

A máj funkciójának vizsgálata vena portae elzárással kiváltott májregeneráció során

Doktori értekezés

Dr. Kovács Tibor

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szijártó Attila Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Jancsó Gábor Ph.D., egyetemi docens
Dr. Kékesi Violetta Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kóbori László Ph.D., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Ferencz Andrea Ph.D., egyetemi docens
Dr. Dede Kristóf Ph.D., főorvos, adjunktus

Budapest
2019

Tartalomjegyzék

TARTALOMJEGYZÉK	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1. BEVEZETÉS	7
1.1. ELŐSZÓ.....	7
1.2. MALIGNUS MÁJTUMOROK ÉS MÁJSEBÉSZETI KEZELÉSÜK.....	8
1.2.1. <i>A máj daganatos betegségei</i>	8
1.2.2. <i>A daganatos májbetegségek kezelésének sebészeti alapjai</i>	9
1.2.3. <i>Vena portae okklúzióval indukált májregeneráció</i>	16
1.2.3.1. Alapok	16
1.2.3.2. Története	17
1.2.3.3. Patofiziológiai és molekuláris háttér	18
1.2.3.4. A PVO klinikuma	22
1.3. MORFOLÓGIA ÉS FUNKCIÓ KÉRDÉSE A MÁJSEBÉSZETBEN	23
1.4. A MÁJ FUNKCIÓJÁNAK MÉRÉSE	24
1.4.1. <i>Statikus májfunkciós tesztek</i>	24
1.4.2. <i>Klinikai „score” rendszerek</i>	25
1.4.3. <i>Dinamikus májfunkciós tesztek</i>	26
1.4.3.1. Konverziós tesztek.....	27
1.4.3.2. Eliminációs tesztek	28
1.4.3.3. Nukleáris képalkotás alapú tesztek.....	29
1.4.3.4. A májfunkció mérésének újszerű lehetőségei	31
1.4.4. <i>A máj drogmétabolizmusa és a citokróm P450 enzimek</i>	33
2. CÉLKITŰZÉSEK	36
3. MÓDSZEREK	37
3.1. ETIKAI ENGEDÉLYEK, ÁLLATTARTÁSI FELTÉTELEK.....	37
3.2. MŰTÉT – VENA PORTAE LIGATÚRA (PVL)	37
3.3. I. KÍSÉRLET – MÁJFUNKCIÓ A SZERVES ANION TRANSPORT TÜKRÉBEN	39
3.3.1. <i>Csoportbeosztás</i>	39
3.3.2. <i>In vitro vizsgálatok</i>	40
3.3.2.1. Hepatocita izolálás és sejt kultúrák létrehozása	40
3.3.2.2. Immunfluoreszcencia.....	41
3.3.2.3. In vitro taurokolát és bilirubin transzport analízis.....	42
3.3.3. <i>In vivo vizsgálatok</i>	43
3.3.3.1. Máj tömeg és májvolumen	43
3.3.3.2. Epeszekréció vizsgálata	44
3.3.3.3. Indocián-zöld clearance teszt.....	45
3.3.3.4. Planáris dinamikus ^{99m} Tc-hepatobiliáris szcintigráfia.....	47
3.3.3.5. Konfokális lézer endomikroszkópia	48
3.4. II. KÍSÉRLET – MÁJFUNKCIÓ A DROGMETABOLIZMUS TÜKRÉBEN.....	49
3.4.1. Csoportbeosztás	49
3.4.2. Pentobarbital sleeping teszt	49
3.4.3. Máj tömeg.....	50

3.4.4. Mikroszóma preparálás és in vitro citokróm P450 enzimaktivitás meghatározás	50
3.4.5. Citokróm P450 RNS izolálás és kvantitatív “real-time polymerase chain reaction”	51
3.4.6. Immunhisztokémia	52
3.5. STATISZTIKAI ANALÍZIS	53
4. EREDMÉNYEK	54
4.1. I. KÍSÉRLET – MÁJFUNKCIÓ A SZERVES ANION TRANSZPORT TÜKRÉBEN	54
4.1.1. <i>In vitro</i> vizsgálatok	54
4.1.1.1. Sejtkultúra immunfluoreszcencia	54
4.1.1.2. Taurokolát és bilirubin transzport analízis	56
4.1.2. <i>In vivo</i> vizsgálatok	58
4.1.2.1. Májtömeg és májvolumen	58
4.1.2.2. Epeszekréció vizsgálata	58
4.1.2.3. <i>In vivo</i> immunfluoreszcencia	60
4.1.2.4. Globális májfunkció	63
4.1.2.5. Regionális májfunkció	63
4.2. II. KÍSÉRLET – MÁJFUNKCIÓ A DROGMETABOLIZMUS TÜKRÉBEN.....	66
4.2.1. Pentobarbital sleeping teszt	66
4.2.2. Májtömeg.....	66
4.2.3. <i>In vitro</i> citokróm P450 enzimaktivitás	67
4.2.4. Citokróm P450 mRNS expresszió	71
4.2.5. Immunhisztokémia	72
5. MEGBESZÉLÉS	73
6. KÖVETKEZTETÉSEK.....	93
6.1. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK.....	94
7. ÖSSZEFOGLALÁS	95
8. SUMMARY	96
9. IRODALOMJEGYZÉK	97
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	115
10.1. DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK	115
10.2. EGYÉB KÖZLEMÉNYEK.....	115
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	117

Rövidítések jegyzéke

^{99m} Tc	99-es tömegszámú, metastabil technécium izotóp
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALPPS	associating liver partition with PVL for staged hepatectomy
ANOVA	analysis of variance / variancia analízis
APRI	aspartate transaminase-to-platelet ratio index
ASGPR	aszialoglikoprotein receptor
B _{1/2}	vér féléletidő
B-C	Bismuth-Corlette szerinti klasszifikáció
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer guideline
BDG	bilirubin-diglukuronid
BG	bilirubin-glukuronid / konjugált bilirubin
BILCHE	serum bilirubin/serum cholinesterase index
BMG	bilirubin-monoglukuronid
BSA	body surface area / telje testfelszín
BSEP/Bsep	bile salt export pump
CAR	konstitutív androsztán receptor
CCC	kolangiocelluláris karcinóma
CL	caudate lobe / kaudális májlebenyek
CLE	confocal laser endomicroscopy / konfokális lézer endomikroszkópia
CT	computed tomography / komputeres tomográfia
CTP	Child-Turcotte-Pugh score
CYP	cytochrome P450 enzyme(s) /citokróm P450 enzi(ek)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
D _{START}	első duodenális megjelenés
DTPA	dimeglumin
EASL	European Association for the Study of the Liver
EBSS	Earl's balanced salt solution
ECM	extracelluláris mátrix
EGF	epidermális növekedési faktor
FLR	future liver remnant / tervezett maradékmáj
FLR%	tervezett maradékmáj hányados

FLRV	future liver remnant volume / tervezett maradékmáj térfogat
Gd-EOB	gadolinium-etoxibenzil
GSA	galactosyl serum human albumin / galaktozil szérum humán albumin
HBS	hepatobiliáris szcintigráfia
HBSS	Hank's balanced salt solution
HBV, HCV	hepatitisz B vírus, hepatitisz C vírus
HBS	hepatobiliary scintigraphy / hepatobiliáris szcintigráfia
HCC	hepatocelluláris karcinóma
HGF	hepatocita növekedési faktor
HIF1- α	hipoxia indukálta faktor-1-alfa
HPB	hepato-pankreatiko-biliáris / hepatico-pancreatico-biliary
HPLC	high-performance liquid chromatography
I/VCAM	intercellular/vascular cell adhesion molecule
ICG	indocyanine-green / indocián-zöld
IL	interleukin
i/eNOS	indukálható/endoteliális nitrogén-monoxid szintáz
LiMAx	liver maximum capacity
LL	lekötött lebenyek
LLL	left lateral lobe / bal laterális májlebeny
mebrofenin	2,4,6-trimethyl-3-bromo iminodiacetát
MELD	model for end-stage liver disease score
ML	median lobe / középső májlebeny
MMP	mátrix metalloproteázok
MRI	magnetic resonance imaging / mágneses rezonancia képalkotás
MRP/Mrp2	multidrug resistance protein 2
NASH	non-alcoholic steatohepatitis / nem-alkoholos zsírmáj
NF- κ B	nukleáris faktor kappa B
NLL	nem-lekötött lebenyek
NTCP/Ntcp	sodium-taurocholate cotransporting polypeptide
PC	csúcsintenzitás
PDGF	vérlemezke eredetű növekedési faktor
PDR	plasma disappearance rate / plazma eltűnési hányados

PET	positron emission tomography/pozitron emissziós tomográfia
PHLF	posthepatectomy liver failure / poszthepektómiás májelégtelenség
PH	parciális hepatektómia
PXR	pregnán X receptor
PVE	<i>vena portae</i> embolizáció
PVL	<i>vena portae</i> ligatúra
PVO	<i>vena portae</i> okklúzió
RC	relatív csúcsintenzitás
RLL	right lateral lobe / jobb májlebenyek
RT15	retention at 15 min / 15 perces retenciós érték
sFLR	standardised future liver remnant / sztenderdizált tervezett maradékmáj
sFLRV	sFLR térfogat
SPECT	single photon emission tomography
STAT3	signal transducer and activator of transcription-3
SOCS	suppressors of cytokine signalling
T _{1/2}	csúcsintenzitás felezési ideje
TELV	total estimated liver volume / teljes becsült májtérfogat
TGF- α / β	transforming growth factor / transforming growth factor alfa/béta
TIPS	transzkután intrahepatikus portoszisztémás söntkezelés
TLV	total liver volume / teljes májtérfogat
TMT	teljes máj tömeg
T _{MAX}	csúcsintenzitás ideje
TNF- α	tumor necrosis factor alpha / tumor nekrozis faktor alfa
tt	testtömeg
TV	tumour volume / tumor térfogat
OATP	organic anion transporting polypeptide
OLT	orthotopic liver transplantation / ortotópikus májtranszplantáció
UCB	unconjugated bilirubin / konjugálatlan bilirubin
UICC	Union for International Cancer Control
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
ZO-1	zonula occludens-1

1. Bevezetés



1. ábra Peter Paul Rubens, Frans Snyders: A léláncolt Prométeusz

„Visszatérhetett hát a napvilágra Prométheusz, de szabadságát nem nyerte még vissza: Hermész a Kaukázus egyik sziklájához vezette, ahhoz láncolta őt Héphaisztosz, Zeusz pedig egy vérengző sast rendelt oda, hogy csőrével hasítsa fel Prométheusz keblét, és napról napra megújuló máján lakmározzék.”¹⁰

1.1. Előszó

A máj tumoros betegségei kiugró halálozásuk révén az egész világon hatalmas egészségügyi problémát jelentenek. A korábbi idők szerény, jórészt a beteg explorációjára, klinikumára és fizikális vizsgálatára, s végső soron exploratív lapartómiára (!) támaszkodó diagnosztikai lehetőségeihez képest napjaink modern képalkotó arzenáljával, intervenciós radiológiai technikáival és molekuláris biológiai kórszövettani ismereteivel a májtumorok diagnózisa már gyakran nem ütközik akadályokba.¹¹ Korszerű kezelésük multidiszciplináris, azonban az elmúlt idők terápiás metódusainak robbanásszerű bővülése ellenére a kuratív kezelés szinte kizárólagosan egyet jelent a daganat műtéti eltávolításával. Bár a sebésztechnikai vívmányok már igen heroikus kiterjedésű reszekciókat is lehetővé tesznek, a „határ” ironikus módon már nem ebben, hanem a beteg számára megmaradó májállomány mennyiségében rejlik.¹²⁻¹⁴ Ugyanakkor, kezelésük ezen határon túlmenően is lehetséges, melyre a máj bámulatos - már az ókori görög legendákban is megsejtett - regenerációján alapulva a *vena portae* ágainak elzárásával („portal vein occlusion”, PVO) indukált májregeneráció hozta meg a zseniális választ.¹⁵⁻¹⁹ Azonban a „látszat néha csal”, melynek jegyében a legfrissebb felfedezések szerint a máj teljesítménye gyakran nem követi a jelentős morfológiai változásokat.¹⁴ Így napjainkban egyre nagyobb hangsúly kerül a folyamat funkcionális aspektusaira, mely drámai javulást hozhat a kezelés hatékonyabbá válása révén. Mindezeknek megfelelően kutatásaink során a PVO-val kiváltott májregeneráció funkcionális aspektusainak állatkísérletes vizsgálatát tűztük ki legfőbb célunkként.

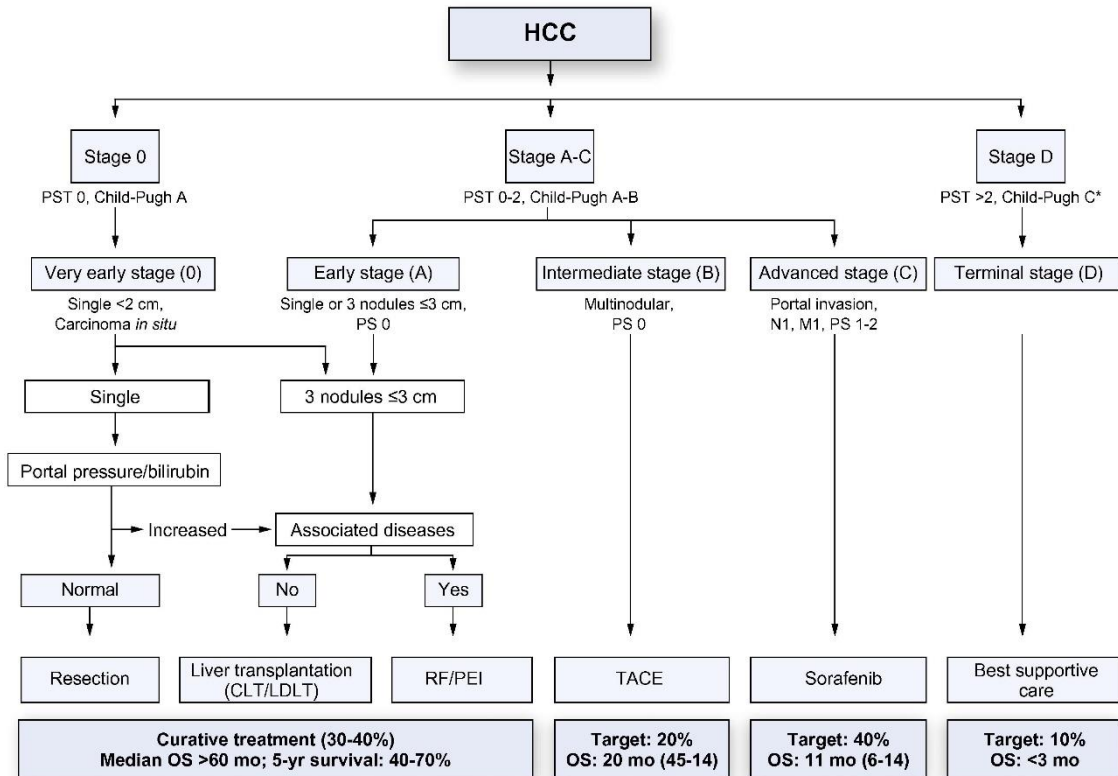
1.2. Malignus májtumorok és májsebészeti kezelésük

1.2.1. A máj daganatos betegségei

Az elsődlegesen májból kiinduló rosszindulatú tumorok világszerte óriási egészségügyi és társadalmi problémát jelentenek. Hazánkban „csupán” 300-400, míg a legfrissebb adatok (GLOBOCAN, 2012) alapján világszerte évi 782 000 új esettel a hatodik leggyakoribb daganatcsoport, mely kiugróan magas mortalitásával (745 000 elhalálozás/év) ugyanakkor a második a daganatos halálozás listáján.^{13, 20-22} A primer malignus májtumorok 75-90%-át kitevő hepatocelluláris karcinóma (HCC) legfőbb etiológiai faktora a máj cirrózisa, leggyakrabban hepatitis B, vagy C vírus (HBV, HCV) fertőzés okozta hepatitisz, alkoholos májbetegség, dohányzás, illetve akár aflatoxin B1-expozíció, hemokromatózis és Wilson-kór révén.¹³ Újabb felismerések szerint különféle civilizációs betegségek, mint az elhízás, nem-alkoholos zsírmáj (NASH) és a cukorbetegség is fokozzák a HCC kialakulásának esélyét.^{21, 23} A máj másik jelentős (10-15%) primer malignus tumora az epeúti sejtekből kiinduló kolangiocelluláris karcinóma (CCC), melynek etiológiai faktorai között az epeutak veleszületett- (primer szklerotizáló kolangitisz, Caroli-szindróma, epeúti ciszta stb.) és szerzett (epeúti kövesség és parazitózis, gyulladással járó bélbetegség stb.) betegségei és a torotraszt-expozíció emelendők ki, míg a HBV és HCV infekció, dohányzás, alkohol szerepe egyelőre vitatott.^{13, 20-22} A további primer malignus májtumorok (fibrolamelláris karcinóma, hepatoblastoma, primer neuroendokrin májtumor stb.) részletes tárgyalására ritka előfordulásuk, illetve sebészeti kezelésük nagyfokú hasonlósága miatt e dolgozat keretein belül nem térünk ki.^{21, 22, 24-26} Ezeknél messzemenőkéig hangsúlyosabbak a máj szekunder tumorai, melyek elsősorban emlő-, tüdő-, valamint vastag-végbél-, illetve jóval kisebb részt fej-nyaki daganatok áttétei. Bár a pontos incidencia nem ismert, gyakoriságuk jóval meghaladja az elsődlegesen májból kiinduló daganatokét, melyet jól érzékeltet, hogy a világszerte évi 1,4 millió incidenciájú kolorektális rákos esetek felében; az 1,67 millió incidenciájú emlőtumorok kb. 5,2%-ában, és az 1,82 millió incidenciájú tüdőtumorsejtek bizonyos részében is jelentkezik májmetasztázis.^{21, 27-29} A máj gyakori érintettségének oka kettős, egyfelől a zsigeri keringés elrendezéséből, másfelől a hepatikus endotél gazdag, tumorsejtek invázióját megkönnyítő fenestráltságából fakad.^{21, 27-29}

1.2.2. A daganatos májbetegségek kezelésének sebészeti alapjai

A sebészivel párhuzamosan az onkológiai, radiológiai, intervenciós radiológiai, gasztroenterológiai, patológiai, molekuláris biológiai, aneszteziológiai- és intenzív terápiás ismeretanyag, illetve a diagnosztikai- és terápiás eljárások exponenciális bővülésével napjainkban a daganatos betegségek kezelése határozottan a multidiszciplinaritás irányába tolódott. Mindezek értelmében a máj (malignus) tumorainak ellátása kapcsán egy sajátos kettősség áll fenn. Egyfelől, a multidiszciplináris megközelítés mind a CCC, mind a HCC viszonylatában vitathatatlanul észlelhető a klinikai döntéshozatal és a kezelési algoritmusok terén. Bár a CCC esetében a különféle kemo-radioterápiás, illetve perkután ablatív- és különféle embolizációs technikák klinikai kimenetelre, túlélésre gyakorolt hatása, valamint optimális terápiás algoritmusaiak egyelőre vitatottak, hatékony klinikai alkalmazásukra egyre nagyobb a törekvés.^{13, 30} A multidiszciplinaritás elve a HCC viszonylatában még inkább szembetűnő. Az Európai Májkutató Társaság (European Association for the Study of the Liver, EASL) által támogatott, és a HCC kezelésére aktuálisan leginkább elfogadott, „goldstandard”, klasszifikációs-, terápiás-, és prognosztikai ajánlás, a Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) beosztás stádiumfüggően (0-A-B-C-D) javasolja az alkalmazandó, különféle modalitású kezelési lehetőségeket (2. ábra).^{23, 31-33} A BCLC elvitathatatlan előnye, hogy a tumorstátusz mellett a beteg, illetve a máj (Child-Pugh score, ld. később) funkcionális állapotát is figyelembe veszi,^{23, 32, 33} ugyanakkor irányelveit mindmáig heves bírálatok érik túlzott restriktív, „egyenirányító” és a stádiumok között kevés átjárást engedő jellege, valamint a műtéti terápia indikációjának szigorú korlátozása miatt. Ennek megfelelően elsőként Torzilli, illetve a neves hepato-pancreato-biliaris (HPB) sebészeket tömörítő „HCC East-West Study Group” bizonyította köztes- és előrehaladott stádiumú, sebészi reszekcióval kezelt betegek BCLC-hez képest jóval előnyösebb (5 éves) túlélését (BCLC „B”: 57%,; BCLC „C”: 38%),³⁴ mellyel szinkronban napjaink májsebészeti álláspontja szelektált esetekben támogatja a műtéti terápia BCLC ajánlásához képest liberálisabb alkalmazását.³⁵⁻³⁷ Párhuzamosan, az igen rossz prognózisú CCC esetén a kizárólag R0 reszekcióval, esetlegesen májtranszplantációval elérhető 25-50%-os 5 éves túlélés műtéti kezelés nélkül szinte nem létező fogalom (0-5%), a túlélés pedig csupán hónapokban (6-12) mérhető.^{38, 39} Az áttéti májtumorok teljes körű eltávolítása nélkül szintén nem képzelhető el a beteg hosszú távú túlélése.^{12, 27-29}

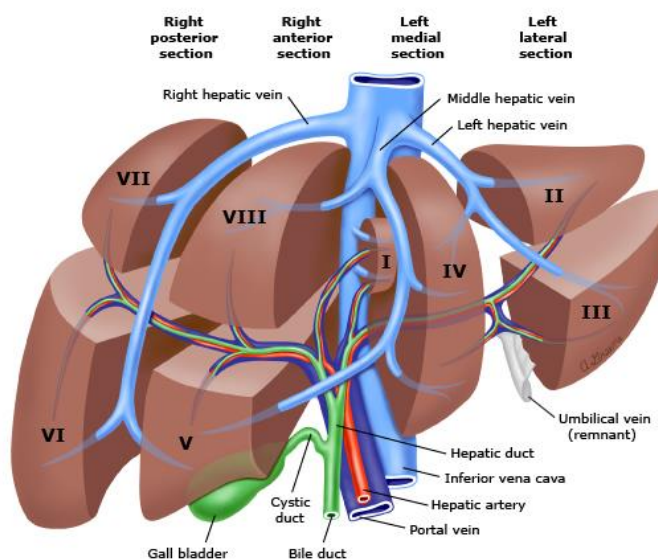


2. ábra A HCC BCLC szerinti klasszifikációja, kezelési és prognosztikai sémája. Ábra módosítás nélkül adaptálva: EASL–EORTC, Journal of Hepatology 2012.²³

Mindezek felhívják a figyelmet a rosszindulatú májdaganatok műtéti eltávolításának kulcsfontosságú és megkerülhetetlen szerepére, mely a hosszú távú túlélés elhagyhatatlan feltétele. Ez egyben azt is jelenti, hogy a kuratív kezelés néhány (vitatott) kivételtől (intervenciós radiológiai/perkután ablatív technikák)²³ eltekintve - egyet jelent a műtét szükségességével.^{11-14, 40, 41} Utóbbiak jól szemléltetik a malignus májtumороk kezelésének kettősségét, amennyiben a modern és korrekt multidiszciplinaritás elve és gyakorlata mellett a kuratív terápia döntően a májsebész vállain nyugszik - amely természetesen kéz a kézben jár a társszakmáknak a diagnosztika, adjuváns- és neoadjuváns, pre- és posztoperatív kezelés terén nyújtott, helyettesíthetetlen szerepével.

A daganat műtéti eltávolításának lehetőségei a daganat által érintett májlebenyek, vagy, szükség esetén, az ezeket meghaladó méretű májállományok sebészi reszekciója, illetve a máj transzplantációja. Utóbbi a teljes máj eltávolítását követően leggyakrabban egy új, egészséges máj változatlan anatómiai viszonyokat eredményező beültetését, azaz ortotópikus májtranszplantációt (OLT), míg ritkábban egy élő személyből származó májrészlet beültetését, azaz élő donoros májtranszplantációt jelenti.

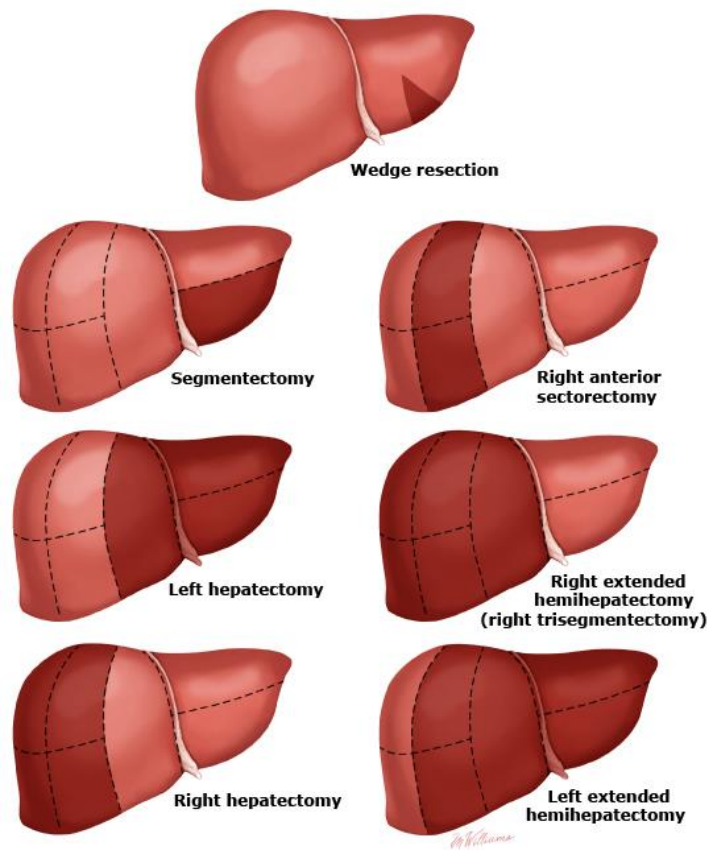
Az immunszuppresszió valamint a jelentősen nagyobb műtéti terhelés ellenére a májtranszplantáció elméleti síkon több szempontból előnyösebbnek tekinthető a sebészi reszekciónál, mivel nagyobb a (májra lokalizált!) daganatok maradéktalan eltávolításának, ezzel párhuzamosan alacsonyabb a kiújulás esélye, továbbá (relative) egészség graft esetén az esetleges társuló



3. ábra A máj Couinaud ajánlásán alapuló szegmentális sebészeti anatómiája. Ábra módosítás nélkül adaptálva: Graphic 81897 Version 3.0, „Overview of hepatic resection”, UpToDate 2018.

parenchymás májbetegségek (szteatózis, cirrózis/fibrózis) is kiküszöbölhetők. Az OLT indikációjának sarokkövét jelentő, 1996-ban Mazzaferro és mtsai. által lefektetett, meglehetősen szigorú „Milánói kritériumrendszer”-re (legfeljebb 5 cm-es szoliter, vagy legfeljebb 3 db, maximum 3 cm átmérőjű HCC, makroszkópos érinvázió és extrahepatikus terjedés nélkül),^{42, 43} épülően, több bővített indikációs ajánlás [University of California San Francisco (UCSF) (legfeljebb 6,5 cm-es szoliter, vagy legfeljebb 3 db, maximum 4,5 cm átmérőjű tumor, összesített tumor méret nem haladhatja meg a 8 cm-t);⁴⁴ „Up-to-seven” (egygócsú-, vagy többgócsú tumorok számának és átmérőinek összege nem haladhatja meg a hetet)] született, melyekkel az OLT sebészeti reszekcióval egyenértékű, sőt, sokszor jobb (!) 3 és 5 éves túlélési-, illetve onkológiai sokszor eredményeket produkált. Mindezek alapján leginkább az Egyesült Állomokban, Kínában (kb. 8 000, illetve 7 000/év), Brazíliában (kb. 2 200/év valamint Nyugat-Európában (országoként kb. 1 000-1 500/év; Európában összesen: kb. 10 000/év) a máj daganatsebészetének gyakorta alkalmazott módszere a májtranszplantáció.^{13, 45} Megjegyzendő, hogy az alacsonyabb aktivitású közép- és kelet-európai országok között a hazánkban, elsősorban a Semmelweis Egyetem Transzplantációs és Sebészeti Klinikáján végzett évi 74-80 májtranszplantáció száma jelentős, mellyel Magyarország a legtöbb kelet-európai országot és Szlovákiát is megelőzi.⁴⁶⁻⁴⁸

Ugyanakkor az érem másik oldalaként a májtranszplantáció rendkívül komoly, az egészségügy minden szintjén jelentkező szakmai (transzplantációs centrumok, -májsebész, -személyzet, -program, időfaktoros műtétek, szervprezerváció, eszközök, stb.), infrastruktúrális, finanszírozási és társadalmi követelményei miatt az OLT sajnálatos módon a kevésbé előnyös szocio-ökono-



kulturális országokban, azaz a világ nagy részén túlnyomórészt nem jelent valós alternatívát a máj „mindannapi” daganatsebészetében. Továbbá szakmailag sem feltétlenül indokolt OLT végzése a

4. ábra A májreszekciók sémás illusztrációja. Ábraanyag módosítás nélkül adaptálva: Graphic 66282 Version 11.0, „Overview of hepatic resection”, UpToDate 2018.

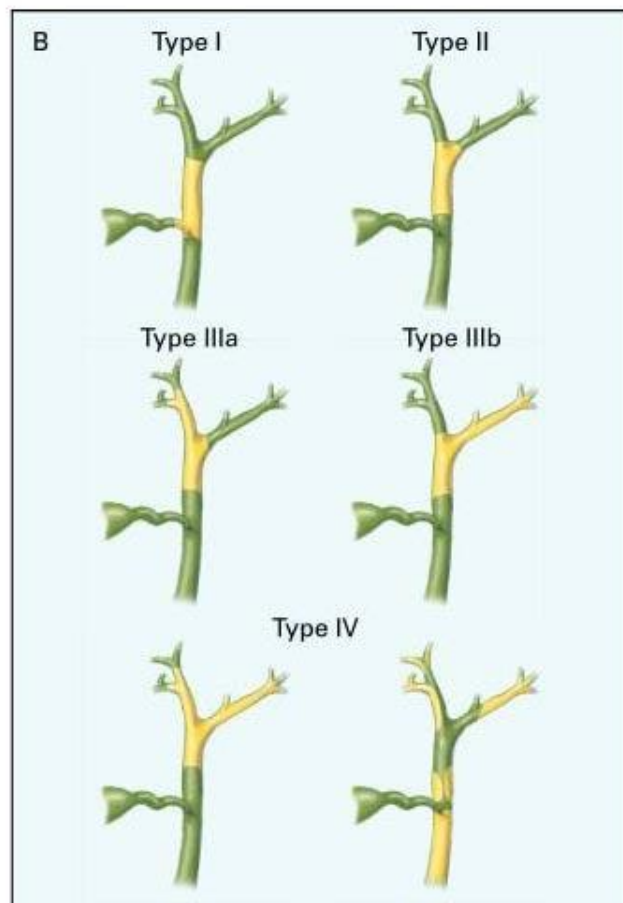
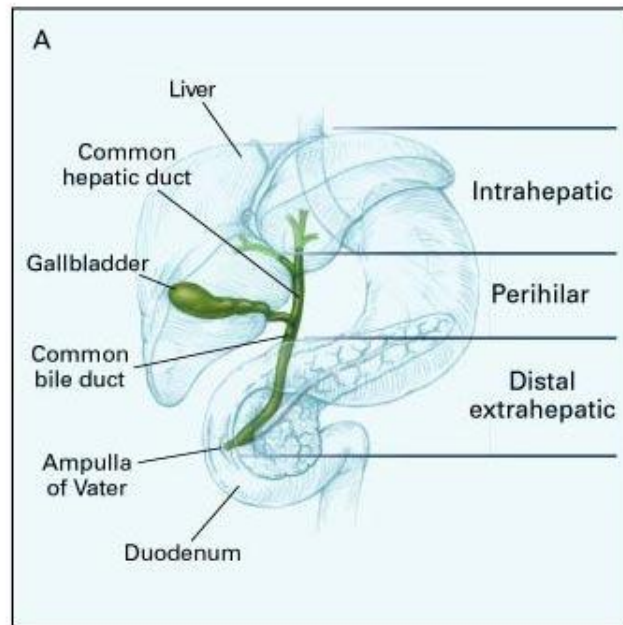
sebészi, R0 reszekcióval biztonságosan kezelhető esetekben.

Mindezek értelmében a daganatok műtéti eltávolításának mind a mai napig szakmai- és gazdasági szempontok alapján is legfőbb módszere a sebészi reszekció, mely világszerte az alapvetően választandó beavatkozás, azaz a „standard of care”.^{13, 40, 45} A sebészi reszekció pontos megtervezése minden esetben egyedi elbírálást igényel. Mind primer-, mind szekunder tumorok kapcsán alapvető, kritikus fontosságú az R0 reszekció kivitelezése, azaz a tumor (szövettanilag igazoltan) épben való kimetszése. HCC esetében a szomszédságban gyakorta észlelt „szatellita” metasztázisok és a késői kiújulás miatt a „nem anatómiai”, azaz ék-, vagy lokális reszekciókkal szemben mindenképpen javasolt az „anatómiai reszekciók” preferálása. Ez a máj (Couinaud-féle) szegmentális

anatómiáján⁶ (3. ábra) alapulva a tumor által érintett, minimálisan egy, maximálisan hat májszegmentum

(szegmentumhatárokat respektáló) eltávolítását jelenti, mely irodalmi adatok alapján jobb onkológiai eredményekhez (alacsonyabb kiújulási hajlam, jobb túlélés) vezet (4. ábra).⁴⁹

A CCC klasszifikációjára kiemelkedő az EASL-támogatott American Joint Committee on Cancer/Union for International Cancer Control (AJCC/UICC) TNM- „staging” alapú, bármely lokalizáció esetén alkalmazható, illetve az egyetlen, stádium és túlélés között bizonyítható kapcsolatot teremtő osztályozása.^{50, 51} Kezelés tekintetében a választandó reszekciós (és rekonstrukciós!) terv nagyban függ a tumor lokalizációjától (5. ábra).⁴ Extrahepatikus, disztális (*ductus cyticus*-tól a Vater-papilla felé; 5-20%) CCC esetén pankreatikoduodenektómia javasolt. Bár a szintén extrahepatikus, ám perihiláris CCC („Alteimer-Klatskin tumor”, 60-



5. ábra A CCC elhelyezkedése szerinti beosztása (A), illetve a perihiláris CCC Bismuth-Corlette szerinti klasszifikációja (B). Ábra módosítás nélkül adaptálva: De Groen PC és mtsai., New England Journal of Medicine 1999.⁴

70%) osztályozására az amerikai Memorial Sloan Kettering Cancer Centre (MSKCC) sebészi szemléletű (oldalíság? májparenchyma atrófia? *vena portae*/másodlagos epeutak érintettsége?) Blumgart-ajánlása tekinthető az egyik legnaprakészebbnek,^{52, 53} addig a reszekciós terv felállítása mindmáig leginkább annak hagyományos Bismuth-Corlette (B-C) klasszifikációjától függ.^{30, 54} B-C I (*ductus hepaticus* villát el nem érő tumorok) és II (*ductus* villát elérő tumorok) esetén az epehólyag és az extrahepatikus epeutak *en bloc*, 5-10 mm-es ép szegéllyel történő reszekciója (szükség esetén I-es szegmentum reszekcióval, rosszabb esetben, [kiterjesztett] hemihepatektómiával), hiláris limfadenektómia, illetve rekonstrukció céljából Roux-kacccsal kivitelezett hepaticojejunosztómia szükséges. B-C IIIa, IIIb, vagy B-C IV (jobb-, bal-, vagy mindkét *ductus hepaticus*-ba terjedő tumor) kapcsán a fentieknek mellett az oldalíságnak megfelelő hemihepatektómia, vagy kiterjesztett hemihepatektómia (triszekcionektómia) szükséges; míg a mindkét oldali epeutak másodlagos oszlásainak, vagy egyéb környező képletek infiltrációja inoperabilitást jelent.³⁰ Intrahepatikus CCC (5-20%) esetén hiláris limfadenektómia, illetve (a 0%-tól különböző 3- és 5 éves túlélés érdekében) kulcsfontosságú R0 májreszekció javasolt. Utóbbi kapcsán a (leggyakran major) „anatómiai reszekciók” alkalmazása jobb onkológiai eredményekkel járt.^{30, 49, 55} Említendő, hogy a CCC epeutak menti terjedéséből fakadóan gyakorta alakul ki az epeutak valamely helyzetű és fokú szűkülete, és kolesztázis. A máj áttéti daganatainak - hematogén eredetükből adódóan – megjelenése gyakran diffúz, ugyanakkor a környező májparenchyma állapota (hacsak egyéb, májat érintő betegség nem áll fenn) általában egészséges. Ez utóbbiak a tumorok májsebészeti kezelésének szempontjait messzemenőig befolyásolják (ld. alább). Továbbá a májáttétek sebészete során - a primer malignus tumorokkal szemben - az anatómiai reszekciók kivitelezése nem járt onkológiai-, vagy túlélésbeli előnnyel a „nem anatómiai”, vagy ékreszekciókhoz képest. Bár jelenleg a szükséges legkisebb reszekciós szél pontos mérete vitatott, az MSKCC korábbi, 1 cm ≤ ép szegély esetén jelentős túlélési előnyt megállapító ajánlásához képest számos újabb ajánlás jóval kisebb, 1 mm-es, illetve akár 1 hepatocytá sejt sor szélességű ép szél is elegendőnek tart.^{49, 56-58}

Mindezek, azaz az egyre nagyobb májállomány eltávolításával járó különféle „nem-anatómiai” és „anatómiai” reszekciók – szegmentektómiák, multisegmentektómiák, hemihepatektómiák, kiterjesztett hemihepatektómiák és

triszekcionektómiák – vezetnek el az ominózus kérdéséhez: Mi a reszekciók és az eltávolítható májállomány határa? Mennyit szabad „kivenni”? Ennek kapcsán az elmúlt idők perioperatív- és intenzív terápiás ellátása, a sebészi műtéttechnika, valamint az annak rendelkezésére álló műszerek (kiemelve a májparenchyma transzszekciójára alkalmas eszközöket és az intraoperatív ultrahangot) jelentős fejlődése révén már a kifejezetten heroikus, nagy kiterjedésű, akár 6-7 szegmentum eltávolításával járó reszekciók is kivitelezhetővé váltak, így a technikai feltételek látszólag nem állítanak korlátokat. Az egyre növekvő radikálítással azonban hamar kiderült, hogy a szomorú határokat leginkább poszthepatektómiás májelégtelenség („posthepatectomy liver failure”, PHLF) szabja, mely 5-15%, szélsőséges adatok szerint akár 30%-os előfordulásával a – tipikusan 3-5%, más adatok szerint akár 30% mortalitású - major májreszekciók legfőbb morbiditási és mortalitási faktora.⁵⁹⁻⁶¹ Mivel az áthidaló szerepű májpótló kezelésen túl érdemi terápiája nem ismert, továbbá mortalitása legsúlyosabb stádiumában akár 54%-ot is elérheti, így igen rossz prognózisú kialakulása mindenképpen kerülendő.^{59, 60} Fellépésének oka a túl nagy májállomány eltávolítása következtében visszamaradó májparenchyma elégtelen mennyisége. Ezzel szinkronban a májsebészet paradigma váltása következett be, melynek keretében a „millió dolláros kérdés” a korábbi „Mi távolítható el?”-ről a „Mennyi marad meg?”-re változott. Ennek megfelelően egy májreszekció elvégzésének lehetőségét, illetve indikációját immár a (műtét után) tervezett maradék máj („future liver remnant”, FLR) mennyisége szabja meg. A „Mennyi?” kvantitatív mérésének mindmáig „goldstandard” metódusa a többfázisú CT felvétel rekonstrukcióján alapuló májvolumetria. Ennek keretében a biztonságos reszekció feltétele, hogy az FLR térfogata a teljes máj térfogatának megfelelő hányadát (FLR%) adja, melynek meghatározása többféleképpen történhet. A legegyszerűbb megfogalmazás az FLR térfogatának (FLRV) arányát vizsgálja a teljes májtérfogat (TLV) tumor térfogattal (TV) csökkentett értékéhez képest: $FLR\% = (FLRV/TLV - TV) * 100$. Bizonyos szerzők ezt pontatlannak találva a teljes máj volumen mért értéke helyett inkább a testfelszín („body surface area”, BSA) alapján becsült teljes májtérfogatot (TELV) írják a képletbe, ahol: $TELV = 706,2 * BSA + 2,4$.⁶² Azonban ez, az elsősorban távol-keleti populációra alkalmazott becslés nem bizonyult helytállóknak a kaukázusi rassz antropometriai viszonyaira,⁶³ így a képletet Vauthey és mtsai. az alábbiak szerint módosították: $TELV = -794,41 + 1267,28 * BSA$ ⁶⁴, mely felhasználásával adható meg az

úgynevezett „standardised”, azaz sztenderdizált FLR (sFLR): $sFLR=(FLRV/TELV-TV)*100$. Ez utóbbi egyes beszámolók szerint a volumenhányadosok pontosabb megadását teszi lehetővé.⁶⁵ A fenti képletek valamelyikét alapul véve a biztonságosan elvégezhető májreszekció konszenzus feltétele a 20-25%-ot meghaladó FLR hányados egészséges májparenchyma esetén, míg valamely okból „kompromittált” májparenchyma (szteatózis, cirrózis, kemoterápiás kezelés, stb.) esetén ennél magasabb, legalább 40-50%-os FLR hányados szükséges.^{13, 14, 40, 49, 61} E feltételnek azonban sajnálatos módon a betegpopuláció nagy része nem tesz eleget, mely részben indokolja, hogy a primer, illetve szekunder malignus májtumoros betegek csupán 10-30%-ában végezhető primer májreszekció.⁶¹ A fennálló nagyszámú betegcsoport egy részének további, potenciálisan kuratív kezelése kétféleképpen lehetséges. Az egyik a neoadjuváns, „downstaging” kemoterápia, mely az onkológiailag kezdetben „borderline reszekábilisnak” és irreszekábilisnak nyilvánított betegek későbbi reszekábilissé válásának ígérését hordozza magában - a kemoterápiára adott pozitív válasz esetén.^{13, 27, 66-69} A másik lehetőséget a különféle *vena portae* okklúzióval („portal vein occlusion”, PVO) előidézett, FLR megnövelését lehetővé tevő indukált májregenerációs eljárások jelentik.

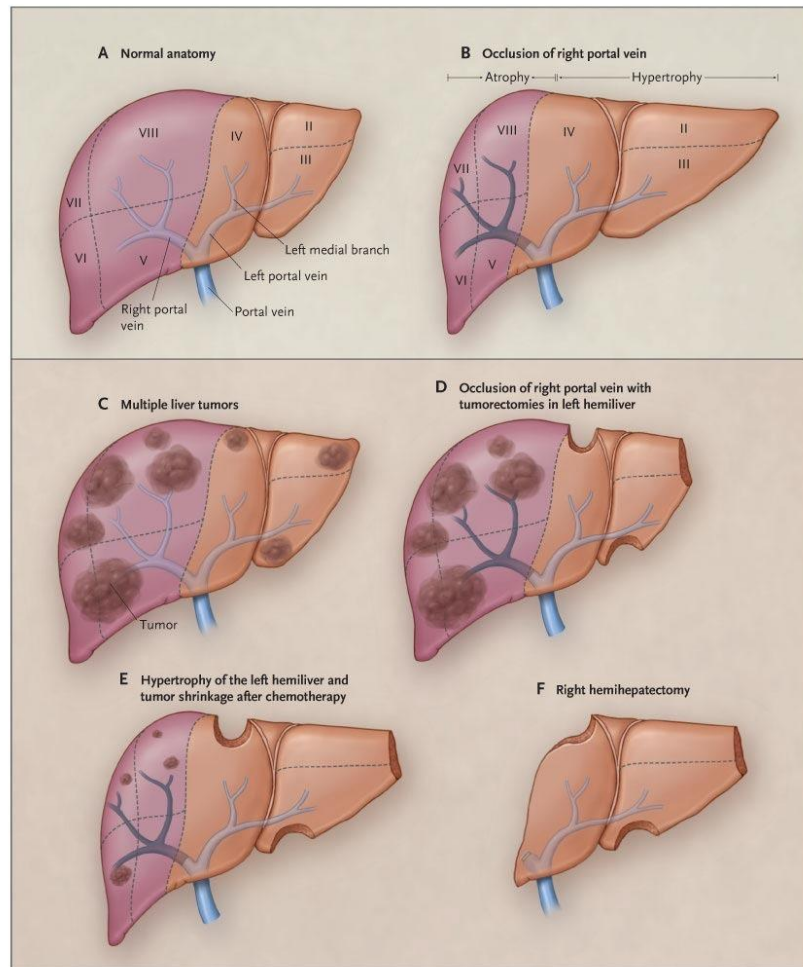
1.2.3. *Vena portae* okklúzióval indukált májregeneráció

1.2.3.1. Alapok

A *vena portae* okklúziós eljárások („portal vein occlusion”, PVO) lényege, *sine qua nonja* a *vena portae* bizonyos ágainak célzott elzárása nyitott sebészeti műtét során végzett lekötés, azaz ligatúra („portal vein ligation”, PVL), vagy intervenciós radiológiai eljárás keretében végzett embolizáció („portal vein embolization”, PVE) segítségével. Ez a megszüntetett *vena portae* áramlású májlebenyek fokozatos atrófiáját, zsugorodását, illetve ezzel párhuzamosan a zavartalan portális áramlású lebenyek kompenzatórikus hipertrófiája váltja ki. Az így kifejlődő változások a májregeneráció egy speciális formáját jelentik, melyet klinikailag leggyakrabban a komplikált májtumорок daganatsebészetében alkalmaznak (6. ábra).

1.2.3.2. Története

A PVO, illetve az azt követő máj volumen változások első dokumentációja Theodor von Frerichs, a berlini Charité német patológusának 1879-es megfigyeléséhez kötődik, melyben a májkapuban növekvő szifilisz gumma kapcsán írta le a májparenchyma azonos oldali atrófiáját és ellenoldali hipertrofiáját, ugyanakkor a



jelenséget tudatosan még nem kacsolta össze a PVO-val.⁷⁰ Ez utóbbi első leírása Peyton Rous és Louis Larimore, a new yorki Rockefeller Institute amerikai kutatóinak neveihez

6. ábra A vena portae okklúzió (PVO). A máj fiziológiás anatómiája és a Couinaud szerinti szegmentumok (A).^{5, 6} Jobb oldali PVE-t követően a jobb lebeny V-VIII szegmentumai atrofizálnak, míg a bal lebeny I-IV szegmentumai hipertrofizálnak (B). Multiplex, bilobáris májtumorok (C) kezelése PVL és kétlépéses reszekció segítségével (C-F). Első lépésben a bal lebeny tumorainak eltávolítása és a jobb vena portae ág lekötése (PVL) történik (D), mely a jobb lebeny atrófiájához és a bal lebeny hipertrofiájához vezet (E). Ezt követően elégséges mennyiségű és tumormentes tervezett maradékmáj parenchyma mellett második lépésben elvégezhető a tumor által érintett jobb lebenyek eltávolítása (jobb hemihepatektómia) (F). Ábraanyag módosítás nélkül adaptálva: Clavien PA és mtsai., New England Journal of Medicine 2007.⁹

kötődik, akik nyúlkísérleteikben létrehozott PVL kapcsán 1920-ban dokumentálták a kifejlődő hatásokat.¹⁸ A bámulatos eljárás klinikai hasznosíthatóságának felismerése és alkalmazása jórészt japán sebészek neveihez kötődik, mely az 1900-as évek végéig váratott magára. A 1961-1965 közti időszakban elsőként Honjo és mtsai., valamint Kozaka és mtsai. alkalmazták a PVL-indukálta májregenerációt kétlépéses májreszekció kapcsán.¹⁵ A PVE-vel kiváltott preoperatív májvolumen manipulációt elsőként Kinoshita

és mtsai. hasznosították HCC kezelése kapcsán 1986-ban, majd Makuuchi és mtsai. hiláris CCC kapcsán 1990-ben.^{16, 17} Ezt követően a PVL és a PVE világszerte elterjedt és alkalmazott eljárásokká váltak a komplikált májtumorok komplex kezelését végző májsebészeti centrumokban.^{40, 41} A terület legújabb lökését a német Schnitzbauer és mtsai. felfedezése adta, mely során a PVO-t a májparenchyma okkludált- és nem-okkludált zónáinak határán kivitelezett *in situ* transzszekciójával kombinálták, amely a rapidabb maradékmáj növelést előidéző, ugyanakkor azóta igen nagy tudományos- és etikai vitát kavarázó ALPPS („associating liver partition with PVL for staged hepatectomy”) eljárás születéséhez vezetett.⁷¹ Ez utóbbi alkalmazási területe a felfedezését övező nagy kezdeti lelkesedés ellenére a felmerülő klinikai aggályok révén napjainkban vitatott és inkább szűkülőben van. Ugyanakkor (szigorú) indikációja - jó eredményei alapján - megalapozottnak tűnik a kis maradékmájjal járó kolorektális májmetasztázisok kezelésében.^{72, 73} Mindeközben a „klasszikus” PVO eljárásokat, azaz főként a PVE-t és a PVL-t napjainkban is rutinszerűen, nagy számban alkalmazzák világszerte, így hazánkban is.^{40, 41, 61, 74} A hazai viszonyok tekintetében kiemelkedő jelen dolgot anyaintézményeként a Semmelweis Egyetem I. sz. Sebészeti Klinikája, ahol a PVO révén előidézett májregeneráció, FLR növelés kísérletes és klinikai vizsgálata nemzetközileg is elismert, magas színvonalon zajlik. A klinikai gyakorlatban az országban elsőként történt FLR növelés 2001-ben PVL, míg 2013-ban ALPPS műtét segítségével.⁷⁴⁻⁷⁶ Klinikánkon 2007-óta a PVE is elérhető, mely kapcsán az országban szintén a legnagyobb, és nemzetközileg is jelentős esetszámmal rendelkezik. Mindezek hatására az Intézet májreszekciós mortalitása jóval 3% alatti.

1.2.3.3. Patofiziológiai és molekuláris háttér

A PVO-t követően az intakt portális beáramlású lebenyekben létrejövő hipertrófia esszenciális alapja a máj csodálatra méltó regenerációs képessége, melyet a Prométeusz legendából tükröződően, megmagyarázhatatlan módon már az ókori görögök is megsejtettek.^{19, 77-79} A májregeneráció jelensége a természet evolúciósan konzervált, sztereotíp válaszának tekinthető a májat specifikusan, vagy aspecifikusan károsító noxákra, melyek funkcionáló májállomány vesztéshez, illetve szélsőséges esetben májelégtelenséghez és halálhoz vezetnének. Ez az állatvilágban leggyakrabban a hepatotoxikus ágensek (mérgező növények, gombák), illetve a különféle, hepatotrop vírusokfertőzések, heptatitiszek által okozott májsejt nekrozist, valamint esetlegesen a

traumás májsérüléseket jelenti. Kutatási szempontból a májregenerációnak több kísérletes modellje ismert [szén-tetraklorid intoxikáció, PVO, parciális hepatektómia (PH)]⁸⁰, melyek közül a PH tekinthető a „legtisztábbnak”, hiszen itt a különböző fokú, azonnali májállomány vesztésen túl egyéb „zavaró tényező” (társuló gyulladás, atrofizálódó okkludált lebenyek, gyógyszer-, vagy vírus expozíció, stb.) nincs jelen.⁷⁷⁻⁷⁹ Ennek fényében a PVO a májregeneráció egy speciális altípusának tekinthető az okkludált lebenyek perzisztálása és megtartott artériás áramlása, valamint az egymással párhuzamosan zajló atrófia- és hipertrófia folyamatai miatt, ugyanakkor a májregeneráció e két típusa irodalmi adatok szerint messzemenőig hasonló, mely jól tükröződik többek között szignáltranszdukciójuk nagyfokú egyezésében is.^{19, 77} Az alábbiakban a PVO indukálta májregeneráció patofiziológiai és molekuláris mechanizmusai kerülnek rövid ismertetésre.

PVO során az okklúzió létrejöttét követően azonnali, fundamentális hemodinamikai változások alakulnak ki a máj keringésében, mely számos további, szerteágazó folyamat kiindulópontja. Míg a PVO a keringés legfőbb makro paramétereit (artériás középnyomás, teljes perifériás rezisztencia, szívfrekvencia, perctérfogat) nem érinti, addig a zsigeri- és portális keringés drámai átrendeződéséhez vezet. Minthogy a máj keringését fiziológiásan 75-25% arányban biztosítja a *vena portae* és az *arteria hepatica* vérhozama, így az okkludált lebenyek portális beáramlásának nullára csökkenésével ez utóbbiakban egy jelentős véráramlás csökkenés jön létre. Ez a kapillárisokban lévő, reaktív hiperémia humorális mediátoraként ismert adenzin csökkent „kimosódásához” vezet, amelynek vazodilatatív hatása miatt az *arteria hepatica* áramlása kb. 3-4-szeresére fokozódik. A jelenség a „hepatic artery buffer response” (HABR) néven ismert,⁸¹ melynek hatására az okkludált lebenyek teljes vérárama „csupán” 50%-ra csökken; melynek szinte kizárólag artériás perfúziójához a megnyíló arterioportális anasztomózisok révén egy kevés portális vér is keveredik. A *nem-okkludált lebenyekben* ezzel szemben egy kiugró portális áramlás fokozódás jön létre, mely egy reverz-HABR effektus és csökkent artériás áramlás ellenére a lebeny teljes véráramlásának 230%-ra fokozódásához, valamint (csökkent érfeület mellett azonos átáramló vérmennyiség révén) megnövekedett portális áramlási ellenálláshoz és nyomáshoz vezet.¹⁹ Mindezek, és kifejezetten ez utóbbi portális nyomásfokozódás a mikrocirkuláció jelentős megváltozását is eredményezik. Az endotélre ható nyíró erők

(„shear stress”) emelkedése és a következményes Ca^{2+} -influx révén fokozódik a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) endoteliális típusának aktivitása, nitrogén-monoxid termelése is. Továbbá a nyíróerők a máj egyéb, hepatocita, Kupffer- és fibroblaszt sejtjeire kifejtett direkt hatása révén fokozódik az indukálható NOS, különféle citokinek, az extracelluláris mátrixhoz (ECM) kötött- és frissen termelt hepatocita növekedési faktor (HGF), egyéb növekedési faktorok (vérlemezké eredetű és vaszkuláris endoteliális növekedési faktorok, PDGF, VEGF), valamint az ECM-et bontó mátrix metalloproteázok (MMP) és az urokináz aktivitása is, továbbá fokozódik a sejtadhéziós fehérjék (ICAM, VCAM, stb.) expressziója is, melyek jelentős szerepet játszanak a májregeneráció kiváltásában.^{19, 77-79} A PVO-t követő májregeneráció humorális teóriájával^{82, 83} párhuzamosan a portális keringés átrendeződésének egy további hozadéka, hogy a nem-okkludált lebenyeket a szplanknikus területről érkező metabolitok, így tápanyag monomerek (mono- és diszacharidok, aminosavak, zsírsavak), hormonok (inzulin, ösztrogén, inkretinek), növekedési faktorok (duodenum Brunner-mirigyei által termelt epidermális növekedési faktor, EGF) és epesavak -, tehát összefoglalóan „blood-borne” faktorok fokozott hatása éri, melyek szintén jelentős szerepet játszanak a májregeneráció mediálásában.^{82, 83} A PVO-t követő májregeneráció egy további fontos triggerre lehet a hipoxia, melynek létrejötte szintén a hemodinamikai változások terhére írható. Az okkludált lebenyekben a közel 100%-ban artériás beáramlás ellenére a jelentősen csökkent teljes átáramlás miatt, míg a nem-okkludált lebenyekben a teljes áramlás növekedés ellenére a reverz HABR és csökkent artériás átáramlás miatt csökken az oxigén kínálat, mely a sejtek megtartott oxigén igénye mellett mindkét oldalon hipoxiához vezet. Az oxigénhiány a HIF1- α jelpálya aktiválásán keresztül szintén emeli a VEGF expresszióját, illetve más hatásai révén is hozzájárul a májregeneráció létrejöttéhez.¹⁹

A PVO indukálta májregeneráció beindulása, kialakulása, valamint lezárulása mediátorok, illetve szignáltranszdukciós folyamatok két nagy csoportja köré rendezhető. Az okklúziót követően megnő a nem-okkludált lebenyeket érő lipopoliszacharid és egyéb bakteriális termék terhelés, mely toll-like és egyéb receptoraikon keresztül a Kupffer-sejtek aktivációjához vezet. Ennek hatására ugrásszerűen megnő a Kupffer-sejtek interleukin (IL) 1, tumor nekrosis faktor alfa (TNF- α) és egyéb gyulladáscitokin termelése, melyek szerteágazó hatásaik révén számos sejt típusban (hepatocitákban, endotél sejtekben, leukocitákban, fibroblasztokban stb.) a nukleáris faktor kappa B (NF-

κB) és a „signal transducer and activator of transcription-3” (STAT3) transzkripciós faktorok aktivációján át számos gén, köztük a c-fos, c-myc, c-jun fokozott expresszióját váltják ki. Mindezek a nyugvó fázisban (G0) lévő hepatociták sejtciklusba, G1 fázisba lépéséhez vezetnek, mely a májregeneráció beindulásának kezdeti lépése. Ennek értelmében a különféle gyulladáscitokinek úgynevezett „priming”, azaz „belökő” szerepet töltenek be a májregeneráció kiváltásában, amennyiben felelősek a sejtek sejtciklusba léptetéséért, továbbá érzékenyítik a sejteket a különféle növekedési faktorok hatásaira. Ez utóbbiak, azaz a növekedési faktorok alkotják a májregeneráció szignalizációjának másik nagy mediátor csoportját. Ide tartozik a csillagsejtek által nagymennyiségben termelt, illetve a fokozott MMP aktivitás hatására az ECM-ből felszabaduló HGF és „transzformáló növekedési faktor alfa” (TGF-α.), a *duodenum* Brunner-mirigyei által termelt EGF, a hepatociták által termelt VEGF, angiopoetin 1 és 2, a vérlemezke eredetű PDGF, illetve az inzulin és számos egyéb vegyület is, melyek szintje PVO-t követően jelentős emelkedést mutat. Hatásukra a citokinek által „primeolt”, sejtciklus G1-fázisába lépett sejtekben fokozódik a ciklinek, illetve kritikusan a ciklin-D és ciklin-E szintje, melyek hatására a sejtek a G1 fázison túlhaladva az S, azaz szintetikus fázisba (kb. 12-24. óra), majd a további fázisokba haladnak.⁷⁷⁻⁷⁹ Ezek értelmében a citokinek feladata leginkább a „priming”, azaz a sejtciklus és a regeneráció beindítása, melynek fenntartásáért, intenzív előrehaladásáért elsősorban a növekedési faktorok, azaz mitogének felelnek.^{19, 77-79} Ugyanakkor a szignalizáció e két csoportja között számos interakció, illetve átfedés áll fenn, melynek köszönhetően egy-egy elemének, mediátorának kiesése nem vezet a májregeneráció zavarához, csupán meglassulásához. Mindezen jelátviteli folyamatok a nem-okkludált lebenyekben a májregeneráció hirtelen beindulásához vezetnek, mely hatására az érett, funkcionáló, nyugvó hepatociták 75-95%-a duzzadni, zsírt halmozni, illetve a sejtciklusba lépve osztódni kezd, amely szövetszinten a kb. 36-48. órára egy periportális-pericentrális hullámban húzódó sejtosztódási folyamatot eredményez.^{19, 77-79} Ezek hatására új acinusok létrejötte nélkül a máj acinusai méretben növekednek, sejteik szaporodnak, melyek hatására az összefekvő hepatocita sejterendák mentén egy korai-, illetve késői, apoptózis-mediált „remodeling” is kialakul, 1-1 sejterenda vastagságú, megnövekedett acinusokat eredményezve. A máj egyéb, így szinusoidális endotél sejteit, epeúti sejteit, és csillagsejteit némi (kb. 24-48 óra) késéssel szintén követik ezt az osztódási hullámot. Eközben az okkludált lebenyben a hipoxiás

viszonyok miatt centrilobuláris nekrozis, irányítottan apoptózis, illetve periportális irányból egy leukocita infiltráció alakul ki. Az elhalt nekroapoptotikus területeket a fehérvérsejtek fokozatosan felszámolják, melyet követően hasonló sejt „remodeling” után a kiindulásra hasonlító acinus struktúra alakul ki, azonban méretük jelentősen zsugorodott, illetve mikrocirkulációjuk a gazdag fenesztrációk megszűnésével klasszikus kapillárisokká épül át.⁸⁴⁻⁸⁶ Figyelemre méltó, hogy az atrófia-hipetrófia komplex kiegyensúlyozott, önkorlátozó jelleget mutat, amennyiben a teljes májállomány állandó marad. Végül a volumenviszonyok és a máj metabolikus funkciójának helyreállításával a folyamat lezárul. Utóbbi háttérben szintén komplex szignalizáció feltételezett, azonban eddig csupán a citokin-szignált negatív-feedback visszacsatolással mérséklő „suppressors of cytokine signalling” (SOCS), illetve a növekedési faktorok hatásait antagonizáló, csillagsejtek és ECM komponensek által termelt TGF- β , acitivin család szerepére sikerült fényt deríteni.^{19, 77-79, 86}

1.2.3.4. A PVO klinikuma

A fentiekkel összhangban a PVO indikációja egészséges májparenchyma esetén a 70-75%, míg „kompromittált” májparenchyma esetén a 60-65% májállományt meghaladó májreszekció terve volt.⁶¹ Embolizációra leggyakrabban kolorektális metasztázisok (39,6%), CCC (28,9%), illetve HCC (20,4%) miatt került sor, a beavatkozás során leggyakrabban elzárt részek a Couinaud-szerinti V-VIII szegmentumok (79,9%), melyet bizonyos esetekben a IV-es szegmentum technikailag nehezebb embolizációjával egészítene ki (11,7%).⁶¹ PVL végzése nyitott sebészi műtét során, a jobb (V-VIII szegmentumok), vagy bal (I-IV szegmentumok) *vena portae* ág sebészi lekötésével történik. PVE kivitelezése ritkábban minilaparotómiát követően, transzileokólikus hozzáféréstől történik, azonban a leginkább preferált módszer a radiológiai intervenció keretében, ultrahangos ellenőrzés mellett végzett *vena portae* ág punkció, illetve katéterezés, perkután transzhepatikus ipszi-, vagy kontralaterális metódussal. Az embolizációs anyag leggyakrabban n-butyl cianoakrilát, vagy embolizációs mikrogöngy (zselatinnal fedett akrilpolimer) partikulumok, valamint zselatin és lipiodol, esetlegesen kiegészítve különféle embolizációs „coilokkal” azaz trombogén tekercsekkel, vagy Amplatzer-dugókkal (59,5%). Ugyanakkor számos egyéb vegyület is ismert, mint például polivinil-alkohol, fibrin és polidokanol hab.⁶¹ Mindezek hatására az FLR eredeti viszonyokhoz képest 21-69%-os, átlagosan 38%-os növekménye

jön létre, mely fel nem szívódó embolizáló anyagok, ezen belül korábban n-butil cianoakrilát, illetve bevezetését követően embolizációs mikrogyöngyök esetén a legkifejezettebb.⁸⁷ A PVE mortalitása irodalmi ritkaság, klinikai sikertelenségi rátája csupán 3,9%-os, melyből az FLR elégtelen hipertrófiája 2,8%-ot tesz ki.⁶¹ PVO-t követően a képalkotó vizsgálatot (CT) az egyes centrumok 2-7 héten belül, átlagosan 26 nap után végezték.⁶¹ Ez utóbbi elvégzésének ajánlott ideje a van Gulik munkacsoport funkcionális analízist klinikai morbiditási és mortalitási adatokkal párhuzamban állító elemzésére alapuló ajánlása alapján 21 nap.^{7, 14} PVO-t követően májreszekcióra az esetek 20%-ában sajnálatosan nem kerül sor, melyből 14,2%-ban az ok intra- (6,1%), vagy extrahepatikus (8,1%) tumorprogresszió. A betegek fennmaradó (operábilis) 80%-ában a PVO és reszekció között 3-12 hét, átlagosan 37 nap telt el, a reszekció túlnyomórészt (74%/80%) jobb oldali volt, mely 43%-ban jobb oldali hemihepatktómia, míg 31%-ban kiterjesztett jobb hemihepatektómia/triszekcionektómia. A műtét morbiditása 21,7%, összesített mortalitása 3,3%, utóbbi domináns okát a halálos kimenetek feléért felelős májelégtelenség jelentette.⁶¹

1.3. Morfológia és funkció kérdése a májsebészetben

A különféle PVO eljárásokkal tehát lehetséges a kezdetben elégtelen mennyiségű FLR 20-25%-os (egészséges májparenchyma), illetve 40-50%-os („kompromittált” májparenchyma) FLR hányados határt meghaladó méretűre növelése.^{40, 41, 61} Fontos azonban, hogy a fentiek alapján a posztoperatív morbiditást és mortalitást, így a klinikai kimenetelt elsősorban meghatározó PHLF kialakulása nem az FLR méretének, illetve volumenének, hanem sokkal inkább aktuális funkciójának függvénye.⁸⁸⁻⁹¹ A máj, illetve ezen belül az FLR – metszeti morfológiai képalkotókkal látható – volumene és annak valós funkcionális kapacitása között pedig jelentős diszkrépancia állhat fenn. Ennek elméleti okai a máj parenchymájának funkcionális inhomogenitása, illetve egységnyi májszövet aktuális funkciójának széles spektrumon való, számos tényező által befolyásolt változása. Bár míg e jelenség háttérében a máj fokális- és regionális patológiás eltérései (tályog, tumor, kolesztázis) és a májparenchymát diffúzan érintő eltérések (szteatózisz, hepatitisz, cirrhosis, stb.) is állhatnak, addig a PVO a volumen- és fiziológiás viszonyok drámai megváltoztatása révén kifejezett morfofunkcionális diszkrépancia forrása lehet.^{7, 8, 90, 92, 93} Mindezek következtében a máj pusztán morfológiáján, metszeti anatómiáján alapuló képalkotók (CT, MRI) sem közvetlenül, sem extrapoláció révén nem alkalmasak

a máj aktuális funkciójának pontos becslésére. Ugyanakkor májsebészeti beavatkozások kapcsán a májfunkció pontos ismerete a súlyos, potenciálisan halálos szövődmények elkerülése érdekében elengedhetetlenül fontos, így annak mérésére az idők során számos funkcionális mérőmódszer, teszt került kidolgozásra.^{3, 88-90}

1.4. A máj funkciójának mérése

Számos, egzakt, vagy legalábbis jó közelítéssel egyértelműen mérhető változóval, mennyiséggel – mint például magasság, tömeg, (máj)térfogat – szemben a máj funkciójának mérése nehézségekbe ütközik. Ennek oka, hogy a szervezet anyagcseréjének központi elemeként a máj számos, így például bioszintetikus, metabolizáló és kiválasztó szereppel bír, melynek megfelelően a máj funkcióját linearitás helyett a komplexitás jellemzi. A máj funkciójának mérése legérzékletesebben úgy szemléltethető, mint egy teljes kör kerületének, vagy gömb felületének (a „májfunkció”) valamely pontjában húzott érintő szakasz, vagy sík (egy funkcionális aspektus) mentén történő kétdimenziós leképezése (ami ebből mérhető). Ennek megfelelően nagyszámú, a májfunkció egy-egy, vagy néhány aspektusának mérését célzó funkcionális teszt ismert, melyek - a máj élettanáról alkotott ismeretek és a fizika, biofizika és orvosi képalkotás fejlődésének köszönhetően – saját evolúcióval bírnak, és egymástól minőségükben, hatékonyságukban és precizitásukban is különböznek. Többféle csoportosítási lehetőségük mellett a legkézenfekvőbb, dinamikát alapul vevő osztályozás szempontjából megkülönböztethetünk *statikus, klinikai pontrendszer („score”) alapú,* illetve *dinamikus (konverziós, eliminációs és nukleáris képalkotás alapú)* funkcionális tesztek.

1.4.1. Statikus májfunkciós tesztek

A statikus tesztek a májfunkció mérésének legprimitívebb, általában véve korábbi és kevésbé hatékony módszerei, melyek valamely vegyület szérumkoncentrációja alapján igyekeznek következtetni a máj funkciójára. Bár ide sorolásuk téves, itt említendőek a klinikai gyakorlatban sokszor „májfunkciós paraméter”-ként szolgáló máj transzaminázok (aszpartát- és alanin-aminotranszferáz), melyek a máj funkcióját semmilyen mértékben, ehelyett hepatocita nekroenzimként csupán a májsejtek károsodását jellemzik. A „klasszikus”, leggyakrabban említett statikus tesztek közé tartoznak a bioszintetikus funkciót tükröző albumin, protrombin és az international normalized ratio (INR), a parenchymás tartalékot jellemző pszeudo-kolinészteráz,

valamint az eliminációs képességet reflektáló bilirubin. A statikus tesztek több szempontból nem kellően hatékonyak. Egyfelől elnevezésüknek megfelelően a máj funkciójáról csupán egy pillanatképet szolgáltatnak, mely emellett gyakran nem kellően specifikus más kórformák általi befolyásoltatottsága révén (albumin - tápláltsági állapot, fehérje bevitel; bilirubin – hemolízis, stb.), illetve szenzitivitásuk sem elég magas ahhoz, hogy jelezni tudják a máj funkciójában pillanatszerűen létrejövő apró változásokat. Továbbá szérumban paraméterként csupán a teljes máj funkcióját tükrözik, nem képesek az egyes májterületek saját funkciói közti különbségtételre.^{3, 88-90, 94} Mindezek ellenére újabb lehetőségek is felmerültek. Ilyen a kizárólag máj szinuszoidális endotélsejtjei által keringésből eliminált hialuronsav szérumban koncentrációja,⁹⁴ illetve a szérumban aszpartát-aminotranszferáz és vérlemezke (APRI index), valamint a szérumban bilirubin és pszeudokolinészteráz (BILCHE index) szintjeinek hányadosai,^{13, 90} melyek valamelyest magasabb szenzitivitást és specificitást mutatnak,^{13, 95} ugyanakkor szintén magukon viselik a statikus tesztek levethető hátrányait.

1.4.2. Klinikai „score” rendszerek

A klinikai pont- azaz „score” rendszerek bizonyos szérumban paraméterek mellett egyéb tényezők, mint például klinikai tünetek, vagy vesefunkció figyelembe vételével törekszenek a májfunkció teljesebb értékű és pontosabb meghatározására. Ezek közül a legjelentősebb a

Measurement	The Child-Pugh score		
	Score		
	1	2	3
Albumin (g/dL)	>3.5	2.8-3.5	<2.8
Bilirubin (mg/mL)	<2.0	2.0-3.0	>3.0
Prothrombin time (sec)	<4.0	4.0-6.0	>6.0
International normalized ratio	<1.7	1.7-2.3	>2.3
Ascites	No	Easy to control	Hard to control
Encephalopathy	No	Grade I-II	Grade III-IV
Child-Pugh class obtained by adding score for each parameter (total points)			
Class A=5 to 6 points			
Class B=7 to 9 points			
Class C=10 to 15 points			

7. ábra A Child-Turcotte-Pugh pontrendszer^{1, 2} a májfunkció becslésére. Ábra módosítás nélkül adaptálva: Ge P-L és mtsai., HPB Diseases International 2014.³

Child-Turcotte-Pugh score, mely napjainkban a májfunkció jellemzésének egyik leggyakoribb, a nyugati világban első számú mércéje.^{88, 96} Alapját az 1963-ban a cirrotikus betegek portális hipertenzió műtéti ritikóját becselő Child-Turcotte skála adta, mely a szérumban albumin és bilirubin szintek mellett ascitesz és hepatikus encefalopátia jelenlétét, valamint a tápláltsági állapotot összesítette.^{1, 3} Pugh és mtsai. 1973-as módosító javaslatával - melyben a tápláltsági állapotot a protrombin időre cserélték – született meg

a Child-(Turcotte)-Pugh (CTP) score, amely az 5 tényező mindegyikére súlyosságától függően 1-3 pontot adva az összesen elérhető 5-15 pontból elért eredmény alapján három, eltérő kockázatú kategóriába sorolja a máj funkcióját: „A” (5-6 pont), „B” (7-9) és „C” (10-15) (7. ábra).² A CTP score leginkább cirrotikus betegekben, illetve HCC esetén vált be; előnye a klinikai tényezők figyelembe vétele mellett könnyű klinikai alkalmazhatósága. Hátránya, hogy csupán a teljes máj funkciójának szuboptimális hatékonyságú mérésére alkalmas, mely leginkább az „A” kategória nagyfokú heterogenitásban tükröződik. Mindezen hiányosságok nem-cirrotikus és nem-HCC-s betegek kapcsán fokozottan érvényesek.^{3, 88-90}

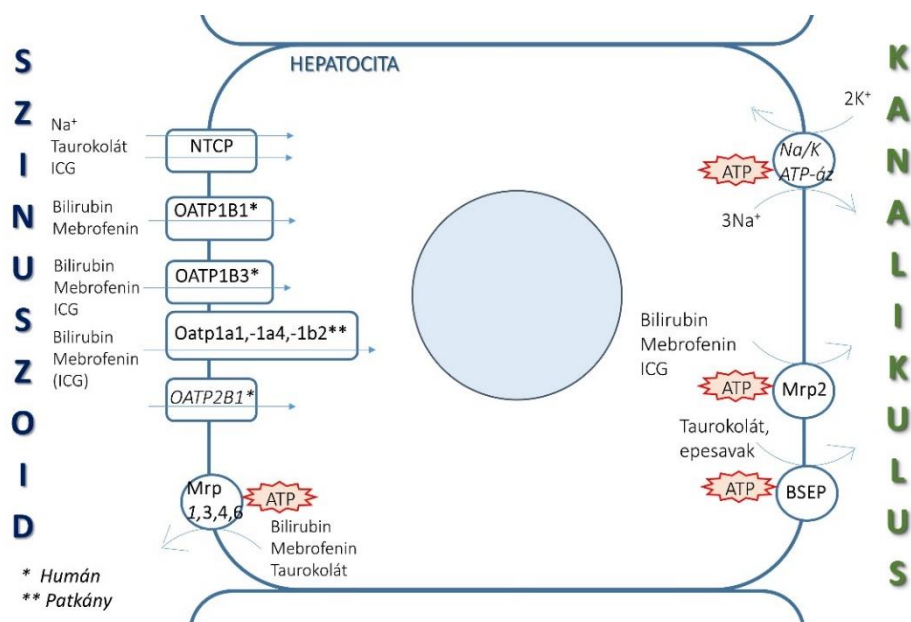
Egy másik gyakran alkalmazott és relatíve hatékony klinikai pontrendszer az eredetileg portális hipertenziós betegek transzjuguláris intrahepatikus portoszisztémás szöntbeültetésének kockázatbecslésére ajánlott „model for end-stage liver disease” (MELD), score, amely egy logaritmikusságú függvény keretében a szérumbilirubin, INR és az „etiológiai faktor” mellett a szérumbilirubin koncentrációt tömöríti, mely utóbbi révén a máj funkciózavarához gyakran társuló hepatorenális szindrómára is tekintettel van. A képletnek azóta számos módosítása (MELD-Na; iMELD, MESO, UKELD, Re-weighted MELD) merült fel.^{3, 88, 94} A pontrendszer elsősorban a májtranszplantáció terén nyert létjogosultságot.⁹⁰ A MELD előnye a vesefunkció figyelembe vétele és - bonyolult képlete alapján - viszonylagos pontossága, ugyanakkor ez utóbbi egyben betegágy melletti alkalmazásának korlátja is. Továbbá a statikus tesztekhez és CTP-hez hasonlóan csupán a teljes májfunkcióra enged következtetni.^{88, 90}

1.4.3. Dinamikus májfunkciós tesztek

A dinamikus májfunkciós tesztek a máj funkcióját nem egy, vagy több, időben kumulálódó/eliminálódó paraméter, vagy klinikai tünet pillanatnyi szintje alapján ítélik meg, hanem valamely bejuttatott anyag átalakulása, vagy transzportjának vizsgálata révén a máj dinamikus „stressz-tesztjét” valósítják meg. Ez az aktuális májfunkció sokkal érzékenyebb, pontosabb megítélését teszi lehetővé.⁸⁸⁻⁹⁰ A mérőmódszer metodikai, biofiziko-kémiai elve alapján kis önkényességgel konverziós, eliminációs és nukleáris képzőképzésre épülő módszereket különböztethetünk meg.

1.4.3.1. Konverziós tesztek

A konverziós tesztek lényege egy exogén, bejuttatott anyag máj által történő metabolizmusának mérése az eredeti vegyület eltűnése, valamely metabolit felszaporodása, vagy szervezetből távozása alapján.^{3, 89, 94, 97} Az ilyen tesztek túlnyomó részében közös, hogy a májspecifikus konverziós reakció a máj drogmétabolizmusának központi szerepű citokróm P450 (CYP) enzimeikhez kötött, mely alapján CYP-dependens és CYP-independens tesztek különíthetők el. A konverziós tesztek korábbi, népes csoportja az úgynevezett „kilégzési tesztek”, melyek alapja a bejuttatott (gyakran ¹³C-jelölt) anyag (aminopirin, koffein, diazepam, eritromicin, stb.) májspecifikus konverziója, majd a metabolit (¹³CO₂) kilégzését követő kvantifikációja.^{89, 97} A konverziós tesztek másik csoportjának lényege a bejuttatott anyag, vagy a metabolit szérumkoncentrációjának sorozatvérvételi, vagy non-invazív optikai alapú mérése. Ilyen a lidokain clearance, avagy „MEGX” teszt, mely a lidokain mono-etil-glicinilididdé történő CYP-dependens átalakításán alapul, és szintén a májtranszplantáció terén vált elterjedté.^{89, 94} CYP-independens konverziós teszt például a paraaminobenzoát glicin-konjugációs átalakításán alapuló paraaminohippursavvá hippurát hányados teszt.⁸⁹ A konverziós tesztek előnye dinamikus jellegüknél fogva nagyobb pontosságuk, hátrányuk azonban, hogy szintén csak az egész máj funkciójának jellemzésére képesek.



8. ábra A máj szerves anion transzportjának sematikus illusztrációja. *: Humán-specifikus transzporterek; **: patkány—specifikus transzporterek. Az ábra az I. sz. Sebészeti Klinika Kísérletes Sebészeti Részlegének tulajdona.

1.4.3.2. Eliminációs tesztek

Az eliminációs tesztek az exogén bejuttatott anyag vérből történő, májspecifikus felvétele révén megvalósuló eliminációján, és az adott anyag szérumkoncentrációjának sorozatvérvételi, vagy non-invazív optikai denzitometriás mérésén alapulnak. Minthogy a vér kompartmentje képezi a bemeneti kompartmentet és a szignál forrását is, így az egyenirányúsítás céljából fontos az adott anyag enterohepatikus körforgásának definíciószerű, teljes hiánya. Itt említendő meg a számos eliminációs-, illetve nukleáris képalkotásos májfunkciós teszt alapjául szolgáló máj szerves anion transzport (8. ábra).⁹⁸ Utóbbi kritikus jelentősége kettős, mivel egyfelől eze(ke)n a transzport útvonal(ak)on történik számos endogén szerves anion (bilirubin, epesavak, stb.) és exogén szerves vegyület (gyógyszerek, toxinok) szervezetből való eliminációja, másfelől a transzport energiaigényénél fogva jól tükrözi a máj funkcionális állapotát. Így a máj központi szerepű szerves anion transzportjának mérése magas klinikai relevanciát mutat a májfunkció vizsgálata szempontjából.^{88, 90, 98, 99} A szerves anion transzport elemei a hepatociták bazolaterális membránjának karrier-mediált passzív felvételt végző „organic anion transporting polypeptid” (humánban OATP1B1, -1B3 és 2B1, patkányban Oatp1a1, -1a4, -1b2 és -2b1) és szekunder aktív felvételt végző „sodium-taurocholate cotransporting polypeptide” (NTCP/Ntcp) transzporterei; a szinuszoidális effluxot végző aktív „multidrug resistance protein”-jei (MRP/Mrp-1,-3,-4,-6), valamint a kanalikuláris membránjának aktív kanalikuláris effluxot végző MRP/Mrp2 és „bile salt efflux pump” (BSEP/Bsep) transzporterei.^{8, 90, 98, 100} Mindezek alapján nem meglepő, hogy a modern eliminációs, illetve nukleáris képalkotási tesztek nagy része a máj szerves anion transzportjának vizsgálatán alapul, melyet a teszt során alkalmazott, bevitt szerves anyag típusa tesz lehetővé. Ironikusan, mindezek után jó ellenpélda az intravénásan injektált galaktóz szérumkoncentrációjának sorozatvérvételi mérésén alapuló galaktóz eliminációs teszt. A galaktóz egyszerű monoszacharidként felvevődik a sejtekbe, ahol foszforilációja megakadályozza az ellentétes irányú diffúzióját, melynek megfelelően az irodalom a tesztet a „citoszólikus kapacitás mérőmódszereként” említi.^{89, 94, 101} Ugyanakkor a tesztet számos kritika éri, mivel számos folyamatban (így például PVO-val, vagy PH-val indukált májregeneráció) pontatlan a májfunkció mérésére, annak megfelelően, hogy a galaktóz egyszerre energiaszubsztrát és membránalkotó komponens is. Az eliminációs, illetve összességében véve a májfunkciós tesztek között világszerte, főleg Japánban és a

Távol-Keleten leggyakrabban alkalmazott teszt az indocián-zöld (ICG) clearance teszt.^{3, 88-90, 96} Elterjedtségét és elfogadottságát jelentős specificitásának, illetve viszonylagos hatékonyságának köszönheti. A módszer lényege a fluoreszcens trikarbocianin ICG intravénás befecskendezését követően a vegyület szérumkoncentrációjának, illetve plazma eliminációjának és 15 perces retenciós koncentrációjának mérése sorozatvérvételi minták spektrofotometriás, vagy non-invazív denzitometriás mérése alapján. Az ICG a keringésben albuminhoz kötődik, a vesében nem filtrálódik, eliminációja kizárólag a máj szerves anion transzportjának útján (bazolaterális felvétel: NTCP, OATP1B3, OATP2B1; kanalikuláris elimináció: MRP2) történik bárminemű intracelluláris metabolizmus, illetve enterohepatikus körforgás nélkül. Szintje a máj funkcióján túl csupán a véráramlásától függ.^{3, 88-90, 96} Mindezen előnyös tulajdonságai révén több ajánlás is történt májsebészeti alkalmazása kapcsán, melyek az ICG clearance teszt eredményétől tették függővé az elvégezhető reszekció kiterjedését;^{102, 103} továbbá a májfunkciós tesztek tekintetében mindmáig jelentős hasonlítási alapot képvisel. Mindezek ellenére számos pontatlan, a klinikai kimeneteltől drámaian eltérő funkcionális becslés miatt májsebészeti döntéshozatalbeli alkalmazhatósága jelentősen korlátozódott.⁸⁸⁻⁹⁰ Továbbá a fenti tesztekhez hasonlóan csupán a teljes máj teljesítményének mérésére alkalmas.

1.4.3.3. Nukleáris képalkotás alapú tesztek

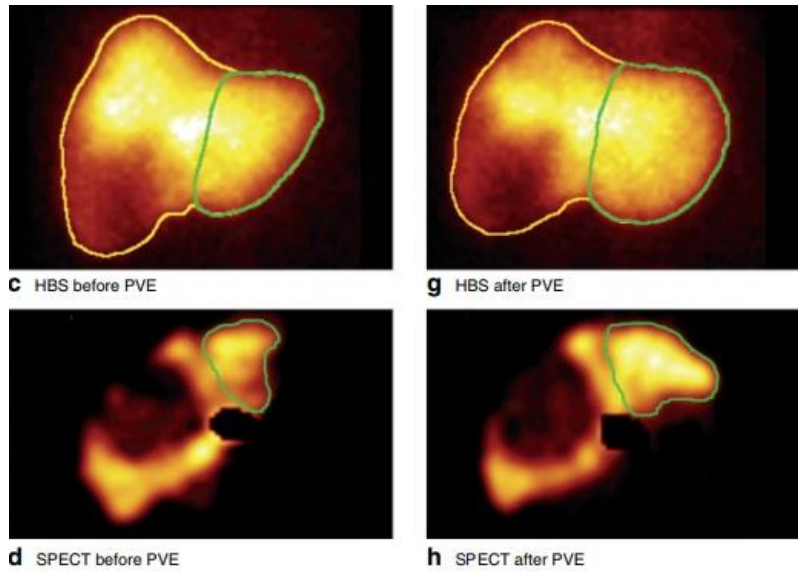
A nukleáris képalkotás kiaknázása teljesen új alapokra helyezte a májfunkciós teszteket. A metodika kulcsa a szervezetbe juttatott radiofarmakon, azaz valamely májspecifikus transzportú szerves anyaghoz kapcsolt radioaktív izotóp. Az izotóp és a teszt típusától függően a kvantitatív mérést kivitelező, non-invazív képalkotó vizsgálat a β^+ sugárzó izotópokkal működő pozitron emissziós tomográfia (PET),¹⁰⁴ illetve gamma-sugárzást detektáló egy, vagy több gamma kamerás szcintigráfia, vagy a három dimenziós felvételt generáló egyfoton emissziós tomográfia („single photon emission tomography”), azaz SPECT lehet.^{7, 88, 90, 105} A nukleáris képalkotók új távlatokat nyitnak a májfunkció meghatározásában, hiszen míg a megelőző tesztek a májat oszthatatlan egységként értelmeztek, ezáltal a funkcionális kapacitást csupán a teljes májra vonatkoztatva tudták megadni, addig a nukleáris képalkotás révén lehetővé vált a máj különálló részeinek független funkcionális vizsgálata, illetve a funkcionális szignálok anatómiai lokalizációja. Ez lehetővé teszi a regionális májfunkció tetszőleges területű meghatározását, mely segítségével a preoperatív FLR funkcióbecslés szofisztikált

kivitelezése révén a májsebészeti, pre-reszekciós döntéshozatal hatékonyságának, biztonságának kifejezett javulásához vezethet.^{88,90} Bár PET kapcsán is ismertek kezdeti eredmények,¹⁰⁴ a tisztán γ -sugárzó, metastabil technécium izotóp (^{99m}Tc) nyújtotta legnagyobb jel és legkisebb ionizáló sugárterhelésnek megfelelően elsősorban a γ -sugárzáson alapuló szcintigráfias- és 3D SPECT/CT alapú eljárások váltak be, a ^{99m}Tc -GSA SPECT, valamint a ^{99m}Tc -mefrofenin hepatobilirális szcintigráfia (HBS) és SPECT kiemelkedő szerepével.

A ^{99m}Tc -GSA SPECT teszt során a szerves anyag a galaktozil-szérum humán albumin (GSA), mely - szialsav-mentes szerves molekulaként - a specifikus és kizárólagosan a máj aszialoglikoprotein receptorain (ASGPR) keresztüli eliminációért felelős.^{3, 88, 101} A teszt koncepciójának alapja, hogy a máj ASGPR receptor denzitása a szerv funkcionális kapacitásának függvénye, így krónikus májbetegségek, illetve a máj funkciózavara kapcsán csökkenést mutat.^{3, 88} Így a májba felvett, és a 3D SPECT vizsgálattal detektálható radiofarmakon mennyisége alapján a teszt képes a májfunkció globális-, illetve akár regionális szintű becslésére, mely értékes, pontos vizsgálattá teszi. Ugyanakkor a GSA-alapú radiofarmakon specifikus kanalikuláris transzport hiányában a májban dúsul, mely a felvételi kapacitás, funkcionális májvolumen (FLRV) vizsgálatának hatékonysága mellett lehetetlenné teszi a kanalikuláris transzport vizsgálatát.^{3, 88} Elterjedésének további korlátja, hogy egyedül Japánban törzskönyvezett.

A ^{99m}Tc -mefrofenin HBS és SPECT vizsgálatok során használt „mefrofenin” (2,4,6-trimethyl-3-bromo iminodiacetát) iminodiacetát-analóg szerves anyag, mely a keringésben albuminhoz kötött formájának megfelelően csupán minimális renális eliminációt mutatva specifikusan a máj szerves anion transzport útvonalán ürül, bazolaterálisan az OATP1B1 és -1B3 (patkány: Oatp1a1, -1a4, -1b2) csatornákon és MRP(/Mrp)3,-4,-6 transzporterek, míg kanalikulárisan az MRP(/Mrp)2 transzporterek segítségével; enterohepatikus körforgása nincs.^{3, 88, 90, 98-100, 106} Mindez a ^{99m}Tc -GSA SPECT-tel szemben a máj felvételi kapacitása mellett a globális- és regionális exkréciós kapacitás vizsgálatát is lehetővé teszi.^{3, 88, 90, 99} A ^{99m}Tc -mefrofenin transzport vizsgálat kétfajta képalkotóval is végezhető, melyek technikai és metodikai okokból eltérő hasznosíthatósággal rendelkeznek.⁸⁸ A 3D SPECT készülékek a vizsgálat elkészítéséhez rendszerint hosszabb időt igényelnek, így a mefrofenin viszonylag gyors transzportja

mellett csupán egy, általában a hepatikus fázis csúcsára pozícionált felvétel készíthető, mely így a ^{99m}Tc -GSA SPECT-hez hasonlóan elsősorban a funkcionális májvolumen (FLRV) tükrözi. A transzportfolyamat



különböző aspektusaira jóval informatívabb az egy-, vagy több gamma-

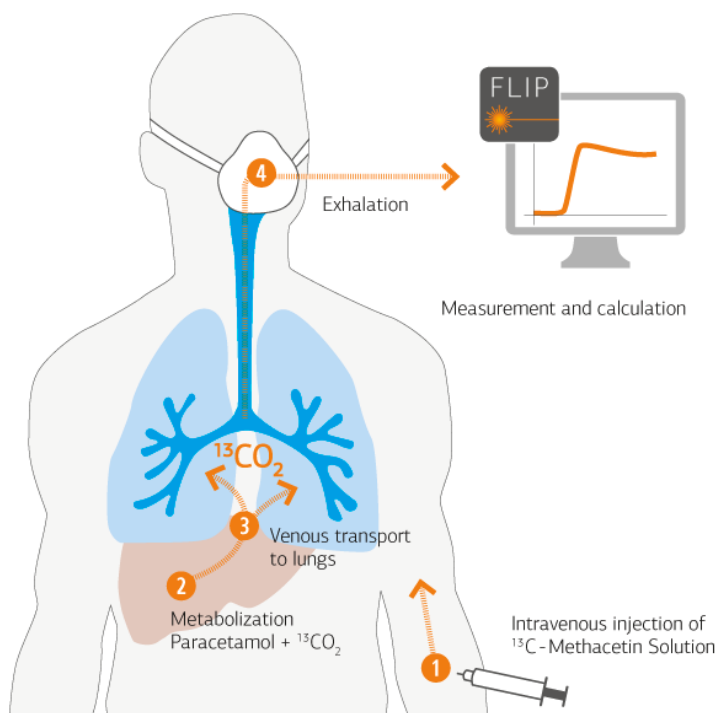
9. ábra ^{99m}Tc -mebrofenin HBS (C, G) és SPECT (D, H) májfunkciós vizsgálatok PVE-t megelőzően (C, D), illetve azt követően (G, H). Ábra részlet egyéb módosítás nélkül adaptálva: de Graaf W és mtsi., British Journal of Surgery 2011.⁷

kamerával végzett dinamikus HBS, mely ezáltal a májfunkció különböző kvalitásainak (globális és regionális, felvételi és exkréciós) jóval pontosabb analizését teszi lehetővé (9. ábra).^{88,90} Mindezek alapján a ^{99m}Tc -mebrofenin HBS és SPECT napjainkban világszerte, főként (Nyugat-) Európában növekvő gyakorisággal alkalmazott, igen magas klinikai relevanciát mutató, regionális- és akár specifikus FLR funkció pontos mérésére is képes eljárásai. Ezzel párhuzamosan májsebészeti alkalmazásuk egyre növekvő tendenciát mutat.^{88, 107-111}

1.4.3.4. A májfunkció mérésének újszerű lehetőségei

A májfunkció mérésére nemrégiben több újszerű lehetőség merült fel. A teljesség igénye nélkül, a leglényegesebbekre fókuszálva, ezek egyike a ^{13}C -metacetin, vagy „liver maximum capacity” (LiMAX) teszt, mely ironikus módon egy kilégzési próba. Az intravénásan injektált ^{13}C -metacetint egyedül a kizárólag májban, irodalmi adatok szerint homogén disztribúcióval expresszázó CYP1A2 enzim metabolizálja paracetamollá, majd $^{13}\text{CO}_2$ -vé, mely kilégezve kvantitatívan mérhető (10. ábra).⁹⁰ Bár kilégzési teszt voltának megfelelően elviekben csupán a teljes májfunkció mérésére alkalmas, egyes szerzők szerint a módszer - morfológiai képalkotóval (CT/MRI) történő volumetriai

súlyozást követően - képes tetszőleges térfogatarányú májterület individuális funkciójának meghatározására, mely kapcsán a biztonságos reszekciót lehetővé tevő, specifikus FLR funkció „cutoff” érték is felvetésre került.¹¹² Ezen extrapoláció lehetősége, illetve pontossága a máj funkciójának potenciális inhomogenitása miatt jelentős vitatott.⁹⁰ További



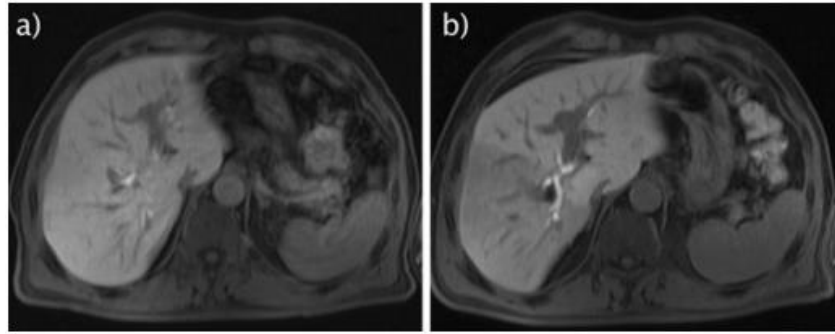
limitációt jelent, hogy (számos egyéb befolyásoló tényező mellett) a CYP1A2 expressziója HCC esetén

10. ábra A „liver maximum capacity”, azaz LiMAX kilégzési májfunkciós teszt ¹³C-metacetin intravénás beadását követően. Ábra részlet egyéb módosítás nélkül adaptálva: Humedics GmbH, Germany - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=32634303>, 2012

megváltozik, mely a teszt univerzális alkalmazhatóságának jelentős korlátja.^{90, 113}

Egy másik, a nukleáris képalkotási technikák sikerén alapuló lehetőség a májfunkció MRI-alapú, gadolinium-etoxibenzil-dimeglumin (Gd-EOB-DTPA) kontrasztanyag vizsgálatára.^{8, 90, 114} Ennek során a bejuttatott anyag az alacsony (50%) renális filtrációjú, májspecifikus, (mefrofeninnel egyező) szerves anion transzportot mutató dimeglumin (DTPA), amelyhez kapcsolt Gd-EOB mágnesezhető kontrasztanyag felelős a szignálért.^{8, 90, 98, 99, 114} A képalkotás non-invazív, többfázisú (natív, artériás, vénás és *20 perces hepatobiliáris fázis*) kontrasztanyag MRI felvétellel történik (11. ábra).^{8, 114} Mindezek alapján a Gd-EOB-DTPA-nak számos, figyelemre méltó előnye van. A morfológiai viszonyok rendkívül pontos ábrázolása mellett a teszt egyazon felvételen, invazív beavatkozás, vagy sugárzó izotópok nélkül, a szerves kontrasztanyag transzporter specifikus útvonalának vizsgálata révén lehetővé teszi egyfelől a máj tumorainak CT-vizsgálatnál jóval hatékonyabb és specifikusabb vizualizálását (!), valamint a *hepatobiliáris fázisban* a globális májfunkció mellett tetszőleges májterület, így akár az

FLR saját funkciójának mérését is. Mindezek hatására a Gd-EOB-DTPA MRI egy „mindent-egyben” („one-stop-shop”)



vizsgálatként merült fel a máj, tumorai és a globális, valamint

11. ábra Gd-EOB DTPA MRI felvétel perhiláris CCC kapcsán végzett PVE-t megelőzően (A), illetve 2 héttel azt követően (B). Utóbbin az embolizált- és nem-embolizált májterületek jelintenzitásának elkülönülése észlelhető. Ábra részlet egyéb módosítás nélkül adaptálva: Geisel D és mtsai., European Radiology 2013.⁸

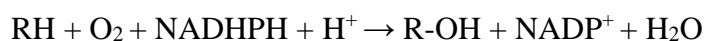
regionális májfunkció specifikus vizsgálatára csupán egy darab, non-invazív, sugárterheléssel nem járó felvétel keretében, mely hatalmas jövőbeni klinikai potenciált tartogat.^{8, 90, 98, 99, 114} Rutinszerű, nukleáris képalkotók sikerét és hatékonyságát potenciálisan felülmúló elterjedésének jelenleg azonban megoldandó akadályai az MRI alacsony hozzáférhetősége és magas költsége, a (vizsgálat-orientáltan) képzett radiológusok alacsony száma, illetve a nem kellően szoros korreláció a májparenchyma jelintenzitása és a funkcionális kvantifikáció között.^{90,99,114}

Szintén újszerű vizsgálómódszer az optikai, fluoreszcens képalkotó „konfokális lézer endomikroszkópia” (CLE), mely lényegben egy endoszkópos vizsgálatot lehetővé tevő vezetődrtt végén elhelyezkedő, 488 és 660 nm hullámhosszú fény kibocsátására és fluoreszcens jel regisztrálására is alkalmas mikroszáloptikából és a feldolgozó komputerből áll. Az eljárást elsősorban gasztrointesztinális és bronchoalveroláris vizsgálatok keretében „live optical biopsy”, azaz „élő optikai biopszia” elvégzésére fejlesztették ki, melyek során valós időben teszi lehetővé a különféle szövetek és sejtek mikroszkópikus struktúrájának (natív-, vagy fluorofórral jelölt) vizsgálatát.¹¹⁵ Néhány, májjal kapcsolatos alkalmazása^{116, 117} ellenére a máj funkcionális vizsgálata céljából történő alkalmazása ez idáig még nem került leírásra.

1.4.4. A máj drogmétabolizmusa és a citokróm P450 enzimek

A biotranszformációs és gyógyszermetabolizáló kapacitás a májfunkció egyik elsődleges, kulcsfontosságú aspektusa, mivel számos endogén vegyület bioszintézise (szterán vázas vegyületek, hormonok stb.) mellett rengeteg endogén- és az exogén apoláros molekula (növényi alkaloidák, toxinok, gyógyszerek, festékek, stb.) átalakítása

és szervezetből való eltávolítása is ennek segítségével történik. Jelentőségéhez emellett a fentiek alapján szintén hozzájárul a konverziós májfunkciós tesztek során játszott központi szerepe. A drogmétabolizmus kulcsfontosságú tényezői az elsősorban a májsejtek simafelszínű endoplazmás retikulumában megtalálható citokróm P450 enzimek.¹¹⁸⁻¹²⁰ Az élővilágban egyik legnagyobb evolúciós konzerváltságot mutató CYP enzim szuperfamilia tagjai vélhetőleg egyetlen, 1,36 milliárd éves, *Archebacterium*-tól származó, közös, ősi gén leszármazottai, melynek képviselői a Föld keletkezésének idején fennálló nyomás- és hőmérsékletviszonyok mellett is működőképeseek voltak.^{118, 120} Az evolúciós fejlődésük során népes szuperfamiliaivá váló CYP enzimek homológiájuk foka alapján családokra (CYP1, CYP2, stb.; 40%-os aminosav sorrend egyezés), alcsaládokra (CYP2B, CYP2C, stb.; 55%-os egyezés), ezen belül konkrét izoformákra (pl. CYP3A4, CYP3A5, stb. minimális aminosav-sorrend eltérés: 3%) tagolódnak. Funkcionálisan a gyógyszermetabolizmus, illetve biotranszformáció legfőbb fázis I enzimeiként a vegyületek oxidatív metabolizmusát végzik. Katalizált reakciók szempontjából a vas ion, illetve hem tartalmú „hemotiolát monooxigenáz”, vagy „kevert funkciójú oxigenáz” CYP enzimek (peroxidáz aktivitásuk mellett) elsősorban egy oxigén molekula és kofaktorok megkötését követően az egyik oxigén atom bevitelét katalizálják a különféle, javarészt apoláros vegyületekbe, míg a másik oxigénatom vizet alkot.¹¹⁸⁻¹²⁰



A CYP családok egyik csoportjának enzimeit az endogén anyagok bioszintézisében vesznek részt, ahonnan gyakran a család elnevezése is származik (pl. a CYP21A1: koleszterin hidroxilációja a 21-es szénatomon). A másik csoportba a CYP1, CYP2 és CYP3 család tagjai tartoznak, melyek túlnyomórészt az exogén vegyületek metabolizmusát végzik.¹¹⁸⁻¹²⁰ Kritikus jelentőségű, hogy a CYP enzimek aktivitása egy széles spektrumon, az adott körülményeknek megfelelően változó mennyiség, melyet genetikai tényezők (allélpolimorfizmus, stb.) mellett számos környezeti- és szerzett faktor (életkor, táplálkozás, dohányzás, hormonális státusz, fertőzés, gyulladási aktiváció, tumor), de legfőképpen a májat érintő patológiai kórállapotok (szteatózis, hepatitisz, kolesztázis, PVO, stb.) is pillanatszerűen befolyásolnak.¹²¹⁻¹²³ Ennek kapcsán CYP enzimaktivitás csökkenés oka egyfelől csökkent kifejeződésből adódó „downreguláció”, másfelől azonnali poszttranszlációs változás révén kialakuló gátlás lehet. Ugyanakkor ellentétesen, aktivitásuk fokozódhat is, akár struktúra-stabilizáció

(CYP2E1), azonban dominánsan új fehérjék szintézisét eredményező enzimindukció révén.¹¹⁸⁻¹²⁰ A CYP enzimaktivitások esetlegesen szélsőséges változásai az alkalmazott gyógyszeres terápia szempontjából az potenciálisan felmerülő szövődmények - így gyógyszer túladagolás, vagy hatásvesztés – szempontjából kulcsfontosságúak.^{118, 120, 123} Fontos megemlíteni, hogy a CYP enzimesalád evolúciós mércével nagyfokú konzerváltsága mellett napjainkban az egyes fajok között az izoformák homológiájában, affinitásában, valamint indukciós és repressziós profiljában számottevő „interspecies” különbségek állnak fenn, melyekkel a fajok közti összehasonlítás, állatkísérletek során számolni kell.^{118, 120} Az alábbi kutatásunk szempontjából érintett alcsaládokat tekintve a CYP1A és CYP2B alcsalád tagjai közül előbbieket javarészt a környezeti karcinogének, aromás szénhidrogének, koffein és teofillin, míg utóbbiak számos anesztetikum (propofol, ketamin, phenobarbitál, stb.) metabolizmusát végzik. A két alcsalád kifejezett (CYP1A), illetve viszonylagos (CYP2B) „interspecies” homológiája révén a fajok közti összehasonlíthatósra kifejezetten alkalmasnak mondhatók. Ez csak korlátozottan érvényes a CYP3A alcsaládra; ahol a humán dominás, májban nagymennyiségben jelen lévő, forgalomban elérhető gyógyszerek legnagyobb részét metabolizáló CYP3A4 a legtöbb szempontból megfeleltethető a patkány analóg izoforma CYP3A1-nek (bár utóbbi a patkányban egy fokkal kevésbé hangsúlyos, mind máj CYP tartalom, mind metabolizált gyógyszerek tekintetében), ugyanakkor bizonyos indukciós-inhibíciós eltérésekkel az „interspecies” következtetések levonásakor számolni kell. Még kifejezettebb a különbség a CYP2C alcsalád esetén, mely patkányban az emberhez képest jóval jelentősebb, a drogmétabolizmus mennyiségében és affinitásában is legfőbb CYP alcsaládjá. A patkány CYP2C alcsalád tekintetében szintén hangsúlyos, hogy a hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely, illetve a nemi hormonok szoros regulációja alatt áll, továbbá az egyes izoformák nem-specifitása is ismert (domináns hím izotípusok: CYP2C11, -2C13; nem-független expresszió: CYP2C6).¹¹⁸⁻¹²⁰

2. Célkitűzések

A primeren irreszekábilis májtumороk kezelésének mindmáig széles körben alkalmazott eszköze a *vena portae* megfelelő ágainak okklúziójával – azok lekötésével, vagy embolizációjával – indukált májregeneráció, mely a megőrzendő lebenyek hipertrófiája révén lehetővé teszi a tumoros területek biztonságos eltávolítását kellő mennyiségű májparenchyma visszahagyásával. A májvolumeneket érintő eltérésekkel szemben a funkcionális változások pontos karakterisztikája nem kellően ismert, jóllehet ez utóbbiak a PHLF kialakulása, ennek megfelelően a májreszekció időpontjának meghatározása szempontjából kulcsfontosságúak. A szervezet anyagcseréjében és méregtelenítésben betöltött központi szerepének megfelelően rendkívül sokoldalú májfunkció kiemelten fontos aspektusai a szerves anion transzport, illetve a gyógyszer metabolizmus. Ennek megfelelően patkányban végzett PVL-t alkalmazó kísérletünkben az alábbi konkrét kérdésekre kerestünk válaszokat:

1. Izolálhatók-e **életképes, primer sejtkultúrák létrehozására képes hepatociták** úgy a lekötött-, mint a nem-lekötött lebenyekből a regeneráció egyes időpontjaiban?
2. Amennyiben igen, hogyan változik LL és NLL sejtkultúráiban a **hepatociták *in vitro* morfológiája, transzporter expressziója és transzport funkciója** PVL-t követően?
3. Hogyan befolyásolja a PVL a teljes máj „**globális**” **funkcióját**; különös tekintettel a pentobarbital alvási teszt, indocián-zöld clearance teszt és a ^{99m}Tc-mebrofenin hepatobiliáris szcintigráfia vonatkozó paramétereire?
4. Milyen hatásokkal rendelkezik a PVL LL és kifejezetten az NLL „**regionális**” **funkciójára**, különös tekintettel azok szerves anion transzportját minősítő funkcionális tesztheinek (^{99m}Tc-mebrofenin HBS, CLE), illetve drogmétabolizmusának (CYP enzim expresszió és aktivitás, CYP mRNS expresszió) vonatkozó paramétereire?
5. Alkalmazható-e az eredetileg más gasztroenterológiai- és bronchoalveoláris vizsgálatokra fejlesztett **konfokális lézer endomikroszkópia** (Cellvizio, MaunaKea Technologies, Paris, France) a **regionális májfunkció célzott mérésére**?

3. Módszerek

3.1. Etikai engedélyek, állattartási feltételek

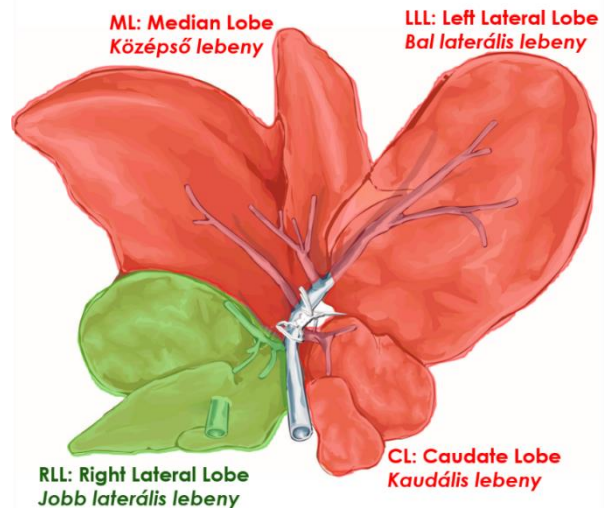
Kísérleteinket a nemzetközi állattartási és állatjóléti direktívák (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; National Institutes of Health) és a 40/2013-as (II.14.) Kormányrendeletben foglaltak betartásával az intézményi, valamint a hatósági etikai szervezetek hivatalos engedélyével végeztük [Munkahelyi Állatjóléti Bizottság, Semmelweis Egyetem; Állategészségügyi Osztály, Élelmiszerlánc-biztonsági, Növény- és Talajvédelmi Főosztály, Pest Megyei Kormányhivatal, Állatkísérletes Tudományos Etikai Tanács (ÁTET), Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH) - engedélyszámok: PEI/001/313-4/2014; PE/EA/2895-6/2016; PE/EA/2893-6/2016].

A kísérlethez felhasznált 200-240g tömegű hím Wistar patkányok (Központi Állatház, Nagyváradi Téri Elméleti Tömb, Semmelweis Egyetem, Budapest, Magyarország) tartása egy külön erre a célra kialakított, konvencionális szintű, az előírásoknak megfelelő helyiségben, a napszaki változásokat automatikusan követő megvilágítás, 22-24°C-os hőmérséklet és megfelelő páratartalom, szükségletüknek megfelelő víz, száraztáp, és szakszerű gondozás, ellátás biztosítása mellett speciális, az Európai Unió szabványoknak megfelelő tartóegységekben történt, különös tekintettel az állatok számára előírt minimális élettér, belmagasság és környezetgazdagítás előírásaira.

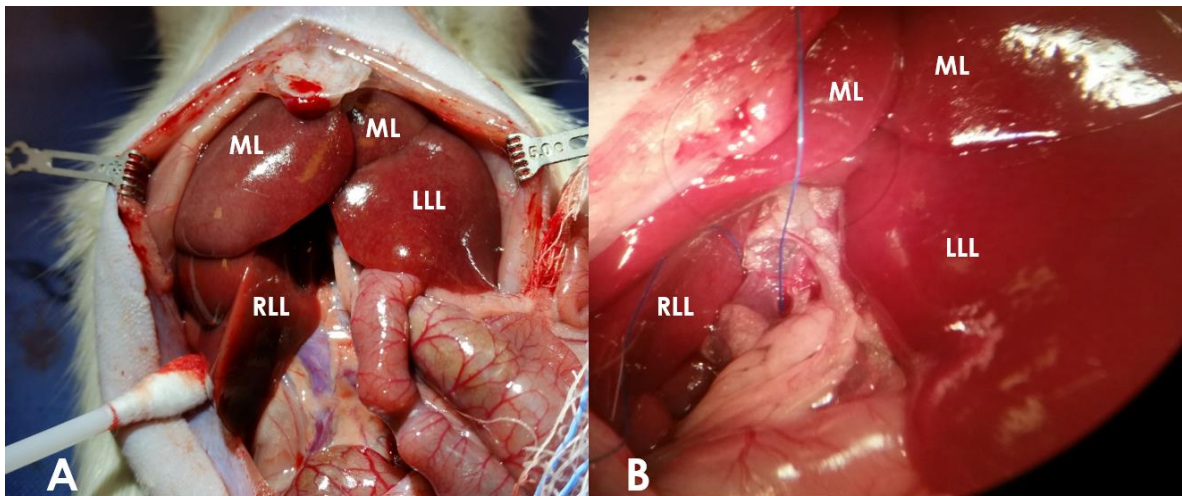
3.2. Műtét – vena portae ligatúra (PVL)

A műtéti beavatkozások és analitikai vizsgálatok általános inhalatív izoflurán anesztézia (I. kísérlet) [Fortec, Cyprane Ltd., Keighley, England; 1-1,5 l/min 100% oxigén és 2-2,5% izoflurán (Vetflurane 1000 mg/g, Virbac, Carros, France) elegye]; illetőleg általános intraperitoneális (ip.) ketamin/xylazin anesztézia (II. kísérlet) (ip. beadott 75 mg/testtömeg (tt) kilogram (kg) ketamin és 7,5 mg/ttkg xylazin 1,5 ml fiziológiás sóoldatban) mellett történtek. A patkány máj állományának kb. 80%-ára kiterjedő PVL-t munkacsoportunk korábbi gyakorlata alapján végeztük.^{84, 124} Az állat háton fekvő helyzetében a has borotválását, fertőtlenítését és medianlaparotomiát követően a hasüreg feltárása történik. A belek izolálása után azonosításra kerül a máj, a májkapu képletei, illetve azok portális oszlása (12. ábra). Ezt követően operációs mikroszkóp (Leica M6, Wild Heerbrugg, Heerbrugg, Svájc) alatt, mikrosebészeti

eszközök és atraumatikus preparálás segítségével disszekáljuk a máj középső, bal laterális és kaudális lebenyeihez („median-, left lateral- caudate lobe”) futó közös *vena portae* ágat, melynek a vele párhuzamosan futó artériától és epeúttól való atraumatikus elkülönítését követően szelektív lekötése történik 6-0 polipropilén sebészi varróanyag (Atramat, Ciudad du México, Mexikó) segítségével (13. ábra).



12. ábra 80%-os vena portae ligatúra (PVL) sematikus képe patkányban. A patkány máj parenchyma kb. 80%-át kitevő középső- (median lobe, ML), bal laterális- (left lateral lobe, LLL) és kaudális (caudate lobe, CL) lebenyeinek közös *vena portae* törzsére felhelyezett ligatúrát (szimbólum) követően az említett lebenyek (pirossal) portális vérrellátása megszűnik, míg a jobb laterális lebenyek (right lateral lobe, RLL) (zölddel) portális vérrellátása fokozódik.



13. ábra. 80%-os vena portae ligatúra (PVL) intraoperatív felvételei patkányban. Mediánlaparotómia, a hasüreg feltárása és a beleket izolációja, majd a máj, illetve lebenyeinek pontos azonosítása (A). A hilaris képletek operációs mikroszkóp alatti azonosítása, atraumatikus disszekciója, ligatúra 6-0 polipropilén sebészi fonállal a középső- bal laterális, ill. kaudális lebenyek közös *vena portae* törzsén.

Bő hasúri lavage-drainage-t, antibiotikum (10 mg/ttkg metronidazol ip.) és analgetikum (1 mg/ttkg nalbuphine szubkután) biztosítását követően a hasüreg kétrétegű (hasizmok, bőr) zárásra került tova futó 4-0 selyem (Atramat, Ciudad du México, Mexikó) varratok segítségével, melyet követően az állat visszakerül ketrecébe.

3.3. I. kísérlet – Májfunkció a szerves anion transzport tükrében

Első kísérletünk során a máj szerves anion transzportjára fókuszálva a májfunkció komplex vizsgálatát végeztük *in vitro* sejtkultúrák, *ex vivo* szövetminták, illetve különféle, modern *in vivo* képalkotó technikák segítségével.

3.3.1. Csoportbeosztás

A PVL-t követő változások időbeli karakterisztikájának követése céljából a vizsgálatok preoperatíván („kontroll”), illetve a műtétet követő 24/48/72/168/336. órában történtek. A kísérletben felhasznált állatokat (n=106 db) öt csoportba osztottuk (1. Táblázat). Az első két csoportban a pontosabb, standard összehasonlíthatóság érdekében ismételt sorozatmérés elrendezésében ICG-clearance teszt („ICG” csoport, n=7 db), illetve planáris dinamikus ^{99m}Tc-mebrofenin HBS, valamint ezt követő mágneses rezonancia képalkotás (MRI) alapján májvolumetria vizsgálatok („MEB” csoport, n=9 db) kerültek elvégzésre. További három csoport elkülönítése tette lehetővé az *in vitro* sejtkultúrák (n=30 db), epe-, vér- és szöveti minták (n=30 db), valamint CLE vizsgálati eredmények (n=30 db) beszerzését, az alkalmazott vizsgálatok metodikai háttéréből adódóan időpont-terminálás elrendezésében.

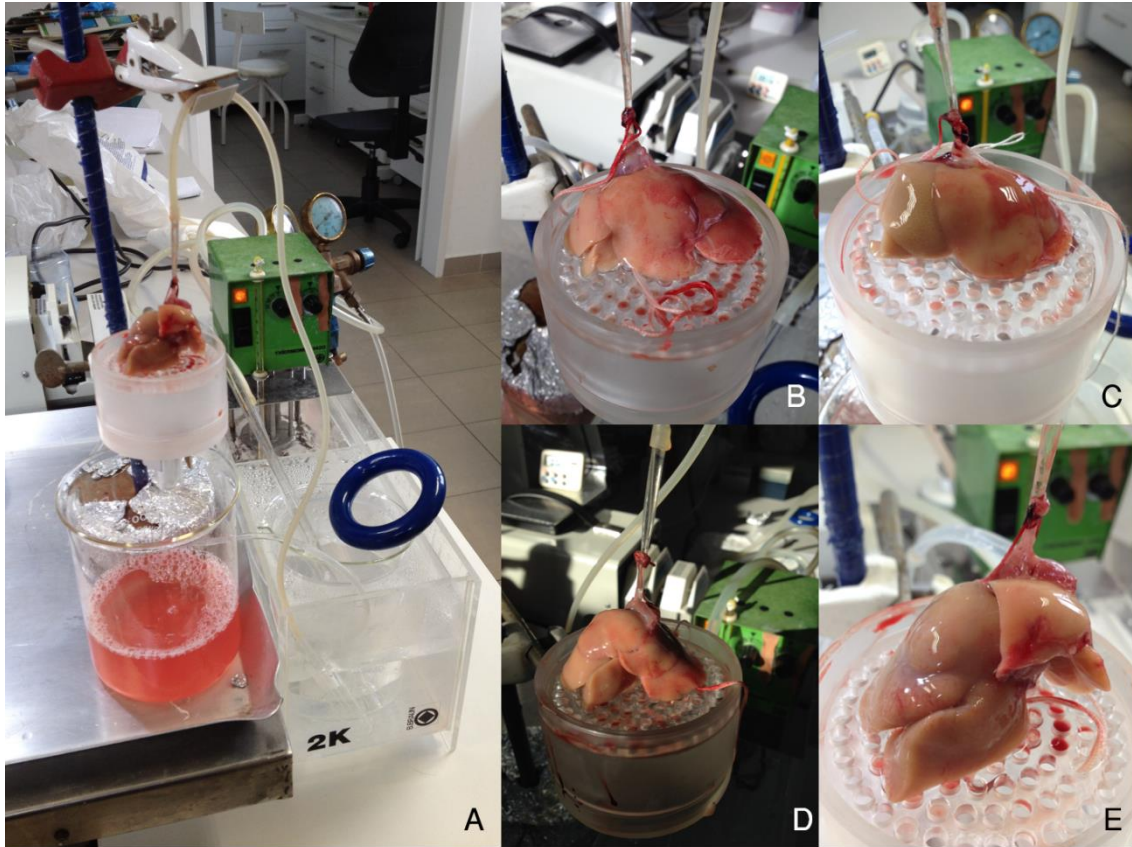
1. Táblázat. Csoportbeosztás - I. kísérlet. A felhasznált 106 db Wistar patkányt 5 csoportba osztottuk, vizsgálatainkat a 0 (kontroll)/24/48/72//168/336. órában végeztük. A ^{99m}Tc-mebrofenin hepatobiliáris szcintigráfiát (HBS) és mágneses rezonancia képalkotást (MRI), valamint indocián-zöld (ICG) clearance teszt elvégzése sorozatmérés keretében történt. A további három csoportban időpont terminálás elrendezésében gyűjtöttünk epe, szérum és májmintákat; végeztük sejtkultúra immunfluoreszcencia (IF) és transzport vizsgálatainkat, valamint konfokális lézer endomikroszkópiás (CLE) méréseinket.

Vizsgálati időpontok: kontroll/24/48/72//168/336. óra		
Csoport	Metodika	Vizsgálati elrendezés
Mebrofenin (n=9)	planáris ^{99m} Tc-mebrofenin HBS, MRI	sorozatmérés
ICG (n=7)	ICG-clearance teszt	sorozatmérés
Mintavétel (n=30)	epe, szérum, májminták vételezése	időpont terminálás
Sejtkultúra (n=30)	sejtkultúra IF és <i>in vitro</i> transzport analízis	időpont terminálás
CLE (n=30)	konfokális lézer endomikroszkópia	időpont terminálás

3.3.2. *In vitro* vizsgálatok

3.3.2.1. Hepatocita izolálás és sejt kultúrák létrehozása

Az *in vitro* vizsgálatokhoz szükséges sejt kultúrák létrehozása az irodalomban korábbiakban már publikált, kollaborációs munkacsoportunk által alkalmazott eljárás^{125, 126} kiegészítésével történt. A LL szinkron emésztődése érdekében az állatból eltávolított máj retrográd kollagenáz-perfúziója a suprahepaticus *vena cava inferior* irányából bevezetett üvegkanulón át adagolt Earl's balanced salt solution (EBSS) segítségével történt, első lépésben Ca^{2+} -kelátor (EGTA) hozzáadásával, majd második lépésben ennek eltávolításával, végül harmadik lépésben Ca^{2+} ionok, és IV-es típusú kollagenáz 5 percen át tartó (*Clostridium histolyticum* kivonat, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Egyesült Államok) alkalmazásával (14. ábra). Az átvágott *vena portae* mellett, preoxigenizált, 37°C-ra előmelegített perfúziós oldatokkal kivitelezett 30 ml/min áramlási sebességű, a teljes máj elhalványodásához vezető perfúzió során a végpontot a szöveti felszínnek emésztődése, valamint a májat körülvevő hártya (Glisson-tok) máj felszínétől való elválása jelentette hozzávetőlegesen 5 perc után. A LL és NLL elkülönítését, fizikai manipulációját, valamint „tripánkék-kizárás” meghatározását követően csupán a 90%-ot meghaladó életképességű hepatocita szuszpenziókból készültek sejt kultúrák 6- (2×10^6 sejt/kút), illetve 24 kutas ($0,36 \times 10^6$ sejt/kút) lemezeken, 5% (magzati) borjúsérum, 0,1 μM inzulin, 0,05 μM glukagon, 0,05 mg/ml gentamicin, 30 nM Na_2SeO_3 , és 0,1 μM dexametazon tartalmú William's Medium E hozzáadásával. 24 órát követően a borjúsérum médiumból elhagyása történt. A párasított környezetben, 37°C-os hőmérsékleten, 5% szén-dioxid és 95% körlevegő keverékén inkubált sejteket 24 órát követően 2 ml, inzulint, glukagont, gentamicint, dexametazont és Na_2SeO_3 -t is tartalmazó, jéghideg William's Medium E-ben oldott 0,25 ml/ml koncentrációjú „matrigel basement membrán mátrix”-szal (Matrigel Matrix; SoftFlow Hungary, Pécs, Magyarország) fedték. A sejt kultúra-médiум cseréje 24 óránként történt.



14. ábra A máj ex vivo kollagenáz perfúziója. A retrográd, többfázisú ex vivo májperfúzió, ill. kontrollált kollagenáz-emésztés mérési elrendezése vízfürdővel, pumpával, illetve oldat oxigenációval (A). *Vena portae* ligatúrát követő reprezentatív időpontokban [24. óra (B), 48. óra (C), 72. óra (D), ill. 336h. óra (E)] végzett perfúziók illusztrációja a lekött- és nem-lekött lebenyek eltérő morfológiai- és színváltozásaival.

3.3.2.2. Immunfluoreszcencia

Terminálást követően a LL és NL állományából (állatonként) identikus anatómiai lokalizációkból eltávolított, majd folyékony nitrogénben fagyasztott szövetmintákból kriomikrotóm segítségével fagyasztott metszetek készültek. A májregeneráció kitüntetett időpontjaiból (kontroll – kiindulási viszonyok; 72. óra – átmeneti fázis; 336. óra – végállapot) származó fagyasztott metszetek, valamint 72 órája *in vitro* sejt kultúrában lévő sejtek fixálását, permeabilizálását és blokkolását követően Bsep, Ntcp (mindkét antitest Bruno Stieger szívességéből, University Hospital Zürich, Zürich, Svájc), Mrp2 (George Scheffer szívességéből, Free University Medical Center, Amsterdam, Hollandia) és a tight-junction protein ZO-1 (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, Egyesült Államok) ellenes primer antitestekkel való inkubációja történt. Mosást követően a minták jelölése fluorofór-konjugált másodlagos anti-kecske, anti-nyúl, illetve anti-patkány antitestek (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok),

illetőleg a sejtmagok jelölése 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) hozzáadásával történt. A jelölt, sejt kultúrában lévő hepatociták, illetőleg fagyasztott májmetszetek piros, zöld és kék immunfluoreszcens jeleinek felvételei széles látóterű-, illetőleg konfokális mikroszkópia (Leica, Wetzlar, Németország) segítségével készültek. A minták negatív kontroll vizsgálata céljából a primer antitesteknek az immunfluoreszcens reakció protokolljából való elhagyásával történt. Az immunfluoreszcens felvételek kiértékelése ImageJ 1.51 h szoftver segítségével történt (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, Egyesült Államok).

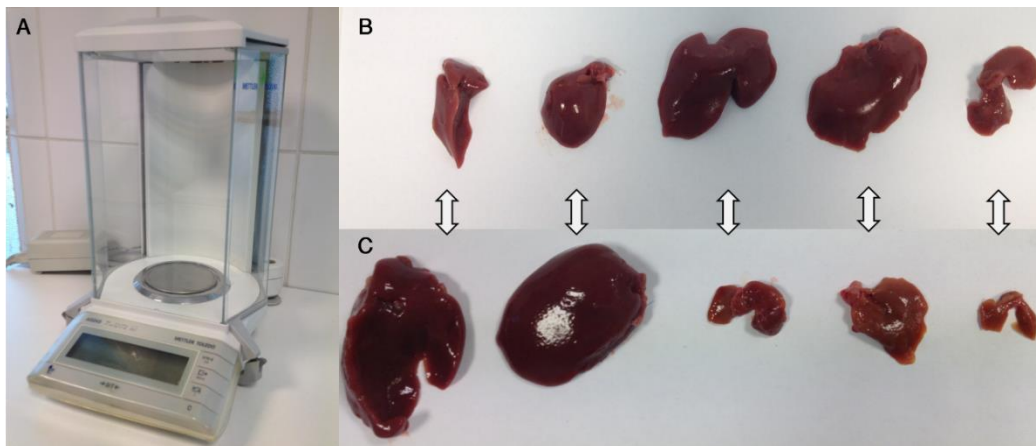
3.3.2.3. *In vitro* taurokolát és bilirubin transzport analízis

A bilirubin és taurokolát *in vitro* transzportjának vizsgálata 72 órával a sejt kultúrák létrehozása után, az érintkező sejtek közötti funkcionális epekanalikusok kialakulását követően történt a korábban publikált módszerekkel összhangban^{125, 127}. A bilirubin transzport vizsgálata során a sejt kultúrák 10 μM bilirubint tartalmazó Hank's balanced salt solution (HBSS) oldatban 5 percig tartó inkubációját, majd mosást követően egy 10 perces efflux periódus következett standard, illetve $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -mentes HBSS oldatban, azaz megtartott, valamint permeabilis tight-junction funkció mellett. A sejtek acetonnitril/víz oldattal végzett lízisét követően mind a sejt lizátum, mind az efflux médium bilirubin-, illetve bilirubin-monoglukuronid (BMG) és bilirubin-diglukuronid (BDG) tartalmának meghatározása nagyteljesítményű folyadék kromatográfiával (high-performance liquid chromatography, HPLC) történt. Ezek alapján végeztük a bilirubin bazolaterális felvételének, valamint kanalikuláris- és szinusoidális exportjának, valamint intracelluláris akkumulációjának meghatározását. A taurokolát transzport vizsgálatának módszere a bilirubinéhoz nagymértékben hasonló volt, ugyanakkor ez esetben a szubsztrát biztosítása 1 perces 1 μM ^3H -taurokolát expozícióval, míg a sejtek lízise 0,5% Triton X-100 tartalmú foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldattal, a sejt lizátum és az efflux médium taurokolát tartalmának meghatározása pedig folyadék szcintigráfia segítségével történt.

3.3.3. *In vivo* vizsgálatok

3.3.3.1. Máj tömeg és májvolumen

A szöveti mintavételi csoportban az epegyűjtést és vérvételt követően eltávolított LL és NLL „nedves” tömege konvencionális laboratóriumi mérleggel (AG 245, Mettler-Toledo LLC, Columbus, Ohio, Egyesült Államok) került meghatározásra (15. ábra). A „MEB” sorozatmérésű csoportban a ^{99m}Tc -mebrofenin HBS után MRI volumetria vizsgálat [koronális T1-súlyozott „gradient echo sequencing”, 128 db 0.4 mm szeletvastagságú axiális szelet (nanoScan PET/MRI; Mediso Ltd., Budapest, Magyarország)] segítségével LL és NLL térfogatának meghatározása történt az egyes szeleteken LL és NLL területeinek manuális kijelölésével, valamint ezek háromdimenziós rekonstrukciójával egy 160*160 pixeles mátrixban (16. ábra). A tömeg, illetve térfogati értékek a testtömeg függvényében kerültek megadásra.



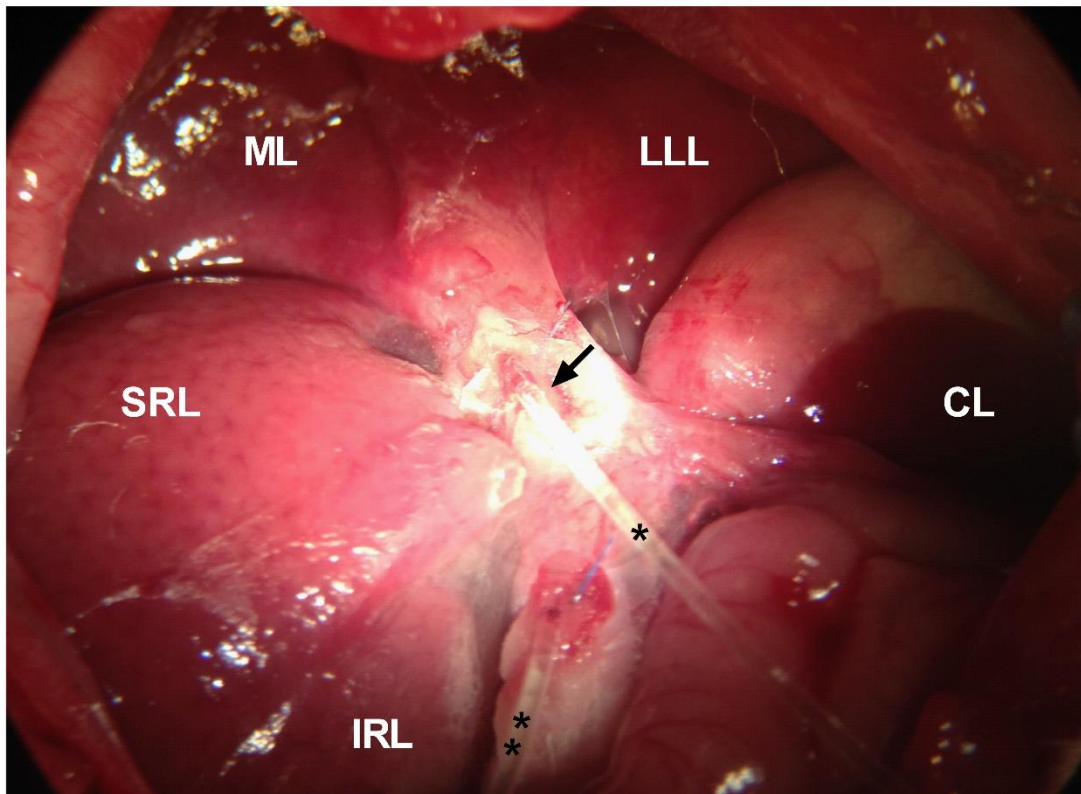
15. ábra Máj tömegek mérése. A tömegméréshez használt laboratóriumi mérleg (A). Az egyes májlebenyek (balról jobbra sorban: alsó RLL (IRL), felső RLL (SRL), ML, LLL, CL) morfológiájának illusztrációja a 0. (B) és a 336. (C) órákban.



16. ábra Májvolumenek mérése. A máj volumetriához használt PET/MRI készülék (bal kép), és az inhalatív izoflurán anesztézia mellett kivitelezett mérés (jobb kép).

3.3.3.2. Epeszekrécio vizsgálata

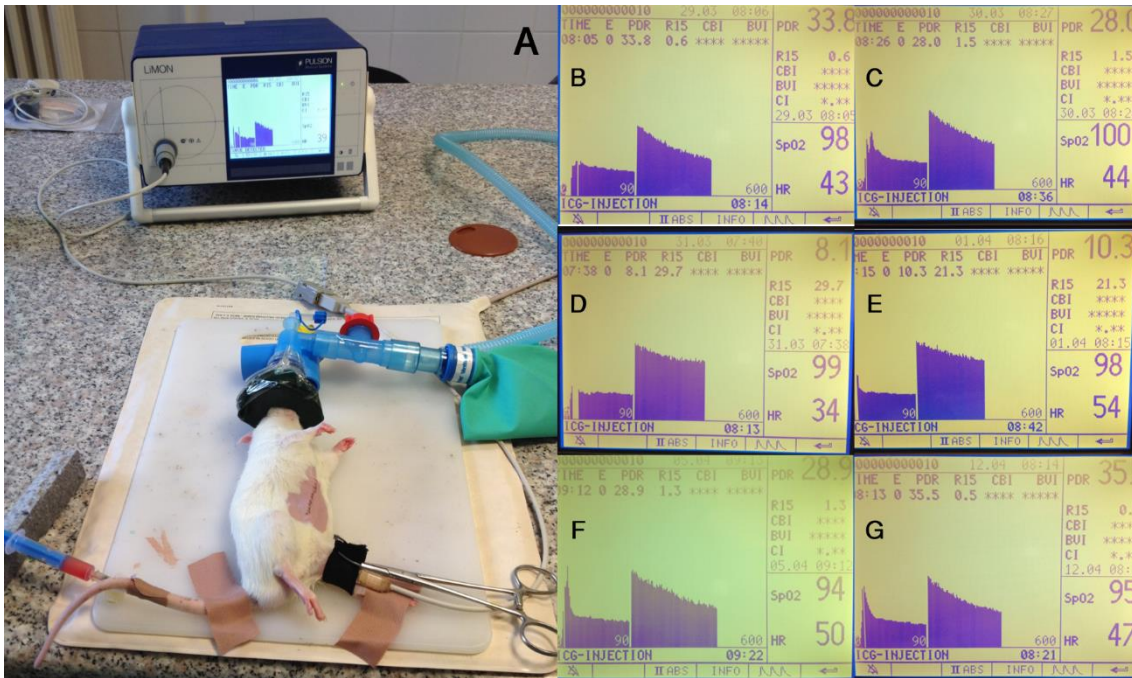
A szövetmintavételi csoportban szérumszám- és epeminták vételezése történt. Medianlaparotomiát követően a LL és NLL szelektív epeúti drenázsát végeztük az anatómiaiailag megfelelő epeúti szakaszokba - operációs mikroszkóp ellenőrzés mellett - szelektíven bevezetett, fixált 1,8F polietilén kanülök (PE10, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, Egyesült Államok) segítségével⁸⁴ (17. ábra). A LL és NLL által 40 perc alatt elválasztott epe laboratóriumi mérleggel (AG 245, Mettler-Toledo LLC) (17. ábra) megmért tömege az állat testtömegének függvényében került kifejezésre. Továbbá, az állat terminálása során nyert vérből rutin laboratóriumi technikákkal citrát-antikoagulált szérumminták készültek. Mind az epe-, mind a szérumminták konjugátlan- (UCB), illetve konjugált bilirubin (BG) tartalma meghatározásra került HPLC segítségével.



17. ábra A lekötött- és nem-lekötött lebenyek szelektív epeúti kanülálása és drenázsa. A LL (ML, LLL, CL) epeúti drenázsa ML, LLL és CL lebenyek anatómiailag korrespondáló, közös epeútjába (nyíl) fixált miniatűr kanül (*) bevezetésével, míg NLL drenázsa a (kraniálisan lekötött) ductus choledochus kanülálásával (**) történt.

3.3.3.3. Indocián-zöld clearance teszt

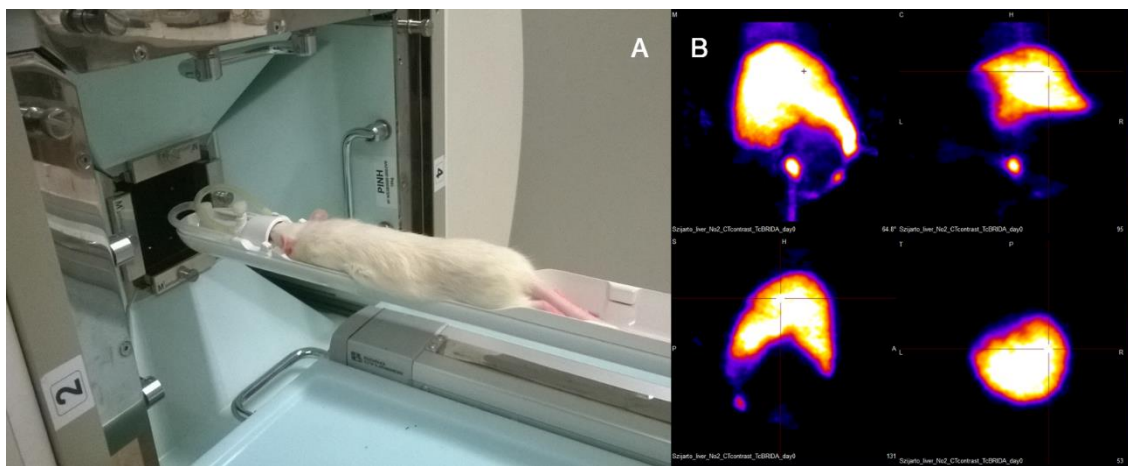
Az ICG-clearance teszt elvégzése munkacsoportunk megelőző gyakorlatának⁸⁴ módosításával történt. A háton fekvő állat belső combjának borotvált felszínére rugalmas szövetcsík segítségével egy spektrofotometriás, non-invazív neonatális szenzor (PV50200; PULSION Medical Systems, Feldkirchen, Németország) került felhelyezésre, mely egy kereskedelmi forgalomban elérhető, az ICG-clearance vizsgálatra specializált analitikai és megjelenítő egységhez (PC5000 LiMON; PULSION Medical Systems) csatlakozott. Kalibrációt követően a teszt elvégzéséhez az állat laterális farokvénájába vezetett branülön keresztül 1 ml/ttkg 1,5 mg ICG/ml desztillált víz került befecskendezésre. Az eszköz 5-6 perces eliminációs periódust követően határozta meg az ICG plazma eltűnési hányadosát (PDR), illetve 15 perces retenciós értékét (retention at 15 min, RT15) (18. ábra).



18. ábra Indocián-zöld clearance teszt. Mérési elrendezés (A): inhalatív izoflurán anesztézia mellett a borotvált belső comb bőrén fixált non-invazív mérőfej; a standard mennyiségű ICG injektálása laterális farokvénán át történt. A műszer által mért az ICG elimináció dinamikájának regisztrátumai az egyes posztoperatív időpontokban [kontroll (B), 24. óra (C), 48. óra (D), 72. óra (E), 168. óra (F), 336. óra (G)], illetve a kalkulált eliminációs- (PDR), és retenciós (RT15) értékek (jobb felső sarkok).

3.3.3.4. Planáris dinamikusan ^{99m}Tc -hepatobiliáris szcintigráfia

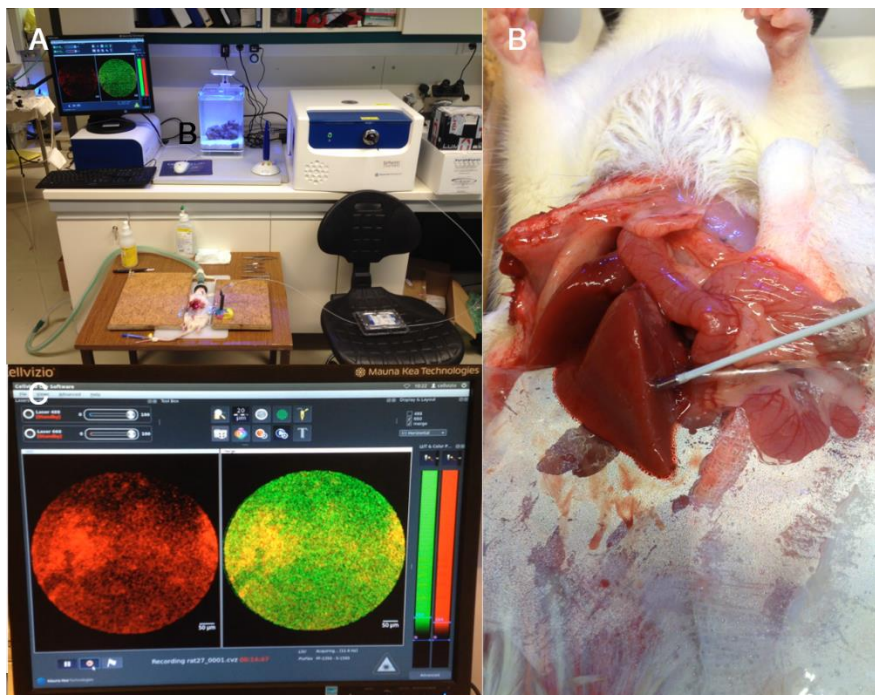
0,3 ml fiziológiás sóoldatban 150 MBq dózisu ^{99m}Tc -mebrofenin [Bromo-Biliron radiofarmakológiai kit (Medi-Radiopharma Ltd., Budapest, Magyarország) és ^{99m}Tc izotópok (Ultra-Technekow Technetium Generator, Mallinckrodt Medical, Petten, Hollandia) kombinációja] laterális farokvénán át történő beadását követően planáris HBS (NanoSPECT/CT Silver Upgrade, Mediso Ltd., Budapest, Magyarország) történt „parrallel septal ultrahigh-resolution” kollimátor (NanoSPECT-UHR, Mediso Ltd, Budapest, Magyarország) segítségével 256*256 pixeles felbontással 4 projekciós síkban. A tracer gyors felvételének és kanalikuláris leadásának mérése céljából alkalmazott három fázisú dinamikus protokoll során percenként 20, 6, ill. 2 felvétel készült egyenként 2, 4, ill. 35 percen át. A felvételek kiértékelése a szív, LL és NLL, valamint duodenum projekcióinak megfelelően elhelyezett elliptikus ROI-k intenzitás görbéinek kiértékelése alapján történt, mely során a meghatározásra került a radiofarmakon vér felezési ideje ($B_{1/2}$), első duodenalis megjelenése (D_{START}), valamint LL és NLL régióspecifikus mérőszámai, úgymint csúcsintenzitás (PC) ideje (T_{MAX}), csúcsintenzitás felezési ideje ($T_{1/2}$), illetve a LL és NLL csúcsintenzitásainak az egyidejű vérintenzitásra vonatkoztatott hányadosa (relatív csúcsintenzitás, RC) (19. ábra).



19. ábra Planáris dinamikusan ^{99m}Tc -mebrofenin hepatobiliáris szcintigráfia (HBS). Mérési berendezések (SPECT/CT, ill. UHR kollimátor) és mérési elrendezés (A): inhalatív izoflurán anesztézia mellett a ^{99m}Tc -mebrofenin radiofarmakon injektálása laterális farokvénán át történt. A planáris HBS során három dinamikus fázisban került rögzítésre a vér (mediastinum), LL és NLL, illetve a duodenum aktivitása, melyek reprezentatív megjelenítése színekódolással is történhet (B). A funkcionális analízis a manuálisan kijelölt ROI-k aktivitásgörbéi alapján származtatott paraméterek alapján történt.

3.3.3.5. Konfokális lézer endomikroszkópia

Medianlaparotomiát követően az NLL jobb alsó lebenyének („inferior right lobe”) atraumatikus mobilizálása, valamint stabilizálása történt a légzőmozgások mérséklése céljából egy hozzávetőlegesen a medianaxilláris sík magasságában rögzített műanyag fólián. Ezt követően a lézer eszköz (Cellvizio, MaunaKea Technologies, Párizs, Franciaország) endoszkópos vezetőjének érzékelő fejét atraumatikus módon a lebeny medialis felszínéhez nyomva fixáltuk. Laterális farokvénán át 1 ml/ttkg 1,5 mg ICG/ml desztillált víz befecskendezését követően intermittáló fény excitáció, illetve regisztráció (a kifehéredési effektus elkerülésére 10 másodpercenként 3 felvétel) mellett 40 perces „time-lapse” videót rögzítettünk (20. ábra). A felvétel 10, manuálisan kiválasztott területének („region of interest”, ROI) intenzitásbeli változásainak grafikonos ábrázolását követően exponenciálisan növekvő, illetve csökkenő karakterisztikát alapul vevő görbeillesztési módszer segítségével meghatározásra kerültek az NLL ICG felvételét- (csúcshintenzitás ideje, T_{MAX}), illetve leadását (csúcshintenzitás felezési ideje, $T_{1/2}$) jellemző paraméterek.



20. ábra Konfokális lézer endomikroszkópia (CLE). Mérési elrendezés (A): inhalatív izoflurán anesztézia; medianlaparotomia után az optikai vizsgálofej elmozdulás mentes stabilizálása a NLL alsó lebenyén (IRL) (B), majd standard mennyiségű ICG injektálása a laterális farokvénán bevezetett branülön át. 40 perces „time-lapse” felvétel (C) és vizualizációja, lehetővé téve a májacinusokra manuálisan elhelyezett ROI-k intenzitásgörbéi karakterisztikájának vizsgálatát.

3.4. II. kísérlet – Májfunkció a drogmetabolizmus tükrében

Második kísérletünk keretében a májfunkció (CitokrómP450 enzimek mediálta) gyógyszer metabolizáló aspektusát helyeztük vizsgálatunk középpontjába.

3.4.1. Csoportbeosztás

A kísérlethez felhasznált állatokat (n=24 db) hat csoportba osztottuk tervezett túlélési idejük szerint (2. Táblázat). A PVL-től, illetve bármiféle műtéti beavatkozástól megkímélt „natív” kontroll csoportban (n=4 db) azonnal, míg a további öt csoportban (n=4-4 db) a PVL-t követő 24/48/72/168/336. órában *in vivo* funkcionális pentobarbital sleeping tesztet végeztünk, mely végeztével az állat exszanguinációja és szöveti mintavétel történt.

2. Táblázat. Csoportbeosztás - II. kísérlet. A felhasznált 24 db Wistar patkányt hat időpont terminálás elrendezésű csoportba osztottuk, vizsgálatunkat a 0 (kontroll)/24/48/72//168/336. órában végeztük. A kontroll csoportban *vena portae* ligatúra (PVL) nem történt, míg a „pentobarbital sleeping teszt” minden csoportban elvégzésre került, melyet követően az állatokat termináltuk.

Csoport	Állatszám	PVL	Sleeping test	Mintavétel
Kontroll	n=4	-	azonnal	időpont terminálás
24h	n=4	+	24. óra	időpont terminálás
48h	n=4	+	48. óra	időpont terminálás
72h	n=4	+	72. óra	időpont terminálás
168h	n=4	+	168. óra	időpont terminálás
336h	n=4	+	336. óra	időpont terminálás

3.4.2. Pentobarbital sleeping teszt

A drogmetabolizmus, illetve a máj CYP enzimei globális funkciójának *in vivo* megítélésére „pentobarbital sleeping” teszt keretében meghatározásra került az egyszeri pentobarbital injekcióval (30 mg/ttkg pentobarbital 1 ml fiziológiás sóoldatban ip. beadva) indukált „alvási idő” hossza¹²⁸. Ennek kezdeteként a háton fekvő állat ösztönös oldalra fordulási reflexének („righting reflex”) elvesztését, míg végeként a reflex spontán visszatérését definiáltuk.

3.4.3. Máj tömeg

Exszanguinációt és terminálást követően LL és NLL májlebenyek, valamint teljes máj (TMT) tömegeinek meghatározása, illetve kifejezése az I. kísérlet keretében leírtakkal egyezően, laboratóriumi mérleg segítségével történt.

3.4.4. Mikroszóma preparálás és *in vitro* citokróm P450 enzimaktivitás meghatározás

LL és NLL szövetmintái első lépésben 1 mM EDTA-t és 154 mM KCl-t (Reanal Finechemicals Co., Budapest, Magyarország) tartalmazó 0,1 M Tris-HCl pufferben (pH: 7,4) homogenizálásra kerültek. A máj eredetű mikroszómák preparálása differenciált centrifugálással történt, első lépésben a homogenizátum 30 percen át 10.000g-vel történő centrifugálásával. A felülúszó (S9) frakció 105.000g-n 1 óráig tartó centrifugálását követően a pelletet újfent 0,1 M Tris-HCl-ben szuszpendálva az előzőhöz hasonló paraméterekkel ismételt centrifugálás, majd a mikroszómális frakció -80°C-on tárolása történt a további vizsgálatokig. A máj mikroszómák fehérje tartalmának meghatározása standardként bovin-szérum albumin (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, Németország) felhasználásával történt Lowry és mtsai. módsere szerint¹²⁹. A CYP-szelektív enzimaktivitások meghatározása az irodalomban publikált módszerek szerint történt, CYP1A enzimek tekintetében az ethoxyresorufin O-deetiláció¹³⁰, CYP2B esetén a pentoxyresorufin O-dealkiláció¹³⁰, CYP2C esetében a tolbutamid 4-hidroxiláció¹³¹, míg CYP3A kapcsán a midazolam 1'- és 4-hidroxiláció vizsgálatával¹³². A reakcióelegy egy NADPH-generáló rendszert (1 mM NADPH, 10 mM glükóz 6-foszfát, 5 mM MgCl₂ és 2 nemzetközi egység/ml glükóz 6-foszfát dehidrogenáz), a patkány májból preparált mikroszómákat, illetve az adott esetben vonatkozó, CYP enzim(al)család-specifikus szubsztrátokat (CYP1A: ethoxyresorufin; CYP2B: pentoxyresorufin; CYP2C: tolbutamid; CYP3A: midazolam) tartalmazta. Az inkubációs periódus leállítását a 60. percben jéghideg metanol, vagy acetonitril hozzáadásával történt, melyet követően HPLC-t végeztünk az irodalomból ismert módszerek alkalmazásával^{131, 132}. A resorufin fluoreszcenciája 550 nm gerjesztési- és 589 nm emissziós hullámhosszok mellett került mérésre¹³⁰. Végül, a [pmol metabolizált termék/(mg mikroszómális fehérje*perc)] formátumban megadott, „intrinsic” mikroszómális enzimaktivitások meghatározása mellett az enzimaktivitások májlebeny tömegekkel való súlyozását követően

extrapoláltuk LL és NLL teljes CYP alcsalád aktivitásait is, melyet relatív egységekben tüntettünk fel (kontroll érték adott százaléka).

3.4.5. Citokróm P450 RNS izolálás és kvantitatív “real-time polymerase chain reaction”

A májminták teljes RNS tartalmának a gyártó utasításait mindenkor követő izolálását (TRI reagent, Molecular Research Center Inc., Ohio, Egyesült Államok) követően azok tisztasága, illetve koncentrációja spektrofotometriás módszerrel (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) került meghatározásra. Egységnyi mennyiségű (3 µg) RNS egyszálú cDNS-t eredményező reverz-transzkripcióját (Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Fisher Scientific Inc.) követően RT-PCR-t végeztünk (Maxima SYBR Green qPCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific Inc.) a megfelelő CYP izoformákra - CYP1A2, CYP2B1, CYP2B2, CYP3A1, CYP2C6, CYP2C11, CYP2C13 (3. Táblázat) - specifikus primerek alkalmazásával, mely során a a célgén mRNS-ének mennyiségét relatív egységekben, a hipoxantin foszforibozil-transzferáz (HPRT) „housekeeping gén” mRNS-e mennyiségének függvényében adtuk meg¹³³.

3. Táblázat. Primer szekvenciák. A „real-time quantitative polymerase chain reaction” (RT-PCR) vizsgálat során alkalmazott, Citokróm P450 (CYP) enzimekre és a hipoxantin foszforibozil-transzferáz (HPRT) enzimre vonatkozó „forward” és „reverse” primerek bázispár (bp) szekvenciáinak listája.

Gén	5'→3'szekvencia	Primerek	Amplikon (bp)
CYP1A2	Forward	CCTACAACCTCTGCCAGTCTCC	89
	Reverse	AGTAGCAGCTCTGGGGCTAA	
CYP2B1	Forward	CTCCTCGTGGGCTTCTTGTT	149
	Reverse	TCTCGAAGCTGCATGAAGGAA	
CYP2B2	Forward	TGCATGGATGAGAGAGGAGAAG	134
	Reverse	TGAGCAGGAAACCATAGCGG	
CYP2C6	Forward	AGCAGTCCCTGGACACAGTT	205
	Reverse	TGTGATTTTCCTGCTTCCACTT	
CYP2C11	Forward	TGTTTGGAGCTGGCACAGAA	88
	Reverse	ACTTTAGCTGTGACATCCACG	
CYP2C13	Forward	TTCTCAGCAGGAAAACGGATGT	169
	Reverse	GGAAAGTGGGAGGAACTGAAGAA	
CYP3A1	Forward	ACCAGCAGCACACTTTCCTT	106
	Reverse	GAGGTGCCTTATTGGGCAGA	
HPRT	Forward	CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC	123
	Reverse	GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC	

3.4.6. Immunhisztokémia

A LL és NLL állományából (állatonként) egyező helyekről vett májmintákból rutin eljárások segítségével formalin-fixált-paraffinba ágyazott szöveti blokkok készültek, melyekből mikrotóm segítségével 3-5 µm vastagságú metszetek vágása, illetve azok deparaffinálása (EZ Prep 10x, F. Hoffmann-La Roche AG Konzern, Basel, Switzerland) és rehidrálása történt. Az antigén feltárás 30 percen át zajlott egy speciálisan immunhisztokémiai automatákban végzett reakciók céljára kifejlesztett oldattal (Cell Conditioning 1, Ventana Medical Systems, F. Hoffmann-La Roche AG Konzern). Ezt követően standard, tormaperoxidáz-diaminobenzidin kromogén alapú immunhisztokémiai reakciót (IHC) végeztünk egy speciális immunhisztokémiai

automatában (BenchMark ULTRA, Ventana Medical Systems, F. Hoffmann-La Roche AG Konzern), mely során poliklonális, CYP3A1 ellenes nyúl antitestek (BML-CR3310-0025; Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, New York, Egyesült Államok) 1:1000 hígítású, 32 perces alkalmazása történt 42°C-on a gyártó instrukcióinak követésével. Kiegészítő hematoxylin festést követően végül a metszetek scannelése, illetve digitalizálása történt.

3.5. Statisztikai analízis

Az adattömbök eloszlását Shapiro-Wilk normalitási tesztek segítségével vizsgáltuk. A mindenkor normál eloszlásúnak bizonyuló adatok megjelenítése átlag \pm standard hiba formátumban történt; statisztikai analízisük során parametrikus kétutas varianciaanalízist („two-way ANOVA”) végeztünk, míg az egyes csoportok összehasonlítása Bonferroni *post hoc* teszt segítségével történt. A parametrikus adatok korrelációja Pearson féle korrelációs teszttel történt. Statisztikailag szignifikáns különbség a 0,05-öt meg nem haladó P-értékek esetén került megállapításra. Az adatok megjelenítése, rendezése, statisztikai analízise és grafikai ábrázolása a GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, California, Egyesült Államok) és Origin (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, Egyesült Államok) számítógépes szoftverekkel történt.

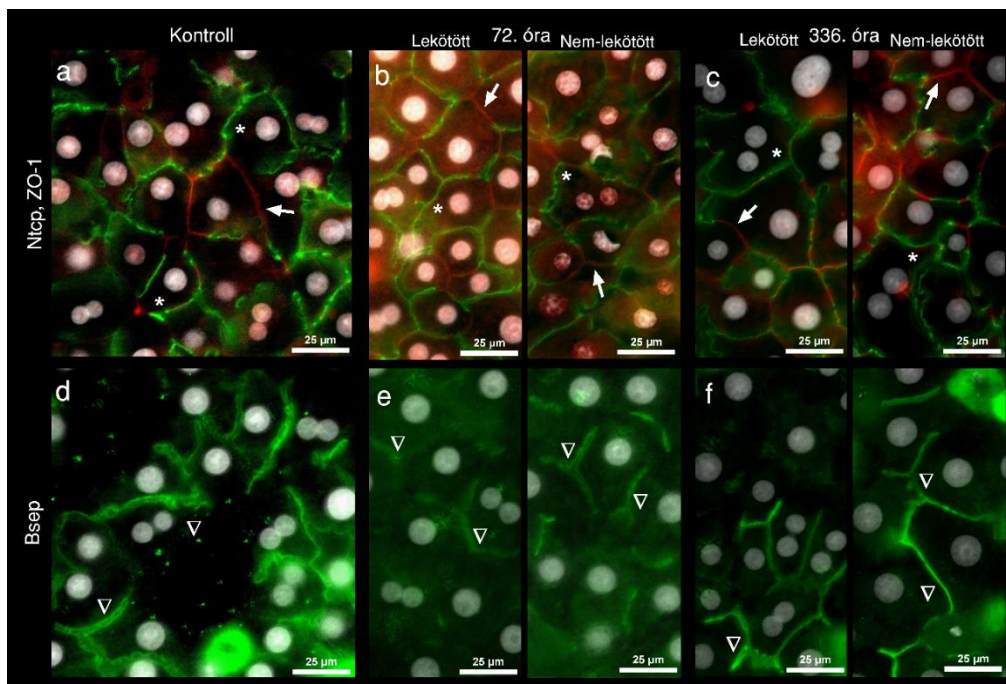
4. Eredmények

4.1. I. kísérlet – Májfunkció a szerves anion transzport tükrében

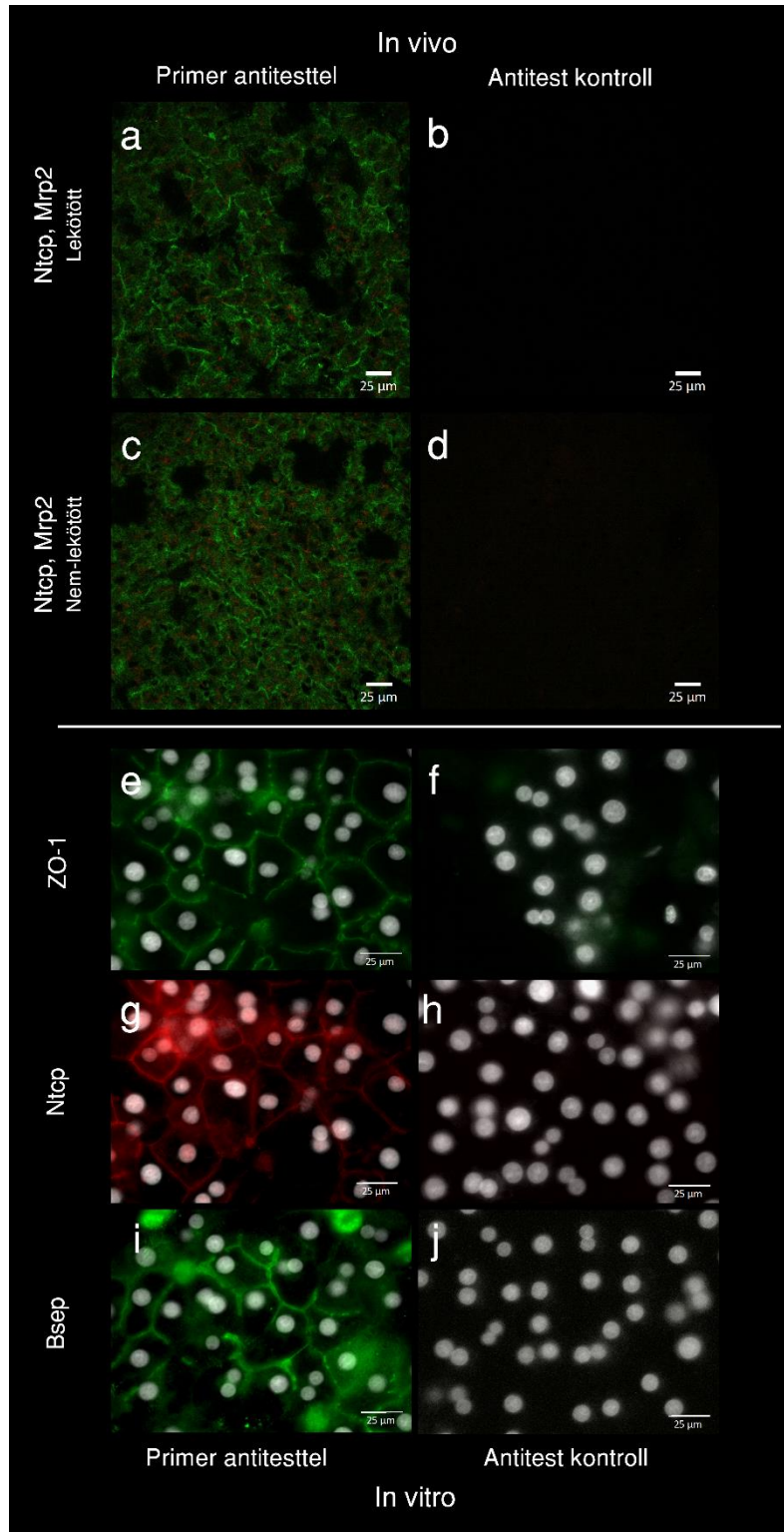
4.1.1. *In vitro* vizsgálatok

4.1.1.1. Sejtkultúra immunfluoreszcencia

A sejtkultúrák létrehozása során minden időpontban mindkét lebenyből jelentős, a minimálisan szükséges mennyiséget meghaladó életképes hepatocita (minden mintában több, mint 50 millió) került izolálásra. A sejtkultúrák ZO-1, Ntcp és Bsep immunfluoreszcens vizsgálata során mindkét lebenyből, bármely időpontban készült sejtkultúrákban fiziológiás morfológiát mutató, megtartott polarizációjú hepatociták voltak megfigyelhetők, melyek ezen túl a szabályos epeúti kanalikuláris struktúrák kialakítása mellett a kulcsfontosságú Ntcp és Bsep transzporterek megfelelő lokalizációjú expresszióját mutatták (21. ábra). A primer antitestek elhagyásával végzett antitest kontroll vizsgálatok *in vitro* és *in vivo* is specifikus kötődést tanúsítottak (22. ábra).



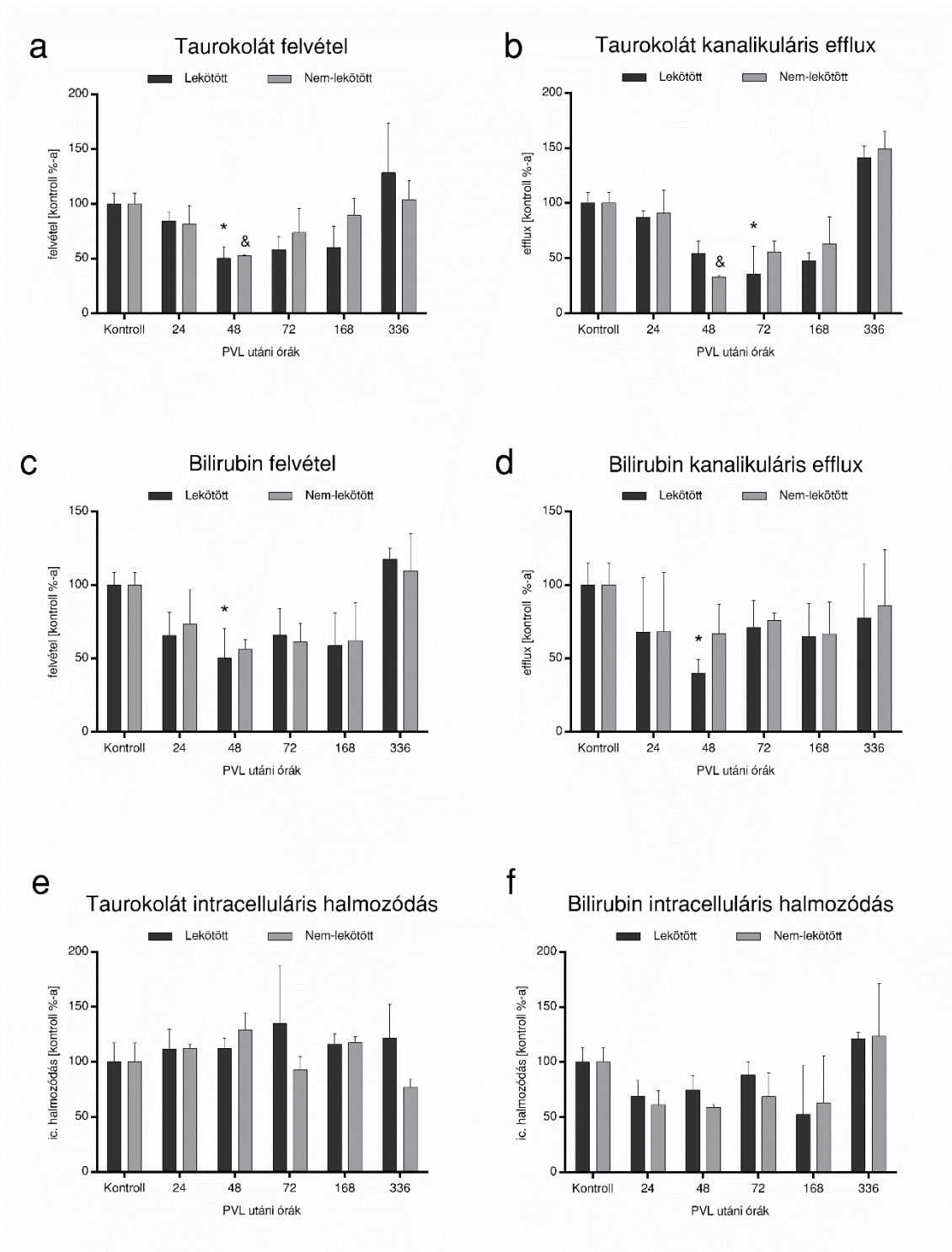
21. ábra Sejtkultúra immunfluoreszcencia. *Vena portae* ligatúrát követően a máj lekötött- és nem-lekötött lebenyeiből izolált hepatocitákból álló *in vitro* sejtkultúrákon végzett ZO-1 (zöld), Ntcp (piros) (a-c), valamint Bsep (zöld) (d-f) immunfluoreszcens vizsgálatok. A sejtmagok festése DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol)-val történt. Jelölés: „*”: ZO-1 pozitivitást mutató adekvát sejt-kapcsolatok; nyilak: Ntcp expresszió; „▽”: Bsep pozitivitást mutató, specifikus epekanalikulusok. A lépték 25 µm-t jelöl.



22. ábra Primer antitest kontroll vizsgálatok. A kísérlet során alkalmazott in vivo (a-d), illetve in vitro (e-j) immunfluoreszcens reakciók negatív kontroll vizsgálatai ZO-1, Ntcp, Bsep és Mrp2 ellenes primer antitestekkel (a, c, e, g, i), illetve azok elhagyásával (b, d, f, h, j). A lépték 25 μm-t jelöl.

4.1.1.2. Taurokolát és bilirubin transzport analízis

A sejt kultúrák *in vitro* funkcionális vizsgálata keretében végzett taurokolát transzport analízis során mindkét leány taurokolát felvétele és kanalikuláris leadása átmeneti szignifikáns csökkenést mutatott a 48-72. órákban. Hasonlóan, LL bilirubin felvétele és kanalikuláris leadása szintén átmenetileg szignifikánsan alacsonyabb volt a 48. órában. NLL bilirubin transzportja ehhez hasonló karakterisztikát mutatott, ugyanakkor a változások csupán tendenciózusnak bizonyultak. Mindezen transzport változások hatására a sejtek intracelluláris taurokolát és bilirubin tartalma változatlan maradt (23. ábra).



23. ábra In vitro taurokolát és bilirubin transzport. *Vena portae* ligatúrát követően a máj lekötött- és nem-lekötött lebenyeiből izolált hepatocitákból álló *in vitro* sejt kultúrákon végzett taurokolát (a, b, e), illetve bilirubin (c, d, f) transzport (felvétel, kanalikuláris leadás, intracelluláris felhalmozódás) vizsgálatok. Statisztikai analízis: kétutas ANOVA, Bonferroni *post hoc* teszt. Adatok megjelenítése: átlag ± szórás; n=5 állat/időpont. „*”, illetve „&”: p<0,05 aktuális lekötött-, illetve nem-lekötött vs. kontroll.

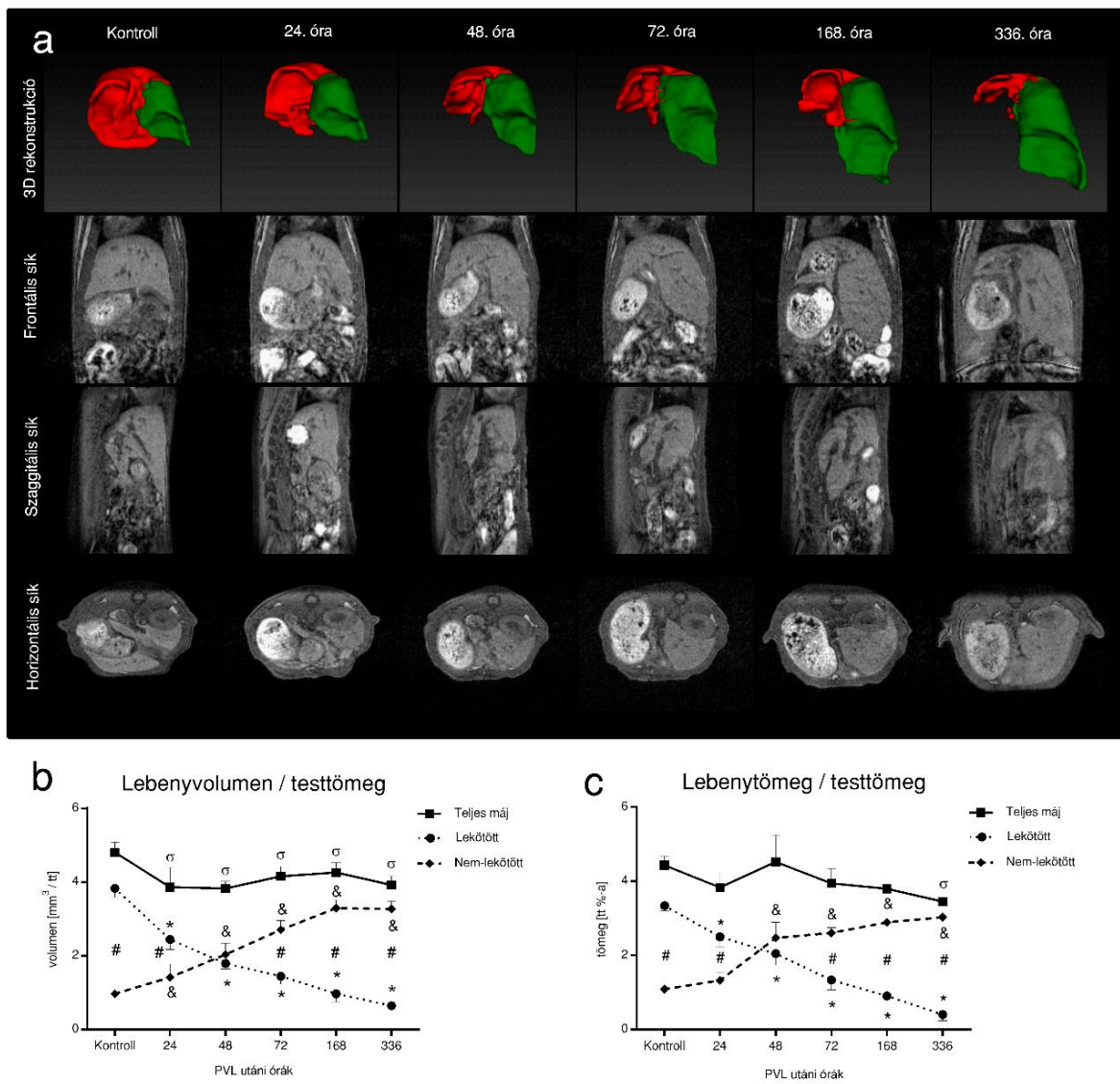
4.1.2. *In vivo* vizsgálatok

4.1.2.1. *Májtömeg és májvolumen*

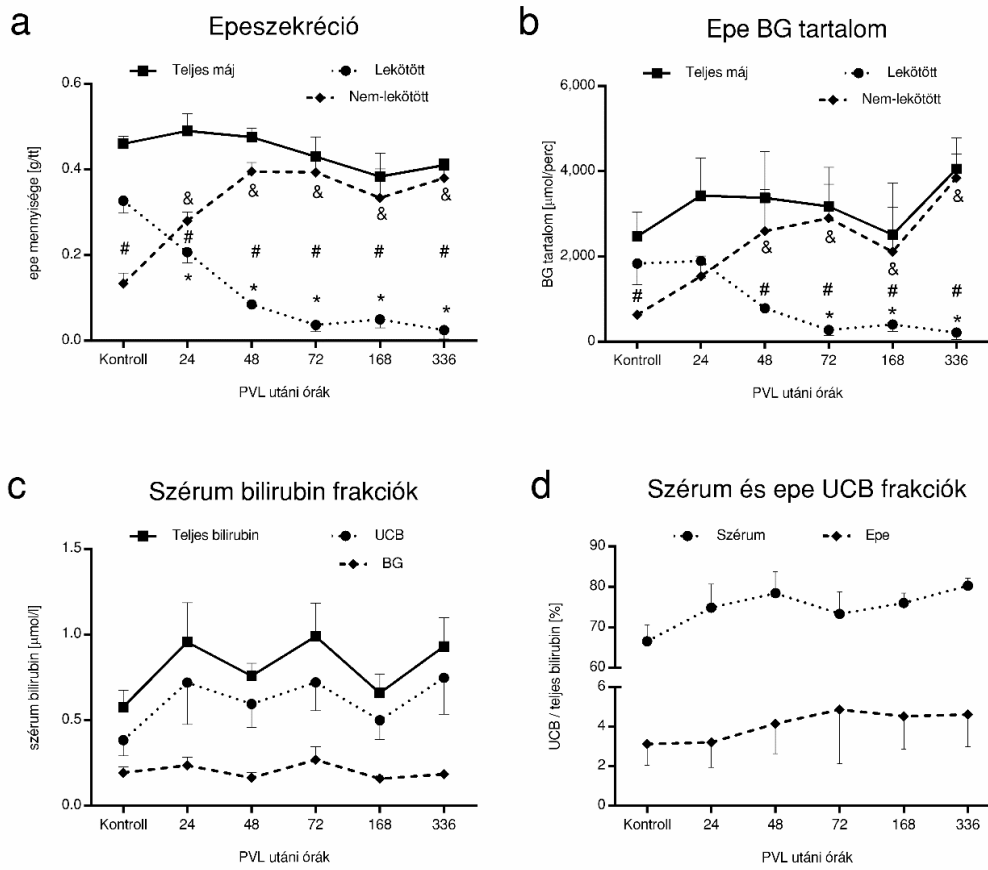
A morfológiai változások makroszkópos megítélése a májlebenyek tömeg- és térfogatváltozásainak mérésével történt. LL tekintetében progresszív atrófia, azaz lépcsőzetesen, szignifikánsan csökkenő májtömegek [$0,41 \pm 0,17\%$ (336. óra) vs. $3,41 \pm 0,14\%$ (kontroll)], míg NLL tekintetében szinkron, szignifikánsan növekvő lebenytömegekkel [$3,04 \pm 0,1\%$ (336. óra) vs. $1,09 \pm 0,1\%$ (kontroll)] járó, előremenő hipertrófia volt megfigyelhető, melyek hatására a teljes máj tömege érdemben nem változott. Ezzel párhuzamosan a mebifenin csoportban sorozat MRI-volumetriával mért LL és NLL májlebeny térfogatok változásai nagymértékben hasonlóak voltak, melynek megfelelően szignifikáns korrelációt (LL: $r = 0.976$; $p = 0.001$; NLL: $r = 0.96$; $p = 0.002$) mutattak a mért májtömegekkel (24. ábra).

4.1.2.2. *Epeszkréció vizsgálata*

A májlebenyek *in vivo* funkciójának alapvető vizsgálata LL és NLL szelektív epeúti drenázsra révén gyűjtött epe-, valamint szérumminták analízisével történt. Az elválasztott epe volumene, illetve annak BG tartalma párhuzamosan változva LL-ben progresszív csökkenést, míg NLL-ben progresszív növekedést mutatott, melyek hatására a máj összesített epe-, illetve BG szekréciója változatlan maradt. A szérumminták analízise alapján a szérum bilirubin frakcióinak (UCB, BG, teljes bilirubin) szintjei, valamint az UCB epemintákban és szérummintákban vett frakciói (UCB/teljes bilirubin) sem változtak szignifikáns mértékben (25. ábra).



24. ábra Máj tömeg és májvolumen. Az MRI-volumetria vizsgálat során nyert frontális, szagittális, horizontális felvételek, illetve azok alapján készített 3D rekonstrukciók a lekötött- (piros) és nem-lekötött (zöld) lebenyek jelölésével (a). A májlebenyek térfogat- (b), illetve tömegváltozásainak (c) számszerű vizsgálata. Statisztikai analízis: kétutas ANOVA, Bonferroni post hoc teszt. Adatok megjelenítése: átlag ± szórás; n=9 állat/időpont (a, b), illetve n=5 állat/időpont (c). „*”, „&”, „σ”: p<0,05 aktuális lekötött-, nem-lekötött, illetve teljes máj vs. kontroll. „#”: p<0,05 aktuális lekötött vs. aktuális nem-lekötött.

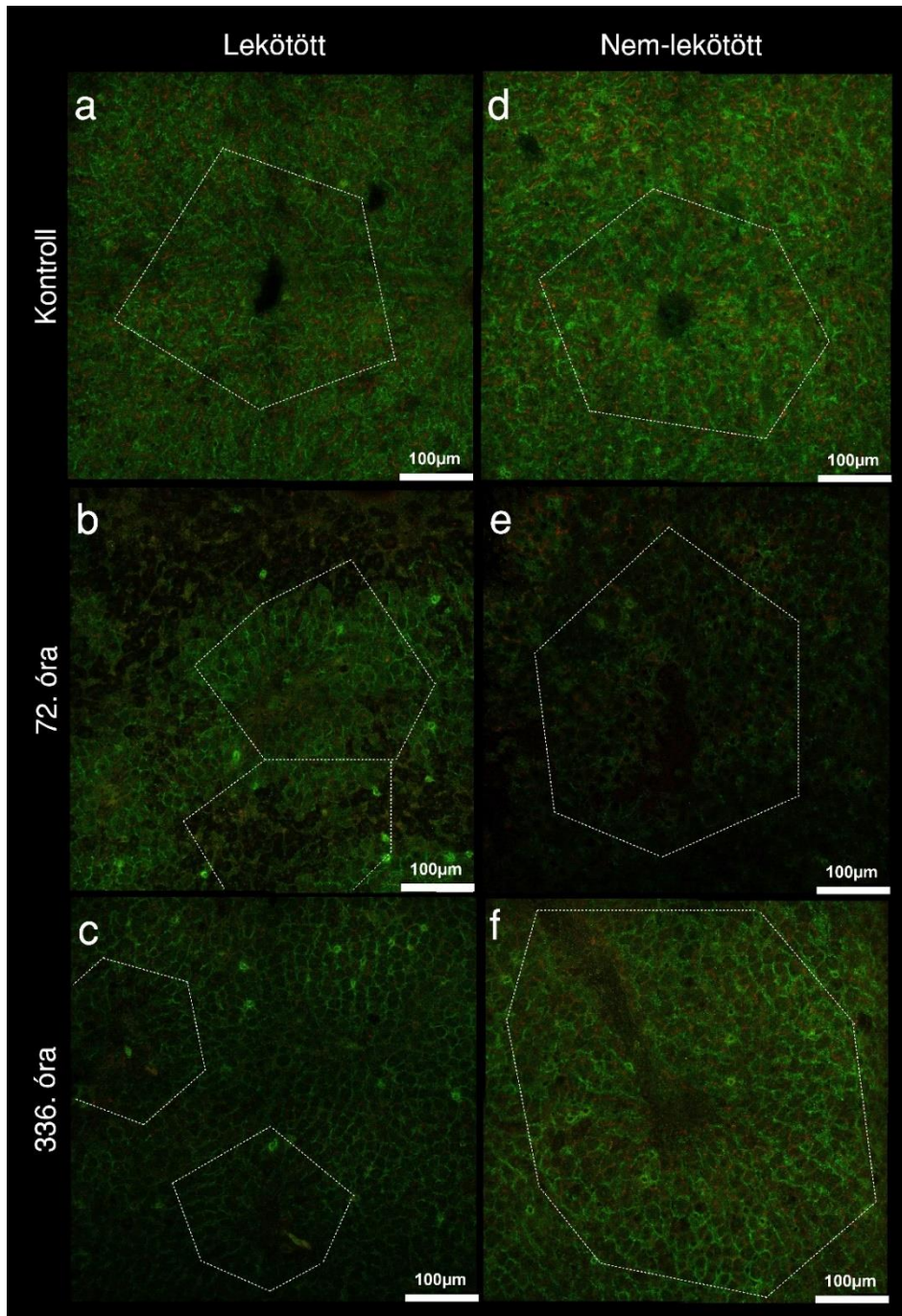


25. ábra Epeszekréción vizsgálata. *Vena portae* ligatúrát követően a máj lekötött- és nem-lekötött lebenyeinek epe- (a), konjugált bilirubin (BG) termelése (b); továbbá a szérum konjugátlan- (UCB), konjugált- és teljes bilirubin koncentrációi (c); illetve az UCB frakció százalékos megoszlása az epében és a szérumban (d). Statisztikai analízis: kétutas ANOVA, Bonferroni post hoc teszt. Adatok megjelenítése: átlag ± szórás; n=5 állat/időpont. „*”, „&”, „#”: p<0,05 aktuális lekötött-, illetve nem-lekötött vs. kontroll. „#”*: p<0,05 aktuális lekötött vs. aktuális nem-lekötött.

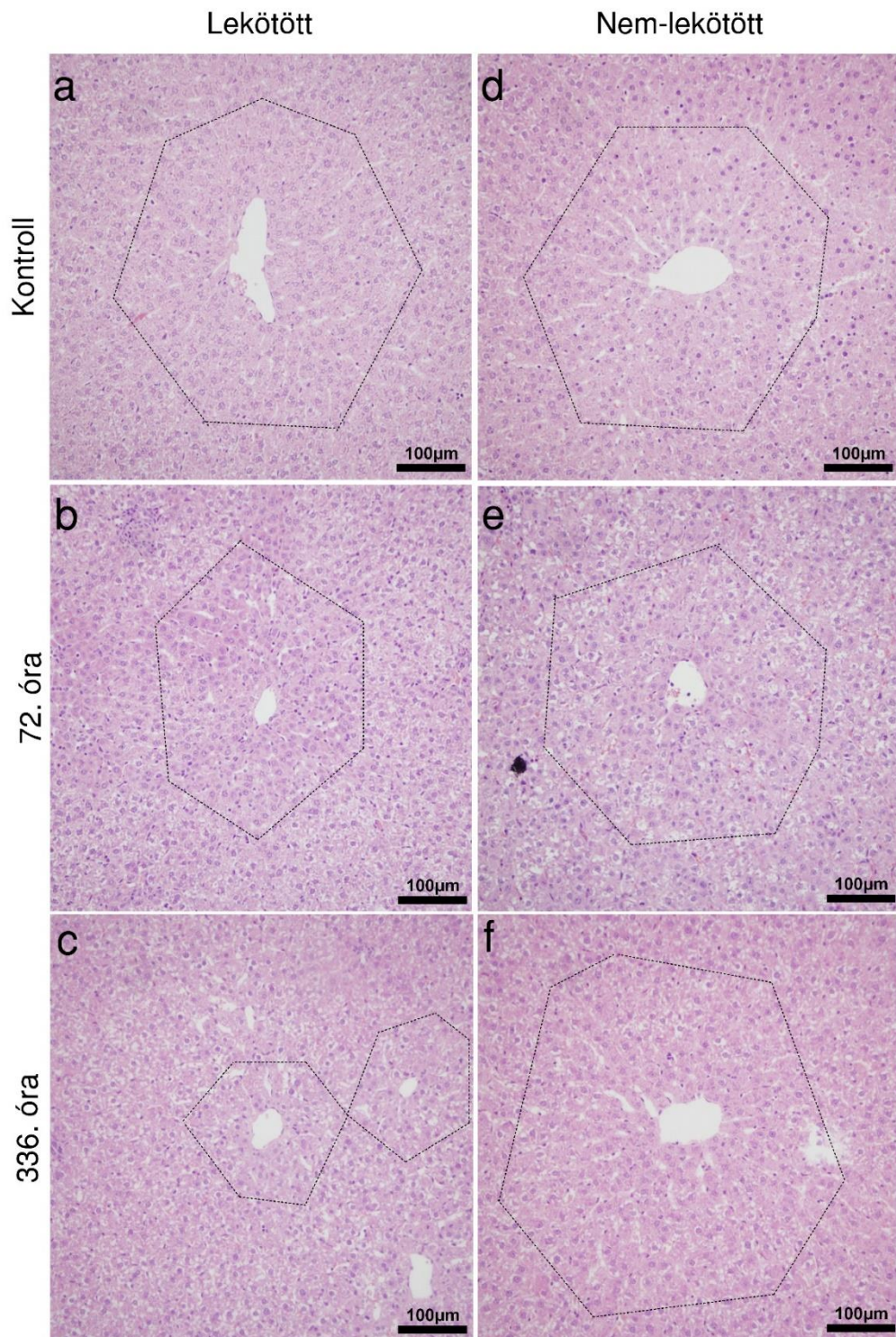
4.1.2.3. *In vivo* immunfluoreszcencia

A máj szerves aniontranszportjában kulcsszerepet játszó Ntcp és Mrp2 transzporterek *in vivo* lokalizációjának megítélése mindkét májlebenyből vett májmintákból készített fagyasztott metszetek immunfluoreszcens vizsgálata alapján történt. A kontroll állatokban LL és NLL egyformán megtartott acináris struktúrái és határai voltak megfigyelhetők, valamint fiziológiás, Ntcp esetén bazolaterális, Mrp2 esetén kanalikuláris transzporter expresszió. Ezzel szemben a 72. órában készült metszeteken LL-ben a transzporterek foltos, vélhetőleg nekroapoptotikus zónáknak megfelelő hiánya mutatkozott, míg NLL-ben foltos hiányok nem, ugyanakkor a transzporterek általánosan alacsonyabb kifejeződése volt megfigyelhető. Ezen, transzporter expressziókat érintő változások a 336. órára mindkét lebenyben helyreálltak,

ugyanakkor az acinusok jelentős méretbeli eltérése jött létre, így LL acinusai zsugorodottnak, míg NLL acinusai jelentősen megnagyobbodottak voltak (26. ábra). A morfológiai változások (nekroapoptotikus foltok, acinus méret) kiegészítő, reprezentatív hematoxilin-eozin festett, rutin szövettani metszeteken is láthatóak voltak (27. ábra).



26. ábra In vivo immunfluoreszcencia. Fagyasztott metszetek Ntcp (zöld), illetve Mrp2 (piros) immunfluoreszcens vizsgálata, kontroll, illetve *vena portae* ligatúrát követő 72. és 336. órában terminált állatok májának lekötött- (a-c), illetve nem-lekötött (d-f) lebenyeiből. A szaggatott vonalak a májacinusok hozzávetőleges határait jelzik. A lépték 100 μm -t jelöl.



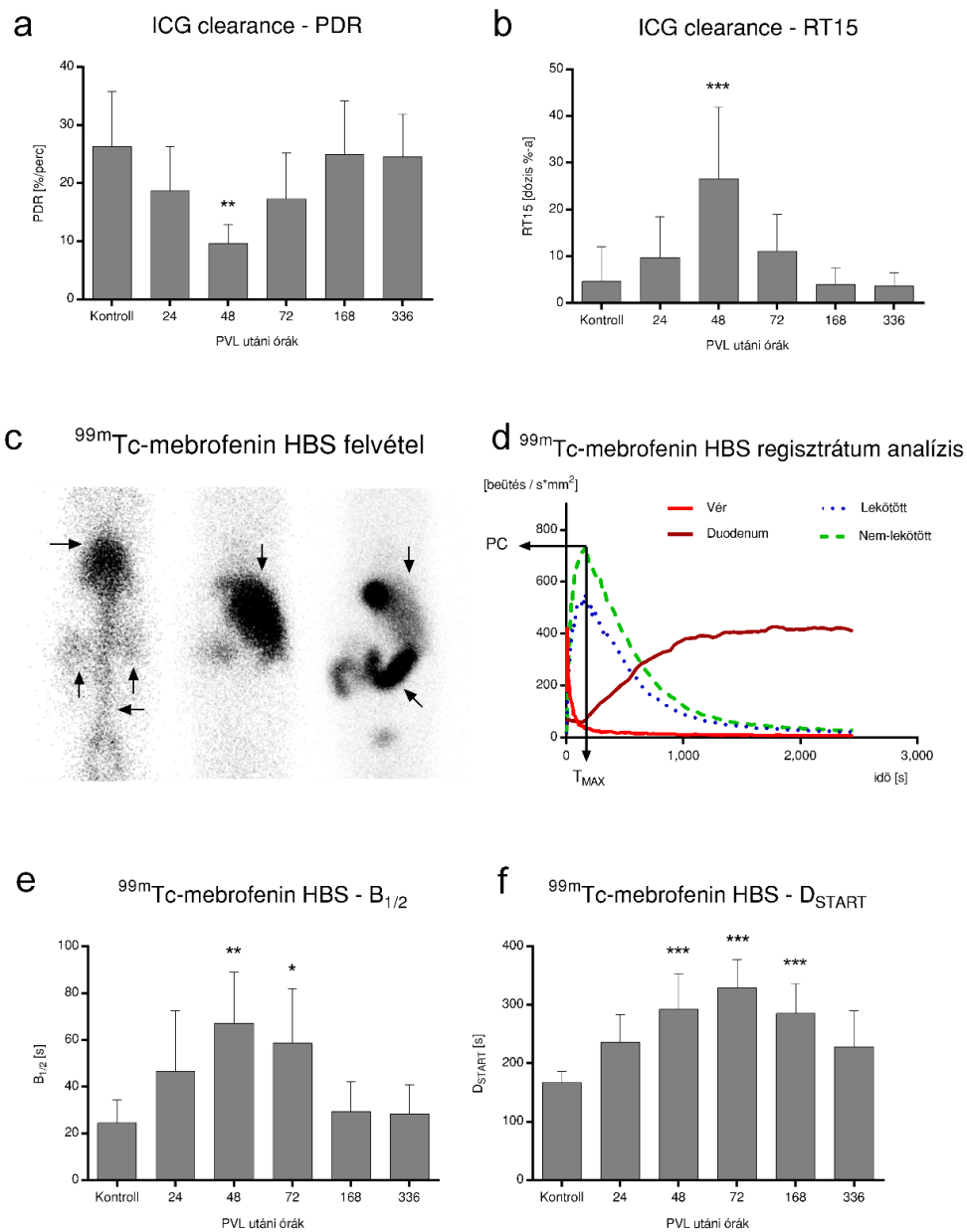
27. ábra Hematoxin-eozin szövettani metszetek. Hematoxin-eozin festett rutin szövettani metszetek kontroll, illetve *vena portae* ligatúrát követő 72. és 336. órában terminált állatok májának lekötött- (a-c), illetve nem-lekötött (d-f) lebenyeiből. A szaggatott vonalak a májacinusok hozzávetőleges határait jelzik. A lépték 100 µm-t jelöl.

4.1.2.4. Globális májfunkció

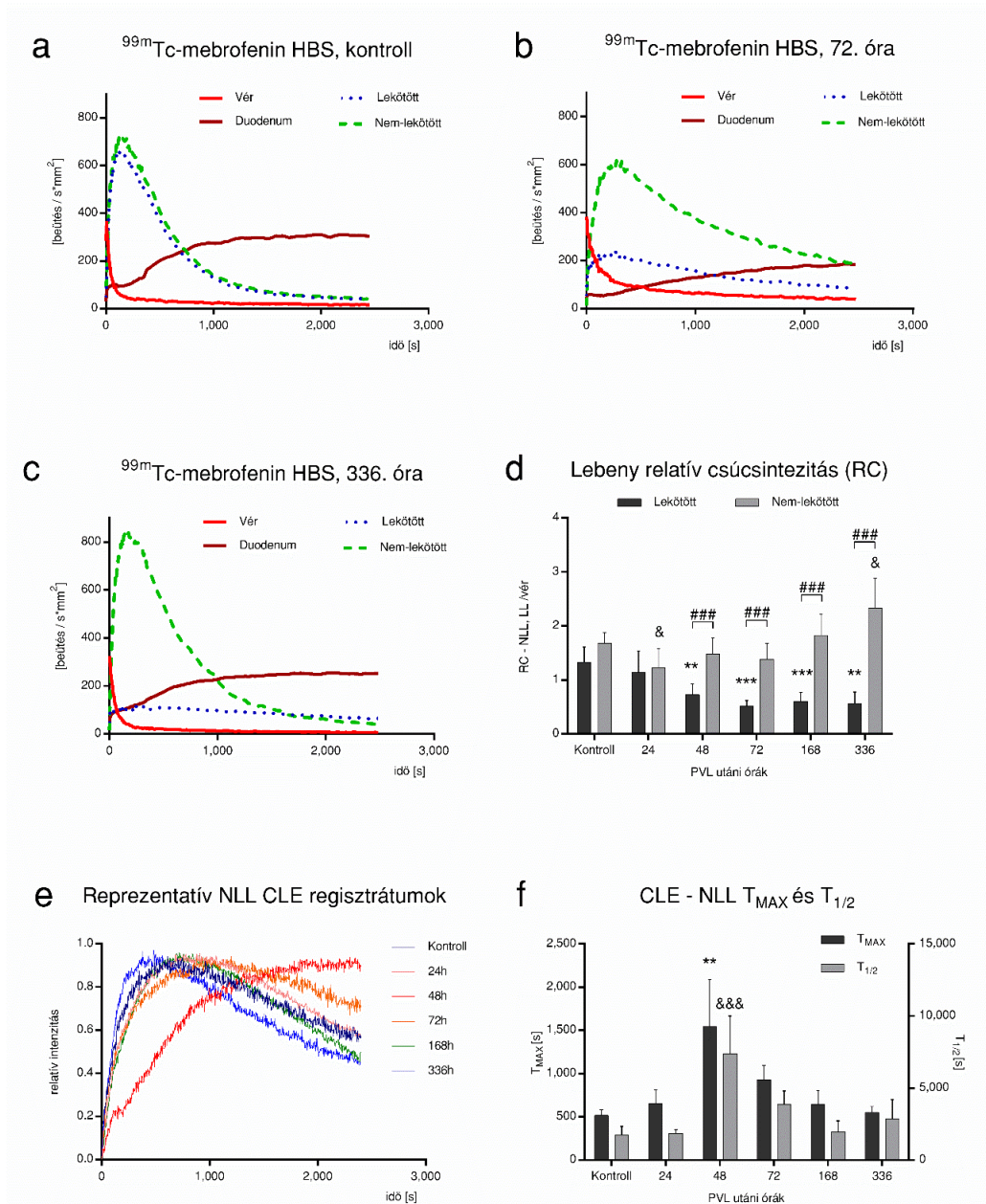
A globális *in vivo* májfunkció vizsgálatára dinamikus májfunkciós tesztekét végeztünk. Az ICG clearance teszt a 24-72. óra között szignifikánsan csökkent PDR és 5,8-szorosára emelkedett RT15 értékekkel átmeneti globális funkciózavart jelzett, mely a 168. órára rapidan normalizálódott. Ezzel szinkronban a planáris dinamikus ^{99m}Tc -mebrofenin HBS vizsgálat a 48-72. óra között szignifikánsan emelkedett vér féléletidővel ($B_{1/2}$), illetve első duodenalis megjelenéssel (D_{START}) szintén a globális felvételi- és kiválasztási kapacitás csökkenését mutatta. Megjegyzendő, hogy míg $B_{1/2}$ helyreállása a 168. órára megvalósult, addig D_{START} csupán később rendeződött, és szintje még a 336. órában is tendenciózusan emelkedett volt (28. ábra).

4.1.2.5. Regionális májfunkció

A regionális májfunkció szofisztikált, részletes vizsgálatára modern képalkotó eljárásokat alkalmaztunk. A HBS regisztrátumok a kontroll viszonyokhoz képest a 72. órában mind a LL, mind a NLL aktivitási görbéjének ellaposodását és kiszélesedését mutatták, melyet követően a 336. órára NLL aktivitási görbéje helyreállt, azonban LL görbéje tartósan ellaposodott, ezzel a lebenygörbék közti jelentős diszkrpanciát eredményezve. Ezen változások jól tükröződtek a regionális lebenyfunkciót jellemző relatív csúcsintenzitások (RC) tekintetében, melyek 24-72. órák között mindkét lebenyben csökkenést, majd csupán a NLL tekintetében nagyfokú, kontrollhoz hasonlítva szignifikáns növekedést, míg az LL-ben tartós csökkenést mutattak. Ennek megfelelően LL és NLL csúcsintenzitásai között a 48. órától kezdve szignifikáns, kifejezett különbség alakult ki. A NLL regionális funkciójának CLE vizsgálata során az ICG-transzport intenzitás görbéiből származtatott T_{MAX} , illetve $T_{1/2}$ értékek 24-72. órák közötti átmeneti, szignifikáns emelkedése, majd preoperatív értékekre visszarendeződése volt látható, jelezve NLL felvételi-, illetve leadási funkciójának átmeneti zavarát (29. ábra).



28. ábra Globális májfunkció. A máj *in vivo* globális funkciójának vizsgálata ICG-clearance teszt, illetve ^{99m}Tc -mebrofenin hepatobiliáris szcintigráfia (HBS) segítségével. Az ICG-clearance teszt során mért plazma eltűnési hányados (PDR) (a) és 15 perces retenciós értékek (RT15) (b). A planáris dinamikus HBS vizsgálat három fázisa (balról jobbra: radiofarmakon injekció és gyors disztribúció; hepatikus fázis; hepatobiliáris exkréciós és intesztinális fázis); a kirajzolódó szerveket nyilak jelölik (jobbra: szív; felfelé: vesék; balra: aorta; lefelé: máj; ferde: belek) (c). A HBS regisztrátumok analízise az alkalmazott négy kompartmentes modellben; a lebenyek csúcsintenzitása (PC) és annak ideje (T_{MAX}) (d). A HBS vizsgálat globális májfunkciót jelző paraméterei: vér féleletidő ($B_{1/2}$) és első duodenalis megjelenés (D_{START}). Statisztikai analízis: ANOVA, Bonferroni *post hoc* teszt. Adatok megjelenítése: átlag \pm szórás; $n=7$ állat/időpont (a, b), illetve $n=9$ állat/időpont (c-f). **, ***/, ****: $p<0,05/0,01/0,001$.

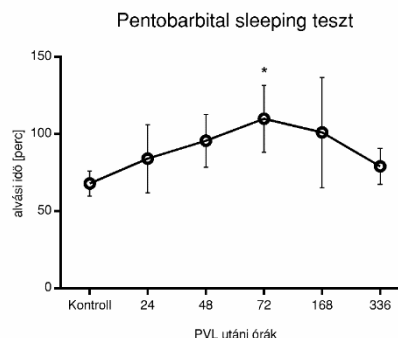


29. ábra Regionális májfunkció. A máj lekötött- (LL) és nem-lekötött lebenyeinek (NLL) regionális funkciója ^{99m}Tc -mebrofenin hepatobiliáris szcintigráfia (HBS), illetve konfokális lézer endomikroszkópia (CLE) segítségével. Reprezentatív HBS regisztrátumok kontroll viszonyok között, illetve a *vena portae* ligatúrát követő 72. és 336. órában (a-c). A HBS regisztrátumok kvantitatív analizését követően a LL és NLL relatív csúcsintenzitásainak (RC) változásai (d). Reprezentatív CLE regisztrátumok kontroll viszonyok között, illetve *vena portae* ligatúrát követően (e). NLL CLE-vel vizsgált ICG transzportjának, azaz felvételi- (csúcsintenzitás, T_{MAX}) és leadási (csúcsintenzitás felezési ideje, $T_{1/2}$) aktivitását minősítő paraméterek számszerű vizsgálata. Statisztikai analízis: kétutas ANOVA, Bonferroni post hoc teszt. Adatok megjelenítése: átlag \pm szórás; $n=9$ állat/időpont (d), illetve $n=5$ állat/időpont (f). „*”, „**”, „***”, „&”, „&&”, „&&&”, „#”, „##”, „###”: $p<0,05/0,01/0,001$ aktuális lekötött-, nem-lekötött vs. kontroll. „#”, „##”, „###”: $p<0,05/0,01/0,001$ aktuális lekötött vs. aktuális nem-lekötött.

4.2. II. kísérlet – Májfunkció a drogmétabolizmus tükrében

4.2.1. Pentobarbital sleeping teszt

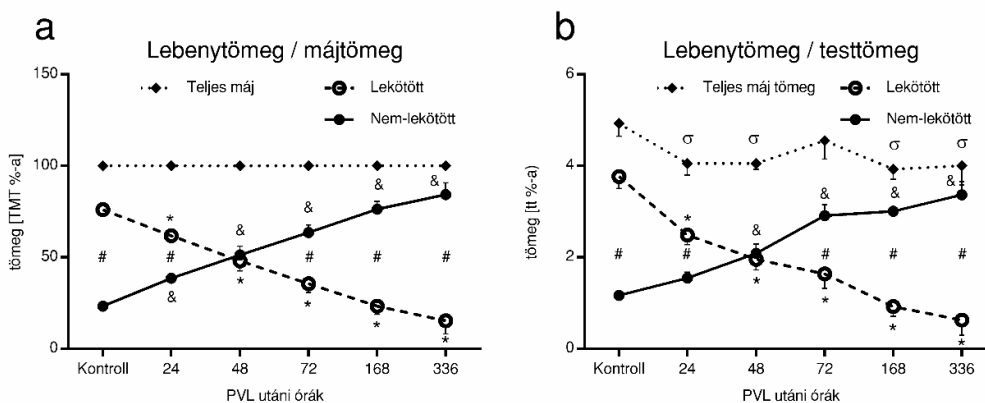
PVL-t követően az alvási idő a kontroll értékhez viszonyítva fokozatosan emelkedve a 72. órában szignifikánsan hosszabb volt ($p=0,0451$), melyet követően a 336. órára a kiindulási értékre visszarendeződést mutatott (30. ábra).



30. ábra Pentobarbital sleeping teszt. Kontroll, valamint *vena portae* ligatúrának (PVL) alávetett állatokon különböző posztoperatív időpontokban pentobarbital sleeping tesztet (30 mg/ttkg ip.) végeztünk. Statisztikai analízis: ANOVA, Bonferroni post hoc teszt. Adatok megjelenítése: átlag \pm szórás; $n=4$ állat/időpont. „*”: $p<0,05$.

4.2.2. Májtómeg

A LL tömege a kiindulási értékekről (kontroll: $76\pm 1,83\%/TMT$; $3,77\pm 0,27\%/tt$) fokozatosan, szignifikánsan csökkent (336. óra: $15,25\pm 7,18\%/TMT$, $0,63\pm 0,33/tt$) ($p<0,0001$). Párhuzamosan, NLL tömege a kezdeti viszonyokhoz (kontroll: $23,25\pm 1,71\%/TMT$; $1,17\pm 0,05\%/tt$) képest progresszív, szignifikáns növekedést mutatott (336. óra: $84,25\pm 6,4\%/TMT$; $3,37\pm 0,29\%/tt$) ($p<0,0001$). A TMT kezdeti, 24. órában mért csökkenését követően a kísérlet hátralévő részében változatlan volt (31. ábra).

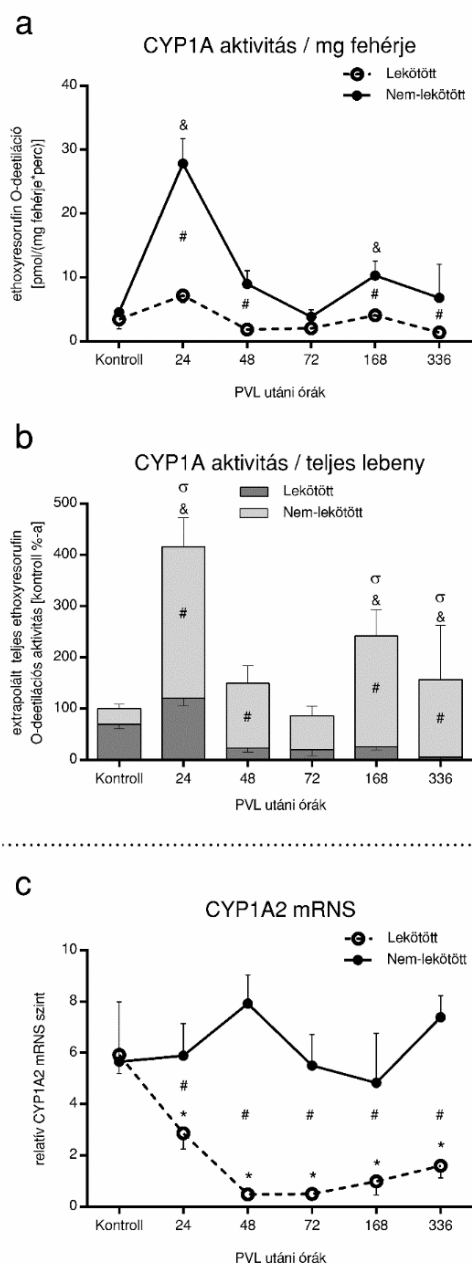


31. ábra Májtómegek. A kontroll, valamint *vena portae* ligatúrának (PVL) alávetett állatok lekötött-, illetve nem-lekötött májlebejeinek tömegének mérése, majd a teljes májtömeg (TMT) (a), illetve testtömeg (tt) (b) függvényében feltüntetése. Statisztikai analízis: kétutas ANOVA, Bonferroni post hoc teszt. Adatok megjelenítése: átlag \pm szórás; $n=4$ állat/időpont. „*”, „#”, „&”, „ σ ”: $p<0,05$ aktuális lekötött-, nem-lekötött, illetve teljes máj vs. kontroll. „#”: $p<0,05$ aktuális lekötött vs. aktuális nem-lekötött.

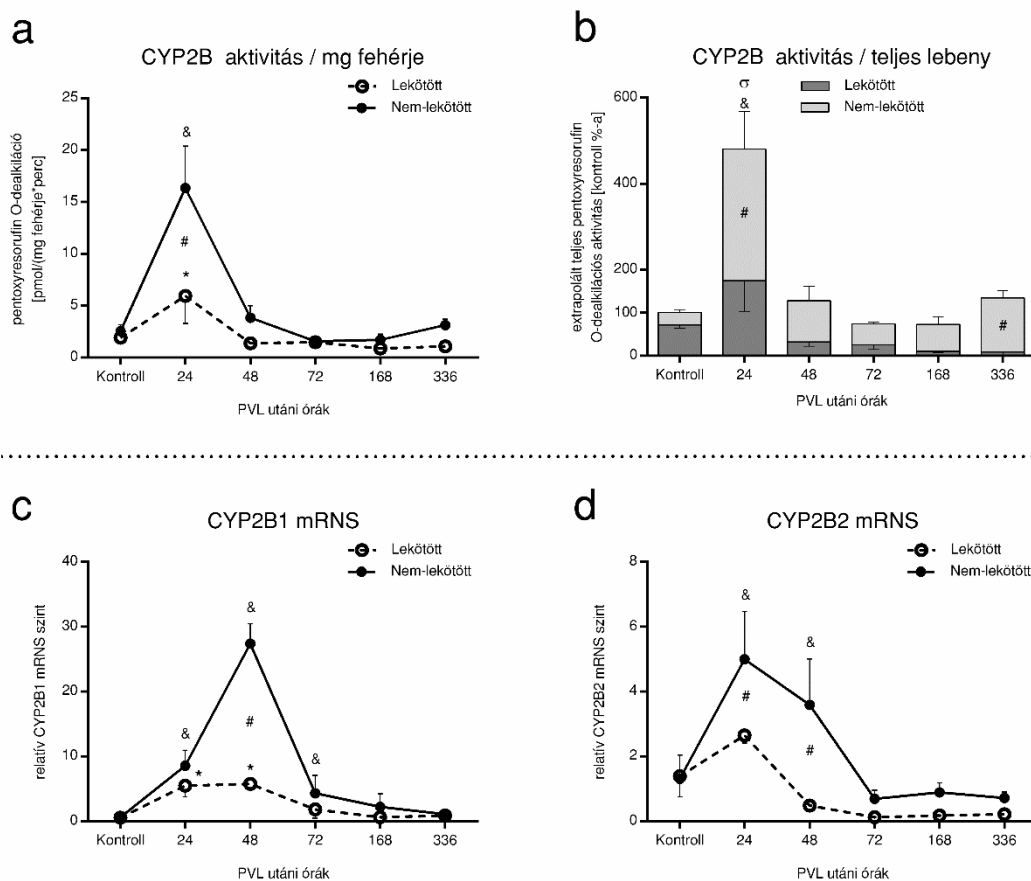
4.2.3. In vitro citokróm P450 enzimaktivitás

Az „intrinsic” mikroszómális CYP aktivitások [pmol metabolizált termék/(mg mikroszómális fehérje*perc)] tekintetében az ethoxyresorufin O-deetiláció, és a midazolam 1'- és 4-hidroxiláció által mért CYP1A és CYP3A enzimaktivitások nagymértékben hasonló eredményeket mutattak (32/a, 35/a,c ábrák). Aktivitásaiknak a 24. órában mért szignifikáns emelkedése után mindkét lebenyben csökkenő tendencia volt megfigyelhető a 72. óráig, melyet követően csupán az NLL-ben jött létre egy nagyfokú, kontrollhoz mérten is szignifikáns emelkedés a 168. órában, végül pedig kiindulási értékekre konvergálás a 336. órában.; míg a LL enzimaktivitásai tartósan alacsonyan maradtak. Ennek következtében LL és NLL enzimaktivitásai között már 24-48. órákban is megfigyelhető, azonban a késői, 168-336. órákban legkifejezettebb szignifikáns különbség alakult ki.

32. ábra CYP1A enzimaktivitás és CYP1A2 mRNS szint. A kontroll, valamint vena portae ligatúrának (PVL) alávetett állatok lekötött-, illetve nem-lekötött májlebenyeinek CitokrómP450 (CYP) 1A enzimaktivitásai (a,b) és megfelelő CYP1A2 mRNS expressziói (c). A specifikus, ethoxyresorufin-O-deetilációs aktivitással karakterizált CYP1A aktivitások megjelenítése kétféleképpen - „intrinsic”, azaz 1 mg mikroszómális fehérjére (a), valamint a teljes lekötött- és nem-lekötött lebenyekre (b) vetítve – történt. Statisztikai analízis: kétutas ANOVA, Bonferroni post hoc teszt. Adatok megjelenítése: átlag ± szórás; n=4 állat/időpont. „*”, „&”, „σ”: p<0,05 aktuális lekötött-, nem-lekötött, illetve teljes máj vs. kontroll. „#”: p<0,05 aktuális lekötött vs. aktuális nem-lekötött.

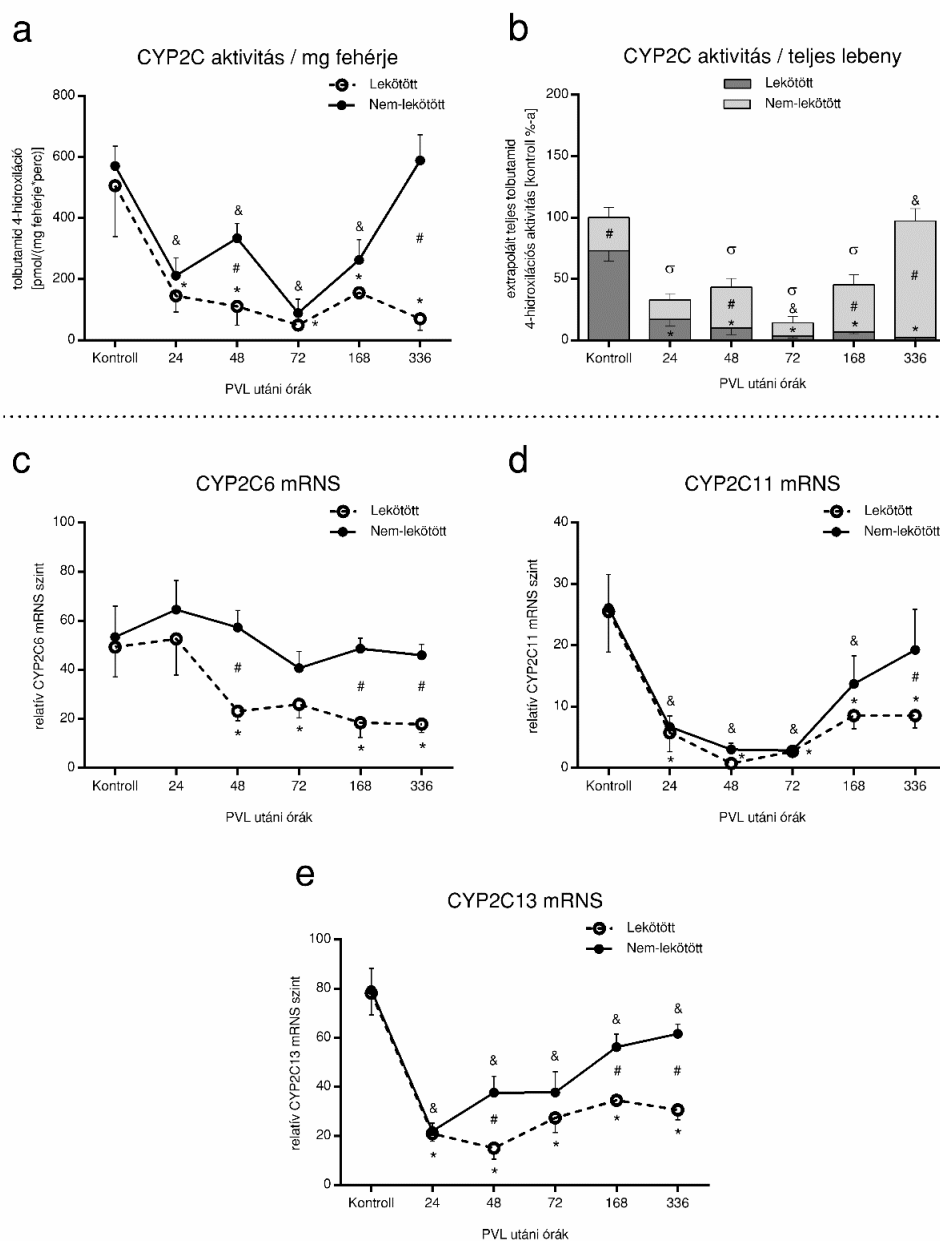


A CYP2B enzim aktivitási görbéje a CYP1A és CYP3A-nál látottakhoz hasonló lefutást mutatott, azonban mind a NLL 168. óras emelkedése, és következésképpen a LL és NLL különbsége csupán tendenciózusnak bizonyult (33/a ábra).

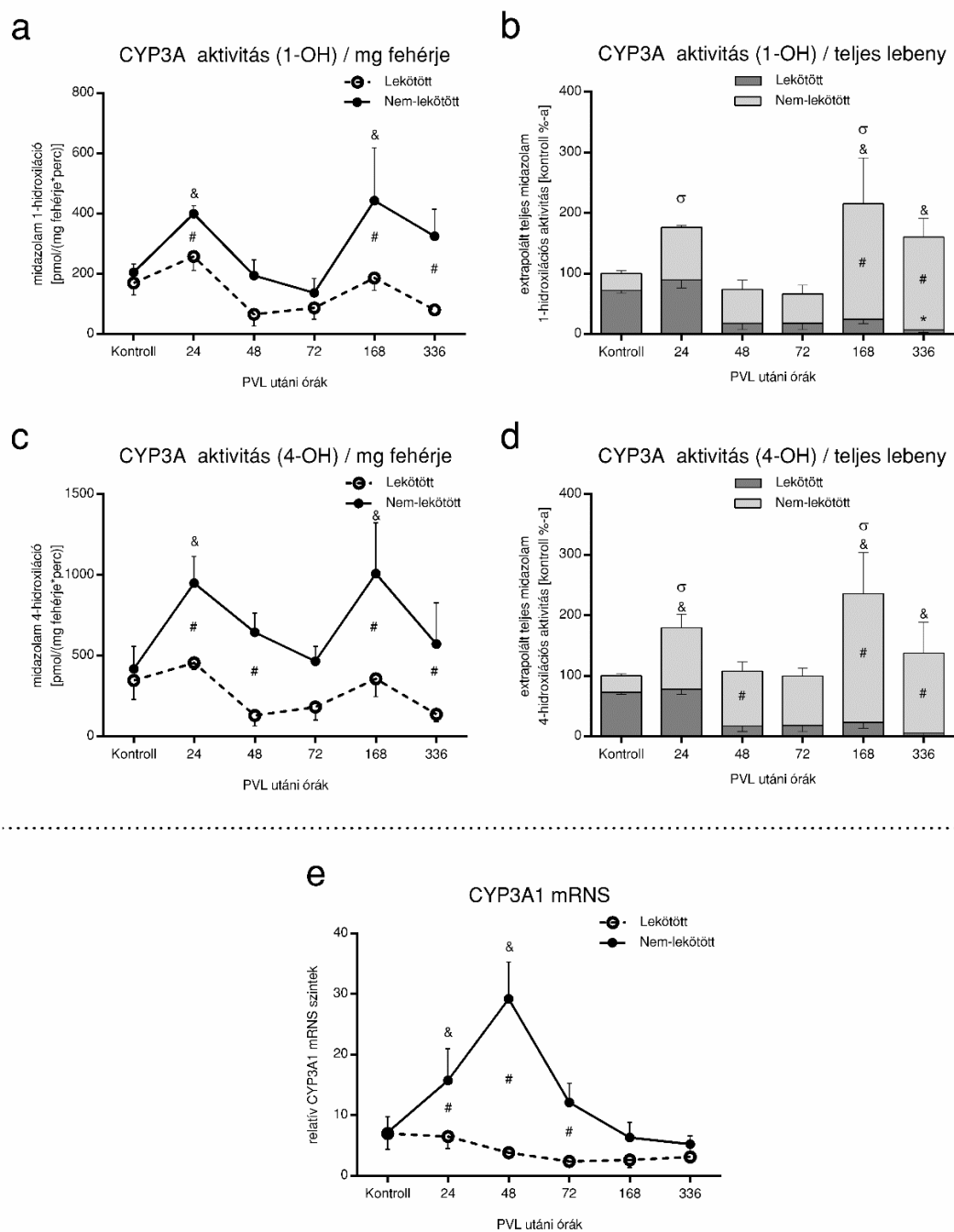


33. ábra CYP2B enzimaktivitás és CYP2B1/2 mRNS szintek. A kontroll, valamint *vena portae* ligatúrának (PVL) alávetett állatok lekötött-, illetve nem-lekötött májlebejeinek citokróm P450 (CYP) 2B enzimaktivitásai (a,b) és megfelelő CYP2B1 és CYP2B2 mRNS expressziói (c, d). A specifikus, pentoxyresorufin-O-dealkilációs aktivitással karakterizált CYP2B aktivitások megjelenítése kétféleképpen - „intrinsic”, azaz 1 mg mikroszómális fehérjére (a), valamint a teljes lekötött- és nem-lekötött lebejeekre (b) vetítve – történt. Statisztikai analízis: kétutas ANOVA, Bonferroni post hoc teszt. Adatok megjelenítése: átlag ± szórás; n=4 állat/időpont. „*”, „&”, „σ”, „#”: p<0,05 aktuális lekötött-, nem-lekötött, illetve teljes máj vs. kontroll. „#”: p<0,05 aktuális lekötött vs. aktuális nem-lekötött.

Ezzel szemben a tolbutamid 4-hidroxilációval mért CYP2C enzimaktivitások jelentősen eltérő karakterisztikát mutattak (34/a ábra). Itt a PVL-t követően mindkét lebejen egy hirtelen, jelentős aktivitáscsökkenés volt megfigyelhető, mely csupán a NLL-ben, a késői, 168-336. órában rendeződött; mindemellett LL CYP2C aktivitása végig csökkent maradt, melynek megfelelően a késői 168-336. órában LL és NLL CYP2C aktivitásai is szignifikánsan különbözőnek adódtak.



34. ábra CYP2C enzimaktivitás és CYP2C6/11/13 mRNS szintek. A kontroll, valamint *vena portae* ligatúrának (PVL) alávetett állatok lekötött-, illetve nem-lekötött májlebejeinek citokróm P450 (CYP) 2C enzimaktivitásai (a,b) és megfelelő CYP2C6, CYP2C11 és CYP2C13 mRNS expressziói (c-e). A specifikus, tolbutamid-4-hidroxilációs aktivitással karakterizált CYP2C aktivitások megjelenítése kétféleképpen - „intrinsic”, azaz 1 mg mikroszómális fehérjére (a), valamint a teljes lekötött- és nem-lekötött lebenyekre (b) vetítve – történt. Statisztikai analízis: kétutas ANOVA, Bonferroni post hoc teszt. Adatok megjelenítése: átlag ± szórás; n=4 állat/időpont. „*”, „&”, „σ”: p<0,05 aktuális lekötött-, nem-lekötött, illetve teljes máj vs. kontroll. „#”: p<0,05 aktuális lekötött vs. aktuális nem-lekötött.



35. ábra CYP3A enzimaktivitás és CYP3A1 mRNS szint. A kontroll, valamint *vena portae* ligatúrájának (PVL) alávetett állatok lekötött-, illetve nem-lekötött májlebejeinek citokróm P450 (CYP) 3A enzimaktivitásai (a-d) és megfelelő CYP3A1 mRNS expressziója (e). A specifikus, midazolam-1- (a,b), illetve midazolam-4-hidroxilációs (c,d) aktivitással karakterizált CYP3A aktivitások megjelenítése kétféleképpen - „intrinsic”, azaz 1 mg mikroszómális fehérjére (a,c), valamint a teljes lekötött- és nem-lekötött lebenyekre (b,d) vetítve történt. Statisztikai analízis: kétutas ANOVA, Bonferroni post hoc teszt. Adatok megjelenítése: átlag ± szórás; n=4 állat/időpont. „*”, „&”, „σ”, „#”: p<0,05 aktuális lekötött-, nem-lekötött, illetve teljes máj vs. kontroll. „#”: p<0,05 aktuális lekötött vs. aktuális nem-lekötött.

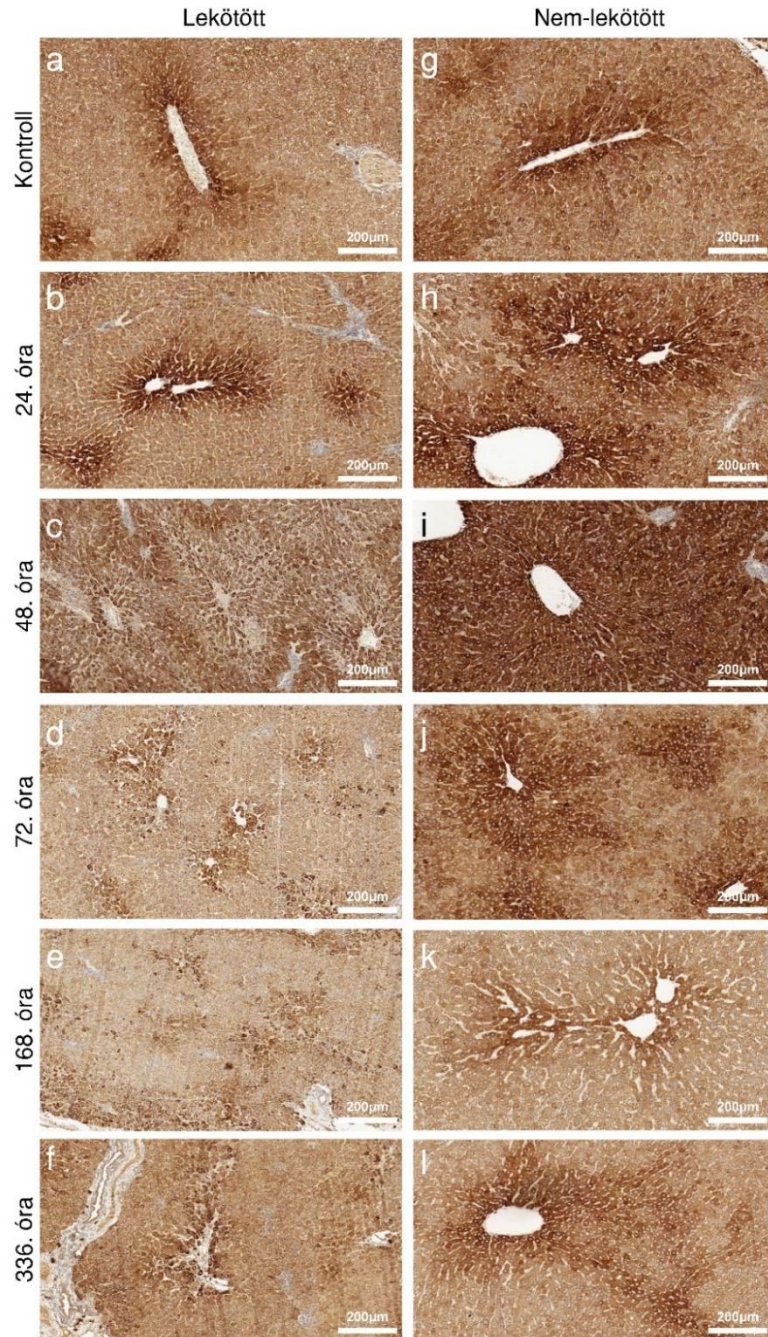
A lebenytömeg-súlyozással kalkulált teljes CYP aktivitások általánosságban nagymértékben hasonló lefutást mutattak az megfelelő „intrinsic” enzimaktivitásoknál látottakhoz, ugyanakkor a tömegarányokkal való extrapoláció fokozottan érvényre juttatta LL és NLL különbségeit a késői posztoperatív időszakban (32/b, 33/b, 34/b, 35/b, d ábrák). Így amíg LL teljes CYP aktivitásai tovább süllyedtek, addig NLL teljes CYP1A, CYP2C és CYP3A aktivitása még a 336. órában szignifikánsan magasabb volt, valamint LL és NLL enzimaktivitásainak különbsége tovább fokozódott, és CYP2B esetén is szignifikánsnak bizonyult. NLL drámaian fokozott teljes CYP enzimaktivitásának következtében a késői időszakban az egész máj (LL+NLL) teljes CYP1A, valamint CYP3A aktivitásai is szignifikánsan magasabbak voltak a 168. órában a kiindulási értékekhez képest. Továbbá minden CYP izoforma tekintetében a máj teljes CYP aktivitásainak drasztikus redisztribúciója jött létre NLL drámai térnyerésével, melynek hozzájárulása a teljes máj CYP funkciójához a kiindulási, $28\pm 2\%$ -ról $96\pm 2\%$ -ra emelkedett ($p < 0,0001$).

4.2.4. Citokróm P450 mRNS expresszió

CYP2B1, CYP2B2 és CYP3A1 mRNS szintjeinek változása egyező karakterisztikát mutattak, a NLL 24-48. órában mutatott gyors, szignifikáns, jelentős expressziófokozódása, majd alapértékekre visszarendeződése tekintetében, miközben LL mRNS szintjei csupán mérsékelten (CYP2B1, CYP2B2), vagy egyáltalán nem emelkedtek (CYP3A1), minek hatására LL és NLL mRNS szintjei között a korai 24-48. óras időszakban szignifikáns különbség alakult ki (33/c,d; 35/e ábrák). A CYP1A2 kapcsán szintén igazolható volt LL és NLL mRNS szintjeinek – ez esetben a korai lokalizáció helyett végig fennálló - szignifikáns különbsége, amely azonban itt a LL-ben látott hirtelen, szignifikáns expresszió csökkenés mellett a NLL végig megtartott (48. órában tendenciózusan emelkedett) mRNS-szintjének volt következménye (32/c ábra). A CYP2C6, CYP2C11 és CYP2C13 mRNS expressziói ismételtelen jelentősen eltérő lefutást mutattak (34/c-e ábrák). Míg LL mRNS koncentrációi tartósan, szignifikánsan csökkentek, addig NLL mRNS szintjei nem változtak (CYP2C6), vagy átmenti csökkenést és késői, alapvonalra visszatérést (CYP2C11), vagy azt megközelítő konvergenciát (CYP2C13) mutattak. Ennek következtében LL és NLL mRNS expressziói ismételtelen szignifikánsan különbözőnek bizonyultak dominánsan a kései 168-336. órában (továbbá CYP2C6 és CYP2C13 tekintetében a 48. órában is).

4.2.5. Immunhisztokémia

Az IHC során a CYP3A1 pozitivitása minden esetben a fiziológiásnak megfelelően, pericentrális túlsúlyú lokalizációban volt látható. PVL-t követően LL CYP3A1 pozitivitása csökkent, majd tartósan alacsonynak bizonyult. Bár a kontroll viszonyokhoz képest NLL CYP3A1 pozitivitása is alacsonyabb volt a késői 168. órában, a 24-72. órák közötti megtartottabb expresszió révén LL és NLL CYP3A1 pozitivitása eltérőnek bizonyult a jelölt időszakban (36. ábra).



36. ábra CYP3A1 immunhisztokémia. A kontroll, valamint vena portae ligatúrának (PVL) alávetett állatok lekötött- (a-f), illetve nem-lekötött (g-l) májlebejeinek formalin-fixált-paraffinba ágyazott metszeteinek klasszikus immunhisztokémiai reakciói; CitokrómP450 3A1 (CYP3A1)-specifikus primer antitestekkel és standard (torma-peroxidáz-diaminobenzidin interakción alapuló) kromogén jelöléssel, azonos protokollal működő immunhisztokémiai automatában. CYP3A1 fehérje expressziója minden esetben pericentrális túlsúlyú lokalizációt mutatott. A lépték 200 μm -t jelöl.

5. Megbeszélés

A máj rosszindulatú daganatos megbetegedései világszerte hatalmas problémát, egyben kihívást jelentenek a társadalom és az egészségügy minden - így a beteg, a (máj)sebész, a társszakmák, valamint az egészségügyi rendszer - szintjén. Ennek oka a májdaganatok gyakori előfordulása (világszerte hatodik leggyakoribb primer májtumor, illetve még magasabb incidenciájú májáttétek) mellett a kiugróan magas mortalitásban (daganatos halálozás második számú tényezője) keresendő.²⁰ A napjainkban alapvető fontosságú multidiszciplináris terápiás szemlélet ellenére kezelésük megingathatatlan alappillére a daganat(ok) sebészi eltávolítása, mely mind elsődleges-, mind áttéti májtumorkok tekintetében a legjobb hosszú távú eredmények, illetve túlélés alapvető záloga.^{11, 134} A májtranszplantáció, illetve sebészi reszekció terápiás lehetőségek közül előbbi jó eredményei miatt főként Észak-Amerikában, Kínában és Nyugat-Európában egyre gyakrabban kerül alkalmazásra,⁴⁵⁻⁴⁷ azonban a sebészi megoldás világszerte legfőbb módja továbbra is a daganat által érintett májterületek sebészi eltávolítása, a máj reszekciója.^{7, 13, 41, 49, 96, 102, 135} Az operatív- és intenzív terápiás kezelési eljárások robbanásszerű fejlődésével a májreszekció radikalitásának napjainkban már nem (műtét)technikai korlátok, hanem a műtétet követően betegben visszamaradó máj mennyisége szab határt, amellyel szinkronban a májsebészetben paradigma váltása következett be a korábbi központi „mi távolítható el?” kérdésről a „mi marad meg?” fókuszba kerülésével.^{12, 13, 89} Utóbbi alapjául szolgál, hogy a kiterjesztett májreszekciók során a posztoperatív morbiditás és mortalitás első számú tényezője az esetek 1-30%-ban jelentkező, legsúlyosabb válfajában akár 54%-os mortalitású poszthepektómiás májelégtelenség (PHLF), mely a visszamaradó májparenchyma (FLR) elégtelen mennyisége miatt lép fel.^{14, 59, 136} Ennek megfelelően a - preoperatíván becsült - alacsony FLR részben felelős a májáttétel rendelkező betegek 80-90%-ának, míg a primer májrákos beteget 70-80%-ának műtéti kontraindikációjáért.⁶¹ Mindazonáltal e népes betegcsoport egyébiránt (aneszteziológiailag) operábilis, technikailag reszekábilis tumorról, ugyanakkor elégtelen FLR-el rendelkező alcsoportjának kuratív kezelésére nyújtanak lehetőséget az úgynevezett *vena portae* okklúziós eljárások („portal vein occlusion”, PVO).^{14, 41, 61} A módszer a '60-as-'90-es évek, Honjo,¹⁵ Kinoshita¹⁶ és Makuuchi¹⁷ nevéhez fűződő első klinikai kivitelezéseit követően világszerte gyorsan elterjedt és rendszeresen alkalmazottá vált a komplikált májtumorkok multidiszciplináris

kezelését végző centrumokban.^{40, 61} A két lépéses kezelési algoritmus során első lépésben a tumoros májszegmentumokat ellátó *vena portae* ágak sebészi lekötése (PVL), vagy intervenciós radiológiai embolizációja (PVE) történik, mely az érintett lebenyterületek atrófiájával párhuzamosan az ellenoldali lebenyek fokozatos hipertrófiáját váltja ki egy 2-8 hetes „interstages”, azaz várakozási fázisban. Ezt követően a progresszív máj parenchyma változások révén második lépésben immár *elégséges mennyiségű FLR* mellett biztonságosan végezhető el a daganat jellemzői (méret, elhelyezkedés) alapján indikált májreszekció.^{12, 13, 61} A kritikus, élet-halál kérdést jelentő döntés a májreszekció időzítése, azaz a várakozási periódus hossza a *Szkülla és Kharübdisz*¹⁰ probléma révén, melyet a PHLF-el fenyegető, időelőtti májreszekció, illetve a túl hosszú várakozást követően kialakuló tumorprogresszió jelentenek.^{14, 61, 137} A probléma megoldása az FLR mennyiségének követésében rejlik, ugyanakkor a két felmerülő kérdés a „Hogyan?” és a „Mennyi?”, azaz a mérési metodika, illetve a konkrét, biztonságos reszekciót lehetővé tevő küszöbérték.^{3, 88, 89, 91, 94, 108} Ennek kapcsán a szakmai konszenzus – bizonyos hiányosságai ellenére - mindmáig a májlebenyek, illetve az FLR morfológiai, ezen belül térfogat változásainak CT angiográfiás, volumetriás követése, ahol az FLR mennyisége (egyébként) egészséges májparenchyma esetében a teljes tumormentes máj állományának minimálisan 20-25%-a, míg „kompromittált” májparenchyma (szteatózis, fibrózis/cirrózis, megelőző kemoterápiás kezelés, stb.) esetén legalább 40-50%-a.^{7, 61, 135} A morfológiai változások klinikai relevanciájával párhuzamosan jelen kutatásunk során mindkét kísérlet keretében vizsgáltuk a PVL-t követően kialakuló, májtömegeket, illetve májvolumeneket érintő változásokat, melyek egybehangzóan a lekött lebenyek (LL) fokozatos atrófiájával párhuzamosan a nem-lekött lebenyek (NLL) progresszív hipertrófiáját mutatták, miközben a teljes máj tömege, illetve volumene nem-, vagy a kezdeti kis változást követően a későbbiekben nem változott. Továbbá az I. kísérlet során LL és NLL lebenyek tömeg- és térfogat értékei erős korrelációt ($r_{LL}=0,976$, $r_{NLL}=0,96$) mutattak, mintegy validálva a CT-vel végzett májlebeny térfogatmérés metodikáját a morfológiai változások követésében. Mindezek megerősítik, illetve összhangban állnak az irodalomban más szerzők, illetve saját munkacsoportunk által ismételt dokumentált, PVL-t követő atrófia-hipertrófia komplexus, illetve e kiegyensúlyozottságának tényével.^{19, 84, 124, 137-139} Továbbá jelen kísérletünkben a morfológiai paraméterek egyfelől

bizonyították a műtéti modell sztenderditását, másfelől a további, szofisztikált funkcionális analízis sarokköveiként szolgáltak.

Ugyanakkor a morfológia nem szükségszerűen tükrözi a funkciót. Ezt támasztják alá számos munkacsoport nemrégiben megjelent eredményei, miszerint a máj térfogatváltozásai nem egyeznek meg annak funkciójában bekövetkező változásokkal. Ezek közül az egyik első Uesaka és mtsai. felismerése, mely keretében PVE-t, majd többszörös, izolált epeúti drenázst követően írták le az embolizált és regenerálódó lebenyek (ICG-clearance-szel mért) eltérő funkcionális kapacitását.⁹³ Ezt követően számos munkacsoport számolt be a májregenerációs eljárás kapcsán a morfológiai- és funkcionális paraméterek eltéréséről, mely keretében egyes szerzők (relatív) funkcionális elmaradást,¹³⁹ míg mások funkcionális túlműködést^{7, 92} észleltek. A morfo-funkcionális diszkrepancia egyik fontos tényezője a májparenchyma *kvalitásbeli eltérése*, mely eredhet az alapbetegségből (szteatózis, cirrózis, kolesztázis), illetve kemoterápiás kezeléssel is.⁹⁴ A másik kulcsfontosságú tényező a májfunkció *inhomogenitása*, akár a tumor okozta lokális kompresszió,⁹⁴ akár a különféle indukált májregenerációs eljárások, mint a PVL, PVE, vagy az ALPPS révén. Így mivel eredendően nem funkcionális képzőanyagok, továbbá a potenciális kvalitás- és homogenitásbeli eltérések miatt egzakt funkcionális extrapoláció sem kivitelezhető, a (pusztán) morfológiai vizsgálóeljárások, ezen belül a máj térfogatváltozásait alapul vevő CT volumetria alkalmatlanok a májfunkció vizsgálatára. Holott a máj funkciója kulcsfontosságú, közvetlen befolyásoló tényező a PHLF-hez kötődő morbiditás és mortalitás, és ilyen módon a beteg túlélése szempontjából, így pontos mérése kritikus jelentőségű. Ugyanakkor, tekintettel rendkívül komplex, szerteágazó feladataira, a „májfunkció” egyetlen, egyetemes vizsgálat keretében nem, csupán egyes rész-aspektusai mérhetőek. Így az idők folyamán számtalan, történelmi jelentőségű, illetve modern vizsgálóeljárás született, melyek a májfunkció egy-, vagy több aspektusát, így bioszintetikus-, konverziós-, vagy eliminációs kapacitását vizsgálva következtetnek a „nagy egészre”.⁸⁸⁻⁹⁰ Sajnálatos módon a különféle molekulák szérumszintjét alapul vevő statikus tesztek alkalmatlannak bizonyultak a máj funkciójának pontos becslésére,^{89, 90} melyet bizonyos, releváns klinikai tünetek (pl. aszcitesz, hepatikus enkefalopátia) „összeházasításával” létrehozott különféle klinikai score rendszerek sem tudtak teljes egészében megoldani. Fontos ugyanakkor megemlíteni, hogy napjaink egyik legszélesebb körben használatos klinikai

(máj)funkcionális score rendszere, a Child-(Turcotte)-Pugh score - krónikus hepatitiszben, portális hipertenzióban való hatékony alkalmazása mellett - egyben a kiindulási állapot jelenti mind a HCC, mind egyéb májtumorok sebészeti kezelése során;⁹⁰ ⁹⁶ míg a MELD-score a (transzplantációs) májsebészeti gyakorlatban is széleskörben elterjedt.^{88, 89} A statikus és klinikai tesztekkel jóval relevánsabb információt nyújtanak az úgynevezett dinamikus májfunkciós tesztek. A számos, historikus jelentőségű (aminopirin, koffein kilégzési tesztek⁹⁷) mellett napjainkban elfogadott [lidocain (MEGX), és midazolam clearance]^{3, 89} és újabb (LiMAX,)⁹⁰ módszereket is felvonultató konverziós tesztek közös pontja az érintett vegyület májban történő átalakulása, melyet a máj gyógyszer metabolizáló rendszere, illetve annak kulcsfontosságú citokróm P450 (CYP) enzimek katalizálnak.¹¹⁸⁻¹²⁰ Ez utóbbiak egyben a különféle szervezetbe juttatott gyógyszerek lebontását is végzik, illetve aktivitásuk számos kórállapotban (tumor, gyulladás, szepszis, stb.), különösen a májat érintő betegségekben is jelentős változást mutat,^{118, 140, 141} mely a megváltozott aktív metabolit koncentrációk révén könnyedén gyógyszer szövődményekhez - intoxikációhoz, vagy a kívánatos terápiás hatás elmaradásához - vezethetnek.¹⁴²⁻¹⁴⁴ Ennek megfelelően a hepatikus drogmetabolizmus és CYP enzimek aktivitásának vizsgálata kritikus jelentőségű az indukált májregenerációval járó állapotok, így például PVO kapcsán a gyógyszer-szövődmények elkerülése, illetve a CYP-ek májfunkcióban, funkcionális analízisben betöltött központi szerepe folytán. Az eliminációs és nukleáris képződéses májfunkciós tesztekben közös, hogy valamely májspecifikus, szerves anion keringésből való eltávolításán alapulnak, azaz valójában a máj szerves anion transzportját számszerűsítik. Ez utóbbi („organic anion transport”) felelős számos endogén- (pl. bilirubin, epesavak) és exogén (pl. xenobiotikumok, gyógyszerek, toxinok)⁹⁸ vegyület eltávolításáért a hepatociták bazolaterális- (NTCP, OATP-k, MRP-k stb.) és apikális (MRP-k, BSEP, stb.) transzportrendszerei révén. Így a szerves anion transzport a májfunkció kulcsfontosságú aspektusát képviseli, melynek megfelelően a különféle, májspecifikus szerves anyagokkal végzett funkcionális tesztek kifejezetten releváns, reprezentatív és szenzitív információt nyújtanak a máj valós funkciójáról. A nagyszámú eliminációs teszt közül kiemelkedő jelentőséggel bír az indocián-zöld (ICG) clearance teszt, mely jelenleg világszerte (főként a Távol-Keleten) a leggyakrabban alkalmazott (májspecifikus) funkcionális teszt.^{3, 88, 96} Metodikai alapjaiból adódóan számos májpatológiai állapot esetén (cirrózis, fibrózis, krónikus májbetegség)

hatékony és pontos becslést nyújt a teljes máj funkciójáról, továbbá májsebészeti, pre-reszekcionális döntéshozatali alkalmazási ajánlásai is ismertek.^{103, 145} A funkcionális képalkotás legújabb képviselőit jelentő modern nukleáris képalkotó technikák során az izotóphoz kapcsolt szerves molekulából álló radiofarmakonok használata a szenzitívebb mérés mellett lehetőséget nyújt a „tracer” pontos térbeli lokalizációjára is. A csupán Távol-Keleten törzskönyvezett, leginkább funkcionális volumet leíró ^{99m}Tc-GSA SPECT-tel szemben a főként Nyugat-Európában elterjedt ^{99m}Tc-mebrofenin hepatobiliáris szcintigráfia lehetővé teszi a transzportfolyamat pontos dinamikájának, illetve a máj exkréciós karakterisztikájának vizsgálatát is. Mindezekkel párhuzamosan állatkísérletes kutatásunk fókuszpontjába a *vena portae* ligatúrával indukált májregeneráció során bekövetkező májfunkció változások komplex vizsgálatát helyeztük, különös tekintettel a szerves anion transzportra és gyógyszermetabolizmusra. A teljes máj funkcióját tekintve PVL-t követően mindkét kísérletünk során egy átmeneti, globális májfunkció csökkenés volt megfigyelhető. Ennek részeként a máj gyógyszermetabolizmusának átmenti, 72. órában kicsúcsosodó kapacitáscsökkenése, csökkent pentobarbital lebontása volt látható az *in vivo* pentobarbital sleeping teszt során. Ezzel egybehangozva, a szerves anion transzport tekintetében a 24-72. órák között csökkent ICG elimináció, illetve csökkent globális ^{99m}Tc-mebrofenin felvétel és csökkent globális mebrofenin exkréció volt látható az ICG-clearance és planáris HBS vizsgálatok során. Utóbbi kapcsán azonban megjegyzendő, hogy míg a globális mebrofenin felvétel a 168. órára már normalizálódott, addig a globális exkréció még ekkor is emelkedett volt, és csupán a 336. órában vált a kiindulási helyzettől szignifikánsan nem különbözővé. Tekintettel a bazolaterális oldali passzív- (facilitált, karriermediált diffúzió, patkányban: Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp1b2; emberben OATP1B1, OATP1B3)^{98, 106}, illetve a kanalikuláris oldal aktív (ATP-dependens Mrp2 pumpa) mebrofenin transzport mechanizmusára, e különbség hátterében energetikai okok is felmerülhetnének a májsejtek fokozott energia- és ATP-igényes, intenzív proliferációja révén. Ugyanakkor a hepatociták proliferációs csúcsa jóval korábbra, kb. a 24-48. óra tájékára tehető.^{146, 147} Így a diszkrepancia hátterében vélhetőleg más tényezők állhatnak, melyek közül legvalószínűbb az indukált májregeneráció során létrejövő intraabdominális adhéziók, illetve az MRI-felvételeken jól követhető, májlebenyek volumenében és anatómiai pozíciójában létrejövő kiterjedt változások szerepe, amik könnyedén vezethettek az

exkréciós kapacitás elnyúló zavarához. Kísérleteink eredményei a globális májfunkció tekintetében számos irodalmi adattal összhangban állnak. Míg Takemura és mtsai.¹³⁹, valamint Starkel és mtsai.¹⁴⁸ a máj gyógyszermetabolizmusa esetében, addig munkacsoportunk saját publikációi⁸⁴, valamint egyéb adatok különféle májfunkciós tesztek, ICG-clearance-, illetve aminopirin légzési teszt segítségével észleleték a májfunkció átmeneti globális csökkenését patkányban létrehozott PVL-t¹⁴⁹, illetve sertésben végzett PVE-t¹⁵⁰ követően.

Bár a teljes máj globális funkciójának mérése hatékonyan alkalmazható krónikus májbetegségek, így például szteatózis, (szteato)hepatitisz, cirrózis, fibrózis, hemokromatózis, Wilson-kór stb.) esetén, illetve májsebészeti szempontból is jó tájékozódó vizsgálatnak minősül, sajnálatos módon a pusztán globális májfunkciót mérő eljárások - részben, de szorosabb értelemben teljesen - alkalmatlanok májreszekció és/vagy májtranszplantáció tervezése kapcsán pontos preoperatív funkciómérésre. Ennek esszenciális oka a fenti beavatkozások által teremtett konstellációban rejlik. Míg a különféle konverziós, eliminációs, és nukleáris képkalkotók globális paraméterei csupán a *teljes máj globális funkciójának* mérésére képesek, addig a májreszekció kivitelezését követően csupán a máj egy része („liver remnant”, azaz maradékmáj) marad a betegben, valamint a donorban, mely a későbbiekben kizárólagosan felelős a szervezet metabolikus funkcióinak biztosításáért.⁶¹ Ennek megfelelően kritikus jelentőségű a *tervezett maradékmáj* (valamint élő donoros májtranszplantációs esetben a tervezett, recipiensbe szánt graft) *individuális, regionális funkciójának* meghatározása preoperatíván, azaz még a reszekció/donorműtét elvégzése előtt. A „nagy egész egy részének” funkcióbecslésére ismertek korábbi, illetve újabb próbálkozások, melyek valamely globális májfunkciós teszt [ICG-clearance-, lidocain clearance (MEGX)-, ¹³C-metacéin légzési (LiMAX) teszt] és valamely képkalkotó eljárás (CT-, vagy MRI-volumetria) eredményeinek ismeretében extrapolálják a tervezett maradékmáj funkcióját a funkcionális paraméterek volumenszorzókat tükröző súlyozásával.⁹⁰ Ezen módszerek ugyanakkor metodikailag hibás voltjukon túl vitatott, alacsony hatékonyságúnak és specificitásúnak bizonyultak,⁹⁰ melyek legfőbb oka vélhetően a májfunkció korábban ismertett inhomogenitása. Az inhomogenitás még kifejezettebb, a körülmények pedig még szélsőségesebbek PVO-val indukált májregenerációs eljárások során. Ekkor a *vena portae* elzárását követő nyugalmi periódusban mind az okkludált, tumorhordozó lebenyek, mind a nem-okkludált FLR

perzisztálnak a betegben, ugyanakkor a második lépésben végzett, tumoros lebenyeket eltávolító májreszekciót követően csupán az FLR kerül visszahagyásra, melynek funkcionális kapacitásán áll vagy bukik a PHLF- és a kapcsolódó morbiditás, mortalitás kifejlődése, így végső soron a beteg élete. Ennek megfelelően a specifikusan az FLR funkciójának mérését lehetővé tevő regionális májfunkció vizsgálata kulcsfontosságú, élet-halál kérdést jelent a PVO indukálta májregenerációt igénybe vevő májsebészeti kezelések kapcsán.

A fentiekkel párhuzamosan kutatásunk kiemelt célkitűzése volt a PVL-t követő, regionális májfunkcióban bekövetkező változások állatkísérletes vizsgálata. Ennek céljából a LL és NLL individuális funkcióinak többszintű, multimodális analízisét végeztük *in vitro* sejtkultúrák, *ex vivo* immunfluoreszcencia, valamint *in vivo* szelektív epeúti drenázs és epeanalízis, különféle modern képalkotó metodikák (ICG-clearance teszt, ^{99m}Tc-mebrofenin HBS, konfokális lézer endomikroszkópia) és a drogmetabolizmus CYP enzimeinek vizsgálata segítségével. A regionális májfunkció vizsgálat első lépése a májlebenyek (kontrollált) kollagenáz-perfúziós emésztését követően kinyert sejtszuspenziókból készített LL és NLL sejtkultúrák *in vitro* immunfluoreszcens és transzportvizsgálata volt. Ez lehetőséget nyújtott az LL-t és NLL-t alkotó sejtek alapvető morfológiai- és funkcionális tényezőinek standard, egyéb tényezőktől (hisztopatológiai, hemodinamikai változások) független vizsgálatára. Ennek során mindkét lebenyből, bármely időpontban kinyerhetők voltak legalább 90%-os viabilitási rátájú hepatociták, melyek megőrizték potenciáljukat életképes, adekvát sejt-sejt kapcsolatokat és epekanalikulusokat, valamint specifikus Ntcp és Bsep transzporter expressziót- és lokalizációt mutató sejtkultúrák kialakítására. Továbbá ezen sejtkultúrákon *in vitro* transzportvizsgálatokat végeztünk. A taurokolát – Bsep-mediált, ATP-függő – kanalikuláris exportja a PVL-t követő 48-72. órában mindkét lebenyben átmenetileg csökkent volt, melyet sejtenergetikai tényezők magyarázhatnak. Míg a LL tekintetében ennek hátterében a drasztikusan alacsonyabb véráramlás következtében csökkenő oxigénkínálat állhat, addig a NLL esetében az energiahiány vélhetőleg az adott időszakban zajló, és 48. órában tetőző, kifejezett energiaigényű sejtproliferációval magyarázható, melyet korábbi eredményeink, illetve a PVL-t követő májregeneráció kezdeti fázisában alacsonyabb sejt energiatöltöttséget észlelő irodalmi adatok is megerősítenek.^{146, 147} A taurokolát felvétele hasonló átmeneti csökkenést, míg

bazolaterarális exportja tendenciózus emelkedést mutatott, mindemellett az intracelluláris taurokolát mennyiség változatlanak bizonyult. Az epesavak (intracellulárisan) toxikus hatásának, illetve annak tudatában, hogy PVL-t követően a portális keringés teljes – toxikus hatású - epesav terhelése az NLL-t terheli, a taurokolát transzportban észlelt változások háttérében az energetikai tényezőknél túl egy adaptív mechanizmus is feltételezhető.¹⁵¹ Ez utóbbiakat támasztja alá egy másik irodalmi beszámoló, mely során parciális hepatektómiával indukált májregenerációt követően észleltek hasonló adaptív jellegű taurokolát transzport változásokat.¹⁵² A bilirubin transzportja a taurokolátéhoz nagymértékben hasonló karakterisztikát mutatott, ugyanakkor a NLL tekintetében nem bizonyult szignifikánsan különbözőnek, mely a bilirubin transzport szorosabb regulációjára utal. A közvetlen ok a bilirubin transzportjának nagyobb variabilitása, redundanciája, illetve kisebb transzporter-dependenciája lehet. Oatp1a1, Oatp1a4 és Oatp1b2 knock-out (KO) állatísérletek bizonyították, hogy a bilirubin a fenti transzporterek mellett a bromosulphoftalein/bilirubin-binding protein mediálásával (konjugált bilirubin), illetve passzív diffúzió (konjugálatlan bilirubin) útján is bejuthat a hepatocitákba, továbbá az egyes transzporterek hiánya jól kompenzálta; szemben a taurokolát transzportját végző Oatp1a, Oatp1b2 és Ntcp transzporterek valamelyikének kiesése esetén észlelt taurokolát transzport zavarral.^{153, 154} Mindezen *in vitro* eredmények megőrzött funkcionális kapacitásra engednek következtetni, mely nem meglepő a bő vérellátású, hipertrofizáló NLL esetén. Figyelemre méltó ugyanakkor, hogy a fokozatosan atrofizáló LL-ből még 336 órával a PVL-t követően is izolálhatóak életképes, funkcionális hepatociták. Napjainkig a PVO-t követő adaptív elváltozások irreverzibilisként, a kifejlődő atrófia és hipertrofia pedig mint végpontokként voltak számon tartva. Ugyanakkor a PVE felszívódó embolizációs anyagokkal (fibrin, zselatin)^{61, 155} való kivitelezése egyik pillanatról a másikra megteremtette a reverzibilis embolizáció koncepcióját,^{156, 157} mely kapcsán a portális okklúzió reverzibilitását, illetve a kifejlődő morfológiai változásokat állatkísérletes tanulmányok igazolták.^{158, 159} Jelen kutatásunk jelentős előrelépést jelent a sejt szintű háttér tekintetében, amennyiben igazoltuk, hogy a portális keringésétől megfosztott lebenyből (LL) a regenerációs időszak minden időpontjában izolálhatóak olyan életképes sejtek, melyek idealizált körülmények (sejtkultúrák) között nem csupán életképes sejtkultúrák létrehozására képesek, hanem hepatocita-specifikus transzporter expressziót is mutatnak, melyeknek (csupán

átmenetileg csökkent) funkcionalitása is bizonyítást nyert. Mindez felveti annak lehetőségét, hogy az okklúzió esetleges megszűnése és a portális véráramlás helyreállása esetén az LL-ben maradt élet- és működőképes sejtek potenciálisan képesek lehetnek a májszövet acináris struktúrájának és funkcionális kapacitásának újbóli kialakítására.

Ugyanakkor, a sejt kultúra technikák nyújtotta információk, és a levonható következtetések jelentősége eredendően korlátozott, mivel a szuszpenziók generálásakor az elpusztult sejtek (obligát) kiszűrésével és eliminálásával az életképes sejtek szelektív, célzott kiválasztásra kerülnek. Ennél fogva a sejt kultúrákon alapuló, *in vitro* technikák nem nyújtanak teljes képet a reális viszonyokról olyan esetekben, mikor valamely okból kifolyólag sejthalállal kell számolni, mely igazoltan fennáll patkányban végzett PVO kapcsán.^{19, 84} Ennek megfelelően kísérletünk során az élőben vett viszonyok reális, pontos megismerése érdekében különféle *ex vivo* szövettani, illetve *in vivo* vizsgálatokkal végeztünk. Első lépésben fagyasztott metszeteken *ex vivo* Ntcp és Mrp2 immunfluoreszcencia segítségével vizsgáltuk a máj szöveti, morfológiai struktúráját, illetve transzporter expresszióját. Ennek keretében az LL és NLL egyező, intakt viszonyaihoz képest a PVL-t követő 72. órában az LL-ben elszórtan transzporter mentes foltok voltak láthatók, melyek vélhetőleg az okklúziót követően kialakult nekroapoptotikus zónáknak feleltethetők meg. Az NLL szinkron metszetein hasonló foltos transzporter hiányok nem, ugyanakkor generalizáltan alacsonyabb transzporter expresszió volt látható. A 336. órára mindezen elváltozások rendeződtek, a LL és a NLL transzporter expressziója is helyreállt, ugyanakkor jelentős változások jöttek létre a májacinusok méretében, amennyiben a LL-ben jelentősen kisebb, zsugorodott, míg a NLL-ben kifejezetten megnövekedett, „óriás” acinusok voltak láthatók. Míg az acinusok méretbeli változásai, illetve a LL nekroapoptotikus foltjai jól tükröződnek a parallel készített, H-E szövettani metszeteken, illetve korábbi vizsgálataink során már leírásra kerültek,⁸⁴ addig a transzporter expresszióban észlelt mindkét oldali (LL: foltos NLL: generalizált) átmeneti csökkenés új felismerés, mely szerepet játszhatott a transzportfunkciók átmeneti zavarában.

Ezt követően a regionális májfunkció *in vivo* vizsgálatára fókuszáltunk. Ennek első lépéseként a májlebenyek epe- és bilirubin kiválasztását, és a szérum- és epe bilirubin szintjeit vizsgáltuk szelektív epeúti drenázs segítségével annak megfelelően, hogy szekréciójuk nagy energiaigényénél fogva jó közelítő képet adnak a májlebenyek

funkcionális státuszáról. Az elválasztott epe, illetve BG mennyisége jól tükrözte a máj morfológiájában kialakult változásokat, amennyiben az epe- és BG szekréció LL tekintetében progresszív csökkenést, NLL tekintetében jelentős funkcionális gyarapodást mutatott, míg az összesített epe- és BG termelés konstans maradt. Mindeközben a szérumbilirubin (UCB), BG és teljes bilirubin szintjei, valamint a szérumbilirubin és epebilirubin (UCB) frakciója változatlanok voltak, mely párhuzamba állítható az in vitro vizsgálatok során észlelt, megőrzött bilirubin transzporttal. Az endogén, ugyanakkor toxikus hatású bilirubin kiválasztásának megtartottsága ennek megfelelően egy fontos, evolúciósan konzervált védelmi mechanizmusra utalhat. Azonban mindent egybevéve, a májfunkcióban kialakuló finom, pillanatszerű változások pontos jelzésének hiánya miatt a bilirubin – még a különféle, említett score-rendszerek komponenseként is – alkalmatlannak bizonyult a májfunkció pontos becslésére.^{88-91, 94}

Ezzel szemben a különböző dinamikus funkciós próbák lehetővé teszik a májfunkciójának pontos mérését. Ez utóbbiak közül az egyik kiemelkedő jelentőségű a világszerte leggyakrabban alkalmazott, ezen belül Távol-Keleten kifejezetten preferált ICG-clearance teszt.^{84, 88, 90} A májsebészeti gyakorlatban több, ez utóbbit alapul vevő prereszekcionális funkcióbecslést célzó ajánlás is felvetésre került a korábbiakban. Fan és mtsai. az ICG-clearance teszt alapján adtak javaslatot a biztonsággal kivitelezhető sebészeti reszekció maximális kiterjedéséről, amennyiben major- és minor hepatektómiát 14, illetve 22% R15 érték alatt javasoltak.¹⁰² Imamura és mtsai., illetve a Makuuchi munkacsoport nevéhez fűződik az utóbbiról elnevezett, progresszív májsebészeti döntési fa, mely az 1.) aszcitesz jelen (nem) léte és 2.) szérumbilirubin szint alapján reszekcióra alkalmasnak ítélt betegcsoporton belül határozza meg az 3.) R15 érték függvényében a maximálisan kivitelezhető reszekció fokát (normál: triszekcionektómia, 10-19%: jobb/bal hemihepatektómia, 20-29%: szegmentektómia, 30-39%: limitált reszekció, 40%<: enukleáció).¹⁰³ A „Makuuchi-féle döntési fa”, illetve az ICG-clearance teszt prereszekcionális döntéshozatali alkalmazása kezdetben nagy sikernek örvendett, és a mai napig főként Ázsiában, illetve világszerte számos helyen elfogadott, egyben rutinszerűen végzett. Intézetünkben, a komplikált májtumorok PVO-indukálta FLR növeléssel történő kétlépcsős kezelésében a legnagyobb hazai, és nemzetközileg is jelentős tapasztalattal rendelkező Semmelweis Egyetem I. sz. Sebészeti Klinikáján a jelentős máj parenchymás komorbiditással érintett betegek kezelése a Makuuchi-féle

döntési fa alapelveinek figyelembe vételével történik. Továbbá PVL-indukálta FLR növeléssel kezelt betaganyagunkon, ismételt CT-volumetria és ICG-clearance teszt együttes alkalmazása segítségével klinikailag igazoltuk utóbbi teszt prognosztikai értékét, amennyiben a magas ICG-clearance értékű csoport alacsonyabb szövődmény-, és magasabb regenerációs rátát, illetve a reszekciós műtét korábbi elvégzését mutatta.¹⁶⁰ Ugyanakkor az ICG-clearance alapján reszekcióra alkalmasnak ítélt betegek kapcsán több alkalommal számoltak be PHLF, majd halálos kimenetel fellépéséről, illetve fordítva, inoperábilisnek minősített betegeken sikeresen végeztek reszekciót jelentősebb szövődmények nélkül.^{161, 162} Ennek megfelelően napjainkban alkalmazása vitatott és egyértelműen nem ajánlható.^{88, 89} Ennek oka feltehetően az ICG-clearance teszt alapvető metodikai alkalmatlansága, mivel a teszt az indocián-zöld plazmaeliminációjának méréséből adódóan csupán a globális májfunkció becslésére alkalmas, így nem képes egy körülhatárolt májterület, így az FLR funkciójának szelektív megítélésére. Ez utóbbi kérdésben nyújtottak forradalmi megoldást a különféle modern nukleáris képalkotó technikák. Ezek radioaktív izotóphoz kapcsolt, májspecificitást biztosító szerves anyagok révén lehetővé teszik a bejuttatott radiofarmakonok transzportjának pontos követését, ezáltal a funkcionális adatok anatómiai lokalizációját. Így a korábbi tesztekkel ellentétben nem csupán a jeladó molekula vérben való megjelenése/eltűnése, vagy kilégzése, hanem ezen túlmenően, tetszőleges májterület „tracer” transzportja is vizsgálhatóvá vált. A nukleáris képalkotó technikák egyik legkorszerűbb képviselőjeként a ^{99m}Tc-mebrofenin hepatobiliáris szcintigráfia a máj globális felvételi- és exkréciós kapacitásának mérésén túl az egyes májterületek, így az FLR regionális funkciójának célzott, szofisztikált meghatározására is alkalmas. Klinikai hasznát számos irodalmi adat is alátámasztja, melyek közül kiemelkedő jelentőségűek az amszterdami, van Gulik munkacsoportba tartozó, alábbi munkák. Bennink és mtsai. a preoperatív kalkulált FLR, és a 24 órával műtétet követő, valós FLR funkcióját, valamint a műtétet 3 hónappal követően mért ^{99m}Tc-mebrofenin HBS és ICG-clearance eredmények között fennálló erős korrelációk ($r=0,95$ és $r=0,81$) alapján validálták a ^{99m}Tc-mebrofenin HBS pontosságát az FLR funkcionális kapacitás becslése terén.¹¹⁰ Ezen túlmenően, kifinomult pontossága közvetlen klinikai haszonnal jár, amennyiben Dinant és mtsai. igazolták a ^{99m}Tc-mebrofenin HBS hagyományos CT volumetriához képest jóval hatékonyabb PHLF rizikót, illetve a kapcsolódó mortalitást prognosztizáló képességét.¹¹¹ Ennek során a 2,5% beütés/min/m²

testfelszín határ-, azaz „cut-off” értéket határoztak meg az FLR individuális funkciójára vonatkozóan, melyet meghaladóan a mortalitás 3%-nak, míg ez alatt 56%-nak bizonyult.¹¹¹ De Graaf és mtsai. preoperatív PVE-n és major májreszekción áteső betegek vizsgálata kapcsán az FLR funkciójára vonatkozó határértéket 2,7%/min/m²-ben határozta meg, mely a munkacsoport amszterdami centrumának jelenleg hatályos határértéke.^{7, 88, 90} Mindezek alapján a ^{99m}Tc-mebrofenin HBS vizsgálat számos (főként európai) centrumban komoly létjogosultságot nyert a prereszekcionális funkcióbecslés, illetve ezáltal a májreszekció időpontjának meghatározása terén PVO indukálta májregenerációval kombinált beavatkozások során.^{108, 109, 163} Mindezekre való tekintettel napjainkban a ^{99m}Tc-mebrofenin HBS az egyik legpontosabb és legértékesebb mérőmódszer a - regionális funkcióra is kiterjedő – máj funkciómérés során.^{88, 90} Kísérletes- és klinikai alkalmazása PH,¹⁰¹ PVE,⁷ valamint a relatíve új, és számos vitás kérdést felvető - ALPPS^{107, 108, 163} beavatkozás kapcsán is ismert. PVL viszonylatában az irodalomban ugyanakkor még nem volt dokumentált ^{99m}Tc-mebrofenin HBS kísérletes kivitelezése, így kutatásunk során elsőként vizsgáltuk a patkányban végzett PVL-t követően az LL és NLL regionális funkcionális kapacitásában létrejövő változásokat ^{99m}Tc-mebrofenin HBS segítségével. Ennek során egy kezdeti, 48-72. órában kicsúcsosodó, mindkét lebenyt érintő, regionális funkcionális kapacitás csökkenést követően a lebenyek funkcionális kapacitásának progresszív divergenciája alakult ki, amennyiben LL funkcionális teljesítménye tartósan károsodott maradt, míg a NLL nagyfokú funkcionális kapacitás növekedést mutatott. Mindezek hatására a májfunkció drámai inhomogenitása alakult ki, a máj funkcionális kapacitásának NLL lebenyek irányába tolódásával. A NLL funkcionális kapacitásában észlelt drámai változásokat észlelve azok további vizsgálatát végeztük konfokális lézer endomikroszkópiával. A modern, optikai képalkotáson alapuló, endoszkópos vezetődróra rögzített fluoreszcens vizsgálófejjel működő¹⁶⁴ CLE szélesebb körű alkalmazási spektrumából a máj kapcsán - májmetasztázisok¹¹⁶ és HCC diagnosztikája¹¹⁷, illetve kísérletes májabláció hatékonyságának megítélése¹⁶⁵ - is ismertek friss irodalmi adatok, azonban tudomásunk szerint vizsgálatunk az első, mely a CLE-t a (PVO-t követően nem-okkludált, regenerálódó májlebenyek) regionális májfunkció szelektív, „próbaszerű” vizsgálatára használja kísérletes körülmények között. Ennek során a posztoperatív 24-72. órák között a NLL ICG-transzport mind felvételi-, mind exkréciós aspektusainak átmeneti zavara volt

látható, melyek a 168. órára normalizálódva jelentős összecsengést mutattak a NLL ^{99m}Tc -mebrofenin vizsgálat során mértékkel. Mindezek ígéretes jövőbeli klinikai jelentőséget hordoznak magukban, mivel a CLE segítségével perkután végzett, szelektív, regionális májfunkció vizsgálat potenciálisan kiegészítheti, illetve tovább bővítheti regionális májfunkcióbecslés diagnosztikai lehetőségeit mind krónikus májbetegségek, mind prereszekcionális kockázatbecslés kapcsán. A szerves anion transzport vizsgálatát célzó kísérlet átfogó, némi magyarázatra szoruló tapasztalata, hogy míg az exogén vegyületek, így ICG és mebrofenin exkréciója átmeneti zavart szenvedett, addig az endogén bilirubin kiválasztása megtartott maradt. Bár a fentieknek megfelelően a bilirubin májon át történő transzportjának minden eleme egészében nem ismert, addig bizonyított, hogy az érintett transzporterek kisebb (ICG), vagy nagyobb (mebrofenin) átfedéséből adódóan a bilirubin a fenti vegyületekkel kompetícióban áll.^{88, 100, 106} Ez utóbbival szinkronban hiperbilirubinémia esetén *in vitro* és klinikai vizsgálatok is csökkent ^{99m}Tc -mebrofenin transzportról számoltak be.^{100, 106} A bilirubin toxicitásának tudatában elképzelhető, hogy a hepatociták Oatp transzporterei evolúciós okoknál fogva nagyobb affinitást mutatnak bilirubin, mint a különféle exogén szubsztrátok irányában. Továbbá, a májregeneráció folyamatában kulcsszerepet játszó gyulladásozó (mester)citokinekről, így TNF- α -ról és IL-6-ról is bebizonyosodott Oatp-expresszió csökkentő hatásuk, mely az ICG és mebrofenin csökkent felvételéhez vezethet. Mindeközben a bilirubin alternatív útvonalakon, köztük passzív diffúzió révén is bejuthat a sejtekbe,^{106, 154} mely okok végső soron magyarázhatják a megtartott bilirubin szint mellett átmenetileg csökkent exogén szerves anyag transzportot.

A regionális májfunkciót az általános, átfogó jellegű szerves anion transzport szempontja mellett a gyógyszer lebontó képesség célzott aspektusából is kiterjedten vizsgáltuk, annak megfelelően, hogy a drogmétabolizmus kulcsfontosságú citokróm P450 enzimek központi szerepet töltenek be a különféle konverziós májfunkciós tesztekben, illetve az endogén- és exogén vegyületek lebontásában.¹¹⁸⁻¹²⁰ Ez alapján a PVO-t követően az okkludált és nem-okkludált lebenyek individuális CYP enzim funkcióinak változásai mellett kiemelt jelentőségűek a nem-okkludált lebenyekben végbemenő folyamatok. A fentiekhez hasonlatosan ennek oka, hogy míg a regenerációs folyamat során mindkét májterület funkcionális kapacitása releváns, addig a második lépésben végzett májreszekciót követően kizárólag az FLR, illetve CYP enzimeinek

funkcionális kapacitásán nyugszik a szervezet drogmétabolizmusa. A CYP enzimek aktivitásainak módosulása pedig gyógyszer intoxikációhoz, vagy terápiás hatás vesztéshez vezethet. Ennek megfelelően kísérletünkben a rendkívül népes CYP szupercsalád exogén vegyületek lebontását végző CYP1, CYP2 és CYP3 családjai közül - a CYP enzimek nagyfokú evolúciós konzerváltsága ellenére fennálló, jól dokumentált fajspecifikus és interspecies különbségek^{118, 120} figyelembe vételével - a kitüntetett jelentőségű enzimek vizsgálatára fókuszáltunk. Nagyfokú evolúciós konzerváltsága folytán a CYP1A család jelentőségét a magas interspecies homológia és a fajok közti jó összehasonlítási alap adja. Utóbbit teszik szintén lehetővé az anesztetikumok egy részét (is) metabolizáló CYP2B1 és CYP2B2 enzimek. Míg a gyógyszerek kb. 40%-ának lebontását végző CYP3A enzimek emberben és patkányban egyaránt kulcsfontosságúak (humánban a máj CYP tartalmának 30%-a, patkányban valamelyest kisebb része), addig a domináns humán CYP3A4 és patkány megfelelője, a CYP3A1 között fennálló kisfokú indukciós/inhibíciós eltérések miatt az összehasonlítás bizonyos korlátokkal tehető meg.^{118, 120} A CYP2C az egyik legkomplexebb család, amely emberben korlátozott jelentősége (gyógyszerek 16%-a szubsztrátja, a máj CYP tartalmának kb. 20%-a) mellett a patkány egyik legfontosabb CYP enzimesaládjá 50% feletti máj CYP tartalommal és annak megfelelő metabolikus szereppel. Kiemelendő a család és egyes izoenzimeinek nem- (CYP2C11, CYP2C13: domináns hím izoformák, CYP2C6: nemtől független) és hormonfüggő (hím és női nemi hormonok aktuális egyensúlya) expressziója.¹¹⁸⁻¹²⁰ Mindezeknek megfelelően kísérletünk során patkányban végzett PVL-t követően a CYP1A, CYP2B, CYP2C és CYP3A enzimaktivitásokkal szinkronban - irodalmi adatok szerint elsőként - a megfelelő, CYP1A2, CYP2B1, CYP2B2, CYP2C6, CYP2C11, CYP2C13 és CYP3A1 mRNS expressziós szinteket is vizsgáltuk a háttérben húzódo transzkripcionális és regulációs változások azonosítása érdekében. Az „intrinsic” (egységnyi májszövetre eső) CYP1A és CYP3A, valamint kisebb mértékben a CYP2B enzimaktivitások nagyon hasonló görbelefutást mutattak, mely keretében a mindkét lebenyben a 24. órában észlelhető emelkedést követően a 72. óráig csökkenő tendencia volt észlelhető, melyet követően a NLL enzimaktivitása jelentős emelkedést, majd a 336. órára az alapvonalra (vagy annak közelébe) visszarendeződést mutattak, míg az LL enzimaktivitásai tartósan csökkentek maradtak. A teljes lebenyekre extrapolált enzimaktivitások nagymértékben egyeztek az „intrinsic” aktivitásokkal. Ugyanakkor a

tömegarányokkal való súlyozás jelentősen kihangsúlyozta a LL és NLL közti különbséget, illetve NLL 168-336. órai enzimaktivitás-növekedését, mely hatására a teljes máj (LL és NLL együttese) 168. órai aktivitása is emelkedettnek bizonyult, továbbá a NLL részesedése a teljes máj aktivitásból a preoperatív 28%-ról jelentősen megnövekedett a 336. órában látott 96%-ra. Az enzimaktivitás változásokkal párhuzamosan a CYP1A2, CYP2B1/2, CYP3A2 enzimek mRNS szintjei a korai (24-48. óra) posztoperatív periódusban éles, átmeneti emelkedést mutattak, mely az LL-ben nem volt észlelhető. A 24. órában észlelt aktivitás fokozódás fehérje stabilizáció, illetve *de novo* fehérjeszintézis következményének tudható be az NLL-ben.¹¹⁸ Ugyanakkor mRNS-szinten a lebenyek között éles különbség áll fenn, mert az NLL-ben látott CYP1A2, CYP2B1/2, CYP3A2 mRNS szint emelkedés az LL-ben hiányzott. Ezzel szemben a CYP2C család eredményei markánsan eltérő karakterisztikát mutattak. A specifikus, „intrinsic”, illetve teljes lebenyre extrapolált tolbutamid-4-hidroxiláció, továbbá a CYP2C11 és CYP2C13 mRNS expressziói PVL-t követően egyöntetűen, mindkét lebenyben hirtelen, jelentős csökkenést mutattak, melyet követően az enzimaktivitások, és mRNS szintek tekintetében csupán az NLL-ben volt megfigyelhető egy késői, 336. órára kifejlődő visszarendeződés; míg az LL értékei tartósan deprimáltak maradtak. A CYP2C6 mRNS expressziója az LL-ben szintén csökkent, míg NLL-ben változatlan volt. Figyelemre méltó a CYP2C (al)családnak a többi, CYP1A, CYP2B és CYP3A alcsaládtól lényegesen eltérő válasza, melynek több oka lehet. A kezdeti posztoperatív periódusban a CYP2C enzimaktivitások és mRNS szintek is jelentős csökkenést mutattak. PVL-t követően irodalmi adatok szintén beszámolnak a CYP-függő drogmetabolizáló kapacitás átmeneti csökkenéséről. Míg Takemura és mtsai. PVL-t követően a regeneráció funkcionális aspektusainak (CYP3A2 és CYP2C11) morfológiaihoz képest történő elmaradását állapították meg,¹³⁹ addig Starkel és mtsai. a PVL-t követő, korai posztoperatív időszakban (0,5-8. óra) észleltek CYP3A és CYP2E1 funkció csökkenést, melyet a PVL specifikus hatásai helyett a műtéti stressz specifikus következményeinek tulajdonítottak.¹⁴⁸ A CYP funkció csökkenésének molekuláris hátterében a két beszámoló egybehangzóan a gyulladáshoz kapcsolódó citokinek (TNF- α , IL-1 β , IL-6), illetve az „felregulált”, indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) által megnövekedett mennyiségben termelt nitrogén-monoxid hatásainak központi szerepét véleményezték.^{139, 148} Ennek kapcsán megjegyzendő, hogy különféle patofiziológiai állapotok, így például fertőzés, gyulladás,

illetve tumoros betegség esetén a fenti gyulladáshoz kapcsolódó citokinek (TNF- α , IL-1 β , IL-6) a máj génextpressziójának jelentős megváltoztatása, ezáltal a számos CYP (CYP2B, CYP2C, CYP3A) transzkripció regulációjában szerepet játszó nukleáris receptorok [pregnán X receptor (PXR) és konstitutív androsztán receptor (CAR)]^{122, 166} repressziója következtében CYP downregulációhoz vezetnek.^{167, 168} Mindeközben ugyanezen citokinek, valamint a nitrogén-monoxid is kulcsszerepet játszanak a májregenerációs folyamat kiváltásában és mediálásban mind PH-t, mint PVO-t követően, melyek során szérumszintjük élesen emelkedett a gyulladáshoz kapcsolódó és hemodinamikai változások következtében. Mindezek alapján abszolút elképzelhető, hogy a gyulladáshoz kapcsolódó citokinek és a nitrogén-monoxid potenciálisan hozzájárultak a CYP funkció PVL-t követő, átmeneti károsodásához. Ugyanakkor a CYP2C alcsalád a többihez képest a regeneráció korai és kései időszakában is eltérő görbelefutást, késlekedő helyreállást mutatott. Utóbbi időszakban a citokinek, illetve a nitrogén-monoxid múltó hatása már kevésbé tehető felelőssé az észlelt diszkrépanciáért, azonban a lehetséges magyarázat a hormon-dependens regulációban mutatkozhat. Ennek oka, hogy a CYP2C enzimek expressziója a nemi hormonok egyensúlyának, illetve a hipotalamusz-hipofízis-gonád hormonális tengely szabályzásának hatása alatt áll.¹¹⁸ A patkány máj CYP tartalmának több, mint 40%-át kitevő CYP2C11 és a CYP2C13 a domináns hím-specifikus CYP izoformák, melyek expressziója a mindenkori tesztoszteron/ösztrógen egyensúly függvénye. Igazolást nyert, hogy bizonyos, exogén vegyi anyagokon túl különféle endogén kórállapotok is képesek CYP expresszió, illetve funkció csökkenést okozni a szérumszint nemi hormon koncentrációinak befolyásolása révén.^{118, 169} Állatkísérletes tanulmányok PH, illetve PVL modelljében csökkent CYP expresszió, funkció, valamint a drogmétabolizmus „demaszkularizációja” mellett emelkedett szérumszint ösztrógen és csökkent tesztoszteron szinteket, valamint a hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely szuppresszióját észlelték.^{140, 141} Továbbá a Kobayashi munkacsoport számos vizsgálata során arra az összefoglaló következtetésre jutott, hogy a máj különféle kórállapotai (ide értve az epeúti ligatúrát, PH-t, illetve PVL-t) a gyomor parietális sejtjeinek fokozott ösztrógen termelése révén a portális és szérumszint ösztradiol szint növekedését okozzák, amely hormon-dependens koleszterin métabolizmusához és CYP expresszióhoz (hím-specifikus izoformák csökkent, nőstény-specifikus izoformák fokozott kifejeződése), illetve hipofízis szuppresszióhoz vezet.¹⁷⁰⁻¹⁷² Mindezek értelmében a jelen kutatásunk

viszonylatában felmerül, hogy a megnövekedett koncentrációban jelen lévő női nemi hormonok fokozott hatása hozzájárult a CYP2C enzimek funkciójának, illetve expressziójának gyors, jelentős és elhúzódó csökkenéséhez, mely hipotézist tovább erősíti, hogy a hormon-független CYP2C6 expressziója az NLL-ben változatlan maradt. Ezzel párhuzamosan, a nemi hormonok hatásától független CYP1A és CYP3A enzimek aktivitásának 168. órában észlelt helyreállása és hiperfunkciója, valamint a vonatkozó CYP1A2 és CYP3A1 izoformák korai, jelentős expressziófokozódása az NLL adaptív választ jelezheti, mely a szervezet egy potenciális endogén kompenzációs, „escape”, azaz „menekülési” mechanizmusaként a kieső, csökkent CYP2C funkciót igyekezhet pótolni. Végül lépésben a biológiai szempontból kiemelt jelentőségű CYP3A alcsoportba tartozó CYP3A1 expresszió változásait célzó reprezentatív CYP3A1 IHC vizsgálatot végeztünk. Ez ismételten a CYP3A1 enzimek megtartottságát tükrözte a NLL-ben a korai posztoperatív periódusban, mely a LL tartósnál, fokozatosan megkevesbedő pozitivitásával párhuzamosan számottevő lebenyközti különbséget jelzett.

Jelen kutatásunk két kísérletének összevont eredményei kapcsán több tényező is további magyarázatra, tárgyalásra szorul. Ide tartozik az I. kísérlet, azaz a szerves anion transzport vizsgálata során az 1.) *in vitro* és *in vivo* funkcionális eredmények közti diszkrépancia, illetve a II., drogmétabolizmus vizsgálatára irányuló kísérlet kapcsán az 2.) izotípús-függő adaptív válasz hiánya az LL-ben, végül a mindkét kísérlet legfőbb megállapításai közé tartozó, 3.) LL és NLL funkcionális teljesítménye között fennálló drámai különbség. Együttes tárgyalásuk oka, hogy patofiziológiai, hisztopatológiai, illetve molekuláris háttérükben vélhetőleg mindhárom tekintetében a központi mozgatóelem a PVL okozta sokrétű változások összessége. Bár a (leendő) LL-hez tartozó *vena portae* ág lekötése csekély, banális változásnak tűnhet, a ligatúra nagy horderejű, drámai és szerteágazó (kór)élettani, szövettani és molekuláris változások kiindulópontja. Közvetlen következménye a zsigeri, illetve portális keringés gyorsan kialakuló, úgyszólván teljes redisztribúciója.

A LL-ben a portális beáramlás közel nullára csökkenésével párhuzamosan következményes arteriális vazodilatáció (HABR)⁸¹, illetve „csupán” kb. 50%-ra csökkent, arterializált perfúzió alakul ki. Eközben a NLL-ben drasztikusan megnövekedett portális beáramlás, következményes reverz HABR, jelentős (kb. 230%) teljes áramlás növekedés, illetve kapilláris nyomás- és endothélre ható nyíróerő

fokozódás lép fel.¹⁹ Az oxigénkínálat egyik lebenyben sem tudja kielégíteni az oxigén szükségletet, így mindkét oldalon relatív hipoxia alakul ki. Továbbá a lebenyeket ellátó vér összetételében is jelentős változás alakul ki, hiszen a LL-t tápláló artériás vérrrel szemben, a NLL-t a portális hiperperfúzió révén a zsigeri területről érkező vérrrel jelentősen nagyobb nutriens-, hormon- és növekedési faktor kínálat, valamint epesav terhelés éri. Mindezen komplex hemodinamikai, oxigenizációs és metabolikus, humorális változások az NLL-ben együttesen kiváltják a májregeneráció e speciális formáját, míg az LL-ben progresszív atrófia alakul ki nekroapoptózissal, és az acináris- és kapilláris struktúrák megváltozásával.^{19, 77, 78, 138, 173} A fenti szerteágazó változások indokolhatják a szerves anion transzport kísérlet *in vitro* és *in vivo* eredményeinek különbségeit. Kiindulásként, a sejt kultúrákkal végzett *in vitro* vizsgálatok során az élő sejtek obligát kiszelektálása önmagában véve jelentősen torzítja a valós viszonyokat. Mindezen túl, az *in vitro* sejt kultúra vizsgálatok lehetővé teszik a mérések zavartalan, standard, „fékpad” körülmények között történő elvégzését, melyek során az egyéb, mint például nutriens- és oxigén ellátási, strukturális-, elfolyási- és élettani zavaró tényezők szerepe kiküszöbölhető. Ugyanakkor az *in vivo* funkcionális vizsgálatok a PVL generálta (pato)fiziológiai körülmények között történtek, drámai hemodinamikai és strukturális változások mellett. Fiziológias viszonyok között a máj endothél sejtjei gazdagon fenesztráltak, mely lehetővé teszi a makromolekulák és éren belüli alkotóelemek akadálytalan átlépését a szinuszoidok felől a Disse-tér felé.⁸⁵ Azonban PVL hatására a LL-ben a kapilláris struktúrák – nem csupán átáramló vér minőségére vonatkozó – arterializációja jön létre a kapillárisok részleges, standard kapillárisokká alakulásával, azaz „pszeudokapillarizációjával”, mely a fenesztrációk megfogyatkozásával és eltűnésével, fokozott perivaszkuláris fibrózissal és egy bazális lamina-szerű kötőszövetes réteg kialakulásával jár.⁸⁵ Emellett a korábbi,⁸⁴ és az aktuális *in vivo* IF eredményeink során LL-ben igazolt acinus zsugorodás a szinuszoidális változásokkal karöltve szintén a hepatociták vérellátásának elégtelenségével járhat. Mindezek együttesen jelentősen akadályozhatják a makromolekulák, így például az albuminhoz kötött ICG, vagy ^{99m}Tc-mebrofenin elérhetőségét LL acinusai, hepatocitái számára, mely a csökkent *in vivo* funkcionális kapacitás és a megtartott *in vitro* funkció diszkrpanciáját magyarázhatja. A fentiekkel összhangban, a drogmétabolizmust célzó kísérlet során NLL-ben észlelt, míg LL-ben hiányzó, a kieső CYP2C funkciót pótló adaptív CYP1A és CYP3A funkció- és

expresszió fokozódás; továbbá a mindkét kísérletben LL és NLL regionális funkciói között tátongó különbség okai szintén a PVL okozta átfogó hemodinamikai, strukturális, és patofiziológiai változásokra vezethetők vissza. A nagy vérátáramlású, jó nutriens-, hormon- és növekedési faktor ellátottságú NLL a nagy energiaigényű sejtosztódás lezajlásával egyidejű átmeneti időszak után képes funkcionális teljesítménynövekedésre, továbbá a nem- vagy kevésbé gátolt CYP izotípusok adaptív CYP enzim expresszió és ezáltal -aktivitás fokozására. Ezzel szemben, a csökkent vér-, tápanyag-, növekedési- és hormon ellátottságú, jelentősen hipoxiás, átalakult kapilláris- és acináris szerkezetű LL nem képes funkcionális- és drogmétabolizmusa kapacitásának helyreállítására.

Összefoglalva, PVL-t követően a máj morfológiájában, illetve dominánsan a globális- és regionális májfunkcióban kialakuló változásokat vizsgáló két kísérletünkben a máj szerves anion transzportjának, illetve drogmétabolizmusának komplex analízisét helyeztük a fókuszpontba. A máj - erősen korreláló – tömeg- és volumenváltozásai egyértelműen tanúsították az atrófia-hipertrófia komplexust. *In vitro* kísérleteink során mindkét lebenyből, minden időpontban, így a portális véráramlásától megfosztott LL-ből a 336. órában is kinyerhetők voltak életképes sejtek, melyek viabilis, adekvát morfológiát és specifikus transzporter expressziót, valamint csupán átmenetileg csökkent szerves anion transzportot mutattak. A globális májfunkcióban egy átmeneti, korai csökkenés volt látható, mely a globális gyógyszerlebontó készségben, illetve a globális (exogén) felvételi- és leadási kapacitásban is tükröződött, ugyanakkor az endogén bilirubin kiválasztása állandó maradt. Az átmeneti funkcióromlás a LL és NLL regionális májfunkciójában, azaz szerves anion transzportjában, illetve drogmétabolizmusában is tükröződött. Ugyanakkor, míg LL szerves anion transzportja és drogmétabolizmusa végérvényesen károsodott, addig a NLL a posztoperatív 72. órát követően drámai funkciógyarapodást mutatva képes volt a szervezet- és a máj globális funkciójának és drogmétabolizmusának helyreállítására. Ezzel a májfunkció jelentős inhomogenitása, illetve NLL lebenyek irányába tolódása jött létre. NLL drogmétabolizmusának regenerációja tekintetében egy CYP-izotípus függő, adaptív válasz volt látható, mely keretében a rapidan és elnyúlóan károsodott, csupán késői normalizálódást mutató CYP2C enzimekkel szemben a CYP1A és CYP3A enzimek 168. órai túlkompenzációs aktivitásfokozódása és korai transzkripciófokozódása volt látható.

Eredményeink számos értékes jövőbeni potenciállal rendelkeznek mind alapkutatósi, mind klinikai szempontból. A LL-ben igazolt, a regenerációs periódus során mindvégig perzisztáló, életképes, funkcionális sejtek ténye új távlatokat nyithat reverzibilis embolizációs beavatkozások, illetve a máj regeneratív és transzplantációs medicinájának terén. Bár a fajok között fennálló anatómiai és regenerációs viszonyok eltéréseinél fogva a máj (teljes- és a regionális) funkciója tekintetében patkánykísérleteink eredményei nem vonatkoztathatók közvetlenül humán viszonyokra, mégis magas klinikai relevanciával rendelkeznek, mivel kisállat modellben részleteiben világítanak rá a PVO-t követő indukált májregeneráció során a májfunkcióban bekövetkező jelentős, széles spektrumon mozgó, szélsőséges változásokra. Mindezek megerősítik - a megszokott májvolumetriás eljárásokon túl - a regionális májfunkció mérésére alkalmas tesztek alkalmazásának fontosságát májsebészeti beavatkozások, és kiemelkedően, PVO-val indukált májregenerációt alkalmazó májreszekciók kapcsán. A funkcionális tesztek alkalmazása lehetővé teszi a májreszekció időzítésének pontos meghatározását, mely a perioperatív morbiditás- és mortalitás jelentős csökkenéséhez vezethet. Továbbá a CLE a későbbiekben potenciálisan alkalmas lehet a máj funkcionális analizésére rendelkezésre álló diagnosztikai tárház bővítésére, kiegészítésére. A drogmétabolizmus és CYP enzimek májlebenszintű változásainak ismeretének nagy klinikai jelentőségű következmény lehet a különféle gyógyszer szövődmények (intoxikáció, terápiás hatás vesztés) ritkább előfordulása. A CYP enzimeaktivitásoknak megfelelő gyógyszerdozírozást lehetővé tevő „személyre szabott medicina” irányában már történtek kezdeti lépések, mint például a gyógyszer lebontó kapacitás becslése CYP genotipizálás és expressziós mintázat meghatározás alapján.¹²³ Jelen - izotípús-függő CYP enzimaktivitás változásokat igazoló - eredményeink az individuális kezelés még magasabb szintjére adnak lehetőséget, a gyógyszer dózisának az azt specifikusan metabolizáló CYP izoforma enzimaktivitásának függvényében meghatározásával. Mindazonáltal, PVO-t követően a CYP izotípúsok teljes(ebb) körének változásai feltérképezésére, illetve a PVO-t követő májfunkció humán aspektusainak pontosabb megismerésére további klinikai vizsgálatok szükségesek.

6. Következtetések

A PVL segítségével indukált májregeneráció máj morfológiára és májfunkcióra, azon belül a máj szerves anion transzportjára, illetve gyógyszer metabolizmusára gyakorolt hatásait kutató (patkány) állatkísérletes vizsgálataink eredményeit összegezve, eredetileg megfogalmazott kérdéseink kapcsán az alábbi következtetéseket vonhatjuk le:

1. PVL-t követően mindkét lebenycsoportból minden időpontban izolálhatók voltak nagyszámú, életképes, primer kultúrák létrehozására képes májsejtek.
2. Mindkét lebenycsoport bármely posztoperatív időpontban készített sejtkultúráiban adekvát morfológiát, polarizációt, epeút kialakítási potenciált, megtartott transzporter expressziót mutató sejtek voltak láthatók, melyek in vitro (taurokolát- és bilirubin) transzportja csupán átmeneti zavart mutatott, NLL bilirubin transzportjának megkíméltsége mellett.
3. A PVL a globális májfunkció átmeneti csökkenéséhez vezetett, mely jól tükröződött az ICG csökkent plazma eliminációján, valamint a ^{99m}Tc -mebrofenin megnyúlt globális felvételi- és (elnyúlt normalizálódást mutató) globális eliminációs paraméterein, illetve a pentobarbital sleeping teszt átmenetileg emelkedett értékein.
4. PVL-t követően a lekötött lebenyek májfunkciója permanens, míg a nem-lekötött lebenyek regionális funkciója csupán átmeneti csökkenést, majd a globális májfunkciót helyreállító növekedést mutatott mind ^{99m}Tc -mebrofenin (HBS) és ICG (CLE) transzport, mind a drogmétabolizmus CYP enzimaktivitásai tekintetében. Továbbá NLL lebenycsoportban egy adaptív, transzkripciós CYP mRNS aktivitás fokozódás volt megfigyelhető, mely LL-ben hiányzott. A máj funkciójának jelentős redisztribúciója jött létre annak NLL irányába tolódásával.
5. A konfokális lézer endomikroszkópia alkalmas eljárásnak bizonyult a máj regionális funkciójának célzott mérésére kísérletesen, mely felveti további potenciális klinikai alkalmazásának lehetőségét is.

6.1. Új megállapítások

Következtetéseink alapján az alábbi új megállapításokat tehetjük:

1. Patkányban végzett PVL-t követően az indukált májregeneráció teljes időtartama alatt mindkét lebenycsoportban, így a lekötött lebenyekben is perzisztálnak életképes hepatociták, melyek primer sejtkultúrák létrehozására, abban adekvát struktúra, polarizáció, epekanalikulusok és specifikus transzporter expresszió kialakítására képesek, *in vitro* funkciójuk pedig csupán átmeneti zavart szenved.
2. Az indukált májregeneráció ismert válfajai (PVO, ALPPS) közül PVL-t követően, ^{99m}Tc-mebrofenin hepatobiliáris szcintigráfiával is igazolható kísérletesen a globális-, illetve bilaterális regionális májfunkció átmeneti posztoperatív csökkenése. Ez a nem-lekötött lebenyek jelentős funkcionális kapacitás növekedésével áll helyre, mely a máj funkciójának nagyfokú inhomogenitását, (NLL irányában) eltolódását eredményezi.
3. Patkányban végzett PVL hatására a nem-lekötött lebenyekben egy adaptációs, pozitív transzkripciós mechanizmus állítja helyre a máj átmenetileg csökkent drogmetanolizmusát, mely izotípús-függően a CYP2C enzimek átmeneti háttérbe szorulásával és a CYP1A, CYP2B és CYP3A enzimek előtérbe kerülésével jár.
4. A konfokális lézer endomikroszkópia alkalmas vizsgálómódszer a máj regionális funkciójának minimál-invazív, célzott mérésére kísérletes keretek között.

7. Összefoglalás

Bevezetés. A tervezett maradékmáj elégtelen mennyiségénél fogva primeren irrezekábilis májtumорок kezelésének eszköze a daganatos lebenyek *vena portae* ágainak lekötése („portal vein ligation”, PVL), mely az érintett lebenyek (LL) atrófiája és az ellenoldali lebenyek (NLL) hipertrofiája révén teszi lehetővé a reszekciót. A morfológiai folyamatokkal ellentétben a májfunkció kritikus klinikai jelentőségű változásai nem kellően ismertek. *Célkitűzésünk* a PVL indukálta májregeneráció során a máj morfológiájában és kulcsfontosságú szerves anion transzportjának (I. kísérlet), valamint drogmétabolizmusának (II. kísérlet) globális-, valamint regionális funkcionális kapacitásában bekövetkező változások vizsgálata volt.

Módszerek. Hím Wistar patkányokon (200-240g) a máj 80%-ára kiterjedő PVL-t hoztunk létre, vizsgálatainkat preoperatív (kontroll), és a posztoperatív 24/48/72/168/336. órákban végeztük. I. kísérletünkben (n=106) májtömeg mérés, MRI-volumetria, *in vitro* sejtkultúra alapú transzporter immunfluoreszcencia (IF) és transzport vizsgálat, *ex vivo* transzporter IF, *in vivo* szelektív epeúti drenázs, epe- és szérum analízis, indocián-zöld clearance teszt (ICG), ^{99m}Tc-mebrofenin hepatobiliáris szcintigráfia (HBS) és konfokális lézer endomikroszkópia történt. II. kísérletünkben (n=24) májtömegmérés, pentobarbital sleeping teszt, kulcsfontosságú citokróm P450 (CYP) 1A/2B/2C/3A enzimaktivitás, CYP 1A2/2B1/2B2/2C6/2C11/2C13/3A1 mRNS expressziók meghatározása, valamint CYP3A1 immunhisztokémia történt.

Eredmények. PVL hatására LL atrofizált, NLL hipertrofizált, a globális májfunkció (ICG, HBS, pentobarbital sleeping teszt) átmenetileg csökkent, míg a bilirubin elimináció megtartott volt. *In vitro*, mindkét lebenyből mindvégig kinyerhetők voltak életképes, funkcionáló sejtek. *In vivo*, LL szerves anion transzportja és drogmétabolizmusa tartósan károsodott, míg NLL funkciói a 72. órát követően jelentős növekedést mutattak. A CYP1A/2B/3A alcsaládok NLL-ben adaptív funkciófokozódást, míg a CYP2C elnyúló károsodást mutattak.

Konklúziók. PVL-t követően a LL mindvégig tartalmaz életképes sejteket, a máj átmeneti globális funkciózavarát NLL drámai, funkcionális inhomogenitásához vezető funkciógyarapodása állítja helyre, a drogmétabolizmus adaptív, CYP-izoforma függő válasza jön létre. Rutinszerű regionális májfunkció vizsgálat és CYP-izoforma alapú személyre szabott medicina kritikus a májsebészetben és *vena portae* okklúzió kapcsán.

8. Summary

Introduction. Selective portal vein ligation (PVL) allows the two-stage surgical resection of primarily unresectable liver tumours with a low anticipated future liver remnant by generating the atrophy and hypertrophy of portally ligated (LL) and non-ligated lobes (NLL), respectively. Unlike morphological changes, clinically critically important liver functional alterations remain incompletely characterised. Our goal was the evaluation of changes in hepatic morphology as well as the global- and regional functional capacities of hepatic organic anion transport (Experiment I) and drug metabolism (Experiment II) during PVL induced liver regeneration.

Methods. Male Wistar rats (200-240g) underwent PVL affecting ~80% liver parenchyma; analyses were conducted preoperatively ('control'), as well as 24/48/72/168/336 hours after PVL. In Experiment I (n=106), liver weight measurements, MRI-volumetry, *in vitro* cell culture-based transporter immunofluorescence (IF) and transport analysis, *ex vivo* IF, *in vivo* selective bile drainage, bile and serum analysis, indocyanine-green clearance test (ICG), ^{99m}Tc-mebrofenin hepatobiliary scintigraphy (HBS) and confocal laser endomicroscopy were performed. In Experiment II (n=24), liver weight measurements, pentobarbital sleeping test, assessment of key cytochrome P450 (CYP)1A/2B/2C/3A enzyme activities and CYP 1A2/2B1/2B2/2C6/2C11/2C13/3A1 mRNA expressions, as well as CYP3A1 immunohistochemistry were realised.

Results. PVL resulted in LL atrophy and NLL hypertrophy, the temporary depression of global liver function (ICG, HBS, pentobarbital sleeping test), whereas bilirubin elimination remained unchanged. *In vitro*, viable and functioning cells were always found in both lobes. *In vivo*, the organic anion transport and drug metabolism of the LL was permanently depressed, whereas NLL functions dramatically rose beyond 72h. CYP1A/2B/3A subfamilies in the NLL displayed an adaptive functional increment, whereas the CYP2C subfamily was prolongedly deteriorated.

Conclusions. Following PVL, viable cells are maintained in the LL. The temporary reduction in global liver function is restored by the dramatic functional rise of the NLL, leading to hepatic functional inhomogeneity. Drug metabolism displays an adaptive, CYP-isoform-dependent response. Routine testing of regional liver function and CYP-isoform-based personalised medication are critical in liver surgery and during procedures incorporating portal vein occlusion.

9. Irodalomjegyzék

1. Child CG, Turcotte JG. (1964) Surgery and portal hypertension. *Major Probl Clin Surg* 1:1-85.
2. Pugh R, Murray-Lyon I, Dawson J, Pietroni M, Williams R. (1973) Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *British Journal of Surgery* 60(8):646-649.
3. Ge P-L, Du S-D, Mao Y-L. (2014) Advances in preoperative assessment of liver function. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International* 13(4):361-370.
4. De Groen PC, Gores GJ, LaRusso NF, Gunderson LL, Nagorney DM. (1999) Biliary tract cancers. *New England Journal of Medicine* 341(18):1368-1378.
5. Bismuth H. (1982) Surgical anatomy and anatomical surgery of the liver. *World Journal of Surgery* 6(1):3-9.
6. Couinaud C. (Le foie: études anatomiques et chirurgicales, Paris, 1957. (Masson et Cie).
7. de Graaf W, van Lienden KP, van den Esschert JW, Bennink RJ, van Gulik TM. (2011) Increase in future remnant liver function after preoperative portal vein embolization. *British Journal of Surgery* 98(6):825-834.
8. Geisel D, Lüdemann L, Keuchel T, Malinowski M, Seehofer D, Stockmann M, Hamm B, Gebauer B, Denecke T. (2013) Increase in left liver lobe function after preoperative right portal vein embolisation assessed with gadolinium-EOB-DTPA MRI. *European radiology* 23(9):2555-2560.
9. Clavien P-A, Petrowsky H, DeOliveira ML, Graf R. (2007) Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *New England Journal of Medicine* 356(15):1545-1559.
10. Trencsényi-Waldapfel I. (2001) Görög regék és mondák, Móra Ferenc Könyvkiadó. (Budapest).
11. Bengmark S, Ekberg H, Evander A, Klofver-Stahl B, Tranberg KG. (1988) Major liver resection for hilar cholangiocarcinoma. *Annals of Surgery* 207(2):120-125.
12. Jakab F. (2018) [Milestones in liver surgery]. *Orv Hetil* 159(10):375-383.
13. Szijártó A, Fülöp A. (2018) Surgical treatment of primary liver malignancies. *Magyar onkologia* 62(1):14-25.

14. van Gulik TM, van den Esschert JW, de Graaf W, van Lienden KP, Busch OR, Heger M, van Delden OM, Lameris JS, Gouma DJ. (2008) Controversies in the use of portal vein embolization. *Dig Surg* 25(6):436-444.
15. Honjo I, Kozaka S. (1965) Extensive resection of the liver in two stages. *Rev Int Hepatol* 15:309-319.
16. Kinoshita H, Sakai K, Hirohashi K, Igawa S, Yamasaki O, Kubo S. (1986) Preoperative portal vein embolization for hepatocellular carcinoma. *World journal of surgery* 10(5):803-808.
17. Makuuchi M, Thai BL, Takayasu K, Takayama T, Kosuge T, Gunven P, Yamazaki S, Hasegawa H, Ozaki H. (1990) Preoperative portal embolization to increase safety of major hepatectomy for hilar bile duct carcinoma: a preliminary report. *Surgery* 107(5):521-527.
18. Rous P, Larimore LD. (1920) Relation of the portal blood to liver maintenance: a demonstration of liver atrophy conditional on compensation. *J Exp Med* 31(5):609-632.
19. Szijártó A, Fülöp A. (2015) Triggered Liver Regeneration: From Experimental Model to Clinical Implications. *European Surgical Research* 54(3-4):148-161.
20. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer* 136(5):E359-E386.
21. Ananthakrishnan A, Gogineni V, Saeian K. (2006) Epidemiology of Primary and Secondary Liver Cancers. *Seminars in Interventional Radiology* 23(1):47-63.
22. Srivatanakul P, Sriplung H, Deerasamee S. (2004) Epidemiology of liver cancer: an overview. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 5(2):118-125.
23. Liver EAFTSOT. (2012) EASL–EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology* 56(4):908-943.
24. Caplin ME, Buscombe JR, Hilson AJ, Jones AL, Watkinson AF, Burroughs AK. (1998) Carcinoid tumour. *The Lancet* 352(9130):799-805.
25. Quartey B. (2011) Primary hepatic neuroendocrine tumor: what do we know now? *World Journal of Oncology* 2(5):209-216.

26. Song JE, Kim BS, Lee CH. (2016) Primary hepatic neuroendocrine tumor: A case report and literature review. *World journal of clinical cases* 4(8):243.
27. Jakab F (2016) A májáltétek sebészete. Májmetasztázisok sebészete a multimodális terápiaiban. *Májsebészet*, ed Jakab F (Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest), pp 136-139.
28. Kemeny N. (2007) Presurgical chemotherapy in patients being considered for liver resection. *The Oncologist* 12(7):825-839.
29. Tomlinson JS, Jarnagin WR, DeMatteo RP, Fong Y, Kornprat P, Gonen M, Kemeny N, Brennan MF, Blumgart LH, D'Angelica M. (2007) Actual 10-year survival after resection of colorectal liver metastases defines cure. *Journal of Clinical Oncology* 25(29):4575-4580.
30. Braunwarth E, Stättner S, Fodor M, Cardini B, Resch T, Oberhuber R, Putzer D, Bale R, Maglione M, Margreiter C. (2018) Surgical techniques and strategies for the treatment of primary liver tumours: hepatocellular and cholangiocellular carcinoma. *European Surgery* 50(3):100-112.
31. Liver EAftSot. (2016) EASL Clinical Practice Guidelines on the management of benign liver tumours. *Journal of hepatology* 65(2):386.
32. Forner A, Reig ME, de Lope CR, Bruix J (2010) Current strategy for staging and treatment: the BCLC update and future prospects. *Seminars in liver disease*, (© Thieme Medical Publishers), pp 061-074.
33. Llovet JM, Brú C, Bruix J (1999) Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Seminars in liver disease*, (© 1999 by Thieme Medical Publishers, Inc.), pp 329-338.
34. Torzilli G, Belghiti J, Kokudo N, Takayama T, Capussotti L, Nuzzo G, Vauthey J-N, Choti MA, De Santibanes E, Donadon M. (2013) A snapshot of the effective indications and results of surgery for hepatocellular carcinoma in tertiary referral centers: is it adherent to the EASL/AASLD recommendations? An observational study of the HCC East-West study group. *Annals of surgery* 257(5):929-937.
35. Akamatsu N, Cillo U, Cucchetti A, Donadon M, Pinna AD, Torzilli G, Kokudo N. (2017) Surgery and hepatocellular carcinoma. *Liver cancer* 6(1):44-50.

36. Galle PR, Tovoli F, Foerster F, Wörns MA, Cucchetti A, Bolondi L. (2017) The treatment of intermediate stage tumours beyond TACE: From surgery to systemic therapy. *Journal of hepatology* 67(1):173-183.
37. Glantzounis G, Paliouras A, Stylianidi M-C, Milionis H, Tzimas P, Roukos D, Pentheroudakis G, Felekouras E. (2017) The role of liver resection in the management of intermediate and advanced stage hepatocellular carcinoma. A systematic review. *European Journal of Surgical Oncology*.
38. Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD. (2005) Cholangiocarcinoma. *The Lancet* 366(9493):1303-1314.
39. Yusoff AR, Razak MMA, Yoong BK, Vijeyasingam R, Siti ZM. (2012) Survival analysis of cholangiocarcinoma: a 10-year experience in Malaysia. *World journal of gastroenterology: WJG* 18(5):458.
40. Breitenstein S, Apestegui C, Petrowsky H, Clavien PA. (2009) "State of the art" in liver resection and living donor liver transplantation: a worldwide survey of 100 liver centers. *World J Surg* 33(4):797-803.
41. Clavien P-A, Emond J, Vauthey JN, Belghiti J, Chari RS, Strasberg SM. (2004) Protection of the liver during hepatic surgery. *Journal of gastrointestinal surgery* 8(3):313-327.
42. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F, Ammatuna M, Morabito A, Gennari L. (1996) Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *New England Journal of Medicine* 334(11):693-700.
43. Dhir M, Melin AA, Douaiher J, Lin C, Zhen WK, Hussain SM, Geschwind J-FH, Doyle MBM, Abou-Alfa GK, Are C. (2016) A review and update of treatment options and controversies in the management of hepatocellular carcinoma. *Annals of surgery* 263(6):1112-1125.
44. Earl TM, Chapman WC (2013) Transplantation for hepatocellular carcinoma: the North American experience. *Multidisciplinary Treatment of Hepatocellular Carcinoma*, (Springer), pp 145-164.
45. Manizate F, Hiotis SP, Labow D, Roayaie S, Schwartz M. (2010) Liver functional reserve estimation: state of the art and relevance for local treatments: the Western perspective. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 17(4):385-388.

46. (GODT) GOODAT. (2017) Annual rate of Total Liver Transplantation (Total Deceased + Total Living + Total Domino) Worldwide, 2017. (Global Observatory On Donation And Transplantation (GODT)).
47. Transplantes E-ONd. (2018) Newsletter Transplant International figures on donation and transplantation 2017. (EDQM-Organización Nacional de Transplantes), pp 42-46.
48. Dutkowski P, De Rougemont O, Müllhaupt B, Clavien PA. (2010) Current and future trends in liver transplantation in Europe. *Gastroenterology* 138(3):802-809. e804.
49. Agrawal S, Belghiti J. (2011) Oncologic resection for malignant tumors of the liver. *Annals of surgery* 253(4):656-665.
50. Farges O, Fuks D, Le Treut YP, Azoulay D, Laurent A, Bachellier P, Nuzzo G, Belghiti J, Pruvot FR, Regimbeau JM. (2011) AJCC 7th edition of TNM staging accurately discriminates outcomes of patients with resectable intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer* 117(10):2170-2177.
51. Bridgewater J, Galle PR, Khan SA, Llovet JM, Park J-W, Patel T, Pawlik TM, Gores GJ. (2014) Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Journal of hepatology* 60(6):1268-1289.
52. Burke EC, Jarnagin WR, Hochwald SN, Pisters P, Fong Y, Blumgart LH. (1998) Hilar Cholangiocarcinoma: patterns of spread, the importance of hepatic resection for curative operation, and a presurgical clinical staging system. *Annals of surgery* 228(3):385.
53. Lidsky ME, Jarnagin WR. (2018) Surgical management of hilar cholangiocarcinoma at Memorial Sloan Kettering Cancer Center. *Annals of gastroenterological surgery*.
54. Bismuth H, Corlette M. (1975) Intrahepatic cholangioenteric anastomosis in carcinoma of the hilus of the liver. *Surgery, gynecology & obstetrics* 140(2):170-178.
55. Dodson RM, Weiss MJ, Cosgrove D, Herman JM, Kamel I, Anders R, Geschwind J-FH, Pawlik TM. (2013) Intrahepatic cholangiocarcinoma: management options and emerging therapies. *Journal of the American College of Surgeons* 217(4):736-750. e734.

56. Abdalla EK, Adam R, Bilchik AJ, Jaeck D, Vauthey J-N, Mahvi D. (2006) Improving resectability of hepatic colorectal metastases: expert consensus statement. *Annals of surgical oncology* 13(10):1271-1280.
57. Hamady ZZ, Lodge JPA, Welsh FK, Toogood GJ, White A, John T, Rees M. (2014) One-millimeter cancer-free margin is curative for colorectal liver metastases: a propensity score case-match approach. *Annals of surgery* 259(3):543-548.
58. Pawlik TM, Scoggins CR, Zorzi D, Abdalla EK, Andres A, Eng C, Curley SA, Loyer EM, Muratore A, Mentha G. (2005) Effect of surgical margin status on survival and site of recurrence after hepatic resection for colorectal metastases. *Annals of surgery* 241(5):715.
59. Kauffmann R, Fong Y. (2014) Post-hepatectomy liver failure. *Hepatobiliary surgery and nutrition* 3(5):238-246.
60. Rahbari NN, Garden OJ, Padbury R, Brooke-Smith M, Crawford M, Adam R, Koch M, Makuuchi M, Dematteo RP, Christophi C. (2011) Posthepatectomy liver failure: a definition and grading by the International Study Group of Liver Surgery (ISGLS). *Surgery* 149(5):713-724.
61. van Lienden KP, van den Esschert JW, de Graaf W, Bipat S, Lameris JS, van Gulik TM, van Delden OM. (2013) Portal vein embolization before liver resection: a systematic review. *Cardiovasc Intervent Radiol* 36(1):25-34.
62. Urata K, Hashikura Y, Ikegami T, Terada M, Kawasaki S (2000) Standard liver volume in adults. *Transplantation proceedings*, pp 2093-2094.
63. Heinemann A, Wischhusen F, Püschel K, Rogiers X. (1999) Standard liver volume in the Caucasian population. *Liver transplantation and surgery* 5(5):366-368.
64. Vauthey JN, Abdalla EK, Doherty DA, Gertsch P, Fenstermacher MJ, Loyer EM, Lerut J, Materne R, Wang X, Encarnacion A. (2002) Body surface area and body weight predict total liver volume in Western adults. *Liver transplantation* 8(3):233-240.
65. Ribero D, Chun YS, Vauthey J-N (2008) Standardized liver volumetry for portal vein embolization. *Seminars in interventional radiology*, (Thieme Medical Publishers), p 104.

66. Lehmann K, Rickenbacher A, Weber A, Pestalozzi BC, Clavien P-A. (2012) Chemotherapy before liver resection of colorectal metastases: friend or foe? *Annals of surgery* 255(2):237-247.
67. Dede K, Láng I, Pörnczi B, Mester G, Fekete A, Kőszegi G, Mersich T, Besznyák I, Bursics A. (2013) Preoperatív kemoterápia a colorectalis májjáttétes betegek sebészi kezelésében. *Magyar Sebészet* 66(6):325-330.
68. Dede K, Mersich T, Besznyák I, Zaránd A, Salamon F, Baranyai Z, Landherr L, Jakab F, Bursics A. (2013) Bevacizumab treatment before resection of colorectal liver metastases: safety, recovery of liver function, pathologic assesment. *Pathology & Oncology Research* 19(3):501-508.
69. Dede K, Salamon F, Landherr L, Jakab F, Bursics A. (2015) Pathologic assessment of response to chemotherapy in colorectal cancer liver metastases after hepatic resection: which method to use? *Pathology & Oncology Research* 21(1):173-179.
70. Von Frerichs FT (1879) *A clinical treatise on diseases of the liver* (Wood and Co., New York).
71. Schnitzbauer AA, Lang SA, Goessmann H, Nadalin S, Baumgart J, Farkas SA, Fichtner-Feigl S, Lorf T, Goralcyk A, Hörbelt R. (2012) Right portal vein ligation combined with in situ splitting induces rapid left lateral liver lobe hypertrophy enabling 2-staged extended right hepatic resection in small-for-size settings. *Annals of surgery* 255(3):405-414.
72. Olthof PB, Schnitzbauer AA, Schadde E. (2018) The HPB controversy of the decade: 2007-2017-ten years of ALPPS. *European Journal of Surgical Oncology*.
73. Serenari M, Zanella M, Schadde E, Toschi E, Ratti F, Gringeri E, Masetti M, Cillo U, Aldrighetti L, Jovine E. (2016) Importance of primary indication and liver function between stages: results of a multicenter Italian audit of ALPPS 2012–2014. *HPB* 18(5):419-427.
74. Hahn O, Dudás I, Pajor P, Györke T, Korom C, Zsirka-Klein A, Kupcsulik P, Harsányi L. (2013) ALPPS (Associated Liver Partition and Portal vein ligation for Staged hepatectomy)--faster and greater growth of liver. *Magyar sebeszet* 66(1):21-26.

75. Koós O, Kovács T, Fülöp A, Pekli D, Ónody P, Lukovich P, Harsányi L, Kupcsulik P, Hahn O, Szijártó A. (2015) The importance of postoperative circulatory alterations in hepatic surgery. *Orvosi hetilap* 156(48):1938-1948.
76. Budai A, Fulop A, Hahn O, Onody P, Kovacs T, Nemeth T, Dunay M, Szijarto A. (2017) Animal models for associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS): Achievements and future perspectives. *European Surgical Research* 58(3-4):140-157.
77. Fausto N, Riehle KJ. (2005) Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 12(3):181-189.
78. Michalopoulos GK. (2007) Liver regeneration. *Journal of cellular physiology* 213(2):286-300.
79. Taub R. (2004) Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(10):836-847.
80. Higgins GM, and R. M. Anderson. . (1931) Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.* 12:186-202.
81. Abshagen K, Eipel C, Vollmar B. (2012) A critical appraisal of the hemodynamic signal driving liver regeneration. *Langenbeck's Archives of Surgery* 397(4):579-590.
82. Adibi S, Paschkis KE, Cantarow A. (1959) Stimulation of liver mitosis by blood serum from hepatectomized rats. *Experimental Cell Research* 18(2):396-398.
83. Mortensen KE, Conley LN, Nygaard I, Sorenesen P, Mortensen E, Bendixen C, Revhaug A. (2010) Increased sinusoidal flow is not the primary stimulus to liver regeneration. *Comp Hepatol* 9:2.
84. Fulop A, Budai A, Czigany Z, Lotz G, Dezso K, Paku S, Harsanyi L, Szijarto A. (2015) Alterations in hepatic lobar function in regenerating rat liver. *J Surg Res* 197(2):307-317.
85. Yamasaki M, Ikeda K, Nakatani K, Yamamoto T, Kawai Y, Hirohashi K, Kinoshita H, Kaneda K. (1999) Phenotypical and morphological alterations to rat sinusoidal endothelial cells in arterialized livers after portal branch ligation. *Arch Histol Cytol* 62(5):401-411.

86. Michalopoulos GK. (2014) Advances in liver regeneration. *Expert review of gastroenterology & hepatology* 8(8):897-907.
87. Madoff DC, Abdalla EK, Gupta S, Wu T-T, Morris JS, Denys A, Wallace MJ, Morello Jr FA, Ahrar K, Murthy R. (2005) Transhepatic ipsilateral right portal vein embolization extended to segment IV: improving hypertrophy and resection outcomes with spherical particles and coils. *Journal of vascular and interventional radiology* 16(2):215-225.
88. Hoekstra LT, de Graaf W, Nibourg GA, Heger M, Bennink RJ, Stieger B, van Gulik TM. (2013) Physiological and biochemical basis of clinical liver function tests: a review. *Annals of surgery* 257(1):27-36.
89. Mullin EJ, Metcalfe MS, Maddern GJ. (2005) How much liver resection is too much? *Am J Surg* 190(1):87-97.
90. Rassam F, Olthof PB, Bennink RJ, van Gulik TM. (2017) Current Modalities for the Assessment of Future Remnant Liver Function. *Visceral Medicine* 33.
91. Schneider PD. (2004) Preoperative assessment of liver function. *Surgical Clinics of North America* 84(2):355-373.
92. Nishiyama Y, Yamamoto Y, Hino I, Satoh K, Wakabayashi H, Ohkawa M. (2003) ^{99m}Tc galactosyl human serum albumin liver dynamic SPET for pre-operative assessment of hepatectomy in relation to percutaneous transhepatic portal embolization. *Nuclear medicine communications* 24(7):809-817.
93. Uesaka K, Nimura Y, Nagino M. (1996) Changes in hepatic lobar function after right portal vein embolization. An appraisal by biliary indocyanine green excretion. *Annals of surgery* 223(1):77.
94. Garcea G, Ong S, Maddern G. (2009) Predicting liver failure following major hepatectomy. *Digestive and Liver Disease* 41(11):798-806.
95. Donadon M, Costa G, Cimino M, Procopio F, Del Fabbro D, Palmisano A, Torzilli G. (2015) Safe hepatectomy selection criteria for hepatocellular carcinoma patients: a validation of 336 consecutive hepatectomies. The BILCHE score. *World journal of surgery* 39(1):237-243.
96. Breitenstein S, Apestegui C, Petrowsky H, Clavien PA. (2009) "State of the art" in liver resection and living donor liver transplantation: a worldwide survey of 100 liver centers. *World journal of surgery* 33(4):797-803.

97. Armuzzi A, Candelli M, Zocco MA, Andreoli A, De Lorenzo A, Nista EC, Miele L, Cremonini F, Cazzato IA, Grieco A. (2002) Breath testing for human liver function assessment. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 16(12):1977-1996.
98. Pastor CM, Müllhaupt B, Stieger B. (2014) The role of organic anion transporters in diagnosing liver diseases by magnetic resonance imaging. *Drug Metabolism and Disposition* 42(4):675-684.
99. Geisel D, Lüdemann L, Hamm B, Denecke T (2015) Imaging-Based Liver Function Tests—Past, Present and Future. *RöFo-Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren*, (© Georg Thieme Verlag KG), pp 863-871.
100. Ghibellini G, Leslie EM, Pollack GM, Brouwer KL. (2008) Use of tc-99m mebrofenin as a clinical probe to assess altered hepatobiliary transport: integration of in vitro, pharmacokinetic modeling, and simulation studies. *Pharmaceutical research* 25(8):1851.
101. de Graaf W, Bennink RJ, Heger M, Maas A, de Bruin K, van Gulik TM. (2011) Quantitative assessment of hepatic function during liver regeneration in a standardized rat model. *Journal of Nuclear Medicine* 52(2):294-302.
102. Fan ST. (2010) Liver functional reserve estimation: state of the art and relevance for local treatments: the Eastern perspective. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences* 17(4):380-384.
103. Imamura H, Sano K, Sugawara Y, Kokudo N, Makuuchi M. (2005) Assessment of hepatic reserve for indication of hepatic resection: decision tree incorporating indocyanine green test. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery* 12(1):16-22.
104. Keiding S. (2012) Bringing physiology into PET of the liver. *Journal of Nuclear Medicine* 53(3):425-433.
105. Lauber DT, Fülöp A, Kovács T, Szigeti K, Máthé D, Szijártó A. (2017) State of the art in vivo imaging techniques for laboratory animals. *Laboratory animals* 51(5):465-478.
106. de Graaf W, Häusler S, Heger M, van Ginhoven TM, van Cappellen G, Bennink RJ, Kullak-Ublick GA, Hesselmann R, van Gulik TM, Stieger B. (2011)

- Transporters involved in the hepatic uptake of 99m Tc-mebrofenin and indocyanine green. *Journal of hepatology* 54(4):738-745.
107. Oldhafer F, Ringe KI, Timrott K, Kleine M, Ramackers W, Cammann S, Jäger MD, Klempnauer J, Bektas H, Vondran FW. (2016) Monitoring of liver function in a 73-year old patient undergoing ‘Associating Liver Partition and Portal vein ligation for Staged hepatectomy’: case report applying the novel liver maximum function capacity test. *Patient Safety in Surgery* 10(1):1.
 108. Olthof PB, Tomassini F, Huespe PE, Truant S, Pruvot FR, Troisi RI, Castro C, Schadde E, Axelsson R, Sparrelid E, Bennink RJ, Adam R, van Gulik TM, de Santibanes E. (2017) Hepatobiliary scintigraphy to evaluate liver function in associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy: Liver volume overestimates liver function. *Surgery* 162(4):775-783.
 109. Truant S, Baillet C, Deshorgue AC, El Amrani M, Huglo D, Pruvot F-R. (2017) Contribution of hepatobiliary scintigraphy in assessing ALPPS most suited timing. *Updates in Surgery*:1-9.
 110. Bennink RJ, Dinant S, Erdogan D, Heijnen BH, Straatsburg IH, van Vliet AK, van Gulik TM. (2004) Preoperative assessment of postoperative remnant liver function using hepatobiliary scintigraphy. *Journal of Nuclear Medicine* 45(6):965-971.
 111. Dinant S, de Graaf W, Verwer BJ, Bennink RJ, van Lienden KP, Gouma DJ, van Vliet AK, van Gulik TM. (2007) Risk assessment of posthepatectomy liver failure using hepatobiliary scintigraphy and CT volumetry. *Journal of Nuclear Medicine* 48(5):685-692.
 112. Stockmann M, Lock JF, Malinowski M, Niehues SM, Seehofer D, Neuhaus P. (2010) The LiMAX test: a new liver function test for predicting postoperative outcome in liver surgery. *Hpb* 12(2):139-146.
 113. McKinnon RA, Hall PdIM, Quattrochi LC, Tukey RH, McManus ME. (1991) Localization of CYP1A1 and CYP1A2 messenger RNA in normal human liver and in hepatocellular carcinoma by in situ hybridization. *Hepatology* 14(5):848-856.
 114. Van Beers BE, Pastor CM, Hussain HK. (2012) Primovist, Eovist: what to expect? *Journal of hepatology* 57(2):421-429.

115. Hundorfean G, Chiriac MT, Mudter J, Neurath MF. (2013) Confocal laser endomicroscopy provides potential differentiation criteria between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 19(4):E61-64.
116. Schneider C, Johnson SP, Gurusamy K, Cook RJ, Desjardins AE, Hawkes DJ, Davidson BR, Walker-Samuel S. (2017) Identification of liver metastases with probe-based confocal laser endomicroscopy at two excitation wavelengths. *Lasers in surgery and medicine* 49(3):280-292.
117. Wu T, Heuillard E, Lindner V, About GB, Ignat M, Dillenseger J-P, Anton N, Dalimier E, Gossé F, Fouré G. (2016) Multimodal imaging of a humanized orthotopic model of hepatocellular carcinoma in immunodeficient mice. *Scientific reports* 6.
118. Martignoni M, Groothuis GM, de Kanter R. (2006) Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 2(6):875-894.
119. Zanger UM, Schwab M. (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & therapeutics* 138(1):103-141.
120. Zuber R, Anzenbacherova E, Anzenbacher P. (2002) Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *Journal of cellular and molecular medicine* 6(2):189-198.
121. Monostory K, Pascussi J-M. (2008) Regulation of Drug-metabolizing Human Cytochrome P450s. *Acta Chimica Slovenica* 55(1).
122. Pascussi JM, Dvorák Z, Gerbal-Chaloin S, Assenat E, Maurel P, Vilarem MJ. (2003) Pathophysiological factors affecting CAR gene expression. *Drug metabolism reviews* 35(4):255-268.
123. Temesvári M, Kóbori L, Paulik J, Sárváry E, Belic A, Monostory K. (2012) Estimation of drug-metabolizing capacity by cytochrome P450 genotyping and expression. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 341(1):294-305.
124. 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.
125. Jemnitz K, Veres Z, Vereczkey L. (2010) Contribution of high basolateral bile salt efflux to the lack of hepatotoxicity in rat in response to drugs inducing cholestasis in human. *Toxicological sciences* 115(1):80-88.
 126. Seglen PO. (1976) Preparation of isolated rat liver cells. *Methods in cell biology* 13:29-83.
 127. Lengyel G, Veres Z, Szabó P, Vereczkey L, Jemnitz K. (2005) Canalicular and sinusoidal disposition of bilirubin mono- and diglucuronides in sandwich-cultured human and rat primary hepatocytes. *Drug metabolism and disposition* 33(9):1355-1360.
 128. Abdolmaleki A, Moghimi A, Ghayour MB, Rassouli MB. (2016) Evaluation of neuroprotective, anticonvulsant, sedative and anxiolytic activity of citicoline in rats. *European journal of pharmacology* 789:275-279.
 129. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry* 193(1):265-275.
 130. Burke MD, Thompson S, Elcombe CR, Halpert J, Haaparanta T, Mayer RT. (1985) Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochemical pharmacology* 34(18):3337-3345.
 131. Miners JO, Birkett DJ. (1996) [15] Use of tolbutamide as a substrate probe for human hepatic cytochrome P450 2C9. *Methods in enzymology* 272:139-145.
 132. Kronbach T, Mathys D, Umeno M, Gonzalez FJ, Meyer UA. (1989) Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P450 IIIA4. *Molecular pharmacology* 36(1):89-96.
 133. Peinnequin A, Mouret C, Birot O, Alonso A, Mathieu J, Clarençon D, Agay D, Chancerelle Y, Multon E. (2004) Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC immunology* 5(1):3.
 134. Abdalla EK, Vauthey J-N, Ellis LM, Ellis V, Pollock R, Broglio KR, Hess K, Curley SA. (2004) Recurrence and outcomes following hepatic resection,

- radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases. *Annals of surgery* 239(6):818-827.
135. Vauthey J-N, Chaoui A, Do K-A, Bilimoria MM, Fenstermacher MJ, Charnsangavej C, Hicks M, Alsfasser G, Lauwers G, Hawkins IF. (2000) Standardized measurement of the future liver remnant prior to extended liver resection: methodology and clinical associations. *Surgery* 127(5):512-519.
136. Schreckenbach T, Liese J, Bechstein WO, Moench C. (2012) Posthepatectomy liver failure. *Digestive surgery* 29(1):79-85.
137. Kovács T, Máthé D, Fülöp A, Jemnitz K, Bártai-Konczos A, Veres Z, Török G, Veres DS, Horváth I, Szigeti K, Homolya L, Szijártó A. (2017) Functional shift with maintained regenerative potential following portal vein ligation. *Scientific Reports* 7(1):18065.
138. Lauber DT, Dóra Krisztina T, Zoltán C, Tibor K, András B, Dóra D, András F, Attila S. (2016) Liver regeneration after different degrees of portal vein ligation. *Journal of Surgical Research* 0(0).
139. Takemura S, Minamiyama Y, Hirohashi K, Kubo S, Funae Y, Kinoshita H. (2006) Recovery of hepatic function determined by cytochrome P450-dependent drug metabolism lags after compensatory hepatic volume changes after portal vein ligation in rats. *J Surg Res* 134(2):285-291.
140. Farrell GC, Koltai A, Zaluzny L, Murray M. (1986) Effects of portal vein ligation on sex hormone metabolism in male rats: Relationship to lowered hepatic cytochrome P 450 levels. *Gastroenterology* 90(2):299-305.
141. Liddle C, Murray M, Farrell GC. (1989) Effect of liver regeneration on hepatic cytochrome P450 isozymes and serum sex steroids in the male rat. *Gastroenterology* 96(3):864-872.
142. Mai I, Krüger H, Budde K, Johne A, Brockmöller J, Neumayer H, Roots I. (2000) Hazardous pharmacokinetic interaction of Saint John's wort (*Hypericum perforatum*) with the immunosuppressant cyclosporin. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics* 38(10):500-502.
143. Mandelbaum A, Pertzborn F, Martin-Facklam M, Wiesel M. (2000) Unexplained decrease of cyclosporin trough levels in a compliant renal transplant patient. *Nephrology Dialysis Transplantation* 15(9):1473-1474.

144. Mullins ME, Horowitz BZ, Linden DH, Smith GW, Norton RL, Stump J. (1998) Life-threatening interaction of mibefradil and β -blockers with dihydropyridine calcium channel blockers. *Jama* 280(2):157-158.
145. Lau H, Man K, Fan ST, Yu WC, Lo CM, Wong J. (1997) Evaluation of preoperative hepatic function in patients with hepatocellular carcinoma undergoing hepatectomy. *British journal of surgery* 84(9):1255-1259.
146. Kameoka N, Chijiwa K, Kozaki N, Makino I, Naito T, Tanaka M. (1996) Hepatic adenine nucleotides and DNA synthesis during the regenerative and atrophic process of the liver lobes after selective portal vein ligation. *European surgical research* 28(3):212-221.
147. Kucuktulu U, Alhan E, Tekelioglu Y, Ozekin A. (2007) The effects of pentoxifylline on liver regeneration after portal vein ligation in rats. *Liver International* 27(2):274-279.
148. Starkel P, Laurent S, Petit M, Van Den Berge V, Lambotte L, Horsmans Y. (2000) Early down-regulation of cytochrome P450 3A and 2E1 in the regenerating rat liver is not related to the loss of liver mass or the process of cellular proliferation. *Liver* 20(5):405-410.
149. Hashimoto M, Watanabe G. (2001) Changes in functional capacity after portal branch ligation in rats. *Surgery today* 31(12):1065-1069.
150. Duncan JR, Hicks ME, Cai S-R, Brunt EM, Ponder KP. (1999) Embolization of portal vein branches induces hepatocyte replication in swine: a potential step in hepatic gene therapy. *Radiology* 210(2):467-477.
151. van de Laarschot LF, Jansen PL, Schaap FG, Damink SWO. (2016) The role of bile salts in liver regeneration. *Hepatology international* 10(5):733-740.
152. Csanaky IL, Aleksunes LM, Tanaka Y, Klaassen CD. (2009) Role of hepatic transporters in prevention of bile acid toxicity after partial hepatectomy in mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 297(3):G419-G433.
153. Brandoni A, Hazelhoff MH, Bulacio RP, Torres AM. (2012) Expression and function of renal and hepatic organic anion transporters in extrahepatic cholestasis. *World journal of gastroenterology: WJG* 18(44):6387.

154. Iusuf D, van de Steeg E, Schinkel AH. (2012) Functions of OATP1A and 1B transporters in vivo: insights from mouse models. *Trends in pharmacological sciences* 33(2):100-108.
155. van den Esschert JW, van Lienden KP, Alles LK, van Wijk AC, Heger M, Roelofs JJ, van Gulik TM. (2012) Liver regeneration after portal vein embolization using absorbable and permanent embolization materials in a rabbit model. *Annals of surgery* 255(2):311-318.
156. Huang J-Y, Yang W-Z, Li J-J, Jiang N, Zheng Q-B. (2006) Portal vein embolization induces compensatory hypertrophy of remnant liver. *World journal of gastroenterology* 12(3):408.
157. Lainas P, Boudechiche L, Osorio A, Coulomb A, Weber A, Pariente D, Franco D, Dagher I. (2008) Liver regeneration and recanalization time course following reversible portal vein embolization. *Journal of hepatology* 49(3):354-362.
158. Olthof P, Huisman F, van Golen R, Cieslak K, van Lienden K, Plug T, Meijers J, Heger M, Verheij J, van Gulik T. (2016) Use of an absorbable embolization material for reversible portal vein embolization in an experimental model. *British Journal of Surgery* 103(10):1306-1315.
159. Tranchart H, Koffi G, Gaillard M, Lainas P, Poüs C, Gonin P, Nguyen T, Dubart-Kupperschmitt A, Dagher I. (2016) Liver regeneration following repeated reversible portal vein embolization in an experimental model. *British Journal of Surgery* 103(9):1209-1219.
160. Szijártó A, Hargitai B, Fischer S, Darvas K, Kupcsulik P. (2009) Two-staged procedure of portal ligation and hepatectomy monitored by ICG clearance. *Journal of Investigative Surgery* 22(1):63-68.
161. Fan S-t, Lai EC, Lo C-m, Ng IO, Wong J. (1995) Hospital mortality of major hepatectomy for hepatocellular carcinoma associated with cirrhosis. *Archives of surgery* 130(2):198-203.
162. Lam C, Fan S, Lo C, Wong J. (1999) Major hepatectomy for hepatocellular carcinoma in patients with an unsatisfactory indocyanine green clearance test. *British journal of surgery* 86(8):1012-1017.
163. Cieslak KP, Olthof PB, van Lienden KP, Besselink MG, Busch OR, van Gulik TM, Bennink RJ. (2015) Assessment of liver function using ^{99m}Tc-mebrofenin

- hepatobiliary scintigraphy in ALPPS (associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy). *Case reports in gastroenterology* 9(3):353-360.
164. Hundorfean G, Chiriac MT, Mudter J, Neurath MF. (2012) Confocal laser endomicroscopy provides potential differentiation criteria between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammatory bowel diseases*.
165. Schneider C, Johnson SP, Walker-Samuel S, Gurusamy K, Clarkson MJ, Thompson S, Song Y, Totz J, Cook RJ, Desjardins AE. (2016) Utilizing confocal laser endomicroscopy for evaluating the adequacy of laparoscopic liver ablation. *Lasers in surgery and medicine* 48(3):299-310.
166. Pascussi J-M, Gerbal-Chaloin S, Pichard-Garcia L, Daujat M, Fabre J-M, Maurel P, Vilarem M-J. (2000) Interleukin-6 negatively regulates the expression of pregnane X receptor and constitutively activated receptor in primary human hepatocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 274(3):707-713.
167. Aitken AE, Richardson TA, Morgan ET. (2006) Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46:123-149.
168. Slaviero KA, Clarke SJ, Rivory LP. (2003) Inflammatory response: an unrecognised source of variability in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of cancer chemotherapy. *The lancet oncology* 4(4):224-232.
169. Shimada M, Murayama N, Yamauchi K, Yamazoe Y, Kato R. (1989) Suppression in the expression of a male-specific cytochrome P450, P450-male: difference in the effect of chemical inducers on P450-male mRNA and protein in rat livers. *Archives of biochemistry and biophysics* 270(2):578-587.
170. Kobayashi H, Yoshida S, Sun Y-J, Shirasawa N, Naito A. (2013) Gastric estradiol-17 β (E2) and liver ER α correlate with serum E2 in the cholestatic male rat. *Journal of Endocrinology* 219(1):39-49.
171. Kobayashi H, Yoshida S, Sun Y-J, Shirasawa N, Naito A. (2013) Gastric estrogen increases pituitary estrogen receptor α and prolactin mRNAs during the different pathological conditions of the liver. *Endocrine* 43(1):170-183.

172. Kobayashi H, Yoshida S, Sun Y-J, Shirasawa N, Naito A. (2016) 17β -Estradiol in the systemic circulation derives mainly from the parietal cells in cholestatic female rats. *Journal of endocrinological investigation* 39(4):389-400.
173. Schoen JM, Wang HH, Minuk GY, Lutt WW. (2001) Shear stress-induced nitric oxide release triggers the liver regeneration cascade. *Nitric oxide* 5(5):453-464.

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1. Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. **Kovacs T***, Mathe D*, Fulop A, Jemnitz K, Batai-Konczos A, Veres Z, Torok G, Veres DS, Horvath I, Szigeti K, Homolya L§, Szijarto A§

Functional shift with maintained regenerative potential following portal vein ligation
SCIENTIFIC REPORTS 7: Paper 18065. 14 p. (2017)

** Kovacs T, Mathe D megosztott első szerzők; § Homolya L, Szijarto A megosztott utolsó szerzők*

IF: 4.122

2. **Kovács T**, Déri M, Fülöp A, Pálházy T, Háfra E, Sirok D, Kiss Á, Lotz G, Szijártó A, Monostory K:

Isoform-Dependent Changes in Cytochrome P450-Mediated Drug Metabolism after Portal Vein Ligation in the Rat

EUROPEAN SURGICAL RESEARCH 59: (5-6) pp. 301-19. (2018)

IF: 1.343

10.2. Egyéb közlemények

3. Lauber DT, Tihanyi DK, Czigan Z, **Kovacs T**, Budai A, Drozgyik D, Fulop A, Szijarto A

Liver regeneration after different degrees of portal vein ligation.

JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH 203:(2) pp. 451-458. (2016)

IF: 2.187

4. Budai A, Fulop A, Hahn O, Onody P, **Kovacs T**, Nemeth T, Dunay M, Szijarto A
Animal Models for Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy (ALPPS): Achievements and Future Perspectives

EUROPEAN SURGICAL RESEARCH 58:(3-4) pp. 140-157. (2017)

IF: 1.343

5. Lauber DT, Fulop A, **Kovacs T**, Szigeti K, Mathe D*, Szijarto A*

State of the art in vivo imaging techniques for laboratory animals

LABORATORY ANIMALS: THE INTERNATIONAL JOURNAL OF LABORATORY ANIMAL SCIENCE AND WELFARE 51:(5) pp. 465-478. (2017)

„Attila Szijártó and Domokos Máthé are joint senior authors”

IF: 1.450

6. Koos O, **Kovacs T**, Fulop A, Pekli D, Onody P, Lukovich P, Harsanyi L, Kupcsulik P, Hahn O, Szijarto A

A posztoperatív keringésváltozások jelentősége a májsebészetben [The importance of postoperative circulatory alterations in hepatic surgery]

ORVOSI HETILAP 156:(48) pp. 1938-1948. (2015)

IF: 0.291

7. Rosero O, Ónody P, **Kovács T**, Molnár D, Lotz G, Tóth Sz, Turóczi Zs, Fülöp A, Garbaisz D, Harsányi L, Szijártó A

Impaired Intestinal Mucosal Barrier upon Ischemia-Reperfusion: “Patching Holes in the Shield with a Simple Surgical Method”

BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL 2014: Paper 210901. 11 p. (2014)

IF: 1.579

8. Rosero O, Onody P, **Kovacs T**, Molnar D, Fulop A, Lotz G, Harsanyi L, Szijarto A
Postconditioning: "Toll-erating" mesenteric ischemia-reperfusion injury?

SURGERY 161:(4) pp. 1004-1015. (2017)

IF: 3.574

9. Rosero Olivér*, **Kovács Tibor***, Ónody Péter, Harsányi László, Szijártó Attila
Bakteriális transzlokáció: rés a pajzson [Bacterial translocation: gap in the shield]

ORVOSI HETILAP 155:(8) pp. 304-312. (2014)

**Rosero Olivér és Kovács Tibor egyenlő mértékben vett részt a mű megszerkesztésében.*

10. Ónody P., Rosero O., **Kovács T.**, Garbaisz D., Hegedüs V., Lotz G., Harsányi L., Szijártó A: Posztkondicionálás – A távoli szervi dysfunkciók ellenszere?

MAGYAR SEBÉSZET, 65 (4); 222-229 (2012)

11. Köszönetnyilvánítás

E fejezet első soraiban mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani **Dr. Szijártó Attilának**, a Semmelweis Egyetem I. sz. Sebészeti Klinika Igazgató helyettesének, habilitált egyetemi docensének, s egyben a Klinika szárnyai alatt működő Kísérletes Sebészeti Részleg korábbi és aktuális vezetőjének. Immáron nyolc éve téma- és munakhelyi vezetőmként, tanáromként, mentoromként, előljáró példaként hatalmas szerepet játszott érdeklődésem felkeltésében és folytonos megújulásában a tudományos világ, orvostudományi- és sebészeti állatkísérletes-, valamint klinikai kutatások, a hasi- és általános-, valamint ér- és legfőképpen májsebészet iránt. Hol inspiráló motivációval, türelmes segítséggel, hol éles, konstruktív szakmai kritikával, feszes szigorral, hol a messzi távlatok és távoli perspektívák láttatásával elévülhetetlen szerepet játszott mind tudományos-, szakmai és vezetői fejlődésemben, mind tudományos diákkörös (TDK) hallgatói, mezenteriális keringészavarokkal kapcsolatos munkáim, szakdolgozatom, mind indukált májregenerációval kapcsolatos doktoranduszi munkám, kutatásaim, kísérleteim és jelen doktori értekezésem létrejöttében. Szakmai, a sebészet- és a hepatopancreatobiliaris sebészet terén meglévő tudása, speciális jártassága, valamint tudományos eredményei továbbra is követendő példát jelentenek számomra. Tudományos, szakmai-, valamint ezeken túlmenően emberi és baráti tanácsaiért, beszélgetéseinkért mindig hálás leszek.

A fenti soroktól el nem maradóan, szinte azokra (vagy sokkal inkább közé) írandóan szeretném hatalmas köszönetemet és hálámat kifejezni **Dr. Fülöp András**, az I. sz. Sebészeti Klinika sebész szakorvosjelöltje, egyben tudományos munkatársa, és a Kísérletes Sebészeti Részleg megbízott vezetője részére, aki a jómagam, és doktorandusz kollégáim munkáját, kutatásait labor- és tudományos vezetőként a legnagyobb lelkiismeretességgel, segítőkészséggel, odaadással és a legmagasabb szakmai kvalitásokkal segítette, vezette, koordinálta. Fáradhatatlan munkája, valamint szakmai-, tudományos és kritikai észrevételei hatalmas segítséget jelentettek az állatkísérletes kutatás operatív, metodikai, technikai, elméleti és publikációs kvalitásainak elsajátításában és útvesztőinek kiismerésében, melyek nélkül sem a jelen dolgozat, sem az annak alapjánul szolgáló kutatások nem készülhettek volna el. Szakmai és tudományos kvalitása, mentalitása, munka- és teherbírása, türelme, embersége révén szintén követendő példaként és jó barátként, bajtársént gondolok rá.

Szintén hatalmas köszönettel és hálával tartozom **Dr. Rosero Olivérnek**, későbbi PhD-hallgató kollégámnak. Bár e dolgozat elkészültében közvetlen nem, de áttételesen annál inkább involvált, hiszen korábbi TDK-hallgatói munkacsoport- és projektvezetőként hatalmas szerepe van tudományos, állatkísérletes, sebészeti kutatási pályámon való elindulásom, operatív, technikai és publicisztikai ismereteim megszerzésének elősegítésében, melyek végül a szakmai- és tudományos alapot és készségeket biztosították a PhD-képzésbe lépéshez, illetve jelen kutatásaim megkezdéséhez. Mindezek mellett Olivért szintén örömmel mondhatom jó barátomnak.

Szeretnék továbbá köszönetet mondani **Dr. Ónody Péternek**, **Dr. Czigány Zoltánnak**, illetve **Dr. Turóczy Zsoltnak**, **Dr. Garbaisz Dávidnak** és **Dr. Arányi Péternek** laborunk „PhD-öregdiákjainak” akik akár korábbi munkacsoport vezetőimként, akár anélkül tudományos munkámban ismételten hatalmas segítségemre, fejlődésemre voltak, legyen szó akár szakdolgozat/rektori/tudományos pályázatról, vagy TDK-előadásról, s akiket a közös emlékek révén szintén barátaimként tarthatok számon.

Köszönet illeti **Dr. Kupcsulik Péter** és **Dr. Harsányi László** Professzor Urakat, a Semmelweis Egyetem I. sz. Sebészeti Klinikájának korábbi- és jelenlegi igazgatóit, amiért a Klinika szárnyai alatt a Kísérletes Sebészeti Részleget ismételten útjára indították, illetve a későbbiekben működését lehetővé tették. Köszönöm támogatását, illetve kifogyhatatlan kedvességét **Dr. Darvas Katalin** Professzor Asszonynak is.

Sorban haladva köszönet doktorandusz hallgatótársaimnak, **Dr. Budai Andrásnak**, **Dr. Tihanyi Dórának** és **Dr. Pálházy Tímeának**, akikkel az elmúlt éveket együtt töltve a tudományos világ kavalkádjában, útvesztőiben, nehézségeiben, örömeiben, sikereiben és az egész utazásban igazi munka- és büntársakként és összetartó barátokként ott voltunk egymásnak, hol tudományos, szakmai, hol baráti tanácsot/vigaszt nyújtva egymásnak, olykor a tudományos pedantéria, olykor a jóindulatú/csipkelődő/epés tréfa hangjain. „Nekünk”, nekik, és az utánunk következőknek (aktuálisan: **Dr. Keczer Bánk**) további sikereket és minden jót kívánok.

Külön köszönet az általam vezetett munkacsoportba tartozó, s együtt dolgozó TDK-hallgatóknak: **Dr. Bencsics Máté**, **Dr. Nagy Petronella**, **Lévay Klára**, **Dr. Szinvai Attila**, **Dr. Kovács Kristóf**, **Dr. Illés Kristóf**, **Dr. Szilágyi Katalin**, **Dr. Koós Olivér**, **Rozman Petra**, **Dr. Lauber Dávid**, **Aszódi Bence**, **Czakó Krisztina**, **Dr. Pálla Péter**, **Dr. Juhász Dávid**, **Dr. Csinta Borbála**, **Dr. Katona Dávid**. Tevékeny segítségük, és

közös csapatmunkánk szintén nagyban hozzájárult az itt leírtak valóra válásához, s akikkel – remélhetőleg legalábbis többükkel - eközben szintén jó munka- és emberi kapcsolatunk alakult ki. Köszönet a Kísérletes Sebészeti Részleg kötelékében korábbi kollégáimnak (**Dr. Hegedüs Viktor, Dr. Pekli Damján, Dr. Dániel Ádám, Dr. Pomizs István, Dr. Ferreira Gábor, Dr. Tamás Judit, Dr. Drozgyik Dóra**), illetve minden további volt és aktuális munkatársának. Külön említés nélkül köszönet az I. sz. Sebészeti Klinika munkatársai, orvos- és nem orvos kollégáim számára is.

Jelen kutatásaink létrejöttében természetesen felülbecsülhetetlen szerepű kollaborációs munkacsoportjaink munkatársainak erőfeszítései. Köszönet a Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetéből **Dr. Máthé Domokos, Dr. Szigeti Krisztián, Dr. Veres Dániel Sándor, Horváth Ildikó, és Dr. Kis Petikova Katarina**; a Semmelweis Egyetem II. sz. Patológiai Intézetéből **Dr. Lotz Gábor és Azumahné Kovács Erzsébet**; a Magyar Tudományos Akadémia Természettudományos Kutatóközpontjának Szerves Kémiai Intézetéből **Dr. Jemnitz Katalin, Dr. Veres Zsuzsanna, és Dr. Bártai-Konczos Attila**; valamint az azonos intézet Enzimológiai Intézetéből **Dr. Homolya László, Dr. Monostory Katalin, Dr. Török György, Déri Máté, Háfra Edit, Kiss Ádám Ferenc, Sirok Dávid és Tóth Katalin** munkatársaknak.

Hálás köszönet szüleimnek, **Édesapámnak és Édesanyámnak, Testvéreimnek, egész családomnak** és kedves barátaimnak (köztük **Bohner Gergő, Kozma Richárd Zoltán, Töreki Balázs, Matlák Péter és Suhajda Balázs**) az elapadhatatlan türelmért, érdeklődésért, töretlen támogatásért, néha oly jól eső vigasztalásért és együtt örülésért, amellyel kutatásaim, képzésem és az eddigiek során mindvégig körülvettek, és amelyből hatalmas erőt és kitartást tudtam meríteni. Külön említés **Bohner Gergőnek**, aki bár más képzésben, de szintén PhD-hallgató társamként, bajtársamként, s annál inkább, kedves jó barátomként őszintén tudott osztozni a doktoranduszi léttel járó feladatokban, kihívásokban, nehézségekben és örömeinkben. Végezetül köszönet **Dr. Czuczor Petrának**, aki bár a mondat másik felében elbizonytalanodva az úton végül nem kívánt útitárs lenni, de a „Segítjük egymást...”-nak megfelelően türelmével, megértésével, bátorításával, vigaszával, örömeivel elévülhetetlen támogatást nyújtott a jelen dolgozathoz vezető munkához.