

# Morfológiai és funkcionális változások akcelerált májregeneráció során

Dr. Budai András

Semmelweis Egyetem

Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:	Dr. Szijártó Attila, DSc., egyetemi tanár
Hivatalos bírálók:	Prof. Dr. Oláh Attila, DSc., egyetemi tanár Dr. Hagymási Krisztina Ph.D., egyetemi docens
Szigorlati bizottság elnöke:	Dr. Wéber György, Ph.D., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai:	Dr. Szabó Andrea, Ph.D., egyetemi docens Dr. Dávid Csaba Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest

2020

## 1. Bevezetés

A máj daganatos betegségei jelen korunkban vezető halálteki szerepet töltenek be a fejlett és fejlődő világban egyaránt. Annak ellenére, hogy az elmúlt 30 év jelentős fejlődést hozott az onkoterápiás megoldások terén, mégis ezen megbetegedések legjobb hosszútávú túlélést kínáló, valóban kuratív kimenettel bíró kezelése továbbra is a daganatos szövettömeg ép sebési szélekkel történő eltávolítása jelenti. Sajnálatos módon, a májdaganatok sokáig lappangó természete miatt a diagnózis felállítása idején betegek jelentős része már előrehaladott betegséggel rendelkezik, ezért a közel 45%-uk primeren kiterjesztett hepatektómiát igényel. Habár a máj rendkívüli regenerációs képességgel és nagy funkcionális rezervoárral rendelkezik, mégis, kiterjesztett reszekciók esetében előfordulhat, hogy a daganat eltávolítása során az R<sub>0</sub> (visszamaradó tumortól mentes) reszekció eléréséhez túlzottan nagy mennyiségű parenchyma eltávolítása válik szükségessé. Ilyen esetekben megnő a post-hepatektómiás májelégtelenség (PHLF post-hepatectomy liver failure) kialakulásának veszélye. Így a visszamaradó parenchyma mennyiség elégtelensége miatt számos beteg primeren inoperabilisnek minősül a diagnózis felállításának pillanatában. Szerencsés módon az elmúlt 30 év folyamán számos sebési stratégiát dolgoztak ki, amelyek elsődleges célja a PHLF elhárítása volt a visszamaradó parenchyma volumenének megnövelésén keresztül. Ezen megoldások közül a legjelentősebb a tumoros májfél vena portae ágainak lezárása embolizáció (PVE- portal vein embolization – portális véna embolizáció), vagy sebési ligatúra (PVL – portal vein ligation – portális véna ligatúra) segítségével (PVO – Portális véna okklúzió), amelynek következtében az „ép” májfél volumen növekedése idézhető elő. A PVO technikák segítségével nagyszámú olyan beteg vált ismételt kuratív célzatú beavatkozásra alkalmassá, akik azelőtt primeren kontraindikáltak voltak a ki méretű visszamaradó májparenchyma mérete (és áttételesen funkcionális elégtelensége miatt). Ugyanakkor a PVO technikáknak is számos hátulütője van, amelyek közül kiemelendő, hogy ezen megoldásokat alkalmazva viszonylag lassú -(4-8 hét alatt végbemenő) regeneráció idézhető elő, így számos beteg alkalmatlanná válhat a kuratív célzatú tumor-reszekciót megelőző hosszabb kivárási idő alatti alapbetegség progresszió miatt. Erre a problémára 2007-ben egy véletlen folytán fedezték fel a megoldást. Ekkor Schlitt és munkatársai első ízben hajtottak végre ALPPS-t (ALPPS - Association liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy), amely a máj tumoros és ép részei között elvégzett transzekciót és a tumoros májfél portális okklúzióját magába foglaló sebésztechnikai megoldás. Ezen eljárás segítségével a klasszikus PVO technikákkal szemben gyorsabb és jelentősen nagyobb májvolumen növekedést idézhető elő.8 Ezzel az eljárással így azon betegek is reszekcióra alkalmassá tehetők, akik PVO technikával ez idáig nem voltak kezelhetők a tumoros megbetegedés kiterjedtsége, elhelyezkedése vagy biológiai viselkedése miatt. Minthogy minden sebési eljárásnak vannak kockázatai, sajnos az ALPPS is rendelkezik néhány rendkívül súlyos hátulütővel. Alkalmazásakor szignifikánsan magasabb mortalitási és morbiditási mutatókat figyeltek meg (akár 50% mortalitás és 79% súlyos morbiditás a perioperatív időszakban). Érdekes módon az ALPPS alkalmazásakor tapasztalt megemelkedett betegvesztés fő oka PHLF annak ellenére, hogy volumetriai vizsgálatok alapján a túléléshez megfelelő mennyiségű visszamaradó májparenchyma állt rendelkezésre. Mindebből arra lehetett következtetni, hogy ALPPS-t követően szignifikáns mértékű májfunkció csökkenés tapasztalható, amelyet az utóbbi évek során szcintigráfiai vizsgálatok segítségével igazoltak.

A máj regenerációja rendkívül energiafüggő folyamat, amelynek ATP fedezetét első sorban az oxidatív foszforiláció (OXPHOS) biztosítja. A máj ALPPS-t követő funkcionális kapacitás csökkenésének hátterében feltételezhető, hogy a mitokondriális homeosztázis zavara húzódik. A jelen dolgozatban szereplő kísérletek elsődleges célja az ALPPS-t követő májregeneráció során megfigyelt funkcionális változások modellezése és konvencionális PVO technikával előidézett májregenerációval történő összevetése volt.

## **2. Célkitűzések**

A jelen dolgozatban bemutatott kutatómunka eredményei két kísérletsorozatban keletkeztek. Az I. vizsgálatban a PVL és ALPPS összevetése történt annak érdekében, hogy a mitokondriális élettani háttér feltárásával megismerhetőek legyenek az ALPPS-t követő magas szövődmény és halálózási rátával összefüggésbe hozható sejt-energetikai eltérések.

### **I. kísérletsorozat célkitűzései**

1. Olyan állatkísérletes ALPPS modell létrehozása, amely mind anatómiailag, mind az élettani változásokat tekintve megfelelően utánozza a humán műtétek során és azokat követően megfigyelt, májra lokalizált és szisztémás folyamatokat.
2. Annak meghatározása, hogy a PVL és az ALPPS esetében miként változnak a mitokondriális energiatermelés alapfolyamatai, úgymint az ATP termelés, oxigénfelhasználás és NAD(P)H egyensúly fenntartása.
3. A megfigyelt mitokondriális funkcióban bekövetkező változásokkal összefüggésbe hozható biogenezis és gyulladásos jelátviteli utak és azok működésének felmérése.
4. Annak vizsgálata, hogy a funkcionális és biogenezisben bekövetkező változásokat követik-e mikroszkópos, vagy ultrastrukturális analízissel azonosítható morfológiai eltérések.

### **II. kísérletsorozat célkitűzései**

A II. kísérletsorozatban a testmozgás, mint potenciálisan alkalmazható preoperatív felkészítési módszer (prehabilitáció) vizsgálata történt a következő célkitűzések mentén.

1. Annak vizsgálata, hogy miképpen hat az ALPPS-t követő májregeneráció folyamatára a műtetet megelőző fizikai aktivitás (fizikai prehabilitáció) fokozás.
2. A mitokondriális funkcióra gyakorolt hatások széleskörű felderítése az ALPPS kezelt, nyugalmi körülmények között tartott és fizikailag felkészített állatcsoportokban.
3. A testmozgás hatására kialakuló mitokondriális funkció változások hátterében álló, májsejten belüli gyulladásos és mitokondriális biogenezisben bekövetkező változások feltérképezése.

## **3. Módszerek**

### **3.1. Etikai nyilatkozat**

A dolgozatban bemutatott állatkísérletek a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága (MÁB), a Magyar Állatvédelmi Törvény és a hatályos Európai Unió jogszabályoknak megfelelően kerültek végrehajtásra. Valamennyi beavatkozás és vizsgálat kivitelezése a Nemzeti Élelmiszerlánc-Biztonsági Hivatal (NÉBIH) által előzetesen elfogadott etikai engedélyeknek megfelelően történt. (Engedélyszám: PEI/001/1732-6/2015)

### **3.2. Állatok tartása**

Az I. kísérletsorozat során 6 hetes, 200-210 g testtömegű, Wistar patkányokat (n=100), a II. kísérletsorozatban a hosszú felkészítési idő miatt idősebb, 14-16 hetes, 300-500 g testtömegű egyedeket használtunk fel (allokáció: 1. és 2. táblázat). Az állatok elhelyezése egy erre a célra specifikusan kialakított állatházban történt, 12 órás nap-éj ciklus, állandó hőmérséklet (20-23°C) és relatív páratartalom (40-60%) biztosítása mellett. Az állatok számára táplálék és víz korlátlan mennyiségben, szabadon állt rendelkezésre

### **3.3. Műtéti Beavatkozások**

Generalizált anesztézia indukcióját követően (I. kísérlet: ketamin + xylazin [75mg/ttkg + 7,5mg/ttkg] kombinációjával, II. kísérlet: Isoflurane és tiszta oxigén kombinációjával [2,5%(v/v) koncentráció és 0,5-0,75l/perc gázáramlás]) a has megnyitása medián laparotomia útján történt. A vena portae jobb laterális (right lateral lobe -RLL), bal mediális (left median lobe -LML), bal laterális (left lateral lobe -LLL)-t és kaudális lebenyét (caudate lobe -CL) ellátó ágainak kipreparálása és lekötése (6-0 Black Silk, Atramat, Mexico DF, Mexico) sebészi mikroszkóp alatt történt (Leica M650, Leica Microsystems, Zürich) 10x-es nagyítás mellett. Az ALPPS csoport egyedeiben ezen felül a májparenchyma elektrokauterrel és intraparenchymális U-alakú beöltésekkel kivitelezett in situ transzszekciója is elvégzésre került (6. ábra). Az állatok életének kioltása halálos dózisu ketaminnal történt.

### **3.4. Testedzési protokoll**

A II. kísérletsorozat alkalmával az állatokat 2 csoportba soroltuk. A kontrollcsoport (ALPPS) egyedeit 6 héten át konvencionális tartási körülmények között helyeztük el. A rehabilitációban részesülő csoport (ALPPS+P) egyedei emellett 6 héten át, heti ötször, alkalmanként 1 óra hosszan futópados edzésben részesültek maximum 16m/perc futási sebességgel.

### 3.5. Állatok beosztása kísérletek szerint

1.táblázat: Állatok allokációja a PVL és ALPPS mitokondriális változásokra gyakorolt hatásának vizsgálatát célzó kísérletekben (I. kísérlet):

		Regenerációs idő és állatszámok(db)					összesítés	
Végrehajtott vizsgálatok	Csoport	0h	24h	48h	72h	168h	Csoport	Teljes kísérlet
mitokondriális, western blot, szövettani és PCR vizsgálatok	PVL	5+5	5	5	5	5	25	100
	ALPPS		5	5	5	5	25	
Ultrastruktúra analízis és elektronmikroszkópia	PVL	5+5	5	5	5	5	25	
	ALPPS		5	5	5	5	25	

2.táblázat: Állatok allokációja az ALPPS esetén alkalmazott fizikai felkészítés hatásait célzó vizsgálatok során (II. kísérlet):

		Regenerációs idő és állatszámok(db)					összesítés	
Végrehajtott vizsgálatok	Csoport	0h	24h	48h	72h	168h	Csoport	Teljes kísérlet
mitokondriális, western blot, szövettani és PCR vizsgálatok	ALPPS	6	6	6	6	6	30	60
	ALPPS+P	6	6	6	6	6	30	

### 3.6. Morfometriai vizsgálatok

#### 3.6.1. Májttömeg változások és a regenerációs ráta vizsgálata:

A regenerációs ráta számítása a következő képlet segítségével lett elvégezve: *(Testtömegre vonatkoztatott lebenytömeg/kontroll csoport testtömegre vonatkoztatott azonos májlebenyének tömege) \*100.*

#### 3.6.2. Szövettani vizsgálatok

A májlebenyek tömegének mérését követően a regenerálódó RML-ből (right median lobe - jobb mediális lebeny) 4 mm vastag szövethasábok kimetszése történt, amelyek ezt követően 24 órás fixálásban részesültek 4%-os semleges pufferezt paraformaldehidben. A mintákat felszálló alkoholsoros kiszáritás után paraffinba ágyztuk. Az így kapott szövettani blokkokból 4µm-es szövettani metszetek készültek. A metszetek xilolban történő deparaffinálását és alkoholos mosását követően (2x15 perc) pH 9.0-en történő feltárását végeztük el (30 perc, 95°C). A feltárt metszetek blokkolása 3%-os BSA (bovine serum albumin) puffereztben történt, amelyet 1 óra primer anti-Ki-67 (Agilent, Santa Clara, CA, USA), majd 1 óra szekunder antitestekkel történő

inkubálás követett (Antitestek listáját: 4. Táblázat tartalmazza). Az elkészült metszetek fedése Everbrite Hardset (Biotium, LaJolla, Ca, USA) fedőanyaggal történt.

### **3.6.3. Elektronmikroszkópia**

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a szövetminták 2%-os glutáraldehiddel és 4%-os paraformaldehiddel történő perfundálással lettek kezelve. Ezt követően az előfixált szerveket még 2 óra glutáraldehides (2%) utófixálásban részesítettük. Az így előkészített mintákból 1x1x1 mm-es darabok készültek, amelyeket felszálló alkoholsoros dehidráció után Araldite-ba ágyasztunk. Ezekből a mintákból azután egy ultramikrotóm segítségével ultravékony metszetek készültek, amelyeket ólom-acetát kontrasztzásban részesítettünk. Az anyagvizsgálat H-7500 típusú, Hitachi transzmissziós elektronmikroszkóppal történt (Hitachi, Tokyo, Japán).

## **3.7. Mitokondriális vizsgálatok**

### **3.7.1. Mitokondriumok izolálása**

A mitokondriumok izolálása a regenerálódó májlebeny 0,5 g tömegű mintáiból történt. Az állatok életének kioltását, a máj eltávolítását és lebenyeinek lemérését követően az RLM-ből származó friss szövetdarabot 250 mM szukróz, 10 mM Tris, 0,5 mM EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav), 1 g/l BSA pH 7,4 (HCl) tartamú pufferben, Potter csőben homogenizáltuk, ezt követően 10 percen keresztül 585 G-n centrifugáltuk. A felülúszót további 10 percen keresztül 200G-n centrifugáltuk. Az így kiülepitett pelletet újra szuszpendáltuk a homogenizációs pufferben. Ez a mintatisztítást szolgáló lépést további 3 alkalommal ismételtük meg, végül az utolsó alkalommal a felülúszót eltávolítottuk és a pelletet 200µl homogenizációs médiumban újra szuszpendáltuk. A mitokondriális ATP termelés, oxigén fogyasztás, NAD(P)H (nikotinamid-adenin-dinukleotid-(foszfát)) egyensúly és ROS (reaktív oxigéngyök) termelés mérése az így nyert friss mitokondriális izolátumokon történt. A megmaradó izolátumokat -80°C-on tároltuk további western blot vizsgálatok céljára.

### **3.7.2. mitokondriális légzés vizsgálata**

A mitokondriális légzés (oxigénfogyasztás) vizsgálata során a terminális respirációs lánc I. (NADH-dehidrogenáz, CI) és II. (szukcinát dehidrogenáz, CII) komplexeinek oxigénfogyasztás vizsgálata történt meg (147). A mitokondriális oxigénfogyasztási próbákat Oxygraph-2K (Oroboros Instruments, Innsbruck, Ausztria) magas-felbontású respirometriás rendszerrel 37°C-on végeztük 2 ml-es küvettákban (148). Az oxigén-érzékelők rutin kalibrálása légköri szaturáción és oxigénmentes médiumban egyaránt elvégzésre került. A mérések során state 4 (bazális állapot – csak ADP és mitokondrium található a reakcióelegyben) és szubsztráttal energizált state 3 (indukált állapot – szubsztrát, ADP és izolált mitokondriumok hozzáadása a reakcióelegyhez) légzésvizsgálatokat végeztünk. A mitokondriumokat glutamáttal és maláttal (GM) (5Mm egyenként), vagy szukcináttal (Suc) (5 Mm) energizáltuk. A mitokondriális légzési kontroll rátát ADP (2 Mm) jelenlétében határoztuk meg. A méréseket standard reakciómédiumban (125 mM KCl (Kálium-klorid), 1 mM MgCl<sub>2</sub> (Magnézium-klorid), 20 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethaneszulfonsav), 2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Dikálium-hidrogén-foszfát), 0,1 mM EGTA (Egzatik-sav), pH 7,0 [KOH] és 0,025% zsírsav-mentes BSA) hajtottuk végre.

### **3.7.3. mitokondriális ATP termelés vizsgálata**

Az izolált mitokondriumok ATP termelésének vizsgálatát kapcsolt enzimatikus reakcióval végeztük el, amelyben a következő folyamatok mennek végbe: a standard mérési médiumhoz NADP<sup>+</sup>-t adtunk (1,5 mM), hexokinázzal (2 U/ml), glükóz-6-foszfát-dehidrogenázzal (3,84 U/ml), 2,5 mM glükózzal és 50 µM P1,P5-di(adenozin-5)-pentafoszfáttal (az adenilát-kináz inhibitora) egyetemben. A reakció során az elegyben található hexokináz jelenlétében az ATP a glükózt glükóz-6-foszfáttá foszforilálja. Az így keletkező glükóz-6-foszfátot a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz 6-foszfoglükonáttá alakítja, amely reakció során az enzim egyidejűleg a médiumban található NADP<sup>+</sup>-t NAD(P)H-vá redukálja. Az így keletkező NADPH abszorbanciáját 340 nm-en Jasco V650 UV/VIS dupla-sugaras spektrofotométerrel mértük (ABL&E Jasco, Tokyo, Japán). A mérések kalibrálását ismert mennyiségű ATP-vel végeztük. A mitokondriális ATP termelés hatékonyságát P/O (termelt ATP/fogyasztott oxigén) hányados számolással igazoltuk.

### **3.7.4. mitokondriális NAD(P)H homeosztázis vizsgálata**

A mátrix NAD(P)H autofluoreszcencia vizsgálata PTI Deltascan fluoreszcens spektrofotométerrel (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ, USA), 37°C-on, 2 ml-es kamrákban történt. A bazális NAD(P)H autofluoreszcencia mérése során egyedül mitokondriumok voltak jelen az inkubációs médiumban. Az indukált NAD(P)H értékek mérését CI vizsgálatánál glutamát, CII esetében pedig szukcinát hozzáadásával végeztük. A fluoreszcenciát 344 nm-es excitációs és 460 nm-es emissziós hullámhosszon mértük. A NAD(P)H koncentrációjában bekövetkező változásokat nmol/µl-ben fejeztük ki.

### **3.7.5. mitokondriális ROS termelés vizsgálata**

A mérések H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hidrogén-peroxid) és Amplex UltraRed (Thermo Scientific, Boston, MA) fluoreszcens pigment tartalmú közegben történtek. Az inkubációs médiumhoz torma peroxidáz adását követően (5 unit/2 ml), az Amplex UltraRed reagenssel (1 µM), majd a mitokondriális izolátummal inkubáltuk. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> képződést glutamát és malát (5-5 Mm egyenként) vagy szukcinát hozzáadásával indítottuk meg, a fluoreszcenciát 37°C-on PTI Deltascan fluoreszcencia spektrofotométer segítségével detektáltuk (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ, USA) 550 nm excitációs és 585 nm emissziós hullámhosszok mellett. A kalibrációs jelet ismert mennyiségű H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> segítségével hoztuk létre minden mérés végén (147).

## **3.8. qPCR vizsgálatok**

A szövetminták RNS tartalmának izolálását NucleoSpin® RNA II kit (Macherey-Nagel # 740955.250 Düren, Németország) segítségével végeztük el a gyártó ajánlásainak megfelelően. A cDNS könyvtárak szintézise Tetro cDNA Synthesis kit (Bioline #BIO-65026 Luckenwalde, Germany) használatával valósult meg. A qPCR-hez használt reakcióelegy a következő összetevőkből állt: 1ul EvaGreen pigment, 10 ul 2x iTaq supermix, 2,5 ul 10 nmol koncentrációjú specifikus primer pár összesen 20 ul végtérfogatra hígítva. Az amplifikációkat LightCycler 480 típusú készülékkel végeztük el.

## **3.9. Western blot vizsgálatok**

A western blot vizsgálatokhoz szükséges protein izolátumok elkészítése 35mg májszövet RIPA bufferben történő homogenizálásával történt, melyet Next Advance Bead Beater 24 (NextAdvance, Boston, MA, USA) cirkóniumgyöngyös szövetzúzó segítségével hajtottunk végre.

Ezt követően a homogenizált szövet ülepítését végeztük 4°C-on 14500 RPM centrifugálás mellett. A pontos fehérje koncentrációt Bradford reakcióval határoztuk meg. Ezt követően az izolátumok stabilizálását végeztük el Laemmli oldat hozzáadásával, és 5 perc 95°C-on történő főzéssel. Valamennyi stabilizált oldatból 15 µg fehérjét tartalmazó mennyiség került felvitelre 5-15%-os SDS-PAGE gélekre (Bio-Rad, Hercules, MA, USA). A proteinfuttatást követően (95 Volt hordozófeszültség) azok PVDF membránokra (polivinil-difluorid) (WesternBright-Cl, Advansta, Menlo Park, CA, USA) történő elektrotranszferjére került sor, 0,5 Amper áramerősség mellett. A teljes proteintartalom vizualizálása Ponceau vörös pigmenttel történt, a későbbiek során a teljes jelölt fehérjetartalom szolgált belső kontrollként. Ezt követően a membránok mosását TBST (tris buffered saline-tween) oldatban végeztük el (3x15 perc). A membránok primer antitestekkel történő jelölését és blokkolását 3%-os, megfelelő koncentrációra hígított antitesteket tartalmazó BSA-TBS oldattal hajtottuk végre (4. táblázat). A primer antitestek vizualizációja specifikus szekunder antitestek alkalmazásával történt (Advansta, Menlo Park, CA, USA).

### **3.10. Statisztikai kiértékelés**

A mérések során kapott eredmények statisztikai kiértékelése GraphPad Prism v7.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) szoftver segítségével történt. Az egyes csoportok közötti statisztikai különbséget kétutas ANOVA és Bonferroni-féle post-hoc analízisekkel végeztük. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, amennyiben  $p < 0,05$ . Az eredmények közlése  $\text{átlag} \pm \text{SD}$  formában történt. A korreláció-analízisek kétirányú Pearson próba segítségével lettek megvalósítva.



## **4. Eredmények:**

### **I. Kísérlet: Sejt energetikai változások vizsgálata PVL és ALPPS során**

#### **4.1.1. Lebentömeg változások PVL és ALPPS hatására:**

A PVL kezelt állatokban a regenerálódó RML tömegnövekedése a posztoperatív 48. órától szignifikáns mértékben meghaladta a kontroll csoportban mért értékeket. Az ALPPS operációval kezelt állatok regenerálódó lebenyeinek növekedése szignifikáns mértékben meghaladta a PVL csoportban mérhető abszolút lebentömeg növekedést. Ez a növekmény az ALPPS kezelt egyedekben dinamikusabbnak bizonyult a PVL-en átesett állatokhoz képest (24h:  $p=0,404$ , 48h:  $p<0,001$ , 72h:  $p<0,001$ , 168h:  $p<0,001$ , PVL vs. ALPPS).

#### **4.1.2. A sejtosztódás ütemének változásai PVL és ALPPS hatására**

Mind a PVL, mind pedig ALPPS elvégzését követően szignifikáns mértékű Ki-67 index emelkedés figyelhető meg, amely legmagasabb értékét a műtéteket követő 24. órában érte el, és szignifikánsan magasabb maradt a kontrollcsoporthoz képest a 48. és 72. óra folyamán. A 24. órában mérhető legmagasabb osztódási számot követően mindkét állatcsoportban a Ki-67 index graduális csökkenése figyelhető meg, amely a 168. órára a bazális értékhez konvergál. Mindezen változásokból kiemelendő, hogy az ALPPS csoportban a Ki-67 index emelkedés jelentősen meghaladta a PVL csoportban mérhető értékeket a 24. és 48. posztoperatív órában. (24h:  $p<0,001$ , PVL vs. ALPPS; 48h:  $p=0,001$ , PVL vs. ALPPS).

#### **4.1.3. A PVL-t és ALPPS-t követő, terminális oxidációban bekövetkező változások**

PVL-t és ALPPS-t követően az I. légzési komplex bazális O<sub>2</sub> fogyasztásában szignifikáns eltérés nem volt mérhető. A II. légzési komplexum esetében az ALPPS csoportban a kontroll értékekhez képest szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető a 24. óra folyamán. Az I. légzési komplex indukált működése esetében a kontrollcsoporthoz képest egyik állatcsoportban sem változott szignifikáns mértékben az oxigénfogyasztás, ugyanakkor a 48. órában az ALPPS csoport értékei szignifikáns mértékben alacsonyabbnak bizonyultak a PVL csoportban mértekhez képest ( $p=0,004$ ). A II. légzési láncalkotó indukciója esetén a PVL csoportban szignifikáns emelkedés volt látható a kontrollcsoport értékeihez képest a 24. és 48. óra során. Az ALPPS csoport esetében ugyancsak szignifikáns emelkedést mutatott a kontrollcsoport értékeihez képest a 24. órában, ugyanakkor a 48. órára az oxigén fogyasztás csökkenése volt megfigyelhető, amely által a PVL és ALPPS csoportok között szignifikáns eltérés alakult ki ( $p=0,017$ ).

#### **4.1.4. A PVL-t és ALPPS követő ATP termelésében bekövetkező változások**

PVL-t követően a bazális CI ATP termelés nőtt a vizsgálatok első 24 órája során. Ez a növekmény a 48. óra elteltével csökkenést mutatott, ugyanakkor a bazális értékekhez képest még mindig szignifikánsan magasabbnak bizonyult. Így ebben a csoportban az ATP termelés szignifikánsan fokozott volta egészen a 168. óráig fennmaradt a CI esetén. Mindezen változások eredményeképpen a PVL csoportban szignifikánsan magasabb ATP termelési értékek voltak mérhetőek az ALPPS csoporthoz viszonyítottan a posztoperatív 48. és 72. óra folyamán (48h:  $p=0,014$ , 72h:  $p<0,001$ ). A CII vizsgálatok az eredmények némiképp eltértek. A bazális aktivitás a PVL csoportban szignifikánsan emelkedett a kontrollcsoporthoz képest a 24., 48. és 72. óra folyamán, ugyanakkor a 168. óra elteltével az ATP termelés mértéke visszatért a

kiindulási érték közelébe. Az ALPPS csoport vizsgálatakor a bazális ATP termelésben bekövetkező változások élesen eltértek. A CII esetében szignifikáns mértékű ATP szintézis fokozódás volt látható az első 24 óra folyamán, ugyanakkor ez a felfokozott szintetikus aktivitás hirtelen csökkenést mutatott a posztoperatív 48. órára, amelynek következtében szignifikánsan alacsonyabb értékek mutatkoztak a PVL csoporthoz képest a 48. posztoperatív óra során. ( $p=0,019$ ). Az indukált CI ATP termelés vizsgálatakor a PVL csoport esetében szignifikánsan emelkedett aktivitást figyeltünk meg a kontrollcsoporthoz képest. Az ALPPS csoportban szignifikáns eltérés nem volt kimutatható a kontrollcsoport értékeihez képest. Ugyanakkor, a posztoperatív 48. óra folyamán az ALPPS csoportban a PVL csoporthoz képest szignifikánsan alacsonyabb ATP termelés volt megfigyelhető ( $p=0,038$ ). Indukált CII aktivitás esetében a PVL csoportban a kontrollcsoporthoz képest szignifikánsan alacsonyabb ATP termelés volt mérhető a posztoperatív 72. és 168. órában. Az ALPPS csoport esetében az indukált CII ATP termelése a posztoperatív 48., 72. és 168. órában is szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkozott a kontrollcsoporthoz képest. A 48. órában tapasztalt ATP termelés csökkenés következtében az ALPPS csoportban a PVL csoporthoz képest szignifikánsan csökkent értékek voltak mérhetőek ( $p=0,029$ ).

#### **4.1.5. NAD(P)H egyensúly változások PVL-t és ALPPS-t követően**

A bazális CI aktivitás során mért NAD(P)H egyensúlyi változásokat illetően a PVL csoportban nem volt megfigyelhető szignifikáns eltérés a kiindulási értékekhez képest. Az ALPPS csoport esetében ugyanakkor a posztoperatív 48. órában szignifikánsan alacsonyabb értékeket mértünk a kontroll értékhez képest. A PVL és ALPPS csoportok összehasonlításakor a PVL csoportban mért NAD(P)H koncentráció az ALPPS csoporttal összevetve szignifikánsan magasabbnak mutatkozott a posztoperatív 24. és 48. óra során (24h:  $p=0,041$ ; 48h:  $p=0,049$ ). A bazális CII aktivitás esetében a PVL csoportban a kontroll értékekhez képest nem voltak szignifikáns változások mérhetőek. Az ALPPS csoportban mért NAD(P)H koncentráció értékek a bazális koncentrációkhoz képest szignifikáns csökkenést mutattak a posztoperatív 48. órától kezdődően a kísérletek végéig. Ezen koncentrációcsökkenés eredményeképp az ALPPS csoportban a PVL kezelthez képest szignifikánsan alacsonyabb NAD(P)H tartalom volt megfigyelhető a 48. posztoperatív órában ( $p=0,026$ ). Indukált CI aktivitás esetében a PVL csoportban nem történt szignifikáns változás a NAD(P)H tartalommal illetően, míg az ALPPS csoportban a kiindulási értékhez viszonyítottan szignifikánsan lecsökkent az intramitokondriális NAD(P)H koncentráció a posztoperatív 48. és 72. órában. Mindezen változások eredményeképp a 48. posztoperatív órában az ALPPS csoportban a PVL csoporthoz viszonyítva szignifikánsan csökkent NAD(P)H koncentráció volt kimutatható ( $p=0,002$ ). Indukált CII aktivitás esetében hasonló tendenciákat figyeltünk meg. A PVL által indukált májregeneráció során a NAD(P)H tartalom nem mutatott szignifikáns eltéréseket a kiindulási koncentrációkhoz viszonyítottan.

#### **4.1.6. A respiráció-kontroll változásai**

A respiráció kontroll vizsgálata során sem a PVL csoportban, sem pedig az ALPPS kezelt állatokban nem volt kimutatható szignifikáns eltérés a kontrollcsoporthoz viszonyítva, vagy a kezelési modalitások között.

#### **4.1.7. A szabadgyök termelés változásai ALPPS-t és PVL-t követően**

A kísérletek során szignifikáns reaktív oxigén gyök (ROS) termelésbéli különbség sem a PVL, sem pedig az ALPPS csoport egyedeiben nem volt mérhető a kontrollcsoportban mért értékekhez képest. Állatcsoportok közötti különbség csupán az indukált CI. aktivitás esetén, a

posztoperatív 168. óra folyamán volt megfigyelhető. Ekkor a PVL csoportban mért ROS termelés szignifikáns mértékben meghaladta az ALPPS csoportban mérhető.

#### **4.1.8. mRNS expresszióban bekövetkező változások**

Műtéteket követően a PGC1- $\alpha$  mRNS expressziója a PVL kezelt állatokban szignifikáns emelkedést mutatott a kontrollcsoporthoz képest 24, 48 és 72 órával az operációk után. Az ALPPS csoport esetében ugyancsak emelkedett expressziós aktivitás volt megfigyelhető a 24. és 48. posztoperatív óra folyamán. A 24. posztoperatív órában az ALPPS csoportban a PVL csoporthoz mérten szignifikánsan emelkedett PGC1- $\alpha$  expressziós értékek voltak mérhetőek ( $p=0,041$ ). Az NRF1 és mTFA mRNS expressziója a kontroll csoporthoz képest ugyan fokozott volt mindkét állatcsoportban, de egymáshoz viszonyítottan nem mutatkozott statisztikai eltérés.

#### **4.1.9. gyulladásos válasz reakcióban bekövetkező változások PVL és ALPPS hatásár**

PVL-t követően a májszövetben mérhető TNF- $\alpha$  protein koncentrációja az első 24 óra folyamán szignifikáns emelkedést mutatott a kontrollcsoporthoz képest ( $p=0,009$ ), de a 48. órától a kiindulási értékekhez viszonyítva szignifikáns koncentráció különbség már nem volt mérhető. Az ALPPS csoportban a szöveti TNF- $\alpha$  koncentrációja a kontrollcsoporthoz képest szignifikáns mértékben emelkedett az első két posztoperatív napon, legmagasabb mérhető koncentrációját pedig a posztoperatív 48. órára érte el. A 48. óra folyamán mért emelkedett szöveti koncentráció egyben szignifikánsan magasabbnak bizonyult a PVL csoportban mért értékhez képest is (24h:  $p=0,019$ ; 48h:  $p=0,012$ ). Az NF- $\kappa$ B P65 esetében mindkét állatcsoportban szignifikáns mértékű emelkedést mértünk az első 72 posztoperatív óra során, ugyanakkor a PVL-t követően ennek a mediátornak koncentrációi értékei szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyultak az ALPPS csoportban mértékhez képest 24 és 48 órával a műtétek után (24h:  $p=0,0054$ , 48h:  $p=0,039$ ). Mindkét vizsgált gyulladásos mediátor koncentrációja a kontrollcsoport értékeihez vált hasonlóvá 168 órával a műtétek után.

#### **4.1.10. mitokondriális biogenezisben bekövetkező változások**

A PVL csoportban a szöveti PGC1- $\alpha$  koncentráció szignifikáns mértékű növekedést mutatott a kontrollcsoport értékeihez képest a posztoperatív 48. órában, majd ismét a kiindulási értékhez konvergált. Az ALPPS csoportban egyik időpontban sem volt kimutatható mérhető különbség a kontrollcsoporthoz viszonyítva. Ugyanakkor a 48. órában mért PGC1- $\alpha$  koncentráció szignifikáns mértékben alacsonyabbnak bizonyult a PVL csoportban mért értékhez képest ( $p=0,040$ ). A májszöveti NRF1 protein koncentrációja a kontrollcsoportéval összevetve szignifikánsan megnövekedett a PVL csoport esetében az első 3 posztoperatív napon. ALPPS esetében szignifikáns mértékű NRF1 koncentráció változás nem volt mérhető egyik vizsgálati időpontban sem. Ezek az eltérések együttesen szignifikáns különbségek kialakulásához vezettek a PVL és ALPPS csoportok között a 24., 48. és 72. posztoperatív órában (24h:  $p=0,045$ ; 48h:  $p=0,028$ , 72h:  $p=0,047$ ). Az NRF2 esetében nem jelentkezett szignifikáns proteintartalom eltérés sem a kontrollcsoportokhoz képest, sem pedig az egyes kezelési modalitásokat egymáshoz viszonyítva. A májszövetből izolált mTFA koncentrációja mindkét állatcsoport esetében szignifikáns mértékű emelkedést mutatott a kontrollcsoportokhoz képest a 48. és 72. posztoperatív órában. Ezen felül az ALPPS csoport esetében 168 óra elteltével is szignifikánsan magasabb mTFA koncentráció volt mérhető a kontrollcsoporthoz képest. A teljes májszövetből izolált citokróm-c koncentrációjában egyik mérési időpontban sem bizonyult szignifikánsan különbözőnek a két állatcsoportot egymáshoz, vagy a kontroll értékekhez hasonlítva.

#### **4.1.11. mitokondriális proteintartalom változások**

A mitokondriális izolátumokból mért mTFA koncentrációjában a PVL csoport esetében szignifikáns változás nem volt kimutatható a kontrollcsoporthoz képest. Ugyanezen változások mellett az ALPPS csoportban a kontroll értékekhez viszonyított statisztikai mértékű eltérés nem jelentkezett az mTFA intramitokondriális koncentrációjában. Mindezen proteintartalombéli eltérések miatt az ALPPS csoportban mért mTFA koncentráció a PVL csoporthoz képest szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkozott (48h:  $p=0,002$ , PVL vs. ALPPS, 72h:  $p=0,028$  PVL vs. ALPPS). A mitokondriális citokróm-c koncentrációja a PVL csoportban szignifikáns mértékben megemelkedett a kontroll értékekhez képest a posztoperatív 48. és 72. óra folyamán, valamint az ALPPS csoporthoz viszonyítottan szignifikánsan magasabb értékek voltak mérhetőek az első 3 posztoperatív napon (24h:  $p=0,001$ ; 48h:  $p=0,001$ ; 72h:  $p<0,001$ ).

#### **4.1.12. mitokondriális méretváltozások**

PVL-t követően a mitokondriális méret a kontrollcsoporthoz viszonyítottan egyik mérési időpontban sem mutatott szignifikáns mértékű eltéréseket. ALPPS esetében viszont a 48. posztoperatív órára az átlagos mitokondriális átmetszeti terület szignifikáns csökkenést mutatott a kontroll és a PVL csoportokhoz képest ( $p= 0,035$ , PVL vs. ALPPS). Ezzel egyidőben a 0,24 négyzetmikrométernél kisebb mitokondriumok arányában szignifikáns növekedést regisztráltunk a PVL és a kontrollcsoportokhoz képest ( $p= 0,032$ , PVL vs. ALPPS).

## **II. kísérlet: A rehabilitáció hatásainak vizsgálata ALPPS-t követő májregeneráció során**

#### **4.2.1. Az ALPPS és ALPPS+P csoportok pre -és posztoperatív testtömegei**

A fizikai felkészítésben részesült ALPPS+P állatok testtömege mind a műtétek előtt, mind pedig azok után szignifikánsan alacsonyabbnak adódott az ALPPS csoportban mért értékekhez képest ( $p<0,001$  ALPPS vs. ALPPS+P).

#### **4.2.2. A fizikailag felkészített és nem felkészített, ALPPS műtéten átesett állatok RML lebenyeinek regenerációs ráta változásai**

Az ALPPS csoport esetében a regenerációs ráta a kontrollcsoporthoz képest szignifikáns emelkedést mutatott a 24. posztoperatív órától kezdve a felkészített csoport esetében a regenerációs ráta növekedése sokkal dinamikusabbnak bizonyult, amellyel így nem csak a kontrollcsoporthoz képest, de a fizikai felkészítésben nem részesülő, azonos időbeli csoporthoz képest is szignifikáns növekmény volt látható (24h:  $p= 0,012$ , 48, 72 és 168h:  $p<0,001$ ).

#### **4.2.3. Sejtciklusba lépés aktivitása ALPPS-t követően a fizikailag felkészített és nem felkészített állatok esetében.**

A Ki-67 index az ALPPS és ALPPS+P csoportokban egyaránt szignifikáns emelkedést mutatott 24, 48 és 72 órával a műtéteket követően, ugyanakkor az ALPPS+P csoportban a Ki-67 pozitív sejtek száma a 72. órában szignifikánsan magasabb értékkel jelent meg az ALPPS csoporthoz viszonyítva ( $p<0,001$ ).

#### **4.2.4. Az oxigénfelhasználás változásai ALPPS-t követően fizikai felkészítésben részesült és nem részesült állatok esetében.**

Az ALPPS állatcsoport esetében a CI bazális oxigénfogyasztása 24 és 48 órával a műtétet követően szignifikáns mértékben meghaladta a kontrollcsoport értékeit. Az ALPPS+P csoportban az oxigénfelhasználás a kontrollcsoportéhoz képest szignifikánsan megemelkedett a 48. és 72. posztoperatív órára. Mindezen változások eredményeképpen a 24. óra folyamán az ALPPS csoportban mért oxigénfelhasználás paradox módon szignifikánsan magasabbnak bizonyult az ALPPS+P csoportéhoz képest ( $p < 0,001$ ), míg a 72. posztoperatív órára ez a reláció megfordult, és az ALPPS+P csoport egyedeiben volt mérhető szignifikánsan magasabb oxigénfogyasztás az ALPPS műtéten átesettekhez képest ( $p = 0,027$ ). A II. légzési komplex esetében hasonló tendenciákat figyeltünk meg a bazális oxigénfogyasztás változásait illetően. Az ALPPS csoport egyedeiben a kontrollcsoportéhoz képest szignifikánsan emelkedett a bazális oxidáció mértéke a 24. és 48. órára. Az ALPPS+P kezelt állatokban a II. légzési komplexen keresztüli bazális oxigénfogyasztás szignifikáns emelkedést mutatott a 48. és 72. órában a kontrollcsoport értékeihez képest. E változások eredményeként a 24. posztoperatív órában az ALPPS-on átesett, nem felkészített egyedek májából izolált mitokondriumok bazális CII oxigén felhasználása szignifikánsan magasabbnak bizonyult az ALPPS+P csoport értékeihez viszonyítva ( $p < 0,001$ ). A 72. posztoperatív órára ez az arány megfordult a két csoport között, így a fizikailag felkészített csoportban szignifikánsan magasabb oxidációs értékek voltak mérhetőek a nem felkészített csoport értékeihez képest ( $p = 0,007$ ). Az indukált CI aktivitás esetében az ALPPS csoportban a kontrollcsoport értékeihez képest szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető a posztoperatív 24. és 48. óra folyamán. Az ALPPS+P egyedekben ugyancsak szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető. Az indukált CII oxigénfogyasztás esetében szignifikáns oxidáció-fokozódás jelentkezett az ALPPS csoportban a 24., 48., 72. óra folyamán, valamint a fizikai felkészítésben részesült állatok esetében a 48. óra során. A két állatcsoport között csak a 168. órában volt szignifikáns különbség az indukált CII oxigénfelhasználási értékekben ( $p < 0,01$ ).

#### **4.2.5. Az ATP termelés változásai ALPPS-t követően fizikai felkészítésben részesült és nem részesült állatok esetében.**

Az ALPPS esetében a posztoperatív 24. órában szignifikáns különbség volt kimutatható a bazális ATP termelés mértékében mindkét légzési komplex esetében (CI;  $p < 0,001$ , ALPPS vs. ALPPS+P valamennyi időpontban, CII; 0h, 24h, 48h és 72h:  $p < 0,001$ , 168h:  $p = 0,015$ ). Az indukált CI ATP termelés az ALPPS állatcsoport esetében a kontrollcsoporttal összevetve szignifikáns csökkenést mutatott a 48. és 72. majd 168. posztoperatív órában is. Az ALPPS+P csoport esetében a kontrollcsoportéhoz képest szignifikáns emelkedés volt tapasztalható a posztoperatív 24., 48. és 72. órában. Továbbá, ugyanezen állatcsoportban mért ATP termelés szignifikánsan magasabb értéket mutatott a csak ALPPS kezelt állatcsoportéhoz képest a posztoperatív 24. és 72. óra közötti intervallumban (24h:  $p = 0,0019$ , 48 és 72h:  $p < 0,001$ ). Az indukált CII ATP termelése nem mutatott szignifikáns eltérést a saját kontrollcsoport értékeihez képest a nem felkészített állatcsoportban. A fizikai felkészítésben részesült egyedekben mért indukált CII ATP termelés a kontroll és 72. óra közötti valamennyi mérési időpontban szignifikánsan magasabbnak mutatkozott a nem felkészített csoport értékeihez mérten ( $p < 0,001$ ).

#### **4.2.6. A P/O (termelt ATP/fogyasztott oxigén) arány változásai az ALPPS és ALPPS+P csoportokban**

Az ALPPS csoportban a P/O arány a posztoperatív 24., 48. és 72. órában az I. és II. légzési komplex esetében is szignifikáns csökkenést mutatott a kontrollcsoportéhoz képest. Az

ALPPS+P csoport esetében a P/O arány stabil maradt, amelynek következtében az I. légzési komplex esetében a 24. és 48. posztoperatív órában a II. légzési komplex esetén a 24., 48. és 72. órában szignifikánsan magasabb értékek voltak mérhetőek az ALPPS csoporthoz viszonyítva.

#### **4.2.7. A NAD(P)H egyensúly változásai prehabilitált és nem felkészített állatokban**

Bazális CI aktivitás alatt a mitokondriális NAD(P)H tartalom a kontrollcsoporthoz képest nem mutatott szignifikáns eltérést a fizikai felkészítésben nem részesült csoportban, míg a prehabilitációban résztvevő állatok esetében a kontrollcsoporthoz képest szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a posztoperatív 24. és 48. órában. Emellett kiemelendő, hogy a kontrollcsoportok esetében az ALPPS+P egyedeknél a mitokondriális NAD(P)H tartalom szignifikánsan magasabb volt a felkészítésben nem részesített állatokhoz képest ( $p=0,033$ ). A bazális CII aktivitás esetében mért NAD(P)H tartalomváltozások a kontrollcsoporthoz képest egyik vizsgált állatpopulációban sem bizonyultak szignifikáns mértékben eltérőnek. Ugyanakkor bazális CII működés esetében a posztoperatív 24. órában az ALPPS+P csoportban szignifikánsan magasabb NAD(P)H tartalom volt mérhető a csak ALPPS-ban részesült állatokban mért értékekhez képest ( $p=0,037$ ). Indukált CI aktivitás közben a bazális CI működés során látott változásokhoz hasonlóak voltak megfigyelhetőek. A fizikai felkészítésben nem részesülő állatcsoportok egyikében sem volt tapasztalható a kontrollcsoporttól szignifikánsan különböző NAD(P)H egyensúlybeli eltérés, míg a prehabilitált csoportban a posztoperatív 24. és 48. órában szignifikánsan alacsonyabb NAD(P)H koncentráció volt mérhető a kontroll értékekhez képest. Indukált CII aktivitás esetében ugyancsak szignifikánsan magasabb kontroll NAD(P)H koncentráció volt mérhető a fizikai felkészítésben részesült állatok esetében ( $p=0,0032$ ). Indukált CII aktivitáskor a bazális értékeknél esetében mértékhez hasonlóan egyik állatcsoport sem mutatott szignifikáns eltéréseket a kontrollcsoportjaikhoz viszonyítottan. Ugyanakkor a két állatcsoport között jelentős különbségek mutatkoztak. Indukált CII aktivitás esetében a fizikai felkészítésben részesült állatokban szignifikánsan magasabb NAD(P)H koncentráció volt mérhető a nem felkészített csoporthoz viszonyítva (24h:  $p=0,040$ , 48h:  $p=0,046$ ).

#### **4.2.8. A prehabilitáció gyulladáshoz való válaszként gyakorolt hatásai ALPPS-t követően.**

Az IL-1 $\beta$  koncentrációja szignifikánsan magasabbnak mutatkozott az ALPPS csoportban az ALPPS+P csoporthoz hasonlítva a műtétek után 48 és 72 óra elteltével (48h:  $p=0,0019$ , 72h:  $p<0,001$ ). Az ALPPS+P csoportban a beavatkozásokat követően 24 és 48 órával szignifikáns mértékű IL-1RA koncentráció emelkedés volt megfigyelhető a kontrollcsoporthoz képest, valamint a 24. órát követően valamennyi vizsgált időpontban az ALPPS csoporthoz képest (24h, 48h és 168h:  $p<0,001$ , 72h:  $p=0,0042$ ). 48 órával az ALPPS csoportban az IL-1RA szöveti koncentrációja szignifikáns mértékben növekedett a kontrollcsoporthoz képest. Az IL-6 koncentráció változásai hasonló kinetikát mutattak. ALPPS-t követően szignifikáns mértékű koncentráció növekedés volt megfigyelhető a kontrollcsoporttal szemben 24, 48 és 72 óra elteltével. Az ALPPS+P csoporttal szemben 48 és 72 órával a műtétek után ugyancsak szignifikánsan magasabb IL-6 koncentrációk voltak mérhetőek a csak ALPPS kezelt állatokban ( $p<0,001$ ). Az NF- $\kappa$ B P65 koncentrációja mindkét állatcsoportban megemelkedett a kontrollcsoportokhoz képest 24, 48, és 72 órával az operációk után, ugyanakkor a 24. és 48. órában az ALPPS csoport értékei szignifikánsan magasabbak voltak az ALPPS+P csoportnál (24h:  $p=0,035$ , 42h:  $p=0,004$ ).

#### **4.2.9. A rehabilitáció hatásai a mitokondriális biogenezisre.**

ALPPS-t követően a teljes sejtlizátum PGC1- $\alpha$  tartalma a kontrollcsoport értékeihez képest csupán a posztoperatív 24. órában mutatott szignifikáns változást. Az ALPPS+P csoportban PGC1- $\alpha$  koncentrációja viszont a 24. és 48. órában is szignifikánsan magasabbnak bizonyult a saját kontrollcsoportjának értékeihez képest, illetve ugyanezen időpontokban az ALPPS csoportban mérhető értékekhez hasonlítva is. A teljes sejtlizátumból mért NRF1 tartalom hasonló kinetikával változott. Az ALPPS csoportban az NRF1 koncentrációja emelkedettnek bizonyult 48, 72 és 168 órával a műtétek után. Az ALPPS+P csoport egyedeiben a kontroll, illetve a 24. 48. posztoperatív órában mért értékek magasabbnak mutatkoztak az ALPPS csoportban mérhető értékekhez képest ( $p < 0,001$ ). Az NRF2 koncentrációja az ALPPS csoportban a műtétek követően 24, 48 és 72 órával szignifikáns emelkedést mutatott a kontrollcsoporthoz képest. Az ALPPS+P csoportban úgyszintén, ugyanezen időpontokban szignifikáns NRF2 koncentrációemelkedés volt megfigyelhető a kontrollcsoporthoz képest, amely a 24. és 48. órában szignifikáns mértékben meghaladta az ALPPS csoportban mért értékeket ( $p < 0,001$ ).

#### **4.2.10. A rehabilitáció légzési komplexum szintézisre gyakorolt hatásai**

A teljes sejtlizátumok I. légzési komplexum tartalma az ALPPS csoportban csupán a 168. órában mutatott szignifikáns emelkedést a kontrollcsoporthoz képest. Az ALPPS+P csoportban ennek a légzési komplexumnak a koncentrációja nem mutatott változást a saját kontrollcsoportjához viszonyítottan, ugyanakkor szignifikánsan magasabbnak bizonyult az ALPPS csoport értékeinél 24, 48, és 72 órával a műtétek követően (24h és 72h:  $p < 0,001$ , 48h:  $p = 0,038$ ). A II. légzési komplexum koncentrációinak változásában hasonló dinamika volt megfigyelhető azzal a különbséggel, hogy ennek az enzimkomplexumnak a protein koncentrációja már a kontrollcsoportok összehasonlításakor is szignifikánsan magasabb értéket mutatott az ALPPS csoportban (kontroll, 24h és 72h:  $p < 0,001$ , 48h:  $p < 0,01$ ). A III. légzési komplexum oxidoreduktáz koncentrációinak vizsgálatakor egyik állatcsoportban sem jelentkezett szignifikáns eltérés a kontrollcsoportokhoz képest, ugyanakkor az ALPPS csoportban 24 óra elteltével szignifikánsan alacsonyabb koncentrációk voltak mérhetőek az ALPPS+P csoporthoz képest ( $p < 0,001$ ). A IV. légzési komplexum koncentrációja az ALPPS csoportban a műtétet követően nem mutatott eltérést a kontrollcsoporttal összevetve. Az ALPPS+P csoport esetében a kontrollcsoporthoz képest szignifikáns mértékű növekedés volt látható a műtétet követő 24., 48. és 72. óra folyamán. Ugyanezen időpontokban az ALPPS+P csoport értékei szignifikánsan meghaladták az ALPPS csoportét (24h, 48h és 72h:  $p < 0,001$ ). Az ATP-szintáz vizsgálatakor az ALPPS csoportban szignifikáns változás nem volt kimutatható. Az ALPPS+P csoportban a 24. posztoperatív órában szignifikáns növekedés volt detektálható a kontrollcsoport értékeihez képest. A két állatcsoportot összehasonlítva az ALPPS+P csoportban mérhető koncentráció értékek szignifikánsan magasabbak voltak az ALPPS csoportban mérhetőkhöz képest 24 és 72 órával a műtétek után (24h:  $p < 0,001$ , 72h:  $p = 0,028$ ).

## 5. Következtetések

### Az I. kísérletsorozatból levonható főbb következtetések.

1. A vizsgálatok során alkalmazott ALPPS modell a rágcsáló kísérletekre vonatkozó megkötésekkel jól és reprodukálható módon modellezte a humán műtéteket követő változásokat. Alkalmazása során a PVL-hez képest szignifikánsan magasabb regeneratív válaszreakció keletkezett, amely mikroszkópos szinten sokkal intenzívebb sejtosztódás formájában nyilvánult meg.
2. Az ALPPS-t a PVL-h rendkívül erős gyulladáshoz jelpálya aktiválódás követi, ami interferenciákat okozhat a mitokondriumok újdonszaporodásáért és karbantartásáért felelős biogenezis folyamatában.
3. A nagyobb fokú regeneráció mellett a biogenezis folyamatában létrejövő károsodások miatt a mitokondriális funkció jelentős visszaesése volt megfigyelhető a regeneráció azon ideje alatt, amikor a sejtosztódás a legintenzívebb. Humánra interpretálva ezen időszak a posztoperatív 10-14 nap közötti időszaknak feleltethető meg, amely sokszor egybe esik az ALPPS második műtétjének idejével, így előfordulhat, hogy a megfelelő májvolumen ellenére a sejt-energetikai rezervoárok alacsony volta miatt funkcionális deficit alakulhat ki.
4. A biogenetikus folyamatok károsodása fizikailag is azonosíthatóan manifesztálódik. ALPPS-t követően a mitokondriumok számbeli sokszorozódása figyelhető meg, ugyanakkor ezen organellumok kisméretűek, éretlenek. Ez utóbbi állítást megerősítik a mitokondriális frakció fehérjeösszetételében bekövetkező negatív változások.

### A II. kísérletsorozatból levonható főbb következtetések:

1. A fizikai aktivitás preoperatív időszakban történő fokozása szignifikáns változásokat idézett elő a máj regenerációjának dinamikájában. A fizikai felkészítésben részesült állatpopulációban a regenerációba lépő májsejtek száma hosszabb ideig maradt magasak, ami szignifikánsan nagyobb lebenytömeg növekedést idézett elő.
2. A nagyfokú regeneráció fokozódás mellett az ALPPS mellett fizikai felkészítésben részesült állatok májából izolál mitokondriumok erőteljes funkció fokozódása volt megfigyelhető, amely megfelelő energiát biztosított a regeneráció folyamatának stabil fenntartására és további akcelerálására.
3. Az energetikai output megemelkedésének hátterében a stressz indukálta mitokondriális biogenezis mediátorainak koncentráció fokozódása állt, amelynek következtében az egyes organelláris funkcióban résztvevő valamennyi komponens koncentrációja szignifikánsan magasabbnak bizonyult az előkezelésben nem részesülő állatcsoportéhoz képest.



## 6. Saját közlemények listája:

### A doktori értekezés alapjául szolgáló közlemények:

- **A. Budai**, A. Fulop, O. Hahn, P. Onody, T. Kovacs, T. Nemeth, M. Dunay, A. Szijarto “Animal Models for Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy (ALPPS): Achievements and Future Perspectives”, Eur Surg Res. 2017;58(3-4):140-157. doi: 10.1159/000453108. Epub 2017 Mar 9.
- **A. Budai** , G. Horváth, L. Tretter, Z. Radák, E. Koltai, Z. Bori, F. Torma, Á. Lukáts, Röhlich, A. Szijártó, A. Fülöpmitokondrial function after associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy in an experimental model. Brit J Surg. DOI: 10.1002/bjs.10978

### Egyéb Közlemények:

- Fulop A., Szijarto A., Harsanyi L., **Budai A.**, Pekli D., Korsos D., Horvath I., Kovacs N., Karlinger K.,Mathe D., Szigeti K: „Demonstration of metabolic and cellular effects of portal vein ligation using multi-modal PET/MRI measurements in healthy rat liver PLoS One.” 2014 Mar 5;9(3):e90760. doi: 10.1371/journal.pone.0090760. eCollection 2014
- Fülöp A., **Budai A.**, Czigány Z., Lotz G., Dezső K., Paku S., Harsányi L., Szijártó A.: „Alterations in hepatic lobar function in regenerating rat liver.” J Surg Res. 2015 Aug;197(2):307-17. doi: 10.1016/j.jss.2015.04.033. Epub 2015 Apr 15
- David Tibor Lauber, Dóra Krisztina Tihanyi<sup>1</sup>, Zoltán Czigány, **András Budai**, Kovács, Tibor, Dóra Drozgyik, András Fülöp, Attila Szijártó: „Effects of different degrees of extended portal vein ligation on liver regeneration.” J Surg Res