Vena portae okklúzió indukálta májregenerációt jellemző morfológiai és funkcionális változások vizsgálata

Doktori tézisek

Dr. Fülöp András

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Harsányi László Ph.D., egyetemi tanár
Konzulens: Dr. Szijártó Attila Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók:
Dr. Németh Norbert Ph.D., egyetemi docens
Dr. Toronyi Éva Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Wéber György Ph.D., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Lengyel Gabriella Ph.D, egyetemi docens
Dr. Furka Andrea Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2016

Bevezetés:

A hepatobiliáris daganatok előfordulása világszerte növekvő tendenciát mutat. A primer májtumorok többsége hepatocellularis carcinoma, mely a hatodik leggyakrabban diagnosztizált daganatos megbetegedés, és a harmadik leggyakoribb halált okozó daganatféleség. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy a máj rosszindulatú elváltozásai döntően másodlagosak, többnyire colorectalis carcinoma áttétei. A máj malignus betegségeinek kezelésében - legyen az primer vagy szekunder eredetű - gyakran a sebészi resectio jelenti az egyetlen kuratív ellátást, mely egyben biztosítja a hosszú távú túlélést is. Az esetek jelentős részében a tumormentes resectios szél eléréséhez kiterjesztett hepatectomia szükséges. A máj parenchyma ily mértékű, excesszív eltávolítása azonban gyakran a beteg életét veszélyeztető posztoperatív májelégtelenség kialakulásával fenyeget. A hepatectomiát követő májelégtelenség megelőzésére leggyakrabban használt módszer a műtét után visszamaradó máj (future liver remnant, FLR) volumenének preoperatív megnövesztése vena portae okklúziós technikák segítségével. A vena portae egyes ágainak szelektív elzárása a teljes portalis vérmennyiség várható FLR felé történő átirányításával, a visszamaradó parenchyma hypertrophiáját (májregeneráció), míg a portális keringéstől megfosztott májlebeny atrophiáját idézi elő. Ezen volumenmanipuláció adta lehetőségnek köszönhetően mára a nagy kiterjedésű tumorállományok eltávolítása is biztonságosan kivitelezhetővé vált.

A klinikai gyakorlatban végrehajtott első sikeres vena portae okklúzió publikációja óta eltelt közel 30 év alatt a módszer és annak különböző módosulatai lényegében az egész világon elterjedtek. Ugyanakkor egy nem régiben megjelent szisztematikus összefoglaló alapján vena portae okklúziót követően a tervezett resectiók közel 20% elmarad, döntően a primer betegség progressziója, illetve az elégtelen mértékű regeneráció következtében. Ez a relatív magas sikertelenségi arány felhívja a figyelmet számos, az indukált májregenerációval kapcsolatos kérdés megválaszolatlanságára.

Célkitűzések:

A fentieket figyelembe véve jelen dolgozat célja a vena portae ligatúra (PVL) indukálta regeneratív folyamat vizsgálatára alkalmas kisállat modell felállítása és az indukált keringési, morfológiai és funkcionális változások vizsgálata volt. Kísérleteink során a következő kérdésekre kerestük a választ:

1.) Patkánymodellben biztonsággal és eredményesen kivitelezhető-e, standardizálható-e a májparenchyma jelentős részét ellátó (70%, 80%, 90%) vena portae ágak lekötése? Miként befolyásolják e kiterjedt portalis okklúziók a májregeneráció ütemét, mértékét és a portalis vénás nyomást? Kimutatható-e összefüggés a portalis vénás nyomásváltozás és a regeneratív folyamat aktivitása között?

2.) A máj állományának 80%-át érintő vena portae ligatúra miként befolyásolja a szervezet keringési viszonyait, beleértve a szisztémás (artériás középnyomás), a splanchnicus (portalis vénás nyomás) és a máj mikrokeringését (lézer Doppler áramlásmérés) jellemző paramétereket?

3.) A 80%-os vena portae ligatúra hatására fellépő atrophiás, illetve regeneratív folyamatot milyen szövettani (morfológiai) változások kísérik, mi jellemző e jelenségek dinamikájára? A portalis lekötés miként befolyásolja az egyes lebenycsoportok (lekötött, nem-lekötött) mikrostruktúráját (lobulus méretváltozás)?

4.) A 80%-os vena portae ligatúra miként befolyásolja a máj és az egyes lebenycsoportok funkcionális kapacitását? Miként változnak a globális májfunkciót jellemző laboratóriumi tesztek (transzamináz, albumin, bilirubin) és kvantitatív májfunkciós vizsgálatok (ICG clearance teszt) eredményei? Miként változik az egyes lebenycsoportok kiválasztó funkciója, beleértve az epe és ICG kiválasztó képességüket? A nem-lekötött (regenerálódó) lebenyek tömeggyarapodása miként viszonyul a lebenyek epe és ICG kiválasztásához? Milyen összefüggés mutatható ki a morfológiai (tömegnövekedés) és funkcionális regeneráció között?

5.) A nanoScan PET/MR készülék alkalmas-e kisállatokban a vena portae ligatúrát követő rapid térfogatváltozások monitorozására?

6.) Miként befolyásolja a vena portae ligatúra a máj és az egyes lebenycsoportok FDG (2-deoxi-2-(^{18}F)fluoro-D-glükóz) felvételét, glükóz metabolizmusát?

Módszerek:

Törvényi háttér, állatok

Kísérleteinket 200-250g súlyú, hím Wistar patkányokon végeztük az állatok védelméről és kíméletéről szóló 1998. évi XXVIII. törvény, valamint a 40/2013 (II.4) Kormányrendelet szerint elvárt követelményeknek megfelelően.

Csoportbeosztás

I. Kísérlet: A különböző mértékű ligatúra (70-80-90%) májregenerációra gyakorolt hatásának vizsgálata (n=64).

II. Kísérlet: 80%-os vena portae ligatúra indukálta morfológiai változások részletes vizsgálata (n=44).

III. Kísérlet: 80%-os vena portae ligatúra indukálta keringési és funkcionális változások vizsgálata (n=42): A.) A keringési, valamint a máj kiválasztó funkcióját érintő változások, illetve B.) a máj glükóz metabolizmusában bekövetkező változások (nanoScan PET/MR) vizsgálata.

A műtét menete

Intraperitoneális anesztézia indukciót és medián laparotomiát követően operációs mikroszkóp alatt a lekötendő lebenyeket ellátó vena portae ágak felszabadítását és a vénák szelektív lekötését végeztük. A művelet során nagy gondot fordítottunk az atraumatikus műtéti technikára, az arteria hepatica illetve a közös epevezeték sérülésének elkerülésére. Kísérleti elrendezéstől függően a következő májlebenyek portális beömlése került lekötésre: *70% PVL* - középső, bal lateralis májlebenyek; *80% PVL* - középső, bal lateralis és caudalis májlebenyek; *90% PVL* -

jobb lateralis, középső és bal lateralis májlebenyek. Vena portae ligatúrát követően, a lebenyek eredeti anatómiai helyzetének visszaállítás és a hasüreg alapos fiziológiás sóoldattal való átöblítése után, a hasfal két rétegben, tovafutó varratsor segítségével zárásra került és az állatok további vizsgálatokig visszakerült ketrecükbe. Megfelelő regenerációs idő elteltével (24, 48, 72, 120, 168 óra) az állatok csoportbeosztásának megfelelő adatgyűjtésre és mintavételre került sor.

Morfológiai változások vizsgálata

Máj tömeg mérés

Az állatok terminálását követően a májat eltávolítottuk, majd az egyes lebenycsoportok (lekötött, illetve nem-lekötött) nedves tömegét laboratóriumi mérleg segítségével meghatároztuk. Az adatok kiértékelése során a relatív lebeny tömeget a következő képlet segítségével fejeztük ki: máj tömeg (g) / 100 g testtömeg.

Májszöveti nedvességtartalom

A lebenyek nedves tömegét a mintavételt követően közvetlenül megmértük, majd a májszöveteket +80°C-on 3 napig szárítva meghatároztuk a száraz tömeget. Ezt követően a májszövet nedvességtartalma meghatározható volt: (nedves tömeg – száraz tömeg) / nedves tömeg * 100

Szövettani változások vizsgálata

A formalinban fixált, paraffinba ágyazott 3-5µm vastag szövettani metszeteken, hematoxilin-eozin festést követően a necrosis szemikvantitatív kiértékelése Suzuki által leírt metodika alapján történt. Az apoptosis és mitoticus aktivitás megítélésére immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk aktív kaszpáz-3, illetve Ki-67 ellenes antitestekkel. A májsejtek glikogén tartalmának meghatározásához perjódsav-Schiff (PAS) festést végeztünk.

Lobulus méret meghatározása

A lobulusok méretének meghatározására Papp és munkatársai által korábban publikált metodika alapján került sor.

Vena cava kanülön keresztül, retrográd módon, a centrális vénákat egy fluoreszcens festéket tartalmazó polisztirol műgyantával feltöltöttük. Ezt követően a vizsgálni kívánt lebenyek felszínéről inverz konfokális mikroszkóp segítségével felvételeket készítettünk. A felvételeken a vena centralisokban és sinusoidokban lévő fluoreszcensen világító gyanta kirajzolta az interlobularis határvonalakat, így az elkészült képeken a lobulusok kerülete és területe könnyen meghatározhatóvá vált.

Keringési változások vizsgálata

Artériás középnyomás, portalis vénás nyomás

Az artériás középnyomás, egy az arteria carotisba vezetett polietilén kanülhöz csatlakoztatott vérnyomásmérő berendezés segítségével, folyamatosan regisztrálásra került. Közvetlenül az állatok leölését megelőzően a vena portae főtörzsébe vezetett polietilén branül segítségével az állatok portalis vénás nyomásának meghatározására is sorkerült.

Máj mikrocirkuláció

A has megnyitását követően az egyes lebenycsoportok áramlását párhuzamosan vizsgáltuk lézer Doppler áramlásmérő segítségével. Az áramlásmérő mérőfejét a lebenyek felszínén rögzítve, a mikrocirkulációt 5 percig detektáltuk. Egy-egy lebenyen legalább 4 különböző ponton történt áramlás mérés, melyek átlaga jó közelítéssel jellemzi a lebeny mikrocirkulációját.

Funkcionális változások vizsgálata

Konvencionális laboratórium vértesztek

A vérminták centrifugálását követően, a mérések 24 órán belül megtörténtek, mely során laboratóriumi automata segítségével meghatároztuk a szérum albumin, össz-bilirubin, valamint transzamináz (alanin-aminotranszferáz (ALAT), aszpartát-aminotranszferáz (ASAT)) szinteket.

ICG-clearance teszt

A globális májfunkció jellemzésére indicianin zöld (ICG) clearance tesztet végeztünk. Az ICG plazma koncentrációját kereskedelmi forgalomban kapható denzitométer (PC5000 LiMON) segítségével detektáltuk. 1ml/ttkg, 1,5 mg/ml koncentrációjú ICG oldatot beadását követően az eszköz automata módon kalkulálja az ICG plazma eltűnési sebességét (plasma disappearance rate, PDR) valamint a beadást követő 15. percben visszamaradó ICG %-os arányát (ICG retenciós ráta, R15).

Epetermelés és biliaris ICG exkréció meghatározása

Az egyes lebenycsoportok epetermelését és a biliaris epeszekréció mértékét szelektív epeúti drenázs segítségével vizsgáltuk. Az egyes lebenycsoportok által elválasztott natív epe 10 perces gyűjtését követőn, ICG intravénás bolus injekciója történt. A fluoreszcens festék beadása után a kiválasztott epét előre meghatározott tömegű Eppendorf csövekben gyűjtöttük. A kiválasztott epe mennyiségét gravimetriás módszer segítségével határoztuk meg, feltételezve, hogy az epe sűrűsége 1g/ml. Az epekiválasztást mértékét a percenként kiválasztott epe mennyiségével fejeztük ki, melyet részben a testtömeghez (µl/perc/ttkg), részben pedig az adott májlebeny tömegéhez (µl/perc/g máj) viszonyítottunk. Az epe mennyiségének meghatározását követően a mintákat centrifugáltuk, majd a felülúszót 1:4 arányban desztillált víz segítségével hígítottuk. Az egyes minták ICG koncentrációját spektrofotometriás módszer segítségével 805 nm-es hullámhosszon vizsgáltuk. A mérések során kapott koncentrációs görbék segítségével meghatároztuk az egyes lebenycsoportok által elválasztott epe maximális ICG koncentrációját (C_{MAX}) és a hozzá tartozó időt (T_{MAX}). Továbbá meghatároztuk az ICG exkréciós rátát (ICG_{EX}), mely az adott lebenycsoport által az első 20 percben kiválasztott ICG mennyiségének és a teljes beadott ICG mennyiségének százalékos aránya.

Glükóz metabolizmus vizsgálata (PET/MR)

A glükóz metabolizmusban bekövetkező változásokat fúziós képalkotásra alkalmas NanoScan PET/MR készülékkel vizsgáltuk. A dinamikus PET méréseket megelőzően 0,2 ml, 6,5±1,0 MBq radioaktivitású FDG került beadásra a farok vénán keresztül. A dinamikus PET mérések adatait három dimenziós adatrögzítési módban rögzítettük. Az MR képalkotást (mátrix felbontás 140x140, 0,5mm, 30 szelet, 1,3mm, gap vastagság 0,5mm) 50 percig végeztük T1 (FSE2D, TR/TE 800/10ms, FOV 70mm, NEX 4) T2 (FSE2D, TR/TE 4733/60ms NEX 2) súlyozott szekvenciákkal. A rekonstrukció OSEM 3D algoritmus szerint történt. Szeletenként két VOI (volume of interest) lett körülhatárolva manuálisan a T1 súlyozott felvételeken. Egy a nem-lekötött, egy a lekötött lebenyek területén. A volumetriai mérésekhez a VivoQuant szoftver beépített VOI elemző programját alkalmaztuk. Az FDG felvétel meghatározására kiszámoltuk a standardizált felvételi értéket (standardized uptake value, SUV). A lekötött és nem-lekötött lebenyekre jellemző SUV-t egy referencia szövet (bal kamra, $SUV_{VOI}/SUV_{bal\ kamra}$) és a teljes máj átlagos SUV értékeihez viszonyítottuk ($SUV_{VOI}/SUV_{teljes\ máj}$).

Statisztika

A csoportok közötti, valamint egyes csoportokon belüli különbségek kimutatására egy-, illetve kétutas ANOVA-t alkalmaztunk, melysorán Bonferroni poszt hoc analízist végeztünk. A statisztikai vizsgálatok során IBM SPSS Statistics 20.0 szoftver használtunk. Az átlagértékek közötti különbségeket $p<0,05$ konfidencia intervallum esetén tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények:

I. Kísérlet eredményei - különböző mértékű ligatúra (70-80-90%) májregenerációra gyakorolt hatásának vizsgálata

Májlebenyek tömegváltozása

Mortalitás egyik kísérleti csoportban sem volt megfigyelhető. Csoportbeosztástól függetlenül a máj össztömege szignifikáns mértékben nem változott. Ezzel szemben a nem-lekötött

lebenyek tömege 70%-, 80%-, 90%-os lekötést követő 168. órára 1,50±0,13, 1,00±0,12, 0,50±0,05g/100g testtömeg kiindulási értékről rendre 3,30±0,2, 3,20±0,21, 2,10±0,22g/100g testtömeg értékre nőtt. Ezzel párhuzamosan a lekötött lebenycsoportban a májtömeg folyamatos csökkenése volt megfigyelhető. A nem-lekötött lebenyek tömeggyarapodására jellemző regenerációs rátákat kiszámítva megállapítható, hogy a PVL–90% csoportban a lebenyek regenerációja a műtétet követő 48. órától szignifikáns mértékben meghaladta mind a PVL-80% ($p<0,01$), mind a PVL-70% ($p<0,01$) csoportban látottakat.

Mitoticus aktivitás

A nem-lekötött lebenyek a hepatocyták mitoticus aktivitása a PVL–70% és PVL-80% csoportokban a vena portae ligatúrát követő 48. órára érte el a csúcsértékét, míg a PVL–90% csoport esetén a sejtosztódás maximuma már a műtétet követő 24. órában megfigyelhető volt. Ekkor a PVL-90% csoportban tapasztalt mitoticus aktivitás (96±3,46 osztódó sejt/látótér) szignifikáns mértékben meghaladta mind a PVL-80% (54,67±4,04 osztódó sejt/látótér, $p<0,01$), mind a PVL-70% (31,33±4,04 osztódó sejt/látótér, $p<0,01$) csoportban látottakat.

Portalis vénás nyomás

A vena portae ligatúra következtében mindhárom kísérleti csoportban a portalis vénás nyomás azonnali emelkedése volt detektálható (PVL–70%: 17,12±2,03Hgmm, PVL–80%: 19,8±1,05Hgmm, PVL–90%: 28,39±3,6Hgmm). A PVL–90% csoport nyomásemelkedése szignifikánsan meghaladta mind a PVL-80% ($p<0,01$), mind a PVL-70% ($p<0,01$) csoportban látottakat. Az egyes kísérleti csoportokban a vena portae ligatúrát követő akut portalis vénás nyomásváltozás és a 24. órában tapasztalt sejtosztódás mértéke között Pearson féle korrelációs vizsgálattal szoros lineáris összefüggés ($r=0,932$) volt kimutatható.

Lép tömegváltozás

A lép tömege ligatúrát követően mindhárom csoportban megnövekedett. A legnagyobb növekmény a PVL–90% csoportban volt látható (0. óra: 0,3±0,02g/100g testtömeg vs. 168.óra: 0,49±0,07g/100g testtömeg), mely szignifikáns mértékben meghaladta mind a PVL–80%, mind a PVL-70% csoport értékeit.

II. Kísérlet - morfológiai változások részletes vizsgálata

A májlebenyek makroszkópos megjelenése - tömegváltozása

Vena portae ligatúrát követően a portalis keringésből továbbra is részesedő lebenyek mérete számottevően megnövekedett, melynek következtében a lebenyek a jobb hypochondriumot szinte teljesen kitöltve, a máj tengelyét enyhén jobbra rotálva, mélyen lenyúltak a bordaív alá. A lebenyek törékenynek, világos színűnek mutatkoztak, felszínükön vena centralisok rajzolata jól kivehető volt. Ezzel ellentétben a portalis keringéstől megfosztott lebenyek számottevően megkisebbedtek, sötét színűvé váltak. A lebenyek felszínén az első két posztoperatív napon kisebb-nagyobb kiterjedésű necroticus léziók voltak megfigyelhetők. A lekötött lebenyek tömege a ligatúra hatására jelentősen lecsökkent, a posztoperatív 168. órára a kiindulási érték közel egy negyedét érve el (0.óra: 3,17±0,39g/100g testtömeg vs. 168. óra: 0,86±0,19g/100g testtömeg). Ezzel szemben a nem-lekötött lebenyek kompenzatórikus hypertrophiája volt megfigyelhető, melynek eredményeként a lebenyek kezdeti tömegük több mint háromszorosát érték el (0.óra: 0,97±0,08g/100g testtömeg vs. 168. óra: 3,28±0,09g/100g testtömeg).

Májszöveti nedvességtartalom változása

Vizsgálataink során enyhe nedvességtartalom növekedés mindkét lebenycsoport esetében megfigyelhető volt, mely maximális értékét a műtét követő 120 órában érte el (nem-lekötött lebeny 0. óra: 72,08±1,62% vs. 120. óra 73,13±1,23%, lekötött lebeny 0. óra: 71,98±1,52% vs. 120. óra 73,76±2,25%). Ugyanakkor szignifikáns nedvességtartalom változás egyik lebenyecsoportban sem volt kimutatható.

A májlebenyek szöveti megjelenése

A lekötött lebenyekben intenzív, többnyire centrolobularis, necroticus sejtpusztulás volt megfigyelhető. A necroticus területek legnagyobb kiterjedésüket a posztoperatív 24. órában érték el. Ezt követően a necroticus területek aránya fokozatosan csökkent és a műtétet követő 168. órára helyreállt a normális májstruktúra. A necrosis mellett az apoptoticus sejtek száma szintén jelentős mértékben megemelkedett. Az apoptosis mértéke a posztoperatív 48. órára érte el csúcsértékét (54±8,39 pozitív sejt/látótér). Ezt követően a pozitív festődést mutató sejtek száma fokozatosan csökkent, ugyanakkor a vizsgált periódus végéig szignifikáns mértékben emelkedett maradt. Ezzel szemben a nem-lekötött lebenyekben az elvégzett Ki-67 immunfestés alapján, a sejtek mitoticus aktivitása jelentősen fokozódott, csúcsértékét a műtétet követő 48. órára érve el (142,33±18,88 pozitív sejt/látótér). Ezt követően az osztódó sejtek száma fokozatosan csökkent és a posztoperatív 120. órában már nem különbözött szignifikáns mértékben a kiindulási értéktől. A cellularis glikogén tartalom meghatározására PAS festést végeztünk. A ligatúrát megelőzően a májsejtek egységes, mérsékelt festődését mutattak (nem-lekötött lebenyek: 2,20±0,27, lekötött lebenyek: 2,30±0,27). A műtétet követő 24. órára azonban a lekötött lebenyek glikogén tartalma csaknem teljesen eltűnt (0,70±0,27) és csak a lekötést követő 120. órára (2,00±0,50) tért vissza a kiindulási értékre. Ezzel szemben a nem-lekötött lebenyekben a PAS pozitív glikogén granulomok mennyisége csupán kis mértékben csökkent, szignifikáns változást egyik vizsgált időpontban sem találtunk.

Lobulus méret változás

A nem-lekötött lebenyek hypertrophiájával párhuzamosan a májlobulusok kerülete és terület szignifikáns mértékben megnövekedett, a kiindulási érték 1,52, illetve 2,35-szörösét érve el. Ezzel szemben a lekötött lebenyek lobulusai összezsugorodtak, mialatt a lebenykék átlagos kerülete és területe a kiindulási érték 0,32, illetve 0,54-szeresére csökkent.

III. Kísérlet - keringési és funkcionális változások vizsgálata

Keringési változások

Vena portae ligatúra hatására az artériás középnyomás tekintetében nem következett be szignifikáns mértékű változás. Ezzel szemben a lekötést követő első napon a portalis vénás nyomás szignifikáns mértékben megnövekedett (20,42±1,65Hgmm, $p<0,01$) és tartósan a műtétet követő 168. óráig emelkedett maradt (12,54±1,91Hgmm, $p=0,02$). A lézer Doppler áramlásmérések alapján a nem-lekötött lebenyek mikrocirkulációja a ligatúrát követően szignifikáns mértékben megnövekedett (158±35,80AU-ról 278,91±24,46AU-ra). A 120. órától a lebenyek véráramlása azonban már nem különbözött a műtét előtt tapasztalt értékektől. Ezzel szemben a lekötött lebenyek mikrocirkulációja a ligatúra hatására több mint 50%-al károsodott (199,83±29,26AU vs. 113,89±31,9AU). Majd a lebenyek véráramlása folyamatosan normalizálódva, a műtétet követő 72. órára visszatért a kiindulási értékre.

Konvencionális laboratórium vértesztek eredményei

A vena portae ligatúrát követően szignifikáns mértékű változás sem a össz-bilirubin, sem az albumin szérum szintjében nem mutatkozott. Ezzel szemben a szérum transzamináz szintek tekintetében egy átmeneti emelkedést láthattunk, mely legmagasabb értékét a műtétet követő 24. órára érte el, a posztoperatív 72. órára visszatérve a lekötést megelőző, normál tartományba.

ICG-clearance teszt - globális májfunkció változása

Vena portae ligatúra következtében a máj clearance funkciója átmenetileg jelentős mértékben károsult, mely a PDR szignifikáns csökkenésében és a R15 emelkedésében nyilvánult meg. A funkcióromlás mélypontját a posztoperatív 48. órára érte el. Ezt követően a máj kiválasztó funkciója fokozatosan felépült.

Epetermelés - szegmentális májfunkció változása

A nem-lekötött lebenyek testtömegre normalizált epetermelése a műtétet követően ugrásszerűen megnövekedett a kiindulási érték közel 380%-át érve el (0.óra: 23±5,1µl/perc/ttkg vs. 168. óra: 87,49±7,42µl/perc/ttkg). Ezzel párhuzamosan a lekötött lebenyek testtömegre vonatkoztatott epekiválasztása exponenciálisan

csökkent a kezdeti érték kevesebb mint 24%-ra (0.óra: 76,34±8,4µl/perc/ttkg vs. 168. óra: 17,95±3,17µl/perc/ttkg). Amennyiben az egyes lebenycsoportok epekiválasztását az adott lebeny tömegére vonatkoztatva vizsgáltuk, a nem-lekötött lebenyek epetermelése szignifikáns mértékben megnövekedett, legmagasabb értékét a műtétet követő 48. órában érve el (0.óra: 2,24±0,25µl/perc/g máj vs. 48. óra: 3,3±0,36µl/perc/g máj). Ezzel szemben a lekötött lebenyek epetermelése a 72. óráig fokozatosan csökkent, a kezdeti érték 0,7 szeresére (0.óra: 2,15±0,15µl/perc/g máj vs. 72. óra: 1,52±0,33µl/perc/g máj). A ligatúrát követő 120. és 168. óra közt mindkét lebenycsoport májtömegre normalizált epekiválasztása visszatért közel a műtétet megelőző, kiindulási értékre.

Biliaris ICG exkréció - szegmentális májfunkció változása

A műtétet követő első 48 órában a nem-lekötött lebenyek ICG kiválasztása átmenetileg károsult, mely C_{MAX} szignifikáns csökkenésében (0.óra: 0,34±0,01mg/ml vs. 48. óra: 0,28±0,03mg/ml, p=0,049) és T_{MAX} megnyúlásában (0. óra: 18,33±2,58perc vs. 48. óra: 28,33±5,16perc, p=0,003) mutatkozott meg. Később, a ligatúrát követő 120. órára a nem-lekötött lebenyek kiválasztó funkciójának folyamatos javulásával, C_{MAX} és T_{MAX} visszatért a műtétet megelőzően tapasztalt értékre. A lekötött lebenyek biliaris ICG koncentrációs görbéi az első 48 órában a nem-lekötött lebenyekben látottakhoz hasonlóan változtak. Ezt követően azonban lebenycsoport kiválasztó funkciójában javulás nem volt megfigyelhető. A teljes máj ICG_{EX} a műtétet követően átmenetileg károsult, mélypontját a posztoperatív 48. órában érve el (0. óra: 29,23±2,98% vs. 48. óra: 15,17±1,22%, p<0,001). Ezt követően a teljes máj ICG_{EX} fokozatosan javulva a műtétet követő 120. órára visszatért a kiindulási értékre. A nem-lekötött lebenyek ICG_{EX}-ban a posztoperatív első 48 órában nem következett be szignifikáns mértékű változás. A posztoperatív 48. órát követően azonban a lebenycsoport ICG_{EX}-ja ugrásszerűen megnövekedett, a 168. órára a kiindulási érték 394%-át érve el. Ezzel szemben a lekötött lebenyek

ICG_{EX}-ja a ligatúrát követően folyamatosan csökkent és a kísérlet végére a kezdeti érték 10%-át sem érte el.

A máj tömegében és kiválasztó funkciójában bekövetkező változások összehasonlítása

A nem-lekötött lebenyek epetermelésében bekövetkező változás valamennyi vizsgált időpontban meghaladta a lebenycsoport tömegnövekedését. Ezzel szemben a lebenyek ICG exkréciós rátájának növekedése kezdetben elmaradt (májtömeg 48. óra: 196,24±17,46% vs. ICG exkréciós ráta 48. óra: 164,65±15,62%) a lebenyek tömeggyarapodásának ütemétől. A ligatúrát követő 72. órától az ICG exkréció azonban ugrásszerűen megnövekedett szignifikáns mértékben felülmúlva a lebenyek tömegében bekövetkező változásokat.

III. Kísérlet - Glükóz metabolizmus vizsgálata (PET/MR)

A májlebenyek térfogatváltozása - MR volumetria

A kisállat MR felvételek elemzése alapján a májlebenyek térfogatváltozása követte a lebenyek tömegében bekövetkező változásokat (szoros pozitív korreláció, $r = 0{,}842$; $p < 0{,}001$).

A glükóz metabolizmus változása - FDG-PET

Dinamikus PET felvételek alapján elmondható, hogy a ligatúra mindkét lebenycsoport esetében jelentős mértékben megváltoztatta az FDG idő-aktivitás görbéinek karakterisztikáját, melyre a farmakon kiürülésének elhúzódása volt a jellemző. A görbék statisztikai összehasonlítása érdekében meghatároztuk az egyes lebenycsoportokra jellemző standard felvételi értékeket (SUV). Vena portae ligatúrát megelőzően a májat mérsékelt fokú, homogén tracer felvétel jellemezte. A ligatúrát követően mindkét lebenycsoportban szignifikáns mértékben megnövekedett a $SUV_{VOI}/SUV_{bal\ kamra}$ arány, maximális értékét a műtétet követő 48. órában érve el. Az FDG felvételében bekövetkező változás a lekötött lebenyek tekintetében szignifikánsan nagyobb mértékűnek mutatkozott a nem-lekötött lebenyekhez képest. Ennek következtében a $SUV_{VOI}/SUV_{teljes\ máj}$ arány lekötött lebenyek

irányába tolódott el. A műtétet követő 168. órában azonban mindkét lebenycsoport FDG felvétele visszatért a kiindulási értékre, visszaállítva a beavatkozás előtt jellemző homogén radiofarmakon eloszlást.

Következtetések:

1.) Patkányokon a megfelelő mikrosebészeti készségek elsajátítása után a különböző mértékű, kiterjedt parenchyma mennyiséget érintő vena portae ligatúrák biztonságosan és eredményesen kivitelezhetők, lehetőséget teremtve standard, reprodukálható kisállat modellek felállítására, az indukált regeneratív folyamat további vizsgálatára. Az elzárt vena portae ágak által ellátott májparenchyma mennyiségének növelésével fokozódik az indukált májregeneráció (sejtosztódás üteme, aktivitása) és a portalis vénás nyomásváltozás mértéke. A két változó között szoros korreláció mutatható ki, mely megfigyelés a ligatúra okozta keringésváltozások májregeneráció indukciójában, szabályozásában betöltött szerepét támasztja alá.

2.) A vena portae ligatúra számottevő mértékben nem befolyásolja a szisztémás keringési paramétereket (artériás középnyomás), ugyanakkor hatására jelentős változások következnek be a splanchnicus véráramlásban. A lekötéstől proximalisan portalis vénás nyomásemelkedés és a shunt keringés fokozódásából adódóan splenomegalia jön létre ("*backward*" hatás). Ugyanakkor a ligatúra a máj mikrokeringését is jelentős mértékben befolyásolja ("*forward*" hatás). A lekötött lebenyekben fellépő mikrocirkulációs zavarral (közel 50%-os áramlás romlás) szemben, a nem-lekötött lebenyek véráramlásának fokozódása (1,76-szoros növekmény) figyelhető meg. A fenti keringési változások azonban csupán átmenetinek bizonyultak. Az indukált tömegváltozások előrehaladtával a máj adaptálódik megváltozott áramlási viszonyaihoz, mialatt egy új egyensúlyi állapot kialakulásával helyreállnak a ligatúrát megelőző keringési értékek.

3.) A vena portae ligatúra indukálta atrophia-hypertrophia komplex, szorosan kontrollált, kiegyensúlyozott folyamat, aminek eredményeképp a rapid tömegváltozások ellenére a máj össztömeg a

lekötést követően nem változik. A makroszkópos változások hátterében a lekötött lebenyekben centrolobularisan elhelyezkedő necro-apoptoticus sejtpusztulás, míg a nem-lekötött lebenyekben a hepatocyták mitoticus aktivitásának fokozódása áll. A fenti hisztológiai változások patkánymájban a műtétet követő 24-48. órában érik el csúcsértéküket, majd a posztoperatív 120-168. órára helyreáll a normális májszöveti kép. Ennek eredményeképp az indukált atrophia-hypertrophia jelensége a műtét követő 120-168. óra között platófázist ér el, s ennek alapján feltételezhető, hogy patkánymájban a folyamat egy hét leforgása alatt komplettálódik. A ligatúra hatására fellépő szövettani változások következtében a lebenyek strukturális változásokon is keresztülmennek. A lekötött lebenyek atrophiája során a máj szerkezeti egységét képző májlebenykék (lobulusok) kerülete és területe egyaránt a töredékére csökken (a kiindulási érték 0,32-, illetve 0,54-szeresére). Ezzel ellentétben a nem-lekötött lebenyekben a lobulusok mérete szignifikánsan megnövekszik (a lebenyek kerület a kezdeti érték 1,52-, illetve 2,35-szörösére nő), mely alapján feltételezhető, hogy a regeneráció folyamatában elsősorban nem új lobulusok képződése, hanem a meglévő májlebenyek hypertrophiája játssza a fő szerepet.

4.) Vena portae ligatúrát követően a máj funkcióját jellemző laboratóriumi paraméterek számottevő mértékben nem változnak (kivéve transzamináz szintek - szöveti károsodás következtében), szemben az ICG clearance, mint kvantitatív májfunkciós teszt eredményeivel, ami a globális májfunkció átmeneti károsodását jelzi a műtétet követő első 72 órában. A fenti eredmények alapján az ICG clearance teszt a hagyományos laboratóriumi vérvizsgálatoknál megbízhatóbban jelzi a máj funkcionális állapotát. Vena portae ligatúrát követően a lekötött lebenyek kiválasztó funkciója drasztikus mértékben lecsökken, ami mind az epe, mind az ICG kiválasztás mértékében megnyilvánul. Ezzel szemben a nem-lekötött lebenyek epekiválasztása jelentős mértékben megnövekszik, mely változás már röviddel a lekötést követően észlelhető (feltételezhetően egy adaptív mechanizmus eredményeképp, nem valódi funkciónövekedés). Ugyanakkor a lebenycsoport ICG kiválasztása átmenetileg károsodik és csak a mitoticus aktivitás csúcsértéke után

(48. óra) következik be az ICG exkréció fokozódása. Eredményeink alapján feltételezhető hogy a biliaris ICG kiválasztás az epetermelésnél megbízhatóbb paraméter a máj kiválasztó funkciója szempontjából. A nem-lekötött lebenyek funkciónövekedése (ICG exkréció alapján) kezdetben elmarad a rapid tömeggyarapodástól. Később azonban, a sejtosztódási csúcs elérését követően, a lebenyek kiválasztó funkciója a tömeggyarapodást meghaladó mértékben növekszik meg, ennek eredményeként a máj funkcionális kapacitása, a térfogat változásnál jelentősebb mértékben tolódik át a nem-lekötött, regenerálódó lebenyek irányába, a májfunkció inhomogén megoszlását eredményezve.

5.) A PET/MR vizsgálatok során tapasztalt térfogati változások szoros korrelációt mutattak az állatok boncolása során mért tömegváltozásokkal. Ennek alapján megállapítható, hogy a módszer alkalmas kisállatokban a rapid térfogat változással járó májsebészeti intervenciók non-invazív vizsgálatára, a regeneratív folyamatok monitorozására.

6.) Vena portae ligatúra hatására mind a lekötött, mind a nem-lekötött lebenyekben szignifikáns mértékben megnövekszik az FDG felvétel mértéke. Az FDG dúsulásában bekövetkező változások időben egybeesnek az észlelt szövettani jelenségekkel (mitosis vs. necro-apoptoticus sejthalál, szöveti gyulladás). Mindezek alapján feltételezhető az atrophia és a regeneráció fokozott energiaigénye és ennek következtében a lebenycsoportok fokozott glükóz felvétele, metabolizmusa.

Saját publikációk jegyzéke:

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Σ IF: 7,644

1. Fülöp A, Szijártó A, Harsányi L, Budai A, Pekli D, Korsós D, Horváth I, Kovács N, Karlinger K, Máthé D, Szigeti K (2014) Demonstration of metabolic and cellular effects of portal vein ligation using multi-modal PET/MRI measurements in healthy rat liver. PLoS One 9(3): e90760.

IF: 3,234

2. Szijártó A, Fülöp A (2015) Triggered liver regeneration: from experimental model to clinical implications - Invited review. Eur Sur Res 54(3-4):148-161.

IF: 2,474

3. Fülöp A, Budai A, Czigány Z, Lotz G, Dezső K, Paku S, Harsányi L, Szijártó A (2015) Alterations in Hepatic Lobar Function in Regenerating Rat Liver. J Sur Res 197(2):307-17.

IF: 1,936

A disszertációtól független magyar nyelvű közlemények

1. Szijártó A*, Fülöp A*, Turóczi Zs, Garbaisz D, Dudás E, Szabó J, Nánási R, Kupcsulik P (2011) Rupturált hasi aorta aneurysma kísérletes modellje. A folyadék reszuszcitácó technikai megfontolása. Aneszteziológia és Intezív Terápia 41(2):61-70.

*megosztott elsőszerzősség

2. Garbaisz D, Turóczi Zs, Fülöp A, Rosero O, Arányi P, Ónody P, Lotz G, Rakonczay Z, Balla Zs, Harsányi L, Szijártó A (2013) Alsó végtagi ischaemiás-reperfusiós károsodás hosszú távú tüdőszövődményeinek megelőzése posztkondicionálással. Magy Seb 66 (3):146–154.

A disszertációtól független idegen nyelvű közlemények

Σ IF: 18,645

1. Fülöp A, Turóczi Zs, Garbaisz D, Harsányi L, Szijártó A (2013) Experimental models of hemorrhagic shock. Review. Eur Surg Res 50:57–70.

IF: 1,431

2. Garbaisz D, Turóczi Zs, Fülöp A, Rosero O, Arányi P, Ónody P, Lotz G, Rakonczay Z, Balla Zs; Harsányi L, Szijártó A (2013) Therapeutic option for managing lung injury induced by infrarenal aortic cross-clamping. J Surg Res 185: 469-476.

IF: 2,121

3. Ónody P, Stangl R, Fülöp A, Rosero O, Garbaisz G, Turóczi Zs, Lotz G, Rakonczay Zs, Balla Zs, Hegedűs V, Harsányi L, Szijártó A (2013) Levosimendan: a cardiovascular drug to prevent liver ischemia-reperfusion injury? PLoS One 8(9): e73758.

IF: 3,534

4. Rosero O, Ónody P, Stangl R, Turóczi Zs, Fülöp A, Garbaisz D, Lotz G, Harsányi L, Szijártó A (2014) Postconditioning of the small intestine: which is the most effective algorithm in a rat model? J Surg Res 187:427-37.

IF: 1,936

5. Rosero O, Németh K, Turóczi Zs, Fülöp A, Garbaisz D, Győrffy A, Szuák A, Dorogi B, Kiss M, Nemeskéri Á, Harsányi L, Szijártó A (2014) Collateral circulation of rat lower limb and its significance in ischemia-reperfusion studies. Surg Today 44(12):2345-53.

IF: 1,526

6. Turóczi Zs, Fülöp A, Lukáts A, Garbaisz D, Lotz G, Harsányi L, Szijártó A (2014) Postconditioning protects skeletal muscle against a long-lasting vascular occlusion. J Invest Surg 27(5):282-90.

IF: 1,158

7. Rosero O, Ónody P, Kovács T, Molnár D, Lotz G, Tóth Sz, Turóczi Zs, Fülöp A, Garbaisz D, Harsányi L, Szijártó A (2014) Impaired Intestinal Mucosal Barrier Upon Ischemia-Reperfusion: "Patching Holes In The Shield With A Simple Surgical Method". BioMed Res Int Article ID 210901

IF: 1,579

8. Garbaisz D, Turóczi Zs, Aranyi P, Fülöp A, Rosero O, Hermesz E, Ferencz A, Lotz G, Harsányi L, Szijártó A (2014) Attenuation of skeletal muscle and renal injury to the lower limb following ischemia-reperfusion using mPTP inhibitor NIM-811. PLoS ONE 9(6): e101067.

IF: 3,234

9. Turóczi Zs, Fülöp A, Czigány Z, Varga G, Rosero R, Tökés T, Kaszaki J, Lotz G, Harsányi L, Szijártó A (2015) Improvement of small intestinal microcirculation by postconditioning after lower limb ischemia. Microvasc Res 98:119-25.

IF: 2,126