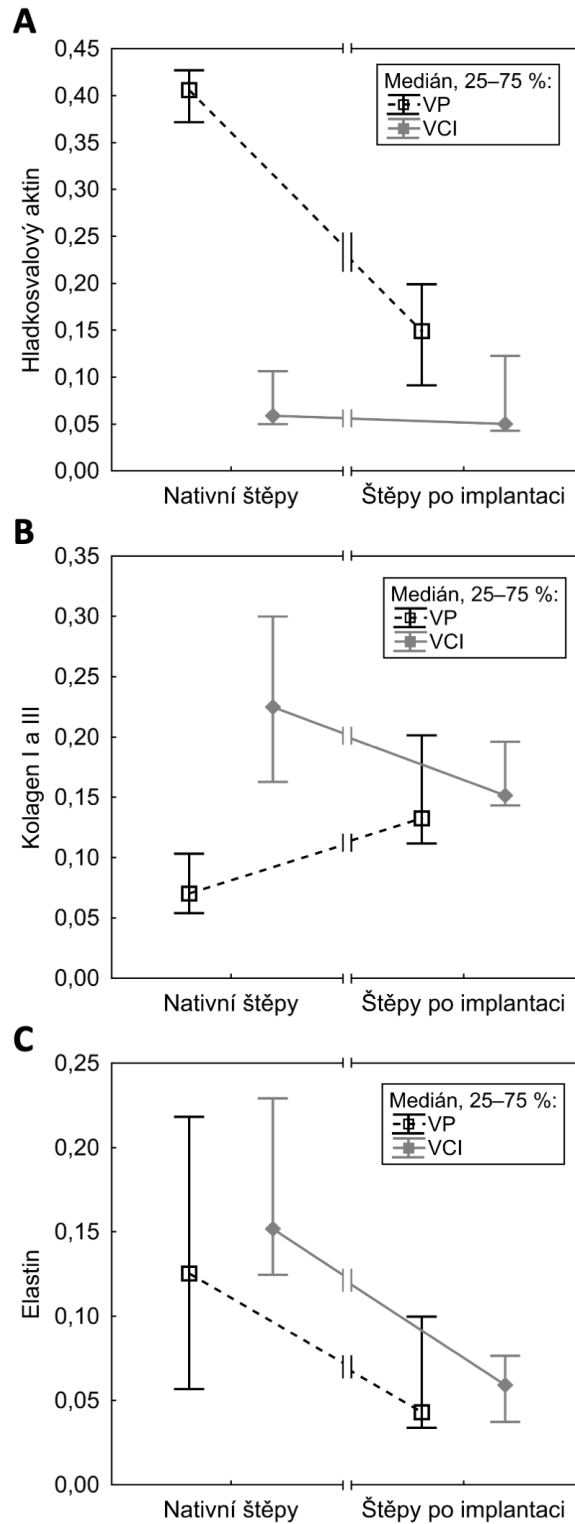
Obrázek č. 10: Stěna žilních štěpů VP a VCI 4 týdny po jejich implantaci. Snímky zachycují oblast anastomózy mezi štěpem a VP operovaného prasete. Otvor po stehu v místě anastomózy je značen hvězdičkou. Stěna štěpu se nachází vždy vlevo od hvězdičky a stěna VP vpravo. Měřítko = 500 μ m. A: Barvení hematoxylinem a eosinem. V oblasti štěpu VP je patrná neointima (černá šipka) a granulační tkáň (žlutá šipka). Ve stěně štěpu byla pozorována ložiska se zánětlivou infiltrací (černá šipka). B: Barvení orceinem na elastická vlákna. Černá šipka značí zřetelnou vrstvu elastických vláken, která se nacházela ve vzdálenosti kolem 600 μ m od lumen cévy. C: Imunohistochemické barvení protilátkou proti hladkosvalovému aktinu. Ve stěně VP je patrná souvislá vrstva hladké svaloviny (žlutá šipka). V samotných štěpech však došlo k vymizení této vrstvy a hladkosvalové buňky byly neorganizovaně rozmístěny napříč cévní stěnou (černé šipky). D: Barvení pikrosiriovou červení a vyšetření v polarizovaném světle na přítomnost kolagenu I (červeně až žlutě) a III (zeleně). Množství kolagenu bylo ve štěpech VP a VCI nebylo na konci experimentu signifikantně odlišné. Žlutá šipka značí artefakt v místě otvoru po stehu.

6.3.5.3 Ostatní kvalitativní histologické změny

U obou typů štěpů (VP i VCI) došlo v průběhu 4 týdnů po jejich implantaci do portálního řečiště k zesílení jejich stěny. Byla pozorována tvorba granulační tkáně ve stěně štěpu. Tato granulační tkáň obsahovala i kontraktilní buňky pozitivní na hladkosvalový aktin. Dále byl v této tkáni patrný vznik mikroskopických cévních struktur a vyskytovaly se zde i obrovské vícejaderné buňky z cizích těles. V oblasti intimy byla přítomna zánětlivá infiltrace a proliferace intimy s různou mírou intimální hyperplazie. Ani u jednoho z obou typů štěpů nebyla na konci experimentu pozorována souvislá vrstva hladké svaloviny. Jedinou diferencovatelnou souvislou vrstvou byla vrstva elastických vláken ve vzdálenosti kolem 600 μm od lumen štěpu. Štěpy zvířat, u kterých došlo k trombotizaci extrahepatální VP a která se zároveň dožila konce experimentu, obsahovaly organizované a částečně rekanalizované tromby. Stěna štěpů VP i VCI se tedy 4 týdny po implantaci skládala z kolagenu typu I a III, ze zbytků elastinu a z částečně organizované granulační tkáně prostoupené jednotlivými kontraktilními buňkami. Charakter stěny štěpů na konci experimentu je zdokumentován na přiloženém obrázku (obrázek č. 10).

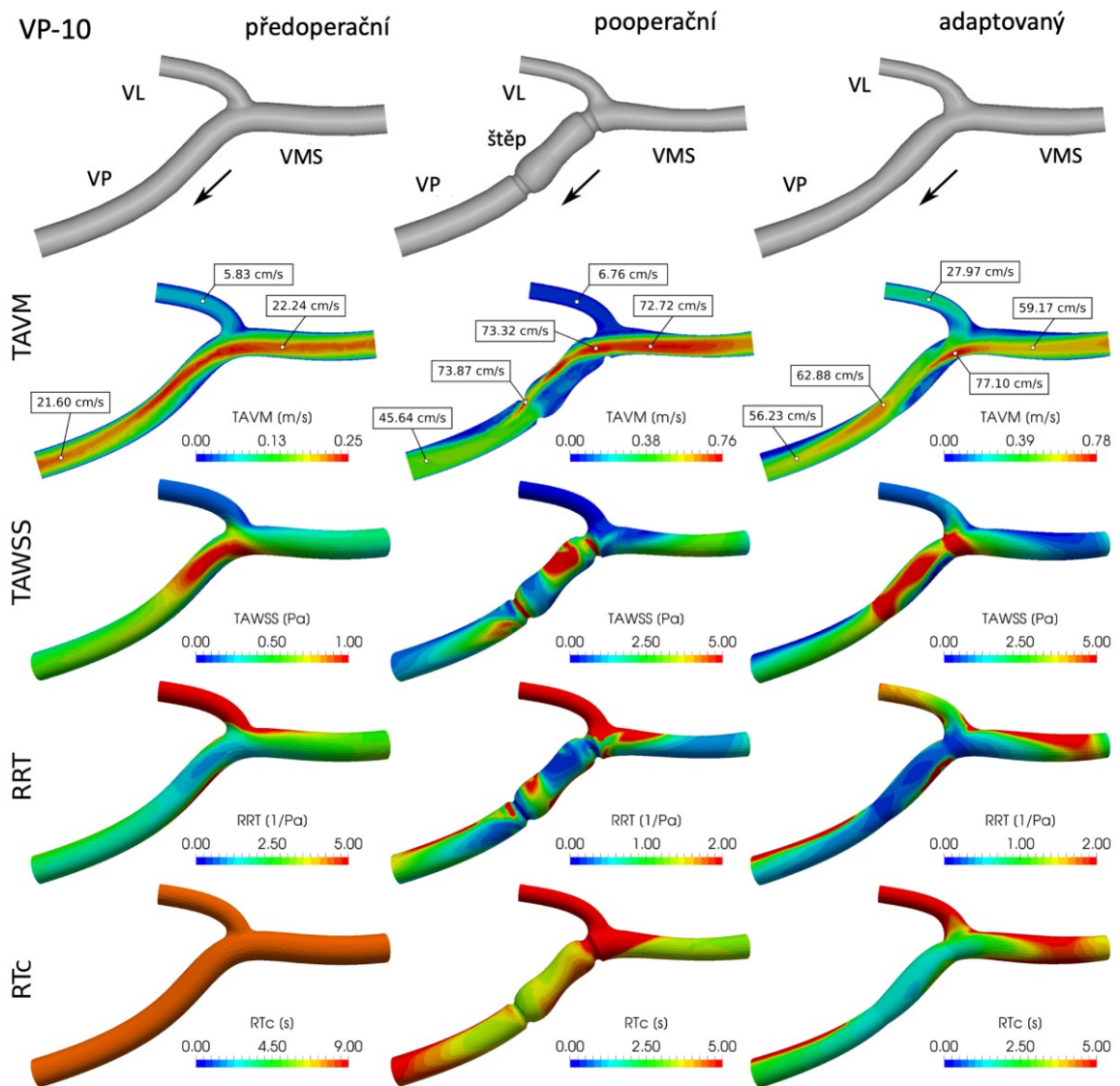
6.3.6 Matematické modelování

Perioperačně naměřené rozměry portálního řečiště v kombinaci s perioperačně pořízenými fotografiemi umožnily vytvoření geometrických modelů u 10 z operovaných prasat. Obrázek č. 4 dokumentuje vytvoření geometrického modelu na základě fotograficky zdokumentované morfologie portálního řečiště. Vzhledem k tomu, že u každého zvířete byly vytvořeny celkem 3 modely pro různé časové body (stav *předoperační*, *pooperační* a *adaptovaný*), celkem bylo možné pracovat se 30 modely. Všechny připravené modely jsou souhrnně prezentovány na obrázku č. 5. Data naměřená DUSG pak umožnila realizaci samotných matematických modelů proudění krve v uvedených geometrických modelech.

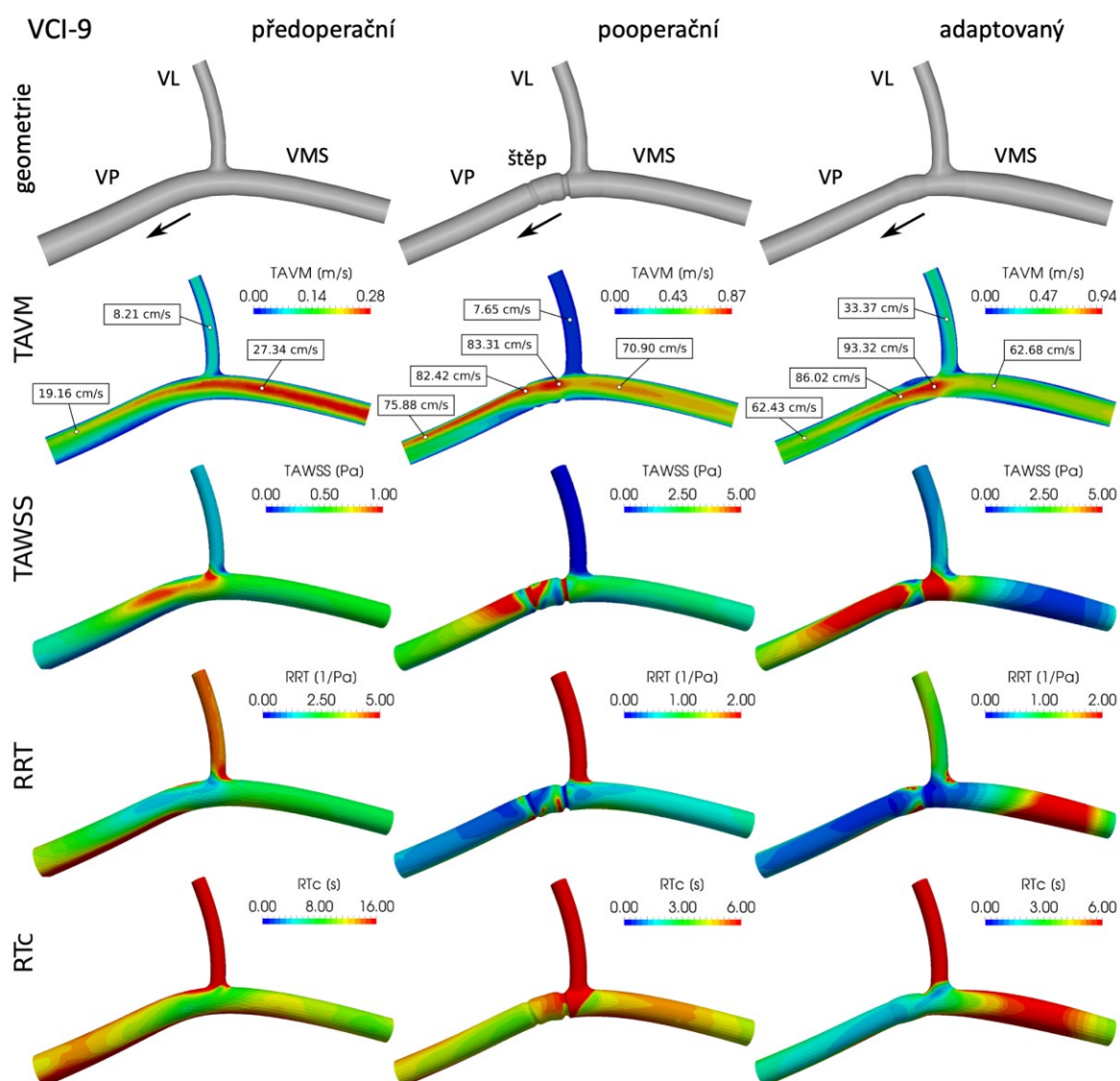


Obrázek č. 11: Změna plošného podílu hladkosvalového aktinu (A), kolagenu I a III (B) a elastinu (C), ke které došlo v období 4 týdnů po implantaci štěpů VP a VCI. U štěpů VP došlo ke snížení podílu buněk pozitivních na hladkosvalový aktin. U štěpů VCI došlo ke snížení podílu elastinu. Ostatní změny nebyly signifikantní.

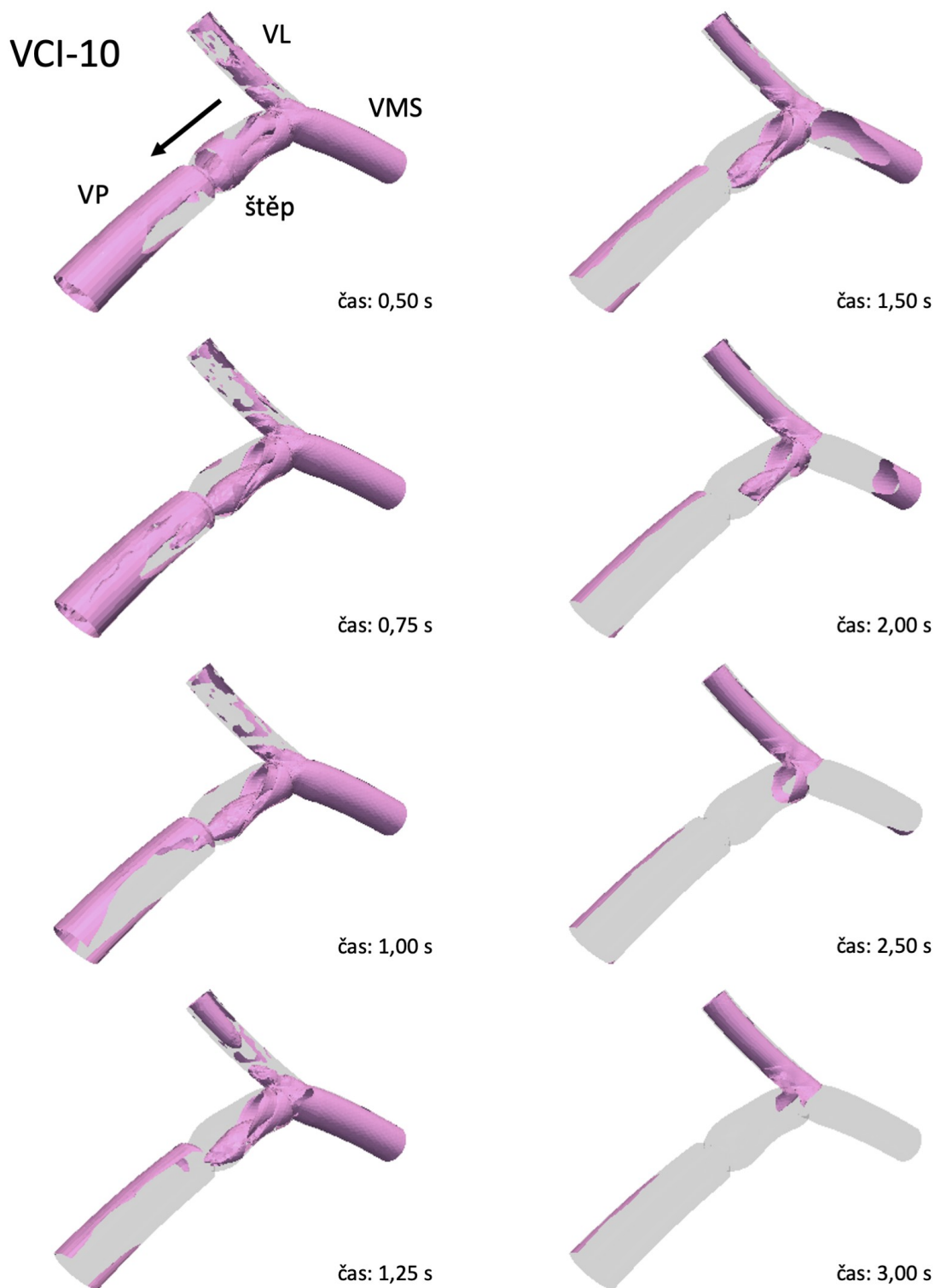
Výsledky softwarových simulací prokázaly, že změna geometrie portálního řečiště způsobená rekonstrukcí VP pomocí žilního štěpu měla významný vliv na hemodynamiku v oblasti VP. Ve všech modelech byla VMS oproti VL dominantním přítokem pro VP. Přítok z VMS tak měl zásadní vliv na tok krve v oblasti štěpu a za ním ve směru k játrům. Oblasti stagnace krve a četných recirkulací byly pozorovány zejména ve štěpech o velkém průměru, tedy tam, kde byl průměr štěpu větší než průměr samotné VP. Výsledky jednotlivých parametrů matematického modelování jsou prezentovány na obrázku č. 12. Výraznější dopad provedené rekonstrukce na hemodynamiku VP byl také pozorován u modelů, u kterých byla podélná osa VP výrazněji odkloněna od podélné osy VMS (obrázek č. 5). V případě modelů s takovýmto odklonem osy byl zaznamenán proud krve o vysoké rychlosti směřující proti stěně VP na straně přítoku VL (obrázek č. 12). V případě štěpů o větší délce pak byla tomuto proudu vystavena stěna samotného štěpu. V případě implantace krátkého štěpu pak tento proud směřoval proti oblasti anastomózy mezi štěpem a VP. Oblasti anastomóz byly obecně spojeny se zvýšením rychlosti proudění, tedy s vyššími hodnotami TAVM (obrázek č. 12). Dle aplikované metodiky virtuálního inkoustu byly vysoké hodnoty RT_c odpovídající oblastem s větší tendencí ke stagnaci krve, identifikovány v oblasti interponovaných štěpů (obrázek č. 13). Vyšší hodnoty byly zaznamenány zejména ve štěpech s průměrem přesahujícím průměr příslušné VP (obrázek č. 13B). Dále byly vyšší hodnoty RT_c i při stěně VP na straně protější přítoku VL. Tedy na opačné straně, než která byla vystavena výše popsanému zrychlenému proudu krve. Oblasti s abnormálně zvýšenými hodnotami TAWSS, tedy místa cévní stěny, která byla vystavena abnormálnímu smykovému napětí, pak odpovídaly oběma anastomózám, stěně VP nebo štěpu vystavené popsanému zrychlenému proudu krve a také oblasti VP distálně za štěpem (obrázek č. 12). Parametr RT_c (vypočtený metodikou virtuálního inkoustu) umožnil v porovnání s parametrem RRT i přípravu názornějších modelů, a to vzhledem k možnosti prostorového zobrazení oblastí s delším časem setrvání částic. Metodika virtuálního inkoustu totiž umožňuje hodnotit celý vnitřní objem cévy, na rozdíl od parametru RRT, který popisuje pouze vnitřní povrch cévy.



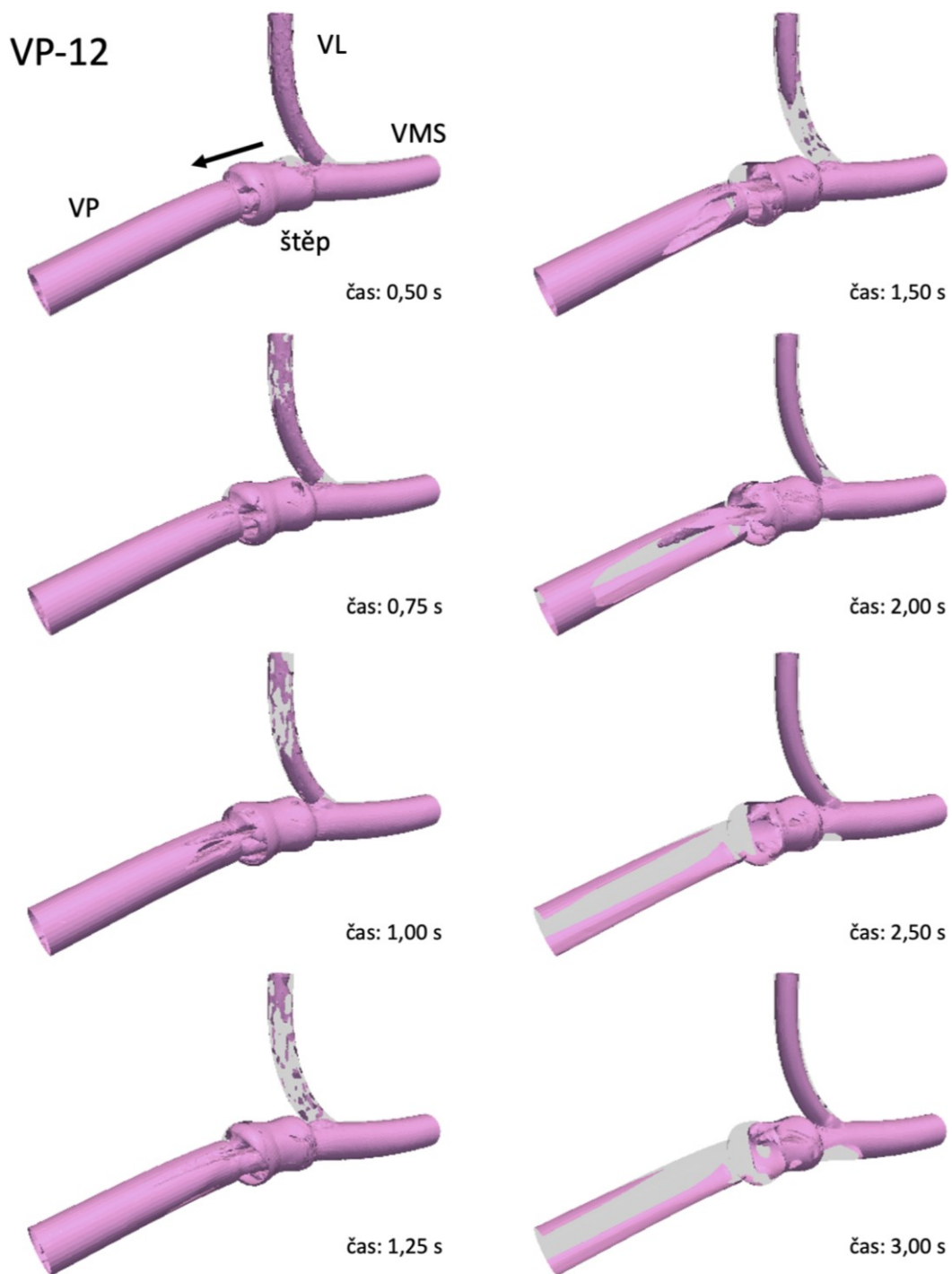
Obrázek č. 12A: Výsledky matematického modelování proudění krve u jedince ze skupiny VP. Byl vybrán jedinec s delším štěpem, kde proud rychleji proudí krve směruje proti stěně štěpu. Tento proud odpovídá vysokým hodnotám TAVM, tedy červené barvě v modelu TAVM. Vysoké hodnoty TAWSS jsou patrné v oblasti štěpu a obou anastomóz. Vyšší hodnoty RRT ve VL jsou způsobené nižšími rychlostmi proudění ve VL. Vypovídající tedy byly hodnoty RRT ve VMS, VP a v samotném štěpu. Pro srovnání s hodnotami RRT jsou uvedeny i hodnoty RTc, zde však pouze pro vnitřní povrch cévy.



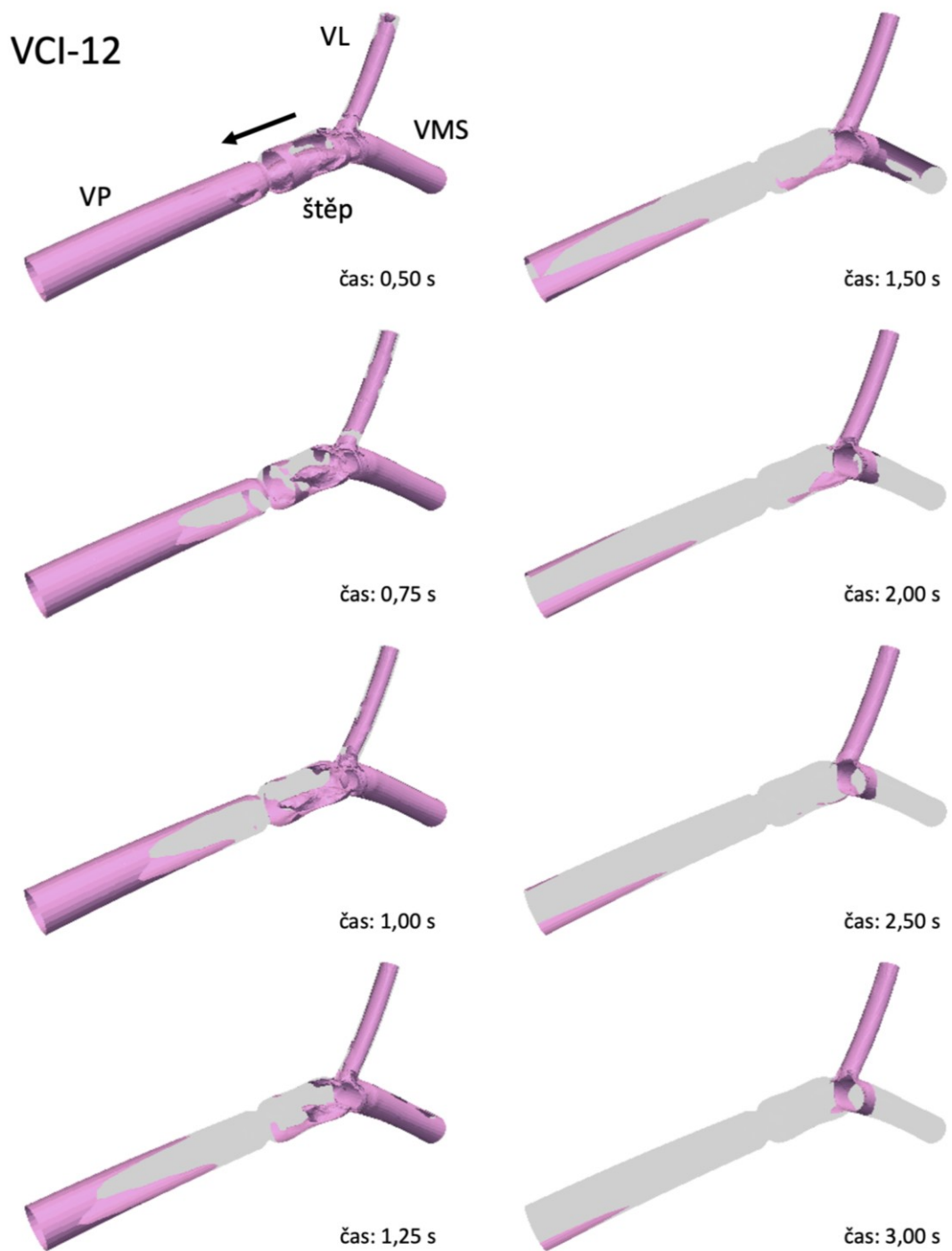
Obrázek č. 12B: Výsledky matematického modelování u jedince ze skupiny VCI. Byl vybrán jedinec, kterému byl implantován kratší štěp, proud krve o vyšší rychlosti (opět červená barva značí vysoké hodnoty TAVM) pak směřuje do oblasti cévní anastomózy. Vysoké hodnoty TAWSS byly opět pozorovány v oblastech anastomóz, v oblasti štěpu a také distálně za štěpem ve VP.



Obrázek č. 13A: Matematický model znázorňující čas setrvání částic stanovený metodikou virtuálního inkoustu (RTc). Oblasti s vyššími hodnotami RTc odpovídají místům náchylným ke stagnaci krve. Tyto oblasti byly identifikovány uvnitř samotných štěpů, obvykle na protější straně od rychlejšího proudu krve (tedy na protější straně než je přítok VL). Zde prezentováno na jedinci ze skupiny VCI (VCI-10).

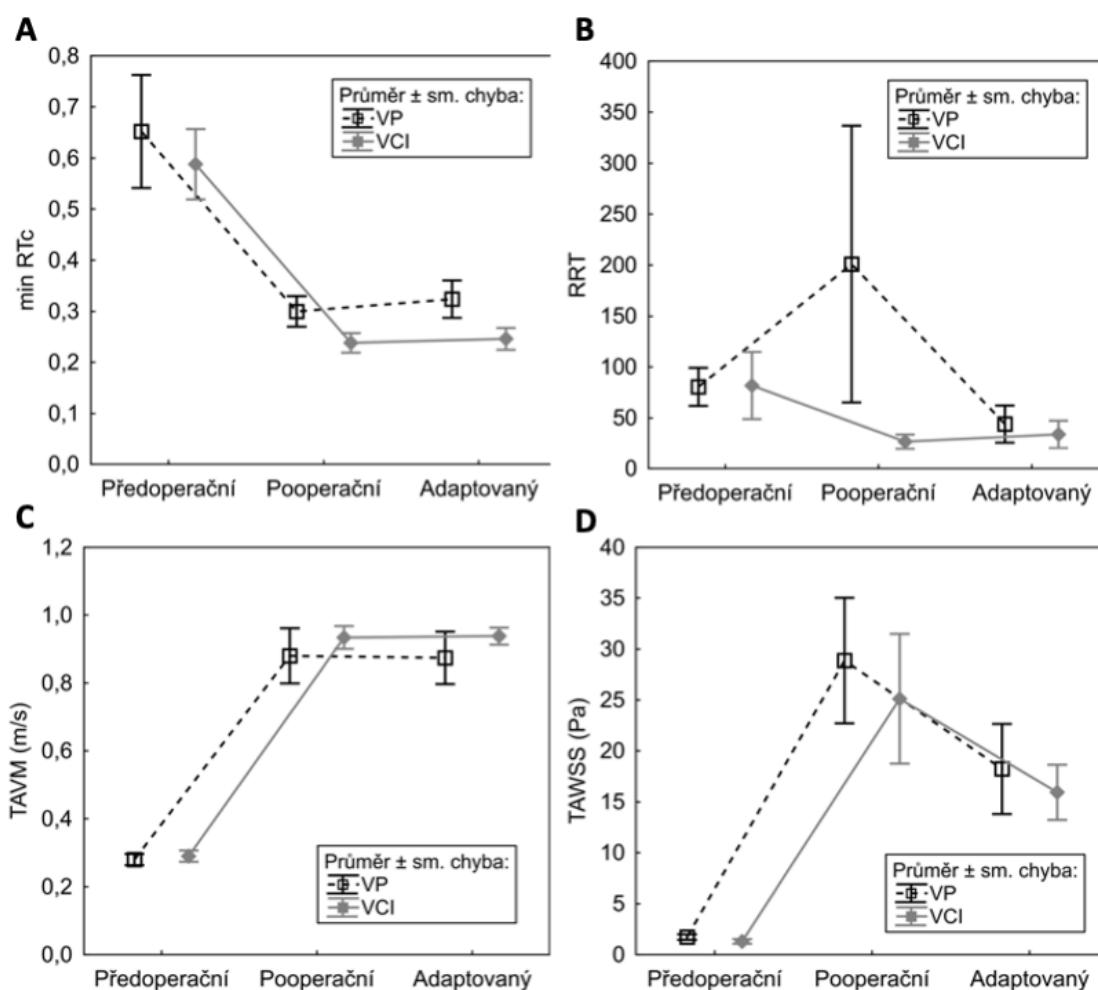


Obrázek č. 13B: Hodnoty RT_c byly vyšší zejména u štěpů o vyšším průměru, tedy u takových, jejichž průměr byl větší než průměr samotné VP. Zde prezentováno na jednom ze zvířat skupiny VP (VP-12).



Obrázek č. 13C: Výsledky modelování u zvířete ze skupiny VCI (VCI-12), kde průměr štěpu nepřesahoval průměr VP. Patrně jsou kratší časy setrvání částic, tedy nižší míra stagnace krve v oblasti štěpu.

Kvantitativní porovnání parametrů softwarového modelování (TAVM, TAWSS, RRT a RTc) neprokázala žádné statisticky signifikantní rozdíly mezi skupinami v jednotlivých časových bodech (obrázek č. 14). Hodnota parametru RRT ovšem ve skupině VP po rekonstrukci pomocí štěpu stoupla, zatímco ve skupině VCI poklesla. Všechny uvedené parametry byly také porovnány ve vztahu k délce použitého štěpu. Cílem bylo zjistit, zda samotná délka použitého štěpu ovlivňuje riziko vzniku trombózy. V rámci tohoto hodnocení byl pozorován výraznější pokles hodnoty TAWSS u delších štěpů mezi stavem pooperačním a adaptovaným oproti štěpům kratším.



Obrázek č. 14: Výsledky kvantitativní analýzy parametrů definovaných pomocí matematického modelování. V jednotlivých časových bodech nebyly statisticky signifikantní rozdíly hodnot mezi oběma skupinami. U skupiny VP však došlo k nárůstu hodnoty RRT po implantaci štěpu, zatímco u skupiny VCI došlo k jejímu poklesu (B).

6.4 Diskuze

Radikální resekce je v současné době jedinou potenciálně kurativní léčbou pro pacienty s karcinomem pankreatu (3). Vzhledem k absenci časných příznaků bývá toto onemocnění diagnostikováno až v pokročilejších stadiích, kdy může být možnost chirurgické léčby limitována přítomností metastáz, nebo samotným rozsahem tumoru, zejména pak jeho prorůstáním do okolních cévních struktur (4,165). Tumory, které postihují stěnu VP/VMS bez současného postižení tepen, jsou kategorizovány jako hraničně resekabilní a lze je odstranit při současném provedení resekce VP/VMS (174). V případě nutnosti resekce delšího úseku VP/VMS existuje několik možností rekonstrukce těchto žil, které se však pojí s jistými riziky (9). Slibnou variantou by mohla být rekonstrukce pomocí alogenních žilních štěpů, jejichž použití je zatím dokumentováno jen v omezeném počtu případů (7,8). Doposud však nebylo zkoumáno, jakého anatomického původu by měly být alogenní štěpy využité za tímto účelem a zda jejich původ může mít vliv na výslednou kvalitu rekonstrukce. Za předpokladu prodloužení OS pacientů s karcinomem pankreatu díky moderním chemoterapeutickým režimům lze předpokládat rostoucí důležitost optimálně provedené rekonstrukce VP/VMS s minimalizací rizik trombotického uzávěru či jiných komplikací (237).

V rámci prezentovaného experimentu byl etablován model hemipankreatoduodenektomie s resekcí VP a její rekonstrukcí pomocí alogenních žilních štěpů různého původu u prasete domácího. Jako vhodný zdroj alogenních štěpů pro klinickou praxi se nabízí řečiště VCI nebo řečiště VP. Tyto žilní systémy se ale vzájemně fyziologicky liší (10,11). VP bývá navíc explantována jako součást jaterního štěpu k transplantaci (353). Byla by tak dostupná jen u dárců orgánů, kterým nejsou játra odebírána. Cílem práce bylo porovnat stavbu a vlastnosti alogenních žilních štěpů z řečiště VP a VCI, vyhodnotit jejich vliv na výsledky provedené žilní rekonstrukce a určit tak vhodný zdroj alogenních štěpů k rekonstrukci VP při hemipankreatoduodenektomii.

V klinické praxi by byly v případě štěpů z řečiště VCI pravděpodobně použity štěpy pánevních žil namísto štěpů samotné VCI, které byly použity v tomto experimentu. Pánevní žíly bývají běžně získávány v rámci odběrů orgánů k transplantaci a mají svým průměrem blíže k VP než má VCI (353). V rámci tohoto experimentu na praseti však byly využity štěpy samotné VCI. U prasete jsou totiž

pánevní žíly výrazně užší než VP, a naopak VCI odpovídá svým průměrem VP (354,355).

Dle dostupné literatury je náš experiment první publikovanou prací využívající zvířecí model hemipankreatoduodenektomie se současnou rekonstrukcí VP. Výkon byl proveden tak, aby co nejpřesněji imitoval tuto operaci v humánní medicíně za účelem zahrnutí co nejvíce faktorů, které by mohly mít vliv na rekonstrukci VP. Samotná hemipankreatoduodenektomie byla již u prasete provedena např. v rámci experimentu zkoumajícího vliv resekce či prezervace pyloru na motilitu trávicího traktu. Autoři však neprováděli kromě rekonstrukce VP ani pankreatiko-jejuno anastomózu (356). Dále byly publikovány práce, kde byla hemipankreatoduodenektomie u prasete provedena laparoskopicky za účelem hodnocení efektivity a bezpečnosti tohoto miniinvazivního přístupu. Zvířata v těchto studiích však byla bezprostředně po výkonu usmrcena (357,358). Naopak rekonstrukce portální žíly bez současné hemipankreatoduodenektomie byla také předmětem několika experimentálních studií. Např. Yoshioka použil záplatu z peritonea k rekonstrukci VP u prasete. Ze všech 7 operovaných prasat nezaznamenal u žádného trombózu zrekonstruované VP. Zvířata byla ovšem sledována po různě dlouhá období a byla usmrcena v rozpětí 2–49 dnů od výkonu (359). Starší studie z 80. a 90. let popisují rekonstrukci VP u psa pomocí syntetických PTFE štěpů za aseptických nebo naopak septických podmínek imitujících pankreatickou chirurgii (360,361). Ohkuma prokázal proveditelnost rekonstrukce VP pomocí PTFE štěpů (360). Nishibe však na základě svých výsledků jednoznačně doporučuje upřednostnění autologních štěpů před PTFE štěpy (362).

Doposud nebylo provedeno srovnání mikroskopické stavby VP a VCI u člověka ani u prasete domácího. Studii struktury těchto žil provedl Brown u králíka a prokázal větší podíl kolagenu ve stěně VCI oproti stěně VP (10). Jiná ze studií pak dokládá více hladkosvalových buněk ve stěně VP u psa v porovnání s jinými žilami velkého průměru (363,364). V případě prasete pak práce porovnávající strukturu a funkční vlastnosti VCI a aorty zmiňuje velký podíl kolagenu ve stěně VCI (365). Tyto nálezy jsou v souladu s výsledky námi provedeného experimentu, kdy byla ve stěně VP pozorována souvislá vrstva hladké svaloviny, zatímco ve stěně VCI se nacházely pouze ojedinělé hladkosvalové buňky. Dále pak VCI obsahovala větší podíl kolagenu oproti VP.

Ve zmíněné studii se Brown zabýval kromě morfologie také biomechanickými vlastnostmi VP a VCI u králíka a prokázal schopnost výraznější vazokonstrikce i vazodilatace VP oproti VCI. Jednalo se o in vitro experimenty, kde byla vazokonstrikce indukována přidáním noradrenalinu do roztoku perfundujícího cévy. Následně byl vliv hladké svaloviny eliminován perfuzí roztokem vázajícím ionty vápníku. Poddajnost VP byla za obou podmínek vyšší než poddajnost VCI. Tedy i v případě kontrakce hladké svaloviny se VP více dilatovala v důsledku zvýšeného perfuzního tlaku oproti VCI. Autor tato zjištění dává do souvislosti s rozdíly ve stavbě stěny obou žil. Výraznější poddajnost VP v relaxovaném stavu oproti VCI se vysvětluje nižším podílem kolagenu v její stěně, který je zodpovědný za pevnost. Příčina větší poddajnosti i v případě kontrakce hladké svaloviny, která se může zdát paradoxní, je přisuzována přechodu kolagenních a elastických vláken do nekompletně napjaté a více poddajné konfigurace právě při vazokonstrikci (10).

Tato odlišná mikroskopická stavba a s ní spojená vyšší poddajnost VP a výraznější schopnost změny svého objemu by mohly být zodpovědné za větší průměr štěpů VP po jejich implantaci oproti štěpům VCI v námi provedeném experimentu. Ve skupině zvířat se štěpem VP byl navíc v průběhu prvního týdne po implantaci zaznamenán nárůst průměru anastomózy, zatímco v případě štěpů VCI se projevila tendence k zužování anastomózy v průběhu sledovacího období. Tuto hypotézu příčiny většího průměru štěpů VP po jejich implantaci však nelze v rámci našeho experimentu potvrdit a bylo by potřeba dalších studií zkoumajících biomechanické vlastnosti VP a VCI u prasete. Průměr štěpu měl však jednoznačný vliv na hemodynamiku a na riziko vzniku trombózy, jak bude diskutováno dále.

V průběhu 4 týdnů po implantaci žilních štěpů došlo k vymizení souvislé vrstvy hladké svaloviny ve stěně VP a ve stěně VCI došlo k úbytku elastinu. Oba typy štěpů si byly na konci sledovacího období svou strukturou podobné. Předpokládáme, že při srovnatelné stavbě stěny obou typů štěpů by se neměly významně lišit ani jejich biomechanické vlastnosti. Pokud měla skutečně odlišná struktura štěpu VP vliv na jeho větší průměr po implantaci, lze předpokládat, že s časovým odstupem 4 týdnů by již měla být poddajnost obou štěpů srovnatelná.

Naprostá většina prací zkoumajících přestavbu stěny žilních štěpů se týká pouze jejich implantace do arteriálního a nikoli žilního řečiště. V takovém případě se uvádí, že dochází k náhradě původních endotelových buněk, k proliferaci

hladkosvalových buněk a intimální hyperplazii (366,367). Endotel může být poškozen již při samotném odběru žilního štěpu, k zániku původních endotelových buněk pak dochází v průběhu prvních 3 dnů po implantaci. Současně dochází i k postupné obnově endotelu. Přinejmenším v prvním týdnu po implantaci však štěp postrádá kompletní souvislou vrstvu endotelií (367,368). Proliferace hladkosvalových buněk začíná dle experimentálních studií v prvních 72 hodinách a trvá minimálně první týden po implantaci (366,367). Jako příčina se uvádí mechanické stimuly působící na buňky hladké svaloviny při vystavení žilní stěny arteriálnímu tlaku. Tento efekt byl prokázán v in vitro podmínkách, kdy periodické napínání vedlo k proliferaci hladkosvalových buněk z vena saphena, zatímco v případě buněk ze stěny arteria thoracica interna tomu tak nebylo (369). Intimální hyperplazie je charakterizována abnormální akumulací buněk i extracelulární matrix v oblasti tunica intima. Mechanismem vzniku je migrace hladkosvalových buněk z tunica media, jejich proliferace a současné zmnožení extracelulární matrix (370,371). Na mikroskopické úrovni začíná tento jev v případě implantace žilního štěpu do tepenného řečiště mezi 3. a 5. dnem po implantaci a zrychluje v průběhu druhého týdne (366,371). K zúžení cévního lumen v důsledku intimální hyperplazie pak dochází až v řádu týdnů až měsíců. Jako příčina vedoucí k intimální hyperplazii u žilních štěpů se udává změna smykového napětí vedoucí k aktivaci endoteliálních buněk a aktivaci proinflamatorních signálních drah (368). Pravděpodobně se jedná o multifaktoriální proces, ale přesná patogeneze zatím není známa (370,371).

V rámci našeho experimentu byla zaznamenána různá míra intimální hyperplazie u implantovaných štěpů. Pomocí matematického modelování byla identifikována i změna smykového napětí na stěně štěpu, což by mohlo vysvětlit příčinu tohoto jevu i když se nejednalo o implantaci do arteriálního řečiště. Ve stěně štěpů VCI, které po odběru obsahovaly minimum hladké svaloviny bylo na konci experimentu pozorováno více hladkosvalových buněk. Toto by mohlo být důsledkem mechanické stimulace stěny v důsledku pulzatilního toku ve VP, který se liší od pulzatilního toku ve VCI (372). Jak však bylo uvedeno, nedošlo v tomto případě k nárůstu plošného podílu hladkosvalových buněk.

Dat o přestavbě stěny žilních štěpů implantovaných do žilního řečiště je minimum. Změnu struktury štěpů VP po implantaci do portálního řečiště zaznamenal ve svém experimentu na myších Yan (373). Popisuje kompletní vymizení hladké

svaloviny a zesílení stěny štěpu mezi druhým a čtvrtým týdnem po implantaci. K oběma těmto změnám došlo i v případě našeho experimentu. Yan však tyto strukturální změny zdůvodňuje imunitní reakcí, protože k nim došlo pouze v případě alogenních štěpů a nikoli u štěpů syngenních či u myši léčených imunosupresí (373). V rámci našeho experimentu však nebyla případná rejekce štěpu specificky vyhodnocována.

U štěpů VCI došlo kromě výše diskutovaných změn i k poklesu plošného podílu elastických vláken. Úbytek elastických vláken je v literatuře v rámci přestavby žilního štěpu zmiňován, ale jedná se opět o situace, kdy byly štěpy vystaveny arteriálnímu tlaku (374,375). Za zmínku stojí poměr mezi elastinem a kolagenem, jehož nízké hodnoty jsou spojovány s vyšší pevností cévní stěny (374,376). Z obrázku č. 11 v rámci výsledků je patrné, že v případě štěpů VP došlo ke snížení tohoto poměru. Toto podporuje výše uvedený předpoklad, že po přestavbě, která byla zdokumentována v našem experimentu by měly mít oba typy žilních štěpů obdobné mechanické vlastnosti. Domníváme se, že zmíněná vyšší poddajnost štěpu VP by se tedy mohla projevit pouze časně po rekonstrukci. Větší průměr štěpů VP oproti štěpům VCI byl také zaznamenán ihned po jejich implantaci.

Elevace AST, která nastala v perioperačním období, vykazovala vrchol 2 hodiny po rekonstrukci VP. Tento vzestup AST dáváme do souvislosti s uzávěrem VP během její rekonstrukce. Je známo, že Pringlův manévr, tedy dočasná okluze VP a AH, vede k určité míře ischemicko-reperfučního poškození jater, které je provázeno vzestupem AST a ALT (377). Také v případě izolovaného uzávěru pouze VP dochází k tomuto poškození i když v o něco menší míře (378,379). Mezi oběma experimentálními skupinami však nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly u žádného ze sledovaných biochemických markerů. Typ použitého štěpu tedy neměl vliv na hemodynamiku VP v takové míře, aby došlo k alteraci renálních funkcí nebo k jaternímu poškození.

Za účelem detailnějšího studia hemodynamiky a vlivu obou typů použitých štěpů bylo provedeno matematické modelování proudění krve portálním řečištěm. Tato metodika umožnila kromě zhodnocení změny hemodynamiky v důsledku implantace štěpu i posouzení rizika vzniku trombózy, se kterým se rekonstrukce VP pojí (237,380). Na rozvoji trombózy se obecně podílí hyperkoagulabilita krve, stáza krve a poškození endotelu cévní stěny, tedy faktory známé jako Virchowova trias (381). Vysoké nebo naopak nízké hodnoty smykového napětí mohou vést k morfologickým

změněm cévní stěny a ke zvýšení rizika rozvoje trombózy (382,383). Příkladem může být prudký nárůst smykového napětí v oblastech stenóz. Hemodynamika charakterizovaná stagnací krve nebo oblastmi jejího pomalého proudění také vykazuje tendenci ke vzniku trombů (384). Na základě těchto poznatků byly vybrány uvedené hemodynamické parametry pro naši studii (TAVM, TAWSS a RRT).

Dle dostupné literatury je nám známý jediný případ využití softwarového modelování v rámci rekonstrukce VP. Jedná se o studii, jejímž cílem bylo definovat optimální techniku vytvoření anastomózy o dostatečném průměru na hypoplastické VP u pediatrické transplantace jater (385). V rámci této práce ovšem nejsou prezentována data o krevním proudění a nebyl využit žádný z námi zvolených parametrů. Dále existují publikace, kde byla modelována hemodynamika portálního řečiště, ne však po jeho rekonstrukci (386,387). Wei stanovoval hodnoty smykového napětí na stěně VP (386). Prokázal nižší hodnoty u pacientů s portální hypertenzí a významný vliv úhlu mezi VL a VP na distribuci smykového napětí ve VP. Vliv přítoku VL na hemodynamiku VP potvrzuje ve své studii i Zhou, který se zabýval vlivem trombózy VL (387). Poněkud v rozporu jsou naše výsledky, kdy měl tok ve VL minimální dopad na hemodynamiku VP. Námi naměřené rychlosti proudění ve VL byly obvykle až desetkrát nižší oproti rychlostem ve VP a VMS. Wei naopak dokládá jen minimální rozdíl mezi těmito rychlostmi (386). V námi provedených modelacích dominoval přítok krve cestou VMS. Úhel mezi VMS a VP pak ovlivňoval hemodynamiku ve VP. V případě výraznějšího odklonu osy VP od osy VMS směřoval proud krve o vysoké rychlosti proti stěně VP na straně přítoku VL a při protější stěně vznikla zóna recirkulace. Za takovýchto anatomických podmínek a při současné implantaci krátkého štěpu, by mohla být tímto proudem ovlivňována samotná oblast anastomózy. Naše modely tedy umožnily sledovat vliv anatomických variabilit a implantovaných štěpů na charakter proudění krve v portálním řečišti. Na rozdíl od zmíněných studií na lidském portálním řečišti měla však u našich modelů VL na hemodynamiku minimální vliv (386,387).

Oblasti stagnace krve a její recirkulace byly identifikovány zejména v případech, kdy průměr implantovaného štěpu přesahoval průměr samotné VP. Vzhledem k tomu, že jsou takovéto oblasti spojeny s vyšším rizikem vzniku trombózy a současně jsme zaznamenali po implantaci větší průměr štěpů VP oproti štěpům VCI, naznačují naše výsledky vyšší riziko trombotizace při použití štěpů VP. Tento předpoklad dále

podporují výsledky metodik určujících čas setrvání částic, tedy míru stagnace krve. Tyto hodnoty ve skupině se štěpy VP po jejich implantaci narostly, zatímco ve skupině se štěpy VCI se hodnoty času setrvání částic snížily. V rámci samotného experimentu pak skutečně došlo ke vzniku trombózy ve skupině VP ve 4 případech, zatímco ve skupině VCI pouze jednou.

U delších štěpů došlo mezi stavem *pooperačním* a *adaptovaným* k výraznějšímu poklesu hodnoty TAWSS oproti kratším štěpům. Toto naznačuje, že delší štěpy by mohly vykazovat nižší riziko rozvoje trombózy. Použití delších štěpů se zdá odůvodněné v případě výskytu výše zmíněné deviace osy VP a VMS. V takovém případě by proud krve o vysoké rychlosti směřoval proti stěně dlouhého štěpu, zatímco při použití štěpu krátkého by tento proud směřoval do oblasti anastomózy s vyšším rizikem poškození endotelu.

Ostatní oblasti podezřelé ze stagnace krve byly identifikovány v samotných štěpech, zejména pak na straně protější k přítoku VL. Toto zjištění odpovídá klinickým nálezům, kdy všechny vzniklé tromby naléhaly alespoň částečně na stěnu interponovaného štěpu.

Limitací vyhodnocení hemodynamiky portálního řečiště je fakt, že vytvořené modely byly sice prostorové ve smyslu průsvitu cévy, ale celé řečiště bylo modelováno pouze v jedné rovině. Důvodem byla data získaná pouze z perioperačních fotografií a měření. CT vyšetření by přineslo informace o prostorovém zakřivení všech modelovaných cév a výsledné modely by pak umožnily přesnější vyhodnocení.

Dalším doposud nejmenovaným důvodem častějšího vzniku trombózy ve skupině VP by mohla být i rozdílně náročná manipulace s oběma typy štěpů. Nejedná se o objektivní parametr, ale snadněji se pracovalo se štěpy VCI, u kterých se zdála stěna pevnější. Při použití štěpů VCI tak bylo subjektivně snazší konstruovat technicky správnou anastomózu s minimálním rizikem prominence kolagenu z vnější strany štěpu do lumina cévy, kde může indukovat rozvoj trombózy.

Dle publikovaných klinických prací je poměrně široké rozpětí udávané incidence trombózy rekonstruované VP v rámci resekcčních výkonů na pankreatu. Trombóza je popisována u 2,5 až 36,8 % případů (252,388,389). V rámci našeho experimentu byla trombóza VP zaznamenána u 19,2 % operovaných zvířat. Labori publikoval systematické review, dle kterého dochází k časné pooperační trombóze po rekonstrukci VP u 7,5 % pacientů s náhradou syntetickým štěpem, u 5,6 % pacientů

s náhradou autologním štěpem a u 2,5 % pacientů s náhradou alogenním štěpem (252). Z dlouhodobého hlediska se trombóza u alogenních štěpů vyskytla u 6,2 % (u 22,2 % a 11,7 % pak u syntetických a autologních štěpů). Za časnou trombózu byla považována ta, ke které došlo do 30 dnů po operaci. Obdobnou dobu, přesně 28 dní, byla sledována zvířata v rámci našeho experimentu. Ve srovnání s výsledky tohoto review pak byla incidence trombózy u prasat zařazených do experimentu vyšší. Vznik trombózy může kromě typu štěpu a technických faktorů ovlivnit i pooperační antikoagulační či antiagregační terapie (236,237,252). Jak bylo zmíněno v úvodu, podávání a forma této terapie je indikována podle rozhodnutí operátora. V současné době neexistuje doporučení ohledně indikace antikoagulační či antiagregační terapie po rekonstrukci VP (236). V rámci prezentovaného experimentu nebyla u prasat pooperačně podávána žádná medikace za účelem prevence vzniku trombózy VP. Důvodem byly obavy z rizika pooperačního krvácení po rozsáhlém výkonu, jakým je hemipankreatoduodenektomie. Byl tak pouze jednorázově aplikován bolus heparinu v dávce 100 mg/kg v průběhu operace před samotnou resekci VP. Příčinou vyšší incidence trombózy VP v prezentovaném experimentu může být vyšší koagulabilita prasečí krve v porovnání s krví lidskou. Hyperkoagulabilita u prasat byla prokázána několika experimenty, z nichž většina využívala k hodnocení tromboelastometrii (390–393).

Dle dostupné literatury jsou alogenní cévní štěpy bezpečnou alternativou k autologním a syntetickým štěpům (252). Výše citované systematické review prokázalo nejnižší incidenci trombózy VP při použití alogenních štěpů, zatímco pooperační mortalita byla pro autologní, syntetické i alogenní štěpy srovnatelná (252). Naš experiment srovnávající alogenní štěpy odebrané z řečiště VP nebo VCI pak prokázal odlišnou strukturu obou typů štěpů a více případů trombózy při použití štěpů VP. Štěpy odebrané ze systémového řečiště VCI jsou navíc v rámci klinické medicíny snadněji dostupné. Na základě výsledků provedeného experimentu se tedy jeví jako bezpečnější upřednostnění štěpů z řečiště VCI k rekonstrukci VP při hemipankreatoduodenektomii. K verifikaci jasné příčiny odlišného chování štěpů z řečiště VCI a VP by bylo nutné provedení dalších experimentů.

6.5 Závěr

Model hemipankreatoduodenektomie s resekcí VP na velkém experimentálním zvířeti byl úspěšně etablován. Tento model se osvědčil jako vhodný ke zkoumání možností rekonstrukce VP. Byl prokázán rozdíl ve stavbě stěny VP a VCI u prasete domácího. Po implantaci alogenních štěpů těchto žil do portálního řečiště v rámci jeho rekonstrukce však došlo po 4 týdnech k přestavbě žilní stěny. Na konci tohoto období byla žilní stěna obou typů štěpů histologicky srovnatelná. Matematické modelování umožnilo identifikovat rizikové oblasti a faktory pro rozvoj trombózy v rámci rekonstrukce VP interponovaným štěpem. Jako rizikové byly identifikovány zejména štěpy o průměru přesahujícím průměr samotné VP. U zvířat s implantovanými štěpy VP byl zjištěn větší průměr těchto štěpů časně po implantaci oproti štěpům VCI. U těchto zvířat také došlo k častější trombóze VP (čtyřikrát ve skupině VP, jednou ve skupině VCI). Rozdílné výsledky by mohly být způsobeny odlišnými biomechanickými vlastnostmi VP a VCI, které však nebyly specificky hodnoceny. Tento experiment podporuje v případě potřeby použití alogenních žilních štěpů ze systémového řečiště VCI k rekonstrukci VP v rámci chirurgické léčby karcinomu pankreatu v klinické medicíně.

7 Použitá literatura

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):7–30.
2. Saad AM, Turk T, Al-Husseini MJ, Abdel-Rahman O. Trends in pancreatic adenocarcinoma incidence and mortality in the United States in the last four decades; a SEER-based study. *BMC Cancer.* 2018;18(1):688.
3. Neoptolemos JP, Kleeff J, Michl P, Costello E, Greenhalf W, Palmer DH. Therapeutic developments in pancreatic cancer: current and future perspectives. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15(6):333–348.
4. Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2016;22(44):9694–9705.
5. Springfield C, Jäger D, Büchler MW, Strobel O, Hackert T, Palmer DH, et al. Chemotherapy for pancreatic cancer. *Presse Med.* 2019;48(3):159–174.
6. Rebelo A, Michalski CW, Ukkat J, Kleeff J. Pancreatic cancer surgery with vascular resection: current concepts and perspectives. *J Pancreatol [Online].* 2019;2(1). [cit. 2021-3-10] Dostupné z: https://journals.lww.com/jpancreatology/Fulltext/2019/03000/Pancreatic_cancer_surgery_with_vascular_resection_.1.a.spx
7. Zhang X-M, Zhang J, Fan H, He Q, Lang R. Feasibility of portal or superior mesenteric vein resection and reconstruction by allogeneic vein for pancreatic head cancer—a case-control study. *BMC Gastroenterol.* 2018;18(1):49.
8. Kleive D, Berstad AE, Sahakyan MA, Verbeke CS, Naper C, Haugvik SP, et al. Portal vein reconstruction using primary anastomosis or venous interposition allograft in pancreatic surgery. *J Vasc surgery Venous Lymphat Disord.* 2018;6(1):66–74.
9. Yamamoto M, Akamatsu N, Aoki T, Sakamoto Y, Tamura S, Hasegawa K, et al. Safety and efficacy of cryopreserved homologous veins for venous reconstruction in pancreatoduodenectomy. *Surgery.* 2017;161(2):385–393.
10. Brown BP, Heistad DD. Capacitance of the rabbit portal vein and inferior vena cava. *J Physiol.* 1986;381:417–425.
11. Kumar A, Sharma P, Sarin SK. Hepatic venous pressure gradient measurement: time to learn! *Indian J Gastroenterol Off J Indian Soc Gastroenterol.* 2008;27(2):74–80.
12. Brunicaudi FC, Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, et al. *Schwartz's principles of surgery.* 10th edition. New York: McGraw-Hill Education, 2014. ISBN 978-0-07179675-0. Kapitola 33, Pancreas, s. 1341–1422.
13. Silen W. *Surgical Anatomy of the Pancreas.* *Surg Clin North Am.* 1964;44(5):1253–1262.
14. Blumgart LH, Belghiti J., Jarnagin WR, Ronald PD, Champman WC, Büchler MW, et al. *Surgery of the liver, biliary tract, and pancreas.* 4th edition. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2007. ISBN 978-1-4160-3256-4. Kapitola 1, Surgical and radiologic anatomy of the liver, biliary tract, and pancreas, s. 3–29
15. Beger HG, Matsuno S, Cameron JL. *Diseases of the pancreas: current surgical therapy.* New York: Springer, 2008. ISBN 978-3-540-28655-4. Kapitola 3, Surgical vascular anatomy and histology, s. 19–28
16. Cubilla AL, Fortner J, Fitzgerald PJ. Lymph node involvement in carcinoma of the head of the pancreas area. *Cancer.* 1978;41(3):880–887.

17. Standing S. *Gray's Anatomy* 40th edition. Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier, 2008. ISBN: 978-0-8089-2371-8.
18. Cesmebasi A, Malefant J, Patel SD, Plessis M Du, Renna S, Tubbs RS, et al. The surgical anatomy of the lymphatic system of the pancreas. *Clinical Anatomy*. 2015;28(4):527–537.
19. O'Morchoe CC. Lymphatic system of the pancreas. *Microsc Res Tech*. 1997;37(5–6):456–477.
20. Havel PJ, Taborsky GJJ. The contribution of the autonomic nervous system to changes of glucagon and insulin secretion during hypoglycemic stress. *Endocr Rev*. 1989;10(3):332–350.
21. Noble M, Gress FG. Techniques and results of neurolysis for chronic pancreatitis and pancreatic cancer pain. *Curr Gastroenterol Rep*. 2006;8(2):99–103.
22. Gasparini G, Pellegatta M, Crippa S, Lena MS, Belfiori G, Doglioni C, et al. Nerves and Pancreatic Cancer: New Insights into a Dangerous Relationship. *Cancers (Basel)*. 2019;11(7):893.
23. Leung PS. Physiology of the pancreas. *Adv Exp Med Biol*. 2010;690:13–27.
24. Blumgart LH, Belghiti J., Jarnagin WR, Ronald PD, Champman WC, Büchler MW, et al. *Surgery of the liver, biliary tract, and pancreas*. 4th edition. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2007. ISBN 978-1-4160-3256-4. Kapitola 8, Pancreatic physiology and functional assessment, s. 98–107.
25. Balko J, Tonar Z, Varga I, Zavazalova S, Hudak R. *Memorix histology*. Praha: Triton, 2018. ISBN: 978-80-7553-577-1.
26. Švíglerová J, Slavíková J. *Fyziologie gastrointestinálního traktu*. 2.vydání. Praha: Karolinum; 2013. ISBN: 978-80-246-2189-0.
27. Whitcomb DC, Lowe ME. Human pancreatic digestive enzymes. *Digestive Diseases and Sciences*. 2007;52(1):1–17.
28. Schubert ML. Gastric acid secretion. *Curr Opin Gastroenterol*. 2016;32(6):452–460.
29. Delgado M, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide: a neuropeptide with pleiotropic immune functions. *Amino Acids*. 2013;45(1):25–39.
30. Beger HG, Matsuno S, Cameron JL. *Diseases of the pancreas: current surgical therapy*. New York: Springer, 2008. ISBN 978-3-540-28655-4. Kapitola 17, Natural course of chronic pancreatitis, s. 153–162
31. Vujasinovic M, Valente R, Thorell A, Rutkowski W, Haas SL, Arnelo U, et al. Pancreatic Exocrine Insufficiency after Bariatric Surgery. *Nutrients*. 2017;9(11):1241.
32. Beger HG, Matsuno S, Cameron JL. *Diseases of the pancreas: current surgical therapy*. New York: Springer, 2008. ISBN 978-3-540-28655-4. Kapitola 5, Physiology and pathophysiology of endocrine pancreatic secretion, s. 37–48.
33. Fu Z, Gilbert ER, Liu D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev*. 2013;9(1):25–53.
34. Rorsman P, Renström E. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 2003;46(8):1029–1045.
35. Ampofo E, Nalbach L, Menger MD, Laschke MW. Regulatory Mechanisms of Somatostatin Expression. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11):4170.
36. Voss M, Pappas T. Pancreatic fistula. *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2002;5(5):345–353.

37. Poher A-L, Tschöp MH, Müller TD. Ghrelin regulation of glucose metabolism. *Peptides*. 2018;100:236–242.
38. Rabiee A, Galiatsatos P, Salas-Carrillo R, Thompson MJ, Andersen DK, Elahi D. Pancreatic polypeptide administration enhances insulin sensitivity and reduces the insulin requirement of patients on insulin pump therapy. *J Diabetes Sci Technol*. 2011;5(6):1521–1528.
39. Hart PA, Bellin MD, Andersen DK, Bradley D, Cruz-Monserrate Z, Forsmark CE, et al. Type 3c (pancreatogenic) diabetes mellitus secondary to chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *lancet Gastroenterol Hepatol*. 2016;1(3):226–37.
40. Śliwińska-Mossoń M, Milnerowicz H. Distribution of Pancreatic Polypeptide-secreting Endocrine Cells in Nondiabetic and Diabetic Cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2017;25(6):422–431
41. Grant TJ, Hua K, Singh A. Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2016;144:241–275
42. Fesinmeyer MD, Austin MA, Li CI, De Roos AJ, Bowen DJ. Differences in survival by histologic type of pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol biomarkers Prev*. 2005;14(7):1766–1773.
43. Hackeng WM, Hruban RH, Offerhaus GJA, Brosens LAA. Surgical and molecular pathology of pancreatic neoplasms. *Diagn Pathol*. 2016;11(1):47.
44. Cascinu S, Falconi M, Valentini V, Jelic S. Pancreatic cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2010;21(5):55–58.
45. McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol*. 2018;24(43):4846–61.
46. Wang R, Zheng-Pywell R, Chen HA, Bibb JA, Chen H, Rose JB. Management of Gastrointestinal Neuroendocrine Tumors. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes*. 2019;12:1–12.
47. Thakker R V., Newey PJ, Walls G V., Bilezikian J, Dralle H, Ebeling PR, et al. Clinical practice guidelines for multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2012;97(9):2990–3011.
48. Alexakis N, Neoptolemos JP. Pancreatic neuroendocrine tumours. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2008;22(1):183–205.
49. Chittiboina P, Lonser RR. Von Hippel-Lindau disease. *Handb Clin Neurol*. 2015;132:139–156.
50. Richards ML, Gauger PG, Thompson NW, Kloos RG, Giordano TJ, Kaplan E, et al. Pitfalls in the surgical treatment of insulinoma. *Surgery*. 2002;132(6):1040–1049.
51. Gonzalez RS. Pancreas, General WHO classification. [online]. 2020, poslední revize 4.1.2021. [cit. 2021-3-10]. Dostupné z: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/pancreaswho.html>
52. Terino M, Plotkin E, Karagozian R. Pancreatoblastoma: an Atypical Presentation and a Literature Review. *J Gastrointest Cancer*. 2018;49(3):361–364.
53. Savari O, Tomashefski JF. Pancreas, Other tumors, Solid pseudopapillary neoplasm. [online]. 2018, poslední revize 26.10.2020. [cit. 2021-3-10]. Dostupné z: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/pancreassolidpseudo.html>.
54. Younan G. Pancreas Solid Tumors. *Surg Clin North Am*. 2020;100(3):565–580.

55. Pan B, Lee Y, Rodriguez T, Lee J, Saif MW. Secondary tumors of the pancreas: a case series. *Anticancer Res.* 2012;32(4):1449–1452.
56. Tan CH, Tamm EP, Marcal L, Balachandran A, Charnsangavej C, Vikram R, et al. Imaging features of hematogenous metastases to the pancreas: pictorial essay. *Cancer imaging Off Publ Int Cancer Imaging Soc.* 2011;11(1):9–15.
57. Kim JY, Hong S-M. Precursor Lesions of Pancreatic Cancer. *Oncol Res Treat.* 2018;41(10):603–610.
58. Basturk O, Hong S-M, Wood LD, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin A V, et al. A Revised Classification System and Recommendations From the Baltimore Consensus Meeting for Neoplastic Precursor Lesions in the Pancreas. *Am J Surg Pathol.* 2015;39(12):1730–1741.
59. Kanda M, Matthaei H, Wu J, Hong S-M, Yu J, Borges M, et al. Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology.* 2012;142(4):730–733.
60. Adsay V, Mino-Kenudson M, Furukawa T, Basturk O, Zamboni G, Marchegiani G, et al. Pathologic Evaluation and Reporting of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas and Other Tumoral Intraepithelial Neoplasms of Pancreatobiliary Tract: Recommendations of Verona Consensus Meeting. *Ann Surg.* 2016;263(1):162–177.
61. Klöppel G, Basturk O, Schlitter AM, Konukiewicz B, Esposito I. Intraductal neoplasms of the pancreas. *Semin Diagn Pathol.* 2014;31(6):452–466.
62. Furukawa T, Hatori T, Fujita I, Yamamoto M, Kobayashi M, Ohike N, et al. Prognostic relevance of morphological types of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Gut.* 2011;60(4):509–516.
63. Genevay M, Mino-Kenudson M, Yaeger K, Konstantinidis IT, Ferrone CR, Thayer S, et al. Cytology adds value to imaging studies for risk assessment of malignancy in pancreatic mucinous cysts. *Ann Surg.* 2011;254(6):977–983.
64. Attiyeh MA, Fernández-Del Castillo C, Al Efishat M, Eaton AA, Gönen M, Batts R, et al. Development and Validation of a Multi-institutional Preoperative Nomogram for Predicting Grade of Dysplasia in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms (IPMNs) of the Pancreas: A Report from The Pancreatic Surgery Consortium. *Ann Surg.* 2018;267(1):157–163.
65. Basturk O, Adsay V, Askan G, Dhall D, Zamboni G, Shimizu M, et al. Intraductal Tubulopapillary Neoplasm of the Pancreas: A Clinicopathologic and Immunohistochemical Analysis of 33 Cases. *Am J Surg Pathol.* 2017 ;41(3):313–325.
66. Yamaguchi H, Kuboki Y, Hatori T, Yamamoto M, Shiratori K, Kawamura S, et al. Somatic mutations in PIK3CA and activation of AKT in intraductal tubulopapillary neoplasms of the pancreas. *Am J Surg Pathol.* 2011;35(12):1812-1817.
67. Volkan Adsay N, Adair CF, Heffess CS, Klimstra DS. Intraductal oncocytic papillary neoplasms of the pancreas. *Am J Surg Pathol.* 1996;20(8):980-994.
68. Marchegiani G, Mino-Kenudson M, Ferrone CR, Warshaw AL, Lillemoe KD, Fernández-del Castillo C. Oncocytic-type intraductal papillary mucinous neoplasms: a unique malignant pancreatic tumor with good long-term prognosis. *J Am Coll Surg.* 2015;220(5):839–844.
69. Thompson LDR, Becker RC, Przygodzki RM, Adair CF, Heffess CS. Mucinous cystic neoplasm (mucinous cystadenocarcinoma of low-grade malignant potential) of the pancreas: A clinicopathologic study of 130 cases. *Am J Surg Pathol.* 1999;23(1):1-16.

70. Pittman ME, Rao R, Hruban RH. Classification, Morphology, Molecular Pathogenesis, and Outcome of Premalignant Lesions of the Pancreas. *Arch Pathol Lab Med*. 2017;141(12):1606–1614.
71. Jang K-T, Park SM, Basturk O, Bagci P, Bandyopadhyay S, Stelow EB, et al. Clinicopathologic characteristics of 29 invasive carcinomas arising in 178 pancreatic mucinous cystic neoplasms with ovarian-type stroma: implications for management and prognosis. *Am J Surg Pathol*. 2015;39(2):179–187.
72. Van Den Berg W, Tascilar M, Offerhaus GJA, Albores-Saavedra J, Wenig BM, Hruban RH, et al. Pancreatic mucinous cystic neoplasms with sarcomatous stroma: Molecular evidence for monoclonal origin with subsequent divergence of the epithelial and sarcomatous components. *Mod Pathol*. 2000;13:86-91.
73. Scarpa A, Real FX, Luchini C. Genetic unrelatedness of co-occurring pancreatic adenocarcinomas and IPMNs challenges current views of clinical management. *Gut*. 2018;67(9):1561-1563.
74. Notta F, Chan-Seng-Yue M, Lemire M, Li Y, Wilson GW, Connor AA, et al. A renewed model of pancreatic cancer evolution based on genomic rearrangement patterns. *Nature*. 2016;538(7625):378-382.
75. Bartsch DK, Gress TM, Langer P. Familial pancreatic cancer--current knowledge. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9(8):445–453.
76. Hruban RH, Canto MI, Goggins M, Schulick R, Klein AP. Update on familial pancreatic cancer. *Adv Surg*. 2010;44:293–311.
77. Giardiello FM, Welsh SB, Hamilton SR, Offerhaus GJ, Gittelsohn AM, Booker S V, et al. Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. *N Engl J Med*. 1987;316(24):1511–1514.
78. Brand RE, Lerch MM, Rubinstein WS, Neoptolemos JP, Whitcomb DC, Hruban RH, et al. Advances in counselling and surveillance of patients at risk for pancreatic cancer. *Gut*. 2007;56(10):1460–1469.
79. Hahn SA, Greenhalf B, Ellis I, Sina-Frey M, Rieder H, Korte B, et al. BRCA2 germline mutations in familial pancreatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(3):214–221.
80. Murphy KM, Brune KA, Griffin C, Sollenberger JE, Petersen GM, Bansal R, et al. Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in familial pancreatic cancer: deleterious BRCA2 mutations in 17%. *Cancer Res*. 2002;62(13):3789–3793.
81. Jones S, Hruban RH, Kamiyama M, Borges M, Zhang X, Parsons DW, et al. Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene. *Science*. 2009;324(5924):217.
82. Slater EP, Langer P, Niemczyk E, Strauch K, Butler J, Habbe N, et al. PALB2 mutations in European familial pancreatic cancer families. *Clin Genet*. 2010;78(5):490–494.
83. Roberts NJ, Norris AL, Petersen GM, Bondy ML, Brand R, Gallinger S, et al. Whole genome sequencing defines the genetic heterogeneity of familial pancreatic cancer. *Cancer Discov*. 2016;6(2):166–175.
84. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2509–2520.
85. Nevala-Plagemann C, Hidalgo M, Garrido-Laguna I. From state-of-the-art treatments to novel therapies for advanced-stage pancreatic cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020;17(2):108–123.

86. Bhalla A, Saif MW. PARP-inhibitors in BRCA-associated pancreatic cancer. *JOP*. 2014;15(4):340–343.
87. Moffat GT, O'Reilly EM. The role of PARP inhibitors in germline BRCA-associated pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2020;18(3):168–179.
88. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*. 2008;321(5897):1801–1806.
89. Waddell N, Pajic M, Patch A-M, Chang DK, Kassahn KS, Bailey P, et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature*. 2015;518(7540):495–501.
90. Sausen M, Phallen J, Adleff V, Jones S, Leary RJ, Barrett MT, et al. Clinical implications of genomic alterations in the tumour and circulation of pancreatic cancer patients. *Nat Commun*. 2015;6:7686.
91. Zhan W, Shelton CA, Greer PJ, Brand RE, Whitcomb DC. Germline Variants and Risk for Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Emerging Concepts. *Pancreas*. 2018;47(8):924–936.
92. Midha S, Chawla S, Garg PK. Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. *Cancer Lett*. 2016;381(1):269–277.
93. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog risks to humans*. 2004;83:1–1438.
94. Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J Oncol*. 2019;10(1):10–27.
95. Vrieling A, Bueno-de-Mesquita HB, Boshuizen HC, Michaud DS, Severinsen MT, Overvad K, et al. Cigarette smoking, environmental tobacco smoke exposure and pancreatic cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J cancer*. 2010;126(10):2394–2403.
96. Heinen MM, Verhage BAJ, Goldbohm RA, van den Brandt PA. Active and passive smoking and the risk of pancreatic cancer in the Netherlands Cohort Study. *Cancer Epidemiol biomarkers Prev a Publ Am Assoc Cancer Res cosponsored by Am Soc Prev Oncol*. 2010;19(6):1612–1622.
97. Maisonneuve P, Lowenfels AB, Müllhaupt B, Cavallini G, Lankisch PG, Andersen JR, et al. Cigarette smoking accelerates progression of alcoholic chronic pancreatitis. *Gut*. 2005;54(4):510–514.
98. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Whitcomb DC, Lerch MM, DiMagno EP. Cigarette smoking as a risk factor for pancreatic cancer in patients with hereditary pancreatitis. *JAMA*. 2001;286(2):169–170.
99. Tramacere I, Scotti L, Jenab M, Bagnardi V, Bellocco R, Rota M, et al. Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation. *Int J cancer*. 2010;126(6):1474–1486.
100. Wang Y-T, Gou Y-W, Jin W-W, Xiao M, Fang H-Y. Association between alcohol intake and the risk of pancreatic cancer: a dose-response meta-analysis of cohort studies. *BMC Cancer*. 2016;16:212.
101. Lucenteforte E, La Vecchia C, Silverman D, Petersen GM, Bracci PM, Ji BT, et al. Alcohol consumption and pancreatic cancer: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2012;23(2):374–482.

102. Hassan MM, Bondy ML, Wolff RA, Abbruzzese JL, Vauthey J-N, Pisters PW, et al. Risk factors for pancreatic cancer: case-control study. *Am J Gastroenterol.* 2007;102(12):2696–2707.
103. Michaud DS, Vrieling A, Jiao L, Mendelsohn JB, Steplowski E, Lynch SM, et al. Alcohol intake and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium (PanScan). *Cancer Causes Control.* 2010;21(8):1213–1225.
104. Rahman F, Cotterchio M, Cleary SP, Gallinger S. Association between alcohol consumption and pancreatic cancer risk: a case-control study. *PLoS One.* 2015;10(4):e0124489.
105. Feakins RM. Obesity and metabolic syndrome: pathological effects on the gastrointestinal tract. *Histopathology.* 2016;68(5):630–640.
106. Iyengar NM, Gucalp A, Dannenberg AJ, Hudis CA. Obesity and Cancer Mechanisms: Tumor Microenvironment and Inflammation. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2016;34(35):4270–4276.
107. Dobbins M, Decorby K, Choi BCK. The Association between Obesity and Cancer Risk: A Meta-Analysis of Observational Studies from 1985 to 2011. *ISRN Prev Med.* 2013;2013:680536.
108. Li D, Abbruzzese JL. New strategies in pancreatic cancer: emerging epidemiologic and therapeutic concepts. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* 2010;16(17):4313–4318.
109. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med.* 2003;348(17):1625–1638.
110. Rebours V, Gaujoux S, d'Assignies G, Sauvanet A, Ruszniewski P, Lévy P, et al. Obesity and Fatty Pancreatic Infiltration Are Risk Factors for Pancreatic Precancerous Lesions (PanIN). *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* 2015;21(15):3522–3528.
111. Paluszkiwicz P, Smolińska K, Dębińska I, Turski WA. Main dietary compounds and pancreatic cancer risk. The quantitative analysis of case-control and cohort studies. *Cancer Epidemiol.* 2012;36(1):60–67.
112. Rohrmann S, Linseisen J, Nöthlings U, Overvad K, Egeberg R, Tjønneland A, et al. Meat and fish consumption and risk of pancreatic cancer: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J cancer.* 2013;132(3):617–624.
113. Appleby PN, Crowe FL, Bradbury KE, Travis RC, Key TJ. Mortality in vegetarians and comparable nonvegetarians in the United Kingdom. *Am J Clin Nutr.* 2016;103(1):218–230.
114. Hassan MM, Li D, El-Deeb AS, Wolff RA, Bondy ML, Davila M, et al. Association between hepatitis B virus and pancreatic cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2008;26(28):4557–4562.
115. Desai R, Patel U, Sharma S, Singh S, Doshi S, Shaheen S, et al. Association Between Hepatitis B Infection and Pancreatic Cancer: A Population-Based Analysis in the United States. *Pancreas.* 2018;47(7):849–855.
116. Arafa A, Eshak ES, Abdel Rahman TA, Anwar MM. Hepatitis C virus infection and risk of pancreatic cancer: A meta-analysis. *Cancer Epidemiol.* 2020;65:101691.
117. Dumitrascu T, Pineau P. Is Hepatitis B Virus a Player in Pancreatic Cancer? *Chirurgia (Bucur).* 2018;113(3):344–352.

118. Schulte A, Pandeya N, Fawcett J, Fritschi L, Risch HA, Webb PM, et al. Association between *Helicobacter pylori* and pancreatic cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Causes Control*. 2015;26(7):1027–1035.
119. Liu H, Chen Y-T, Wang R, Chen X-Z. *Helicobacter pylori* infection, atrophic gastritis, and pancreatic cancer risk: A meta-analysis of prospective epidemiologic studies. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(33):e7811.
120. Maekawa T, Fukaya R, Takamatsu S, Itoyama S, Fukuoka T, Yamada M, et al. Possible involvement of *Enterococcus* infection in the pathogenesis of chronic pancreatitis and cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;506(4):962–969.
121. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.
122. Wahi MM, Shah N, Schrock CE, Rosemurgy AS 2nd, Goldin SB. Reproductive factors and risk of pancreatic cancer in women: a review of the literature. *Ann Epidemiol*. 2009;19(2):103–111.
123. Duell EJ, Travier N, Lujan-Barroso L, Dossus L, Boutron-Ruault M-C, Clavel-Chapelon F, et al. Menstrual and reproductive factors in women, genetic variation in CYP17A1, and pancreatic cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC) cohort. *Int J cancer*. 2013;132(9):2164–2175.
124. Bosetti C, Bertuccio P, Negri E, La Vecchia C, Zeegers MP, Boffetta P. Pancreatic cancer: overview of descriptive epidemiology. *Mol Carcinog*. 2012;51(1):3–13.
125. Yu J, Blackford AL, Dal Molin M, Wolfgang CL, Goggins M. Time to progression of pancreatic ductal adenocarcinoma from low-to-high tumour stages. *Gut*. 2015;64(11):1783–1789.
126. Brotherton L, Welton M, Robb SW. Racial disparities of pancreatic cancer in Georgia: a county-wide comparison of incidence and mortality across the state, 2000-2011. *Cancer Med*. 2016;5(1):100–110.
127. Shavers VL, Harlan LC, Jackson M, Robinson J. Racial/ethnic patterns of care for pancreatic cancer. *J Palliat Med*. 2009;12(7):623–630.
128. Ma J, Siegel R, Jemal A. Pancreatic cancer death rates by race among US men and women, 1970-2009. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(22):1694–1700.
129. Arnold LD, Patel A V, Yan Y, Jacobs EJ, Thun MJ, Calle EE, et al. Are racial disparities in pancreatic cancer explained by smoking and overweight/obesity? *Cancer Epidemiol biomarkers Prev a Publ Am Assoc Cancer Res cosponsored by Am Soc Prev Oncol*. 2009;18(9):2397–2405.
130. Silverman DT, Hoover RN, Brown LM, Swanson GM, Schiffman M, Greenberg RS, et al. Why do Black Americans have a higher risk of pancreatic cancer than White Americans? *Epidemiology*. 2003;14(1):45–54.
131. Blackford A, Parmigiani G, Kensler TW, Wolfgang C, Jones S, Zhang X, et al. Genetic mutations associated with cigarette smoking in pancreatic cancer. *Cancer Res*. 2009;69(8):3681–3688.
132. Dong M, Nio Y, Tamura K, Song MM, Guo KJ, Guo RX, et al. Ki-ras point mutation and p53 expression in human pancreatic cancer: a comparative study among Chinese, Japanese, and Western patients. *Cancer Epidemiol biomarkers Prev a Publ Am Assoc Cancer Res cosponsored by Am Soc Prev Oncol*. 2000;9(3):279–284.

133. Franchini M, Favaloro EJ, Targher G, Lippi G. ABO blood group, hypercoagulability, and cardiovascular and cancer risk. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2012;49(4):137–149.
134. Zhang B-L, He N, Huang Y-B, Song F-J, Chen K-X. ABO blood groups and risk of cancer: a systematic review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(11):4643–4650.
135. Vioque J, Walker AM. [Pancreatic cancer and ABO blood types: a study of cases and controls]. *Med Clin (Barc)*. 1991;96(20):761–764.
136. Wolpin BM, Chan AT, Hartge P, Chanock SJ, Kraft P, Hunter DJ, et al. ABO blood group and the risk of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(6):424–431.
137. Ben Q, Wang K, Yuan Y, Li Z. Pancreatic cancer incidence and outcome in relation to ABO blood groups among Han Chinese patients: a case-control study. *Int J cancer*. 2011;128(5):1179–1186.
138. Rahbari NN, Bork U, Hinz U, Leo A, Kirchberg J, Koch M, et al. ABO blood group and prognosis in patients with pancreatic cancer. *BMC Cancer*. 2012;12:319.
139. Dandona M, Gao F, Linehan DC, Wang-Gillam A. Re: ABO blood group and the risk of pancreatic cancer. Vol. 102, *Journal of the National Cancer Institute*. United States; 2010;102(2):135–137.
140. Wang D, Wang Z, Zhang L, Qiu M, Luo H, Ren C, et al. Are risk factors associated with outcomes in pancreatic cancer? *PLoS One*. 2012;7(7):e41984.
141. Risch HA, Yu H, Lu L, Kidd MS. ABO blood group, Helicobacter pylori seropositivity, and risk of pancreatic cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(7):502–505.
142. Duell EJ, Lucenteforte E, Olson SH, Bracci PM, Li D, Risch HA, et al. Pancreatitis and pancreatic cancer risk: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2012;23(11):2964–2970.
143. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, et al. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med*. 1993;328(20):1433–1437.
144. Everhart J, Wright D. Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. *JAMA*. 1995;273(20):1605–1609.
145. Wolpin BM, Bao Y, Qian ZR, Wu C, Kraft P, Ogino S, et al. Hyperglycemia, insulin resistance, impaired pancreatic β -cell function, and risk of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(14):1027–1035.
146. Pannala R, Leirness JB, Bamlet WR, Basu A, Petersen GM, Chari ST. Prevalence and clinical profile of pancreatic cancer-associated diabetes mellitus. *Gastroenterology*. 2008;134(4):981–987.
147. Andersen DK, Korc M, Petersen GM, Eibl G, Li D, Rickels MR, et al. Diabetes, Pancreatogenic Diabetes, and Pancreatic Cancer. *Diabetes*. 2017;66(5):1103–1110.
148. Schnelldorfer T, Ware AL, Sarr MG, Smyrk TC, Zhang L, Qin R, et al. Long-term survival after pancreatoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma: is cure possible? *Ann Surg*. 2008;247(3):456–462.
149. Hartwig W, Hackert T, Hinz U, Gluth A, Bergmann F, Strobel O, et al. Pancreatic cancer surgery in the new millennium: better prediction of outcome. *Ann Surg*. 2011;254(2):311–319.

150. Bilimoria KY, Bentrem DJ, Merkow RP, Tomlinson JS, Stewart AK, Ko CY, et al. Application of the pancreatic adenocarcinoma staging system to pancreatic neuroendocrine tumors. *J Am Coll Surg*. 2007;205(4):558–563.
151. Chu LC, Goggins MG, Fishman EK. Diagnosis and Detection of Pancreatic Cancer. *Cancer J*. 2017;23(6):333–342.
152. Schmidt-Hansen M, Berendse S, Hamilton W. Symptoms of Pancreatic Cancer in Primary Care: A Systematic Review. *Pancreas*. 2016;45(6):814–818.
153. Al-Hawary MM, Francis IR, Chari ST, Fishman EK, Hough DM, Lu DS, et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma radiology reporting template: consensus statement of the society of abdominal radiology and the american pancreatic association. *Gastroenterology*. 2014;146(1):291-304.e1.
154. Chen F-M, Ni J-M, Zhang Z-Y, Zhang L, Li B, Jiang C-J. Presurgical Evaluation of Pancreatic Cancer: A Comprehensive Imaging Comparison of CT Versus MRI. *AJR Am J Roentgenol*. 2016;206(3):526–535.
155. Bronstein YL, Loyer EM, Kaur H, Choi H, David C, DuBrow RA, et al. Detection of small pancreatic tumors with multiphasic helical CT. *AJR Am J Roentgenol*. 2004;182(3):619–623.
156. Tamm EP, Loyer EM, Faria SC, Evans DB, Wolff RA, Charnsangavej C. Retrospective analysis of dual-phase MDCT and follow-up EUS/EUS-FNA in the diagnosis of pancreatic cancer. *Abdom Imaging*. 2007;32(5):660–667.
157. Yoon SH, Lee JM, Cho JY, Lee KB, Kim JE, Moon SK, et al. Small (≤ 20 mm) pancreatic adenocarcinomas: analysis of enhancement patterns and secondary signs with multiphasic multidetector CT. *Radiology*. 2011;259(2):442–452.
158. Kim JH, Park SH, Yu ES, Kim M-H, Kim J, Byun JH, et al. Visually isoattenuating pancreatic adenocarcinoma at dynamic-enhanced CT: frequency, clinical and pathologic characteristics, and diagnosis at imaging examinations. *Radiology*. 2010;257(1):87–96.
159. Park MJ, Kim YK, Choi S, Rhim H, Lee WJ, Choi D. Preoperative detection of small pancreatic carcinoma: value of adding diffusion-weighted imaging to conventional MR imaging for improving confidence level. *Radiology*. 2014;273(2):433–443.
160. Kim R, Prithviraj G, Kothari N, Springett G, Malafa M, Hodul P, et al. PET/CT Fusion Scan Prevents Futile Laparotomy in Early Stage Pancreatic Cancer. *Clin Nucl Med*. 2015;40(11):e501-505.
161. Krishna SG, Rao BB, Ugbarugba E, Shah ZK, Blaszcak A, Hinton A, et al. Diagnostic performance of endoscopic ultrasound for detection of pancreatic malignancy following an indeterminate multidetector CT scan: a systemic review and meta-analysis. *Surg Endosc*. 2017;31(11):4558–4567.
162. Strobel O, Neoptolemos J, Jäger D, Büchler MW. Optimizing the outcomes of pancreatic cancer surgery. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(1):11–26.
163. Kamata K, Kitano M. Endoscopic diagnosis of cystic lesions of the pancreas. *Dig Endosc Off J Japan Gastroenterol Endosc Soc*. 2019;31(1):5–15.
164. Ballehaninna UK, Chamberlain RS. The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal. *J Gastrointest Oncol*. 2012;3(2):105–119.
165. Mizrahi JD, Surana R, Valle JW, Shroff RT. Pancreatic cancer. *Lancet (London, England)*. 2020;395(10242):2008–2020.

166. Del Chiaro M, Segersvärd R, Lohr M, Verbeke C. Early detection and prevention of pancreatic cancer: is it really possible today? *World J Gastroenterol.* 2014;20(34):12118–12131.
167. Canto MI, Harinck F, Hruban RH, Offerhaus GJ, Poley J-W, Kamel I, et al. International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium summit on the management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer. *Gut.* 2013;62(3):339–347.
168. Goggins M, Overbeek KA, Brand R, Syngal S, Del Chiaro M, Bartsch DK, et al. Management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer: updated recommendations from the International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium. *Gut.* 2020;69(1):7–17.
169. Lu C, Xu C-F, Wan X-Y, Zhu H-T, Yu C-H, Li Y-M. Screening for pancreatic cancer in familial high-risk individuals: A systematic review. *World J Gastroenterol.* 2015;21(28):8678–8686.
170. Roalsø M, Aunan JR, Søreide K. Refined TNM-staging for pancreatic adenocarcinoma - Real progress or much ado about nothing? *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol.* 2020;46(8):1554–1557.
171. Edge SB. *AJCC cancer staging manual.* 8th edition. New York: Springer; 2017. ISBN: 978-3-319-40617-6.
172. Song M, Yoon SB, Lee IS, Hong TH, Choi HJ, Choi MH, et al. Evaluation of the prognostic value of the new AJCC 8th edition staging system for patients with pancreatic adenocarcinoma; a need to subclassify stage III? *Eur J Cancer.* 2018;104:62–69.
173. Hackert T, Schneider L, Büchler MW. Current State of Vascular Resections in Pancreatic Cancer Surgery. *Gastroenterol Res Pract.* 2015;2015:120207.
174. Isaji S, Mizuno S, Windsor JA, Bassi C, Fernández-Del Castillo C, Hackert T, et al. International consensus on definition and criteria of borderline resectable pancreatic ductal adenocarcinoma 2017. *Pancreatol.* 2018 Jan;18(1):2-11.
175. Katz MHG, Pisters PWT, Evans DB, Sun CC, Lee JE, Fleming JB, et al. Borderline resectable pancreatic cancer: the importance of this emerging stage of disease. *J Am Coll Surg.* 2008;206(5):833–838.
176. Hartwig W, Strobel O, Hinz U, Fritz S, Hackert T, Roth C, et al. CA19-9 in potentially resectable pancreatic cancer: perspective to adjust surgical and perioperative therapy. *Ann Surg Oncol.* 2013;20(7):2188–2196.
177. Ferrone CR, Finkelstein DM, Thayer SP, Muzikansky A, Fernandez-delCastillo C, Warshaw AL. Perioperative CA19-9 levels can predict stage and survival in patients with resectable pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2006;24(18):2897–2902.
178. Matthew HG, Syed AA. *Multimodality Management of Borderline Resectable Pancreatic Cancer.* Cham: Springer International Publishing, 2016. ISBN: 978-3-319-22779-5. Kapitola 17, Surgery for borderline resectable pancreatic cancer: The Japanese experience, s. 265–287.
179. Young J, Badgery-Parker T, Dobbins T, Jorgensen M, Gibbs P, Faragher I, et al. Comparison of ECOG/WHO performance status and ASA score as a measure of functional status. *J Pain Symptom Manage.* 2015;49(2):258–264.
180. Perri G, Prakash L, Katz MHG. Defining and Treating Borderline Resectable Pancreatic Cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2020;21(9):71.

181. Perone JA, Riall TS, Olino K. Palliative Care for Pancreatic and Periampullary Cancer. *Surg Clin North Am.* 2016;96(6):1415–1430.
182. Artinyan A, Soriano PA, Prendergast C, Low T, Ellenhorn JDI, Kim J. The anatomic location of pancreatic cancer is a prognostic factor for survival. *HPB (Oxford).* 2008;10(5):371–376.
183. Blumgart LH, Belghiti J., Jarnagin WR, Ronald PD, Champman WC, Büchler MW, et al. *Surgery of the liver, biliary tract, and pancreas.* 4th edition. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2007. ISBN 978-1-4160-3256-4. Kapitola 53, Pathology and classification of pancreatic and ampullary tumors, s. 829–848.
184. Blumgart LH, Belghiti J., Jarnagin WR, Ronald PD, Champman WC, Büchler MW, et al. *Surgery of the liver, biliary tract, and pancreas.* 4th edition. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2007. ISBN 978-1-4160-3256-4. Kapitola 54, Periampullary and Pancreatic Tumors, s. 849–866.
185. Kim CB, Ahmed S, Hsueh EC. Current surgical management of pancreatic cancer. *J Gastrointest Oncol.* 2011;2(3):126–135.
186. Pendola F, Gadde R, Ripat C, Sharma R, Picado O, Lobo L, et al. Distal pancreatectomy for benign and low grade malignant tumors: Short-term postoperative outcomes of spleen preservation-A systematic review and update meta-analysis. *J Surg Oncol.* 2017;115(2):137–143.
187. Kim SH, Kang CM, Satoi S, Sho M, Nakamura Y, Lee WJ. Proposal for splenectomy-omitting radical distal pancreatectomy in well-selected left-sided pancreatic cancer: multicenter survey study. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2013;20(3):375–381.
188. Parikh PY, Lillemoe KD. Surgical management of pancreatic cancer--distal pancreatectomy. *Semin Oncol.* 2015;42(1):110–122.
189. Del Chiaro M, Rangelova E, Segersvärd R, Arnelo U. Are there still indications for total pancreatectomy? *Updates Surg.* 2016;68(3):257–263.
190. Karpoff HM, Klimstra DS, Brennan MF, Conlon KC. Results of total pancreatectomy for adenocarcinoma of the pancreas. *Arch Surg.* 2001;136(1):44–47.
191. Are C, Dhir M, Ravipati L. History of pancreaticoduodenectomy: early misconceptions, initial milestones and the pioneers. *HPB (Oxford).* 2011;13(6):377–384.
192. Whipple AO, Parsons WB, Mullins CR. Treatment of Carcinoma of the Ampulla of Vater. *Ann Surg.* 1935;102(4):763–779.
193. Hunt VC. Surgical Management of Carcinoma of the Ampulla of Vater and of the Periampullary Portion of the Duodenum. *Ann Surg.* 1941 Oct;114(4):570–602.
194. Whipple AO. Observations on radical surgery for lesions of the pancreas. *Surg Gynecol Obstet.* 1946;82:623–631.
195. Traverso LW, Longmire WPJ. Preservation of the pylorus in pancreaticoduodenectomy. *Surg Gynecol Obstet.* 1978;146(6):959–662.
196. Traverso LW. Preservation of the pylorus during pancreaticoduodenectomy — Evolution and current indications. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 1994;1(4):329–334.
197. Vavricka SR, Greuter T. Gastroparesis and Dumping Syndrome: Current Concepts and Management. *J Clin Med.* 2019;8(8):1127.

198. Diener MK, Fitzmaurice C, Schwarzer G, Seiler CM, Hüttner FJ, Antes G, et al. Pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy (pp Whipple) versus pancreaticoduodenectomy (classic Whipple) for surgical treatment of periampullary and pancreatic carcinoma. *Cochrane database Syst Rev*. 2014;11(11):CD006053.
199. Klaiber U, Probst P, Strobel O, Michalski CW, Dörr-Harim C, Diener MK, et al. Meta-analysis of delayed gastric emptying after pylorus-preserving versus pylorus-resecting pancreatoduodenectomy. *Br J Surg*. 2018;105(4):339–349.
200. Gómez T, Palomares A, Serradilla M, Tejedor L. Reconstruction after pancreatoduodenectomy: Pancreatojejunostomy vs pancreatogastrostomy. *World J Gastrointest Oncol*. 2014;6(9):369–376.
201. Olakowski M, Grudzińska E, Mrowiec S. Pancreaticojejunostomy-a review of modern techniques. *Langenbeck's Arch Surg*. 2020;405(1):13–22.
202. Warren KW, Cattell RB. Basic techniques in pancreatic surgery. *Surg Clin North Am*. 1956;36(3):707–724.
203. Grobmyer SR, Kooby D, Blumgart LH, Hochwald SN. Novel pancreaticojejunostomy with a low rate of anastomotic failure-related complications. *J Am Coll Surg*. 2010;210(1):54–59.
204. Blumgart LH, Belghiti J., Jarnagin WR, Ronald PD, Champman WC, Büchler MW, et al. Surgery of the liver, biliary tract, and pancreas. 4th edition. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2007. ISBN 978-1-4160-3256-4. Kapitola 56, Pancreaticoduodenectomy, Distal Pancreatectomy, Segmental Pancreatectomy, Total Pancreatectomy, and Transduodenal Resection of the Papilla of Vater, s. 877–903.
205. Schorn S, Demir IE, Vogel T, Schirren R, Reim D, Wilhelm D, et al. Mortality and postoperative complications after different types of surgical reconstruction following pancreaticoduodenectomy-a systematic review with meta-analysis. *Langenbeck's Arch Surg*. 2019;404(2):141–157.
206. Hwang HK, Lee SH, Han DH, Choi SH, Kang CM, Lee WJ. Impact of Braun anastomosis on reducing delayed gastric emptying following pancreaticoduodenectomy: a prospective, randomized controlled trial. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2016;23(6):364–372.
207. Stojadinovic A, Brooks A, Hoos A, Jaques DP, Conlon KC, Brennan MF. An evidence-based approach to the surgical management of resectable pancreatic adenocarcinoma. *J Am Coll Surg*. 2003;196(6):954–964.
208. Büchler MW, Wagner M, Schmied BM, Uhl W, Friess H, Z'graggen K. Changes in morbidity after pancreatic resection: toward the end of completion pancreatectomy. *Arch Surg*. 2003;138(12):1310–1314.
209. Hartwig W, Werner J, Jäger D, Debus J, Büchler MW. Improvement of surgical results for pancreatic cancer. *Lancet Oncol*. 2013;14(11):e476–485.
210. Sánchez-Velázquez P, Muller X, Malleo G, Park J-S, Hwang H-K, Napoli N, et al. Benchmarks in Pancreatic Surgery: A Novel Tool for Unbiased Outcome Comparisons. *Ann Surg*. 2019;270(2):211–218.
211. Hackert T, Tjaden C, Büchler MW. [Developments in pancreatic surgery during the past ten years]. *Zentralbl Chir*. 2014;139(3):292–300.
212. Bockhorn M, Uzunoglu FG, Adham M, Imrie C, Milicevic M, Sandberg AA, et al. Borderline resectable pancreatic cancer: a consensus statement by the International Study Group of Pancreatic Surgery (ISGPS). *Surgery*. 2014;155(6):977–988.

213. Peparini N, Chirletti P. Mesopancreas: a boundless structure, namely R1 risk in pancreaticoduodenectomy for pancreatic head carcinoma. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol*. 2013;39(12):1303–1308.
214. Demir IE, Jäger C, Schlitter AM, Konukiewicz B, Stecher L, Schorn S, et al. R0 Versus R1 Resection Matters after Pancreaticoduodenectomy, and Less after Distal or Total Pancreatectomy for Pancreatic Cancer. *Ann Surg*. 2018;268(6):1058–1068.
215. Chandrasegaram MD, Goldstein D, Simes J, GebSKI V, Kench JG, Gill AJ, et al. Meta-analysis of radical resection rates and margin assessment in pancreatic cancer. *Br J Surg*. 2015;102(12):1459–1472.
216. Konstantinidis IT, Warshaw AL, Allen JN, Blaszkowsky LS, Castillo CF-D, Deshpande V, et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma: is there a survival difference for R1 resections versus locally advanced unresectable tumors? What is a “true” R0 resection? *Ann Surg*. 2013;257(4):731–736.
217. Jamieson NB, Foulis AK, Oien KA, Going JJ, Glen P, Dickson EJ, et al. Positive mobilization margins alone do not influence survival following pancreaticoduodenectomy for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg*. 2010;251(6):1003–1010.
218. Delperro JR, Bachellier P, Regenet N, Le Treut YP, Paye F, Carrere N, et al. Pancreaticoduodenectomy for pancreatic ductal adenocarcinoma: a French multicentre prospective evaluation of resection margins in 150 evaluable specimens. *HPB (Oxford)*. 2014;16(1):20–33.
219. Gaedcke J, Gunawan B, Grade M, Szöke R, Liersch T, Becker H, et al. The mesopancreas is the primary site for R1 resection in pancreatic head cancer: relevance for clinical trials. *Langenbeck's Arch Surg*. 2010;395(4):451–458.
220. Zhou Y, Zhang Z, Liu Y, Li B, Xu D. Pancreatectomy combined with superior mesenteric vein-portal vein resection for pancreatic cancer: a meta-analysis. *World J Surg*. 2012;36(4):884–891.
221. Kasumova GG, Conway WC, Tseng JF. The Role of Venous and Arterial Resection in Pancreatic Cancer Surgery. *Ann Surg Oncol*. 2018;25(1):51–58.
222. MOORE GE, SAKO Y, THOMAS LB. Radical pancreatoduodenectomy with resection and reanastomosis of the superior mesenteric vein. *Surgery*. 1951;30(3):550–553.
223. Siriwardana HPP, Siriwardana AK. Systematic review of outcome of synchronous portal-superior mesenteric vein resection during pancreatectomy for cancer. *Br J Surg*. 2006;93(6):662–673.
224. Giovinazzo F, Turri G, Katz MH, Heaton N, Ahmed I. Meta-analysis of benefits of portal-superior mesenteric vein resection in pancreatic resection for ductal adenocarcinoma. *Br J Surg*. 2016;103(3):179–191.
225. Gong Y, Zhang L, He T, Ding J, Zhang H, Chen G, et al. Pancreaticoduodenectomy combined with vascular resection and reconstruction for patients with locally advanced pancreatic cancer: a multicenter, retrospective analysis. *PLoS One*. 2013;8(8):e70340.
226. Kanda M, Fujii T, Suenaga M, Takami H, Inokawa Y, Yamada S, et al. Pancreatoduodenectomy with portal vein resection is feasible and potentially beneficial for elderly patients with pancreatic cancer. *Pancreas*. 2014;43(6):951–958.

227. Katz MHG, Wang H, Fleming JB, Sun CC, Hwang RF, Wolff RA, et al. Long-term survival after multidisciplinary management of resected pancreatic adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2009;16(4):836–847.
228. Tseng JF, Raut CP, Lee JE, Pisters PWT, Vauthey J-N, Abdalla EK, et al. Pancreaticoduodenectomy with vascular resection: margin status and survival duration. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract*. 2004;8(8):935–950.
229. Lai ECS. Vascular resection and reconstruction at pancreatoduodenectomy: technical issues. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2012;11(3):234–242.
230. Weitz J, Kienle P, Schmidt J, Friess H, Büchler MW. Portal vein resection for advanced pancreatic head cancer. *J Am Coll Surg*. 2007;204(4):712–716.
231. Shoup M, Conlon KC, Klimstra D, Brennan MF. Is extended resection for adenocarcinoma of the body or tail of the pancreas justified? *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract*. 2003;7(8):946–952.
232. Wang F, Arianayagam R, Gill A, Puttaswamy V, Neale M, Gananadha S, et al. Grafts for mesenterico-portal vein resections can be avoided during pancreatoduodenectomy. *J Am Coll Surg*. 2012;215(4):569–579.
233. Zhang Q, Yan S, Wang W, Shen Y, Zhang M, Ding Y, et al. Use of allograft for portomesenteric vein interposition in radical resection of pancreatic tumor. *Surg Pract*. 2013;17(1):22–27.
234. Yoshitomi H, Kato A, Shimizu H, Ohtsuka M, Furukawa K, Takayashiki T, et al. Tips and tricks of surgical technique for pancreatic cancer: portal vein resection and reconstruction (with videos). *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2014;21(9):E69-74.
235. Kaneoka Y, Yamaguchi A, Isogai M. Portal or superior mesenteric vein resection for pancreatic head adenocarcinoma: prognostic value of the length of venous resection. *Surgery*. 2009;145(4):417–425.
236. Chandrasegaram MD, Eslick GD, Lee W, Brooke-Smith ME, Padbury R, Worthley CS, et al. Anticoagulation policy after venous resection with a pancreatectomy: a systematic review. *HPB (Oxford)*. 2014;16(8):691–698.
237. Glebova NO, Hicks CW, Piazza KM, Abularrage CJ, Cameron AM, Schulick RD, et al. Technical risk factors for portal vein reconstruction thrombosis in pancreatic resection. *J Vasc Surg*. 2015;62(2):424–433.
238. Dokmak S. Pancreaticoduodenectomy with Reconstruction of the Mesentericoportal Vein by the Parietal Peritoneum: “Safi Dokmak Vascular Graft”. *Ann Surg Oncol*. 2015;22:343–344.
239. Shao Y, Yan S, Zhang Q-Y, Shen Y, Zhang M, Wang W-L, et al. Autologous falciform ligament graft as A substitute for mesentericoportal vein reconstruction in pancreaticoduodenectomy. *Int J Surg*. 2018;53:159–162.
240. Jara M, Malinowski M, Bahra M, Stockmann M, Schulz A, Pratschke J, et al. Bovine pericardium for portal vein reconstruction in abdominal surgery: a surgical guide and first experiences in a single center. *Dig Surg*. 2015;32(2):135–141.
241. Mascoli C, D’Ambra M, Casadei R, Ricci C, Taffurelli G, Ancetti S, et al. Portal/Superior Mesenteric Vein Reconstruction during Pancreatic Resection Using a Cryopreserved Arterial Homograft. *Dig Surg*. 2015;32(4):284–290.
242. Smoot RL, Christein JD, Farnell MB. An innovative option for venous reconstruction after pancreaticoduodenectomy: the left renal vein. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract*. 2007;11(4):425–431.

243. Meniconi RL, Santoro R, Guglielmo N, Vennarecci G, Lepiane P, Colasanti M, et al. Pancreaticoduodenectomy with venous reconstruction using cold-stored vein allografts: long-term results of a single center experience. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2016;23(1):43–49.
244. Bacalbasa N, Balescu I, Vilcu M, Dima S, Iliescu L, Brezean I, et al. Superior Mesenteric and Portal Vein Reconstruction With Cadaveric Allograft During Pancreatoduodenectomy - A Case Report and Literature Review. *In Vivo.* 2020;34(2):787–791.
245. Hackert T, Weitz J, Büchler MW. Reinsertion of the gastric coronary vein to avoid venous gastric congestion in pancreatic surgery. *HPB (Oxford).* 2015;17(4):368–370.
246. Strasberg SM, Sanchez LA, Hawkins WG, Fields RC, Linehan DC. Resection of tumors of the neck of the pancreas with venous invasion: the “Whipple at the Splenic Artery (WATSA)” procedure. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract.* 2012;16(5):1048–1054.
247. Strasberg SM, Bhalla S, Sanchez LA, Linehan DC. Pattern of venous collateral development after splenic vein occlusion in an extended Whipple procedure: comparison with collateral vein pattern in cases of sinistral portal hypertension. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract.* 2011;15(11):2070–2079.
248. Dua MM, Tran TB, Klausner J, Hwa KJ, Poultsides GA, Norton JA, et al. Pancreatectomy with vein reconstruction: technique matters. *HPB (Oxford).* 2015;17(9):824–831.
249. Smoot RL, Christein JD, Farnell MB. Durability of portal venous reconstruction following resection during pancreaticoduodenectomy. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract.* 2006;10(10):1371–1375.
250. Yekebas EF, Bogoevski D, Cataldegirmen G, Kunze C, Marx A, Vashist YK, et al. En bloc vascular resection for locally advanced pancreatic malignancies infiltrating major blood vessels: perioperative outcome and long-term survival in 136 patients. *Ann Surg.* 2008;247(2):300–309.
251. Banz VM, Croagh D, Coldham C, Tanière P, Buckels J, Isaac J, et al. Factors influencing outcome in patients undergoing portal vein resection for adenocarcinoma of the pancreas. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol.* 2012;38(1):72–79.
252. Labori KJ, Kleive D, Khan A, Farnes I, Fosby B, Line P-D. Graft type for superior mesenteric and portal vein reconstruction in pancreatic surgery - A systematic review. *HPB (Oxford) [online].* 2020;4:S1365-182X(20)31245-4. [cit. 2021-3-10]. Dostupné z: [https://www.hpbonline.org/article/S1365-182X\(20\)31245-4/fulltext](https://www.hpbonline.org/article/S1365-182X(20)31245-4/fulltext).
253. Hartwig W, Hackert T, Hinz U, Hassenpflug M, Strobel O, Büchler MW, et al. Multivisceral resection for pancreatic malignancies: risk-analysis and long-term outcome. *Ann Surg.* 2009;250(1):81–87.
254. Sasson AR, Hoffman JP, Ross EA, Kagan SA, Pingpank JF, Eisenberg BL. En bloc resection for locally advanced cancer of the pancreas: is it worthwhile? *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract.* 2002;6(2):147–148.
255. Petrucciani N, Debs T, Nigri G, Giannini G, Sborlini E, Kassir R, et al. Pancreatectomy combined with multivisceral resection for pancreatic malignancies: is it justified? Results of a systematic review. *HPB (Oxford).* 2018;20(1):3–10.

256. Seufferlein T, Bachet JB, Van Cutsem E, Rougier P. Pancreatic adenocarcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2012;23(7):V56-V68
257. Appleby LH. The coeliac axis in the expansion of the operation for gastric carcinoma. *Cancer*. 1953;6(4):704–707.
258. Klaiber U, Mihaljevic A, Hackert T. Radical pancreatic cancer surgery-with arterial resection. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2019;4:8.
259. Christians KK, Pilgrim CHC, Tsai S, Ritch P, George B, Erickson B, et al. Arterial resection at the time of pancreatectomy for cancer. *Surgery*. 2014;155(5):919–926.
260. Amano H, Miura F, Toyota N, Wada K, Katoh K, Hayano K, et al. Is pancreatectomy with arterial reconstruction a safe and useful procedure for locally advanced pancreatic cancer? *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2009;16(6):850–857.
261. Stitzenberg KB, Watson JC, Roberts A, Kagan SA, Cohen SJ, Konski AA, et al. Survival after pancreatectomy with major arterial resection and reconstruction. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(5):1399–1406.
262. Mollberg N, Rahbari NN, Koch M, Hartwig W, Hoeger Y, Büchler MW, et al. Arterial resection during pancreatectomy for pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Surg*. 2011;254(6):882–893.
263. Hackert T, Sachsenmaier M, Hinz U, Schneider L, Michalski CW, Springfield C, et al. Locally Advanced Pancreatic Cancer: Neoadjuvant Therapy With Folfirinox Results in Resectability in 60% of the Patients. *Ann Surg*. 2016;264(3):457–463.
264. Glanemann M, Shi B, Liang F, Sun X-G, Bahra M, Jacob D, et al. Surgical strategies for treatment of malignant pancreatic tumors: extended, standard or local surgery? *World J Surg Oncol*. 2008;6:123.
265. Wu X, Tao R, Lei R, Han B, Cheng D, Shen B, et al. Distal pancreatectomy combined with celiac axis resection in treatment of carcinoma of the body/tail of the pancreas: a single-center experience. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(5):1359–1366.
266. Hackert T, Weitz J, Büchler MW. Splenic artery use for arterial reconstruction in pancreatic surgery. *Langenbeck's Arch Surg*. 2014;399(5):667–671.
267. Gaujoux S, Sauvanet A, Vullierme M-P, Cortes A, Dokmak S, Sibert A, et al. Ischemic complications after pancreaticoduodenectomy: incidence, prevention, and management. *Ann Surg*. 2009;249(1):111–117.
268. Hackert T, Stampfl U, Schulz H, Strobel O, Büchler MW, Werner J. Clinical significance of liver ischaemia after pancreatic resection. *Br J Surg*. 2011;98(12):1760–1765.
269. Klompmaker S, de Rooij T, Korteweg JJ, van Dieren S, van Lienden KP, van Gulik TM, et al. Systematic review of outcomes after distal pancreatectomy with coeliac axis resection for locally advanced pancreatic cancer. *Br J Surg*. 2016;103(8):941–949.
270. Klompmaker S, van Hilst J, Gerritsen SL, Adham M, Teresa Albiol Quer M, Bassi C, et al. Outcomes After Distal Pancreatectomy with Celiac Axis Resection for Pancreatic Cancer: A Pan-European Retrospective Cohort Study. *Ann Surg Oncol*. 2018;25(5):1440–1447.

271. Jegatheeswaran S, Baltatzis M, Jamdar S, Siriwardena AK. Superior mesenteric artery (SMA) resection during pancreatotomy for malignant disease of the pancreas: a systematic review. *HPB (Oxford)*. 2017;19(6):483–490.
272. Rose JB, Rocha F, Alseidi A, Helton S. Posterior “superior mesenteric artery first” approach for resection of locally advanced pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol*. 2014;21(6):1927–1928.
273. Sanjay P, Takaori K, Govil S, Shrikhande S V, Windsor JA. “Artery-first” approaches to pancreatoduodenectomy. *Br J Surg*. 2012;99(8):1027–1035.
274. Shrikhande S V, Barreto SG, Bodhankar YD, Suradkar K, Shetty G, Hawaldar R, et al. Superior mesenteric artery first combined with uncinate process approach versus uncinate process first approach in pancreatoduodenectomy: a comparative study evaluating perioperative outcomes. *Langenbeck’s Arch Surg*. 2011;396(8):1205–1212.
275. Strobel O, Berens V, Hinz U, Hartwig W, Hackert T, Bergmann F, et al. Resection after neoadjuvant therapy for locally advanced, “unresectable” pancreatic cancer. *Surgery*. 2012;152(3 Suppl 1):S33-42.
276. Massucco P, Capussotti L, Magnino A, Sperti E, Gatti M, Muratore A, et al. Pancreatic resections after chemoradiotherapy for locally advanced ductal adenocarcinoma: analysis of perioperative outcome and survival. *Ann Surg Oncol*. 2006;13(9):1201–1208.
277. Warschkow R, Widmann B, Beutner U, Marti L, Steffen T, Schiesser M, et al. The More the Better-Lower Rate of Stage Migration and Better Survival in Patients With Retrieval of 20 or More Regional Lymph Nodes in Pancreatic Cancer: A Population-Based Propensity Score Matched and Trend SEER Analysis. *Pancreas*. 2017;46(5):648–657.
278. Tarantino I, Warschkow R, Hackert T, Schmied BM, Büchler MW, Strobel O, et al. Staging of pancreatic cancer based on the number of positive lymph nodes. *Br J Surg*. 2017;104(5):608–618.
279. Tol JAMG, Gouma DJ, Bassi C, Dervenis C, Montorsi M, Adham M, et al. Definition of a standard lymphadenectomy in surgery for pancreatic ductal adenocarcinoma: a consensus statement by the International Study Group on Pancreatic Surgery (ISGPS). *Surgery*. 2014;156(3):591–600.
280. Dasari BVM, Pasquali S, Vohra RS, Smith AM, Taylor MA, Sutcliffe RP, et al. Extended Versus Standard Lymphadenectomy for Pancreatic Head Cancer: Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract*. 2015;19(9):1725–1732.
281. Farnell MB, Pearson RK, Sarr MG, DiMagna EP, Burgart LJ, Dahl TR, et al. A prospective randomized trial comparing standard pancreatoduodenectomy with pancreatoduodenectomy with extended lymphadenectomy in resectable pancreatic head adenocarcinoma. *Surgery*. 2005;138(4):618–630.
282. Nimura Y, Nagino M, Takao S, Takada T, Miyazaki K, Kawarada Y, et al. Standard versus extended lymphadenectomy in radical pancreatoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the head of the pancreas: long-term results of a Japanese multicenter randomized controlled trial. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2012;19(3):230–241.
283. Svoronos C, Tsoulfas G, Katsourakis A, Noussios G, Chatzitheoklitos E, Marakis NG. Role of extended lymphadenectomy in the treatment of pancreatic head adenocarcinoma: review and meta-analysis. *ANZ J Surg*. 2014;84(10):706–711.

284. Ke K, Chen W, Chen Y. Standard and extended lymphadenectomy for adenocarcinoma of the pancreatic head: a meta-analysis and systematic review. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014;29(3):453–462.
285. Neoprolemos JP. Pancreatic cancer. New York: Springer, 2010. ISBN 978-0-387-77497-8. Kapitola 42, Japanese Pancreas Society Staging Systems for Pancreatic Cancer, s. 1035–1050.
286. Finks JF, Osborne NH, Birkmeyer JD. Trends in hospital volume and operative mortality for high-risk surgery. *N Engl J Med*. 2011;364(22):2128–2137.
287. Krautz C, Nimptsch U, Weber GF, Mansky T, Grützmann R. Effect of Hospital Volume on In-hospital Morbidity and Mortality Following Pancreatic Surgery in Germany. *Ann Surg*. 2018;267(3):411–417.
288. Kim SY, Fink MA, Perini M, Houli N, Weinberg L, Muralidharan V, et al. Age 80 years and over is not associated with increased morbidity and mortality following pancreaticoduodenectomy. *ANZ J Surg*. 2018;88(5):E445–450.
289. Shamali A, De'Ath HD, Jaber B, Abuawad M, Barbaro S, Hamaday Z, et al. Elderly patients have similar short term outcomes and five-year survival compared to younger patients after pancreaticoduodenectomy. *Int J Surg*. 2017;45:138–143.
290. Uesaka K, Boku N, Fukutomi A, Okamura Y, Konishi M, Matsumoto I, et al. Adjuvant chemotherapy of S-1 versus gemcitabine for resected pancreatic cancer: a phase 3, open-label, randomised, non-inferiority trial (JASPAC 01). *Lancet*. 2016;388(10041):248–257.
291. Neoptolemos JP, Palmer DH, Ghaneh P, Psarelli EE, Valle JW, Halloran CM, et al. Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*. 2017;389(10073):1011–1024.
292. Han S-L, Zheng X-F, Shen X, Liu Z, Li J-L, Lan S-H, et al. Analysis of procedure-related complications after pancreatodoudenectomy. *Indian J Surg*. 2010;72(3):194–199.
293. Hanna MM, Gadde R, Allen CJ, Meizoso JP, Sleeman D, Livingstone AS, et al. Delayed gastric emptying after pancreaticoduodenectomy. *J Surg Res*. 2016;202(2):380–388.
294. Samlowski E, Okwuosa C, Tashjian N, Wagner M. Catastrophic Bleeding From Gastroduodenal Artery After Whipple Procedure Managed With Resuscitative Endovascular Balloon Occlusion of the Aorta. Vol. 6, *ACG case reports journal*. 2019;6(11):e00283.
295. Hackert T, Werner J, Büchler MW. Postoperative pancreatic fistula. *Surgeon*. 2011;9(4):211–217.
296. Bassi C, Marchegiani G, Dervenis C, Sarr M, Abu Hilal M, Adham M, et al. The 2016 update of the International Study Group (ISGPS) definition and grading of postoperative pancreatic fistula: 11 Years After. *Surgery*. 2017;161(3):584–591.
297. Cheng Y, Briarava M, Lai M, Wang X, Tu B, Cheng N, et al. Pancreaticojejunostomy versus pancreaticogastrostomy reconstruction for the prevention of postoperative pancreatic fistula following pancreaticoduodenectomy. *Cochrane database Syst Rev*. 2017;9(9):CD012257.

298. Keck T, Wellner UF, Bahra M, Klein F, Sick O, Niedergethmann M, et al. Pancreatogastrostomy Versus Pancreatojejunostomy for RECOstruction After PANCreatoduodenectomy (RECOPANC, DRKS 00000767): Perioperative and Long-term Results of a Multicenter Randomized Controlled Trial. *Ann Surg*. 2016;263(3):440–449.
299. Shen Y, Jin W. Reconstruction by Pancreaticogastrostomy versus Pancreaticojejunostomy following Pancreaticoduodenectomy: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Gastroenterol Res Pract*. 2012;2012:627095.
300. Ma J-P, Peng L, Qin T, Lin J-W, Chen C-Q, Cai S-R, et al. Meta-analysis of pancreaticoduodenectomy prospective controlled trials: pancreaticogastrostomy versus pancreaticojejunostomy reconstruction. *Chin Med J (Engl)*. 2012;125(21):3891–3897.
301. Shrikhande S V, Sivasanker M, Vollmer CM, Friess H, Besselink MG, Fingerhut A, et al. Pancreatic anastomosis after pancreatoduodenectomy: A position statement by the International Study Group of Pancreatic Surgery (ISGPS). *Surgery*. 2017;161(5):1221–1234.
302. Diener MK, Seiler CM, Rossion I, Kleeff J, Glanemann M, Butturini G, et al. Efficacy of stapler versus hand-sewn closure after distal pancreatectomy (DISPACT): a randomised, controlled multicentre trial. *Lancet (London, England)*. 2011;377(9776):1514–1522.
303. Weniger M, D'Haese JG, Crispin A, Angele MK, Werner J, Hartwig W. Autologous but not Fibrin Sealant Patches for Stump Coverage Reduce Clinically Relevant Pancreatic Fistula in Distal Pancreatectomy: A Systematic Review and Meta-analysis. *World J Surg*. 2016;40(11):2771–2781.
304. Hackert T, Klaiher U, Hinz U, Kehayova T, Probst P, Knebel P, et al. Sphincter of Oddi botulinum toxin injection to prevent pancreatic fistula after distal pancreatectomy. *Surgery*. 2017;161(5):1444–1450.
305. Gurusamy KS, Koti R, Fusai G, Davidson BR. Somatostatin analogues for pancreatic surgery. *Cochrane database Syst Rev*. 2013;2013(4):CD008370.
306. Van Buren G 2nd, Bloomston M, Hughes SJ, Winter J, Behrman SW, Zyromski NJ, et al. A randomized prospective multicenter trial of pancreaticoduodenectomy with and without routine intraperitoneal drainage. *Ann Surg*. 2014;259(4):605–612.
307. Witzigmann H, Diener MK, Kienkötter S, Rossion I, Bruckner T, Werner B, et al. No Need for Routine Drainage After Pancreatic Head Resection: The Dual-Center, Randomized, Controlled PANDRA Trial (ISRCTN04937707). *Ann Surg*. 2016;264(3):528–537.
308. van der Gaag NA, Rauws EAJ, van Eijck CHJ, Bruno MJ, van der Harst E, Kubben FJGM, et al. Preoperative biliary drainage for cancer of the head of the pancreas. *N Engl J Med*. 2010;362(2):129–137.
309. Ducreux M, Cuhna AS, Caramella C, Hollebecque A, Burtin P, Goéré D, et al. Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2015;26(5):v56-68.
310. van Hilst J, de Rooij T, Klompmaker S, Rawashdeh M, Aleotti F, Al-Sarireh B, et al. Minimally Invasive versus Open Distal Pancreatectomy for Ductal Adenocarcinoma (DIPLOMA): A Pan-European Propensity Score Matched Study. *Ann Surg*. 2019;269(1):10–17.

311. Raouf M, Ituarte PHG, Woo Y, Warner SG, Singh G, Fong Y, et al. Propensity score-matched comparison of oncological outcomes between laparoscopic and open distal pancreatic resection. *Br J Surg*. 2018;105(5):578–586.
312. Nassour I, Wang SC, Christie A, Augustine MM, Porembka MR, Yopp AC, et al. Minimally Invasive Versus Open Pancreaticoduodenectomy: A Propensity-matched Study From a National Cohort of Patients. *Ann Surg*. 2018;268(1):151–157.
313. Esposito A, Balduzzi A, De Pastena M, Fontana M, Casetti L, Ramera M, et al. Minimally invasive surgery for pancreatic cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2019;19(11):947–958.
314. Chowdappa R, Challa VR. Mesopancreas in pancreatic cancer: where do we stand - review of literature. *Indian J Surg Oncol*. 2015;6(1):69–74.
315. Strobel O, Büchler MW. Surgery of pancreatic cancer: techniques to avoid local recurrence. *Chirurg*. 2020;91(8):615–627.
316. Zhang J-F, Hua R, Sun Y-W, Liu W, Huo Y-M, Liu D-J, et al. Influence of perineural invasion on survival and recurrence in patients with resected pancreatic cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(9):5133–5139.
317. Neoptolemos JP, Stocken DD, Dunn JA, Almond J, Beger HG, Pederzoli P, et al. Influence of resection margins on survival for patients with pancreatic cancer treated by adjuvant chemoradiation and/or chemotherapy in the ESPAC-1 randomized controlled trial. *Ann Surg*. 2001;234(6):758–768.
318. Zhang J, Fu X, Liu D, Yang M, Yang J, Huo Y, et al. Molecular markers associated with perineural invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncol Lett*. 2020;20(4):5.
319. Gockel I, Domeyer M, Wolloscheck T, Konerding MA, Junginger T. Resection of the mesopancreas (RMP): a new surgical classification of a known anatomical space. *World J Surg Oncol*. 2007;5:44.
320. Agrawal MK, Thakur DS, Somashekar U, Chandrakar SK, Sharma D. Mesopancreas: myth or reality? *JOP*. 2010;11(3):230–233.
321. Kawabata Y, Tanaka T, Nishi T, Monma H, Yano S, Tajima Y. Appraisal of a total meso-pancreatoduodenum excision with pancreaticoduodenectomy for pancreatic head carcinoma. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol*. 2012;38(7):574–579.
322. Adham M, Singhirunnusorn J. Surgical technique and results of total mesopancreas excision (TMpE) in pancreatic tumors. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol*. 2012;38(4):340–345.
323. Xu J, Tian X, Chen Y, Ma Y, Liu C, Tian L, et al. Total mesopancreas excision for the treatment of pancreatic head cancer. *J Cancer*. 2017;8(17):3575–3584.
324. Inoue Y, Saiura A, Yoshioka R, Ono Y, Takahashi M, Arita J, et al. Pancreatoduodenectomy With Systematic Mesopancreas Dissection Using a Supracolic Anterior Artery-first Approach. *Ann Surg*. 2015;262(6):1092–1101.
325. Burris HA 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1997;15(6):2403–2413.
326. Heinemann V, Haas M, Boeck S. Systemic treatment of advanced pancreatic cancer. *Cancer Treat Rev*. 2012;38(7):843–853.

327. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med*. 2011;364(19):1817–1825.
328. Goldstein D, El-Maraghi RH, Hammel P, Heinemann V, Kunzmann V, Sastre J, et al. nab-Paclitaxel plus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer: long-term survival from a phase III trial. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(2):413.
329. Gradishar WJ, Tjulandin S, Davidson N, Shaw H, Desai N, Bhar P, et al. Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005;23(31):7794–7803.
330. Sohal DPS, Mangu PB, Khorana AA, Shah MA, Philip PA, O'Reilly EM, et al. Metastatic Pancreatic Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2016;34(23):2784–2796.
331. Tempero MA, Malafa MP, Al-Hawary M, Asbun H, Bain A, Behrman SW, et al. Pancreatic Adenocarcinoma, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017;15(8):1028–1061.
332. Nagrial AM, Chin VT, Sjoquist KM, Pajic M, Horvath LG, Biankin A V, et al. Second-line treatment in inoperable pancreatic adenocarcinoma: A systematic review and synthesis of all clinical trials. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015;96(3):483–497.
333. Wang-Gillam A, Li C-P, Bodoky G, Dean A, Shan Y-S, Jameson G, et al. Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic cancer after previous gemcitabine-based therapy (NAPOLI-1): a global, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*. 2016;387(10018):545–557.
334. Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin A V, et al. Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Prim*. 2016;2:16022.
335. Kalsner MH, Ellenberg SS. Pancreatic cancer. Adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection. *Arch Surg*. 1985;120(8):899–903.
336. Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H, et al. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med*. 2004;350(12):1200–1210.
337. Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2007;297(3):267–277.
338. Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D, et al. Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2010;304(10):1073–1081.
339. Valle JW, Palmer D, Jackson R, Cox T, Neoptolemos JP, Ghaneh P, et al. Optimal duration and timing of adjuvant chemotherapy after definitive surgery for ductal adenocarcinoma of the pancreas: ongoing lessons from the ESPAC-3 study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2014;32(6):504–512.
340. Khorana AA, Mangu PB, Berlin J, Engebretson A, Hong TS, Maitra A, et al. Potentially Curable Pancreatic Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2017;35(20):2324–2328.

341. Conroy T, Hammel P, Hebbar M, Ben Abdelghani M, Wei AC, Raoul J-L, et al. FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*. 2018;379(25):2395–2406.
342. Khorana AA, McKernin SE, Berlin J, Hong TS, Maitra A, Moravek C, et al. Potentially Curable Pancreatic Adenocarcinoma: ASCO Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2019;37(23):2082–2088.
343. Tempero MA, Reni M, Riess H, Pelzer U, O'Reilly EM, Winter JM, et al. AFACT: phase III, multicenter, international, open-label, randomized trial of adjuvant nab-paclitaxel plus gemcitabine (nab-P/G) vs gemcitabine (G) for surgically resected pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2019;37(15):4000.
344. Heinrich S, Lang H. Neoadjuvant Therapy of Pancreatic Cancer: Definitions and Benefits. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8):1622.
345. Golcher H, Brunner TB, Witzigmann H, Marti L, Bechstein W-O, Bruns C, et al. Neoadjuvant chemoradiation therapy with gemcitabine/cisplatin and surgery versus immediate surgery in resectable pancreatic cancer: results of the first prospective randomized phase II trial. *Strahlenther Onkol*. 2015;191(1):7–16.
346. Ghaneh P, Palmer DH, Cicconi S, Halloran C, Psarelli EE, Rawcliffe CL, et al. ESPAC-5F: Four-arm, prospective, multicenter, international randomized phase II trial of immediate surgery compared with neoadjuvant gemcitabine plus capecitabine (GEMCAP) or FOLFIRINOX or chemoradiotherapy (CRT) in patients with borderline resectable pan. *J Clin Oncol*. 2020;38(15):4505.
347. Petrelli F, Coiu A, Borgonovo K, Cabiddu M, Ghilardi M, Lonati V, et al. FOLFIRINOX-based neoadjuvant therapy in borderline resectable or unresectable pancreatic cancer: a meta-analytical review of published studies. *Pancreas*. 2015;44(4):515–521.
348. Heinrich S, Pestalozzi B, Lesurtel M, Berrevoet F, Laurent S, Delpero J-R, et al. Adjuvant gemcitabine versus NEOadjuvant gemcitabine/oxaliplatin plus adjuvant gemcitabine in resectable pancreatic cancer: a randomized multicenter phase III study (NEOPAC study). *BMC Cancer*. 2011;11:346.
349. Tachezy M, Gebauer F, Petersen C, Arnold D, Trepel M, Wegscheider K, et al. Sequential neoadjuvant chemoradiotherapy (CRT) followed by curative surgery vs. primary surgery alone for resectable, non-metastasized pancreatic adenocarcinoma: NEOPA- a randomized multicenter phase III study (NCT01900327, DRKS00003893, ISRCTN82191749). *BMC Cancer*. 2014;14:411.
350. Groot VP, van Santvoort HC, Rombouts SJE, Hagendoorn J, Borel Rinkes IHM, van Vulpen M, et al. Systematic review on the treatment of isolated local recurrence of pancreatic cancer after surgery; re-resection, chemoradiotherapy and SBRT. *HPB (Oxford)*. 2017;19(2):83–92.
351. Himburg HA, Grzybowski DM, Hazel AL, LaMack JA, Li X-M, Friedman MH. Spatial comparison between wall shear stress measures and porcine arterial endothelial permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286(5):H1916-1922.
352. Buchanan JR, Kleinstreuer C, Comer JK. Rheological effects on pulsatile hemodynamics in a stenosed tube. *Comput Fluids*. 2000;29(6):695–724.
353. Oniscu GC, Forsythe JLR, Fung JJ. Abdominal organ retrieval and transplantation bench surgery. Chichester, West Sussex: John Wiley, 2013. ISBN 9780470657867.

354. Soleimani M, Fonouni H, Esmaeilzadeh M, Kashfi A, Fani Yazdi SH, Golriz M, et al. Appropriate donor size for porcine liver xenotransplant. *Exp Clin Transplant*. 2012;10(2):148–153.
355. Ntonas A, Katsourakis A, Galanis N, Filo E, Noussios G. Comparative Anatomical Study Between the Human and Swine Liver and Its Importance in Xenotransplantation. *Cureus*. 2020 Jul;12(7):e9411.
356. Borycka-Kiciak K, Kiciak A, Zabielski R, Romanowicz-Barcikowska K, Tarnowski W, Bielecki K. Does different approach during pancreatoduodenectomy influence intestinal migrating myoelectrical complex recovery? Study in experimental pig model. *J Physiol Pharmacol*. 2013;64(3):341–351.
357. Jones DB, Wu JS, Soper NJ. Laparoscopic pancreaticoduodenectomy in the porcine model. *Surg Endosc*. 1997;11(4):326–330.
358. Suzuki O, Hirano S, Yano T, Okamura K, Hazama K, Shichinohe T, et al. Laparoscopic pancreaticoduodenectomy is effective in a porcine model. *Surg Endosc*. 2008;22(11):2509–2513.
359. Yoshioka M, Onda M, Tajiri T, Akimaru K, Mineta S, Hirakata A, et al. Reconstruction of the portal vein using a peritoneal patch-graft. *Am J Surg*. 2001;181(3):247–250.
360. Ohkuma T, Ouchi H, Sasaki H, Maeyama T, Kasai M. Experimental study on expanded polytetrafluoroethylene (E-PTFE) for portal vein reconstruction with combined operation of the digestive tract. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 1982;23(4):328–333.
361. Ohkuma T. [Replacement of portal vein with E-PTFE vascular graft; experimental study on process of the endothelialization]. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*. 1984;85(12):1558–1569.
362. Nishibe T, Manase H, Miyazaki K, Ohkashiwa H, Satoh Y, Watanabe S, et al. Portal vein reconstruction with conventional polytetrafluoroethylene grafts: an experimental study in dogs. *Surg Today*. 1998;28(4):391–395.
363. Brooksby GA, Donald DE. Dynamic changes in splanchnic blood flow and blood volume in dogs during activation of sympathetic nerves. *Circ Res*. 1971;29(3):227–238.
364. Auden RM, Donald DE. Reflex responses of the isolated, in situ portal vein of the dog. *J Surg Res*. 1975;18(1):35–42.
365. Mattson JM, Zhang Y. Structural and Functional Differences Between Porcine Aorta and Vena Cava. *J Biomech Eng*. 2017;139(7):710071–710078.
366. Davies MG, Hagen PO. Pathophysiology of vein graft failure: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg*. 1995;9(1):7–18.
367. Xu Q, Zhang Z, Davison F, Hu Y. Circulating progenitor cells regenerate endothelium of vein graft atherosclerosis, which is diminished in ApoE-deficient mice. *Circ Res*. 2003;93(8):e76-86.
368. Ward AO, Caputo M, Angelini GD, George SJ, Zakkar M. Activation and inflammation of the venous endothelium in vein graft disease. *Atherosclerosis*. 2017;265:266–274.
369. Predel HG, Yang Z, von Segesser L, Turina M, Bühler FR, Lüscher TF. Implications of pulsatile stretch on growth of saphenous vein and mammary artery smooth muscle. *Lancet*. 1992;340(8824):878–879.
370. Newby AC, Zaltsman AB. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol*. 2000;190(3):300–309.

371. Mitra AK, Gangahar DM, Agrawal DK. Cellular, molecular and immunological mechanisms in the pathophysiology of vein graft intimal hyperplasia. *Immunol Cell Biol.* 2006;84(2):115–124.
372. Nihei Y, Sasanuma H, Yasuda Y. Experimental evaluation of portal venous pulsatile flow synchronized with heartbeat intervals. *J Med Ultrason* (2001). 2011;38(3):141–149.
373. Yan S, Zhang Q, Cai M, Yu D, Chen J, Yu P, et al. A novel model of portal vein transplantation in mice using two-cuff technique. *Microsurgery.* 2007;27(6):569–574.
374. Kahle B, Schmidtke C, Hunzelmann N, Bartels C, Sievers HH, Steenbock H, et al. The Extracellular Matrix Signature in Vein Graft Disease. *Can J Cardiol.* 2016;32(8):1008.e11-17.
375. Ozturk N, Sucu N, Comelekoglu U, Yilmaz BC, Aytacoglu BN, Vezir O. Pressure applied during surgery alters the biomechanical properties of human saphenous vein graft. *Heart Vessels.* 2013;28(2):237–245.
376. Robert L. Aging of the vascular-wall and atherosclerosis. *Exp Gerontol.* 1999;34(4):491–501.
377. Yoshikawa T, Nomi T, Sakai K, Hayakawa M, Hokuto D, Matsuo Y, et al. Ischaemia-reperfusion injury with Pringle's maneuver induces unusually large von Willebrand factor multimers after hepatectomy. *Thromb Res.* 2019;183:20–27.
378. Chen YW, Li CH, Zhang AQ, Yang SZ, Zhang WZ, Dong JH. Preserving hepatic artery flow during portal triad blood inflow occlusion reduces liver ischemia-reperfusion injury in rats. *J Surg Res.* 2012;174(1):150–156.
379. Figueras J, Llado L, Ruiz D, Ramos E, Busquets J, Rafecas A, et al. Complete versus selective portal triad clamping for minor liver resections: a prospective randomized trial. *Ann Surg.* 2005;241(4):582–590.
380. Gao W, Dai X, Dai C, Jiang K, Wu J, Li Q, et al. Comparison of patency rates and clinical impact of different reconstruction methods following portal/superior mesenteric vein resection during pancreatectomy. *Pancreatol.* 2016;16(6):1113–1123.
381. Lurie JM, Png CYM, Subramaniam S, Chen S, Chapman E, Aboubakr A, Marin M, Faries P, Ting W. Virchow's triad in "silent" deep vein thrombosis. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord.* 2019;7(5):640-645
382. Casa LDC, Ku DN. Thrombus Formation at High Shear Rates. *Annu Rev Biomed Eng.* 2017;19:415–433.
383. Koskinas KC, Chatzizisis YS, Antoniadis AP, Giannoglou GD. Role of endothelial shear stress in stent restenosis and thrombosis: pathophysiologic mechanisms and implications for clinical translation. *J Am Coll Cardiol.* 2012;59(15):1337–1349.
384. Chiu J-J, Chien S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev.* 2011;91(1):327–387.
385. Hwang S, Kim DY, Ahn CS, Moon DB, Kim KM, Park GC, et al. Computational simulation-based vessel interposition reconstruction technique for portal vein hypoplasia in pediatric liver transplantation. *Transplant Proc.* 2013;45(1):255–258.

386. Wei W, Pu Y-S, Wang X-K, Jiang A, Zhou R, Li Y, et al. Wall shear stress in portal vein of cirrhotic patients with portal hypertension. *World J Gastroenterol.* 2017;23(18):3279–3286.
387. Zhou H, Gong P, Du X, Wang M. Analysis and computational fluid dynamics simulation of hemodynamic influences caused by splenic vein thrombosis. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* 2015;32(1):43-47.
388. Krepline AN, Christians KK, Duelge K, Mahmoud A, Ritch P, George B, et al. Patency rates of portal vein/superior mesenteric vein reconstruction after pancreatectomy for pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg.* 2014;18(11):2016–2025.
389. Lee DY, Mitchell EL, Jones MA, Landry GJ, Liem TK, Sheppard BC, et al. Techniques and results of portal vein/superior mesenteric vein reconstruction using femoral and saphenous vein during pancreaticoduodenectomy. *J Vasc Surg.* 2010;51(3):662–666.
390. Velik-Salchner C, Schnürer C, Fries D, Müssigang PR, Moser PL, Streif W, et al. Normal values for thrombelastography (ROTEM) and selected coagulation parameters in porcine blood. *Thromb Res.* 2006;117(5):597–602.
391. Köstering H, Mast WP, Kaethner T, Nebendahl K, Holtz WH. Blood coagulation studies in domestic pigs (Hanover breed) and minipigs (Goettingen breed). *Lab Anim.* 1983;17(4):346–349.
392. Kessler U, Grau T, Gronchi F, Berger S, Brandt S, Bracht H, et al. Comparison of porcine and human coagulation by thrombelastometry. *Thromb Res.* 2011;128(5):477–482.
393. Lechner R, Helm M, Müller M, Wille T, Riesner HJ, Friemert B. In-vitro study of species-specific coagulation differences in animals and humans using rotational thromboelastometry (ROTEM). *J R Army Med Corps.* 2019;165(5):356–359.

8 Souhrn

Úvod: Radikální resekce je jedinou potenciálně kurabilní metodou léčby karcinomu pankreatu. Z důvodu absence časných příznaků však bývá toto onemocnění ve většině případů diagnostikováno až v pokročilých stadiích. Tumor již bývá lokálně pokročilý nebo jsou přítomny vzdálené metastázy. Karcinom pankreatu často invaduje do vena portae (VP) nebo vena mesenterica superior (VMS). V současné době je v rámci chirurgické léčby karcinomu pankreatu provedení žilní resekce VP/VMS ve specializovaných centrech doporučováno. Existuje několik možností rekonstrukce VP/VMS. Jako výhodné se jeví využití alogenních žilních štěpů, se kterými jsou však v této indikaci zatím omezené zkušenosti. Není jasné, jakého anatomického původu by tyto alogenní štěpy měly optimálně být.

Cíle: Cílem této práce bylo na velkém zvířecím modelu hemipankreatoduodenektomie s rekonstrukcí VP porovnat alogenní štěpy vena cava inferior (VCI) (tj. štěpy ze systémového řečiště) se štěpy samotné vena portae (VP) (tj. štěpy z portálního řečiště). Cílem bylo porovnat histologickou stavbu těchto štěpů před a po jejich implantaci, dále pak vyhodnotit chování těchto štěpů v pooperačním období a identifikovat technické faktory, které ovlivňují míru rizika trombotizace VP po její rekonstrukci.

Metodika: Hemipankreatoduodenektomie s rekonstrukcí VP alogenními žilními štěpy byla provedena u 26 prasat domácích. Zvířata byla rozdělena do dvou experimentálních skupin podle toho, zda byly implantovány štěpy VP (n=13), nebo štěpy VCI (n=13). Zvířata byla po výkonu sledována po dobu čtyř týdnů. Pravidelně byla prováděna vyšetření dopplerovskou ultrasonografií (DUSG). Vzorky žilních štěpů byly histologicky vyšetřeny jednak před jejich implantací (nativní štěpy) a jednak po čtyřech týdnech po implantaci. Na základě získaných dat byly vytvořeny matematické modely proudění krve v portálním řečišti po jeho rekonstrukci za účelem identifikace rizikových faktorů pro rozvoj trombózy VP.

Výsledky: Celkem 19 zvířat přežilo po celou dobu experimentu. U 5 zvířat ze skupiny VP a u 2 zvířat ze skupiny VCI došlo k předčasnému úmrtí z důvodu perioperačních komplikací. Kvantitativní histologické vyšetření prokázalo vyšší podíl hladké svaloviny a méně kolagenu I a III ve stěně štěpů VP oproti štěpům VCI. Čtyři týdny po implantaci však byla stavba stěny obou typů štěpů srovnatelná. Štěpy VP měly časně po implantaci větší průměr než štěpy VCI. Matematické modelování umožnilo identifikovat oblasti rizikové pro rozvoj trombózy. Tendence ke stagnaci krve, jako jeden z rizikových parametrů pro vznik trombózy, byla vyšší v případě štěpů o větším průměru (zejména pokud přesahoval průměr samotné VP). U 4 zvířat ze skupiny VP a u 1 zvířete ze skupiny VCI došlo k trombóze extrahepatální části VP.

Závěr: Provedený experiment podporuje v případě potřeby využití alogenních žilních štěpů ze systémového řečiště VCI pro rekonstrukci VP v rámci chirurgické léčby karcinomu pankreatu v klinické medicíně.

Klíčová slova: karcinom pankreatu, hemipankreatoduodenektomie, rekonstrukce portální žíly, alogenní štěpy, experiment na velkém zvířeti

9 Summary

Introduction: Pancreatic cancer is a fatal malignancy that is known as one of the leading causes of cancer mortality worldwide. The only potentially curative treatment is radical surgical resection. Because of the lack of early symptoms, the diagnosis is usually made in advanced stages of the disease. In the majority of patients, the tumor is already locally advanced or it has distant metastases at the time of diagnosis. Pancreatic cancer tends to infiltrate the portal vein (PV) or the superior mesenteric vein (SMV). Nowadays, resection of infiltrated parts of PV/SMV is recommended in specialized centers. There are several established techniques of PV/SMV reconstruction. The use of allogeneic venous grafts seems to be a method with minimal risk of adverse effects but there is only limited experience with these grafts. The optimal anatomical origin of allogeneic venous grafts for PV/SMV reconstruction remains unknown.

Aims: The aim of this experiment was to compare two types of allogeneic venous grafts used for PV reconstruction in a large animal model of pancreaticoduodenectomy. These grafts were harvested from the caval system (inferior caval vein grafts – IVC grafts) and the portal system (PV grafts). The purpose was also to compare the microstructure of these grafts and to evaluate their possible remodeling after implantation. The experiment was also planned with the intent to enable monitoring of proportions of these grafts in the postoperative period and to identify technical factors that influence the risk of PV thrombosis.

Methods: Pancreaticoduodenectomy with PV reconstruction was successfully performed in 26 piglets. The animals were divided into two experimental groups according to the type of implanted graft (PV group, n = 13; IVC group, n = 13). The postoperative monitoring period was 4 weeks. Regular Doppler ultrasonography controls were performed before the operation and throughout the postoperative period. Specimens of venous grafts taken right after their retrieval and also 4 weeks after implant were examined by qualitative and quantitative histology. Computer simulations of blood flow in the reconstructed portal system were performed to identify risk factors of PV thrombosis.

Results: Nineteen animals survived throughout the whole monitoring period. Five animals in the PV group and two in the IVC group died prematurely due to postoperative complications. Higher amounts of smooth muscle cells and lesser amounts of collagen I and III were observed in the wall of PV grafts compared to IVC grafts right after their retrieval. However, both types of grafts had similar morphology 4 weeks after implantation. Larger graft diameters right after implantation were documented in cases of PV grafts. Computer simulations helped to identify areas susceptible to thrombosis. The propensity for blood stagnation as a risk factor for thrombosis was more noticeable in cases of grafts of larger diameters (especially when the diameter exceeded PV diameter). Thrombosis of extrahepatic PV occurred in 4 animals from the PV group and 1 animal from the IVC group.

Conclusion: Results of this experiment support the use of allografts from the systemic venous system for PV reconstruction in patients with pancreatic cancer when needed.

Key words: pancreatic cancer, pancreaticoduodenectomy, portal vein reconstruction, allogeneic grafts, large animal experiment

10 Vědecké výstupy autora

10.1 Publikace v periodících s impakt faktorem

Pálek R, Jonášová A, Rosendorf J, Mik P, Bajcurová K, Hošek P, Moulisová V, Eberlová L, Haidingerová L, Brzoň O, Bednář L, Kříž T, Dolanský M, Třeška V, Tonar Z, Vimmr J, Liška V: Allogeneic Venous Grafts of Different Origin Used for Portal Vein Reconstruction After Pancreaticoduodenectomy – Experimental Study. *Anticancer Res* 2019;39(12):6603-6620. **IF 1,99**

Pálek R., Rosendorf J, Malečková A, Vištejnová L, Bajcurová K, Mírka H, Tégl V, Brzoň O, Kumar A, Bednář L, Tonar Z, Hošek P, Moulisová V, Eberlová L, Třeška V, Liška V: Influence of Mesenchymal Stem Cell Administration on The Outcome of Partial Liver Resection in a Porcine Model of Sinusoidal Obstruction Syndrome. *Anticancer Res.* 2020;40(12):6817–6833. **IF 1,99**

Rosendorf J, Klíčová M, Červenková L, Pálek R, Horáková J, Klápšťová A, Hošek P, Moulisová V, Bednář L, Tégl V, Brzoň O, Tonar Z, Třeška V, Lukáš D, Liška V. Double-layered Nanofibrous Patch for Prevention of Anastomotic Leakage and Peritoneal Adhesions, Experimental Study. *In Vivo.* 2021;35(2):731-741. **IF 1,54**

Rosendorf J, Klíčová M, Červenková L, Horáková J, Klápšťová A, Hošek P, Pálek R, Ševčík J, Polák R, Třeška V, Chvojka J, Liška V. Reinforcement of Colonic Anastomosis with Improved Ultrafine Nanofibrous Patch: Experiment on Pig. *Biomedicines.* 2021;21;9(2):102. **IF 4,17**

Moulisová V, Jiřík M, Schindler C, Červenková L, Pálek R, Rosendorf J, Arlt J, Bolek L, Šůsová S, Nietzsche S, Liška V, Dahmen U. Novel morphological multi-scale evaluation system for quality assessment of decellularized liver scaffolds. *J Tissue Eng.* 2020;27(11):2041731420921121. **IF 5,35**

Arshad T, Mansur F, Pálek R, Manzoor S, Liška V. A Double Edged Sword Role of Interleukin-22 in Wound Healing and Tissue Regeneration. *Front Immunol.* 2020;11:2148. **IF 6,43**

Jiřík M, Gruber I, Moulisová V, Schindler C, Červenková L, Pálek R, Rosendorf J, Arlt J, Bolek L, Dejmek J, Dahmen U, Železný M, Liška V. Semantic Segmentation of Intralobular and Extralobular Tissue from Liver Scaffold H&E Images. *Sensors (Basel)*. 2020;20(24):7063. **IF 3,28**

Rosendorf J, Horáková J, Klíčová M, Pálek R, Červenková L, Kural T, Hošek P, Kříž T, Tégl V, Moulisová V, Tonar Z, Třeška V, Lukáš D, Liška V: Experimental Fortification of Intestinal Anastomoses With Nanofibrous Materials in a Large Animal Model. *Sci Rep*. 2020;10:1134. **IF 4,53**

Tomášek P, Tonar Z, Grajciarova M, Kural T, Turek D, Horáková J, Pálek R, Eberlová L, Králíčková M, Liška V: Histological mapping of porcine carotid arteries – An animal model for the assessment of artificial conduits suitable for coronary bypass grafting in humans. *Ann Anat*. 2020;228:151434. **IF 2,24**

Eberlová L, Malečková A, Mik, Tonar Z, Jiřík M., Mírka H., Pálek R, Leupen S., Liška V.: Porcine Liver Anatomy Applied to Biomedicine. *J Surg Res*. 2020;250:70-79. **IF 2,19**

Červenková L, Vyčítal O, Brůha J, Rosendorf J, Pálek R, Liška V, Daum O, Mohelníková-Duchoňová B, Souček P: Protein expression of ABCC2 and SLC22A3 associates with prognosis of pancreatic adenocarcinoma. *Sci Rep*. 2019;9:19782. **IF 4,53**

Kumar A, Pálek R, Liška V.: A Critical Analysis of Experimental Animal Models of Sinusoidal Obstruction Syndrome. *J Clin Exp Hepatol*. 2019;9:345-353. **IF 2,16**

Mik P, Tonar Z, Malečková A, Eberlová L, Liška V, Pálek R, Rosendorf J, Jiřík M, Mírka H, Králíčková M, Witter K: Distribution of Connective Tissue in the Male and Female Porcine Liver: Histological Mapping and Recommendations for Sampling. *Journal of Comparative Pathology*. *Journal of Comparative Pathology*, 2018;162:1-13. **IF 1,36**

Vyčítal O, Dubová M, Pálek R, Hošek P, Branžovský J, Třeška V, Daum O, Liška V.: The Impact of Immune Interaction on the Metastatic Infiltration of Colorectal Carcinoma to Lymph Nodes. *Anticancer Res*. 2018;38(7):4159-4167. **IF 1,99**

Eberlová L, Liška V, Mírka H, Tonar Z, Haviar S, Svoboda M, Beneš J, Pálek R, Eminger M, Mik P, Lametschwandtner A.: The use of porcine corrosion casts for teaching human anatomy. *Ann Anat.*, 2017;213:69-77. **IF 1,31**

Liška V, Třeška V, Skalický T, Fichtl J, Brůha J, Vyčítal O, Topolčan O, Pálek R, Rosendorf J, Polívka J, Holubec L.: Evaluation of Tumor Markers and Their Impact on Prognosis in Gallbladder, Bile Duct and Cholangiocellular Carcinomas - A Pilot Study. *Anticancer Res.*, 2017;37(4): 2003-2009. **IF 1,99**

Junatas KL, Tonar Z, Kubíková T, Liška V, Pálek R, Králíčková M, Witter K: Size and density of hepatocytes in porcine liver. *J Anat.*, 2017; 230(4): 575-588. **IF 2,15**

Eberlová L, Liška V, Mírka H, Gregor T, Tonar Z, Pálek R, Skála M, Brůha J, Vyčítal O, Kalusová K, Haviar S, Králíčková M, Lametschwandtner A.: Porcine liver vascular bed in biodur E20 corrosion casts. *Folia morphologica*, 2016;75(2): 154-161. **IF 0,3**

Brůha J, Vyčítal O, Tonar Z, Mírka H, Haidingerová L, Beneš J, Pálek R, Skála M, Třeška V, Liška V.: Monoclonal Antibody Against Transforming Growth Factor Beta 1 Does Not Influence Liver Regeneration After Resection in Large Animal Experiments. *In Vivo.*, 2015;29: 327–340. **IF 1,15**

10.2 Publikace v ostatních periodických

Pálek R, Liška V, Třeška V, Rosendorf J, Eminger M, Tégl V, Králíčková A, Bajcurová A, Jiřík M, Tonar Z: Sinusoidální obstrukční syndrom indukovaný monokrotalinem v experimentu na velkém zvířeti –pilotní studie. *Rozhl Chir.* 2018;97:214–221.

Pálek R, Liška V, Eberlová L, Mírka H, Svoboda M, Haviar S, Eminger M, Brzoň O, Mik P, Třeška V: Experimentální příprava korozivních preparátů orgánů velkého zvířete. *Rozhl Chir.* 2018;97:222–228.

Rosendorf J, Mírka H, Michal M, Pálek R, Šleisová G, Třeška V, Liška V. Benigní angiomyolipom jater: kazuistika. *Rozhl Chir.* 2020;99:91–94.

Rosendorf J, Liška V, Pálek R, Třeška V. Náhlé příhody břišní v těhotenství: retrospektivní studie gravidních pacientek hospitalizovaných pro bolesti břicha. Rozhl Chir. 2020;99:131–135.

Rosendorf J, Pálek R, Mírka H, Třeška V, Liška V: Traumata tenkého střeva. Rozhl Chir. 2019; 98:315–320.

Liška V, Moulisová V, Pálek R, Rosendorf J, Červenková L, Bolek L, Třeška V: Cesta k novým játrům: Decelularizace prasečích jater a jejich znovuosídlení buňkami. Rozhl Chir. 2019; 98:388–393.

Malečková A, Tonar Z, Mik P, Michalova K, Liška V, Pálek R, Rosendorf J, Králíčková M, Třeška V.: Animal models of liver diseases and their application in experimental surgery. Rozhl Chir. 2019; 98:100–109.

Liška V, Třeška V, Mírka H, Vyčítal O, Brůha J, Haidingerová L, Beneš J, Tonar Z, Pálek R, Rosendorf J: Možnosti experimentálního ovlivnění regenerace jaterního parenchymu v souvislosti s ligací větví portální žíly. Rozhl Chir. 2018;97:239–245.

Liška V, Třeška V, Mírka H, Vyčítal O, Brůha J, Haidingerová L, Beneš J, Tonar Z, Pálek R, Rosendorf J: Možnosti experimentálního ovlivnění regenerace jaterního parenchymu v souvislosti s ligací větví portální žíly. Rozhl Chir.2018;97:239–245.

Brůha J, Liška V, Pálek R, Mírka H, Hošek P, Korčáková E, Bajcurová K, Fichtl J, Skalický T, Třeška V: Porovnání perkutánní a otevřené radiofrekvenční ablace metastáz kolorektálního karcinomu ve FN Plzeň v letech 2001-2015. Rozhl Chir. 2016;95:107–111.

Liška V, Emingr M, Skála M, Pálek R, Troup O, Novák P, Vyčítal O, Skalický T, Třeška V.: Jaterní metastázy karcinomů kolon a rekta z pohledu rozdílů v klinických parametrech. Rozhl Chir. 2016;95:69–77.

Liška V, Pálek R, Třeška V, Glanc D, Svobodová M.: Analýza komplikací a klinicko - patologických faktorů ve vztahu k laparoskopické cholecystektomii. Rozhl Chir. 2014;93:123–131.

10.3 Knihy, kapitoly v knihách

Liška V – editor: Experimental surgery. Nava, Plzeň, 2016. ISBN 978-80-7211-490-0. Spoluautor knihy. **Oceněno Maydlovou cenou za rok 2016.**

Liška V, Třeška V, Novák P, Vyčítal O, Brůha J, Pálek R, Rosendorf J: Vliv komplikací kolorektální anastomózy na onkologické výsledky. In: Koloproktologie vybrané kapitoly. Editoři: Hoch J., Antoš F. Mladá fronta, Praha, 2016, ISBN: 978-80-204-4179-9

Liška V, Glanc D, Vyčítal O, Brůha J, Pitule P, Kopalová J, Pálek R, Třeška V: Interleukin-6 inhibitors as novel generation of treatment strategies. In: D'Aquino J, DeVito EN et al.: Interleukin-6: Genetics, Clinical Applications and Role in Disease. Nova, New York, 2013, ISBN: 978-1-62417-592-3.

Tonar Z, Eberlová L, Polívka J, Daum O, Witter K, Králíčková A, Gregor T, Nedorost L, Kochová P, Rohan E, Kalusová K, Pálek R, Skála M, Glanc D, Králíčková M, Liška V: Stereological methods for quantitative assessment of hepatic microcirculation. In: Méndez-Villas A. (Ed): Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology. Microscopy Book Series - 2012 Edition. Formatex Research Centre, Badajoz, Spain. ISBN 978-84-939843-6-6.

10.4 Vybrané přednášky a postery

Pálek R., Jonášová A., Rosendorf J., Mik P., Bajcurová K., Hošek P., Moulisová V., Eberlová L., Haidingerová L., Brzoň O., Bednář L., Kříž T., Dolanský M., Třeška V., Tonar Z., Vimmr J., Liška V.: Allogeneic venous grafts used for portal vein reconstruction after pancreaticoduodenectomy – large animal experiment and biomechanical study. 13th Congress of the European – African Hepato – Pancreato – Biliary Association (E-AHPBA); Amsterdam, Nizozemsko, 2.-5.6.2019.

Pálek R., Rosendorf J., Brzoň O., Dejmek J., Kříž T., Dolanský M., Feurich R., Ševčík J.: První kroky v přípravě experimentálního modelu ortotopické transplantace jater s využitím porto – cavo – jugulárního shuntu (experiment na praseti domácím). 59. Studentská vědecká konference Lékařské fakulty UK v Plzni; Plzeň, 21. 5. 2019.

Pálek R., Moulisová V., Rosendorf J., Červenková L., Jiřík M., Dolanský M., Schindler C.: Pokroky v přípravě perfuzně decelularizovaných jater prasete domácího a jejich in vitro repopulaci. 59. Studentská vědecká konference Lékařské fakulty UK v Plzni; Plzeň, 21. 5. 2019.

Pálek R., Kochová P., Melčková A., Bonkówski M., Horák M., Mik P., Rosendorf J., Tonar Z., Liška V., Třeška V.: Assessment of the impact test of fresh porcine liver and spleen filled with blood under standardized intravascular pressure. 20th European Congress of Trauma and Emergency Surgery. Praha, 5. - 7. 5. 2019.

Pálek R., Moulisová V., Bolek L., Rosendorf J., Dejmek J., Červenková L., Dahmen U., Třeška V., Liška V.: Hodnocení kvality perfuzně decelularizovaných jater prasete domácího. Čtvrtá výroční konference Biomedicínského centra. Plzeň, 7.2.2019.

Pálek R., Rosendorf J., Bednář L., Kříž T., Brzoň O., Tégl V., Bajcurová K., Mik P., Jonášová A., Vimmr J.: Reconstruction of Portal Vein by Different Types of Allogeneous Venous Grafts in Experimental Model of Pancreaticoduodenectomy. The 15th International Medical Postgraduate Conference, Hradec Králové, 22. – 23. 11. 2018.

Pálek R., Liška V., Eberlová L., Mírka H., Svoboda M., Haviar S., Rosendorf J., Kříž T., Dolanský M., Mik P., Třeška V.: Experimentální příprava korozivních preparátů orgánů velkého zvířete. 8. kongres chirurgie jater, žlučových cest a pankreatu; Plzeň, 20. – 21.9.2018.

Pálek R., Rosendorf J., Schindler C., Bednář L., Kříž T., Dolanský M., Tégl V., Brzoň O.: Decelularizace jater jako první krok v přípravě umělého orgánu. 58. Studentská vědecká konference Lékařské fakulty UK v Plzni; Plzeň, 30. 5. 2018.

Pálek R., Liška V., Rosendorf J., Bednář L., Kříž T., Brzoň O., Tégl V., Bajcurová K., Malečková A., Tonar Z., Třeška V.: Monocrotalinem indukovaný syndrom sinusoidální obstrukce v experimentu na velkém zvířeti XXVII. Petřivalského Rapantovy dny, Olomouc, 19.-20.4.2018

Pálek R., Rosendorf J., Emingr M., Bednář L., Kříž T., Brzoň O., Tégl V., Bajcurová K., Tonar Z.: Rekonstrukce portální žíly různými typy alogenních žilních štěpů v experimentálním modelu hemipankreatoduodenektomie. Celostátní konference studentských vědeckých prací, 14. - 15.11.2017, Olomouc. **Přednáška oceněna II. cenou v klinické sekci.**

Pálek R., Rosendorf J., Emingr M., Bednář L., Kříž T., Brzoň O., Tégl T., Bajcurová K., Tonar Z.: Rekonstrukce portální žíly různými typy alogenních žilních štěpů v experimentálním modelu hemipankreatoduodenektomie. 57. Studentská vědecká konference lékařské fakulty UK v Plzni; Plzeň, 17. 5. 2017. **Přednáška oceněna II. cenou v pregraduální sekci.**

Pálek R., Liška V., Eberlová L., Mírka H., Svoboda M., Haviar S., Rosendorf J., Emingr M., Brzoň O., Mik P., Třeška V.: Experimentální příprava korozivních preparátů orgánů velkého zvířete. Postgraduální lékařské dny Plzeň 2018, 13.2.2017, Plzeň.

Pálek R., Liška V., Brůha J., Vyčítal O., Tonar Z., Mírka H., Haidingerová L., Beneš J., Bajcurová K., Skála M., Třeška V.: Monoclonal Antibody Against Transforming Growth Factor Beta - 1 Does Not Influence Liver Regeneration after Resection in Large Animal Experiment. 51st Congress of the European Society for Surgical Research. Praha, 25.-28.5. 2016.

Pálek R., Emingr M., Skála M., Eberlová L., Liška V., Mírka H.: Význam v. portae a a. hepatica propria v korozivních preparátech jaterní mikrocirkulace prasete

domáciho. 56. Studentská vědecká konference lékařské fakulty UK v Plzni; Plzeň, 13.4.2016. **Přednáška oceněna II. cenou v pregraduální sekci.**

Pálek R., Skála M., Třeška V., Haidingerová L., Beneš J., Mírka H., Tonar Z., Vyčítal O., Brůha J., Liška V.: Monoclonal antibody against Transforming growth factor Beta 1 does not influence liver regeneration after resection in large animal experiment. 25th IASGO World Congress, Fuzhou, 4.-6. září 2015. **Poster oceněn cestovním stipendiem.**

Pálek R., Skála M., Glanc D., Rosendorf J., Emingr M., Troup O., Brůha J., Vyčítal O.: Příprava Experimentálního modelu hemipankreatoduodenektomie s náhradou portálního řečiště alogenním žilním štěpem. 55. Studentská vědecká konference lékařské fakulty UK v Plzni, Plzeň, 22.4.2015. **Přednáška oceněna I. cenou v pregraduální sekci.**

10.5 Kopie nejvýznamnějších prací v hepatopankreatobiliární problematice

Pálek R., Jonášová A, Rosendorf J, Mik P, Bajcurová K, Hošek P, Moulisová V, Eberlová L, Haidingerová L, Brzoň O, Bednář L, Kříž T, Dolanský M, Třeška V, Tonar Z, Vimmr J, Liška V: Allogeneic Venous Grafts of Different Origin Used for Portal Vein Reconstruction After Pancreaticoduodenectomy – Experimental Study. *Anticancer Res* 2019;39(12):6603-6620. IF 1,99

Pálek R., Rosendorf J, Malečková A, Vištejnová L, Bajcurová K, Mírka H, Tégl V, Brzoň O, Kumar A, Bednář L, Tonar Z, Hošek P, Moulisová V, Eberlová L, Třeška V, Liška V: Influence of Mesenchymal Stem Cell Administration on The Outcome of Partial Liver Resection in a Porcine Model of Sinusoidal Obstruction Syndrome. *Anticancer Res.* 2020;40(12):6817–6833. IF 1,99

Eberlová L, Malečková A, Mik, Tonar Z, Jiřík M., Mírka H., Pálek R., Leupen S., Liška V.: Porcine Liver Anatomy Applied to Biomedicine. *J Surg Res.* 2020; 250:70-79. IF 2,19

Červenková L, Vyčítal O, Brůha J, Rosendorf J, Pálek R., Liška V, Daum O, Mohelníková-Duchoňová B, Souček P: Protein expression of ABCC2 and SLC22A3 associates with prognosis of pancreatic adenocarcinoma. *Sci Rep.* 2019; 9:19782. IF 4,53

Pálek R, Jonášová A, Rosendorf J, Mik P, Bajcurová K, Hošek P, Moulisová V, Eberlová L, Haidingerová L, Brzoň O, Bednář L, Kříž T, Dolanský M, Třeška V, Tonar Z, Vimmr J, Liška V: Allogeneic Venous Grafts of Different Origin Used for Portal Vein Reconstruction After Pancreaticoduodenectomy – Experimental Study. *Anticancer Res* 2019;39(12):6603-6620. IF 1,99

Allogeneic Venous Grafts of Different Origin Used for Portal Vein Reconstruction After Pancreaticoduodenectomy – Experimental Study

RICHARD PALEK^{1,2}, ALENA JONASOVA³, JACHYM ROSENDORF^{1,2}, PATRIK MIK^{2,4},
KRISTYNA BAJCUROVA^{2,5}, PETR HOSEK², VLADIMIRA MOULISOVA², LADA EBERLOVA^{2,4},
LENKA HAIDINGEROVA⁶, ONDREJ BRZON², LUKAS BEDNAR², TOMAS KRIZ²,
MARTIN DOLANSKY², VLADISLAV TRESKA¹, ZBYNEK TONAR^{2,7}, JAN VIMMR³ and VACLAV LISKA^{1,2}

¹Department of Surgery, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic;

²Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic;

³Department of Mechanics, Faculty of Applied Sciences, University of West Bohemia, Pilsen, Czech Republic;

⁴Department of Anatomy, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic;

⁵Department of Medical Imaging, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic;

⁶Department of Anesthesiology and Resuscitation,
Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic;

⁷Department of Histology and Embryology,
Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic

Abstract. *Background:* In clinical medicine, little is known about the use of allografts for portal vein (PV) reconstruction after pancreaticoduodenectomy (PD). Portal and caval systems are physiologically different, therefore the properties of allografts from caval and portal systems were studied here in a pig model. *Materials and Methods:* PD with PV reconstruction with allogeneic venous graft from PV or inferior vena cava (IVC) was performed in 26 pigs. Biochemical analysis and ultrasonography measurements were performed during a 4-week monitoring period. Computer simulations were used to evaluate haemodynamics in reconstructed PV and explanted allografts were histologically examined. *Results:* The native PV and IVC grafts varied in histological structure but were able to adapt morphologically after transplantation. Computer simulation suggested PV grafts to be more susceptible to thrombosis development. Thrombosis of reconstructed PV occurred in four out of five cases in PV group. *Conclusion:* This study

supports the use of allografts from caval system for PV reconstruction in clinical medicine when needed.

Pancreatic cancer is one of the leading causes of cancer mortality in developed countries; its incidence has been rising over last decades and without a breakthrough in therapy this trend is expected to continue (1, 2). The incidence of pancreatic cancer is almost equal to its mortality rate and the estimated 5-year survival rate is only 5% (1, 3).

Nowadays the only potential curative therapy of this disease is radical surgical resection, which can help to increase the 5-year survival rate up to 25% (4). The standard surgical method for curative resection of tumours arising in the head of the pancreas is pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy (PPPD) (5). However, the resectability of pancreatic cancer is limited by vessel infiltration. In the presence of tumour ingrowth into adjacent arteries, surgical resection is not generally recommended due to high postoperative morbidity and mortality (4, 6). However, tumours infiltrating venous structures [such as the superior mesenteric vein (SMV), and portal vein (PV)] can be safely resected together with involved part of the vein, resulting in morbidity and mortality comparable with standard PPPD (4, 7).

Resection of either PV or SMV during PPPD requires a suitable reconstruction of the involved vessel. In cases when only a tangential resection or short segmental resection is performed, the vein can be reconstructed by venorrhaphy, patch plasty or primary anastomosis. When a longer venous

Correspondence to: Richard Palek, Alej Svobody 76, 323 00 Pilsen, Czech Republic. Tel: +420 722435599, e-mail: palekrichard@gmail.com; Václav Liška, Alej Svobody 76, 323 00 Pilsen, Czech Republic. Tel: +420 732160287, e-mail: vena.liska@skaut.cz

Key Words: Pancreaticoduodenectomy, portal vein reconstruction, allogeneic grafts, portal vein haemodynamics, computer blood flow simulation.

segment has to be removed and a tension-free anastomosis cannot be achieved even after the mobilization of abdominal organs, then a reconstruction with interposition graft is required (5, 8). For this, autologous venous grafts are used in most cases utilizing e.g. the left renal vein, internal jugular vein, great saphenous vein or superficial femoral vein. Synthetic polytetrafluorethylene (PTFE) grafts are rarely used for PV reconstruction as they are suspected of increasing the rate of postoperative thrombosis and infection (9). Nevertheless, the most commonly used technique using autologous venous grafts still has some disadvantages. These include prolonged operation time, poorly fitting diameter of the graft which has to be adapted, a risk of complications at the site of harvesting, and harvesting itself, which may require an additional incision (10).

Considering the disadvantages of autologous grafts, a reconstruction using allogeneic cadaveric grafts might be a fast and elegant method for reducing postoperative morbidity. Since portal and caval venous systems vary by their perfusion pressure or by vessel capacitance (11, 12), we hypothesised that allografts originating from the PV would be ideal for PV reconstruction. However, PV allografts are less available compared to easily accessible allografts from the caval system such as the inferior vena cava (IVC) or iliac veins. The reason for this is the harvesting of PV together with the liver for transplantation purposes. The use of allogeneic venous grafts from organ donors for PV reconstruction has been described in only few studies; in all these cases, grafts from the iliac or femoral vein from the caval venous system were used (13-15). Moreover, to our knowledge, no study examining potential differences between grafts originating from the portal system and the caval system have been reported. Due to the mentioned physiological differences between portal and caval venous systems, a comparison of graft types is very important for safe application and wide use of this technique in clinical medicine.

The reconstruction of PV using venous graft is associated with certain risk of postoperative thrombosis (16). Factors such as composition of the blood, changes of haemodynamics and changes of the vessel wall can trigger thrombosis (17). A non-uniform blood flow and inadequate shear stress stimulation of the vascular wall can cause changes observed at the morphological as well as physiological level (18). Moreover, haemodynamics associated with stagnation or low-velocity zones or areas with a sudden increase in shear stress, such as vascular stenoses, have a propensity for thrombosis (19). Thus, in order to provide an alternative insight into the problem of portal system haemodynamics and to assess its role in the outcome of PV reconstruction, computer simulations of blood flow in pre- and postoperative PV models were carried out. To our knowledge this is the first time this method has been used to evaluate the risk of thrombosis in reconstructed PV.

The aim of this study was to compare the characteristics of cadaveric venous grafts from PV and IVC in order to evaluate their properties and functionality in a reconstructed portal system to verify the suitability of their utilization. For better intelligibility and because of comparison with clinical medicine the term IVC is used for pig caudal vena cava throughout the article.

Materials and Methods

Animal experiment legislation. This study was conducted under the authority of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic. All the procedures with the use of animals were approved by the Commission for Work with Experimental Animals at the Charles University, Faculty of Medicine in Pilsen, and the whole study was conducted in accordance with the law of the Czech Republic, which is compatible with the legislation of the European Union (number of approval - 4891/2015-MZE-17214).

Experimental animals and testing of immunocompatibility. For the *in vivo* model of PPPD, Prestice black pied pig was used. All the animals were healthy, about 3-4 months old, with body weight between 24 and 36 kg. Both males and females were included. There were two recipient groups (PV and IVC) and one group of donors. Animals in the PV group received a PV graft (n=13). Animals in the IVC group received a graft of supra-hepatic part of IVC (n=13).

One PV and one IVC graft were harvested from each of the donor pigs (n=13). To avoid incompatibility among individual donors and recipients, a standard blood cross-matching test was performed prior to surgery.

Premedication and general anaesthesia. All animals were under general anaesthesia during all surgical procedures and under analgesia during ultrasound examination and blood sample collection. Intramuscular premedication used 10 mg/kg ketamine (Narkamon; Spofa, a.s., Prague, Czech Republic), 5 mg/kg azaperon (Stresnil; Janssen Pharmaceutica NV, Beerse, Belgium) and 1 mg atropine (Atropin Biotika; Hoechst Biotika, Martin, Slovak Republic). General anaesthesia was induced and maintained by intravenous administration of propofol (1% mixture 5-10 mg/kg/h propofol; Fresenius Kabi Norges as, Halden, Norway). Intravenous administration of fentanyl (1-2 µg/kg/h Fentanyl Torre; Chiesi cz s.r.o., Prague, Czech Republic) was used for continuous analgesia. Airways were secured by endotracheal intubation and pigs were mechanically ventilated. Physiological functions were monitored throughout the surgery. During the procedure, pigs received infusions and volume substitution when needed: Hartmann's Solution (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) and Plasmalyte (Baxter Healthcare Ltd., Compton, UK). Amoxicillin and clavulanic acid (1.2 g Augmentin per pig; GlaxoSmithKline Slovakia s.r.o., Bratislava, Slovak Republic) were used as antibiotic prophylaxis at the beginning of the procedure; the dose was repeated after 2 hours.

Collection of venous grafts. PV and IVC grafts were harvested under aseptic and antiseptic conditions from the pigs in donor group. Before graft harvesting 20,000 IU of heparin (Heparin - Zentiva, k.s., Prague, Czech Republic) was intravenously administered.

Collected grafts were then stored in saline with 20 000 IU of heparine per litre in fridge with temperature around 8°C. Finally, the donor was sacrificed by intravenous administration of a potassium chloride solution.

PPPD and transplantation of venous grafts. Firstly, ProPort Plastic Venous Access System with PolyFlow polyurethane catheter (Deltec, Smiths Medical Deutschland GmbH, Grasbrunn, Germany) was implanted and introduced through the jugular vein into the superior vena cava for intravenous premedication, administration of crystalloids and blood sample collection. The surgery of recipients followed a standard protocol for PPPD; there was only a small modification involving preservation of the gallbladder, and therefore the bile duct was divided at the level of common bile duct instead of at the level of the common hepatic duct. This step was taken because of easier creation of biliodigestive anastomosis at the level of common bile duct with larger diameter, thus reducing the risk of postoperative complications after such an extensive procedure as PPPD. Then 100 IU/kg of heparin was administered intravenously to prevent thrombosis during PV occlusion. The freed and encircled PV was then clamped with two vessel clamps proximally and distally to the liver so as to enable the part of the potentially affected PV to be resected and removed together with the whole specimen (the duodenum, proximal part of jejunum, the head and the neck of the pancreas and the part of the PV).

PV reconstruction. For PV reconstruction, the PV or IVC graft was cut into an appropriate length and two end-to-end hand sewn anastomoses were performed to interpose the graft at the place of resected part of the PV. Suture using 5-0 monofilament polypropylene was used. The length of the resected part of the PV and of the graft used for reconstruction was different for individual animals, simulating the situation in clinical medicine when the length of segment which has to be resected depends on the extent of tumour invasion. However, these were equally distributed between both experimental groups to enable the comparison of the groups.

Perioperative measurement. The diameters of the PV, SMV and lienal vein (LV) were measured with sterile caliper prior to vessel reconstruction. The length of the interposed graft, the diameters of the PV, SMV, LV, interposed graft and both anastomoses were measured right after vessel reconstruction.

Restoration of gastrointestinal continuity. The reconstruction of gastrointestinal tract started with end-to-side pancreaticojejunostomy. About 10 centimetres distally from the pancreaticojejunostomy, the choledochojejunostomy was created end-to-side. The stomach was connected with the jejunum with end-to-side pylorojejunostomy followed by side-to-side jejunojejunostomy to avoid regurgitation of the bile and pancreatic juice into the stomach. Then the laparotomy was closed in anatomical layers, and the animals were extubated and allowed to recover.

Follow-up. The animals were monitored every day for the next 4 weeks, focusing on clinical examination to be able to identify any potential surgical complications. The animals fasted for the first 3 postoperative days after the operation and were re-alimented to standard feed portions during the first postoperative week. Access to water was not restricted. Throughout the first postoperative week, 40 mg of pantoprazole (Nolpaza KRKA Slovensko, s.r.o.,

Bratislava, Slovak Republic), 250 ml of Hartmann's Solution and 250 ml of Glucosa 5% (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) was daily administered *via* the ProPort system. From the second postoperative week, only 40 mg of pantoprazole was added into the feed every day for the rest of the experiment.

Biochemical markers. Blood samples were collected before the operation, immediately before PV resection, immediately after PV reconstruction, 2 hours after PV reconstruction, and then on postoperative days 7, 14, 21 and 28. Using these samples, serum aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, γ -glutamyltransferase, alkaline phosphatase, bilirubin, urea and creatinine levels were analyzed.

Ultrasound examination. All transplanted animals underwent ultrasound examination before operation, right after operation and then on postoperative days 7, 14, 21 and 28. Doppler ultrasonography (Ultrasound Scanner Pro Focus 2202; BK Medical, Herlev, Denmark) was performed to verify and quantify the blood flow in the graft and in the PV system. Diameters of the PV, interposed graft, anastomoses, SMV and LV were measured together with the maximum velocity of blood flow in these locations. On the 28th postoperative day, the PV was harvested together with the interposed graft under general anaesthesia. The pigs were then sacrificed by intravenous administration of potassium chloride solution.

Histology. All the explanted PV specimens with the interposed graft as well as the rest of the grafts not used for PV reconstruction were histologically examined. For comparison of the types of grafts at the end of experiment, only the specimens from surviving animals were used. All the tissue samples were spread and stitched to cork plates to prevent tissue deformation and extensive shrinkage and to preserve the orientation of the specimen. All samples were fixed in 10% buffered formalin and processed to 3 μ m paraffin sections. Samples were cut along the plane parallel to the long axis of the original vein. The overall morphology was examined using hematoxylin-eosin and green trichrome stains. Type I and type III collagen was examined in circularly polarized light using picosirius red staining (Direct Red 80; Sigma Aldrich, Munich, Germany). Elastic fibres were stained with Tanzer's orcein (Bowley Biochemical Inc., Danvers, MA, USA). Vascular smooth muscle cells as well as contractile myofibroblasts in the suture area were visualized using immunohistochemical reaction against alpha-smooth muscle actin (monoclonal mouse anti-human smooth muscle actin, clone 1A4, dilution 1:500; DakoCytomation, Glostrup, Denmark). The presence of thrombi, lymphatic infiltration, formation of neointima, and integrity of the endothelial layer was also analysed.

Stereological analysis. Following the stereological principles, we quantified the area proportion of elastin-, collagen-, and actin-positive vascular smooth muscle cells within the venous wall. This was achieved using the point counting method in Stereologer software (Stereology Resource Center, Inc., Chester, MD, USA). These methods were previously established for quantitative histological assessment of the composition of vascular wall (20-22). For the quantification, we firstly took systematic uniform pictures (Nikon Eclipse Ti, obj. 20x, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA) of the region of interest of each native vein and placed a point grid over the photographs. Then, we counted the number of points hitting the structures of interest and divided this number with the

number of points of the grid over the image. The result was the percentage of a proportion of quantified parameter.

Computer simulations. For the assessment of pre- and post-operative portal haemodynamics, vessel reconstructions from 10 experimental animals were selected: five from the PV group (PV-9 to PV-13) and five from the IVC group (IVC-9 to IVC-13). Note that not all animals from the experimental group were included in the computer simulations due to the large amount of data required and the difficulties associated with the preparation of simulation models. All vein models used for the computer simulation (30 in total: 10 pre-operative, 10 post-operative, and 10 adapted) were reconstructed on the basis of real vein geometries obtained from perioperative measurements and photographs taken before and after the PV reconstruction. The mathematical description of the hepatopetal portal venous flow with small fluctuations related to cardiac activity was based on incompressible Navier–Stokes equations, with blood modelled as a Newtonian fluid. The flow model was numerically solved together with appropriate initial and boundary conditions (23) by means of the cell-centred finite-volume method (24). Fully developed inlet flows simulated in the SMV and LV were based on velocity values measured by Doppler ultrasonography in one of the animals (IVC-12) and used throughout the haemodynamic study as a reference. In other words, SMV and LV velocities prescribed in the venous models of the other animals were proportional to the values found in the IVC-12 animal. This step was taken with the intent to make correlations between each venous model and also to draw general conclusions independently of the haemodynamics of each animal.

Haemodynamic parameters. Beside the usual visualisation of simulated pre- and post-operative results in the form of time average velocity magnitude (TAVM), our aim was to quantify the shear stimulation of vascular wall and to associate its abnormal magnitude with areas susceptible to thrombosis. For this purpose, we used the haemodynamic parameter known as the time-averaged wall shear stress (TAWSS) to describe the time-averaged viscous stress exerted on the endothelium by streaming blood. Note that both low and high TAWSS values are indicators of disturbed haemodynamics and are often denoted as triggers of morphological changes or a primary cause of endothelial injury (12, 25). Another marker of disturbed blood flow, prone to thrombus formation due to enhanced blood cell deposition and aggregation, is the relative residence time (RRT) defined by Himburg *et al.* (26). Because the calculation of particle residence time according to RRT is limited to the immediate vicinity of vascular walls, it was appropriate to introduce another quantity that is able to circumvent this inconvenience and provide an aggregation indicator for the entire vessel. The principle of the technique is to virtually inject the entire vascular model with an ‘ink’ of a given initial concentration C and to monitor its gradual decrease with time as the ink is washed away. The residence time (RTc) value within a certain part of the vessel then corresponds to the time it took the ink concentration to drop below a critical value C_{crit} . On this basis, it is easy to identify stagnation or low-velocity zones, where the blood cells would show a tendency to deposit and aggregate, thereby increasing the thrombosis risk.

Statistical analysis. Biochemical parameters and results of computational modelling were analysed with respect to group (factor) and measurement time point (level of repeated

measurement) using repeated-measures ANOVA. Since the follow-up measurements of vessel diameters and blood flow included a substantial amount of missing data, repeated-measures ANOVA was not suitable for these and the following approach was used instead. Firstly, in order to assess overall differences between experimental groups over all measurement points, the measured values of each variable were converted into z-scores for each day, these z-scores were then merged and the difference in z-scores between groups was then tested using Mann–Whitney U -test. Secondly, in order to evaluate the time progression of the variables, the variable values were converted into z-scores for all available data points for each pig, the z-scores were merged and their development throughout the time points was analyzed using Kruskal–Wallis ANOVA (looking for significantly non-uniform distribution) and Spearman correlation (looking for consistent increasing or decreasing trends). The time trends were assessed both in the whole sample and in the individual groups. Differences in quantitative histological findings were analyzed using Mann–Whitney U and Wilcoxon signed-rank tests. To determine whether the graft types differed in the change of quantitative histological findings between the native and adapted states, two-way ANOVA with interactions was performed and the significance of the interaction factor was assessed. All reported p -values are two-tailed and the level of statistical significance was set at $\alpha=0.05$. Statistical processing and testing were performed using STATISTICA data analysis software system (Version 12; StatSoft, Inc, 2013; www.statsoft.com).

Results

Postoperative complications. PD with PV reconstruction using allogeneic venous graft from PV or IVC was performed in 26 animals in total. Nineteen animals survived the whole experiment (eight in the PV group, 11 in the IVC group). Seven animals died prematurely because of perioperative or postoperative complications (five in the PV group, two in the IVC group). Two animals died due to thrombosis of extrahepatic part of PV (one in the PV group immediately after the operation, one in the IVC group on the first postoperative day). The other causes of death were as follows: metabolic failure (two in the PV group on the first and second postoperative days), postoperative bleeding in retroperitoneum (one in the IVC group on the first postoperative day), gastrectasia (one in the PV group on the 18th postoperative day), and pancreatic pseudocyst (one in the PV group on the 12th postoperative day).

PV thrombosis. Altogether the thrombosis of the extrahepatic part of the PV was noted in five cases (four in the PV group, one in the IVC group, 19.2% in total) but only two cases caused death (mentioned above).

Vessel size and blood flow. The results of parameters of portal system measured with Doppler ultrasonography are presented in Figure 1. Only parameters for which values were significantly different between groups or which showed significant trends are presented.

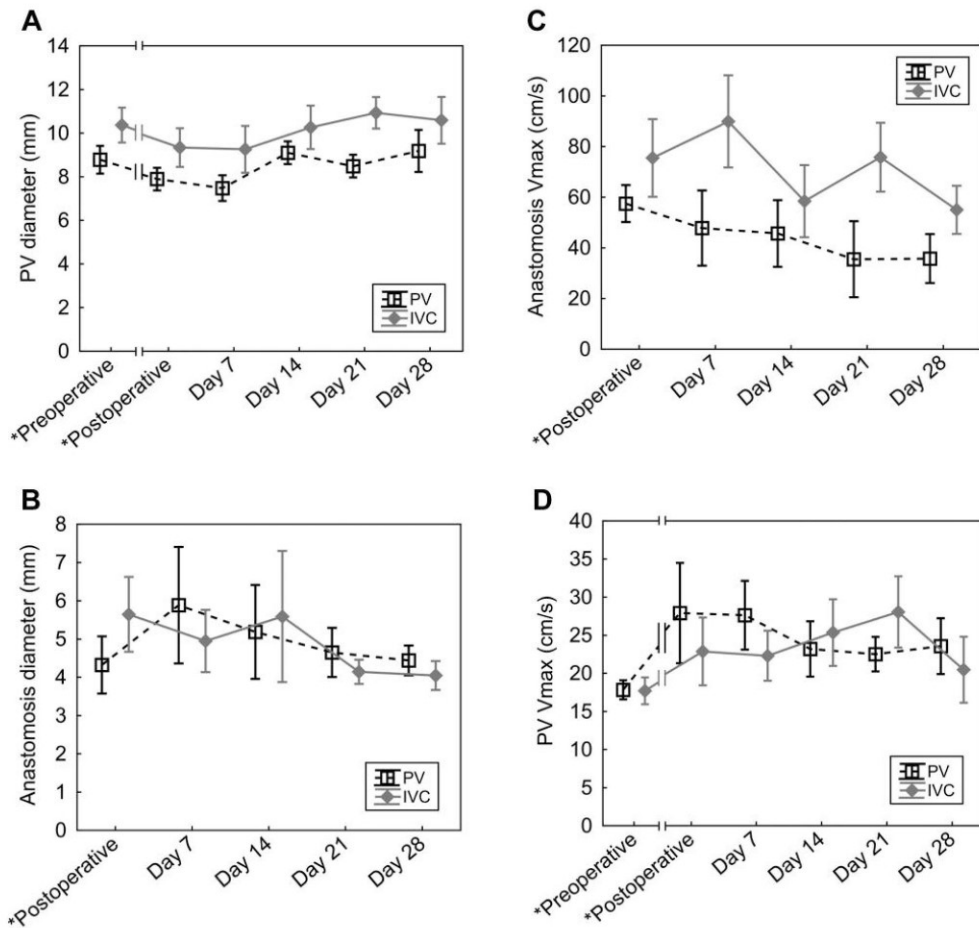


Figure 1. Results of Doppler ultrasonography measurement. A: The diameter of portal vein (PV) was higher in the PV group compared to the inferior vena caval (IVC) group throughout the experiment ($p<0.05$). The time course was similar for both groups. B: There was a significant trend for narrowing of the anastomosis in the IVC group during the postoperative period ($p<0.05$). Note the different course in the PV group, where the diameter increased during the first postoperative week. C: The blood flow velocity in the area of anastomosis was higher in the IVC group compared to the PV group ($p<0.05$). D: Both groups showed a significant increase of blood flow velocity in PV distally to the graft after the graft interposition ($p<0.05$). Data are the mean \pm SEM. *Immediately.

Graft length. The length of interposed graft was different between individual animals (range=14 to 43 mm; mean=25.3 mm) but it was equally distributed throughout the experimental groups (PV group: range=20-43 mm; mean=26.2 mm; IVC group: range=14-40 mm; mean=24.4 mm). Perioperative measurements revealed PV grafts to be of larger diameter

(range=12-16 mm, mean=14.2 mm) when compared to IVC grafts (range=9-12 mm, mean 11 mm) ($p<0.05$) (Figure 2).

Biochemical markers. The course of levels of biochemical markers in perioperative and postoperative period are presented in Figure 3.

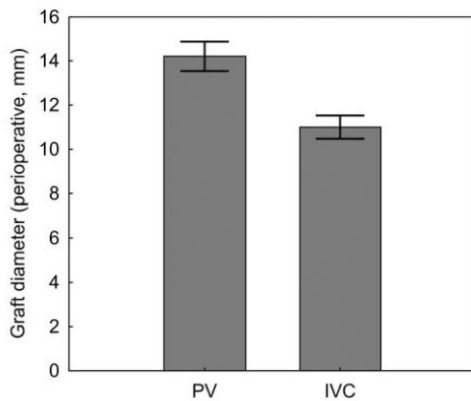


Figure 2. Comparison of the portal vein (PV) and inferior vena caval (IVC) graft diameter measured immediately after its interposition. Data are the mean \pm SEM.

Histology. Quantitative histological analysis showed significant differences in the structure of the wall of native PV graft and native IVC graft. The wall of PV grafts before the implantation contained a continuous layer of vascular smooth muscle cells which were absent from the wall of IVC grafts (Figure 4). In agreement with this, the proportion of actin-positive cells was greater in native PV grafts compared to native IVC grafts ($p < 0.05$; Figure 5A). On the other hand, native IVC grafts had a greater proportion of collagen I and III fibres compared to the native PV grafts ($p < 0.01$; Figure 5B). The proportion of elastic fibres did not significantly vary between both types of native grafts ($p = 0.35$; Figure 5C). We did not observe any significant histological differences between the two types of implanted grafts after their explantation at the end of the experiment, which demonstrates efficient adaptation of the graft to the implantation site (Figure 5). Related to this, a comparison of the structure of the IVC graft before and after the implantation revealed a significant decrease in the proportion of elastic fibres in transplanted grafts ($p < 0.01$; Figure 5C), as well as a greater proportion of contractile cells; nevertheless, the proportion of actin-positive cells was not significantly different (Figure 5A). Transplanted PV grafts lost stratification of smooth muscle layer and showed smaller proportion of actin-positive cells when compared to native PV grafts ($p < 0.01$; Figure 5A). The decrease of the proportion of elastic fibres in PV grafts was not significant ($p = 0.13$; Figure 5C).

Additional histological changes of the implanted grafts that developed during the 4 weeks of remodelling are shown in Figure 6. Both PV and IVC grafts developed

thickening of the wall during the remodelling process. In both graft groups, we observed formation of granulation tissue pervaded with smooth-muscle actin-positive contractile cells with formation of micro-vessels, occasionally accompanied by foreign-bodies giant cells. We also detected inflammatory infiltration and proliferation of intima with neointimal hyperplasia. The endothelial layer was preserved to a vastly variable extent, from no endothelial cells detected to a continuous endothelial line. At the end of the experiment, we did not observe a homogeneous layer of contractile cells in either of the groups. The only region-specific stratification was observed at a distance of 600 μ m from the lumen, where in most of the grafts, a layer of thick elastic fibres was preserved. On the top of this, we identified occlusive thrombi showing signs of organisation and recanalization in several samples. To sum up, for both types of the grafts, the wall was predominantly formed of collagen type I and III, remnants of elastin, and partially organised granulation tissue with interposed contractile cells (smooth-muscle actin-positive cells) (Figure 6).

Computer simulations. Numerical results of computer simulations showing TAVM, TAWSS and RRT are depicted in Figure 7, and show that a change in vessel geometry caused by an interposed graft can have a significant impact on the downstream PV haemodynamic. In all simulated models, the inflow from SMV proved to be dominant compared to the inflow from LV and, thus, played an important role in the resulting blood flow in and after the venous graft. Areas of blood stagnation or recirculation were identified especially in the case of vessels with large-diameter grafts, and also in models where the PV line significantly deviated from the direction given by SMV, resulting in a peak velocity skewed towards the wall at the site of the LV inflow (as an example, see results of PV-10 animal in Figure 7A). This peak velocity was heading the area of the graft when longer grafts were used (Figure 7A). In the case of short grafts, the peak velocity was oriented to the area of anastomosis (Figure 7B). The presence of anastomoses was usually accompanied by an increase in TAVM, as is apparent from the model IVC-9 (Figure 7B). According to the 'virtual ink' technique, the highest RTc, which can identify sites with a tendency for blood stagnation, was observed within graft regions, usually near the walls opposite the deflected main stream (at the site opposite the LV inflow) and in large-diameter grafts (Figure 8). Regarding abnormally high shear stress stimulation, which can lead to blood cell damage and trigger thrombosis, very high TAWSS values were particularly noted in areas of both anastomoses and partly downstream from the interposed graft (Figure 7).

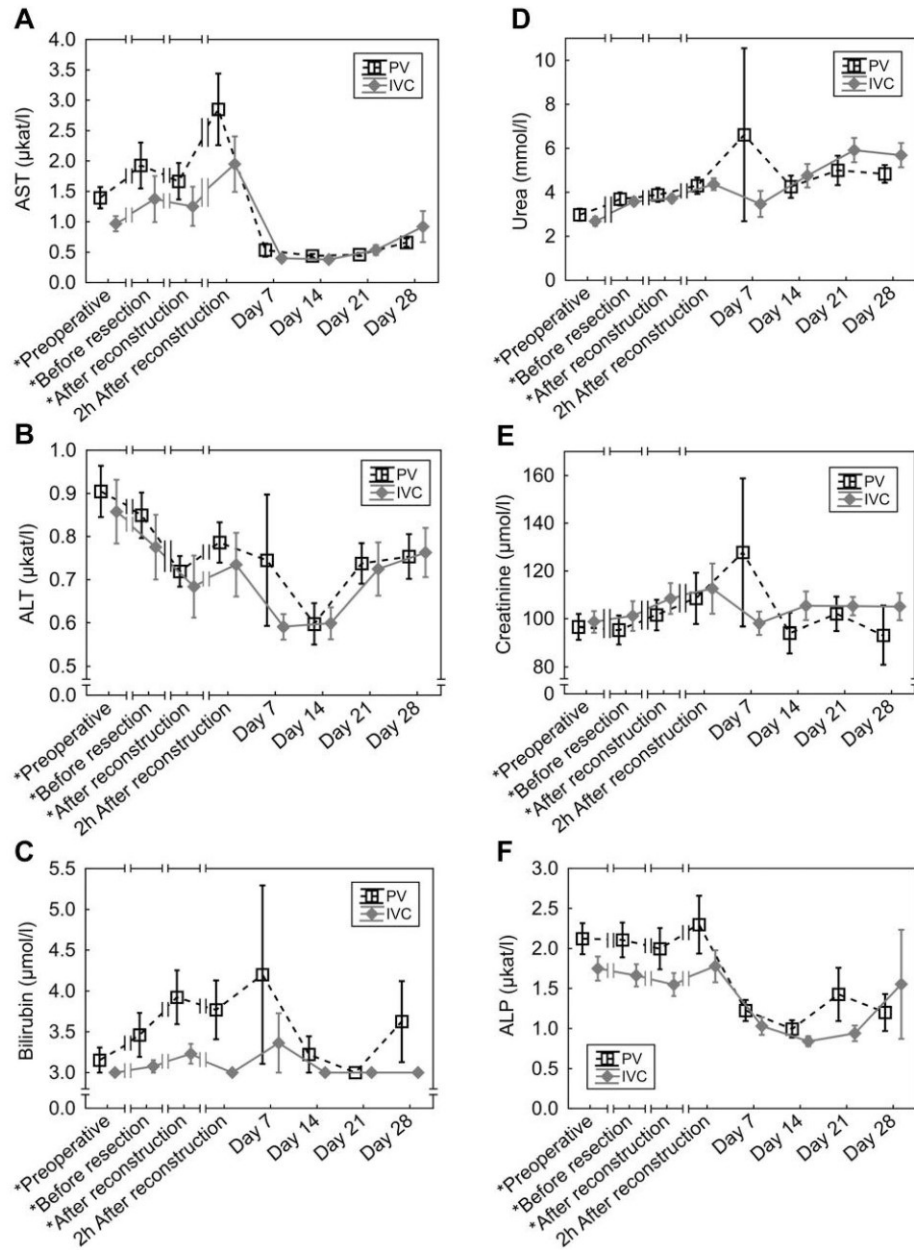


Figure 3. Continued

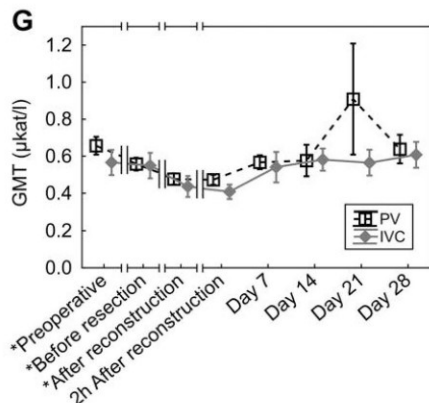


Figure 3. Liver and renal biochemical markers in serum. A: Biochemical analysis revealed elevation of aspartate aminotransferase (AST) concentration in the perioperative period with peak levels at 2 hours after PV reconstruction in both groups. This AST elevation diminished during the postoperative period. B: Serum level of alanine aminotransferase (ALT) slightly decreased in the postoperative period in both groups. C: The serum level of bilirubin was negligibly higher in the PV group perioperatively. D: The level of urea had a tendency to increase but it remained within the normal reference range. E-G: Serum levels of creatinine, alkaline phosphatase (ALP) and γ -glutamyltransferase (GMT) did not show any impairment of the liver or renal functions during the postoperative period; considering the values of these biochemical markers there were not any significant differences between PV group and IVC group at the individual time points or together for whole period of follow-up. Data are the mean \pm SEM. *Immediately.

Quantification. Quantitative comparison of TAVM, TAWSS, RRT and RTc values of both experimental groups did not reveal any significant differences (data not presented). However, the value of RRT in the PV group increased after graft implantation and decreased in the IVC group. All the aforementioned parameters were also evaluated in relation to the length of the interposed graft to clarify whether the length itself might influence PV haemodynamics, and thus enhance the risk of thrombosis. According to these evaluations, longer grafts were usually associated with more noticeable decrease in TAWSS when comparing postoperative and adapted states of the PV reconstructions.

Discussion

Due to a low survival rate in patients with pancreatic cancer that is often related to late diagnosis (1, 3), there is an urgent need to develop more efficient strategies for tumour resection and suitable reconstruction of involved vessels. We addressed this issue by establishing a pig model of PD followed by PV

reconstruction using cadaveric allogeneic grafts. By choosing a large animal model we aimed to imitate a standard clinical PD as much as possible to include all factors which potentially involve the PV reconstruction itself.

We evaluated two different types of cadaveric allogeneic venous grafts originating from PV and IVC in terms of their suitability for PV reconstruction.

There is no reference to usage of allogeneic grafts of PV itself for PV reconstruction after PD, only allogeneic venous grafts of iliac or femoral veins were mentioned (13-15). According to the literature, this is the first report of an established large animal surviving a model of pancreaticoduodenectomy with PV reconstruction.

Histology and physiology. To our knowledge, no study comparing the microscopic structure of the porcine or human PV and IVC has been published. Brown *et al.* reported a higher collagen content in the wall of IVC compared to the PV in rabbit (12). They also demonstrated correlation between histological findings and functional differences of PV and IVC. PV showed greater capacitance compared to IVC, which allows PV to adapt to the varied needs of the portal circuit. The collagen fibres are probably responsible for greater tension of the IVC wall compared to the more flexible PV (12). In our study, we also observed a greater proportion of collagen in the wall of native IVC compared to that of native PV.

Studies of canine veins showed more smooth muscle cells in the wall of PV compared to other large veins (27, 28). In the case of porcine IVC, only a small amount of smooth muscle was observed (29). Our results correlate with these findings. The smooth muscle cells were present in coherent layer in native PV and they were practically lacking from the wall of native IVC in our study. Brown *et al.* noted stronger vasoconstriction of PV after noradrenaline administration and more noticeable vasodilatation after removal of calcium compared to IVC. This effect is probably caused by the different wall structure of PV and IVC (higher content of collagen fibres in IVC and more smooth muscle cells in PV) (12).

The ability of greater volume changes of PV according to neurohumoral stimuli might explain the larger diameter of PV grafts immediately after the reconstruction in comparison with IVC grafts. This might potentially be caused by smooth muscle relaxation due to storing of the grafts in saline after harvesting. We also hypothesise that the structure of PV graft wall may cause the dilation of the anastomosis during the first postoperative week which was not observed in the IVC group. However, for verification of this hypothesis, further experimentation would be required.

During the 4-week postoperative period, the PV graft lost stratification of the smooth muscle layer and the smooth muscle actin content significantly decreased. This finding corresponds with the experiment of Yan *et al.* who studied syngeneic and allogeneic PV transplantation in mice (30). They observed destruction and complete substitution of the

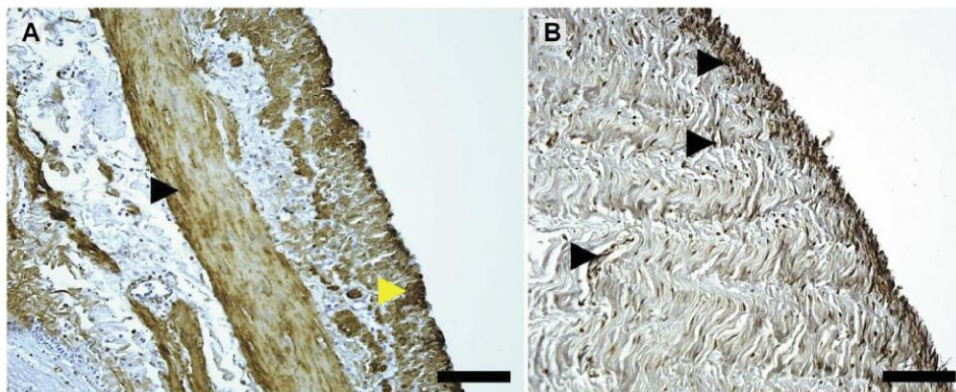


Figure 4. Native portal vein graft (A) and inferior vena caval graft (B) before the implantation. A: Lumen is on the right. In the vein wall, the individual layers were not unambiguously distinguishable. However, there was a continuous layer of smooth muscle actin (SMA)-positive cells in the wall of portal vein graft before implantation (black arrowhead), and smooth muscle actin-positive cells were also present sub-endothelially (yellow arrowhead). B: Lumen is on the right. In the wall of the inferior vena cava graft, the SMA-positive cells did not form a distinct layer (arrowheads). Immunohistochemical staining (monoclonal mouse anti-human SMA), scale bar=100 μ m.

muscular layer in allogeneic PV graft at 4 weeks after implantation. He explains this change as a result of graft rejection because these changes were not observed in syngeneic grafts nor in the group of mice treated with immunosuppressive agent. Yan *et al.* observed increase of the wall thickness of the PV allografts between the second and fourth postoperative week (30). Our results also correlate with their findings. We observed thickening of the wall of PV grafts as well as IVC grafts in the 4 weeks after implantation. However, we did not specifically evaluate potential rejection.

The proportion of contractile cells increased slightly in IVC grafts after implantation in our study; however, the proportion of actin-positive cells was not significantly higher. In the case of vein segments grafted into arteries, thickening of the tunica media, growth of smooth muscle, and intimal hyperplasia are described. These changes are caused by mechanical stimuli. According to experiments on dogs, intimal hyperplasia is associated with low flow velocity, and low blood–artery shear stress. The thickening of the tunica media is associated with increased deformation of the vein wall in the circumferential direction (31). Predel *et al.* in their *in vitro* study noted proliferation of smooth muscle cells from saphenous vein exposed to cyclic mechanical stretch, whereas such proliferation did not occur in the case of smooth muscle cells from internal mammary artery (32). It is possible that the proliferation of contractile cells in the IVC graft implanted in the PV in this study was triggered by mechanical stimuli, which should be different in caval circulation and portal circulation (11, 12).

Another of the observed differences was a significant decrease of the elastin proportion in the IVC grafts. The degradation of collagen and elastin during vein graft adaptation was described in other studies and is caused by mechanical stimuli and oxidative stress (33). We hypothesize that the decrease in the proportion of elastin in the IVC group is a result of changed mechanical stimuli after the transposition of a part of the IVC in the portal system with different haemodynamic properties.

Biochemical markers. The elevation of AST during the perioperative period, with a peak at 2 hours after PV reconstruction might have been caused by general anesthesia in combination with perioperative manipulation and later temporary occlusion of PV during the reconstruction (34). The levels of the other markers remained within the normal reference range. Because there were no significant differences in the observed biochemical markers between the PV and IVC group, it is apparent that the type of graft did not influence liver or renal function.

Computer simulations. To the best of our knowledge, the use of computer simulations has not been previously reported for the study of PV haemodynamics in an experimental animal model. In the past, values of WSS in portal circulation were studied by Wei *et al.* in cirrhotic patients with PV hypertension (35), using geometrical models of PV prepared according to computed tomographic images. The authors observed lower values of WSS in patients with portal

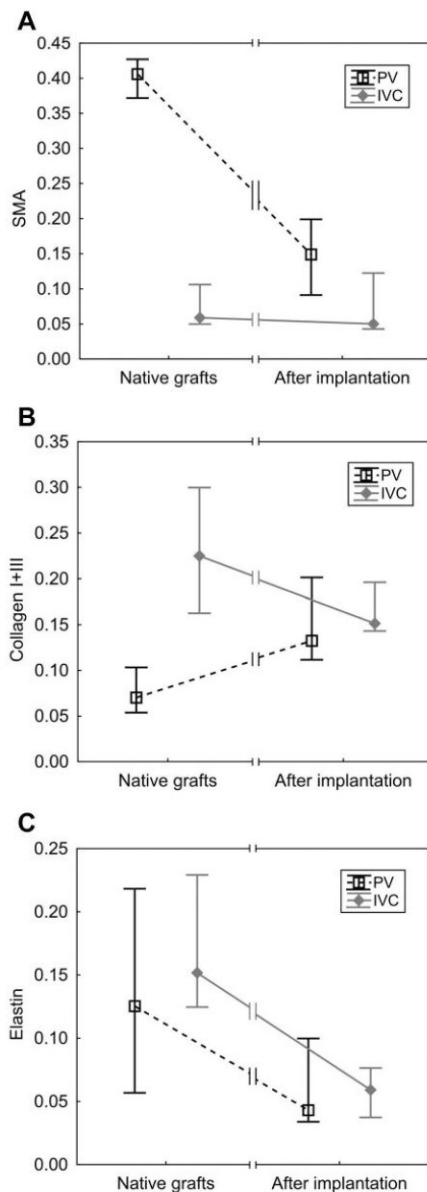


Figure 5. Quantitative analysis of the percentage of staining for smooth muscle actin (SMA) (A), collagen (B) and elastic fibres (C) by area in both types of grafts before and 4 weeks after implantation. See detailed description in the Results section. Data are the median \pm interquartile range.

hypertension and noted an influence of the angle between the LV and PV or SMV (34) on the downstream distribution of shear stress. By contrast in our study, these angles did not have a major impact on the resulting PV haemodynamics. This finding can be explained by the fact that in our case, the values of blood flow velocity measured in LV were significantly lower than those in PV and SMV (the peak velocity in LV was usually 10-times lower) as opposed to the values considered in the study by Wei *et al.* (35), where the difference between the blood flow velocity in LV and PV was minimal.

Influence of anatomic conditions. Furthermore, compared to the aforementioned study and also as a consequence of the dominant SMV flow, our results revealed an influence of the angle between PV and SMV on the downstream haemodynamics (both veins with comparable values of blood flow velocity). In cases when the PV significantly deviated from the direction given by the SMV, the downstream peak velocity had a tendency to shift towards the wall at the site of LV inflow, while the vicinity of the wall opposite the LV inflow was filled with a large recirculation zone.

Influence of graft diameter. Generally speaking, areas of blood stagnation or recirculation were observed to be more common in PVs with interposed grafts of a larger diameter. In our study, the diameter of PV grafts was significantly larger compared to that of IVC grafts immediately after the reconstruction, corresponding to the models simulating the postoperative state. Moreover, the RRT increased in the PV group and decreased in the IVC group after graft implantation. Thus, it can be assumed that the use of PV grafts would probably be associated with a higher risk of thrombosis. This observation seems to be in agreement with the clinical findings, namely, that four out of five thromboses occurred in the PV group.

Influence of graft length. The more noticeable decrease of TAWSS in longer grafts when comparing the postoperative and adapted states might indicate lower risk of thrombosis in these grafts. Usage of longer grafts seems to be reasonable in the case of more noticeable deviation of the PV vein from the direction of SMV. In such a situation, the peak velocity is heading towards the area of the graft, while in the case of a short graft, the peak velocity is oriented to the area of anastomosis, with higher risk of endothelial injury induced by mechanical stress.

Correlation with clinical finding. Other areas susceptible to blood stagnation were identified within graft regions, mainly near the walls opposite the LV and the deflected main stream. This is also in accordance with the clinical findings. The thrombi which developed in reconstructed PVs were

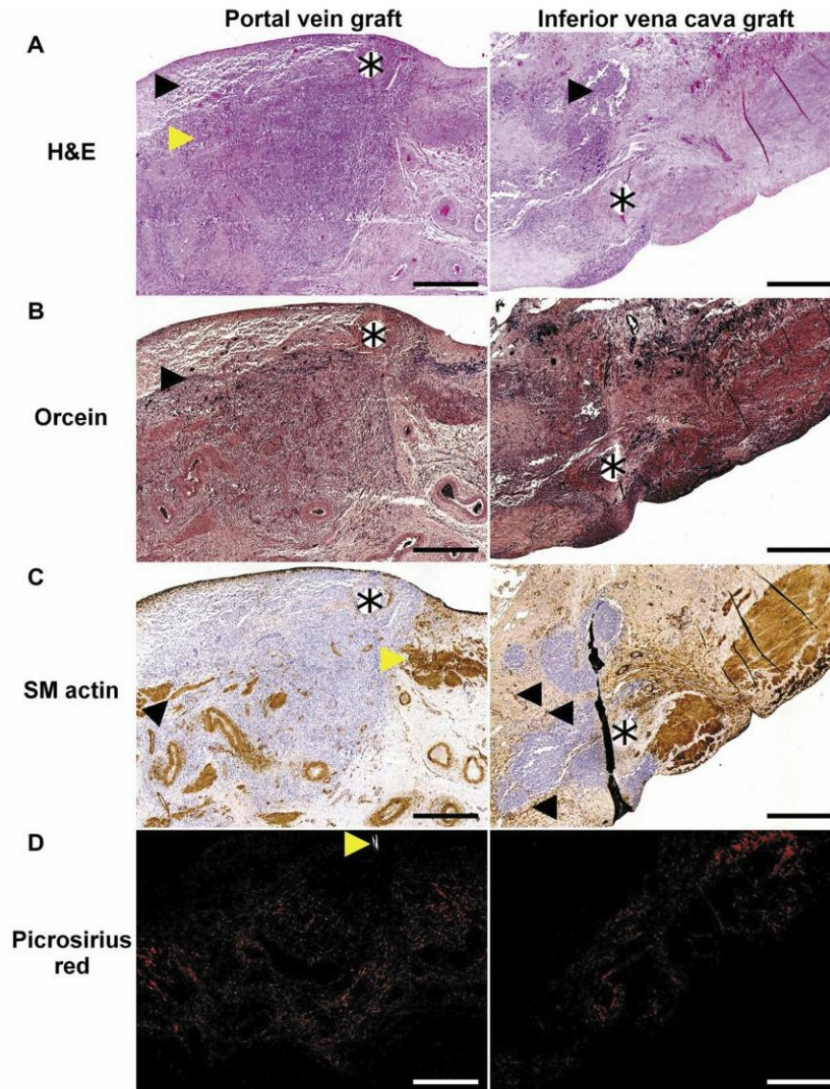


Figure 6. Portal vein (PV) graft and inferior vena caval (IVC) graft 4 weeks after implantation. The graft is on the left and the native vein is on the right of the stitch hole (asterisk). A: Hematoxylin and eosin (H&E) staining. On the left of the stitch hole (asterisk), proliferation of intima (black arrowhead) and granulation tissue (yellow arrowhead) are visible in the PV graft. Large inflammatory foci (black arrowhead) were visible in the wall of the IVC graft. B: Left: Orcein staining of elastic fibres. Forming of the elastic layer of thick elastic bundles (black arrowhead) is visible at approximately 600 μm from the lumen. C: Left: Smooth muscle actin (SMA). Note the remodelling of the original smooth-muscle layer of vena portae (yellow arrowhead) in the PV graft (black arrowhead). In the vein graft, the smooth-muscle actin-positive structures (black arrowheads) were scattered among other components of the graft wall. Large inflammatory foci (black arrowhead) were visible in the wall of the vein graft. D: Under fluorescence microscopy, compare the proportion of collagen type I and III between the specimens. There was no statistically significant difference. Yellow arrowhead in D indicates an artefact within the stitch hole. Scale bar=500 μm .

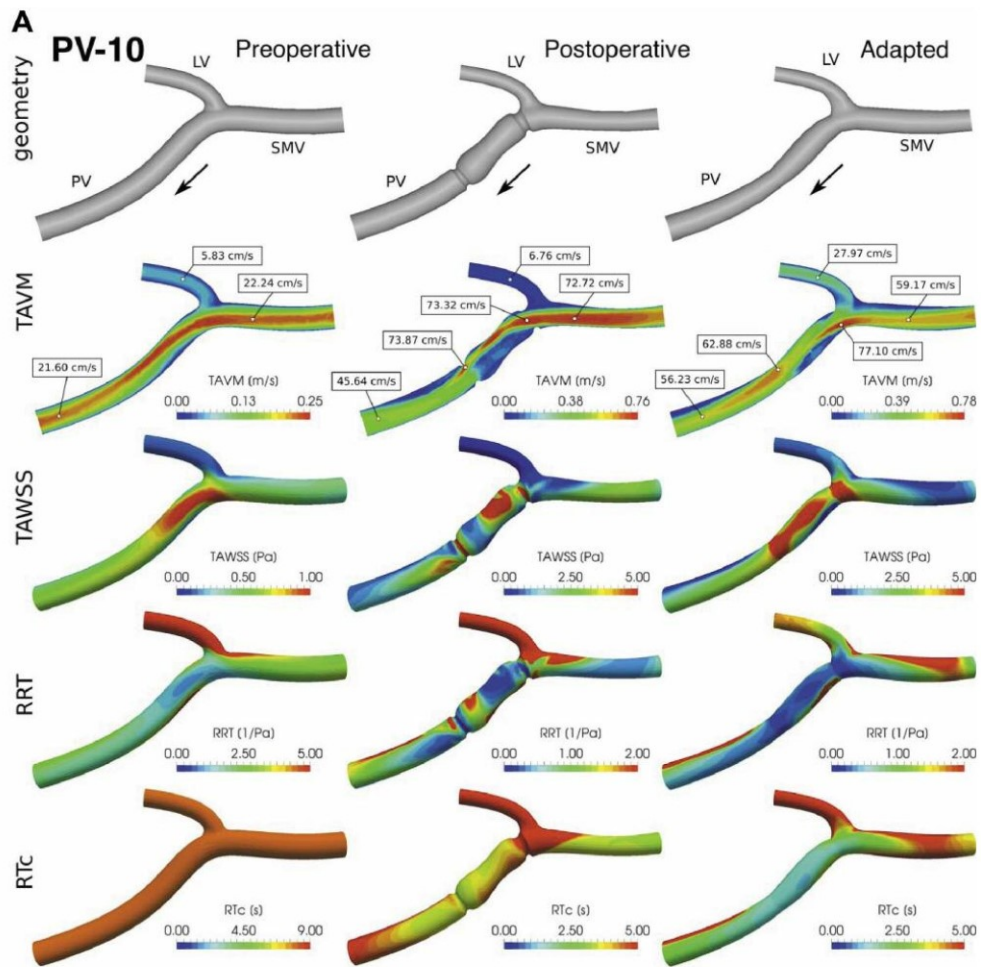


Figure 7. Continued

always located, at least by part of their volume, in the area of the interposed graft.

Possible limitation of computer simulations. The weak point of the haemodynamic evaluation in this experiment may be the planar three-dimensional geometrical model reconstructed on the basis of perioperative measurements and photographs. Computed tomography can provide data for out-of-plane three-dimensional geometrical models in future experiments.

Thrombosis in the PV group. Another reason for a higher incidence of thrombosis in the PV group might be a difference in mechanical properties of the grafts. It was subjectively easier to work with the graft of IVC, which had tougher wall and, as such, it was effortless to perform a technically correct anastomosis with minimal risk of folding of the graft wall that would cause exposure of adhesive molecules of the outer part of vessel wall into the vessel lumen and, consequently, trigger thrombosis (36).

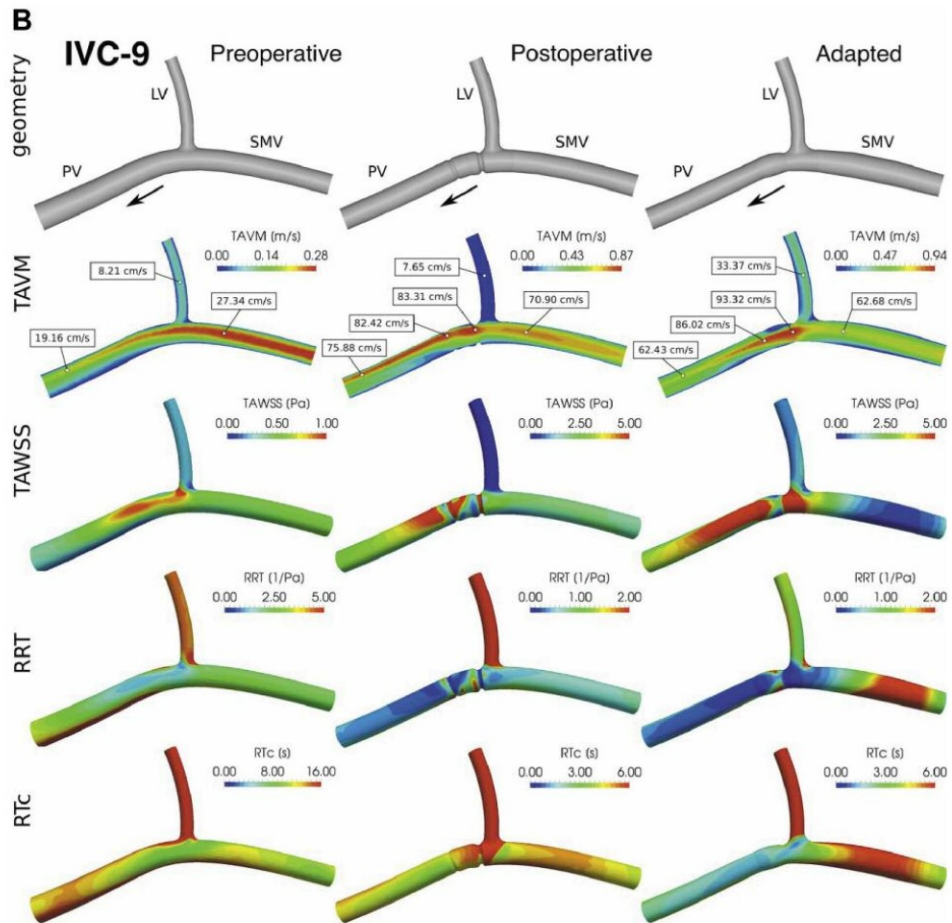


Figure 7. Vessel geometries and computer simulation results for portal vein (PV) reconstruction animal PV-10 from the PV group (A) and IVC-9 from the inferior vena caval group (B). For detailed description please see the text.

PV thrombosis in clinical medicine. The thrombosis rate of 19.2% in this study concurs with the incidence of thrombosis after PV reconstruction after PD using interposition autologous venous grafts in clinical medicine, which varied between 9.1% and 36.8% (37, 38).

Conclusion

To the best of our knowledge, this is the first publication on a large animal experiment studying PV reconstruction

after PD using allogeneic venous grafts and the first concerning computer simulation of haemodynamics in reconstructed PV. Histological analysis showed differences in the wall morphology of PV and IVC in the Fig. However, both types of grafts (PV and IVC) developed morphological changes during the 4 weeks after implantation, as they seem to adapt, showing comparable structure at the end of the experiment. Computer simulations based on Doppler ultrasound data demonstrated a significant impact of PV reconstruction on PV

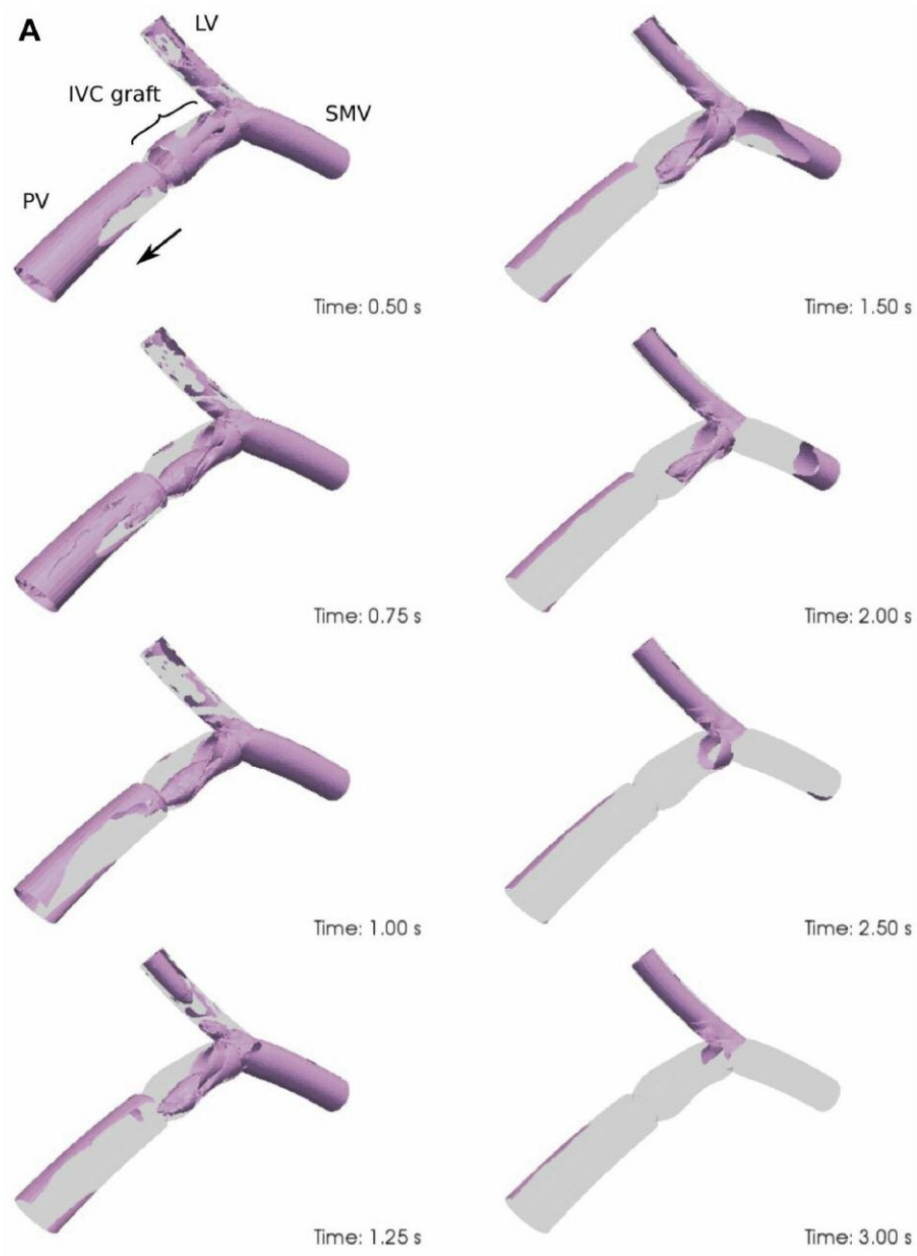


Figure 8. *Continued*

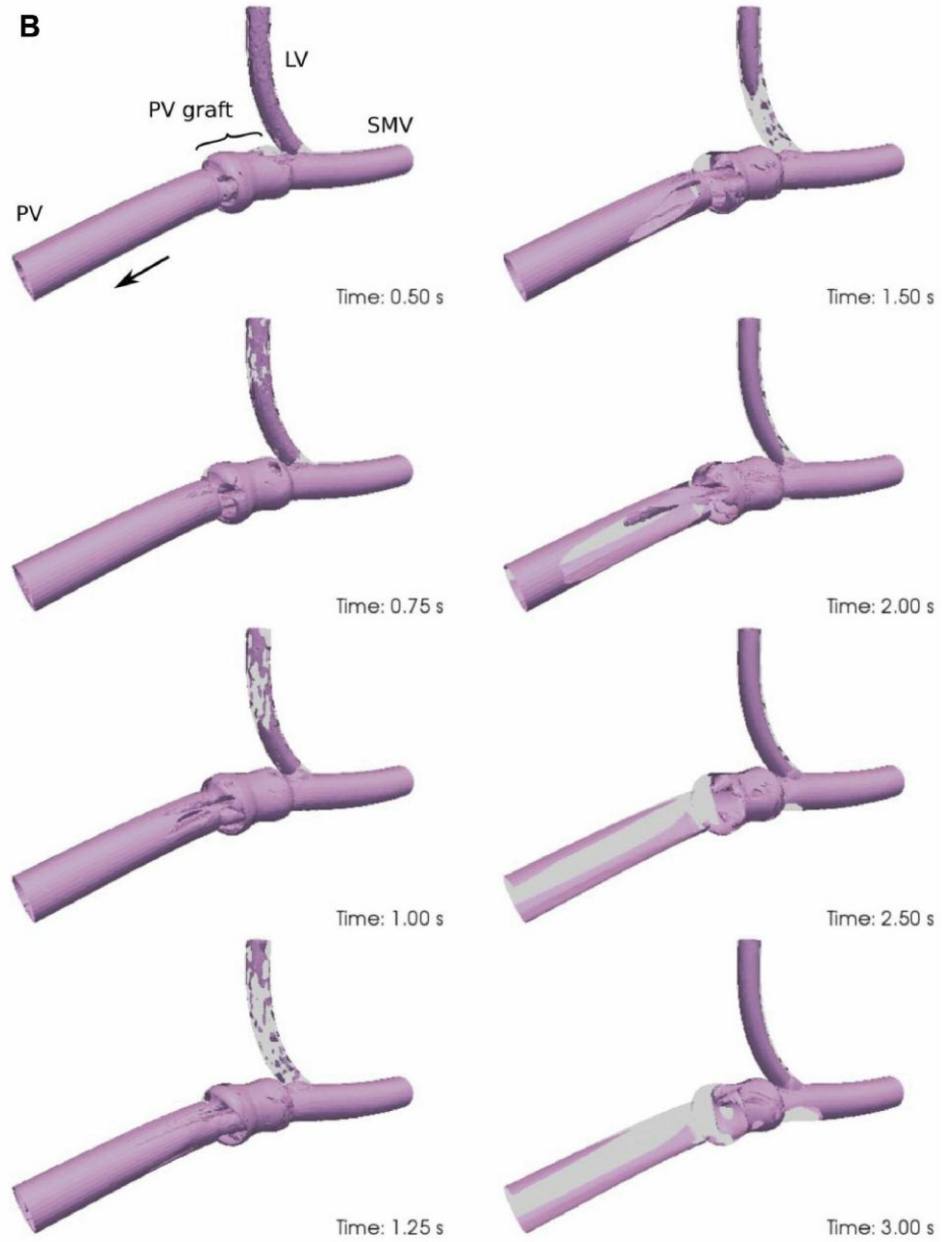


Figure 8. *Continued*

6617

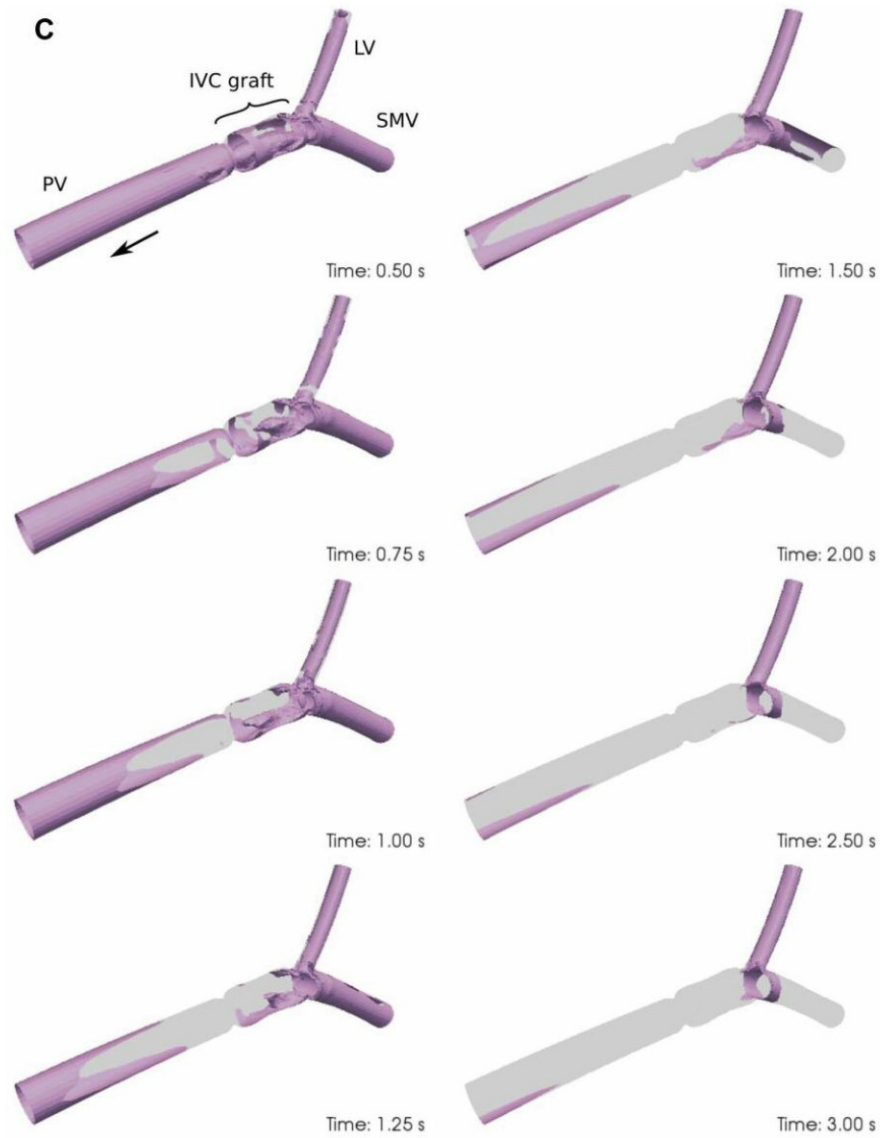


Figure 8. Computer visualization of blood stagnation in the vessel system obtained by 'virtual ink' technique. Calculation of the residence times (RTc) is shown for three animals: IVC-10 from the inferior vena caval group (A), PV-12 from the portal vein (PV) group (B), and IVC-12 from the inferior vena caval group (C). Areas with the tendency for blood retention (i.e. with the highest RTc values) were observed within graft regions, usually near the walls opposite the deflected main stream (at the opposite site to the lineal vein (LV) inflow) (A). The RTc was higher within grafts with larger diameter (B) compared to grafts with smaller diameter corresponding to the PV diameter (C). Note that higher RTc values observed in the LV were a result of blood flow simulated in this vein (i.e. compared to PV and superior mesenteric vein (SMV) flows, the peak velocity in LV was usually 10-times lower, and thus a longer time was required for the virtual ink to completely leave the vein).

haemodynamics and demonstrated a higher risk of PV thrombosis in animals with implanted PV graft compared to those with IVC graft. PV thrombosis really occurred more often in the PV group (four cases) compared to the IVC group (one case). This study supports the use of allogeneic venous grafts from the caval system for PV reconstruction in clinical medicine when needed. If possible, individual vessel geometries and appropriate graft lengths should be considered during PV reconstruction with interposition graft.

Conflicts of Interest

None.

Authors' Contributions

Richard Palek: Corresponding author, performance of the animal experiment (operation, postoperative follow-up), methodology, data collection, data analysis, data curation, writing: original draft, review. Alena Jonasova: Performance of the computer simulations, data analysis, investigation, methodology. Jan Vimr: Methodology, supervision, validation. Jachym Rosendorf: performance of the animal experiment (operation, postoperative follow-up), data collection, data analysis. Patrik Mik: Methodology, investigation, performance of the histology examination. Zbynek Tonar: Supervision, validation. Kristyna Bajcurova: Performance and evaluation of the ultrasound examinations, data collection. Petr Hosek: data analysis, data curation, performance of the statistical analysis. Vladimira Moulisova: Investigation, writing, editing. Lada Eberlova: Supervision, validation, investigation. Lenka Haidingerova: Methodology, performance of the animal anaesthesia. Ondrej Brzon: Methodology, performance of the animal anaesthesia. Lukas Bednar: Methodology, performance of the animal experiment (operation, postoperative follow-up). Tomas Kriz: Methodology, performance of the animal experiment (operation, postoperative follow-up). Martin Dolansky: Methodology, performance of the animal experiment (operation, postoperative follow-up). Vladislav Treska: Supervision, methodology, resources. Vaclav Liska: Corresponding author, validation, supervision, investigation, methodology, funding acquisition, performance of the animal experiment (operation).

Acknowledgements

The project was supported by grant LO1503 (National Sustainability Program I of the Ministry of Education Youth and Sports of the Czech Republic), UNCE/MED/006 Charles University – Center of clinical and experimental liver surgery and from European Regional Development Fund-Project „Application of Modern Technologies in Medicine and Industry” (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007280).

References

- Ilic M and Ilic I: Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 22(44): 9694-9705, 2016. PMID: 27956793. DOI: 10.3748/wjg.v22.i44.9694
- Mohammed S, Van Buren G and Fischer WE: Pancreatic cancer: Advances in treatment. *World J Gastroenterol* 20(28): 9354-9360, 2014. PMID: 25071330. DOI: 10.3748/wjg.v20.i28.9354
- Muñoz AR, Chakravarthy D, Gong J, Halff GA, Ghosh R and Kumar AP: Pancreatic cancer: Current status and Challenges. *Curr Pharmacol Rep* 3(6): 396-408, 2017. PMID: 29404265. DOI: 10.1007/s40495-017-0112-3
- D'Haese JG and Werner J: Resektabilität des Pankreaskarzinoms: Neue Kriterien. *Radiologe* 56(4): 318-324, 2016. DOI: 10.1007/s00117-016-0092-z
- Bahra M and Neumann U: Surgical techniques for resectable pancreatic cancer. Recent results. *Cancer Res* 177: 29-38, 2008. PMID: 18084944. DOI: 10.1007/978-3-540-71279-4_4
- Bockhorn M, Burdelski C, Bogoevski D, Sgourakis G, Yekebas EF and Izbicki JR: Arterial en bloc resection for pancreatic carcinoma. *Br J Surg* 98(1): 86-92, 2011. PMID: 21136564. DOI: 10.1002/bjs.7270
- Ravikumar R, Sabin C, Abu Hilal M, Abu Hilal M, Bramhall S, White S, Wigmore S, Imber CJ and Fusai G: Portal vein resection in borderline resectable pancreatic cancer: a United Kingdom multicenter study. *J Am Coll Surg* 218(3): 401-411, 2014. DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2013.11.017
- Yoshitomi H, Kato A, Shimizu H, Ohtsuka M, Furukawa K, Takayashiki T, Kuboki S, Takano S, Okamura D, Suzuki D, Sakai N, Kagawa S and Miyazaki M: Tips and tricks of surgical technique for pancreatic cancer: portal vein resection and reconstruction (with videos). *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 21(9): E69-74, 2014. PMID: 24964060. DOI: 10.1002/jhbp.128
- Smoot RL, Christein JD and Farnell MB: Durability of portal venous reconstruction following resection during pancreaticoduodenectomy. *J Gastrointest Surg* 10: 1371-1375, 2006. PMID: 17175456. DOI: 10.1016/j.gassur.2006.09.001
- Hirono S, Kawai M, Tani M, Okada K, Miyazawa M, Shimizu A, Kitahata Y and Yamaue H: Indication for the use of an interposed graft during portal vein and/or superior mesenteric vein reconstruction in pancreatic resection based on perioperative outcomes. *Langenbecks Arch Surg* 399: 461-471, 2014. PMID: 24663295. DOI: 10.1007/s00423-014-1182-x
- Suk KT: Hepatic venous pressure gradient: Clinical use in chronic liver disease. *Clin Mol Hepatol* 20(1): 6, 2014. PMID: 24757653. DOI: 10.3350/cmh.2014.20.1.6
- Brown BP and Heistad DD: Capacitance of the rabbit portal vein and inferior vena cava. *J Physiol* 381: 417-425, 1986. PMID: 3625540. DOI: 10.1113/jphysiol.1986.sp016335
- Kleive D, Berstad AE, Sahakyan MA, Verbeke CS, Naper C, Haugvik SP, Gladhaug IP, Line PD and Labori KJ: Portal vein reconstruction using primary anastomosis or venous interposition allograft in pancreatic surgery. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord* 6(1): 66-74, 2018. PMID: 29128301. DOI: 10.1016/j.jvsv.2017.09.003
- Meniconi RL, Ettore GM, Vennarecci G, Lepiane P, Colasanti M, Laurenzi A, Colace L and Santoro R: Use of cold-stored vein allografts for venous reconstruction during pancreaticoduodenectomy. *J Gastrointest Surg* 17(7): 1233-1239, 2013. PMID: 23615805. DOI: 10.1007/s11605-013-2201-x
- Zhang XM, Fan H, Kou JT, Zhang XX, Li P, Dai Y and He Q: Resection of portal and/or superior mesenteric vein and reconstruction by using allogeneic vein for pT3 pancreatic cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 31(8): 1498-1503, 2016. PMID: 26825612. DOI: 10.1111/jgh.13299
- Gao W, Dai X, Dai C, Jiang K, Wu J, Li Q, Guo F, Chen J, Wei J, Lu Z, Tu M and Miao Y: Comparison of patency rates and clinical impact of different reconstruction methods following portal/superior mesenteric vein resection during pancreatotomy. *Pancreatol* 16(6): 1113-1123, 2016. PMID: 27707648. DOI: 10.1016/j.pan.2016.09.010

- 17 Chung I and Lip GY: Virchow's triad revisited: blood constituents. *Pathophysiol Haemost Thromb* 33(5-6): 449-454, 2003. PMID: 15692259. DOI: 10.1159/000083844
- 18 Malek AM, Alper SL and Izumo S: Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA* 282(21): 2035-2042, 1999. PMID: 10591386. DOI: 10.1001/jama.282.21.2035
- 19 Chiu JJ and Chien S: Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev* 91(1): 327-387, 2011. PMID: 21248169. DOI: 10.1152/physrev.00047.2009
- 20 Eberlova L, Tonar Z, Witter K, Krizkova V, Nedorost L, Korabecna M, Tolinger P, Kocova J, Boudova L, Treska V, Houdek K, Molacek J, Vrzalova J, Pesta M, Topolcan O and Valenta J: Asymptomatic abdominal aortic aneurysms show histological signs of progression: a quantitative histochemical analysis. *Pathobiology* 80: 11-23, 2013. PMID: 22797551. DOI: 10.1159/000339304
- 21 Tonar Z, Kubikova T, Prior C, Demjen E, Liška V, Kralickova M and Witter K: Segmental and age differences in the elastin network, collagen, and smooth muscle phenotype in the tunica media of the porcine aorta. *Ann Anat* 201: 79-90, 2015. PMID: 26232584. DOI: 10.1016/j.aanat.2015.05.005
- 22 Kubikova T, Kochova P, Brazdil J, Spatenka J, Burkert J, Kralickova M and Tonar Z: The composition and biomechanical properties of human cryopreserved aortas, pulmonary trunks, and aortic and pulmonary cusps. *Ann Anat* 212: 17-26, 2017. PMID: 28434910. DOI: 10.1016/j.aanat.2017.03.004
- 23 Vimmr J, Jonasova A and Bublik O: Effects of three geometrical parameters on pulsatile blood flow in complete idealised coronary bypasses. *Comput Fluids* 69: 147-171, 2012. DOI: 10.1016/j.compfluid.2012.08.007
- 24 Vimmr J, Jonasova A and Bublik O: Numerical analysis of non-Newtonian blood flow and wall shear stress in realistic single, double and triple aorto-coronary bypasses. *Int J Numer Method Biomed Eng* 29(10): 1057-1081, 2013. PMID: 23733715. DOI: 10.1002/cnm.2560
- 25 Buchanan JR, Kleinstreuer C and Comer JK: Rheological effects on pulsatile hemodynamics in a stenosed tube. *Comput Fluids* 29(6): 695-724, 2000. DOI: 10.1016/S0045-7930(99)00019-5
- 26 Himburg HA, Grzybowski DM, Hazel AL, LaMack JA, Li XM and Friedman MH: Spatial comparison between wall shear stress measures and porcine arterial endothelial permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286(5): H1916-H1922, 2004. PMID: 14715506. DOI: 10.1152/ajpheart.00897.2003
- 27 Brooksby GA and Donald DE: Dynamic changes in splanchnic blood flow and blood volume in dogs during activation of sympathetic nerves. *Circ Res* 29(3): 227-238, 1971. PMID: 5093284. DOI: 10.1161/01.res.29.3.227
- 28 Auden RM and Donald DE: Reflex responses of the isolated, in situ portal vein of the dog. *J Surg Res* 18(1): 35-42, 1975. PMID: 1117713. DOI: 10.1016/0022-4804(75)90139-0
- 29 Mattson JM and Zhang Y: Structural and Functional Differences Between Porcine Aorta and Vena Cava. *J Biomech Eng* 139(7), 2017. PMID: 28303272. DOI: 10.1115/1.4036261
- 30 Yan S, Zhang Q, Cai M, Yu D, Chen J, Yu P, Zhao Q, Zhou L, Hoffmann M and Zheng S: A novel model of portal vein transplantation in mice using two-cuff technique. *Microsurgery* 27(6): 569-574, 2007. PMID: 17705281. DOI: 10.1002/micr.20404
- 31 Dobrin PB, Littooy FN and Endean ED: Mechanical factors predisposing to intimal hyperplasia and medial thickening in autogenous vein grafts. *Surgery* 105(3): 393-400, 1989. PMID: 2922677.
- 32 Predel HG, Yang Z, von Segesser L, Turina M, Bühler FR and Lüscher TF: Implications of pulsatile stretch on growth of saphenous vein and mammary artery smooth muscle. *Lancet* 340(8824): 878-879, 1992. PMID: 1357299. DOI: 10.1016/0140-6736(92)93287-w
- 33 Lu DY, Chen EY, Wong DJ, Yamamoto K, Protack CD, Williams WT, Assi R, Hall MR, Sadaghianloo N and Dardik A: Vein graft adaptation and fistula maturation in the arterial environment. *J Surg Res* 188(1): 162-173, 2014. PMID: 24582063. DOI: 10.1016/j.jss.2014.01.042
- 34 Dabir S, Mohammad-Taheri Z, Parsa T, Abbasi-Nazari M, Radpay B and Radmand G: Effects of propofol versus isoflurane on liver function after open thoracotomy. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 23(3): 292-298, 2015. PMID: 25227774. DOI: 10.1177/0218492314551972
- 35 Wei W, Pu YS, Wang XK, Jiang A, Zhou R, Li Y, Zhang QJ, Wei YJ, Chen B and Li ZF: Wall shear stress in portal vein of cirrhotic patients with portal hypertension. *World J Gastroenterol* 23(18): 3279-3286, 2017. PMID: 28566887. DOI: 10.3748/wjg.v23.i18.3279
- 36 Estevez B and Du X: New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiology (Bethesda)* 32(2): 162-177, 2017. PMID: 28228483. DOI: 10.1152/physiol.00020.2016
- 37 Krepline AN, Christians KK, Duelle K, Mahmoud A, Ritch P, George B, Erickson BA, Foley WD, Quebbeman EJ, Turaga KK, Johnston FM, Gamblin TC, Evans DB and Tsai S: Patency rates of portal vein/superior mesenteric vein reconstruction after pancreatotomy for pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg* 18(11): 2016-2025, 2014. PMID: 25227638. DOI: 10.1007/s11605-014-2635-9
- 38 Lee DY, Mitchell EL, Jones MA, Landry GJ, Liem TK, Sheppard BC, Billingsley KG and Moneta GL: Techniques and results of portal vein/superior mesenteric vein reconstruction using femoral and saphenous vein during pancreaticoduodenectomy. *J Vasc Surg* 51(3): 662-666, 2010. PMID: 20080375. DOI: 10.1016/j.jvs.2009.09.025

Received October 6, 2019
 Revised October 23, 2019
 Accepted October 29, 2019

Pálek R., Rosendorf J, Malečková A, Vištejnová L, Bajcurová K, Mírka H, Tégel V, Brzoň O, Kumar A, Bednář L, Tonar Z, Hošek P, Moulisová V, Eberlová L, Třeška V, Liška V: Influence of Mesenchymal Stem Cell Administration on The Outcome of Partial Liver Resection in a Porcine Model of Sinusoidal Obstruction Syndrome. *Anticancer Res.* 2020;40(12):6817–6833. IF 1,99

Influence of Mesenchymal Stem Cell Administration on The Outcome of Partial Liver Resection in a Porcine Model of Sinusoidal Obstruction Syndrome

RICHARD PALEK^{1,2}, JACHYM ROSENDORF^{1,2}, ANNA MALECKOVA^{2,3}, LUCIE VISTEJNOVA^{2,3}, KRISTYNA BAJCUROVA^{2,4}, HYNEK MIRKA^{2,4}, VACLAV TEGL^{2,5}, ONDREJ BRZON², ARVIND KUMAR², LUKAS BEDNAR², ZBYNEK TONAR^{2,3}, PETR HOSEK², VLADIMIRA MOULISOVA², LADA EBERLOVA^{2,6}, VLADISLAV TRESKA¹ and VACLAV LISKA^{1,2}

¹Department of Surgery, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic;

²Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic;

³Department of Histology and Embryology,

Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic;

⁴Department of Medical Imaging, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic;

⁵Department of Anesthesiology and Resuscitation,

Faculty of Medicine in Plzen, Charles University, Pilsen, Czech Republic;

⁶Department of Anatomy, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic

Abstract. *Background:* In patients with colorectal liver metastases, the possibility for radical liver resection can be limited by oxaliplatin-induced sinusoidal obstruction syndrome (SOS). This study investigates the potential of mesenchymal stem cells (MSC) to improve the outcome of liver resections in pigs with SOS. *Materials and Methods:* SOS was induced in all animals (n=20) on day 0. Animals in the experimental group (n=8) received allogeneic MSC on day 7. Liver resection was performed in all animals on day 14 and the animals were observed until day 28. Ultrasound volumetry, biochemical analysis and histological examination of liver parenchyma was performed during the follow-up period. *Results:* Six animals from the control group died prematurely, while all animals survived in the experimental group. According to histology, biochemical analysis and ultrasound volumetry, there were no significant differences between the groups documenting the effect of MSC. *Conclusion:* Single dose allogeneic MSC administration improved survival of animals with SOS undergoing partial liver

resection. Further experiments with different timing of liver resection and MSC administration should be performed to investigate the effect of MSC in more detail.

More than 50% of patients with colorectal cancer develop liver metastases (1, 2) and the only potentially curative therapy for these patients is radical liver resection (3). However, the extent of resection is limited by the future liver remnant (FLR) volume as well as the FLR functional and regenerative capacity (2, 4, 5). The quality of liver parenchyma may be compromised by pre-existent liver diseases such as liver steatosis, cirrhosis or chemotherapy-associated hepatotoxicity (4, 6). Irinotecan is responsible for an increased risk of steatohepatitis, and oxaliplatin-based chemotherapy can cause sinusoidal obstruction syndrome (SOS) (7-9).

SOS, also known as hepatic veno-occlusive disease, is caused by toxic injury to the endothelium of liver sinusoids by certain exogenous toxins and can be a life-threatening condition (10). Typical clinical symptoms of SOS are painful hepatomegaly, jaundice, fluid retention with ascites and in severe cases even multiorgan dysfunction or failure (11, 12). SOS can present in acute, subacute or chronic forms (13). The first-identified agents of SOS were pyrrolizidine alkaloids synthesized by certain plants and even today, ingestion of herbal teas and herbal medicine preparations containing these alkaloids can be a cause of SOS (10, 14). Most often, however, SOS is reported in patients after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) due to preconditioning by high-dose chemotherapy or hepatic irradiation (10, 11, 15).

Correspondence to: Richard Pálek, Alej Svobody 76, 323 00 Plzen, Czech Republic. Tel: +420 722435599, e-mail: palekrichard@gmail.com and Václav Liška, Alej Svobody 76, 323 00 Plzen, Czech Republic. Tel: +420 732160287, e-mail: vena.liska@skaut.cz

Key Words: Sinusoidal obstruction syndrome, colorectal cancer, liver metastases, liver resection, mesenchymal stem cells, monocrotaline.

Experiments on rats have confirmed that SOS is a risk factor increasing morbidity and mortality after liver resection (16). A similar impact of SOS has been documented in the clinical setting. Patients with SOS had decreased long-term survival and earlier intrahepatic recurrence compared to patients without SOS. Therefore, it is apparent that the presence of SOS can have a major impact on the outcome of patients with colorectal liver metastases, and strategies to prevent or treat this disease are needed (17).

Many animal models of SOS have been established to study the pathophysiology, diagnostic markers and potential prevention or treatment of this syndrome. We have analyzed these studies in more detail in our review (18). Rat models of SOS induced by pyrrolizidine alkaloid monocrotaline helped to characterize the pathophysiology in detail (19-21). A reactive metabolite of monocrotaline binds to F-actin in sinusoidal endothelial cells (SEC) and causes its depolymerization, which results in a change of the shape of SEC and formation of gaps between them. Red blood cells, leucocytes and cellular debris then penetrate through the gaps into the space of Disse, thus causing subsequent dissection of whole sinusoidal lining and embolization of SEC with obstruction of liver sinusoids (19-21). Moreover, the F-actin depolymerization increases the expression and activity of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in SEC. Increased MMP-9 activity is responsible for breakdown of the extracellular matrix in the space of Disse and facilitates the dissection of SEC (22).

De Leve *et al.* described the development of histological changes of liver parenchyma in their rat model during the first 10 days after monocrotaline administration. Based on this, they defined *early stage* changes (typically days 3-5, characterized by coagulative necrosis) and *late stage* changes (typically days 6-7, characterized by subendothelial and adventitial fibrosis) (22).

Harb *et al.* showed in an experiment with monocrotaline-induced SOS in rats that bone marrow-derived endothelial cell progenitors are able to replace SEC and central venous endothelial cells after injury (23). Furthermore, this study demonstrated the ability of monocrotaline to suppress endothelial cell progenitors in bone marrow as well as in circulation, indicating that the SOS is probably caused by 2 mechanisms, *i.e.* the toxic injury to SEC and toxic injury to bone marrow progenitors. This finding is in accordance with the fact that the most severe acute cases of SOS are caused by HSCT. High-dose chemotherapy preconditioning before HSCT involves the bone marrow as well as SEC (11).

SOS therapy is limited and includes both preventive strategies and treatment of already-present disease. Prevention is focused on consideration of patient-related or transplant-related risk factors before HSCT as well as on pharmacologic prophylaxis (24). Many agents have been tested to verify their prophylactic effect in animal and also clinical studies, but the evidence is limited and none of them has been assigned

indication criteria for clinical use (18, 25). Most of them prevent hemocoagulation and obstruction of sinusoids (*e.g.* heparine, prostaglandin E1, soluble thrombomoduline, cilostazol, *etc.*) (26-29) or inhibit MMP-9 (sesame oil, doxycycline, sorafenib, regorafenib, *etc.*) (20, 21, 30).

Some of the agents tested for their treatment effect act through the same mechanisms as pharmacologic prophylaxis (MMP-9 inhibition and anti-inflammatory effect) (31, 32) or as anticoagulants (33). However, the only treatment of SOS with approved indications in clinical medicine is defibrotide, which protects endothelial cells and causes hydrolysis of fibrin clots (34).

Harb *et al.* used bone marrow-derived endothelial cell progenitors and proposed another mechanism of potential treatment: the replacement of injured SEC by bone marrow-derived cells (23). This method probably corresponds to the mechanism by which the organism itself reverses SEC injury in normal conditions when the bone marrow is not injured. His study demonstrated a therapeutic effect of whole bone marrow administration in rats with monocrotaline-induced SOS (23). In another experiment on mice, infusion of endothelial progenitor cells successfully prevented SOS development after HSCT (35). As it was shown that the disruption of hepatic endothelial barrier during SOS facilitates transplanted cell engraftment, the principle of cell treatment sounds reasonable (36).

In this study we decided to focus on the enhancement of liver regenerative capacity in SOS and the potential treatment of this disease. According to the results of our previous studies, mesenchymal stem cells (MSC) augment liver regeneration in pigs and humans (37, 38). A promising role of MSC in the treatment of liver failure has been shown in animal experiments as well as in clinical settings (39). The aim of this study was to evaluate whether administration of MSC can improve the outcome of animals after partial liver resection in SOS. The effect of MSC administration on the course of monocrotaline-induced SOS was also evaluated.

Materials and Methods

This study was conducted under the oversight of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic. All the procedures using animals were approved by the Commission for Work with Experimental Animals at the Charles University, Faculty of Medicine in Pilsen, and the whole study was conducted in accordance with the laws of the Czech Republic, which are compatible with the legislation of the European Union.

Experimental animal and structure of the experiment. The Prestice black-pied pig was chosen as the experimental animal. All pigs were obtained from the agriculture company Mladotice (Mladotice, Czech Republic). Both males and females were included (16 females, 5 males) aged 3-4 months, with an average weight of 34.2 kg (range=23-44 kg, median 34 kg). In all 21 animals, monocrotaline was administered to induce SOS on day 0. The animals were sorted into the experimental (n=8) and control (n=12) groups on day 7.

Animals in the experimental group received MSC intravenously on day 7. No treatment was administered to animals in the control group. All the surviving animals underwent partial liver resection on day 14 and were sacrificed on day 28. One of the animals was not included in the analysis because of its premature death during the first week of the experiment.

Premedication and general anaesthesia. All invasive procedures were performed under general anaesthesia, while blood draws and ultrasound examinations under analgesia. Intramuscular premedication before the first induction of general anaesthesia was done with 10 mg/kg of ketamine (Narkamon – Spofa, Prague, Czech Republic), 5 mg/kg azaperone (Stresnil – Janssen Pharmaceutica NV, Beerse, Belgium) and 1 mg of atropine (Atropin Biotika – Hoechst Biotika, Martin, Slovak Republic). The same mixture in lower doses (1-2 mg/kg ketamine, 0.5-1 mg/kg azaperone, 1 mg atropine) was administered intravenously via the ProPort system to provide analgesia during ultrasound examinations and blood draws and as premedication before the second general anaesthesia. General anaesthesia was induced and maintained by intravenous (IV) administration of propofol (1% mixture 5-10 mg/kg/h Propofol, Fresenius Kabi Norges, Halden, Norway). IV administration of fentanyl (1-2 µg/kg/h Fentanyl Torrex, Chiesi cz, Prague, Czech Republic) was used for continuous analgesia. Airways were secured by endotracheal intubation and pigs were mechanically ventilated. Physiological functions were monitored throughout the surgery. During the procedure pigs received infusions and volume substitution when needed: Hartmann's Solution (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) and Plasmalyte (Baxter Healthcare Ltd., Compton, UK). Amoxicillin and Clavulanic acid (Augmentin 1.2 g per pig, GlaxoSmithKline Slovakia., Bratislava, Slovak Republic) were used as antibiotic prophylaxis at the beginning of the procedure; the dose was repeated after 2 hours.

SOS induction. The ProPort Plastic Venous Access System with a PolyFlow polyurethane catheter (Deltec, Smiths Medical, USA) was implanted and introduced through the jugular vein into the superior vena cava in all animals on day 0 of experiment. This venous access simplified the drug and fluid administration in the postoperative period as well as premedication and blood drawing. Subsequently, a midline minilaparotomy was performed and a biopsy from the periphery of left lateral liver lobe was taken; the portal vein was cannulated and a solution with 36 mg of monocrotaline per 1 kg of animal weight was administered over a period of 20 min. The dosage of monocrotaline was established in our previous pilot study (40). To prepare the solution of monocrotaline, the crystals of monocrotaline (Oakwood Products, Inc., SC, USA) were dissolved in 3-4 ml of 1M hydrochloric acid in a warm water bath (40°C). Sterile PBS was added in a sufficient amount to neutralize the pH (approximately 20 ml) and finally distilled water was added to decrease the osmolarity of the solution. The final volume of the solution was approximately 70 ml, depending on the absolute dose of monocrotaline. After monocrotaline administration the minilaparotomy was closed in anatomical layers, animals were extubated, recovered and each pig was placed in a separate pen. They were monitored daily to evaluate their clinical status and detect any surgical complications. During the first postoperative days the doses of granular feed were reduced but the access to water was not limited. Ten ml of Hartmann's Solution per 1 kg of animal weight, the same volume of 5% glucose (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) and 40 mg of pantoprazole (Nolpaza KRKA Slovensko, Bratislava, Slovak Republic) was

administered daily via the ProPort system during the first postoperative days. Blood samples were drawn regularly according to the follow-up scheme described below.

MSC cultivation and administration. Bone marrow was harvested by aspiration from the tibia of healthy pigs, matched in age and weight with the animals included in this experiment. Following a puncture with a sterile needle, 15-25 ml of bone marrow was aspirated into a solution of 2 ml saline and 2,500 IU of heparin (Heparine – Zentiva, Prague, Czech Republic). To isolate MSCs, gradient centrifugation (440 × g, 30 min) was performed on Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, North Richland Hills, TX, USA). The layer of mononucleated cells was washed with phosphate buffer saline and plated on a culture flask (75 cm²; TPP, Troy, NY, USA). The culture media consisted of α-MEM cell culture media (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with 10 % fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific), 1 mM L-glutamine (Biochrom, Cambridge, UK), 6.0 mg/ml penicillin, 10 mg/ml streptomycin (Biosera, Nuaille, France), and 0.25 mg/ml gentamicin (Biosera). The culture media were changed every other day. After 10 days, MSCs were harvested by EDTA/Trypsin 1x (Biosera) and separated into three culture flasks (75 cm²; TPP). Culture media were again changed every other day and after 10 days, MSCs were harvested by the same method and cryopreserved in liquid nitrogen (1x10⁶ cells/cryotube). MSCs were thawed 4 weeks before transplantation and plated on flasks (150 cm²; TPP) in 20 ml of the same culture media and cultured for 4 weeks to get ~50 million cells with one passage cycle, maintaining their stem cell properties. The stem cell phenotype of transplanted cells was identified by flow cytometric detection of CD90, CD73, and CD44. Differentiation ability of MSC was evaluated by their differentiation into adipo-, chondro- and osteo-genic lineages. On the day of administration, MSC were harvested as described above, counted, and re-suspended in 100 ml of physiological solution (B Braun) (37°C, 10⁶ cells/kg of pig weight) per pig. The solution was administered through the ProPort system by slow infusion (30 min) on day 7 of the experiment in all animals from the experimental group (n=8). Infusion of 5ml/kg of Hartmann's Solution and the same volume of 5% glucose followed the MSC administration. Subsequently, animals were monitored according to the follow-up scheme.

Liver resection. On day 14 of the experiment, a midline laparotomy was performed partly at the location of the previous incision but prolonged cranially and caudally, and the left lateral liver lobe was resected using electrocautery. Blood loss was minimized by the Pringle manoeuvre. The vessels and bile ducts for the left lateral liver lobe were ligated and bipolar forceps were used to eliminate bleeding from the parenchyma at the resection area. Samples of the resected left lateral liver lobe were taken and stored in 10% formaldehyde for subsequent histological examination. The laparotomy was closed, animals were extubated, recovered and monitored during a postoperative period of 2 weeks. The food restriction and intravenous administration of crystalloids followed the same scheme as post-monocrotaline administration.

Follow-up (biochemistry and ultrasound examination). Throughout the experiment, regular blood samples were taken in all animals, on day 0 before monocrotaline administration (1), day 3 (2) and day 7 (for the animals in the experimental group, blood was drawn before MSC administration) (3), day 10 (4), day 14 before (5) and right after (6) liver resection, day 14 (2 hours after liver resection) (7), day 15 (8), 17 (9), 21 (10), 24 (11) and day 28 before sacrifice (12). B-mode and

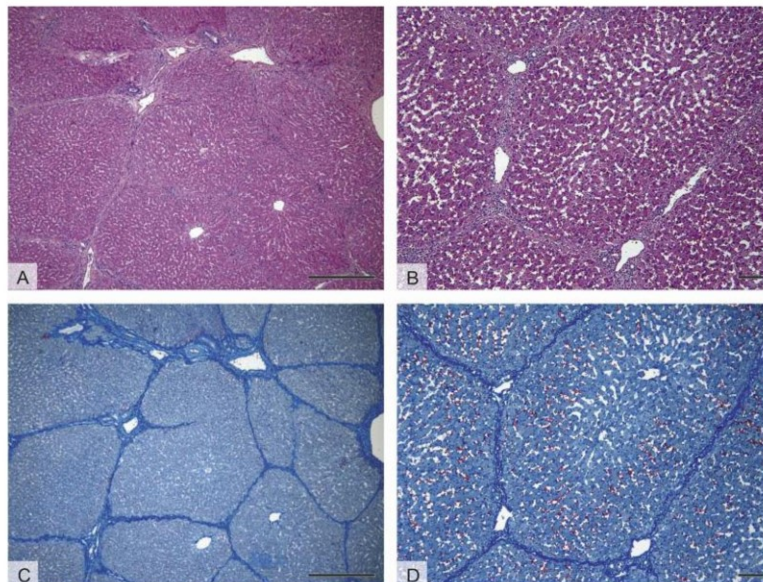


Figure 1. Examples of histological staining, healthy porcine liver. (A, B) Hematoxylin and eosin, (C, D) anilin blue with nuclear fast red used for collagenous connective tissue detection. Scale bars: A and C=500 μm , B and D=100 μm .

Doppler ultrasound examination (Ultrasound Scanner Pro Focus 2202, BK Medical, Herlev, Denmark) was regularly performed in order to assess the toxic liver injury and to follow potential regeneration after the resection. The diameter of the extrahepatic part of the portal vein, maximal blood flow velocity at this area, thickness of the gallbladder wall and liver volume were also measured. For liver volumetry, the liver was measured in B-mode in the axial, sagittal and coronal planes and the volume was calculated using an ultrasonographic formula (axial \times sagittal \times coronal/2) according to our previous publication (41). Ultrasound examination followed this scheme in all animals: day 0 before monocrotaline administration (1), day 7 (for animals in the experimental group, ultrasound was performed before MSC administration) (2), day 14 before (3) and after liver resection (4), day 17 (5), 21 (6), 24 (7) and day 28 before sacrifice (8). Samples of liver parenchyma for histology examination were also taken on day 28 at the end of the experiment or during autopsy, in the case of premature death. The animals were then sacrificed by intravenous administration of T 61 solution (MSD Animal Health, Kenilworth, NJ, USA) under general anaesthesia.

Histology. Liver tissue blocks were fixed with 10% formalin, embedded in paraffin wax and cut into 4 μm -thick sections using an automatic microtome (RM2255, Leica Biosystems, Germany). After dewaxing and rehydration, one randomly selected section per tissue block was stained by hematoxylin-eosin and another randomly selected section was stained with 0.5% anilin blue (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and nuclear fast red (Waldeck GmbH, Münster, Germany) (Figure 1).

Evaluation of histopathological changes of liver tissue was based on a semi-quantitative scoring system previously published by DeLeve *et al.* (19) and Schiffer *et al.* (42). The histopathological evaluation included a qualitative description of changes in liver architecture, namely the presence of haemorrhagic necrosis, blood congestion within sinusoids, presence of inflammatory infiltration of lobules and interlobular septa, presence of reactive fibrotic changes and presence of steatosis (Figure 2). In order to quantitatively describe the severity of liver injury, we quantified two further parameters: volume density of centrilobular haemorrhagic necrosis V_V (necrosis, liver) and volume density of viable liver parenchyma V_V (parenchyma, liver).

The V_V (necrosis, liver) and the V_V (parenchyma, liver) were quantified in 6 necrosis and 8 parenchyma microphotographs per section stained with hematoxylin and eosin, captured with 10x (the necrosis quantification), and 40x objectives (the parenchyma quantification) on an Olympus BX41 microscope (Olympus, Hamburg, Germany). Each of the photomicrographs was taken in a systematic uniform random manner. All quantitative estimates were calculated using well established stereological methods, specifically the point-counting method (43). Ellipse software (ViDiTo, Košice, Slovakia) was used for the quantification (Figure 3).

Statistical analysis. Standard frequency tables and descriptive statistics were used to characterize the sample data set. Quantitative histological parameters were evaluated using repeated measures ANOVA (with the 'Group' factor at two measurement levels of 'Time point' and their interaction). In order to isolate the differences

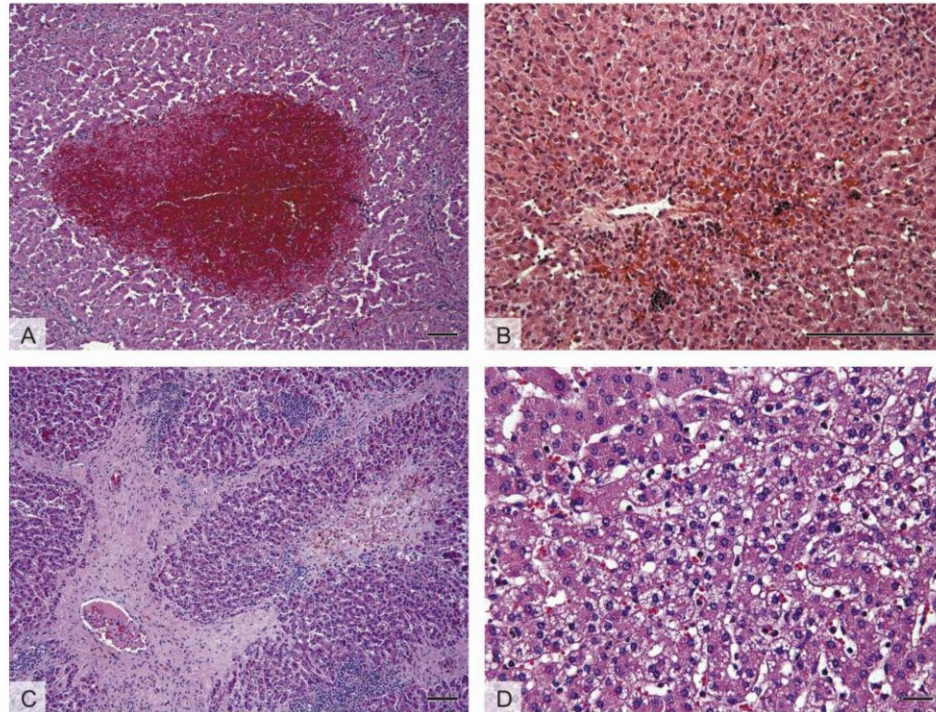


Figure 2. Histopathological changes in liver parenchyma found 14 days (A, B) and 28 days (C, D) after monocrotaline administration. (A) Centrilobular hemorrhagic necrosis in liver sample 14 days after monocrotaline administration. The necrosis represents one of the most important histopathological hallmarks of sinusoidal obstruction syndrome. (B) Congestion of blood causing dilation of hepatic sinusoids. (C) Reactive fibrotic changes that distort normal hepatic architecture. (D) Steatosis in the center of hepatic lobules. Hematoxylin and eosin, scale bars=100 μ m.

in the progression of biochemical variables and ultrasound measurements caused by the application of MSCs from the baseline values that varied randomly among the pigs, the following normalization procedure was carried out. For each variable, the average value before the point of MSC application (or non-application in the case of the control group, *i.e.* the first 3 time points for biochemistry and the first 2 time points for ultrasound measurements) was subtracted from all the subsequent variable values for each pig. These normalized values from the time points after the separation of the groups were subsequently statistically compared using two-way ANOVA (with factors of 'Group', 'Time point' and their interaction). Raw, non-normalized data from all time points were also analysed (using repeated measures ANOVA) and are also shown. Only the pigs that survived the whole duration of the experiment were included in the statistical analysis. All reported *p*-values are two-tailed and the level of statistical significance was set at $\alpha=0.05$. Statistical processing and testing were performed using the STATISTICA data analysis software (Version 12; StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

Results

Survival. Six out of the 12 pigs in the control group died prematurely during the experiment. The deaths occurred before the liver resection in 3 cases (day 10 and in two instances on day 13) and after the liver resection in 3 cases (day 22, 24 and 27). One out of the 6 deaths was not directly caused by liver parenchyma injury but by peritonitis due to fasciitis of the wound after laparotomy. This animal died on day 22. However, in this case the liver injury also undoubtedly had an impact on the overall condition of the animal. The pathological findings in the other 3 animals revealed not only liver injury but also signs of pneumonia. One animal presented with hemopericardium and because the possibility of traumatic or iatrogenic injury was ruled out, the cause was classified as coagulopathy due to the severe liver injury. Only 1 pig showed signs of liver injury without any other pathological findings.

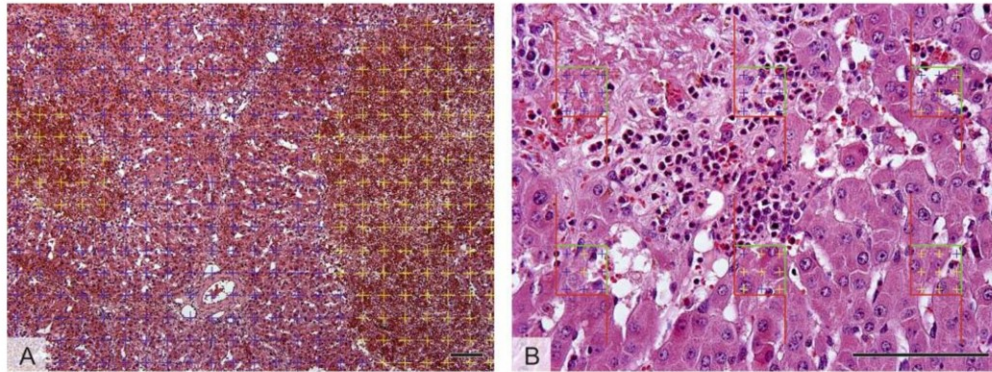


Figure 3. Quantitative analysis of volume density of centrilobular hemorrhagic necrosis V_V (necrosis, liver) and of volume density of viable liver parenchyma V_V (parenchyma, liver). (A) Stereological point grid used for quantification of hemorrhagic necrosis. Points hitting the necrosis are highlighted in yellow. (B) Stereological point grid used for quantification of viable liver parenchyma. The viable parenchyma was defined as hepatocytes organized into one cell thick plate. The hepatocytes had undamaged cytoplasmic membrane and clear, eosinophilic cytoplasm. Points hitting the viable liver parenchyma are highlighted in yellow. Scale bars=100 μ m.

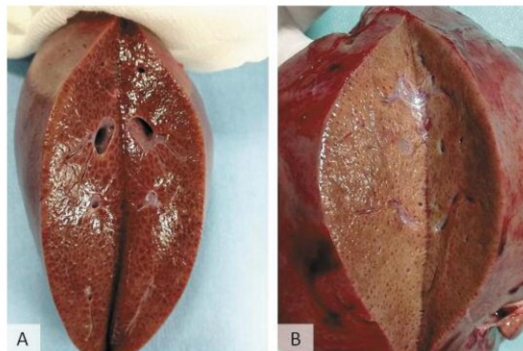


Figure 4. (A) Appearance of resected liver parenchyma on day 14. The dark lesions inside liver lobules correspond to centrilobular necrosis documented by histology. (B) Liver parenchyma at the end of experiment on day 28 when the lesions were smaller but still present.

During autopsy or liver resection, the macroscopic appearance of the liver parenchyma was altered. This is documented in Figure 4. All the animals that died prematurely were discarded from the biochemical analysis, evaluation of the ultrasonography data and from quantitative histological analysis. However, all the liver parenchyma samples underwent qualitative histological analysis.

Evaluation of MSC phenotype and differentiation ability. The stem cell phenotype of transplanted MSC was evaluated by flow cytometry. MSC were transplanted after the third

passage to ensure both minimal loss of stem cell characteristics and minimal differences between MSC groups. Transplanted MSC were positive for CD44^{pos} (99.1%), CD73^{pos} (96.2%), and CD90^{pos} (99.1%), and negative for CD45^{pos} (0.44%) (Figure 5A). The differentiation ability of transplanted MSC was evaluated by differentiation into adipo-, chondro- and osteo-genic lineages. After 21 days of differentiation, MSC were able to accumulate lipid droplets, detected by oil red staining (Figure 5C) as a marker of adipogenic lineage differentiation. They could produce glycosaminoglycans, detected by alcian blue staining (Figure

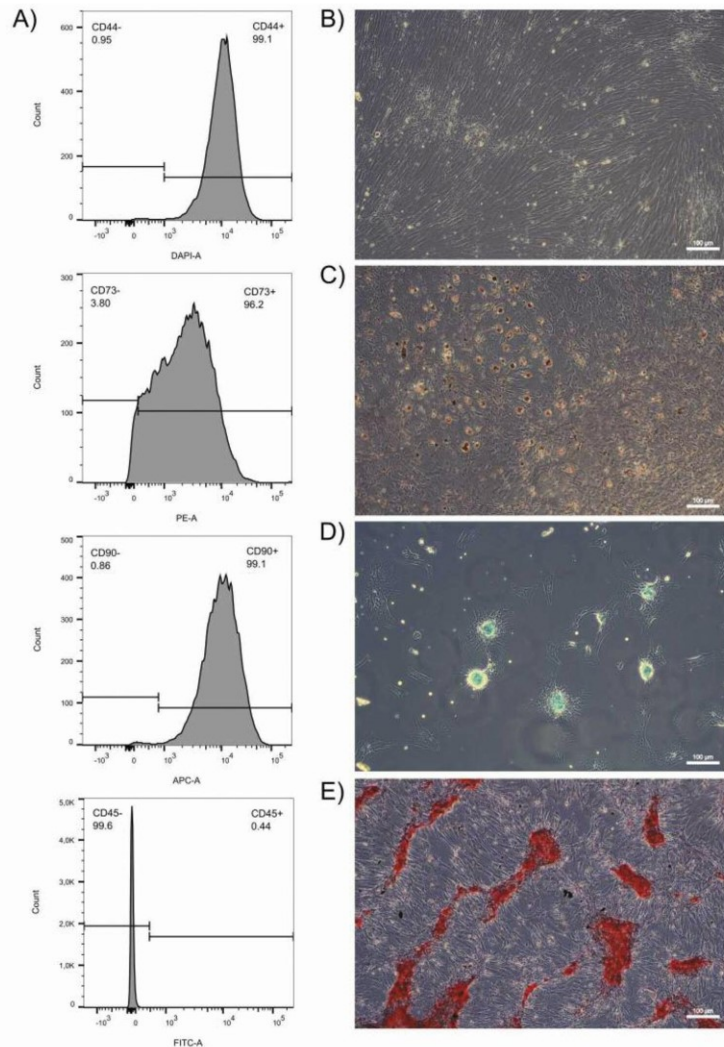


Figure 5. Evaluation of MSC phenotype by flow cytometry and examination of differentiation potential. (A) Representative histograms show that MSCs were negative for CD45 and positive for CD90, CD73 and CD44. Differentiation potential of transplanted MSCs was evaluated by their differentiation in to adipogenic (C), chondrogenic (D) and osteogenic (E) lineages, compared with untreated controls (B). Scale bars=100 μm.

5D) as a marker of chondrogenic lineage differentiation, and deposits of calcium cations could be identified detected by alizarin red staining (Figure 5E), as a marker of osteogenic lineage differentiation (Figure 5B).

Histology. At the time of liver resection (day 14), we found extensive centrilobular haemorrhagic necrosis in most of the pigs, which is typical of SOS. In two pigs there were no signs of necrosis [one pig from the control group (pig C7) and one

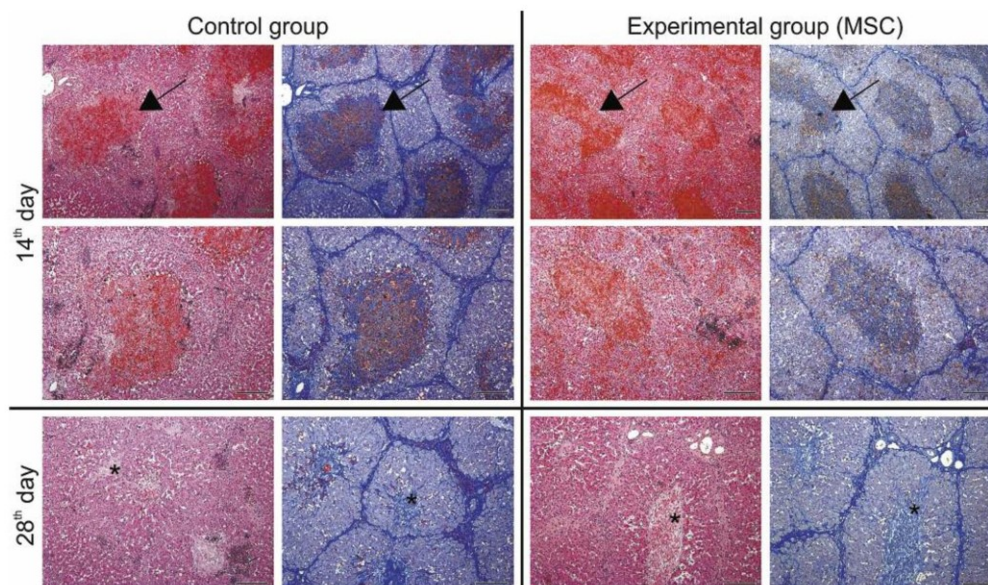


Figure 6. Comparison of liver injury in control and experimental groups 14 and 28 days after monocrotaline administration. 14 days after monocrotaline administration, the liver injury was characterized by denudation of sinusoidal lining, obstruction of the sinusoidal lumina and hemorrhage into the liver parenchyma, leading to extensive centrilobular hemorrhagic necrosis (arrows). After 28 days, the samples showed parenchymal extinction lesions with fibrotic and stenosed hepatic veins (asterisks). Control and experimental groups did not show any significant differences regarding the character and extent of liver injury. Hematoxylin and eosin (1st and 3rd column) and anilin blue with nuclear fast red (2nd and 4th column) were used for staining. Scale bars=200 μ m.

from the experimental group (pig E4)]. The liver parenchyma in these two pigs showed changes which were also observed in the other animals – denudation of SEC and obstruction of the lumen of sinusoids leading to their dilation, as well as inflammatory infiltration. Figure 6 shows the histological changes at the time of liver resection. All the results of qualitative histology for this time point are summarized in Table I.

At the end of the experiment (day 28), haemorrhagic necrosis was no longer present in the majority of animals and was replaced by centrilobular fibrotic lesions. Steatosis was found in the centre of the hepatic lobules. Figure 6 shows the histological findings and Table II the qualitative results.

The most severe change, nodular transformation of the parenchyma, occurred in two animals from the control group that did not survive the experiment. The overview of the liver histology of the animals with premature death is summarized in Table III. The quantitative analyses did not show significant differences in the volume density of haemorrhagic necrosis and viable liver parenchyma between the experimental and control group at the time of liver resection or at the end of the experiment (Figure 7, for more details see Table IV). The

morphology of liver injury was comparable in both groups for both time points. The viable liver parenchyma was chosen as a marker for evaluation of the functional capacity of the liver because the volume of parenchyma was influenced not only by the extent of necrosis but by reactive fibrotic changes, dilation of hepatic sinusoids and by inflammatory infiltration as well.

Biochemistry. The observed levels of biochemical markers of liver and renal functions correspond to severe toxic liver injury (Figure 8). Elevation of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), bilirubin and ammonium were observed in both groups. The first peak was observed after monocrotaline administration and the second peak after liver resection. The level of AST returned to the normal range by the end of the experiment. The level of ALT also dropped during the last week of follow-up and was even lower than the initial value, but still within the normal range. The level of ammonium and bilirubin remained elevated until the end of experiment. The level of urea dropped during the first three days after monocrotaline administration and elevation was observed one day after liver resection.

Table I. Overview of qualitative histological findings at the time of liver resection (day 14). E, Animals from the experimental group; C, animals from the control group.

	Control group				Experimental group			
	Animal	Hemorrhagic necrosis	Inflammatory infiltration	Other findings	Animal	Hemorrhagic necrosis	Inflammatory infiltration	Other findings
Liver resection	C1	Yes	Yes	Steatosis in centre of lobules	E1	Yes	Yes	
	C5	Yes	No		E2	Yes	Yes	
	C7	No	Yes	Without hemorrhagic necroses, almost normal appearance of liver parenchyma	E3	Yes	No	
	C10	Yes	Yes		E4	No	Yes	Without hemorrhagic necroses, dilated sinusoids
	C11	Yes	Yes		Small centrilobular hemorrhagic necroses	E5	Yes	Yes
	C12	Yes	Yes	E6		Yes	Yes	Severe inflammation
				E7	Yes	Yes	Severe inflammation	
				E8	Yes	Yes		

Table II. Overview of qualitative histological findings at the end of the experiment (day 28). Animals from the experimental group are labeled E, animals from the control group are labeled C.

	Control group					Experimental group				
	Animal	Hemorrhagic necrosis	Inflammatory infiltration	Fibrotic centrilobular reactive lesions	Other findings	Animal	Hemorrhagic necrosis	Inflammatory infiltration	Fibrotic centrilobular reactive lesions	Other findings
End of experiment	C1	No	Yes	Yes	Severe inflammation	E1	No	Yes	Yes	Steatosis
	C5	No	Yes	Yes		E2	No	Yes	Yes	
	C7	No	No	No		Almost normal appearance of liver parenchyma	E3	No	Yes	Yes
	C10	Yes (minimally)	Yes	Yes	Severe inflammation		E4	No	Yes	Yes
	C11	Yes	Yes	Yes		Severe inflammation	E5	No	Yes	Yes
	C12	No	Yes	Yes	E6		No	Yes	Yes	Steatosis
						E7	No	Yes	Yes	
						E8	Yes	Yes	No	Centres of lobules with bleeding surrounded by fibrotic tissue

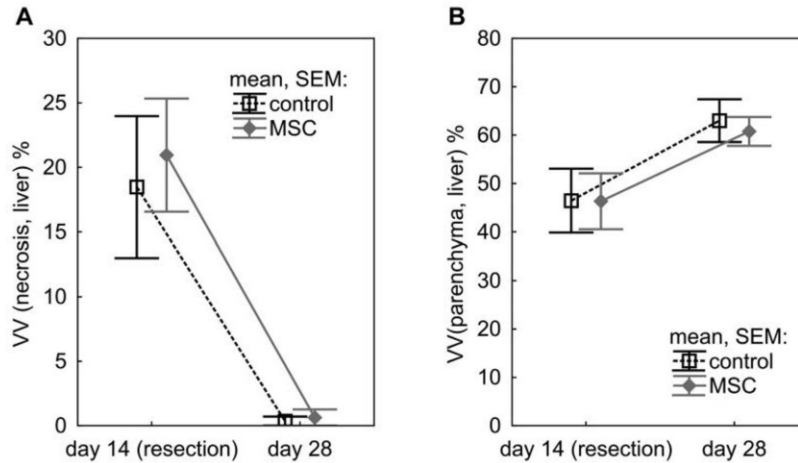


Figure 7. Results of quantitative histological analysis in the experimental (MSC) and control group (control). Neither the volume density of necrosis (A) nor the density of viable parenchyma (B) differed between experimental (MSC) and control groups. The volume density of necrosis was smaller at day 28 than at day 14 (resection). The volume density of viable parenchyma was greater at day 28 than at day 14 (resection). Repeated measures ANOVA was used for quantitative histological analysis.

Table III. Histological findings in samples of liver parenchyma taken during autopsy in animals that died prematurely.

Animal	Sample taken	Death during the experiment		Other findings
		Hemorrhagic necrosis	Inflammatory infiltration	
C2	Death (Day 10)	Yes	Yes	Almost normal appearance of liver parenchyma
C3	Resection	Yes	Yes	
C4	Death (Day 24)	No	Yes	
C6	Death (Day 13)	Yes	No	Nodular transformation of liver parenchyma, sporadic centrilobular necroses
C6	Resection	Yes	Yes	
C8	Death (Day 22)	Yes	Yes	
C8	Resection	Yes	Yes	
C9	Death (Day 27)	Yes	Yes	Nodular transformation of liver parenchyma, sporadic centrilobular necroses
C9	Death (Day 13)	Yes	Yes	

To compare the levels of biochemical markers in the two groups the values were normalized according to the average value before day 7. The comparison of the course of biochemical markers after the day of administration of MSC seemed to be more accurate than comparison of absolute values. However, the analysis of the results for the whole period of follow up without any data normalization was also performed.

The level of ALT and creatinine was significantly higher in the control group during the period after day 7 ($p=0.001$ for both markers). In contrast, the level of bilirubin and ammonium was significantly higher in the experimental group

during the same time period ($p=0.040$ and 0.0001 , respectively). The values of the other markers were comparable between the experimental and the control group.

The analysis for the whole follow-up period did not show any significant differences in biochemical markers between the two groups.

Ultrasound. For the ultrasonography analysis the same data normalization was performed and the groups were compared for the period after day 7. There was no significant difference in the diameter of portal vein or in the blood flow velocity in the

Table IV. Results of quantitative histological analysis of samples taken at the time of liver resection and at the end of the experiment. Volume density of necrosis - V_V (necrosis, liver). Volume density of viable liver parenchyma - V_V (parenchyma, liver).

	Control group			Experimental group		
	Animal	V_V (necrosis, liver) %	V_V (parenchyma, liver) %	Animal	V_V (necrosis, liver) %	V_V (parenchyma, liver) %
Liver resection	C1	30.0	29.2	E1	23.3	49.3
	C5	22.8	46.1	E2	38.2	27.8
	C7	0.3	73.1	E3	23.7	45.6
	C10	20.0	35.4	E4	0.0	77.5
	C11	4.5	56.7	E5	19.4	40.7
	C12	33.4	38.2	E6	17.7	45.6
				E7	10.2	57.4
End of experiment				E8	35.2	26.6
	C1	0.0	47.5	E1	0.0	72.7
	C5	0.0	61.6	E2	0.0	60.6
	C7	0.0	74.5	E3	0.0	50.0
	C10	0.0	76.2	E4	0.0	67.8
	C11	2.1	60.9	E5	0.0	63.4
	C12	0.0	57.4	E6	0.0	47.9
				E7	0.0	64.8
				E8	5.0	58.8

portal vein during the follow-up period between the different groups (Figure 9A, B). The time course of these parameters was not significantly influenced by the SOS induction and by the liver resection. The diameter of the gallbladder wall had a significant tendency to increase throughout the follow-up period ($p=0.004$) and did not differ between the groups (Figure 9C). The volume of liver parenchyma increased during the first week after the monocrotaline administration and dropped after day 7 and after the liver resection (Figure 9D). A smaller increase in liver volume occurred during the first days after the resection and was followed by another period of volume loss. For the period after day 7, the relative liver volume was significantly higher in the control group ($p=0.023$). The ultrasonography detected hyperechogenicity of the liver parenchyma in all animals after day 7 compared to normal echogenicity on day 0. In some animals, reversed flow in the portal vein was observed on day 7 onwards.

Discussion

The study aimed to assess the potential of MSC administration to enhance liver regeneration in SOS and/or its potential to attenuate it. The SOS was induced by intraportal monocrotaline administration in pigs which were then divided into two groups. One of the groups was treated with one intravenous dose of MSC one week after monocrotaline administration, while the second group was a control without any treatment. The survival of animals, levels of biochemical markers,

ultrasonography data and histology of liver parenchyma were compared between the groups to verify the severity of SOS and thus the treatment effect. The capability of liver regeneration after partial liver resection in animals with SOS was also compared to evaluate the effect of MSC.

Induction of SOS. Data from biochemistry, histology and ultrasonography show that SOS was successfully induced in pigs by intraportal monocrotaline administration in a single dose of 36 mg monocrotaline per 1 kg of body weight.

Hepatomegaly and hyperbilirubinemia are mentioned in all diagnostic criteria for SOS used in clinical medicine (44). In this study, the animals showed an increase of liver volume and elevation of bilirubin in the first days after monocrotaline administration. Liver enzymes are also usually elevated in patients with SOS, which corresponds with the finding of elevated AST and ALT during the first days after SOS induction in this study (13, 44). The decrease in the level of urea after monocrotaline administration can correspond with attenuation of liver functions (45, 46). The induction of SOS was also confirmed by histological findings. The denudation of SEC, obstruction of the lumen of sinusoids and hemorrhagic necrosis observed in this study correspond to changes described in rodent models of SOS and in humans (19, 47, 48).

Ultrasonography helped to not only to detect hepatomegaly but also revealed a changed echogenicity of the liver parenchyma, altered flow in the portal vein and increasing

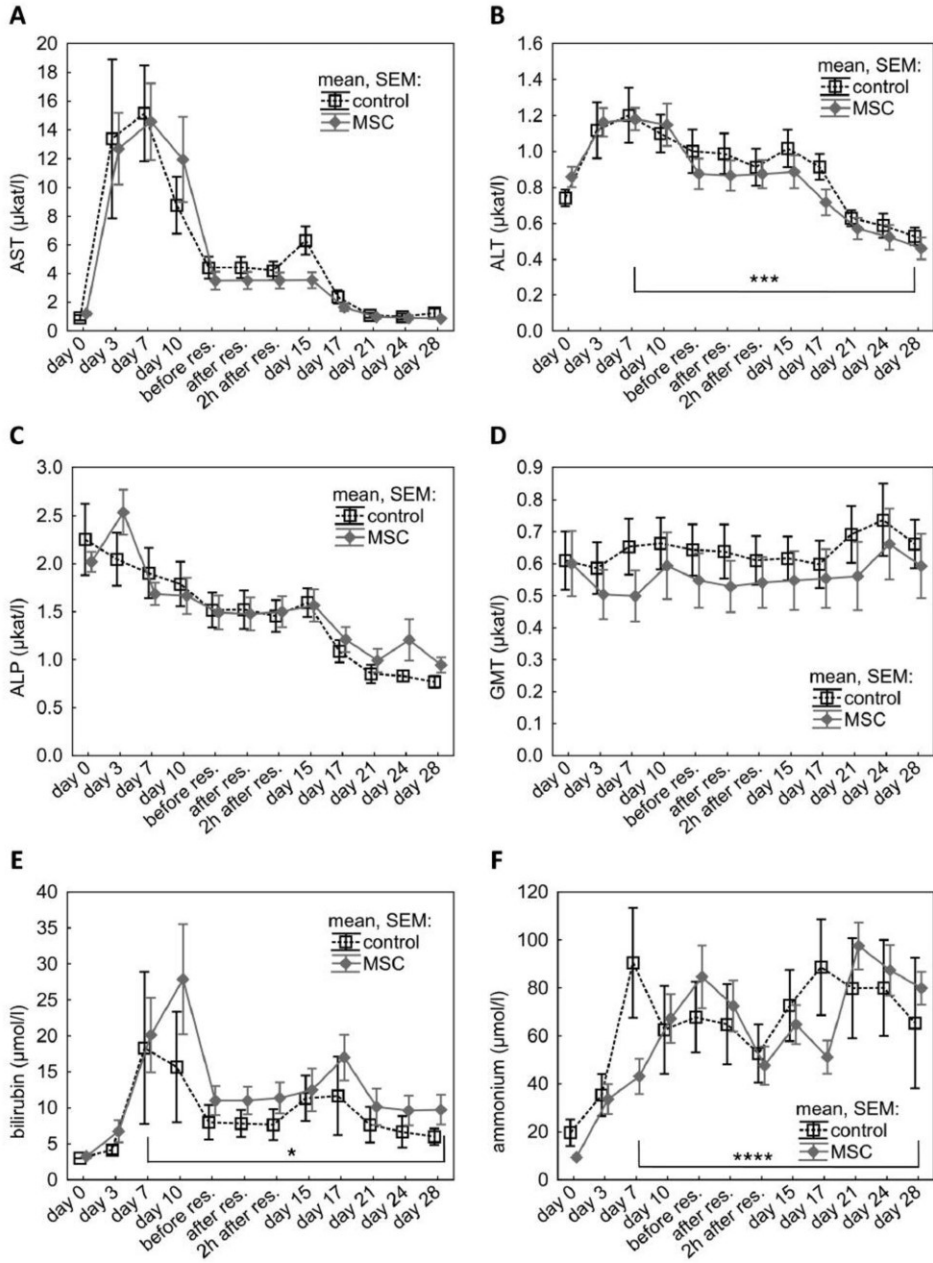


Figure 8. Continued

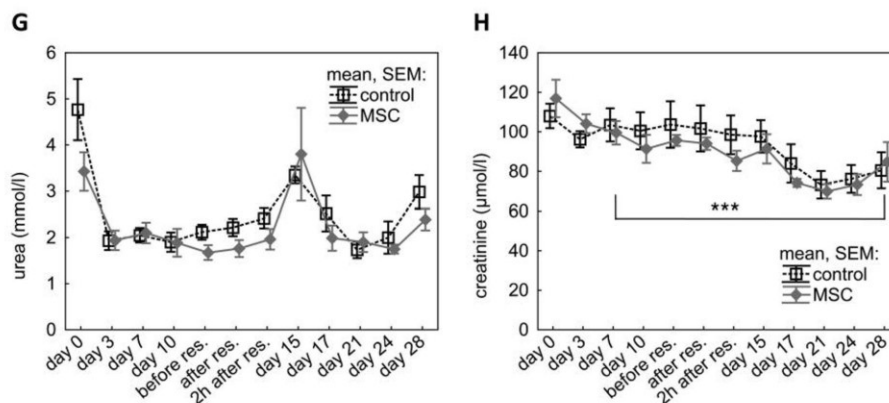


Figure 8. Results of biochemical analysis in the experimental (MSC) and control group (control) throughout the experiment. Significant differences between the groups were observed in the levels of ALT (B) and creatinine (H) (higher in control group after day 7) and in the levels of bilirubin (E) and ammonium (F) (higher in experimental group after day 7). The other markers did not show any significant differences. Two-way ANOVA was used for biochemical analysis after data normalization which is described in methods. The figure shows data before normalization. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

thickness of the gallbladder wall. Imaging methods such as ultrasonography, computed tomography and magnetic resonance imaging are now starting to be used for the diagnosis of SOS in clinical medicine (44). The thickening of the gallbladder wall is a typical finding in patients with SOS (14, 49, 50), and retrograde flow in the portal vein is also mentioned (51). According to our results, ultrasonography seems to be a suitable method to help confirm the diagnosis of SOS in large animal models.

Finally, the macroscopic appearance of the liver parenchyma 2 weeks after monocrotaline administration (or earlier in case of premature death) with apparent hemorrhagic necrosis also supports the diagnosis of SOS. It is important to mention that two animals showed only minimal alterations in the levels of biochemical markers and negligible histological changes of liver parenchyma compared to the other pigs. Because one of these animals was from the experimental and one from control group, we decided not to exclude these animals with less severe injury.

Evaluation of the effect of MSC. Data from the control and experimental groups were compared to verify the effect of MSC administration on the course of SOS and on liver regeneration after resection in animals with SOS.

To avoid the confounding effect of potentially different values between the groups before day 7, we decided to focus on the course of biochemical markers after the day of treatment. The same step was taken in evaluation of ultrasonography data to control for differences in body weight.

According to the biochemical analysis, the experimental group had significantly higher levels of bilirubin and ammonium compared to the control group; in contrast, ALT and creatinine were higher. In this experimental setting the level of bilirubin and ammonium reflects liver function (13, 52). ALT indicates injury of hepatocytes and the elevation of creatinine levels is a mark of worse overall status of the animal and can suggest development of hepatorenal syndrome (57, 58). This suggests deteriorating liver functions in animals from the experimental group compared to the surviving animals from the control group. It is important to mention that in the latter, 5 animals with the most severe liver injury died prematurely due to liver failure and were not included in the statistical analysis. In contrast, all animals survived in the experimental group. Therefore, for the statistical evaluation, the animals with most severe liver injury from the experimental group were included. This suggests a positive effect of MSC administration. However, the effect was limited, as the data show significantly better survival in the experimental group but not improved liver function and histological parameters.

MSC have been used in several animal experiments to verify their ability to treat liver failure of different etiologies. They have been shown to have a positive effect on acute liver injuries in rodents. The bone marrow derived MSC acted through reduction of fibrosis and improvement of immunoregulatory mechanisms (55, 56). We assume that these mechanisms probably do not play a dominant role in the early phase of SOS, which may explain the limited effect of MSC administration in our study.

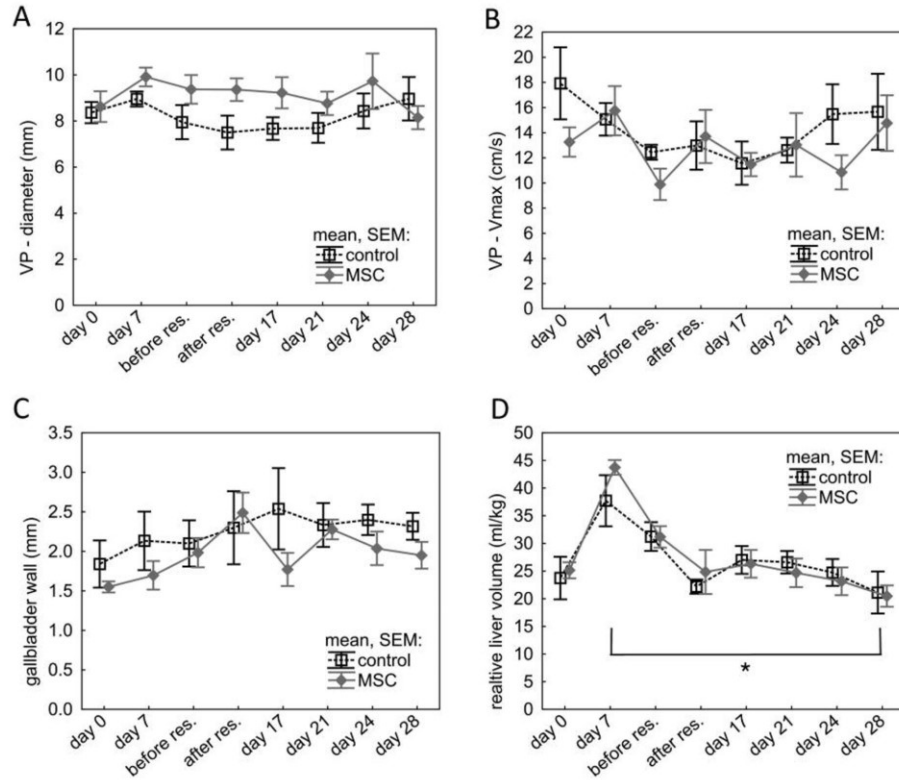


Figure 9. Results of the ultrasound examination in the experimental (MSC) and control group (control). VP stands for portal vein (A), VP – Vmax stands for maximal blood flow velocity in the extrahepatic part of the portal vein (B). The only significant difference was observed in the relative liver volume which was higher in the control group after day 7 (D). Two-way ANOVA was used for evaluation of ultrasound examination after data normalization which is described in methods. The figure shows data before normalization. * $p \leq 0.05$.

Moreover, the antifibrotic effect of MSC is probably caused by induction of MMP-9 expression (57). As increased MMP-9 activity plays a role in the pathogenesis of SOS, it is possible that the MSCs could also have a partially negative effect on the course of SOS, at least in the early phases of the disease.

Because liver fibrosis and inflammatory infiltration was apparent in later phases, it is possible that MSC administration later than day 7 would have a major effect.

However, we also chose this treatment timing according to other functions of MSCs. MSCs are able to reduce hepatocyte apoptosis and promote hepatocyte proliferation. Cytokines and growth factors (e.g. epidermal growth factor) secreted by MSC are responsible for this effect (58). The idea was to attenuate liver failure by promotion of liver regeneration and therefore enable the animals to undergo

liver resection with a better outcome. That is why day 7 was chosen as the most appropriate for MSC administration.

The ability of MSC to alleviate liver failure after resection by promotion of regeneration was confirmed by Ding *et al.* (59). They found improved survival after 90% hepatectomy in rats with a healthy liver after MSC administration via portal vein. They also observed a major increase in liver volume after MSC administration. The impact on survival of animals is in accordance with our results. However, the liver volume results are opposite to those in our experiment. In our study, ultrasonography showed smaller liver volume in MSC-treated animals. This finding cannot be simply explained as attenuated liver regeneration because animals in our study did not have a healthy liver parenchyma. In studies of resection of healthy liver parenchyma, the subsequent regeneration of liver functions

correlates with increasing liver volume (60). This relationship is not present in cases of acute SOS where the liver volume is increasing because of developing hepatomegaly while liver functions are decreasing (11). The liver volume after resection in this experiment was undoubtedly influenced by decreasing hepatomegaly. The liver volume increased only over the first three days after resection and then decreased until the end of the follow-up. The gradual remission of hepatomegaly started after day 7 and was not completed before the liver resection. The smaller liver volume in the experimental group therefore does not have a clear interpretation and can be even a sign of earlier remission of acute SOS in MSC-treated animals.

A model of the chronic or subacute type of SOS would be more accurate for correlation with clinical patients who develop SOS during chemotherapy and require liver resection because of liver metastases. Therefore, further experiments with liver resection postponed to later phases of monocrotaline-induced SOS should be performed to verify the effect of MSCs. In such an experimental setting, repeated administration of MSCs with the second dose at the time of resection would be informative. MSCs are usually administered right after liver resection, which enables them to act more effectively and support liver regeneration (59).

Conclusion

SOS was successfully induced in the pig by intraportal monocrotaline administration. Biochemical analysis, histological findings and ultrasonography confirmed the development of SOS. Intravenous administration of allogeneic MSC one week after induction of SOS improved animal survival. The liver volume after partial resection has to be evaluated with consideration of the hepatomegaly induced by acute SOS. Further experiments with different timing of liver resection and MSC administration should be performed to verify the positive effect of MSC.

Conflicts of Interest

None to be declared.

Authors' Contributions

Study conception and design: RP, VL, AM, LV; Acquisition of data: RP, JR, KB, HM, ZT, OB, AK, LB, VT; Analysis and interpretation of data: RP, VL, AM, PH, LV; Drafting of manuscript: RP, VL, AM, LV; Critical revision of manuscript: VL, PH, VT, VM, LE. All Authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The project was supported by the "Centre of clinical and experimental liver surgery" (grant UNCE/MED/006); from the European Regional Development Fund-Project "Application of

Modern Technologies in Medicine and Industry" (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007280); by the Research Fund Progress (grant Q39) and by a grant from Charles University, GA UK (462520). The Authors would like to thank to Dr. Sarah Leupen, Ph.D. for her sensitive and concise language proofreading.

References

- Chakedis J, Squires MH, Beal EW, Hughes T, Lewis H, Paredes A, Al-Mansour M, Sun S, Cloyd JM and Pawlik TM: Update on current problems in colorectal liver metastasis. *Curr Probl Surg* 54: 554-602, 2017. PMID: 29198365. DOI: 10.1067/j.cpsurg.2017.10.002
- Xu F, Tang B, Jin T-Q and Dai C-L: Current status of surgical treatment of colorectal liver metastases. *World J Clin cases* 6: 716-734, 2018. PMID: 30510936. DOI: 10.12998/wjcc.v6.i14.716
- Ito K, Govindarajan A, Ito H and Fong Y: Surgical treatment of hepatic colorectal metastasis: evolving role in the setting of improving systemic therapies and ablative treatments in the 21st century. *Cancer J* 16: 103-110, 2010. PMID: 20404606. DOI: 10.1097/PPO.0b013e3181d7e8e5
- van den Broek MAJ, Olde Damink SWM, Dejong CHC, Lang H, Malago M, Jalan R and Saner FH: Liver failure after partial hepatic resection: definition, pathophysiology, risk factors and treatment. *Liver Int* 28: 767-780, 2008. PMID: 18647141. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2008.01777.x
- Cieslak KP, Bennink RJ, de Graaf W, van Lienden KP, Besselink MG, Busch ORC, Gouma DJ and van Gulik TM: Measurement of liver function using hepatobiliary scintigraphy improves risk assessment in patients undergoing major liver resection. *HPB (Oxford)* 18: 773-780, 2016. PMID: 27593595. DOI: 10.1016/j.hpb.2016.06.006
- de Meijer VE, Kalish BT, Puder M and Ijzermans JNM: Systematic review and meta-analysis of steatosis as a risk factor in major hepatic resection. *Br J Surg* 97: 1331-1339, 2010. PMID: 20641066. DOI: 10.1002/bjs.7194
- Rubbia-Brandt L, Mentha G and Terris B: Sinusoidal obstruction syndrome is a major feature of hepatic lesions associated with oxaliplatin neoadjuvant chemotherapy for liver colorectal metastases. *J Am Coll Surg* 202: 199-200, 2006. PMID: 16377516. DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2005.09.010
- Fong Y and Bentrem DJ: CASH (chemotherapy-associated steatohepatitis) costs. *Ann Surg* 243: 8-9, 2006. PMID: 16371729. DOI: 10.1097/01.sla.0000193599.57858.9b
- Limaïem F and Bouraoui S: Chemotherapy-induced liver injury in metastatic colorectal cancer: About 48 cases. *Pan Afr Med J* 30: 1-8, 2018. PMID: 30455827. DOI: 10.11604/pamj.2018.30.198.15548.
- Valla D-C and Cazals-Hatem D: Sinusoidal obstruction syndrome. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 40: 378-385, 2016. PMID: 27038846. DOI: 10.1016/j.clinre.2016.01.006
- Coppel JA, Richardson PG, Soiffer R, Martin PL, Kerman NA, Chen A, Guinan E, Vogelsang G, Krishnan A, Giralt S, Revta C, Carreau NA, Iacobelli M, Carreras E, Ruutu T, Barbui T, Antin JH and Niederwieser D: Hepatic veno-occlusive disease following stem cell transplantation: Incidence, clinical course, and outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 16: 157-168, 2010. PMID: 19766729. DOI: 10.1016/j.bbmt.2009.08.024
- Mohty M, Malard F, Abecassis M, Aerts E, Alaskar AS, Aljurf M, Arat M, Bader P, Baron F, Bazarbachi A, Blaise D, Ciceri F, Corbacioglu S, Dalle JH, Dignan F, Fukuda T, Huynh A, Masszi T, Michallet M, Nagler A, NiChonghaile M, Okamoto S,

- Pagliuca A, Peters C, Petersen FB, Richardson PG, Ruutu T, Savani BN, Wallhult E, Yakoub-Agha I, Duarte RF and Carreras E: Revised diagnosis and severity criteria for sinusoidal obstruction syndrome/veno-occlusive disease in adult patients: A new classification from the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 51: 906-912, 2016. DOI: 10.1038/bmt.2016.130
- 13 Fan CQ and Crawford JM: Sinusoidal obstruction syndrome (hepatic veno-occlusive disease). *J Clin Exp Hepatol* 4: 332-346, 2014. PMID: 25755580. DOI: 10.1016/j.jceh.2014.10.002
- 14 Zhou H, Wang YXJ, Lou HY, Xu XJ and Zhang MM: Hepatic sinusoidal obstruction syndrome caused by herbal medicine: CT and MRI features. *Korean J Radiol* 15: 218-225, 2014. PMID: 24643319. DOI: 10.3348/kjr.2014.15.2.218
- 15 Dalle JH and Giralat SA: Hepatic veno-occlusive disease after hematopoietic stem cell transplantation: risk factors and stratification, prophylaxis, and treatment. *Biol Blood Marrow Transplant* 22: 400-409, 2016. PMID: 26431626. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.09.024
- 16 Jafari A, Wehner S, Kalf JC and Manekeller S: Sinusoidal obstruction syndrome in the animal model: influence on liver surgery. *Langenbeck's Arch Surg* 402: 115-122, 2017. PMID: 27585678. DOI: 10.1007/s00423-016-1506-0
- 17 Tamandl D, Klinger M, Eipeldauer S, Herberger B, Kaczirek K, Gruenberger B and Gruenberger T: Sinusoidal obstruction syndrome impairs long-term outcome of colorectal liver metastases treated with resection after neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg Oncol* 18: 421-430, 2011. PMID: 20844968. DOI: 10.1245/s10434-010-1317-4
- 18 Kumar A, Palek R and Liska V: A critical analysis of experimental animal models of sinusoidal obstruction syndrome. *J Clin Exp Hepatol* 9: 345-353, 2019. PMID: 31360027. DOI: 10.1016/j.jceh.2018.07.002
- 19 DeLeve LD, McCuskey RS, Wang X, Hu L, McCuskey MK, Epstein RB and Kanel GC: Characterization of a reproducible rat model of hepatic veno-occlusive disease. *Hepatology* 29: 1779-1791, 1999. PMID: 10347121. DOI: 10.1002/hep.510290615
- 20 DeLeve LD, Wang X, Kanel GC, Ito Y, Bethea NW, McCuskey MK, Tokes ZA, Tsai J and McCuskey RS: Decreased hepatic nitric oxide production contributes to the development of rat sinusoidal obstruction syndrome. *Hepatology* 38: 900-908, 2003. PMID: 14512877. DOI: 10.1053/jhep.2003.50383
- 21 Nakamura K, Hatano E, Narita M, Miyagawa-Hayashino A, Koyama Y, Nagata H, Iwaisako K, Taura K and Uemoto S: Sorafenib attenuates monocrotaline-induced sinusoidal obstruction syndrome in rats through suppression of JNK and MMP-9. *J Hepatol* 57: 1037-1043, 2012. PMID: 22796153. DOI: 10.1016/j.jhep.2012.07.004
- 22 Deleve LD, Wang X, Tsai J, Kanel G, Strasberg S and Tokes ZA: Sinusoidal obstruction syndrome (veno-occlusive disease) in the rat is prevented by matrix metalloproteinase inhibition. *Gastroenterology* 125: 882-890, 2003. PMID: 12949732. DOI: 10.1016/S0016-5085(03)01056-4
- 23 Harb R, Xie G, Lutsko C, Guo Y, Wang X, Hill CK, Kanel GC and DeLeve LD: Bone marrow progenitor cells repair rat hepatic sinusoidal endothelial cells after liver injury. *Gastroenterology* 137: 704-712, 2009. PMID: 19447108. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.05.009
- 24 Corbacioglu S and Richardson PG: Defibrotide for children and adults with hepatic veno-occlusive disease post hematopoietic cell transplantation. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 11: 885-898, 2017. PMID: 28825848. DOI: 10.1080/17474124.2017.1370372
- 25 Cheuk DKL, Chiang AKS, Ha SY and Chan GCF: Interventions for prophylaxis of hepatic veno-occlusive disease in people undergoing haematopoietic stem cell transplantation. *Cochrane database Syst Rev* CD009311, 2015. PMID: 26017019. DOI: 10.1002/14651858.CD009311.pub2
- 26 Imran H, Tleyjeh IM, Zirakzadeh A, Rodriguez V and Khan SP: Use of prophylactic anticoagulation and the risk of hepatic veno-occlusive disease in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Bone Marrow Transplant* 37: 677-686, 2006. PMID: 16489362. DOI: 10.1038/sj.bmt.1705297
- 27 Inukai T, Sugita K, Goi K, Akahane K, Hirose K, Nemoto A, Takahashi K, Sato H, Uno K, Furuichi Y, Nakamura M, Miyamoto N, Yamakawa N, Shiraishi K, Kojika S, Tezuka T, Iijima K and Nakazawa S: [Prevention of hepatic veno-occlusive disease by a combination of heparin and prostaglandin E1 in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation]. *Rinsho Ketsueki* 45: 297-303, 2004. PMID: 15168445
- 28 Nakamura K, Hatano E, Miyagawa-Hayashino A, Okuno M, Koyama Y, Narita M, Seo S, Taura K and Uemoto S: Soluble thrombomodulin attenuates sinusoidal obstruction syndrome in rat through suppression of high mobility group box 1. *Liver Int* 34: 1473-1487, 2014. PMID: 24498917. DOI: 10.1111/liv.12420
- 29 Miyata T, Tajima H, Hirata M, Nakanuma S-I, Makino I, Hayashi H, Oyama K, Miyashita T, Takamura H, Ninomiya I, Fushida S, Iseki S, Harada S-I, Wakayama T and Ohta T: Phosphodiesterase III inhibitor attenuates rat sinusoidal obstruction syndrome through inhibition of platelet aggregation in Disse's space. *J Gastroenterol Hepatol* 33: 950-957, 2018. PMID: 28960464. DOI: 10.1111/jgh.14004
- 30 Okuno M, Hatano E, Nakamura K, Miyagawa-Hayashino A, Kasai Y, Nishio T, Seo S, Taura K and Uemoto S: Regorafenib suppresses sinusoidal obstruction syndrome in rats. *J Surg Res* 193: 693-703, 2015. PMID: 25266603. DOI: 10.1016/j.jss.2014.08.052
- 31 Zhang J, Sheng Y, Shi L, Zheng Z, Chen M, Lu B and Ji L: Quercetin and baicalin suppress monocrotaline-induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome in rats. *Eur J Pharmacol* 795: 160-168, 2017. PMID: 27979702. DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.12.015
- 32 Zheng Z, Shi L, Sheng Y, Zhang J, Lu B and Ji L: Chlorogenic acid suppresses monocrotaline-induced sinusoidal obstruction syndrome: The potential contribution of NFκB, Egr1, Nrf2, MAPKs and PI3K signals. *Environ Toxicol Pharmacol* 46: 80-89, 2016. PMID: 27438897. DOI: 10.1016/j.etap.2016.07.002
- 33 Peres E, Kintzel P, Dansey R, Baynes R, Abidi M, Klein J, Ibrahim RB and Abella E: Early intervention with antithrombin III therapy to prevent progression of hepatic venoocclusive disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 19: 203-207, 2008. PMID: 18388499. DOI: 10.1097/MBC.0b013e3282f2b5d9
- 34 Richardson P, Aggarwal S, Topaloglu O, Villa KF and Corbacioglu S: Systematic review of defibrotide studies in the treatment of veno-occlusive disease/sinusoidal obstruction syndrome (VOD/SOS). *Bone Marrow Transplant*, 2019. PMID: 30804485. DOI: 10.1038/s41409-019-0474-8
- 35 Qiao J, Qi K, Chu P, Mi H, Yang N, Yao H, Xia Y, Li Z, Xu K and Zeng L: Infusion of endothelial progenitor cells ameliorates liver injury in mice after hematopoietic stem cell transplantation. *Liver Int* 35: 2611-2620, 2015. PMID: 25872801. DOI: 10.1111/liv.12849

- 36 Joseph B, Kumaran V, Berishvili E, Bhargava KK, Palestro CJ and Gupta S: Monocrotaline promotes transplanted cell engraftment and advances liver repopulation in rats *via* liver conditioning. *Hepatology* 44: 1411-1420, 2006. PMID: 17133480. DOI: 10.1002/hep.21416
- 37 Liska V, Slowik P, Eggenhofer E, Treska V, Renner P, Popp FC, Mirka H, Kobr J, Sykora R, Schlitt H-J, Holubec L, Chlumka A, Skalicky T, Matejovic M and Dahlke MH: Intraportal injection of porcine multipotent mesenchymal stromal cells augments liver regeneration after portal vein embolization. *In Vivo* 23: 229-235, 2009. PMID: 19414408.
- 38 Treska V, Fichtl J, Ludvik J, Bruha J, Liska V, Treskova I, Kucera R, Topolcan O, Lysak D, Skalicky T and Ferda J: Portal vein embolization (PVE) *versus* PVE with haematopoietic stem cell application in patients with primarily non-resectable colorectal liver metastases. *Anticancer Res* 38: 5531-5537, 2018. PMID: 30194213. DOI: 10.21873/anticancer.12888
- 39 De Miguel MP, Prieto I, Moratilla A, Arias J and Aller MA: Mesenchymal stem cells for liver regeneration in liver failure: From experimental models to clinical trials. *Stem Cells Int* 2019, 2019. PMID: 31191671. DOI: 10.1155/2019/3945672
- 40 Palek R, Liska V, Treska V, Rosendorf J, Eminger M, Tegl V, Kralickova A, Bajcurova K, Jirik M and Tonar Z: Sinusoidal obstruction syndrome induced by monocrotaline in a large animal experiment – a pilot study. *Rozhl Chir* 97: 214-221. PMID: 29792719.
- 41 Bruha J, Vycital O, Tonar Z, Mirka H, Haidingerova L, Benes J, Palek R, Skala M, Treska V and Liska V: Monoclonal antibody against transforming growth factor Beta 1 does not influence liver regeneration after resection in large animal experiments. *In Vivo* 29: 327-340, 2015. PMID: 25977378.
- 42 Schiffer E, Frossard J-L, Rubbia-Brandt L, Mentha G and Pastor CM: Hepatic regeneration is decreased in a rat model of sinusoidal obstruction syndrome. *J Surg Oncol* 99: 439-446, 2009. PMID: 19353590. DOI: 10.1002/jso.21276
- 43 Mouton PR: Principles and practices of unbiased stereology: An introduction for bioscientists. Johns Hopkins University Press, 2001.
- 44 Yang XQ, Ye J, Li X, Li Q and Song YH: Pyrrolizidine alkaloids-induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome: Pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, treatment, and outcomes. *World J Gastroenterol* 25: 3753-3763, 2019. PMID: 31391770. DOI: 10.3748/wjg.v25.i28.3753
- 45 Glavind E, Aagaard NK, Grønbaek H, Møller HJ, Orntoft NW, Vilstrup H and Thomsen KL: Alcoholic Hepatitis Markedly Decreases the Capacity for Urea Synthesis. *PLoS One* 11: e0158388, 2016. PMID: 27379798. DOI: 10.1371/journal.pone.0158388
- 46 Vilstrup H: Synthesis of urea after stimulation with amino acids: relation to liver function. *Gut* 21: 990-995, 1980. PMID: 7450564. DOI: 10.1136/gut.21.11.990
- 47 Hirata M, Tajima H, Miyashita T, Miyata T, Nakanuma S, Makino I, Hayashi H, Oyama K, Takamura H, Ninomiya I, Fushida S, Nakata H, Iseki S, Harada S, Wakayama T and Ohta T: Extravasated platelet aggregation in the livers of rats with drug-induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome. *Mol Med Rep* 15: 3147-3152, 2017. PMID: 28358421. DOI: 10.3892/mmr.2017.6407
- 48 Vreuls CPH, Driessen A, Olde Damink SWM, Koek GH, Duimel H, van den Broek MAJ, Dejong CHC, Braet F and Wisse E: Sinusoidal obstruction syndrome (SOS): A light and electron microscopy study in human liver. *Micron* 84: 17-22, 2016. PMID: 26914502. DOI: 10.1016/j.micron.2016.02.006
- 49 Dietrich CF, Trenker C, Fontanilla T, Gorg C, Hausmann A, Klein S, Lassau N, Miquel R, Schreiber-Dietrich D and Dong Y: New ultrasound techniques challenge the diagnosis of sinusoidal obstruction syndrome. *Ultrasound Med Biol* 44: 2171-2182, 2018. PMID: 30076031. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2018.06.002
- 50 Nishida M, Kahata K, Hayase E, Shigematsu A, Sato M, Kudo Y, Omotehara S, Iwai T, Sugita J, Shibuya H, Shimizu C and Teshima T: Novel ultrasonographic scoring system of sinusoidal obstruction syndrome after hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 24: 1896-1900, 2018. PMID: 29803752. DOI: 10.1016/j.bbmt.2018.05.025
- 51 Collard M, Coche E, Dragean A and Halut M: Hepatofugal portal venous flow: From normal to pathological, 2019. DOI: 10.31487/j.RDL.2019.03.10
- 52 Sharma P and Sharma BC: Lactulose for minimal hepatic encephalopathy in patients with extrahepatic portal vein obstruction. *Saudi J Gastroenterol* 18: 168-172, 2012. PMID: 22626795. DOI: 10.4103/1319-3767.96448
- 53 Gines P, Sola E, Angeli P, Wong F, Nadim MK and Kamath PS: Hepatorenal syndrome. *Nat Rev Dis Prim* 4: 23, 2018. PMID: 30213943. DOI: 10.1038/s41572-018-0022-7
- 54 Fink JC, Cooper MA, Burkhart KM, McDonald GB and Zager RA: Marked enzymuria after bone marrow transplantation: a correlate of veno-occlusive disease-induced "hepatorenal syndrome". *J Am Soc Nephrol* 6: 1655-1660, 1995. PMID: 8749694.
- 55 Fang B, Shi M, Liao L, Yang S, Liu Y and Zhao RC: Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation* 78: 83-88, 2004. PMID: 15257043. DOI: 10.1097/01.tp.0000128326.95294.14
- 56 Zhu X, He B, Zhou X and Ren J: Effects of transplanted bone-marrow-derived mesenchymal stem cells in animal models of acute hepatitis. *Cell Tissue Res* 351: 477-486, 2013. PMID: 23143676. DOI: 10.1007/s00441-012-1524-3
- 57 Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY, Kushida M, Nakao S, Niioka M, Watanabe T, Okano H, Matsuzaki Y, Shiota G and Okazaki I: Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology* 45: 213-222, 2007. PMID: 17187438. DOI: 10.1002/hep.21477
- 58 Natarajan TG and FitzGerald KT: Markers in normal and cancer stem cells. *Cancer Biomark* 3: 211-231, 2007. PMID: 17917151. DOI: 10.3233/cbm-2007-34-506
- 59 Ding HR, Wang JL, Tang ZT, Wang Y, Zhou G, Liu Y, Ren HZ and Shi XL: Mesenchymal stem cells improve glycometabolism and liver regeneration in the treatment of post-hepatectomy liver failure. *Front Physiol* 10: 1-13, 2019. PMID: 31024348. DOI: 10.3389/fphys.2019.00412
- 60 Nadalin S, Testa G, Malago M, Beste M, Frilling A, Schroeder T, Jochum C, Gerken G and Broelsch CE: Volumetric and functional recovery of the liver after right hepatectomy for living donation. *Liver Transplant* 10: 1024-1029, 2004. PMID: 15390329. DOI: 10.1002/lt.20182

Received September 10, 2020

Revised September 30, 2020

Accepted October 12, 2020

Eberlová L, Malečková A, Mik, Tonar Z, Jiřík M., Mírka H., Pálek R., Leupen S.,
Liška V.: Porcine Liver Anatomy Applied to Biomedicine. J Surg Res. 2020; 250:70-
79. IF 2,19

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.JournalofSurgicalResearch.com

Research review

Porcine Liver Anatomy Applied to Biomedicine



Eberlova Lada, MD, PhD,^{a,b,*} Maleckova Anna, MD,^{b,c} Mik Patrik, MA,^{a,c}
 Tonar Zbynek, MD, PhD,^{b,c} Jirik Miroslav, MA, PhD,^b Mirka Hynek,^{b,d}
 Palek Richard, MD,^{b,e} Leupen Sarah, BA, PhD,^f
 and Liska Vaclav, MD, PhD^{b,e}

^a Faculty of Medicine in Pilsen, Department of Anatomy, Charles University, Pilsen, Czech Republic^b Faculty of Medicine in Pilsen, Biomedical Centre, Charles University, Pilsen, Czech Republic^c Faculty of Medicine in Pilsen, Department of Histology and Embryology, Charles University, Pilsen, Czech Republic^d Department of Imaging Methods, University Hospital in Pilsen, Pilsen, Czech Republic^e Department of Surgery, University Hospital in Pilsen, Pilsen, Czech Republic^f Department of Biological Sciences, University of Maryland Baltimore County, Baltimore, Maryland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 May 2019

Received in revised form

16 December 2019

Accepted 28 December 2019

Available online xxx

Keywords:

Biomedical research

Domestic pig

Liver

Anatomy

Histology

ABSTRACT

Currently, there are at least 70 pure domestic pig breeds, but only certain breeds are used in biomedical research. The domestic pig liver is suitable for preclinical research because its size, physiology, and anatomy are similar to that of the human liver; in addition, there is a high degree of genetic similarity between the two species. For planning experiments and identifying improvements in both invasive and noninvasive methods of liver disease management, the morphological similarities and dissimilarities of the pig liver to its human counterpart must be taken into consideration along with sexual dimorphism and interindividual and interspecific variability. Recent histological evaluations based on stereological methods enable precise quantitative morphological estimates and guarantee their unbiased accuracy. The results thereof are crucial for revealing and assessing histological changes and can contribute to the optimization of study designs. New trends in computed tomography data processing have also been introduced. This review article summarizes the newest trends and findings in the field of porcine liver anatomy and histology as applicable to preclinical research.

© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

Declaration of conflict of interest: none.

Photographs used in the text are original, and the pigs from which the liver was obtained were treated in accordance with EU directive for animal experiments. The surgical and anesthesiological procedures were certified by the Commission for Work with Experimental Animals at the Pilsen Medical Faculty of Charles University, Prague, and were under the control of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic.

* Corresponding author. Faculty of Medicine in Pilsen, Department of Anatomy, Charles University, Karlovarska 48, 301 66 Pilsen, Czech Republic. Tel.: +420377593302; fax: +420377593309.

E-mail address: lada.eberlova@lfp.cuni.cz (E. Lada).

0022-4804/\$ – see front matter © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

<https://doi.org/10.1016/j.jss.2019.12.038>

Introduction

The domestic pig (*Sus scrofa domesticus*) is an even-toed ungulate mammal. Genetic evidence indicates that this species developed from the wild boar in Southeast Asia approximately 5 million years ago, and domestication began in Eurasia approximately 10,000 years ago.¹ Hence, there is a general consensus that all variations of pigs (including mini/micro/minature) descend from the Eurasian wild boar. Swine were first used in biomedical research (BMR) in the 1940s, and their use has increased since the 1960s.² More recently, molecular biology and genetics have been applied to the breeding process to enhance selection for valuable traits. At present, the number of pig breeds is uncertain, but a review of more than 70 pure domestic pig breeds from all over the world is maintained on The Pig Site.³ Most of these breeds are primarily used for consumption, but certain small breeds are also used for BMR.⁴ Because the porcine genome, which consists of 18 autosomes and 2 sex chromosomes, has been sequenced and its extensive homology to humans has been demonstrated,⁵ genetically modified pigs have played an important role in translational studies focused on numerous diseases, including cancer, diabetes mellitus, Alzheimer's disease, cystic fibrosis, and Duchenne muscular dystrophy.⁶ In addition, because the structure and function of the porcine cardiovascular, renal, and gastrointestinal organs are similar to those of humans,⁷ these organs are extensively used in experimental surgery to test surgical techniques and experimental therapies^{4,8} before their use in humans (Table 1). In addition, the swine can live up to 10 years, thereby allowing the researchers long-term follow-up after experimental procedures.

The small pigs used in BMR, from an anatomical and physiological perspective, are similar to the domestic swine. The advantages of their small size are obvious: these pigs are easy to handle and house, and they require less food and test substances than larger pigs. Therefore, certain small breeds are predominantly used in pharmacology and toxicology studies for the testing of new drugs and medical devices⁴² (Table 1). Nevertheless, the availability of small breeds is limited.

Porcine liver gross anatomy

In terms of gross anatomy, from four to six liver lobes have been described in pigs (Table 2), and the right and left hemilivers are separated by a deep notch for the round ligament (Fig. 1A and B). The number and size of the lobes (segments) reported varies and thus may be breed-specific. Only the following five lobes are invariably present: the left lateral, left medial, right lateral, right medial, and the caudate lobe. From our experience with the Prestice Black-Pied pig breed,⁴⁵ which is in agreement with the veterinary anatomical textbooks,⁴⁹ the quadrate lobe is present occasionally (Fig. 1B and D). There also seems to be interbreed variability in the lobe proportions. Court et al.⁵⁰ found the left lateral lobe to be the largest, whereas Bekheit et al.,³⁵ based on computed tomography (CT) volumetry, assessed the right medial lobe to be the most voluminous.

Table 1 – Porcine liver applications in biomedical research.

Objects of research	References	Breed
Ablation, resection	9	Guangxi Bama minipig
	10	Wuzhishan pig
	11	Not mentioned
Biomechanics	12	Not mentioned
	13	Ecologically bred animals of various origins
Gene therapy	14,15	HSD11B1-transgenic pig
Imaging techniques, diagnostics	16	Duroc, Pietrain, Landrace, large white pig
	17	Bama miniature pig
Innovation of surgical techniques	18-21	Landrace pig
	19	Landrace pig
	21	Bama miniature pig
Liver transplantation	22	Micromini pigs (Fuji Micra Inc., Shizuoka, Japan)
	23	Landrace pig
	24	GalT-KO pig
Liver traumatology	25	Yorkshire-Landrace pig
	26	German domestic pig
	27,28	Not mentioned
Material testing	29	Chinese experimental hybrid pigs
	30	German Landrace pigs
	31	Not mentioned
Mathematical modeling, quantification	32	Prestice Black-Pied pig
	33	Prestice Black-Pied pig
	34	Prestice Black-Pied pig
Morphology, physiology	35	White pig
	36	Prestice Black-Pied pig
	37	Prestice Black-Pied pig
Pathogenesis, liver failure	38	Specific pathogen-free piglet
	39	Bama experimental miniature pig
	40	Bama experimental miniature pig
Pharmacology, toxicology	41	Prestice Black-Pied pig
	42	Minipig, review
	43	Landrace × large white pig
Regeneration	44	Not mentioned
	45	Polish white pig
	41,46,47	Prestice Black-Pied pig

In the pig, eight segments roughly similar to those in the human liver have been described⁵⁴⁻⁵⁶ (Tables 2 and 3; Fig. 1A and B). However, both the differences between pigs and

Table 2 – Liver segmental anatomy, literature review.

Breed	No of lobes	Name of the lobes	No of segments	Reference
Not mentioned	5	Right lateral, right medial, left lateral, left medial, caudate	8	³⁵
Not mentioned	5	Right, left, right medial, left medial, caudate	8	⁵⁰
Prestice Black-Pied pig	5 (6)	Right lateral, right medial, left lateral, left medial, caudate, quadrate occasionally	Not mentioned	³⁴
Not mentioned	4	Right, left, right paramedian, left paramedian	8	⁵¹
Prestice Black-Pied pig	6	Right lateral, right medial, left lateral, left medial, caudate, quadrate		³⁶
Not mentioned	3	Not named	8	⁵²
Not mentioned	5	Right, left, right middle, left middle, caudate	8	⁵³

humans and among breeds of pigs must be taken into account in extrapolating from porcine to human liver surgery. Unlike in the human liver, the so-called Rex-Cantlie line that divides the embryological and morphological right and left hemiliver is well marked in pigs by the deep notch for the round ligament, fissura ligament teretis (Fig. 1A and B). This line can be seen after ligation of the right or left lobar branch of the portal vein (PV).⁸ However, owing to the intraparenchymal thin-walled caudal vena cava (Fig. 1D), resection of the right lateral lobe in the pig liver is extremely difficult. The liver hilum is located dorsally on the visceral surface, and the PV ramifies a few centimeters outside the parenchyma out to the right lobe.^{50,53} The hepatic artery, the portal vein, and the common hepatic duct branch are accompanied by considerable connective tissue (Fig. 1B) that derives from the

perivascular fibrous capsule (of Glisson) and forms pedicles very similar to the ones found in the human liver.^{55,56} The gallbladder lies within the substance of the right medial lobe, if present, and it separates this lobe from the quadrate lobe⁴⁹ (Fig. 1B–D).

Although the PV supplies up to 90% of the blood volume and up to 2/3 of the oxygen supply to the liver, the hepatic artery proper is irreplaceable for its supply of the biliary tree (Fig. 1C). In experimental studies, embolization or ligation of a PV branch was used to stop the blood flow throughout a part of the liver. In this procedure, the part of the liver with restricted blood flow atrophies, whereas the rest of the tissue hypertrophies.⁸ This method is also used in human subjects, for example, in patients with colorectal carcinoma metastasis in the right liver lobe; after intestinal surgery and also most often

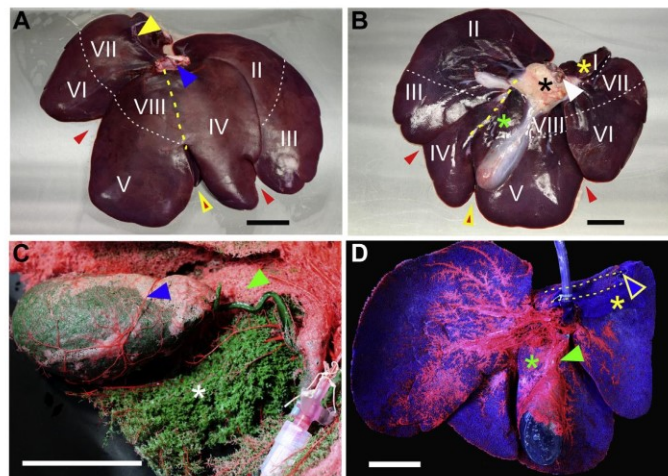


Fig. 1 – Porcine liver gross anatomy and corrosion casts, Prestice Black-Pied breed. (A, B) Segmental anatomy, diaphragmatic (A) and visceral surface (B). Interlobal notches (red arrowheads), notch for the ligamentum teres (yellow-red arrowheads), Rex-Cantlie line (yellow lines), coronary ligament (yellow arrowhead), caudal vena cava (blue arrowhead), portal vein (white arrowhead), hepatoduodenal ligament (black asterisk), caudate lobe (yellow asterisk), and quadrate lobe (green asterisk). (C, D) Vascular corrosion cast, filling with colored Biodur E20 Plus (Heidelberg, Germany) via the hepatic portal vein (blue), hepatic artery (red) and bile duct (green). Caudate lobe (yellow asterisk), quadrate lobe (green asterisk), cystic artery (blue arrowhead), capillary network of the cystic duct (green arrowheads), bile ductules (white asterisk), caudal vena cava course (yellow line), and orifice (yellow-blue arrowhead.) Scale bars = 5 cm. (Color version of figure is available online.)

Table 3 – Porcine liver lobes and segments according to Court et al.⁵⁰ and Zanchet and Monteiro.⁵³

Corresponding parenchyma	Segment
Caudate lobe	S I
Left lateral lobe	S II, III
Left medial lobe	S IV
Right medial lobe	S V, VIII
Right lateral lobe	S VI, VII

after chemotherapy, embolization of the right PV is performed (the arterial supply is preserved to avoid necrosis.) The lobe with metastasis atrophies, whereas the contralateral lobe undergoes compensatory hypertrophy, which, after several weeks (provided that the parenchyma is functionally sufficient), allows for the resection of the part with the malignant deposit. Unfortunately, the growth of the nonoccluded liver is not always sufficient to avoid liver failure. Therefore, experimental studies using the porcine liver model for testing various occlusive methods and/or pharmacological treatments have been designed.^{8,46,57}

Porcine liver microanatomy

For studies of human liver diseases using the porcine liver model, detailed knowledge of liver microanatomy is necessary. The tissue structure of the porcine liver is similar to that

of the human liver.⁷ The parenchymal architecture is organized into well-defined, polygonal lobules centered around the central vein with portal triads at its corners (Figs. 2A and C, 3A–C). The portal lobules are demarcated by fibrous septa containing variable amounts of connective tissue (Fig. 3A–E). Three-dimensional (3-D) reconstruction of the porcine liver has revealed that the morphological lobule is pentagonal rather than hexagonal as it is described in humans.⁵⁸ However, the exact size and shape of portal lobules in the porcine liver and their spatial organization remain unknown.

The functional acinar concept, first described in the human liver by Rappaport,⁵⁹ divides the parenchyma into three concentric zones based on the perfusion of the liver: the classical lobule, portal lobule and acinus. As per this scheme, “metabolic zonation” refers to the differences in expression of the key metabolic genes in hepatocytes (HEPs) within different zones of the liver lobule; this zonation corresponds, to some degree, to the zones of the hepatic acinus.⁶⁰ However, this set of concepts is not sufficient to explain all the physiological and pathological processes in the liver.⁶¹

The morphometry and distribution of HEPs within the porcine liver was assessed by Junatas et al.³⁶ In healthy pigs of the Prestice Black-Pied breed,⁴⁸ each lobe contained HEPs of a comparable size, nuclearity, and density. However, the size and density were not uniformly distributed when comparing the different regions of the liver in relation to the hepatic vasculature (peripheral, paracaval, and periportal regions.) The reported fraction of binuclear HEPs, possibly linked to liver regeneration, was 4%. Interestingly, the number of nuclei

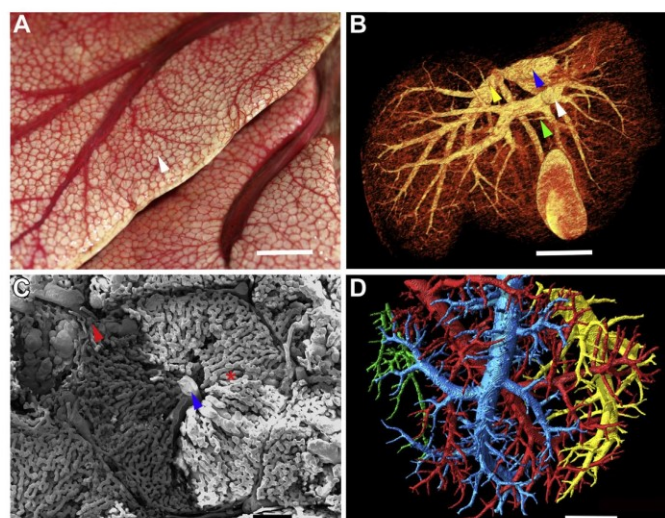


Fig. 2 – Vascular corrosion casts of pig liver, Prestice Black-Pied breed. Filling with colored Biodur E20 via the hepatic artery (A–C) and portal vein (B–D). (A) Classical hepatic lobule (white arrowhead) before corrosion. (B) Macro-CT, volume rendering technique. Syntopic view of portal and hepatic venous systems; hepatic vein (yellow arrowhead), portal vein (white arrowhead), hepatic duct (green arrowhead), and caudal vena cava (blue arrowhead). (C) Classical hepatic lobule in scanning electron microscopy. Portal triad in portal space (red arrowhead), sinusoids (red asterisk), and central vein (blue arrowhead). (D) Micro-CT, 3-D reconstruction, cast filled via the portal vein. Scale bars: 1 cm (A, D), 5 cm (B), 200 μ m (C). (Color version of figure is available online.)

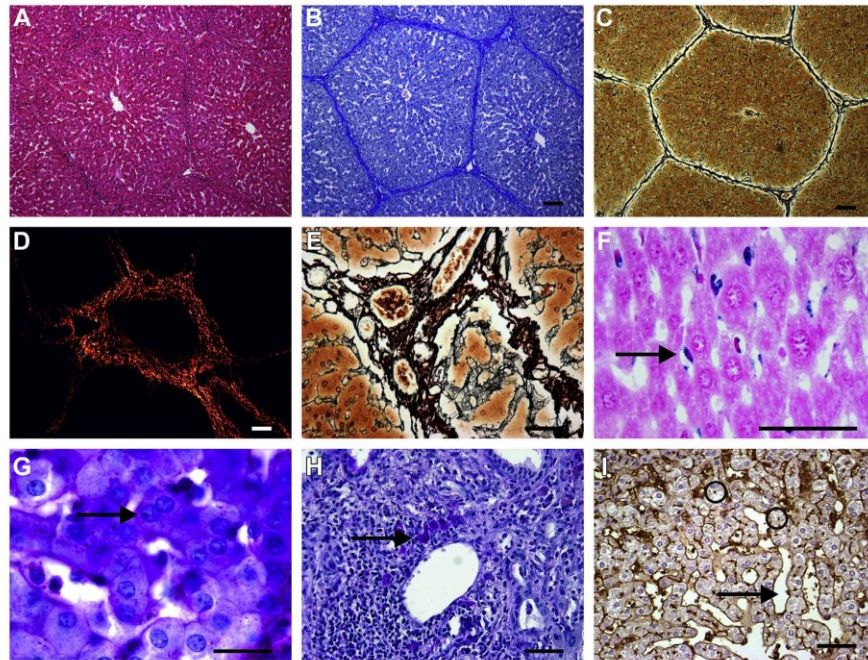


Fig. 3 – Porcine liver microanatomy in various histological staining methods. Hematoxylin and eosin staining (A), anilin blue staining counterstained with nuclear fast red: detection of collagen (B), Gomori reticulin staining: detection of reticular fibers (C, E), picosirius red staining in polarized light: detection of collagen I and III (D), Periodic acid-Schiff staining (G, H), lectin histochemistry staining using *Ricinus communis* Agglutinin lectin (I). (A-C) Demonstration of hepatic lobules clearly demarcated by connective tissue. (D, E) Detail of portal space containing bile ducts and branches of hepatic artery and portal vein surrounded by connective tissue. (F) Hepatic stellate cells (arrow). (G) Binuclear hepatocyte (arrow). (H) Cluster of Kupffer cells after phagocytosing cellular debris (arrow), a typical hallmark of hepatitis. (I) Discontinuous endothelium of hepatic sinusoids (arrow) and bile canaliculi formed by apical membranes of adjacent hepatocytes (circles). Scale bars: 100 μ m (A-C), 50 μ m (D-I). (Color version of figure is available online.)

does not always correspond with the ploidy of HEPs.⁶² However, the morphometry and distribution of HEPs was not mapped with respect to their position within the classical morphological hepatic lobules and liver acini.⁶³ Data on lobular and acinar distribution would provide valuable information concerning the role of HEPs in pathological processes, which predominantly involve the acinar zones. In addition, an estimation of the total number of HEPs within the different lobes⁶⁴ would serve as a powerful tool for comparing the functional capacity and regenerative potential of the hepatic lobes after a partial hepatectomy.^{47,65}

The exocrine function of the liver, bile production, is morphologically represented by a delicate intralobular network of channels, bile canaliculi (Fig. 3I), which drain the bile into the interlobular bile ducts. Hepatic sinusoids (Figs. 2C and 3I) are low-pressure vessels that lie between plates of HEPs and are lined by specialized endothelial cells and fixed macrophages called Kupffer cells (KCs) (Fig. 3H). The integrity of KCs has been linked to hepatocellular proliferation and

thus presumably plays a role in liver regeneration.⁶⁶ A recent study on the rat liver revealed that female rats have a greater number of HEPs and KCs and a larger fraction of binuclear cells than males.⁶³ These findings indicate a higher regenerative potential of the female liver. The stellate cells (Fig. 3F), which are also called Ito cells or fat-storing cells, are located in the perisinusoidal space (of Disse) between the HEPs and the sinusoids. They contain lipids that are involved in vitamin A metabolism and also play a leading role in fibrogenesis.⁶⁷

In the pig, design-based stereology^{64,68} (Fig. 4) has been demonstrated to be a powerful tool for assessing numerous morphological characteristics, namely, the number of HEPs and the amount of connective tissue within the porcine liver.^{36,37} Generating data on the morphometry and distribution of liver cells, together with the 3-D architecture of the vascular and biliary systems, could be the next step in understanding of liver function and pathophysiology and could increase the potential of successful xenotransplantation.⁶⁹ The evidence indicating that the liver is a sexually

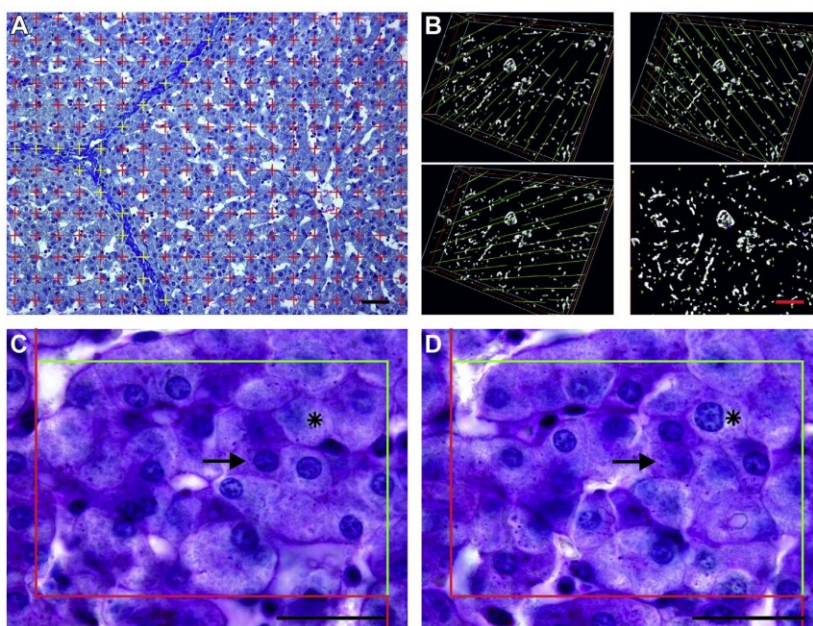


Fig. 4 – Demonstration of stereological methods for quantitative assessment in porcine liver. Point grid⁶⁸ used for the quantification of the connective tissue fraction, aniline blue with nuclear fast red staining. Points over the connective tissue within the predetermined area are highlighted in yellow (A). (B) Estimating the surface of microvessels in a series of μ -CT scans of vascular corrosion cast using the fakir probe consisting of an isotropic grid with three differently oriented, perpendicular sets of probes with random initial orientation. Length of the probe intersections with the microvessel profiles is proportional to their surface (B). Demonstration of optical dissector for estimating the numerical density of hepatocytes in two optical sections (C, D). The cell profiles with nuclei in focus in the bottom reference plane (C) and absent or out of focus in the look-up plane (D) that lie inside the counting frame or touch the green allowance borders but do not cross the red forbidden borders are counted (black arrow). The hepatocyte in focus in the look-up plane is not counted (marked with asterisk.) Scale bars: 50 μ m (A), 100 μ m (B); 20 μ m (C, D). (Color version of figure is available online.)

dimorphic organ warrants consideration in the planning of experiments.^{37,63} Sufficient and systematic sampling is crucial for detecting the biological differences in liver tissue when studying liver regeneration, the pathophysiological mechanisms of liver diseases or the toxicity of drugs.⁶⁴

Liver connective tissue

Most types of chronic liver diseases lead to liver fibrosis and/or eventually to cirrhosis, that is, to the excessive accumulation of extracellular matrix, including fibrillar collagen. Staging and grading of liver fibrosis is a significant histopathological evaluation.^{61,70} In the human, six specific foci of liver fibrogenesis have been proposed for scoring. Namely, the portal, pericellular (perisinusoidal), pericentral (perivenular), centrilobular, ductal (periductal), and ductular fibrosis can be distinguished.⁶¹ The type and extent of fibrosis describes both the architecture of connective tissue and its amount and

measures how far the liver disease has progressed to its end stage—liver cirrhosis. In addition, the grade of the liver disease reflects the speed at which the disease will progress to its end stage. The amount and the architecture of connective tissue in the human liver is usually estimated during routine analysis of liver biopsies, usually as per one of the three most widely used scoring systems.⁷¹ However, the subjectivity and hence the lack of reproducible results of this routine biopsy scoring have been articulated.⁷²

For the study of the mechanisms of origin and spread of fibrosis, and also to assess the liver regenerative capacity, both small and large animals are widely used. However, small animal models have limitations due to their size and differential susceptibility to toxic agents or pathogens.⁷³⁻⁷⁵ A challenge in evaluating fibrosis using this model is that the normal porcine liver microscopically resembles fibrosis in the human; porcine liver lobules are clearly demarcated by the interlobular connective tissue septa that meet in the portal area (Fig. 3A–D). Moreover, according to the quantitative studies,

the distribution of intralobular and interlobular connective tissue in the healthy domestic pig varies with respect to sex and location within the liver.³⁷ In addition, the mean area fraction of the interlobular connective tissue is greater in male pigs; significant differences have also been found among individuals and liver lobes. Owing to the quantitative methods that provide us with objective and reproducible data, when both the sex of specimen and the position of the harvested tissue block are taken into account, more precise quantitative estimates can be achieved.^{37,64,76}

Corrosion casting

Perfusion is a key element to understand the physiology and regeneration of any organ. Because of having two blood inputs, liver perfusion is very complicated, and research is based on the analysis of the geometrical model of the vascular tree. To obtain the highest authenticity model of the 3-D vascular bed, vascular corrosion casts (VCCs) have been used for many decades.^{50,52,53,77} Current casting materials are able to fill the entire vascular bed, which needs to be preserved free from gas and blood clots. As it is almost impossible to obtain a human liver with these characteristics,⁷⁸ the porcine liver model is irreplaceable.⁷⁹ The gap between 2-D histological studies and 3-D microarchitecture can be bridged using X-ray microtomography—micro-CT.^{32,80} Micro-CT data of liver VCC represent another source to provide microvascular morphometry.³³ Using differently colored resins in the VCC (Figs. 1C and D, 2A) is also useful for teaching anatomy, as it enables the student to distinguish the vascular (biliary) beds and differentiates fine structures that cannot otherwise be demonstrated.^{34,81}

Computer vision algorithms in pig liver research

To model liver anatomy and the processes in the liver parenchyma, it is necessary to create macroscopic and microscopic models of the vascular bed. Obtaining imaging data with the required resolution from human patients are not possible for technical reasons, so the porcine liver model is often used. Many kinds of software have been designed to

analyze images from 3-D imaging devices; most of them were developed with regard to clinical practice. For the specific requirements of pig liver anatomy research, however, special software needed to be developed.^{37,82,83}

To extract the shape of the liver parenchyma and the macroscopic model of the vascular system, macro-CT with a resolution of ~1 mm was performed using pig liver corrosion casts (Fig. 2B). Segmentation of the liver parenchyma by the macro-CT was performed interactively by the modified graph-cut algorithm⁸³ available in the Lisa application.^{37,82} The pre-processing was carried out by resampling to a voxel size of 2 mm. Voxels representing the subject of interest (e.g., liver parenchyma) and background (other tissues) were selected. Of these, an intense Gaussian mixture model with three foreground and background components was created. Vascular bed segmentation was performed by a modified connected threshold algorithm. In postprocessing, binary morphological operations were applied. Extraction of the microvascular bed geometry was performed using the image data acquired from micro-CT with a resolution of ~2 μm (Fig. 2D). For the flow modeling and the vascular bed quantitative description, the software Quantan can be used³³ to estimate the radius, length, tortuosity, and branching angles. The application also enables the evaluation of the number of microvessel segments, the volume fraction, as well as the surface and length densities. Semiautomatic subtraction facilitates the evaluator's work and allows for more precise estimates.

Challenges and pitfalls of pig liver utilization in biomedical research

The domestic pig as an experimental animal was critical to many of the key shifts in research on serious human diseases. Although the detailed knowledge of (micro) anatomy is crucial both for designing and evaluation of most experiments, it is interesting that very few breed-related and/or gender-sensitive studies have been published on the anatomy of porcine organs yet. For this reason, we found useful to summarize the current knowledge of (micro) anatomy of the porcine liver to point out critical points in planning and assessment of studies conducted in this animal model (Table 4). Given the size of porcine organs and vast biological

Table 4 – Morphological differences between the normal porcine and human liver, based on Prestice Black-Pied pig breed.⁴⁸

Gross anatomy	Histology
<p>Pig: Deep fissures marking well-marked lobation, right and left hemiliver divided by the notch for ligamentum teres.^{8,79}</p> <p>Human: External lobation does not correspond to the functional (i.e. surgical) anatomy: three main fissures are not visible on the surface and contain three main hepatic veins; they divide the liver into four portal sectors; right and left hemiliver divided by Cantlie's line.⁵⁴</p>	<p>Pig: Irregular, rather pentagonal hepatic lobules (Fig. 2A) clearly demarcated by connective tissue septa (Fig. 3A–C). Caution, normal porcine liver microscopically resembles fibrosis in the human; more connective tissue in males.³⁷</p> <p>Human: Roughly hexagonal hepatic lobules,⁶¹ no interlobular septa, connective tissue found in interlobular space.⁸⁶</p>
<p>Pig: Superficial, extraparenchymal portal vein (PV) lobar branching visible from the visceral surface (Fig. 1D), the caudal caval vein runs through the left lateral lobe.^{50,53}</p> <p>Human: PV divides into the right and left branches at the hilum; only the left PV invariably gives extraparenchymal branches to segment I and sometimes IV.⁸⁶</p>	

variability, it is clear that morphological studies cannot be carried out without the use of stereological procedures.⁶⁸ Unbiased stereology also allows for setting up sampling optimization—the latest studies revealed different tissue structure depending on the sampling location.^{36,37,51,84} These procedures can be advantageously used also for evaluation in imaging methods such as (micro)CT or magnetic resonance imaging.⁸⁵

In experimental medicine, the pig liver is preferably used as a large animal model of acute liver disease and/or liver failure as it is suitable for extracorporeal circulation, repetitive blood sampling, and training of surgical techniques applicable to humans, for example, partial hepatectomies, orthotopic liver transplantation, or PV arterialization.⁸⁷ Unlike small animals, experiments on pigs and other large animal models are limited because of technically demanding treatment and higher financial costs that result in smaller cohorts, which due to considerable interindividual variability makes statistical evaluation and interpretation of results difficult.

Conclusions

A variety of modern pig breeds are available today, and they have been increasingly used in biomedical research. Despite recent efforts to obtain detailed knowledge of pig liver macroanatomy and microanatomy, very little is still known in accordance with biological variability, and certain issues need to be addressed for the appropriate translation of animal observations to clinical testing. Quantitative results based on stereology guarantee unbiased estimates that are able to reveal even subtle histological changes, and it is also possible to optimize the algorithm for study designs in accordance with sex, breed, or position of the harvested tissue block. Newly developed software is able to process data obtained from (micro)CT for 3-D reconstructions, quantitative estimations, and morphometrics, which is highly consistent with manual counting techniques. Volumetric data extracted from computer imaging methods can be used to model liver perfusion and optimal liver resection.

Acknowledgment

Funding sources: This work was supported from European Regional Development Fund, European Union-Project “Application of Modern Technologies in Medicine and Industry” [grant number CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007280], by Charles University in Prague, Czechia [grants SVV number 260390 and 260392 and GAUK number 1206417]; Research Fund Progress [grant Q39] and by the “Center of Clinical and Experimental Liver Surgery” [grant UNCE/MED/006]. Micro-CT scanning was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports under the National Sustainability Program I [projects CENTEM number CZ.1.05/2.1.March 00, 0088, CENTEM PLUS number LO1402 and LO1503 and Program I (NPU I) No. LO1503].

Author contribution: Eberlova Lada contributed the main conceptual idea and wrote most of the article; Maleckova Anna cowrote the article and provided histological figures;

Mik Patrik cowrote the article; and Tonar Zbynek provided critical revision and helped shape the manuscript. Palek Richard carried out literature research and analysis; Sarah Leupen performed language proofreading; Jirik Miroslav cowrote the article; Mirka Hynek provided CT scans and helped shape the manuscript; and Liska Vaclav provided critical revision and helped shape the manuscript.

Disclosure

The authors reported no proprietary or commercial interest in any product mentioned or concept discussed in this article.

REFERENCES

- Larson G, Dobney K, Albarella U, et al. Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science*. 2005;307:1618–1621.
- Bustad LK, McClellan RO. Swine in biomedical research. *Science*. 1966;152:1526–1530.
- Breeds guide | The Pig Site. Available at: <https://thepigsite.com/>. Accessed March 21, 2019.
- Swindle MM. *Swine in the Laboratory: surgery, Anesthesia, imaging, and experimental techniques*. 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC press; 2016.
- Groenen MAM, Archibald AL, Uenishi H, et al. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature*. 2012;491:393–398.
- Perleberg C, Kind A, Schnieke A. Genetically engineered pigs as models for human disease. *Dis Model Mech*. 2018;11. <https://doi.org/10.1242/dmm.030783>.
- Lossi L, D'Angelo L, De Girolamo P, Merighi A. Anatomical features for an adequate choice of experimental animal model in biomedicine: II. Small laboratory rodents, rabbit, and pig. *Ann Anat*. 2016;204:11–28.
- Liska V, ed. *Experimental Surgery*. Plzen: Nava Publishing; 2016.
- Jiang K, Chen J, Liu Y, et al. Heat-irrigate effect' of radiofrequency ablation on relevant regional hepatocyte in living swine liver-initial study on pathology. *Cell Biochem Biophys*. 2015;72:37–41.
- Dong J, Geng X, Yang Y, et al. Dynamic imaging and pathological changes in pig liver after MR-guided microwave ablation. *BMC Cancer*. 2018;18:397.
- Smolock AR, Cristescu MM, Vlasisavljevich E, et al. Robotically assisted sonic therapy as a noninvasive nonthermal ablation modality: proof of concept in a porcine liver model. *Radiology*. 2018;287:485–493.
- Wex C, Stoll A, Fröhlich M, Arndt S, Lippert H. How preservation time changes the linear viscoelastic properties of porcine liver. *Biorheology*. 2013;50:115–131.
- Wex C, Stoll A, Fröhlich M, Arndt S, Lippert H. Mechanics of fresh, frozen-thawed and heated porcine liver tissue. *Int J Hyperthermia*. 2014;30:271–283.
- Carreño O, Sendra L, Montalvá E, et al. A surgical model for isolating the pig liver in vivo for gene therapy. *Eur Surg Res*. 2013;51:47–57.
- Kang HY, Choi Y-K, Jeong YI, et al. Immortalization of porcine 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1-transgenic liver cells using SV40 large T antigen. *Int J Mol Sci*. 2017;18:2625.
- Xiberta P, Boada I, Bardera A, Font-i-Furnols M. A semi-automatic and an automatic segmentation algorithm to remove the internal organs from live pig CT images. *Comput Electron Agric*. 2017;140:290–302.

17. Xie L-T, Xu D-X, Tian G, et al. Value of two-dimensional shear wave elastography for assessing acute liver congestion in a bama mini-pig model. *Dig Dis Sci*. 2018;63:1851–1859.
18. Court FG, Laws PE, Morrison CP, et al. Subtotal hepatectomy: a porcine model for the study of liver regeneration. *J Surg Res*. 2004;116:181–186.
19. Glowka TR, Standop J, Paschenda P, Czaplik M, Kalff JC, Tolba RH. Argon and helium plasma coagulation of porcine liver tissue. *J Int Med Res*. 2017;45:1505–1517.
20. Vrochides D, Kardassis D, Ntinias A, et al. A novel liver parenchyma transection technique using locking straight rigid ties. An experimental study in pigs. *J Invest Surg*. 2014;27:106–113.
21. Zhang Z-B, Gao W, Liu L, Shi Y, Ma N, Shen Z-Y. Development and assessment of normothermic machine perfusion preservation for extracorporeal splitting of pig liver. *Ann Transplant*. 2017;22:507–517.
22. Okada N, Mizuta K, Oshima M, et al. A novel split liver protocol using the subnormothermic oxygenated circuit system in a porcine model of a marginal donor procedure. *Transplant Proc*. 2015;47:419–426.
23. Vogel T, Brockmann JG, Pigott D, et al. Successful transplantation of porcine liver grafts following 48-hour normothermic preservation. *PLoS One*. 2017;12:e0188494.
24. Louras N, Patel M, Shah J, Sachs D, Vagefi P. Biochemistry profiles following pig-to-nonhuman primate liver xenotransplantation. *Am J Transplant*. 2018;18:763–764.
25. Determan C, Anderson R, Becker A, et al. Fed state prior to hemorrhagic shock and polytrauma in a porcine model results in altered liver transcriptomic response. *PLoS One*. 2014;9:e100088.
26. Fröhlich M, Hildebrand F, Weuster M, et al. Induced hypothermia reduces the hepatic inflammatory response in a swine multiple trauma model. *J Trauma Acute Care Surg*. 2014;76:1425–1432.
27. Eschbach D, Horst K, Sassen M, et al. Hypothermia does not influence liver damage and function in a porcine polytrauma model. *Technol Health Care*. 2018;26:209–221.
28. Mylonas AI, Orfanos NF, Karmanioliou II, et al. The effects of hemorrhagic shock secondary to hepatectomy in a swine model. *J Surg Res*. 2015;195:228–234.
29. Tao L, Li Q, Ren H, et al. Repair of extrahepatic bile duct defect using a collagen patch in a Swine model. *Artif Organs*. 2015;39:352–360.
30. Tanaka H, Fukushima K, Srinivasan PK, et al. Efficacy of the novel medical adhesive, MAR-VIVO-107, in an acute porcine liver resection model. *Surg Innov*. 2017;24:423–431.
31. Fu YB, Chui CK. Modelling and simulation of porcine liver tissue indentation using finite element method and uniaxial stress-strain data. *J Biomech*. 2014;47:2430–2435.
32. Králíčková A, Eberlová L, Kalusová K, et al. Quantification of liver microcirculation using X-ray microtomography of vascular corrosion casts. *Key Eng Mater*. 2014;592:505–508.
33. Jiřík M, Tonar Z, Králíčková A, et al. Stereological quantification of microvessels using semiautomated evaluation of X-ray microtomography of hepatic vascular corrosion casts. *Int J Comput Assist Radiol Surg*. 2016;11:1803–1819.
34. Eberlova L, Liska V, Mirka H, et al. The use of porcine corrosion casts for teaching human anatomy. *Ann Anat*. 2017;213:69–77.
35. Bekheit M, Bucur PO, Wartenberg M, Vibert E. Computerized tomography-based anatomic description of the porcine liver. *J Surg Res*. 2017;210:223–230.
36. Junatas KL, Tonar Z, Kubíková T, et al. Stereological analysis of size and density of hepatocytes in the porcine liver. *J Anat*. 2017;230:575–588.
37. Mik P, Tonar Z, Malecková A, et al. Distribution of connective tissue in the male and female porcine liver: histological mapping and recommendations for sampling. *J Comp Pathol*. 2018;162:1–13.
38. Rogée S, Le Gall M, Chafey P, et al. Quantitative proteomics identifies host factors modulated during acute hepatitis E virus infection in the swine model. *J Virol*. 2015;89:129–143.
39. Wang J, Sun Z, Jiang J, et al. Proteomic signature of acute liver failure: from discovery and verification in a pig model to confirmation in humans. *Mol Cell Proteomics*. 2017;16:1188–1199.
40. Liska V, Treska V, Mirka H, et al. Inhibition of transforming growth factor beta-1 augments liver regeneration after partial portal vein ligation in a porcine experimental model. *Hepatogastroenterology*. 2012;59:235–240.
41. Yu R, Zhang Y, Lu Q, et al. Differentially expressed genes in response to cyadox in swine liver analyzed by DDRT-PCR. *Res Vet Sci*. 2018;118:72–78.
42. Swindle MM, Makin A, Herron AJ, Clubb FJ, Frazier KS. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Vet Pathol*. 2012;49:344–356.
43. Lee KS, Santagostino SF, Li D, et al. Catheter-directed intraportal delivery of endothelial cell therapy for liver regeneration: a feasibility study in a large-animal model of cirrhosis. *Radiology*. 2017;285:114–123.
44. Bartas M, Cerven J, Oppelt J, et al. Liver regeneration during the associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy procedure in *Sus scrofa* is positively modulated by stem cells. *Oncol Lett*. 2018;15:6309–6321.
45. Filippini F, Leoncini G, Campatelli A, et al. Segmental organization of the pig liver: anatomical basis of controlled partition for experimental grafting. *Eur Surg Res*. 1995;27:151–157.
46. Liska V, Treska V, Mirka H, et al. Interleukin-6 augments activation of liver regeneration in porcine model of partial portal vein ligation. *Anticancer Res*. 2009;29:2371–2377.
47. Bruha J, Vycital O, Tonar Z, Mirka H, Haidingerova L. Monoclonal antibody against transforming growth factor beta 1 does not influence liver regeneration after resection in large animal experiments. *In Vivo*. 2015;340:327–340.
48. Vrtková I. Genetic admixture analysis in prehistoric black-pied pigs. *Arch Anim Breed*. 2015;58:115–121.
49. König HE, Liebich HG, eds. *Anatomie domacích savců, 2. díl*. Bratislava: H & H; 2013:70–76.
50. Court FG, Wemyss-Holden SA, Morrison CP, et al. Segmental nature of the porcine liver and its potential as a model for experimental partial hepatectomy. *Br J Surg*. 2003;90:440–444.
51. Witter K, Tonar Z, Schöpfer H. How many layers has the adventitia? Structure of the arterial tunica externa revisited. *Anat Histol Embryol*. 2017;46:110–120.
52. Lehmann KS, Ritz J-P, Valdeig S, et al. Portal vein segmentation of a 3D-planning system for liver surgery—in vivo evaluation in a porcine model. *Ann Surg Oncol*. 2008;15:1899–1907.
53. Zanchet DJ, Montero EF. Pig liver sectorization and segmentation and virtual reality depiction. *Acta Cir Bras*. 2002;17:381–387.
54. Couinaud C. [Liver lobes and segments: notes on the anatomical architecture and surgery of the liver]. *Presse Med*. 1954;62:709–712.
55. Martins AC, Machado MA, Ferraz AA. Porcine liver: experimental model for the intra-hepatic glissonian approach. *Acta Cir Bras*. 2008;23:204–207.
56. Nykonenko A, Vavra P, Zonca P. Anatomic peculiarities of pig and human liver. *Exp Clin Transplant*. 2017;15:21–26.

57. Denys A, Prior J, Bize P, et al. Portal vein embolization: what do we know? *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2012;35:999–1008.
58. Ekataksin W, Wake K. Liver units in three dimensions: I. Organization of argyrophilic connective tissue skeleton in porcine liver with particular reference to the "compound hepatic lobule". *Am J Anat*. 1991;191:113–153.
59. Rappaport AM, Wilson WD. The structural and functional unit in the human liver (liver acinus). *Anat Rec*. 1958;130:673–689.
60. Lamers WH, Hilberts A, Furt E, et al. Hepatic enzymic zonation: a reevaluation of the concept of the liver acinus. *Hepatology*. 1989;10:72–76.
61. Saxena R. *Practical Hepatic Pathology: A Diagnostic Approach*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2018.
62. Tanami S, Ben-Moshe S, Elkayam A, Mayo A, Bahar Halpern K, Itzkovitz S. Dynamic zonation of liver ployploidy. *Cell Tissue Res*. 2017;368:405–410.
63. Marcos R, Lopes C, Malhão F, et al. Stereological assessment of sexual dimorphism in the rat liver reveals differences in hepatocytes and Kupffer cells but not hepatic stellate cells. *J Anat*. 2016;228:996–1005.
64. Marcos R, Monteiro RAF, Rocha E. The use of design-based stereology to evaluate volumes and numbers in the liver: a review with practical guidelines. *J Anat*. 2012;220:303–317.
65. Liska V, Treska V, Mirka H, et al. Preoperative use of biological therapy does not influence liver regeneration after large resection - porcine experimental model. *Tumor Biol*. 2012;33:102–103.
66. Yang K, Du C, Cheng Y, Li Y, Gong J, Liu Z. Augmenter of liver regeneration promotes hepatic regeneration depending on the integrity of Kupffer cell in rat small-for-size liver transplantation. *J Surg Res*. 2013;183:922–928.
67. Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr Physiol*. 2013;3:1473–1492.
68. Mouton PR. *Principles and Practices of Unbiased Stereology: An Introduction for Bioscientists*. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press; 2001.
69. Cooper DKC, Ayares D. The immense potential of xenotransplantation in surgery. *Int J Surg*. 2011;9:122–129.
70. Toosi AEK. Liver fibrosis: causes and methods of assessment, a review. *Rom J Intern Med*. 2015;53:304–314.
71. Batts KP, Ludwig J. Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting. *Am J Surg Pathol*. 1995;19:1409–1417.
72. Bedossa P, Dargère D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38:1449–1457.
73. D'Angelo L, Lossi L, Merighi A, de Girolamo P. Anatomical features for the adequate choice of experimental animal models in biomedicine: I. Fishes. *Ann Anat*. 2016;205:75–84.
74. Delire B, Stärkel P, Leclercq I. Animal models for fibrotic liver diseases: what we have, what we need, and what is under development. *J Clin Transl Hepatol*. 2015;3:53–66.
75. Starkel P, Leclercq IA. Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011;25:319–333.
76. Tschanz S, Schneider JP, Knudsen L. Design-based stereology: planning, volumetry and sampling are crucial steps for a successful study. *Ann Anat*. 2014;196:3–11.
77. Lametschwandtner A, Lametschwandtner U. Historical review and technical survey of vascular casting and scanning electron microscopy. In: *Scanning Electron Microscopy of Vascular Casts: Methods and Applications*. Electron Microscopy in Biology and Medicine. Boston, MA: Springer; 1992:1–11.
78. Debbaut C, Segers P, Cornillie P, et al. Analyzing the human liver vascular architecture by combining vascular corrosion casting and micro-CT scanning: a feasibility study. *J Anat*. 2014;224:509–517.
79. Eberlova L, Liska V, Mirka H, et al. Porcine liver vascular bed in Biodur E20 corrosion casts. *Folia Morphol*. 2016;75:154–161.
80. Schladitz K. Quantitative micro-CT. *J Microsc*. 2011;243:111–117.
81. Pálek R, Liska V, Eberlová L, et al. [Experimental processing of corrosion casts of large animal organs]. *Rozhl Chir*. 2018;97:222–228.
82. Lisa JM. Coputer-assisted liver surgery. 2018. Available at: <https://github.com/mjirik/lisa>. Accessed July 31, 2018.
83. Boykov YY, Jolly MP. Interactive graph cuts for optimal boundary and region segmentation of objects in N-D images. In: *Proceedings Eighth IEEE International Conference on Computer Vision. ICCV 2001*. Vol. 1. 2001:105–112. <https://doi.org/10.1109/ICCV.2001.937505>.
84. Tomášek P, Tonar Z, Grajciarová M, et al. Histological mapping of porcine carotid arteries - an animal model for the assessment of artificial conduits suitable for coronary bypass grafting in humans. *Ann Anat*. 2019;228:151434.
85. Bech J, Glud AN, Sangill R, et al. The porcine corticospinal decussation: a combined neuronal tracing and tractography study. *Brain Res Bull*. 2018;142:253–262.
86. Standring S. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 41st ed. China: Elsevier Limited; 2016:1166–1170.
87. Malečková A, Tonar Z, Mik P, et al. Animal models of liver diseases and their application in experimental surgery. *Rozhl Chir*. 2019;98:100–109.

Červenková L, Vyčítal O, Brůha J, Rosendorf J, Pálek R, Liška V, Daum O, Mohelníková-Duchoňová B, Souček P: Protein expression of ABCC2 and SLC22A3 associates with prognosis of pancreatic adenocarcinoma. Sci Rep. 2019; 9:19782. IF 4,53

OPEN

Protein expression of ABCC2 and SLC22A3 associates with prognosis of pancreatic adenocarcinoma

Lenka Cervenkova^{1,2}, Ondrej Vycital^{1,3}, Jan Bruha^{1,3}, Jachym Rosendorf^{1,3}, Richard Palek^{1,3}, Vaclav Liska^{1,3}, Ondrej Daum^{1,4}, Beatrice Mohelnikova-Duchonova⁵ & Pavel Soucek^{1*}

ATP-binding cassette (ABC) and solute carrier (SLC) transporters translocate diverse substances across cellular membranes and their deregulation may cause drug resistance of cancers. This study investigated significance of protein expression and cellular localization of the previously suggested putative prognostic markers ABCC2 and SLC22A3 in pancreatic cancer patients. Protein localization and brush border staining intensity of ABCC2 and SLC22A3 was assessed in tumor tissue blocks of 65 pancreatic cancer patients and associated with clinical data and survival of patients with regard to therapy. Negative SLC22A3 brush border staining in pancreatic tumors significantly increased the risk of both disease progression and patient's death in univariate analyses. Multivariate analyses confirmed the association of SLC22A3 expression with progression-free survival of patients. A subgroup analysis of patients treated with regimens based on nucleoside analogs suggested that patients with negative brush border staining or apical localization of SLC22A3 in tumor cells have worse overall survival. The combination of positive ABCC2 and negative SLC22A3 brush border staining predicted worst overall survival and patients with positive brush border staining of both proteins had best overall and progression-free survival. The present study shows for the first time that the protein presence and to some extent also localization of SLC22A3 significantly associate with prognosis of pancreatic cancer in both unstratified and chemotherapy-treated patients. The combination of ABCC2 and SLC22A3 brush border staining also needs further attention in this regard.

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC, OMIM: 260350) incidence ranks 12th among cancer diagnoses worldwide, but its mortality is predicted to become the second leading cause of cancer death in the USA within the next decade^{1,2}. PDAC clinically manifests by late diagnosis, poor prognosis and overall lack of long term response to the systemic chemotherapy.

Overexpression of ATP-binding cassette (ABC) transporters and downregulation of solute carrier (SLC) transporters is suspected to influence effective intracellular concentration of anticancer chemotherapeutics including some targeted agents^{3,4}. There are numerous examples of such effects demonstrated in various *in vitro* model systems^{5,6}. The resulting chemoresistance of tumor cells leads to progression of the disease to more advanced stages. Thus, discovery of prognostic factors indicating a high risk of such scenarios and development of tools decreasing the chance of chemoresistance or re-sensitizing chemoresistant cells are urgently needed.

In previous studies, we have found dysregulation of transcript levels of several ABC and SLC transporters in tumor tissues of PDAC patients compared to paired adjacent non-tumorous control tissues. Moreover, intratumoral levels of a number of transporters significantly associated with clinical characteristics of patients^{7,8}. Most interestingly, combination of high transcript level of ABCC2 (OMIM: 601107) with low SLC22A3 (OMIM: 604842) level significantly predicted worse overall survival (OS) of patients⁹.

Main goal of the present study was to validate on the protein level the previously suggested putative prognostic role of this combination in independent series of PDAC patients. Thus, we determined protein content of these

¹Biomedical Centre, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic. ²Department of Pathology, Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic. ³Department of Surgery, Faculty Hospital and Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic. ⁴Department of Pathology, Faculty Hospital and Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic. ⁵Department of Oncology and Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic. *email: pavel.soucek@lfp.cuni.cz

Characteristics	N = 65
Age (median \pm S.D.)	66 \pm 8
Gender	
Female	32
Male	33
UICC stage	
Stage IA	4
Stage IB	14
Stage IIA	8
Stage IIB	32
Stage III	6
Unknown	1
Tumor size (pT)	
pT1	10
pT2	27
pT3	23
pT4	4
pTx	1
Lymph node metastasis (pN)	
pN0	28
pN1-2	28
pNx	9
Distant metastasis (cM)	
cM0	60
cMx	5
Grade	
G1	28
G2	29
G3	4
Gx	4
Resection margins (R)	
R0	54
R1	11
Chemotherapy	
None	27
Adjuvant	27
Unknown	11

Table 1. Clinical data of patients included in this study.

biomarkers in a larger cohort of PDAC patients and compared it with the patient's survival in order to substantiate further mechanistic studies behind this association.

Materials and Methods

Patients. In total, 65 surgically treated patients with histologically confirmed diagnosis of PDAC and available clinical follow up were included into the study. All patients were recruited and underwent surgery and oncological treatment at the Department of Surgery and Oncology, Teaching Hospital and Medical School in Pilsen, between years 2002 and 2016.

The following data on patients were retrieved from medical records: age, sex, date of diagnosis, date of surgery, resection margins, tumor size (pT), lymph node metastasis (pN), distant metastasis (cM), clinical stage, histological grade, adjuvant treatment regimen, and survival. Clinical characteristics of patients are described in Table 1. None of the patients had received neoadjuvant chemotherapy. The progression-free survival (PFS) served as a measure of the treatment outcome. The PFS was defined as the time elapsed between surgical resection and disease recurrence or death. The OS was defined as the time elapsed between surgical resection and death of any cause.

All procedures performed in this study were in accordance with the ethical standards of the Ethical Commission of the Medical Faculty and Teaching Hospital in Pilsen, Czech Republic (approval reference no. 301/2019) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Experimental protocol of this study was also approved by the Ethical Commission of the Medical Faculty and Teaching Hospital in Pilsen, Czech Republic (approval reference no. 301/2019). Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Immunohistochemical analysis. Tissue for light microscopy was fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin using routine procedures. Five micrometer-thick sections were cut from the tissue blocks and stained with hematoxylin and eosin. For the immunohistochemical (IHC) study samples were first processed by Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) using Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions pH 6 for ABCC2 and pH 9 for SLC22A3 (Leica Biosystems Inc., Buffalo Grove, IL, USA). Then, endogenous peroxidase activity was blocked using Dako REAL Peroxidase-Blocking Solution (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA), 5% normal goat serum was used for background blocking (slides for SLC22A3) and slides were incubated with the following primary antibodies: ABCC2 (dilution 1:100, cat. no. ab3373, Abcam, Cambridge, UK) and SLC22A3 (1:100, cat. no. ab124826, Abcam). The polymerized reporter enzyme staining system (Universal Immuno-peroxidase Polymer) with Anti-Mouse and Rabbit N-Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI) (Cosmo Bio USA, Carlsbad, CA, USA) were used for visualization. Slides were counterstained by Gill's hematoxylin. Appropriate positive and negative controls were employed. First, predominant localization was evaluated as basal or apical. Then staining in brush border was evaluated as negative or positive. Ambiguous samples were excluded from further statistical analysis (n = 5).

Data analysis. All statistical analyses were performed using SPSS v16.0 Software (SPSS Inc., Chicago, IL). Differences between groups of patients stratified by clinical data were assessed by the ANOVA and the Pearson tests. Survival function was plotted by the Kaplan-Meier method and the Log Rank and Breslow tests were used for evaluation of the compared groups of patients. Multivariate analysis adjusted to clinical factors which significantly modified survival of patients, i.e. resection margins and lymph node metastasis was performed by the Cox regression.

All *P*-values were calculated from two-sided tests. *P*-values lower than 0.05 were considered statistically significant.

Results

ABCC2 and SLC22A3 proteins were stained by IHC in formalin-fixed paraffin-embedded sections of 65 PDAC patients (clinical data in Table 1). The representative IHC slides are presented on Fig. 1. ABCC2 and SLC22A3 were predominantly localized in basal side of plasma membrane in 49% and 45% samples, respectively. Positive IHC brush border staining was observed in 45% and 29% of patients for ABCC2 and SLC22A3, respectively. Both followed characteristics were then combined.

No significant associations of ABCC2 and SLC22A3 IHC brush border staining or localization with gender and age of the patients, stage, tumor size, presence of local and distant metastasis, tumor grade and resection margins have been observed. The median PFS and OS of all patients were 14 ± 7 and 28 ± 9 months, respectively. Five patients were lost to follow up and were not further evaluated. Patients with R1 resection had significantly worse PFS ($P = 0.038$, Log Rank) and OS ($P = 0.001$) than completely resected (R0) ones. Patients with regional lymph nodes invaded by tumor cells (pN1-2) had significantly worse PFS ($P = 0.039$, Log Rank), but not OS than patients without such invasion (pN0). Therefore, subsequent multivariate analyses were adjusted to lymph node metastasis and resection margins.

We then performed univariate analysis of survival functions in groups of patients divided by localization or IHC brush border staining. PDAC patients with negative IHC brush border staining of SLC22A3 had significantly shorter PFS ($P = 0.041$, Log Rank and $P = 0.024$, Breslow; Fig. 2A) and OS ($P = 0.007$, Log Rank and $P = 0.020$, Breslow; Fig. 2B) than patients with positive staining in tumor cells. ABCC2 brush border staining or localization and SLC22A3 localization did not associate with survival of the patients.

Multivariate analysis adjusted to resection margins and lymph node metastasis confirmed that the negative SLC22A3 IHC brush border staining presents high risk factor for disease progression (PFS) ($P = 0.049$, hazard ratio = 2.3, 95% confidence interval = 1.0–5.1), but not for death (OS).

The analysis of combinations of IHC characteristics of both proteins has shown that patients with positive ABCC2 and SLC22A3 brush border staining had the best PFS, but the effect of other combinations was equal ($P = 0.035$, Log Rank and $P = 0.092$, Breslow; Fig. 3A). The combination of positive ABCC2 and SLC22A3 brush border staining was also predictive of best OS, but additionally, patients with combination of positive ABCC2 and negative SLC22A3 intratumoral brush border staining had apparently the worst OS ($P = 0.048$, Log Rank and $P = 0.013$, Breslow; Fig. 3B). The combination of localizations did not influence OS as well as PFS. Multivariate analysis was not performed due to too small numbers of observations in compared subgroups of patients.

Stratified analyses of patients treated with regimens based on nucleoside analogs (gemcitabine and 5-fluorouracil, N = 27) again demonstrated that patients with negative IHC brush border staining of SLC22A3 have significantly worse PFS ($P = 0.010$, Log Rank and $P = 0.013$, Breslow; Fig. 4A) and OS ($P = 0.030$, Log Rank and $P = 0.040$, Breslow; Fig. 4B). Moreover, patients with apical SLC22A3 localization had significantly worse OS than those with basal localization ($P = 0.021$, Log Rank and $P = 0.029$, Breslow; Fig. 4C). Analyses of combinations and multivariate analyses were not performed due to too small numbers of observations in compared subgroups of patients.

Discussion

Based on the previously observed associations of transcript levels of two less frequently studied membrane transporters with survival of PDAC patients^{7–9}, we analyzed prognostic significance of their protein staining intensity and cellular localization by IHC in a larger study. Our data clearly show that presence of SLC22A3 protein associates with prognosis of PDAC patients.

Role of protein expression of SLC22A3 in pancreatic cancer was not addressed to date. Present study demonstrates that patients with detectable SLC22A3 brush border IHC staining in their tumor cells have significantly longer OS and PFS than those without it. SLC22A3 is expressed across a broad spectrum of human tissues mostly

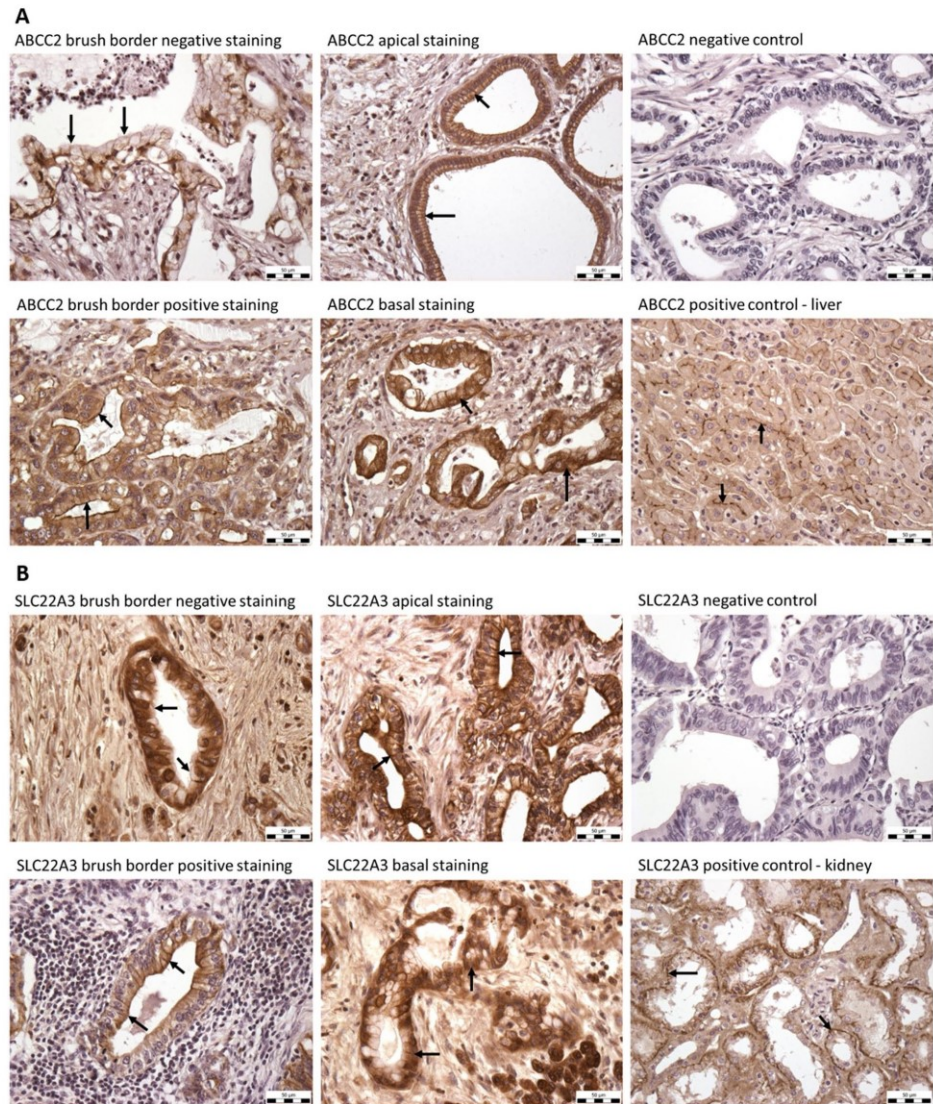


Figure 1. Immunohistochemistry of the ABCC2 and SLC22A3 transporters. **(A)** Examples of ABCC2 negative and positive brush border staining, apical and basal staining, and negative and positive controls. Negative control: tumor tissue stained without primary antibody. Positive control: human kidney cortex. **(B)** Examples of SLC22A3 negative and positive brush border IHC staining, apical and basal staining, and positive and negative controls. Negative control: tumor tissue stained without primary antibody. Positive control: human liver. Arrows allow easier visual control of results. Scale bar 50 μm .

in cellular plasma membrane where it actively uptakes a high number of both endogenous substrates and xenobiotics including antineoplastic drugs. Gene expression of SLC22A3 is both genetically and epigenetically regulated¹⁰. The current view about role of SLC22A3 in cancer has two aspects.

First, SLC22A3 expression was previously connected with onset and progression of several cancers. Specifically, genetic variability of SLC22A3 predisposes to colorectal and prostate cancer^{11–13}. Association of

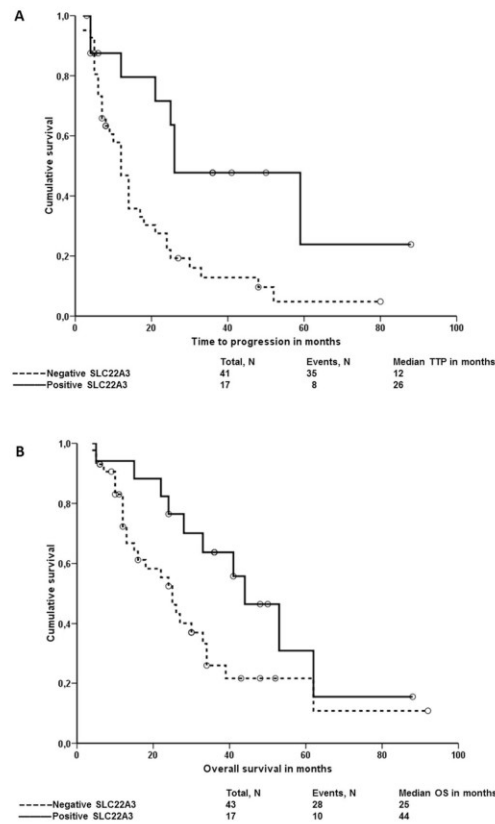


Figure 2. Associations between SLC22A3 brush border staining and the survival of all patients. Kaplan-Meier survival curves were plotted for the PFS or the OS of patients divided into negative and positive staining groups. Dashed line represents the group with negative staining and solid line the group with positive staining. Plot (A) shows results of PFS analysis and plot (B) of OS analysis.

genetic variant rs2504938 in *SLC22A3* with overall survival of pancreatic cancer patients was recently published¹⁴. Hepatocellular carcinomas express lower SLC22A3 protein levels than non-tumor tissues¹⁵ and larger size and number of chemically-induced liver tumors were observed in SLC22A3 knock-out mice model compared to wild type mice¹⁶. In line with these observations, SLC22A3 was reported as metastasis suppressor in familial esophageal squamous cell carcinoma where it directly inhibits ACTN4 (alpha actin 4, OMIM: 604638)¹⁷. More recently, a correlation between *SLC22A3* promoter hypermethylation and a higher risk for developing familial esophageal squamous cell carcinoma in Chinese was described, together with a new function of SLC22A3 in heat stress-induced oxidative DNA damage¹⁸. On the other hand, SLC22A3 overexpression promoted cell proliferation and stimulated migration and invasion of colorectal carcinoma cell line models, while repression of the expression reversed these effects¹³. Taken together previous studies suggested that genetic, epigenetic or phenotypic nature of SLC22A3 can serve as putative risk predictive or prognostic biomarker in cancer.

Second, SLC22A3 function as uptake transporter of number of chemicals including antineoplastic drugs was implicated in cancer treatment efficacy and individualization. Higher pre-treatment intratumoral SLC22A3 protein expression was observed in colorectal cancer patients responding to adjuvant chemotherapy with FOLFOX (combination of 5-fluorouracil, folinic acid and oxaliplatin) regimen than in non-responders¹⁹ suggesting a potential predictive character of this biomarker. In agreement with our findings, patients with head and neck squamous cell carcinoma classified as having high SLC22A3 protein level had improved overall survival after cisplatin therapy and correspondingly, the *in vitro* sensitivity of cell line models to this compound correlated with SLC22A3 expression²⁰. Besides frequently used platinum compounds, SLC22A3 also plays a role in the therapeutic action of metformin²¹. High SLC22A3 expression is being tested as a potential surrogate biomarker predicting response of several cancers to metformin^{22,23}.

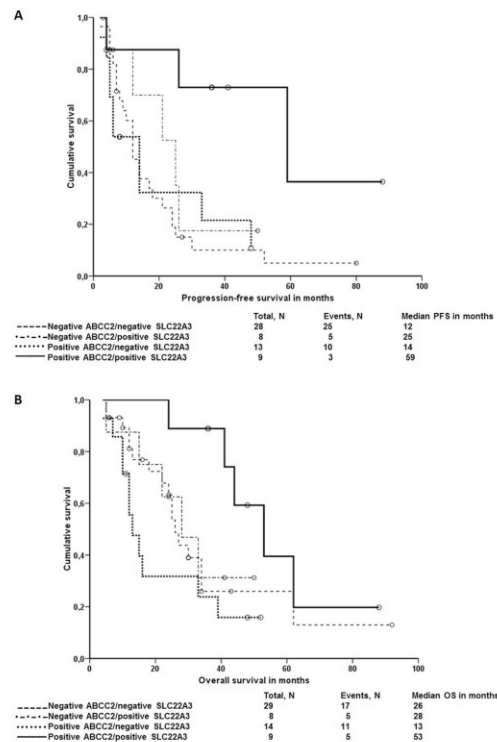


Figure 3. Survival analysis of combinations of SLC22A3 and ABCC2 brush border staining in all patients. Kaplan-Meier survival curves were plotted for the PFS or the OS of patients divided into ABCC2-negative/SLC22A3-negative (dotted lines), ABCC2-negative/SLC22A3-positive (hatched lines), ABCC2-positive/SLC22A3-negative (dashed lines), and ABCC2-positive/SLC22A3-positive (solid lines). Plot (A) shows results of PFS analysis and plot (B) of OS analysis.

Collectively, the present study and previous reports suggest that SLC22A3 may serve as a putative prognostic and predictive biomarker for follow up validation and functional studies aimed at personalized therapy of PDAC and several other, mostly gastrointestinal, cancers. IHC is routine method established in all pathology departments of larger medical centers worldwide and thus quick application of verified biomarker(s) is envisaged.

Recent genetic study reported that several polymorphisms in the *ABCC2* gene (rs3740067, rs3740073 and rs717620) significantly associate with OS of PDAC patients in an early disease stage and may become prognostic biomarkers²⁴. This observation complements previous studies suggesting that *ABCC2* polymorphism rs2273697 associates with poor OS and response to chemoradiotherapy of PDAC patients²⁵ and upregulated *ABCC2* protein expression leads to an altered sensitivity to gemcitabine and irinotecan *in vitro*²⁶. Another study recently pointed out that silencing *ABCC2* protein expression increases oxaliplatin accumulation and cytotoxicity in PANC-1 pancreatic cell line model *in vitro*²⁷. Although the relation between *ABCC2* and PDAC therapy response and prognosis was already well demonstrated in various experimental settings, the present study did not prove association of *ABCC2* protein expression alone with survival of PDAC patients.

Prognostic potential of *ABCC2* and SLC22A3 combination detected in the present study represents completely new area. Combinations of efflux and uptake transporters by definition of their major functions, i.e. export of drugs outside cells or cellular compartments by ABCs and import of drugs inside by SLCs may have much stronger effect than single biomarker-based predictions. Thus we hypothesized that negative *ABCC2* and positive SLC22A3 protein expression should associate with long survival and opposite combination with poor survival of patients. In fact, combination of positive *ABCC2* and positive SLC22A3 predicted longest survival (both PFS and OS) suggesting that the extent of overall protein expression dysregulation is prognostic in this case. On the other hand, combination of positive *ABCC2* and negative SLC22A3 protein expression indeed predicted shortest overall survival of patients and complied with the function-based hypothesis. However, the breaking up the cohort to very small subgroups poses a problem with statistical power especially in rarely studied diseases and thus, these observations must be replicated.

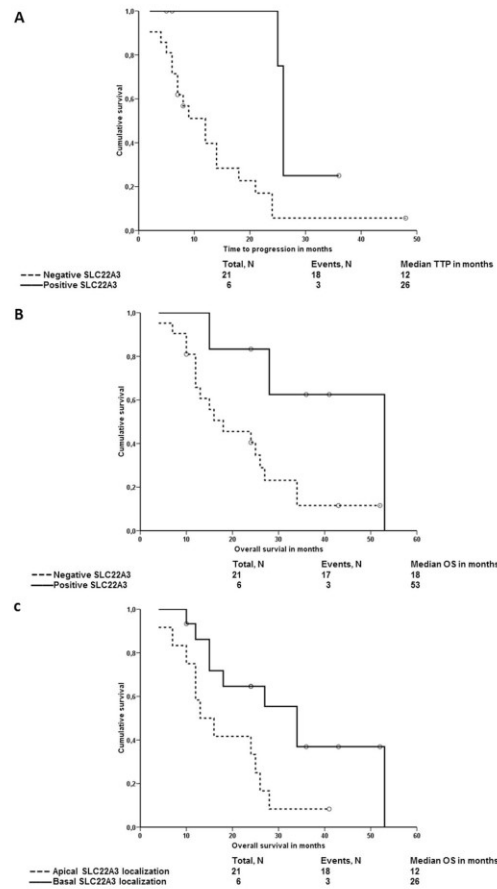


Figure 4. Associations of SLC22A3 brush border staining and localization with the survival of chemotherapy-treated patients. Kaplan-Meier survival curves were plotted for the PFS or the OS of patients divided into negative and positive or apical and basal localization groups. Dashed line represents the group with negative staining, solid line the group with positive staining. Plot A shows results of PFS analysis and plot (B) of OS analysis. In the plot (C), the solid line represents the group with basal localization and dashed line the group with apical localization of SLC22A3 protein in plasma membrane compared with OS of patients.

We are aware of some limitations of our study. First, the modest sample size may be seen as rather low. However, the incidence of PDAC, although quickly rising, is still quite low and mainly the percentage of its resectability is very limited (10–15%). Thus, it is rather difficult to put together larger series of patients with available clinical follow up. The rate of drop-out of patients from the follow up due to very dismal character of the disease is also quite high. Second, numerous systems of evaluation of protein appearance in tumor cells were published and especially in experimental and less studied proteins it is complicated to decide which of the reported approaches should be used. Therefore, we have chosen both semi-quantitative and qualitative measures to robustly assess relevance of proteins of interest. It is necessary to conduct next studies to validate present results.

On the other hand, this study has also certain advantages. All patients were recruited and followed in one regional center and thus represent homogeneous group of patients treated and surveyed in uniform way. Moreover, the present study was driven by previous observations on different patient group (also single center cohort) at the transcript level and thus congruent results obtained now cannot be attributed to the chance as in the case of hypothesis-generating screens.

Taken together, our results confirm the prognostic role of SLC22A3 protein in PDAC previously suggested by targeted transcriptomic study. ABCC2 transporter seems to play rather marginal role in this regard, but the effect

of combinations of both biomarkers observed in a small scale subgroup analysis should be further validated by independent studies.

Compliance with Ethical Standards

Ethical approval. All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the Ethical Commission of the Medical Faculty and Teaching Hospital in Pilsen, Czech Republic (reference no. 301/2019) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.

Informed consent. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Data availability

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Received: 13 September 2019; Accepted: 3 December 2019;

Published online: 24 December 2019

References

- Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J. Clin.* **67**, 7–30 (2017).
- Rahib, L. *et al.* Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res.* **74**, 2913–2921 (2014).
- Ford, R. C. & Beis, K. Learning the ABCs one at a time: structure and mechanism of ABC transporters. *Biochem. Soc. Trans.* **47**, 23–36 (2019).
- Lin, L., Yee, S. W., Kim, R. B. & Giacomini, K. M. SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 543–560 (2015).
- Akan, I., Akan, S., Akca, H., Savas, B. & Ozben, T. Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) mediated vincristine resistance: effects of N-acetylcysteine and Buthionine sulfoximine. *Cancer Cell International* **5**, 22 (2005).
- Yonezawa, A., Masuda, S., Yokoo, S., Katsura, T. & Inui, K. Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **319**, 879–886 (2006).
- Mohelnikova-Duchonova, B. *et al.* Differences in transcript levels of ABC transporters between pancreatic adenocarcinoma and non-neoplastic tissues. *Pancreas* **42**, 707–716 (2013).
- Mohelnikova-Duchonova, B. *et al.* The association between the expression of solute carrier transporters and the prognosis of pancreatic cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **72**, 669–682 (2013).
- Soucek, P. *et al.* Biotransformation genes as prognostic markers in pancreatic adenocarcinoma. *Int. J. Mol. Med.* **32**, S46 (2013).
- Chen, L. *et al.* Genetic and epigenetic regulation of the organic cation transporter 3, SLC22A3. *Pharmacogenomics J.* **13**, 110–120 (2013).
- Cui, R. *et al.* Common variant in 6q26-q27 is associated with distal colon cancer in an Asian population. *Gut* **60**, 799–805 (2011).
- Hoffmann, T. J. *et al.* A large multiethnic genome-wide association study of prostate cancer identifies novel risk variants and substantial ethnic differences. *Cancer Discov.* **5**, 878–891 (2015).
- Ren, A. *et al.* Genetic variants in SLC22A3 contribute to the susceptibility to colorectal cancer. *Int. J. Cancer* **145**, 154–163 (2019).
- Mohelnikova-Duchonova, B. *et al.* SLC22A3 polymorphisms do not modify pancreatic cancer risk, but may influence overall patient survival. *Sci. Rep.* **7**, 43812 (2017).
- Namisaki, T. *et al.* Differential expression of drug uptake and efflux transporters in Japanese patients with hepatocellular carcinoma. *Drug Metab. Dispos.* **42**, 2033–2040 (2014).
- Vollmar, J. *et al.* Loss of organic cation transporter 3 (OCT3) leads to enhanced proliferation and hepatocarcinogenesis. *Oncotarget* **8**, 115667–115680 (2017).
- Fu, L. *et al.* RNA editing of SLC22A3 drives early tumor invasion and metastasis in familial esophageal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, E4631–E4640 (2017).
- Xiong, J. X. *et al.* Epigenetic alterations of a novel antioxidant gene SLC22A3 predispose susceptible individuals to increased risk of esophageal cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **14**, 1658–1668 (2018).
- Le Roy, B. *et al.* Assessment of the Relation between the Expression of Oxaliplatin Transporters in Colorectal Cancer and Response to FOLFOX-4 Adjuvant Chemotherapy: A Case Control Study. *PLoS One* **11**, e0148739 (2016).
- Hsu, C. M. *et al.* Upregulated SLC22A3 has a potential for improving survival of patients with head and neck squamous cell carcinoma receiving cisplatin treatment. *Oncotarget* **8**, 74348–74358 (2017).
- Chen, L. *et al.* Role of organic cation transporter 3 (SLC22A3) and its missense variants in the pharmacologic action of metformin. *Pharmacogenet. Genomics* **20**, 687–699 (2010).
- Madera, D. *et al.* Prevention of tumor growth driven by PIK3CA and HPV oncogenes by targeting mTOR signaling with metformin in oral squamous carcinomas expressing OCT3. *Cancer Prev. Res. (Phila)* **8**, 197–207 (2015).
- Cai, H., Everett, R. S. & Thakker, D. R. Efficacious dose of metformin for breast cancer therapy is determined by cation transporter expression in tumours. *Br. J. Pharmacol.* **176**, 2724–2735 (2019).
- Gentiluomo, M. *et al.* Genetic variability of the ABCG2 gene and clinical outcomes in pancreatic cancer patients. *Carcinogenesis* **40**, 544–550 (2019).
- Tanaka, M., Okazaki, T., Suzuki, H., Abbruzzese, J. L. & Li, D. Association of multi-drug resistance gene polymorphisms with pancreatic cancer outcome. *Cancer* **117**, 744–751 (2011).
- Skrypek, N. *et al.* The oncogenic receptor ErbB2 modulates gemcitabine and irinotecan/SN-38 chemoresistance of human pancreatic cancer cells via hCNT1 transporter and multidrug-resistance associated protein MRP-2. *Oncotarget* **6**, 10853–10867 (2015).
- Biswas, R. *et al.* Transport-Mediated Oxaliplatin Resistance Associated with Endogenous Overexpression of MRP2 in Caco-2 and PANC-1 Cells. *Cancers (Basel)* **11**, E1330 (2019).

Acknowledgements

This work was supported by the Czech Health Research Council, project no.: NV19-03-00097 (to B.M.D.), the Charles University project “Center of Clinical and Experimental Liver Surgery”, no.: UNCE/MED/006 (to V.L.), the European Regional Development Fund - project “Application of Modern Technologies in Medicine and Industry” no.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007280 (to V.L.) and by the National Sustainability Program I (NPU

I) no. LO1503 (to P.S.) provided by the Ministry of Education Youth and Sports of the Czech Republic. Authors with to thank Dr. Vera Krizkova from Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic for advice about the strategy of the IHC evaluation.

Author contributions

C.L. established and performed immunohistochemistry, evaluated results, prepared Fig. 1, and drafted final manuscript. V.O., B.J., J.R. and R.P. retrieved clinical data of patients, prepared Table 1, and drafted final manuscript. V.L. curated clinical data, interpreted results and drafted final manuscript. O.D. retrieved and checked all archival blocks, curated immunohistochemical results, and drafted final manuscript. B.M.-D. contributed to the study design by pilot study, curated survival data and their interpretation and substantially revised manuscript. P.S. designed and coordinated the work, made final evaluation of results and drafted all paper versions.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to P.S.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019