

A máj funkciójának vizsgálata vena portae elzárással kiváltott májregeneráció során

Doktori tézisek

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

1. Bevezetés

Az előfordulásuk szerint hatodik, míg a daganatos halálozás tekintetében globálisan második leggyakoribb primer májtumzorok, illetve az ezeknél is magasabb incidenciával és hasonló kilátásokkal rendelkező áttéti májdaganatok világszerte hatalmas problémát jelentenek az egészségügyi rendszer és a társadalom minden szintjén. Az uralkodó, modern multidiszciplináris szemlélet ellenére a májtumzorok kezelése döntően a (máj)sebész vállán nyugszik, amennyiben a túlélést és az onkológiai szempontokat figyelembe véve a kuratív terápia szinte egyet jelent a daganat műtéti eltávolításával. A májtranszplantáció jó eredményei, ugyanakkor komoly szakmai és anyagi feltételei mellett napjainkban a műtét világszerte elsősorban továbbra is a sebészeti reszekciót jelenti. Az intenzív terápia és egyéb társszaktmák fejlődése lehetővé tette heroikus reszekciók technikai kivitelezését, ugyanakkor a posztoperatív morbiditás és mortalitás első számú tényezője, a (poszthepatektómias) májelégtelenség révén a reszekció kiterjedésének korlátját egyre inkább a megmaradó májparenchyma („future liver remnant”, FLR) mennyisége jelentette, mellyel párhuzamosan a májsebészet paradigma váltása következett be a „Mi távolítható el?” kérdés „Mi marad meg?”-re változásával. E téren a biztonságos reszekció aktuális, konszenzuális feltétele a komputeres tomográfia (CT) volumetriával mért, teljes (tumormentes) májtérfogat legalább 20-25%-át, illetve 40-50%-át meghaladó FLR térfogathányados („egészséges”, illetve „kompromittált” májparenchyma esetén). Az ebből kifolyólag primeren irreszekábilis esetek (kuratív) kezelésére a neoadjuváns, „downstaging” kemoterápia mellett a különféle *vena portae* okklúziós (PVO) technikák adnak lehetőséget. Ezek a tumoros lebenyekhez futó *vena portae* ágak sebészeti lekötése (PVL), vagy intervencionális radiológiai embolizációja (PVE) révén kiváltott atrófiával párhuzamosan a fokozatosan kialakuló, ellenoldali (FLR) hipertrófia révén teszik lehetővé a daganat biztonságos eltávolítását második lépésben.

A máj funkcionális inhomogenitása miatt azonban a méret nem azonos a funkcióval. Ebből fakadóan kulcsfontosságú a posztoperatív szövödmények kialakulását meghatározó májfunkció mérése PVO-indukálta májregeneráció során, a reszekció optimális időzítése, illetve a klinikai kimenetel javítása érdekében. Bioszintetikus, metabolikus és eliminációs szerepeiből adódóan a májfunkció komplex fogalom, melynek megfelelően mérésére számos funkcionális teszt ismert. A szérumparámétereken alapuló, ineffektív „statikus teszteken” túl elterjedtek különféle, szérumparámétereket és klinikai jellemzőket is összesítő klinikai pontrendszerek (Child-Turcotte-Pugh score, MELD-score), melyek szintén nem kellő hatékonyságúak. A májfunkció analízisében elsődleges a „dinamikus tesztek” szerepe, melyek általában valamely szervezetbe juttatott anyag konverzióján, eliminációján, vagy nukleáris képzőközponton alapulnak. Utóbbi kettő esszenciális alapja a máj szerves anion transzportja, mely

a különféle endogén (bilirubin, epesavak, stb.) és exogén (alkaloidok, toxinok, gyógyszerek, stb.) vegyületek máj által történő eliminációjának legfőbb, központi, energiaigényes útvonalaként a májfunkció specifikus, hatékony vizsgálatát teszi lehetővé. Az eliminációs tesztek között kiemelkedő jelentőségű az indocián-zöld (ICG) keringésből eltávolításán alapuló, napjainkban világszerte leggyakoribb funkcionális eljárás, egyes szerzők által májsebészeti döntéshozatal keretében is alkalmazott ICG-clearance teszt, mely azonban csupán a teljes máj funkcióját képes mérni. A nukleáris képalkotás alapú tesztek új távlatokat nyitottak, mivel a keringésbe juttatott, májspecifikus szerves anyaghoz kapcsolt radioaktív izotóp révén lehetővé teszik a funkcionális szignálok anatómiai lokalizációját, és ezáltal tetszőleges májterület specifikus (regionális) funkciójának vizsgálatát is. Meghatározó jelentőségű a ^{99m}Tc -mebrofenin hepatobiliáris szcintigráfia (HBS), mely a teljes máj, illetve a kulcsfontosságú FLR felvételi- és exkréciós kapacitásának specifikus, szenzitív vizsgálata révén meggyőző kezdeti eredményeket mutat a PVO-indukálta májregeneráció funkcionális változásainak vizsgálata kapcsán. Továbbá a májfunkció mérése újszerű, MRI- és ^{13}C -metacetin alapú vizsgálóeljárásokkal; illetve potenciálisan az eredetileg gasztroenterológiai és bronchoalveoláris betegségek endoszkópos diagnosztikájára kifejlesztett optikai/fluoreszcens képalkotó „konfokális lézer endomikroszkópia”-val is lehetséges, mely utóbbi munkacsoportunk jelen kutatását megelőzően még nem került alkalmazásra. Végül a máj regenerációja során szintén kiemelt fontosságú drogmétabolizmusának vizsgálata, melynek kulcsfontosságú elemei a konverziós tesztekben is központi szerepű citokróm P450 (CYP) enzimek szupercsaládjának és egyes alcsaládjainak fajok közti („interspecies”) különbségeket is mutató izoformái. A CYP enzimek - különféle patológias állapotok hatására széles keretek között, pillanatszerűen változó (indukálható és gátlható) - enzimaktivitásai kritikus jelentőségűek a különféle gyógyszer-szövődmények (intoxikáció, terápiás hatásvesztés) kialakulása, potenciális megelőzése kapcsán, így ismeretük szintén magas klinikai relevanciával rendelkezik.

2. Célkitűzések

Kutatásunk során a PVL segítségével indukált májregeneráció hatására a máj morfológiájában és funkciójában kialakuló változások átfogó vizsgálatát tűztük ki célul patkány modellben. I. kísérletünkben *in vitro* sejt kultúrák, *ex vivo* szövetminták és modern *in vivo* képalkotó technikák felhasználásával a máj szerves anion transzportját; II. kísérletünkben a máj CYP enzimek mediálta drogmétabolizmusát helyeztük vizsgálataink középpontjába.

Az alábbi konkrét kérdésekre kerestünk válaszokat:

1. Izolálhatók-e életképes, primer sejt kultúrák létrehozására képes hepatociták úgy a lekötött- (LL), mint a nem-lekötött lebenyekből (NLL) a regeneráció egyes időpontjaiban?
2. Amennyiben igen, hogyan változik LL és NLL sejt kultúráiban 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 tesztjeinek (^{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 betartásával az intézményi, valamint a hatósági etikai szervezetek hivatalos engedélyével végeztük (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, Nagyvárad 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 biztosítása mellett Európai Unió szabványoknak megfelelő tartóegységekben történt.

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. Az állat háton fekvő helyzetében a has borotválását, fertőtlenítését és medianlaparotómiát követően a hasüreg feltárása történik. A belek izolálása után azonosításra kerül a máj, a májkapu képletei, illetve azok portális oszlása. 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 futó közös *vena portae* ágat, melynek a vele párhuzamosan futó artériától és epeúttól való atraumatikus elkülönítését követően szelektív lekötése történik 6-0 polipropilén sebészeti varróanyaggal (Atramat, Ciudad du México, Mexikó). 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) varratok segítségével, melyet követően az állat visszakerül ketrecébe.

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

3.3.1. Csoportbeosztás

A vizsgálatok preoperatíván („kontroll”), illetve a PVL-t 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 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. Az I. kísérlet csoportbeosztása.

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 sejtkultúrák létrehozása

A sejtkultúrák létrehozása a korábbiakban publikált, kollaborációs munkacsoportunk által alkalmazott eljárás kisméretű módosításával történt. A LL szinkron emésztődése érdekében az állatból eltávolított máj retrográd kollagenáz-perfúziója a suprahepaticus *vena cava inferior* irányából bevezetett üvegkanülön át adagolt Earl's balanced salt solution segítségével történt, első lépésben Ca²⁺-kelátor hozzáadásával, majd második lépésben ennek eltávolításával, végül harmadik lépésben Ca²⁺ ionok, és IV-es típusú kollagenáz 5 percen át tartó (*Clostridium histolyticum* kivonat, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) alkalmazásával. A preoxigenizált, 37°C hőmérsékletű, 30 ml/min áramlási sebességű, a teljes máj elhalványodásához vezető perfúzió során a végpontot a szöveti felszínek 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 életképeségű hepatocita szuszpenziókból készültek

sejtkultúrák 6- (2×10^6 sejt/kút), illetve 24 kutas ($0,36 \times 10^6$ sejt/kút) lemezeken, 5% (magzati) borjúsérum, 0,1 μ M inzulin, 0,05 μ M glukagon, 0,05 mg/ml gentamicin, 30 nM Na_2SeO_3 , és 0,1 μ M dexametazon tartalmú William's Medium E hozzáadásával. 24 órát követően a borjúsérum médiumból elhagyása történt. A párasított, 37°C-os hőmérsékleten, 5% széndioxid 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 "matrigel basement membrán mátrix"-szal (Matrigel Matrix; SoftFlow Hungary, Pécs, Magyarország) fedték. A sejtkultúra-médium cseréje 24 óránként történt.

3.3.2.2. Immunfluoreszcencia

Terminálást követően a LL és NL állományainak szövetmintáiból 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* sejtkultúrában 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) 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), illetőleg a sejtmagok jelölése 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) hozzáadásával történt. A jelölt, sejtkultúrában lévő hepatociták és fagyasztott májmetszetek piros, zöld és kék immunfluoreszcens jeleinek felvételei széles látóterű-, illetőleg konfokális mikroszkópia (Leica, Wetzlar, Németország) segítségével készültek. Negatív kontroll vizsgálat 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).

3.3.2.3. *In vitro* taurokolát és bilirubin transzport analízis

A bilirubin és taurokolát *in vitro* transzportjának vizsgálata 72 órával a sejtkultúrák létrehozása után, az érintkező sejtek közötti funkcionális epekanalikulusok kialakulását követően történt a korábban publikált módszerekkel összhangban. A bilirubin transzport vizsgálata során a sejtkultúrák 10 μ M 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 acetonitril/víz lízisét követően

mind a sejtlizátum, 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 szinuszoidális exportjának és intracelluláris (ic.) akkumulációjának meghatározását. A taurokolát transzport vizsgálatának módszere a bilirubinéhoz nagymértékben hasonló volt, ugyanakkor ez esetben a szubsztrát biztosítása 1 perces $1\ \mu\text{M}$ ^3H -taurokolát expozícióval, míg a sejtek lízise 0,5% Triton X-100 tartalmú foszfát-pufferelt fiziológias sóoldattal, a sejtlizátum és az efflux médium taurokolát tartalmának meghatározása pedig folyadék szcintigráfia segítségével történt.

3.3.3. *In vivo* vizsgálatok

3.3.3.1. *Májtömeg és májvolumen*

LL és NLL „nedves” tömege konvencionális laboratóriumi mérleggel (AG 245, Mettler-Toledo LLC, Columbus, Ohio) került meghatározásra. MRI volumetria vizsgálat [koronális T1-súlyozott „gradient echo sequencing”, 128 db 0.4 mm szeletvastagságú axiális szelet (nanoScan PET/MRI; Mediso Ltd., Budapest, Hungary)] 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. A tömeg, illetve térfogati értékek a testtömeg függvényében kerültek megadásra.

3.3.3.2. *Epeszekréció vizsgálata*

Medianlaparotomiát követően a LL és NLL szelektív epeúti drenázsát végeztük az anatómiailag megfelelő epeúti szakaszokba - operációs mikroszkóp ellenőrzés mellett - szelektíven bevezetett, fixált 1,8F polietilén kanülök (PE10, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts) segítségével. A LL és NLL által 40 perc alatt elválasztott epe laboratóriumi mérleggel (AG 245, Mettler-Toledo LLC) megmért tömege az állat testtömegének függvényében került kifejezésre. Az állatok véréből rutin laboratóriumi technikákkal citrát-antikoagulált szérumminták készültek. Az epe- és szérumminták konjugátatlan- (UCB), illetve konjugált bilirubin (BG) tartalma meghatározásra került HPLC segítségével.

3.3.3.3. *Indocián-zöld clearance teszt*

Az ICG-clearance teszt munkacsoportunk megelőző gyakorlatának módosításával történt. A belső comb borotvált felszínére egy spektrofotometriás, non-invazív neonatális szenzor (PV50200; PULSION Medical Systems, Feldkirchen, Németország) került felhelyezésre, mely egy kereskedelmi forgalomban elérhető, speciális analitikai egységhez

(PC5000 LiMON; PULSION Medical Systems) csatlakozott. Kalibrációt követően 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 (RT15).

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

0,3 ml fiziológiás sóoldatban 150 MBq dóziszú ^{99m}Tc -mebrofenin [Bromo-Biliaron 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, Hungary) történt „parallel septal ultrahigh-resolution” kollimátor (NanoSPECT-UHR, Mediso Ltd, Budapest, Hungary) segítségével 256*256 pixeles felbontással 4 projekciós síkban. A gyors felvétel és kanalikuláris leadás mérésére 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 „region of interest”,-ek (ROI) 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).

3.3.3.5. Konfokális lézer endomikroszkópia

Medianlaparotómiát követően az NLL jobb alsó lebenyének atraumatikus mobilizálása, stabilizálása történt a légzőmozgások mérséklése céljából a medianaxilláris sík magasságában rögzített műanyag fólián. Ezt követően a lézer eszköz (Cellvizio, MaunaKea Technologies, Paris, France) endoszkópos vezetőjének érzékelő fejét atraumatikusan a lebeny mediális felszínéhez fixáltuk. Laterális farokvénán át 1 ml/ttkg 1,5 mg ICG/ml desztillált víz befecskendezését követően intermittáló fény excitáció, illetve regisztráció (3 felvétel/10 mp) mellett 40 perces „timelapse” videót rögzítettünk. A felvétel 10, manuálisan kiválasztott ROI intenzitásbeli változásainak ábrázolását követően exponenciálisan növekvő, illetve csökkenő karakterisztikát alapul vevő görbeillesztéssel meghatározásra kerültek az NLL ICG felvételét- (csúcsintenzitás ideje, T_{MAX}), illetve leadását (T_{MAX} felezési ideje, $T_{1/2}$) jellemző paraméterek.

3.4. II. kísérlet – Májfunkció a drogmetabolizmus tükrében

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. A II. kísérlet csoportbeosztása.

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 „pentobarbital sleeping” teszt keretében meghatározásra került az egyszeri pentobarbital injekcióval (30 mg/ttkg pentobarbital 1 ml fiziológiás sóoldatban ip. beadva) indukált „alvási idő” hossza, melynek kezdete a háton fekvő állat ösztönös oldalra fordulási reflexének („righting reflex”) elvesztése, végét a reflex spontán visszatérése jelentette.

3.4.3. Májtómeg

LL és NLL májlebenyek, valamint teljes máj (TMT) tömegeinek meghatározása, kifejezése az I. kísérlet keretében leírtakkal egyezően, laboratóriumi mérleggel történt.

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

LL és NLL szövetmintái 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 újfént 0,1 M Tris-HCl-ben

szuszpendálva az előzőhöz hasonló paraméterekkel ismételt centrifugálás, majd a mikroszómális frakció -80°C-on tárolása történt. A mikroszómák fehérje tartalmának meghatározása standardként bovin-szérum albumin (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, Németország) felhasználásával történt Lowry és mtsai. módszere szerint. A CYP-szelektív enzimaktivitások meghatározása az irodalomban publikált módszerek szerint történt, CYP1A enzimek tekintetében az ethoxyresorufin O-deetiláció, CYP2B esetén a pentoxyresorufin O-dealkiláció, CYP2C esetében a tolbutamid 4-hidroxiláció, míg CYP3A kapcsán a midazolam 1'- és 4-hidroxiláció vizsgálatával. 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 a vonatkozó, CYP enzim(al)család-specifikus szubsztátokat (CYP1A: ethoxyresorufin; CYP2B: pentoxyresorufin; CYP2C: tolbutamid; CYP3A: midazolam) tartalmazta. Az inkubációs periódus leállítása a 60. percben jéghideg metanol, vagy acetonitril hozzáadásával történt, melyet követően HPLC történt az irodalomból ismertek alkalmazásával. A resorufin fluoreszcenciája 550 nm gerjesztési- és 589 nm emissziós hullámhosszok mellett került mérésre. 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) 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 CYP izoforma - CYP1A2, CYP2B1, CYP2B2, CYP3A1, CYP2C6, CYP2C11, CYP2C13 - specifikus primerek alkalmazásával, mely során a célgén mRNS-ének mennyiségét relatív egységekben, a hipoxantin foszforibozil-transzferáz „housekeeping gén” mRNS-e mennyiségének függvényében adtuk meg.

3.4.6. Immunhisztokémia

A LL és NLL állományából formalin-fixált-paraffinba ágyazott szöveti blokkok, majd 3-5 µm vastagságú metszetek készültek, melyet deparaffinálásuk (EZ Prep 10x, F. Hoffmann-

La Roche AG Konzern, Basel, Switzerland) és rehidrálsuk követett. Speciális oldattal (Cell Conditioning 1, Ventana Medical Systems, F. Hoffmann-La Roche AG Konzern) 30 percen át végzett antigén feltárást át 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), poliklonális, CYP3A1 ellenes nyúl antitestek (BML-CR3310-0025; Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, New York) 1:1000 hígítású, 32 perces, 42°C-on történő, a gyártó instrukcióit követő alkalmazásával. Kiegészítő hematoxylin festést követően a metszetek scannelése és digitalizálása történt.

3.5. Statisztikai analízis

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

Minden időpontban mindkét lebenyből jelentős, a minimálisan szükséges mennyiséget meghaladó életképes hepatocita (minden mintában >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 a szabályos epeúti kanalikuláris struktúrák kialakítása mellett a kulcsfontosságú Ntcp és Bsep transzporterek megfelelő lokalizációjú expresszióját mutatták. A negatív kontroll vizsgálatok specifikus kötődést tanúsítottak.

4.1.1.2. Taurokolát és bilirubin transzport analízis

Mindkét lebeny 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. A sejtek ic. taurokolát és bilirubin tartalma változatlan maradt.

4.1.2. In vivo vizsgálatok

4.1.2.1. Májtömeg és májvolumen

LL tekintetében progresszív atrófia, azaz lépcsőzetesen, szignifikánsan csökkenő májtömegek, míg NLL tekintetében szinkron, szignifikánsan növekvő lebenytömegekkel járó, előremenő hipertrófia volt megfigyelhető, melyek hatására a teljes máj tömege érdemben nem változott. A sorozat MRI-volumetriával mért LL és NLL májlebeny térfogatváltozások a májtömegekkel szignifikánsan korreláltak (LL: $r = 0,976$; $p = 0,001$; NLL: $r = 0,96$; $p = 0,002$).

4.1.2.2. Epeszekréció vizsgálata

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 epe- és szérummintákban vett frakciói (UCB/teljes bilirubin) sem változtak szignifikánsan.

4.1.2.3. *In vivo* immunfluoreszcencia

A máj szerves aniontranszportjában kulcsszerepet játszó Ntcp és Mrp2 transzporterek immunfluoreszcenciája során kontroll állatokban LL és NLL egyformán megtartott acináris struktúrái és határai voltak megfigyelhetők, valamint fiziológias, Ntcp esetén bazolaterális, Mrp2 esetén kanalikuláris transzporter expresszió. Ezzel szemben a 72. órában készült metszeteken LL-ben a transzporterek foltszerű, vélhetőleg nekroapoptotikus zónáknak megfelelő hiánya mutatkozott, míg NLL-ben foltos hiányok nem, ugyanakkor a transzporterek általánosan alacsonyabb kifejeződése volt megfigyelhető, mely változások a 336. órára mindkét lebenyben helyreálltak. Ugyanakkor az acinusok jelentős méretbeli eltérése jött létre, így LL acinusai zsugorodottak, míg NLL acinusai jelentősen megnagyobbodottak voltak. E változások a kiegészítő, reprezentatív hematoxin-eozin szövettani metszeteken is ábrázolódtak.

4.1.2.4. *Globális májfunkció*

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. 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.

4.1.2.5. *Regionális májfunkció*

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 diszkrepanciát 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.

4.2. II. kísérlet – Májfunkció a drogmetabolizmus tükrében

4.2.1. *Pentobarbital sleeping teszt*

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

4.2.2. *Májtömeg*

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 24. órában mért csökkenését követően változatlan volt.

4.2.3. *In vitro citokróm P450 enzimaktivitás*

Az „intrinsic” mikroszómális [pmol metabolizált termék/(mg mikroszómális fehérje*perc)] CYP1A és CYP3A enzimaktivitások nagymértékben hasonló eredményeket mutattak. A 24. órában mért szignifikáns emelkedésük 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. Így LL és NLL enzimaktivitásai között már 24-48. órákban is megfigyelhető, azonban a késői, 168-336. órákban legkifejezettebb szignifikáns különbség alakult ki. A CYP2B enzim aktivitási görbéje a CYP1A és CYP3A-nál látottakhoz hasonló lefutást mutatott, azonban mind a NLL 168. órás emelkedése, és következésképpen a LL és NLL különbsége csupán tendenciózusnak bizonyult. Ezzel szemben a CYP2C enzimaktivitások jelentősen eltérő karakterisztikát mutattak. Itt a PVL-t követően mindkét lebenyben 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 különbözönek adódtak.

A lebenytömeg-súlyozással kalkulált teljes CYP aktivitások általánosságban nagymértékben hasonló lefutást mutattak a megfelelő „intrinsic” enzimaktivitásoknál látottakhoz, ugyanakkor a tömegarányokkal való extrapoláció fokozottan érvényre juttatta LL és NLL különbségeit a késői posztoperatív időszakban. Így amíg LL teljes CYP aktivitásai tovább süllyedtek, addig NLL teljes CYP1A, CYP2C és CYP3A aktivitása még a 336. órában is 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 redistribúciója 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 változási 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. 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. A CYP2C6, CYP2C11 és CYP2C13 mRNS expressziói ismételt jelentősen eltérő lefutást mutattak. 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 ismételt szignifikánsan különbözőnek bizonyultak dominánsan a kései 168-336. órában (továbbá CYP2C6 és CYP2C13 tekintetében a 48. órában is).

4.2.5. Immunhisztokémia

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 közti megtartottabb expresszió révén LL és NLL CYP3A1 pozitivitása eltérőnek bizonyult a jelölt időszakban.

5. 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.

5.1. 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 sejt kultúrák 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 transzkripció mechanizmus állítja helyre a máj átmenetileg csökkent drogmetabolizmusát, 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.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. 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

6.2. Egyéb közlemények

3. Lauber DT, Tihanyi DK, Czigany 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, Turóczy 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 dysfunctiók ellenszere?

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