

Programozott májregeneráció vizsgálata
Drogmetabolizmus vizsgálata vena portae ligatúrát
követően

Szakdolgozat
Nagy Petronella



Témavezető:

Dr. med. habil. Szijártó Attila Ph.D
az MTA doktora, egyetemi docens

Dr. Fülöp András Ph.D.
sebész szakorvosjelölt

Semmelweis Egyetem
I.sz. Sebészeti Klinika
Kísérletes Sebészeti Részleg

Budapest
2019

Tartalomjegyzék

<u>Rövidítések jegyzéke</u>	3
<u>I. Bevezetés</u>	5
<u>I.1. Májáttétet adó kolorektális karcinóma (CRLM)</u>	6
<u>I.1.1. Adatok, jellemzők</u>	6
<u>I.1.2. Kezelésük</u>	7
<u>I.1.2.1. Reszekábilítási kritériumok</u>	7
<u>I.1.2.2. Sebészi stratégiák</u>	7
<u>I.1.2.3. Főbb szövődmény</u>	9
<u>I.2. Nem reszekálható CRLM problémaköre</u>	10
<u>I.2.1. Tumor “zsugorító” megoldások</u>	10
<u>I.2.1.1. Ablatív technikák</u>	10
<u>I.2.1.2. Konverziós kemoterápia</u>	11
<u>I.2.2. Indukált májregeneráció</u>	12
<u>I.2.2.1. Patomechanizmus</u>	12
<u>I.2.2.2. PVE vs. PVL</u>	14
<u>I.2.2.3. ALPPS</u>	15
<u>I.3. Preoperatív diagnosztika major májreszekciók esetén</u>	16
<u>I.3.1. Visszamaradó májterület (FLR)</u>	16
<u>I.3.2. Problémafelvetés</u>	18
<u>I.3.2.1. Drogmetabolizmus alapjai</u>	18
<u>I.3.2.2. Citokróm p450 rendszer</u>	19
<u>II. Célkitűzés</u>	21
<u>III. Anyagok és módszerek</u>	22
<u>III.1. Kísérleti elrendezés áttekintése</u>	22
<u>III.2. Kísérleti elrendezés kifejtése</u>	22
<u>III.2.1. Állatkísérlet: állatok és etikai engedélyek</u>	22
<u>III.2.2. Műteti eljárás</u>	23
<u>III.2.3. In vivo funkcionális teszt</u>	23

<u>III.2.4. Morfológiai vizsgálat</u>	24
<u>III.2.5. In vitro molekuláris diagnosztika</u>	24
<u>III.2.5.1. Enzimaktivitás meghatározása</u>	24
<u>III.2.5.2. Transzkripció meghatározása</u>	25
<u>III.2.6. Immunhisztokémia</u>	26
<u>III.2.7. Statisztikai feldolgozás</u>	26
<u>IV. Eredmények</u>	27
<u>IV.1. In vivo funkcionális teszt</u>	27
<u>IV.2. Morfológiai vizsgálat</u>	28
<u>IV.3. In vitro molekuláris diagnosztika</u>	30
<u>IV.3.1. Enzimaktivitás meghatározása</u>	30
<u>IV.3.2. Transzkripció meghatározása</u>	37
<u>IV.4. Immunhisztokémia</u>	41
<u>V. Megbeszélés</u>	43
<u>VI. Következtetések</u>	53
<u>VII. Összefoglalás</u>	54
<u>VIII. Summary</u>	56
<u>Irodalomjegyzék</u>	57
<u>Függelék</u>	66
<u>Plágium - Nyilatkozat</u>	66
<u>Köszönetnyilvánítás</u>	67

Rövidítések jegyzéke

ALPPS:	Associating Liver Partition and Portal vein Ligation for Staged hepatectomy
ASA:	American Society of Anesthesiologists, Amerikai Aneszteziológusok Társasága
CARe:	combined ablation and resection, kombinált intraoperatív abláció és reszekció
CRC:	colorectal cancer, kolorektális karcinóma
CRLM:	colorectal cancer liver metastasis, kolorektális karcinóma májmetasztázisa
CT:	computed tomography, komputertomográfia
CYP450:	cytochrome P450, citokróm P450
EGFR:	epidermal growth factor receptor, epidermális növekedési faktor receptor
EHMD:	extra-hepatic metastatic disease, extrahepatikus terjedésű áttét
FLR:	future remnant liver, visszamaradó májterület
GEC:	galactose elimination capacity, galaktóz eliminációs kapacitás
HABR:	hepatic arterial buffer response
HBS:	hepatobiliary scintigraphy, hepatobiliáris szcintigráfia
HIF1:	hypoxia-inducible factor 1, hipoxia indukálta faktor 1
HPLC:	high performance liquid chromatography, nagy teljesítményű folyadék kromatográfia
HPRT:	hipoxantin-foszforibozil-transzferáz
ICG:	indocyanine green, indocianin zöld
ICGR15:	indocyanine green retention value at 15 minutes, indocianin zöld 15 perces retenciós értéke
IL-1 β :	interleukin-1 beta
IL-6:	interleukin 6
iNOS:	inducible nitric oxide synthase, indukálható nitrogén-oxid szintáz
ISGLS:	International Study Group of Liver Surgery, Májsebészet Nemzetközi Kutatócsoportja
LL:	ligated lobe, lekötött lebeny

LM:	liver metastasis, májmetasztázis
LR:	liver resection, májreszekció
MEGX:	monoetil-glicil-xilidid
NF- κ B	nuclear factor kappa-B
NLL:	non-ligated lobe, nem lekötött lebeny
NO:	nitrogen monoxide, nitrogén-monoxid
NTCP:	Na ⁺ -taurocholate cotransporting polypeptid
OATP1B1:	organic-anion-transporting polypeptid 1B1
PHLF:	posthepatectomy liver failure, poszthepatektómiás májelégtelenség
PVE:	portal vein embolisation, porta véna embolizáció
PVL:	portal vein ligation, porta véna ligatúra
PVO:	portal vein obstruction, porta véna okklúzió
RFA:	radiofrequency ablation, rádiófrekvenciás abláció
RT-PCR:	real-time polymerase chain reaction
SOCS:	suppressor of cytokine signalling
SPF:	specific pathogen free, meghatározott kórokozóktól mentes
STAT-3:	signal transducer and activator of transcription 3
^{99m} Tc-GSA:	^{99m} Technetium-galactosyl human serum albumin, ^{99m} Technécium-galaktozil humán szérum albumin
TGF- β :	transforming growth factor beta
TNF- α :	tumor necrosis factor-alpha, tumor nekrozis faktor-alfa
TSH:	two-stage hepatectomy, kétlépcsős hepatektómia
VEGFR:	vascular endothelial growth factor receptor, vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor
$\pm$ SD:	$\pm$ standard deviation, $\pm$ standard eltérés

I. Bevezetés

A nagy kiterjedésű kolorektális karcinóma májmetasztázisainak terápiájában a páciensek számára a legjobb túlélést a sebészeti megoldás jelenti. Major májreszekciók során a parenchyma jelentős részét eltávolítják, melynek hatására számos nem kívánt szövődmény alakulhat ki, így a posztoperatív időszakban májelégtelenséghez (poszthepectomiás májelégtelenség, posthepatectomy liver failure, PHLF) és a beteg halálához vezethetnek. Ennek megelőzésére, széles körben alkalmazzák az eljárás kétféle alakított verzióját, mely első fázisában a beteg portális vénáját lekötik/embolizálják, ezt követően 3-8 hét múlva végzik el második ülésben a daganatos területek eltávolítását. Porta véna ligatúra (PVL) során a tumoros területekhez futó portális ágak lekötése történik, amely megakadályozza ezen területek megfelelő tápanyag és oxigén ellátását. A nem-lekötött (NLL) májterületek kompenzálva az atrofizáló lekötött (LL) területeket, hipertrofizálnak, így a reszekciót követően visszamaradó májterület (FLR) nagysága elegendő marad a PHLF kivédésére és így a módszer alkalmas az operábilis betegpopuláció növelésére. A volumenváltozás mellett azonban a máj funkciója, így pl. a biotranszformáció, drogmetabolizmus is átalakul, viszont a két paraméter egymáshoz viszonyított változása az irodalmi adatok alapján nem egyenesen arányos. Jelenleg a klinikumban főként a morfológiai paraméterek alapján történik az FLR becslése CT volumetria segítségével, a funkcióváltozást globális szinten pedig indocianin zöld jelölőanyag (indocyanine green, ICG) clearance meghatározásával próbálják megállapítani. Azonban utóbbi diagnosztikus módszerek nem adnak kellő információt a két lebenycsoport (LL és NLL) eltérő viszonyairól, mely a klinikai döntéshozatalt megtévesztő módon befolyásolhatja. Klinikailag továbbá releváns problémát jelent az operációt követően a funkcióbeli eltérések részeként a máj gyógyszer metabolizmusában beállt átmeneti változások vizsgálata is, hiszen a sebészeti eljárást követő gyógyszeres terápiák is szövődménnyé válhatnak az elégtelen gyógyszer mennyiség vagy az intoxikáció következtében. Az evolúció univerzális stratégiájaként, a lebontás kulcsenzimeit: a citokróm p450 rendszer kapacitásbeli változásainak vizsgálata egy lehetséges opciót jelenthet kizárólag a nem lekötött, így visszamaradó májterületek funkciójának becslésére. Felmerül tehát a kérdés, hogy a máj drogmetabolizmusa, hogyan változik a két lebenycsoport esetében, porta véna okklúziót (PVO) követően. A kérdés megválaszolására végzett kutatást - tekintve,

hogy Magyarországon először a Semmelweis Egyetem I. számú Sebészeti Klinikáján alkalmazták és a mai napig itt végzik a legnagyobb arányban az eljárást, számos európai viszonylatban is jelentős eredményt prezentálva -, indokolt módon, házon belül végeztük el.

I.1. Májáttétet adó kolorektális karcinóma (CRLM)

I.1.1. Adatok, jellemzők

A kolorektális karcinóma („colorectal cancer” - CRC) világszerte a 4. leggyakoribb daganattípus, évente 1,4 millió új esetet jelentenek. A vonatkozó irodalom a betegpopuláció fő halálozási okának a későn felfedezett májmetasztázist („colorectal cancer liver metastasis”, - CRLM) tekinti, mely az esetek 85%-ban már inoperábilis. Ennek hátterében az az anatómiai tény áll, hogy a rectum körül portocavalis anastomosis rendszer található, mely a vena rectalis superior és media kapcsolódásával összeköttetést teremt a portális és szisztémás vénás rendszer között. A máj sinusoidok fenestrált endothel borításának következtében pedig, a daganatos sejtek könnyen a parenchymába juthatnak. Ebből következik, hogy a CRC viszonylag könnyen képes hematogén úton áttétet adni a májba és így az esetek közel 60%-nál számolhatunk ilyesfajta érintettséggel a betegség lefolyása során. Ez pedig jelentősen rontja a páciensek túlélési esélyét. [1][2]

Májáttétet („liver metastasis” - LM) természetesen nem csak a colorectalis carcinoma képes adni, ám a mell-, tüdő- és fej-nyak daganatokkal szemben (melyek 5-10%-ban vezetnek LM-hez), azonban ez a daganattípus mutatja a legnagyobb képződési rátát a maga 10-20%-ával. Általánosságban azonban elmondható, hogy a máj esetében a metastázisok jóval gyakoribb előfordulást mutatnak, mint a lokálisan primeren kifejlődött elváltozások. [3][4][5][6] Felosztásuk időbeli megjelenésük és az elsődleges daganathoz való viszonyuk alapján történik. Abban az esetben, ha a primer tumor felfedezésekor már észlelhetőek áttétek, „szinkron” típusról beszélhetünk, ez a CRLM esetében 25%. Ezzel szemben, a szekunder módon megjelenő neoplasia-k, melyek csak a primer elváltozás diagnosztizálása és/vagy eltávolítása után alakulnak ki, „metakron” besorolást kapnak, mely a felfedezett CRLM-ek 60%-a. Szinkron tumoroknál agresszívabb lefolyásra számíthatunk, így ezekben az esetekben a primer

tumor és az áttét együttes eltávolítása jelentheti az életképebb terápiás megoldást.[2][7]

I.1.2. Kezelésük

CRLM kezelése során az egyetlen kuratív megoldást a sebészi reszekció jelenti. Az elmúlt évek során megjelenő multidiszciplináris szemléletnek köszönhetően az operatív eljárás neoadjuváns terápiával egészült ki, mely jelentős fejlődést eredményezett: az 5 éves túlélés 20-30%-ról 50%-ra emelkedett.

I.1.2.1. Reszekálhatósági kritériumok

A felfedezett CRLM esetek közül azonban csupán töredék tekinthető operálhatónak. A tumor reszekálhatóságának kritériumai számos változáson estek át az idők során. Elsőként Ekberg és munkatársai (1986) foglalkoztak a májreszekció indikációjának témájával. Az ő megállapításuk szerint a májdaganat térfogata, egy- vagy kétoldalosága, Dukes-féle beosztása és a reszekció típusa nem befolyásolja mérvadóan a reszekciót követő túlélést. Általuk megfogalmazott kritériumok alapján a következő paraméterek betartása számított csak: kevesebb, mint 4 elváltozás, melyek nem mutatnak extrahepatikus terjedést és eltávolításukkor 10 mm-es reszekciós szél érhető el. [8] Ezt követően 2014-ben van Dam és munkatársai kiterjesztették az indikációt olyan esetekre is, ahol 4 vagy több LM volt megtalálható, centrális vagy bilaterális elhelyezkedéstől függetlenül. Azt találták, hogy a medián 5 éves túlélés jelentősen javult, ami a kiterjesztést indokoltá teszi a növekvő szövődményes ráta és a korábbi recidíva ellenére is. [9] Majd 2017-ben Allard és társai közreadták prospektív vizsgálatuk eredményét, mely szerint a 10 vagy annál több metasztázissal rendelkező betegek esetében is elérhető volt hosszú távú túlélés, amennyiben sikerült R0/R1 reszekciót végezni és a páciensek adjuváns terápiában is részesültek. [10] Így a jelenleg érvényben lévő reszekálhatósági kritériumok értelmében nem számít sem a tumorszám, sem a metasztázisok májon belüli elhelyezkedése, az egyetlen túlélést befolyásoló tényező a visszamaradó májterület („future liver remnant” - FLR) elégséges térfogata és funkciója. Mindemellett természetesen meghatározó a műtét technikai kivitelezhetősége és a visszamaradó máj megfelelő vérellátásának (artériás, portális, vénás) és epelefolyásának biztosítása. [2]

I.1.2.2. Sebészi stratégiák

A szinkron CRLM-es betegek sebészeti kezelésének négy fő stratégiáját különbözteti meg az irodalom. A „klasszikus” vagy „kolorektum-első” típus során először a kolorektális karcinóma bélreszekciója, majd kemoterápiát követően 3-6 hónappal később a májjáttétek eltávolítása történik meg.. A „fordított” vagy „máj-első” („liver at first”) eljárás során ugyancsak két lépcsőben, de az előző megoldás sorrendjét megcserélve (azaz először az LM, kemoterápia után pedig a CRC) végzik el a daganatok kimetszését. Ennek létezik egy altípusa, melynél a hepatektómiát 3-6 ciklus kemoterápia is megelőzi, ezt nevezzük „kemoterápia-első” eljárásnak. Az első két verzióval szemben, a harmadiknál lehetőség van arra, hogy egy ülésben, kombinált módon távolítsák el a primer és szekunder elváltozásokat. [11]

Több tanulmány is vizsgálta a különböző stratégiák használhatóságát. Esposito és munkatársai 653 VIA stádiumú CRC-s, csak májmetasztázissal rendelkező beteg adatait vizsgálták meg. Azt találták, hogy a klasszikus és fordított eljárás hasonló onkológiai eredményeket adott a hosszú távú túlélés és recidíva tekintetében. [12] Egy másik, 2018-ban kiadott, 1830 beteget vizsgáló tanulmány szerint a kombinált és fordított stratégiák is hasonló hosszú távú túlélést mutattak a klasszikus eljáráshoz képest. [13] Gyakorlati szempontból a „kolorektum-első” előnyét a primer tumor közvetlen szövődményeinek (így bél obstrukciónak, vérzésnek, perforációnak) és a betegség progressziójának elkerülése adja. Ezzel szemben a „máj-első” módszerrel megelőzhetjük az áttétek olyan szintű terjedését, mely a reszekálhatóságát lehetetlenné tenné a túl kisméretű bent maradó FLR miatt. [2] [12][13]

A két lépcsőben végezhető sebészi megoldások azonban számos hátránnyal járnak. Egy 2005 és 2016 között végzett retrospektív vizsgálat a kórházi kezelési költség tekintetében szignifikáns különbséget írt le az egy ülésben végzett műtétek javára. Ezeknél a teljes ellátás 20.297 dollárba került, szemben a kétülésesek 27.522 dollárjához képest. [14] Az egészségügyre háruló növekvő gazdasági teher mellett, a kétüléses eljárások ellen szól a betegek fokozott műtéti megterhelése és a köztes idő is. Egy másik tanulmány szerint, mely 75 „máj-első” és 34 „kolorektum-első” módszerrel tervezett kezelést vizsgált, az első operációt követően az esetek 35%-ban, stratégiától függetlenül, nem tudták elvégezni a második műtetet, köszönhetően a progresszióknak és a sebészi szövődményeknek. [15]

Tekintve a fennálló ellentmondásos eredményeket a szinkron CRLM kezelést illetően Yin Z. és társai 2013-ban szisztematikus metaanalízist végeztek, melyben az egyidejű és késleltetett módszerek hatékonyságát és biztonságosságát vizsgálták. Azt találták, hogy a posztoperatív 60 napos halálozás tekintetében statisztikai különbség nem volt kimutatható a két csoport között, így a kombinált szinkron végzett műtéti megoldás elfogadható eljárás lehet gondosan kiválasztott körülmények (70 év alatt, <3 szegmensben lévő áttétek, jobb oldali colectomia és jó általános állapot) esetén. [2][16]

Összefoglalva nincs jelentős különbség a három megközelítés között, így az optimális stratégia kiválasztása megköveteli a multidiszciplináris szemléletet, valamint a beteg jellemzőinek szem előtt tartását. A számokat tekintve azonban az elmúlt évek során egyértelműen nőtt a „máj-első” és kombinált, szinkron eljárások száma: 2010 és 2015 között 26,8 %-ról 35,6%-ra emelkedett. [13]

I.1.2.3. Főbb szövegmény

CRLM esetében végzett nagy kiterjedésű hepatektómia esetében a mortalitás fő oka a műtét után bekövetkező májelégtelenség („posthepatectomy liver failure” - PHLF), melynek előfordulási gyakorisága 0,7-34% között változik az irodalomban. A széles tartomány oka az egységes definíció hiánya, valamint az eltérő társbetegségekkel rendelkező betegek vizsgálata az egyes tanulmányokban. Egy 2015-ben végzett metaanalízis szerint a PHLF kialakulására rizikót jelentenek a beteggel, a műtéttel és a májjal kapcsolatos független paraméterek. A páciensről függő faktorok közé a férfi nem, a 65 év feletti kor, az alultápláltság, valamint a cukorbetegség tartozik. A májjal kapcsolatos megbetegedések, úgymint cirrhosis, hepatitis, cholestasis; műtéti faktorként pedig a reszekció mértéke, az esetleges vérátömlesztés szükségessége ugyancsak megnövelheti a májelégtelenség kialakulásának esélyét.

A kritériumokat tekintve, 2011-ben a Májsebészet Nemzetközi Kutatócsoportja („International Study Group of Liver Surgery” - ISGLS) több mint 50 májreszekcióval foglalkozó tanulmányt vizsgálva meghatározta a definíciós szempontokat (INR érték és ezzel párhuzamosan fellépő hyperbilirubinaemia). Emellett a PHLF-t súlyosság alapján is kategorizálták, melyet a betegek klinikai kezelésétől tettek függővé. Enyhe májfunkció csökkenést posztoperatív normálisnak tekintettek, így ezek beavatkozást nem igénylő „A” kategóriát kaptak.

Szemben a „C” besorolású, jelentős májfunkció csökkenéssel és invazív beavatkozást szükségessé tevő esetekkel. [17]

A CRLM sebészi kezelése esetében, akárcsak bármely más major májreszekciót igénylő elváltozásnál, fontos a szövődmények, különösen a PHLF preoperatíván történő megfelelő rizikóbecslése. Utóbbi jelentősen befolyásolja a terápiás módszerünk (legyen az akármelyik) kimenetelét.

I.2. Nem reszekálható CRLM problémaköre

Azokban az esetekben azonban, melyeknél a kolorektális karcinóma májáttétjei nem tekinthetők reszekálhatónak, más eszközökhöz, úgynevezett „átalakító” eljárásokhoz kell folyamodni. Ahogy azt a reszekciós kritériumok fejezetben már említettem, jelenleg a legjelentősebb faktora az LM-es betegek operabilitásának a visszamaradó májterület mérete. Takashi 2013-ban a konverziós technikák indikációjának tisztázására 46 beteget felölelő retrospektív vizsgálatot végzett a korai recidívák prediktív tényezőiről. Ebben a tanulmányában következő definíciót alkalmazta a „nem reszekálható CRLM”-re: a bilobáris elhelyezkedésű, többszörös áttétek, melyek több mint 70%-os reszekciót igényelnek; minden olyan eset, melyeknél nem marad vissza elegendő májterület; mindhárom májvénába betörő daganatok; a jobb és bal oldali arteria hepatica-t vagy vena portae-t infiltráló tumorok; valamint az extrahepatikus terjedésűek (kivéve a reszekálható pulmonáris metasztázisok). [2][18] A konverziós terápiában legszélesebb körben alkalmazott két módszer-kategória: a tumorok zsugorítása, valamint a tumormentes FLR megnövelése.

I.2.1. Tumor “zsugorító” megoldások

Ahhoz, hogy a daganatokat célzottan zsugorítani tudjuk, valamilyen kémiai vagy fizikai ártalomnak kell kitennünk. Erre ideális megoldást kínálnak mind a mikro-, vagy rádiófrekvenciás hullámokat felhasználó ablációs megoldások, mind pedig a daganatos sejtek szaporodását gátló citosztatikumok használata.

I.2.1.1. Ablatív technikák

Az ablatív technikákat elsősorban nem reszekálható metastasis-oknál alkalmazzuk. A nemzetközi ablációs testület határozata alapján az eljárás azok számára indikált, akik technikailag inoperábilisak, rendelkeznek korlátozott számban

társ- vagy krónikus májbetegséggel és nem rendelkeznek elégséges májtartalékkal (FLR). Ám mivel egy biztonságos, jól tolerálható és kevésbé invazív eljárásról van szó, így reszekábilis esetben is felmerül a használata. Fontos azonban hangsúlyozni, hogy jelenleg az operábilis tumoroknál minden esetben (ha a beteg állapota lehetővé teszi), elsődleges választás a sebész megoldás.[19] Egy 53 főt vizsgáló tanulmány azt mutatta ki, hogy nincs szignifikáns különbség a reszekcióval és a rádiófrekvenciás ablációval („radiofrequency ablation” - RFA) kezelt CRLM-es páciensek 1-, 3- és 5 éves kumulatív túlélési arányában. Ellenben a recidíva aránya RFA esetében jóval magasabb. [20] Aliyev és munkatársai szerint RFA-t csak a 3 cm-nél kisebb LM-es betegeknél, a máj parenchyma mélyén található daganatoknál, magas ASA-pontszámú („American Society of Anesthesiologists” – Amerikai Aneszteziológusok Társasága által készített beosztás) betegeknél vagy kardiopulmonális komorbiditásnál érdemes alkalmazni. [21] Emellett ablációs technikákat gyakran alkalmaznak együtt hepatektómiával, kifejezetten a többszörös LM-ek esetében. Az eljárást „kombinált intraoperatív abláció és reszekció”-nak („combined ablation and resection” - CARE) nevezzük, nagy előnye pedig, hogy a kis elváltozásokat nem feltétlenül kell eltávolítani a nagyobbakkal együtt, elég ablálni őket, így nagyobb területet hagyhatunk vissza. [22]

I.2.1.2. Konverziós kemoterápia

Potenciális reszekálhatóságot érhetünk el a tumor zsugorodását kiváltó kemoterápiával. Erre a nem reszekálható CRLM esetében a standard kezelés az úgynevezett FOLFOX (oxaliplatin, fluorouracil és leukovorin) és a FOLFIRI (irinotekán, leukovorin és fluorouracil). Ezek más célzott biológiai szerekkel kombinálva, bizonyítottan növelik a tumor zsugorodásának sebességét. Ilyenek az epidermális növekedési faktor receptor („epidermal growth factor receptor”- EGFR) antitestek, mint a cetuximab és a panitumumab, valamint a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor („vascular endothelial growth factor receptor” - VEGFR) monoklonális antitestek, mint a bevacizumab. A legújabb adatok szerint a nem reszekálható CRLM-ek esetében 24-52%-ban elsőként választandó terápiás megoldás a konverziós hepatektómia [23][24][25][26]

Mindemellett fontos megemlíteni, kemoterápiát nem csak műtétet megelőzően, de az után is lehet adni adjuváns kezelés keretein belül, melynek célja a

posztoperatív recidíva kialakulás esélyének csökkentése. Erre a legelőnyösebb a metasztazektómia után az mFOLFOX6 szerek alkalmazása. [27]

I.2.2. Indukált májregeneráció

A másik megoldás, azaz a tumormentes területek megnövelésére és egyben a tumor zsugorítására is alkalmas indukált májregeneráció, mely a dolgozat témájának megfelelően hosszabban kerül kifejtésre. Ez a folyamat a vena portae valamely ágának szelektív okklúziójával képes az elzárt területeken atrófiát, a szabad véráramlású részeken pedig hipertrófiát okozni. Erre a mechanizmusra építő sebésztechnikákat összegezve porta véna okklúziós („portal vein obstruction” - PVO) eljárásoknak nevezzük, és számos kivitelezése ismert (lsd. „portal vein ligation” - PVL, „portal vein embolization” - PVE, „associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy” - ALPPS). Az indukálható parenchyma atrófia - hipertrófia már a 90-es évek óta ismert. Először Frerichs publikációja kapcsán derült rá fény, melyben a porta egy részét elzáró szifilisz gummaról számolt be, amely hasonló eredményhez vezetett.[28] Ezt a tapasztalatot felhasználva Rouis és Larimore 1920-ban kidolgozta a porta véna ligatúra (PVL) eljárásának modelljét nyúlón, majd több történelmi mérföldkő következett, melyek bebizonyították a módszerek használhatóságát a májdaganatok sebészetében.[29][30][31][32]

I.2.2.1. Patomechanizmusa

Röviden áttekintve májregeneráció patofiziológiáját: a véráramlásból kizárt területeken kialakuló atrófia, az intakt részeken pedig hipertófia két, időben egymással párhuzamosan zajló folyamat. [33] Míg az érett hepatociták, majd némi késéssel a non-parenchyma-s sejtek (Kuppfer-sejtek, csillagsejtek, epithel-sejtek) replikálódnak a periportális terektől a pericentrális részek felé haladva, addig az okkludált lebenyekben apoptózis zajlik (kivéve: patkánynál, ahol pericentrálisan nekrosis történik). [34][35][36] A folyamat az eredeti májtömeg visszanyerésekor befejeződik. Míg az intakt területeken nagyobb lobulus-ok képződnek, addig a művi elzártaknál kisebb, de normál szerkezet, alakul ki. A regeneráció emberben 2-3 hónapot is igénybe vehet, szemben a rágcsálóknál tapasztalt 7-10 nappal. [37][38]

A kialakulás okaként az irodalomban alapvetően három nézőpontot találunk: (1) a hemodinamikai változásokra, (2) a kialakuló hipoxiára és (3) a metabolikus változásokra építő elméleteket.

(1): A máj vérellátását fiziológiásan 80%-ban a vena portae, 20%-ban az arteria hepatica látja el. Amennyiben a portális keringésből kizárunk lebenyterületeket, úgy ott 40-50%-os áramláscsökkenést tapasztalunk, szemben az ipszilaterális 230%-os növekedéssel. [34][39] A számok azért nem egyeznek az eredeti eloszlással, mert a megváltozott hemodinamika miatt, a háttérben egy intrinszik szabályozó mechanizmus indul be, amelynek hatására a MALL-térben lévő adenosin kitágítja a lezárt területekhez futó artériákat. Ezt a mechanizmust nevezzük "hepatic arterial buffer response"-nak (HABR). Ezzel párhuzamosan a háborítatlan részeken mindannak a portális vérmennyiségnek át kell haladnia, ami eredetileg megoszlott az ellátási területek között. Így itt az előző folyamat fordítottját tapasztaljuk, azaz a megnövekedett nyomás miatt az adenosin kimosódik, ezzel gátolva az artériás vazodilatáció kialakulását. [40][41][42][43] Azonban a vénákban kialakuló nyomás emelkedésével a nyíróerő is fokozódni fog, mely nitrogén-monoxid („nitrogen monoxide” - NO) szintézisét indukálja, ezzel elősegítve itt a dilatáció és a sejtproliferáció megindulását. [44]

(2): A hipoxia teória gyakorlatilag ennek a kiegészítése. Eszerint hiába nő meg a portális áramlás az intakt lebenyekben, mégiscsak alapvetően kisebb oxigén tartalmú vér jut ide, ami átmenetileg mindenképpen mérsékelt hipoxiához fog vezetni. Ennek hatására a hipoxia indukálta faktor-1 („hypoxia-inducible factor 1” - HIF-1) aktiválódik, ezáltal a gének szintjén angiogenezishez és sejtproliferációhoz szükséges mediátorok fognak átíródni. [34] Két HIF-1 aktivációs csúcs figyelhető meg, melyek más-más céllal jönnek létre. Az első 24 órában maga az áramlás nő meg, míg a 72 óránál már a vaszkuláris endothel növekedés a cél. Utóbbi háttérben feltehetően az áll, hogy az intenzív sejtproliferáció hatására a sinus tér beszűkül, ezáltal avaszkuláris hepatocita cluster-ek jönnek létre, ahol ismételten oxigén hiány fog fellépni. Az újonnan aktivált HIF-1 pedig serkenteni fogja a vaszkuláris endoteliális növekedési faktort (VEGF).[45]

(3): A humorális vagy más néven metabolikus elmélet szerint valóban történnek áramlásbeli változások, ám ezek korántsem elegendőek a regeneráció kiváltásához. Ehhez a legfontosabb tényező egy, a Kuppfer sejtekből felszabaduló gyulladásos mediátor, az interleukin-6 (IL-6), mely nem csak az elindításban, de a folyamat leállításában is kulcsszerepet játszik. IL-6 és a tumor nekrosis faktor-alfa („tumor necrosis factor-alpha” - TNF- α) hatására olyan transzkripciós faktorok („nuclear factor kappa-B” - NF- κ B; „signal transducer and activator of transcription

3” - STAT-3) és korai gének (c-fos, c-jun, c-myc) aktiválódnak, melyek egyrészt érzékenyebbé teszik a hepatocitákat a növekedési jelekkel szemben („priming” folyamat), másrészt elősegítik a májsejtek sejtciklusba lépését. [46][47] Végül az IL-6 fokozódó szintje indukálja a SOCS („suppressor of cytokine signalling”) fehérjék termelődését, melyek gátolják a STAT-3-t és antiproliferatív citokinejeik („interleukin-1 beta” - IL-1 β , „tumor growth factor-beta” - TGF- β) segítségével kiváltják a májsejtek G0-ba történő visszatérését. Ezzel az indukált regenerációs folyamat lezárul.[48][49]

I.2.2.2. PVE vs. PVL

Indukált májregenerációt kiváltó okklúziós eljárások közül először a porta véna ligatúra (PVL), majd a porta véna embolizáció (PVE), legkésőbb pedig az ALPPS került leírásra. A súlyos hepatektómiát igénylő bilobáris CRLM-es betegeknél a PVE / PVL kétlépcsős hepatektómia az egyetlen gyógyító lehetőség. Az 1. szakaszban, a tumoros területeknek megfelelő portális ágak lekötésre vagy embolizálásra kerülnek, majd a megfelelő FLR elérésével, a második szakaszban kiterjedt májreszekciót („liver resection” - LR) hajtunk végre. A kétlépcsős hepatektómia fő előnye, hogy csökkenti a májelégtelenség kockázatát és növeli a remisszió esélyét.[2]

Műtét technikailag a PVL (azaz a sebészi lekötés felhelyezése az elzárandó törzsre), teljes anesztéziában, nyitott vagy laparoskopos technikával kerül kivitelezésre. Ezzel szemben PVE egy minimál invazív intervenciós technika, melynél perkután transzhepatikus katéter segítségével, ultrahanggal vagy fluoroszkópos technika vezérlése mellett juttatjuk be az embolizáló anyagot (pl.N-butil-krianoakrilát, polivinil-alkohol, zselatin, fibrin) a portális érrendszerbe. A klinikumban előforduló esetek jelentős részében kiterjesztett jobb hepatektómiát végzünk, így mindkét technikánál általában a jobb oldali vena portae ágrendszert zárjuk el (de természetesen lehetőség van bal oldali beavatkozásra is). [50][51]

Számos előny és hátrány szól mindkét megoldás mellett. Előbbinél fontos negatívum, hogy a sebészi lekötést viszonylag proximálisan helyezzük el, így intrahepatikusan kialakulhatnak új kollaterálisok a portális rendszer ágai között, ezzel csökkentve a regeneráció mértékét. Ezzel szemben PVE-nél az embolizáló anyagot egészen distalis területig is el lehet juttatni. [34] [52] A másik hátránya PVL-nek a nyitott műtéttel járó megterhelés és a hepatoduodenális területek preparálását másodlagosan követő adhéziók kialakulása, melyek a második ülésben végzett

műtétnél a tájékozódási viszonyokat és a máj mobilizálhatóságát jelentősen megnehezíthetik. Értelemszerűen ez PVE-nél nem jelent akkora problémát a minimál invazivitása miatt. [53] Azonban PVL rendelkezik jó néhány pozitívummal is: egyrészt kevésbé speciális technikáról van szó, így kivitelezéséhez nem szükséges intervenciós radiológus jelenléte, a lekötés megfelelő helyéről elég a sebész által látott színváltozással megbizonyosodni. Másodsorban ezzel együtt más hasi beavatkozás is elvégezhető, így például szinkron CRLM kombinált sebészi stratégiáját is lehetővé teszi, hisz egyszerre kivitelezhető a CRC eltávolítása és a ligatúra felhelyezése.[54]

Nem reszekálható CRLM sebészi kezelése során kettős hozzáállást tapasztalunk annak eldöntésére, hogy PVE vagy PVL az elsőként választandó a kétlépcsős eljárás első szakaszában. Egy 2017-ben végzett irodalmi áttekintés szerint az embolizáció növelte a kolorektális tumor progressziójának esélyét, a betegek 30%-a nem jutott el a reszekcióig. [55] Egy újabb retrospektív vizsgálat szerint azonban, mely a major májreszekción átesett betegek túlélési arányát nézte, nem igazolódott a PVE hosszútávú negatív hatása a kimenetelre. [56] 2017-ben metaanalízist végeztek, melyben 21 tanulmányt így összesen 1953 PVE-ben, 123 PVL-ben részesült páciens esetét hasonlították össze, annak eldöntésére, hogy melyik eljárás jár nagyobb hatékonysággal és biztonsággal. Ennek során nem találtak szignifikáns különbséget az FLR hipertrófiában, a beavatkozást követő halálozásban és morbiditásban. [57] Összességében jelenleg az az ajánlás, hogy azokban az esetekben, amikor szimplán FLR növelésére van szükség, a kisebb műtéti megterhelés miatt PVE-t érdemes alkalmazni. Kétlépcsős májreszekció esetében azonban, intraoperatív CRC eltávolítása is lehetővé válik, így optimálisabb PVL mellett dönteni.[2]

1.2.2.3. ALPPS

PVL vagy PVE segítségével végzett major májreszekciók esetében a hipertrófia kialakulása nagyjából 4-6 hetet vesz igénybe. Xiao munkacsoportja által kidolgozott eljárás során hat ciklus neoadjuváns terápiát követően végzik el az embolizációt, mely 2 hétre csökkenti a várakozási időt, ez azonban még mindig túl hosszúnak tekinthető, mivel lehetőséget teremthet a tumor progressziójára. [58] A hosszú köztes idő kiküszöbölése érdekében 2012-ben leírták az ALPPS (Associating Liver Partition and Portal vein Ligation for Staged hepatectomy) nevű technikát, melyben az első szakaszban a jobb oldali vena portae lekötése mellett egy parenchyma hasítást is végrehajtanak a ligamentum falciforme vagy a Cantlie-vonal mentén.

Második lépésként a cél FLR elérése után, itt is elvégzik a tumoros területek reszekálását, ám a két műtét között csupán 8-11 napra van szükség.[59]

Számos tanulmány készült a kétlépcsős hepatektómia („two-stage hepatectomy” - TSH) és az ALPPS összehasonlítására. Egy prospektív vizsgálat eredményeképp, a két eljárás között nem találtak különbséget a rövid távú mortalitás és mellékhatások tekintetében, azonban ALPPS esetében a reszekciós arány 92%-os volt, szemben az 52%-os TSH-val. [60] Egy másik esettanulmány szerint azonban a perioperatív szövődmények száma ALPPS esetében egyértelműen fokozódott.[61] 2018-ban metaanalízist készítettek a nem reszekálható CRLM-es betegek kezeléséről, melyben leírták, hogy nem találtak jelentős különbséget a posztoperatív FLR mennyiségében; viszont ALPPS-nál a mortalitási és morbiditási mutatók jelentősen növekedtek.[62] Ezek az eredmények azt sugallják, hogy ALPPS alkalmas lehet CRLM-es betegek kezelésére; viszont a kedvező eredményekhez elengedhetetlen a megfelelő betegek kiválasztása és egyúttal preoperatíván történő kockázatbecslés is, az eljárás előnyeiről és hátrányairól. Azt még érdemes megemlíteni, hogy ALPPS-ot ”végső megoldásként (rescue)” is alkalmazzák, azaz olyan TSH-val vagy PVE-vel kezelt CRLM-es betegek alternatív sebészeti terápiájaként, akiknél első körben nem sikerült elérni a több, mint 30%-os FLR mennyiségét.[63]

I.3. Preoperatív diagnosztika major májreszekciók esetén

I.3.1. Visszamaradó májterület (FLR)

Ahhoz tehát, hogy mind a reszekálható esetek prognózisát (vagyis a PHLF rizikóját) meg tudjuk jósolni, mind a CRC áttéttek operálhatóságát el tudjuk dönteni; szükséges ismernünk a műtét után visszamaradó területek volumenét és funkcióját. A volument tekintve az optimális érték a minimum 20-25% bennmaradó májterület, mely mind a regenerációs folyamathoz, mind a máj funkcióinak ellátásához elegendőnek bizonyul normál állapotú szerv esetén. Más a helyzet azonban olyankor, ha a beteg preoperatíván, hosszútávon (> 12 hétig) kemoterápiát kap. Ilyenkor a több mint 30%-os FLR elegendő funkcionális tartalékot jelenthet a májelégtelenség kialakulásának fokozott veszélyével szemben.[64] A máj fennálló megbetegedései ugyancsak befolyásolják a szükséges volumet, így cirrhosis, hepatitis esetén minimálisan 40%-os FLR számít biztonságosnak.

Az FLR preoperatív értékelése így a siker záloga lett. A 3D komputertomográfia („computed tomography” - CT) volumetria pontos és reprodukálható módszernek bizonyul a máj térfogatának mérésére, azonban önmagában nem elegendő az FLR becslésére. Ehhez egy képletet alkalmaznak: becsült teljes máj térfogat (cm³) = 794.41 + 1267.28 × BSA (m²). BSA egy korrelációs szám, mely a mért májtérfogatot a testfelülettel összevetve megadja a “teljes májtérfogatot”. Amennyiben pedig a mért és becsült értékeket összevetjük, az eredményt standardizálhatjuk. A képlet alkalmazásának fontosságát jelzi az a tanulmány is, mely több mint 5%-os különbséget talált a mért és becsült értékek között (a mért magasabb), ez pedig jelentősen befolyásolhatja a klinikai döntéshozatalt.[65][66]

A krónikus májbetegségeknél értelemszerűen a térfogat becslése valójában nem fog korrelálni a máj tényleges feladat végzésével (biotranszformáció, szénhidrátok, fehérjék és zsírok intermediér anyagcseréje), mely a végleges kimenetelt meghatározza. Így a klinikumban számos próbálkozás történt a morfológia mellett a funkció megállapítására is. Indocianin-zöld („indocyanine green” - ICG) clearance teszt alkalmas a májtartalék becslésére, bár főként primer májdaganatoknál és gyógyszer indukálta májbetegségeknél alkalmazzák. ICG esetén a retenciós arány 15 perc („indocyanine green retention value at 15 minutes” - ICGR15), ami azt jelenti, hogy ennyi idő szükséges az intravénásan beadott 0,5 mg/ttkg injekciót követően a detektációhoz, ám az így kapott eredmény korrelál a máj parenchyma reszekciós rátájával.[67] Azonban CRLM esetén sokszor neoadjuváns kemoterápiára is szükség van. Egy 2014-ben végzett tanulmány szerint a kemoterápia hatására kialakuló májkárosodás mértéke (steatohepatitis aktivitási pontszáma) nem korrelált szorosan az ICGR15-el. [68] Egy másik biokémiai módszer a ⁹⁹Tc-Mebrofenin, melynek máj felvételi arányát szcintigráfiával szokták értékelni. A kapott eredmény hasonlóan alakul ICGR15-höz képest, ám a klinikai gyakorlatban nem alkalmazzák, mivel nem tesz különbséget a globális és a várható májmaradék között.[66][69]

Összegezve tehát a CT volumetria és egy korrekciós egyenlet segítségével az FLR térfogata megbecsülhető. Ehhez jó kiegészítő diagnosztikai eljárás lehet az ICGR15, mely némi retenciós idővel bár, de jól jelzi a visszamardó területek összfunctióját.

I.3.2. Problémafelvetés

Látható probléma azonban, hogy a máj részfunkcióinak változását preoperatíván sem volumetrikus mérésekkel, sem globális funkciót célzó eljárásokkal jelenleg nem tudjuk előre megbecsülni. A máj pontos anyagcsere vizsgálatára számos olyan tesztet dolgoztak ki, mellyel transzkután detektorral vagy szekvenciálisan a szérumból, a köztes és a céltermékek meghatározhatóak, ám ezek többségének prediktív értéke nem megfelelő. A lidokain teszt, másnéven monoetil-glicil-xilidid (MEGX), egy több mint 200 főt felölelő tanulmány szerint, a hepatektómián átesett betegeknél és a transzplantációra váró cirrhotikus eseteknél is megbízható májfunkciós indexnek tekinthető.[66][70] Azonban a máj számos funkciója közül a drogmétabolizmust jelenleg sem tudjuk korrekten megítélni, pedig ennek ismerete elengedhetetlen lenne a páciens hatékony perioperatív farmakológiai kezeléséhez.

I.3.2.1.Drogmétabolizmus alapjai

A megfelelő gyógyszerelést csak akkor fogjuk tudni kivitelezni, ha kellően ismerjük az alkalmazott vegyület szervezeten belüli útját. Mivel alapvetően testidegen anyagokról beszélünk, ezek a felszívódást követően nem fognak tudni beépülni test szerkezeti egységébe, így a kívánt hatásuk kifejtése után fontos, hogy kiürüljenek a szervezetünkéből. A felszívódás és ürülés folyamatához azonban eltérő fizikokémiai tulajdonságra van szükség, míg előbbit a lipid-, utóbbit a vízdékonyság segíti. Ehhez viszont vegyületek szerkezetét meg kell változtatni, ezt a folyamatot nevezzük metabolizmusnak. Ennek során a polaritás fokozódik, ami az ürülés esélyét növeli, illetve az esetek nagy részében a gyógyszerhatást is megszünteti. Fontos azonban megjegyezni, hogy a folyamat kulcsenzimeit, a citokróm p450 rendszer fehérjéit, a gyógyszer átalakításon kívül más xenobiotikumok (pl. alkohol) lebontásáért és endogén anyagok (pl. szteroid hormonok, koleszterin) szintéziséért is felelősek. Így "gyógyszer-metabolizmus" kifejezés alkalmazásakor a biotranszformáció egy szűkebb funkcióját emeljük ki.

A biotranszformáció fő színtere a máj, mivel a hepatocitákban minden olyan gyógyszer-metabolizáló enzim és transzport fehérje expresszálódik, ami a biotranszformáció teljes végbe meneteléhez szükséges. Ezen kívül még olyan szervek is részt vesznek a folyamatban, melyek a külvilággal szorosabb kapcsolatban állnak, így fokozott antigén expozíciónak vannak kitéve, ám jelentőségük másodlagos. Ilyen

a szaglóm, a bélnyálkahártya, tüdő, vese, a bőr és a placenta. A máj lebontásban való szerepét az tény is fokozza, hogy a bélből felszívódó anyagoknak a májon át kell haladniuk a portális keringés megléte miatt. [71]

I.3.2.2. Citokróm p450 rendszer

A klinikai gyakorlatban alkalmazott gyógyszerek kb.70-80%-át a citokróm p450 („cytochrome P450” - CYP450) család 1, 2 és 3 alcsaládjába tartozó enzimek metabolizálják. Zanger tanulmánya szerint az enzimek expressziója és aktivitása külső és belső tényezőktől is függ; így mind a genetika, epigenetika, hormonális rendszer, mind pedig a gyógyszerek enzimindukációs hatása és különböző kóros állapotok (pl. gyulladás vagy daganatos megbetegedések) befolyásolják működésüket.[72] Egy Temesvári és társai által vezetett kísérletben, melyben transzplantációra kijelölt májak CYP mRNS szintjeit hasonlították össze, bebizonyosodott, hogy az enzimfehérjék expressziója korrelál a máj metabolikus kapacitásával. [73] Ezáltal érthetővé válik, hogy a klinikumban a preoperatív diagnosztikában miért pont ezen enzimek működésének mérése lenne a legfontosabb, hisz kapacitásbeli különbségeik a gyógyszerelés során nem várt szövődményekhez: intoxikációhoz, elégtelen gyógyszer mennyiséghez vezethetnek.

Tekintve, hogy a citokróm rendszer általi lebontó tevékenység evolúciós szinten egy univerzális stratégiának számít, így több tanulmány foglalkozott a megfelelő kísérleti állatmodell kérdésével. Martignoni és társai az egerek, patkányok, kutyák és majmok CYP profilját hasonlították össze a humánban fellelhető enzimtulajdonságokkal. Azt találták, hogy a CYP2E1 mutatja a legnagyobb fokú konzerváltságot, míg az 1A, 2C és 3A alcsládoknál lényeges eltéréseket találunk szubsztrát-specifititás és indukálhatóság tekintetében.[74] A humánhoz leginkább passzoló állatmodell a patkányé, de emellett a kutya és a majom is jól alkalmazhatóak kísérletesen.[75]

Jelen kísérletünkben patkánymodellel dolgoztunk és számos olyan citokróm enzimet vizsgáltunk, melyeket emberben és patkányban is lényeges metabolizáló szerepük miatt választottunk ki. A CYP1A2 a fajok között 80-83%-os hasonlóságot mutat, így rendkívül jó enzimmodellnek tartja az irodalom. Humánban a máj citokróm rendszerének 12%-át adja, fajspecifikusan azonban extrahepatikusan is elhelyezkedhet, így patkányban a bélben is fellelhető. A CYP2B1 és 2 enzimek patkányban 97%-ban megegyeznek és ketamin, illetve fenobarbitál lebontásban

vesznek részt. Ezek akárcsak az embernél a 2B6 és 7, szexuális dimorfizmust mutatnak: hímekben magasabb az expressziójuk. A CYP2C alcsalád izoenzimjei nem túl jó modellek, mivel jelentős különbség található az inhibíciós profiljuk, nemi orientációjuk és szubsztrát specifitásuk tekintetében is. Mivel azonban a patkányok drogmétabolizmusának legjelentősebb részét ezek az enzimek végzik, vizsgálatuk elkerülhetetlen. A fellelhető irodalom szerint a Cyp2C6 és 11 alkalmasak lehetnek, arra azonban érdemes figyelni, hogy a 11-es dominánsan hímekben fordul elő, viszont náluk a máj CYP rendszerének közel 50%-át adják. A humánban a métabolizmus szempontjából a legfontosabb biológiai jelentőségű fehérje a CYP3A4, mely piaci gyógyszerek több, mint 52%-át alakítja át. Ennek a patkányban a CYP3A1 feleltethető meg leginkább, viszont ennek a használata is korlátozottan lehetséges, mivel van némi indukció (rifampicin csak a humán enzimre hat induktívan) eltérés köztük és a tipikus szubsztrátjaik is különböznek. [74][75]

A klinikumban fellelhető egyetlen olyan diagnosztikai “eszköz”, mely a citokróm rendszer működését vizsgálja: a “CYP teszt”, melynek segítségével a perifériás vérből a leukociták CYP2C9 genotípusát tudják szűrni. Ám ez az eljárás sem alkalmas kifejezetten a visszamaradó területek drogmétabolizmus változásainak vizsgálatára. [76][77] Így érthetővé válik a következőkben kifejtésre kerülő, munkacsoportunk által kivitelezett kísérlet létjogosultsága. Hisz a kétlépcsős májreszekciók esetében a visszamaradó májterületek drogmétabolizáló képességének ismerete a klinikumban jelentős relevanciára tett szert.

II. Célkitűzés

Célkitűzésünk az volt, hogy PVL-indukált májregeneráció patkány modelljében több szinten vizsgáljuk a CYP enzimrendszer homeosztázisának és a máj drogmétabolizmusának változásait a műtét által szeparált lekötött és nem lekötött lebenycsoportokban.

Így a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Igazolható-e általunk is a szakirodalomban leírt morfológiai változás PVL eljárást követően?
2. A morfológiai változásokkal összefüggésben változik-e a máj funkciója, kifejezetten a globális drogmétabolizáló képességét megfigyelve? A biotranszformáció homogén módon változik-e a májban?
3. Mutat-e időbeli és térbeli eltérést a két lebenycsoport között a drogmétabolizmus vizsgálata kapcsán megfigyelt CYP enzimek aktivitása és transzkripciója?
4. Van-e eltérés a megfigyelt enzimcsaládok között aktivitásbeli és transzkripciósbeli változásaikat szemlélve?
5. Kimutatható-e struktúrális szinten is a molekuláris megközelítés mellett, a megfigyelt CYP enzimfehérjék kifejeződésének inhomogenitása?

III. Anyagok és módszerek

III.1. Kísérleti elrendezés áttekintése

Állatkísérletünk során 6 random csoportba (n=4) osztott 24 patkányon, a kontroll csoport kivételével, 80%-os porta véna ligatúrát hajtottunk végre. Az operációt követően 24, 48, 72, 168 és 336 óra elteltével vizsgáltuk a bekövetkező változásokat. Elsőként in vivo funkció meghatározás céljából alvási tesztet végeztünk, majd időpont terminálást követően lemértük a nem lekötött és lekötött lebenyek tömegét. Ezt követően a lebenycsoportokból homogenizátumokat készítettünk, majd vizsgáltuk az enzimaktivitásokat nagy teljesítményű folyadék kromatográfiával („high-performance liquid chromatography” - HPLC) és a vonatkozó CYP enzimek mRNS-ének transzkripcióját real-time PCR („polymerase chain reaction”) segítségével. Végül szövettani mintavételt követően paraffinba ágyazott klasszikus immunhisztokémiai eljárással a CYP3A1 protein expresszióját határoztuk meg.

III.2. Kísérleti elrendezés kifejtése

III.2.1. Állatkísérlet: állatok és etikai engedélyek

A kísérleteket a Semmelweis Egyetem Központi Állatházából beszerzett hím Wistar patkányokon hajtottuk végre, melyek tömege 210-230 g körül mozgott és meghatározott kórokozóktól mentesek voltak („specific pathogen free”- SPF). Az operációt megelőzően az állatok gondozása kifejezetten erre kialakított állatházban történt, 22-24°C fokon, mesterséges megvilágítás mellett. A fény ellátás a napszaki ritmust követte. Táplálásuk vízzel és száraz táppal történt, melyet az állatok szabadon fogyaszthattak.

Az 1998.évi XXVIII.számú törvény által, valamint 40/2013 (II.14.) Kormányrendeletben megfogalmazott, állatkísérletek végzésével kapcsolatos előírásokat munkánk során betartottuk. Munkacsoportunk számára, az állatkísérletek elvégzésére engedélyt adott a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága. (Engedélyszám: PE/EA2893-6/2016.)

III.2.2. Műtéti eljárás

A felhasznált állatokon a kontroll csoport kivételével, munkacsoportunk által kidolgozott és a humán sebészetben a kiterjesztett májreszekciónak leginkább megfeleltethető, 80%-os porta véna ligatúrát hajtottunk végre. Az eljárás kivitelezéséhez az állatok előzetes általános anesztéziai ellátására került sor, melyet intraperitoneálisan beadott 75 mg/ttkg ketaminnal (Calypsol®) és 7,5mg/ttkg xylasinnal (Sedaxilan®) végeztünk. Majd medián laparotómiát követően, kipreparáltuk a portális képleteket és lekötöttük az állatok májának medián, caudális és bal laterális lebenyéhez futó vena portae ágakat. Az állatokban elvégzett ligatúrával kapcsolatban fontos továbbá azt is megjegyezni, hogy a lekötés csupán a vénákat érintette, a párhuzamosan futó artériák és epeutak megsértése nélkül. Az atraumatikus preparálást az operációs mikroszkóp, mikroczipesz és 6-0 sebészi fonal alkalmazása biztosította. Annak megítélésére, hogy a fonalat megfelelő magasságban helyeztük el, a vizuálisan tapasztalható színváltozásokat vettük alapul, mivel a lekötött lebenyek jól látható módon elfehéredtek, így elkülöníthetővé váltak a jó vérellátású, nem lekötött területektől. Végül fiziológiás sóoldattal történt hasi lavage és intraperitoneálisan beadott, profilaktikusan alkalmazott antibiotikum (0,5 ml metronidazol /Klion®) adása után a hasfalat két rétegben zártuk. Mind az izomnál, mind a bőrnél 6-0-ás sebészi fonallal tova futó varratsort készítettünk.

III.2.3. In vivo funkcionális teszt

Első vizsgálódó eljárásunk során „*sleeping*” (*alvási*) *tesztet* végeztünk. Intraperitoneálisan 30 mg/ttkg pentobarbitál injekció beadását követően vizsgáltuk az állat májának barbiturát bontó képességét. Ehhez megfigyeltük az alvási időt, melyet a „*righting*” (oldalra fordulási) reflex elvesztése és megjelenése közti idő intervallummal határoztunk meg. A hátukra fektetett állatoknál a reflex mindaddig fennállt, míg kellően bódult állapotba nem kerültek, így az elalvás időtartama is vizsgálhatóvá vált.

III.2.4. Morfológiai vizsgálat

A random csoportokba osztott állatok terminálását az operációt követően eltérő időpontokban végeztük el (24, 48, 72, 168 és 336 óra elteltével). Ennek során eltávolításra kerültek a májlebenyek, melyek tömegét laboratóriumi mérleg (Mettler Toledo AG 245) segítségével határoztuk meg. Külön mértük le a lekötött és nem lekötött szervrészeket. Majd kiszámoltuk a lebenyek relatív tömegét, melyet a következő képlet segítségével végeztünk el: *relatív lebenytömeg = májtömeg (g)/100 g testtömeg*.

III.2.5. In vitro molekuláris diagnosztika

III.2.5.1. Enzimaktivitás meghatározása

A molekuláris vizsgálatok elvégzéséhez szükséges volt a májlebenyek megfelelő előkészítése. Ezt a következőképpen csináltuk: a lebenycsoportokból 0,1 M Tris-HCL puffer oldat segítségével homogenizátumot készítettünk, majd centrifugálással mikroszómális frakciókat különítettünk el. Puffer oldatunk kémhatása 7,4-es volt és 1mM EDTA-t valamint 154 mM KCL-t tartalmazott. A centrifugálást három részletben végeztük el: először 10.000 G gyorsulással 30 percig, majd a felülúszót 105.000 G gyorsulással 1 órán keresztül választottuk szét. Végül puffer oldatunk segítségével történő újraszuszpendálás után ismét 105.000 G-vel 1 órán át tartó centrifugálással fejeztük be a folyamatot.[78] A frakciók fehérjetartalmát pedig szérumbóvin albumin segítségével határoztuk meg.[79] A készítményeket a továbbiakban hűtőládákban elkülönítve, -80 °C fokon tároltuk. A megfelelő hőmérséklet ellenőrzése, melyről jegyzőkönyv is készült, a munkacsoport tagjai által napi rendszerességgel történt meg.

Az enzimaktivitások meghatározásához a frakciókat, azaz az állat májának mikroszómáit NADPH-termelő rendszerrel és a citokróm enzimek specifikus szubsztrátjaival reagáltattuk 10-60 percig, majd a jéghideg metanollal termináltuk a folyamatot. A CYP2C enzim esetében a szubsztrátként hozzáadott tulbutamid 4-hidroxilációs reakciója ment végbe. A CYP3A esetében a midazolam 1-4-hidroxilációja, a CYP1A-nál az etoxi-rezorufin O-deetilációja, a CYP2B esetében pedig a pentoxi-rezorufin O-dealkilációja. A reakciók eredményeként keletkezett metabolitok koncentrációját nagy teljesítményű folyadék kromatográfia segítségével

határoztuk meg. HPLC működését röviden áttekintve: a vizsgálandó anyag egy áramló mozgó fázisba vezetve, áthalad egy kromatográfiás töltetű, álló fázison, mellyel kölcsönhatásba lép. Az áthaladás gyorsasága, azaz a retenciós idő többek között a vizsgált anyag szerkezetétől függ. A gép pedig egy detektor segítségével érzékeli az oszlopon áthaladó komponensek mennyiségét. A HPLC alapvetően az analitikus diagnosztika eszköze, de számos orvosi alkalmazása is van, így például a kábítószer és D vitamin hiány kimutatása esetében.[80][81][82]

A rezorufin spektrofotometriás mennyiségi meghatározása során 550 nm-es gerjesztési és 589 nm-es emissziós hullámhosszat alkalmaztunk. Az eljárást követően a kapott eredményeket relatív egységekké extrapoláltuk, azaz az LL-ben és NLL-ben meghatározott, adott izoforma teljes aktivitását összevetettük a lebenycsoportok tömegével, így megkapva az enzim százalékos aktivitását a kontrollhoz viszonyítva.

III.2.5.2. Transzkripció meghatározása

A molekuláris diagnosztikai vizsgálat másik része során a citokin enzimek mRNS-ének expresszióját határoztuk meg real-time PCR segítségével. A vizsgálat előkészítése során a mikroszómális frakciókat TRIzol reagenssel (Molecular Research Center Inc., OH) reagáltattuk a gyártó utasítása szerint, amely lehetővé tette az RNS-ek izolálását. Majd a minták RNS koncentrációjának meghatározásához NanoDrop 100 spektrofotométert alkalmaztunk. Végül az RNS-eket reverz transzkripcióval egyszálú DNS-é alakítottuk (Maxima First Strand cDNA Szintézis Kit, Thermo Fisher Scientific Inc.), majd RT-PCR-t végeztünk (Maxima SYBR Green qPCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific Inc.).

A diagnosztika széles körben alkalmazza ezt a módszert a citokinekhez hasonlóan kis mennyiségben átvírt transzkriptumok mennyiségi meghatározására. A vizsgálat során a citokinek által szabályozott, vagy citokin jelátviteli utakban szerepet játszó gének analízise történik meg, amely közvetve információval szolgál a citokin enzimek fehérje expressziójáról.[83] Jelen esetben így az izolált RNS mintához a megfelelő CYP enzimek primerét adtuk hozzá (CYP1A2, CYP2B1, CYP2B2, CYP3A1, CYP2C6, CYP2C11, CYP2C13), és ezek segítségével végeztük el a mennyiségi mérést. Referenciaként a hipoxantin-foszforibozil-transzferáz (HPRT) géntermékét alkalmaztuk.

III.2.6. Immunhisztokémia

Utolsó eljárásunk során klasszikus immunhisztokémiát végeztünk, mellyel a CYP3A1 protein lokalizációját határoztuk meg. Ehhez szövettani mintavételre volt szükség, mely során a lekötött és nem lekötött lebenyek azonos anatómiai területeit metszettük ki, majd 24 óráig tartó, 4%-os formaldehidban való fixálásuk után, paraffinba ágyaztuk őket. Ezt követően 3-5 μm vastag metszeteket készítettünk mikrotóm segítségével, majd a minták depraffináláson és felszálló alkohol sor segítségével rehidráción estek át. Egy előhígított sejt kondicionáló anyag (Ventana Medical Systems, F. Hoffmann-La Roche AG Konzern) segítségével 30 percen keresztül végeztük az antigén kinyerést.

A standard immunhisztokémiai reakciót, az azonos feltételek (hőmérséklet, pH, reagens koncentráció) biztosítása miatt, automata (BenchMark ULTRA, Ventana Medical Systems, F. Hoffmann-La Roche AG Konzern) segítségével végeztük, amely standard diamino-benzidin kromogén szubsztrátot tartalmazott. Az antigén-antitest reakció létrejöttéhez 32 percen át, CYP3A1 elleni nyúlból származtatott primer antitesteket (BML-CR3310-0025; Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY) alkalmaztunk. Mindezt a gyártó utasításait betartva, 42°C fokon, 1:1000 hígítással dolgozva. Majd hematoxilin-eozin festést követően a metszetekről fotókat készítettünk, melyeket digitalizáltunk.

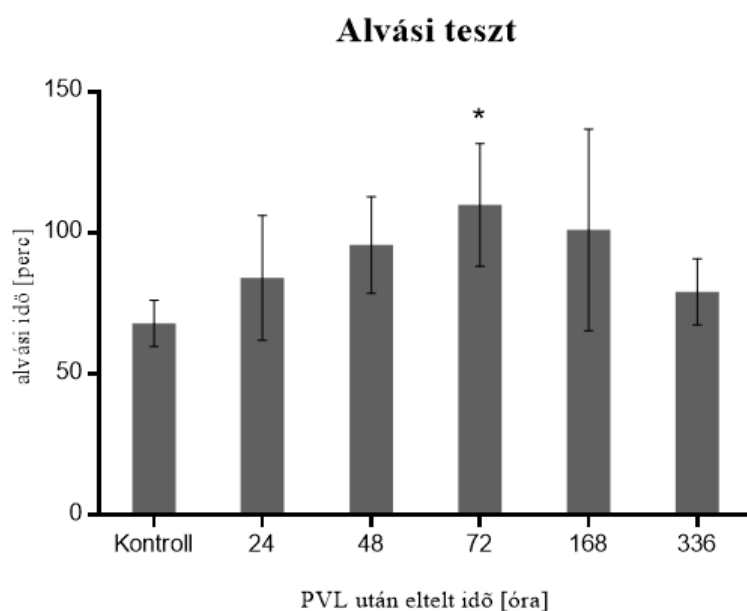
III.2.7. Statisztikai feldolgozás

Az adatok feldolgozása során a kapott értékeket átlagtól való $\pm$ szórással tüntettük fel ($\pm$ standard eltérés/ $\pm$ SD). A vizsgált csoportok között szignifikáns különbségnek a $p < 0,05$ értéket tekintettük. Adataink a kiértékelés során normál eloszlást (parametrikus) mutattak, így egy és két utas ANOVA tesztet alkalmaztunk, majd az elemzésnél Bonferroni post hoc próbával végeztük két adott csoport varianciájának összehasonlítását. Adatainkat a GraphPadPrism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) szoftver segítségével kezeltük, alakítottuk diagramokká.

IV. Eredmények

IV.1. In vivo funkcionális teszt

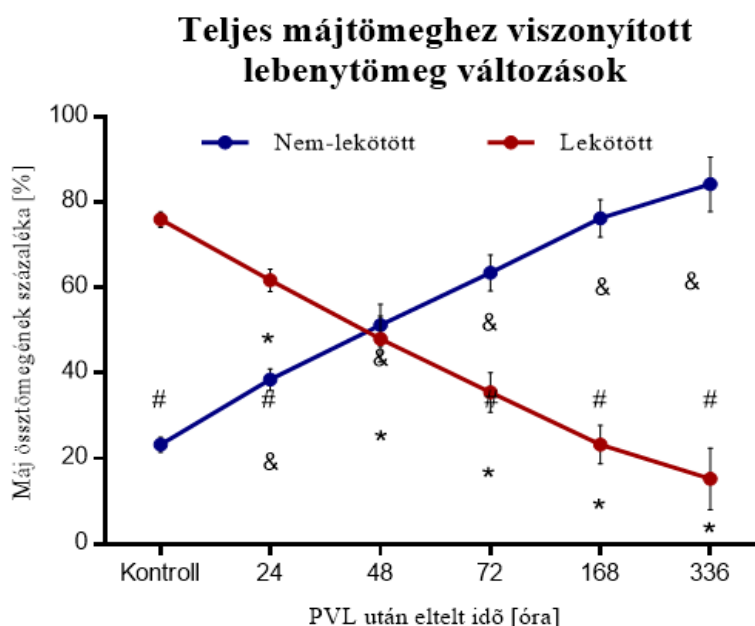
Alvási tesztünk során a drogmetabolizmus átmeneti diszfunkcióját tapasztaltuk, melyet a 72. órában mért alvási idő szignifikáns ($p = 0,0451$) emelkedése támaszt alá (1. ábra). Szemben az elalvási idővel (pentobarbitál injekciót követően az oldalra fordulási reflex elvesztése), mely a kontrollhoz viszonyítva egyik csoportban sem mutatott különbséget (ezen eredmények nincsenek itt feltüntetve), addig az alvási idő folyamatos emelkedést mutatott az operációt követően.



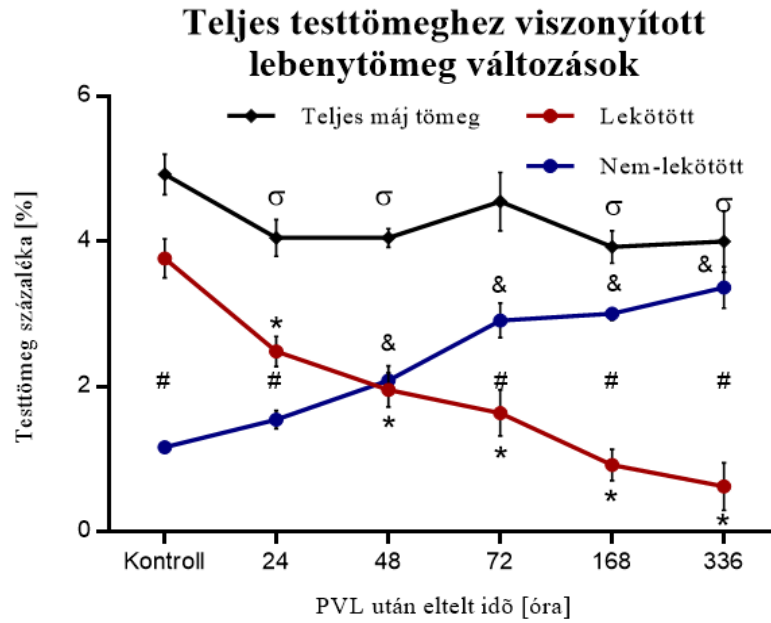
1. ábra: Alvási teszt - Alvási idő eltérései. Egy utas ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt. Jelölések: *: $p < 0,05$ vs. kontroll; oszlopok: eredmények átlaga $\pm$ S.D., $n=4$.

IV.2. Morfológiai vizsgálat

A morfológiai eredményeket tekintve, PVL-t követően a lekötött lebenyben atrófia, a nem lekötött lebenyben hipertrófia alakult ki. LL súlya, mely eredetileg a teljes májtömeg $76 \pm 1,83\%$ - a volt, a műtétet követően szignifikáns ($p < 0,0001$) csökkenést mutatott és a 336. órára az eredeti érték a teljes máj $15,25 \pm 7,18\%$ -ára módosult. Eközben NLL értékei $23,25 \pm 1,71\%$ -ról $84,25 \pm 6,4\%$ -ára nőttek, mely szintén jelentős szignifikáns ($p < 0,0001$) eltérést jelent. [Lásd 2. ábra] A teljes testtömeghez viszonyított értékek ehhez hasonlóan alakultak: LL a teljes testtömeg $3,77 \pm 0,27\%$ -áról $0,63 \pm 0,33\%$ -ra csökkent, míg NLL $1,17 \pm 0,05\%$ -ról $3,37 \pm 0,29\%$ -ra emelkedett. [Lásd 3. ábra] Ezek az eredmények megegyeznek az irodalomban leírt változások megfigyelésével. Fontos továbbá megjegyezni, hogy a lebenycsoportok között a viszonyok szinte felcserélődtek, ám a teljes májtömeg az első 24 órás csökkenést követően szignifikánsan nem változott. [Lásd 3. ábra]



2. ábra: Teljes májtömeghez viszonyított lebenytömeg változások: Atrófia – hipertrófia komplex. Két utas ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt. Jelölések: *: $p < 0,05$ LL aktuális vs. LL kontroll; &: $p < 0,05$ NLL aktuális vs. NLL kontroll; #: $p < 0,05$ LL aktuális vs. NLL aktuális; ●: eredmények átlaga $\pm$ S.D., $n=4$.



3. ábra: Teljes testtömeghez viszonyított lebenytömeg változások. Két utas ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt. Jelölések: *: $p < 0,05$ LL aktuális vs. LL kontroll; &: $p < 0,05$ NLL aktuális vs. NLL kontroll; σ : $p < 0,05$ vs. kontroll; #: $p < 0,05$ LL aktuális vs. NLL aktuális; $\bullet, \diamond$: eredmények átlaga $\pm$ S.D., $n=4$.

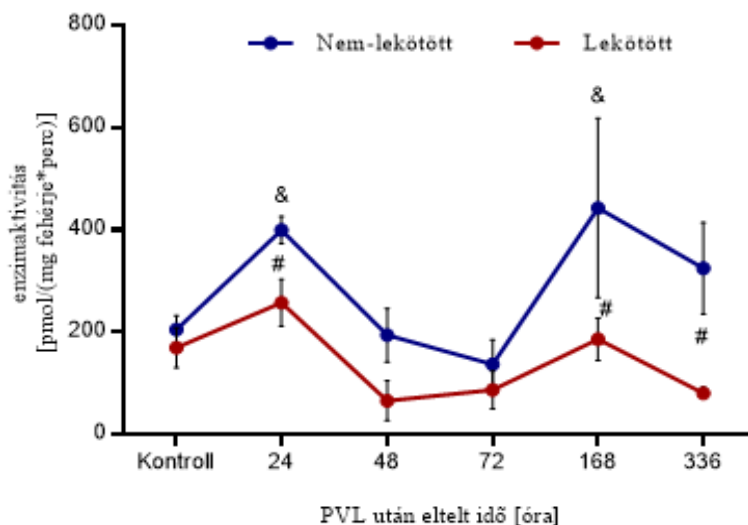
IV.3. In vitro molekuláris diagnosztika

Az enzimaktivitást és transzkripciót tekintve a vizsgált citokróm enzimcsaládok kétféle görbe lefutást mutattak. Az első csoportot a CYP3A, 1A és 2B, a második csoportot a CYP2C izotípusai adták.

IV.3.1. Enzimaktivitás meghatározása

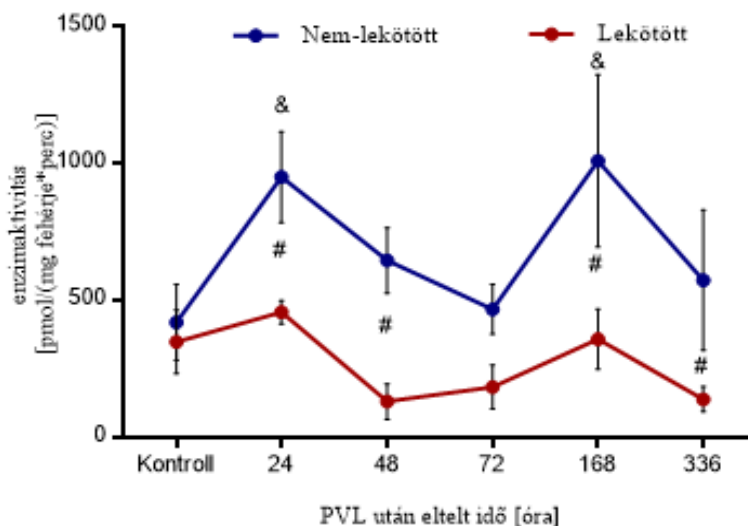
Az enzimaktivitás eredményeinek kiértékelése során először az egységnyi fehérjéhez viszonyított aktivitást vizsgáltuk, melyet (pmol / mg fehérje*perc) mértékegységgel adtuk meg. Az első csoport tagjai közül a CYP3A mutatta a legkarakterisztikusabb változásokat, de a CYP1A és 2B család tagjainak grafikonjai is hasonlóképp alakultak. A csoport tagjainak eredményeinél egy kezdeti aspecifikus emelkedést követően csökkenő tendenciát figyelhattunk meg a 72. óráig mindkét lebeny esetében. Ekkor a hipertrofizáló lebeny aktivitása nem tért el szignifikánsan a kezdeti értéktől. Ezt követően azonban a két lebenycsoport értékei szétváltak, és a lekötöttel szemben, mely 48 órán túl is deprimált maradt, a nem lekötött esetében nagyfokú kompenzációs emelkedés következett be (168 órás csúccsal), ami csak a 336. órára normalizálódott. Így összességében elmondható, hogy a két csoport értékei között szignifikáns eltérést csupán a korai fázisban (24 óránál), majd a későbbi posztoperatív időpontoknál (168-336 óra) találtunk. [Lásd itt 4-7 ábra] Az ábrákat megfigyelve látható, hogy a fent leírt változások a CYP2B esetében kevésbé voltak kifejezettek, viszont magát a tendenciát követték. [Lásd 7. ábra]

CYP3A aktivitás (1-OH) - egységni fehérje mennyiséghez viszonyítva

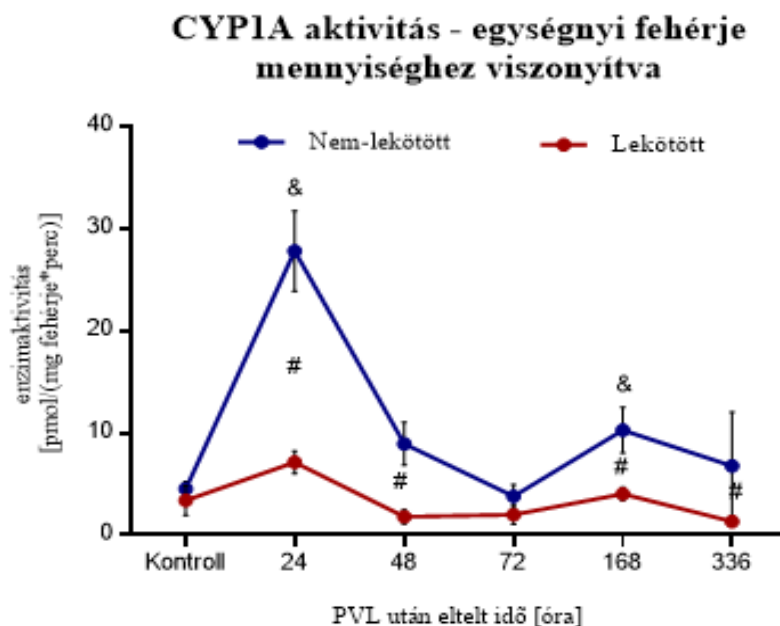


4. ábra: CYP3A család enzimaktivitásának (1-OH) változása, egységni fehérje mennyiséghez viszonyítva. Két utas ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt. Jelölések: &: $p<0,05$ NLL aktuális vs. NLL kontroll; #: $p<0,05$ LL aktuális vs. NLL aktuális; ●: eredmények átlaga $\pm$ S.D., $n=4$.

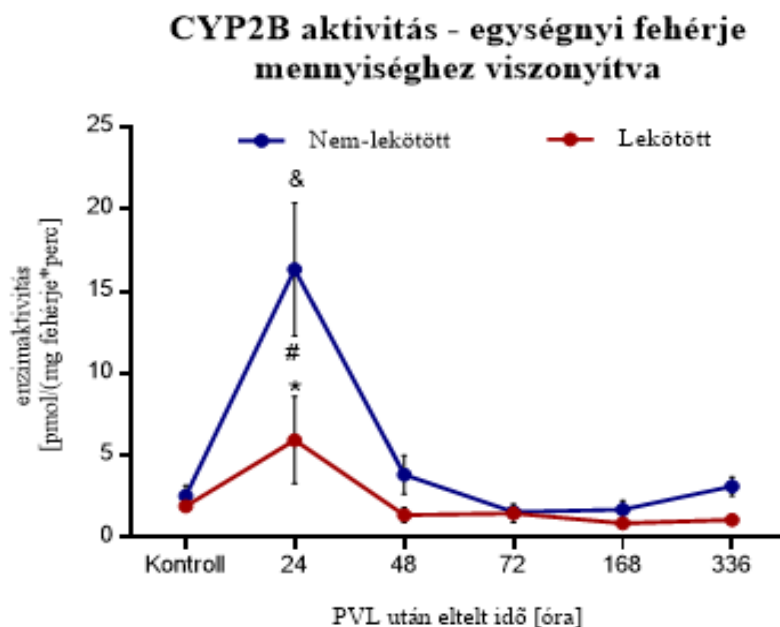
CYP3A aktivitás (4-OH) - egységni fehérje mennyiséghez viszonyítva



5. ábra: CYP3A család enzimaktivitásának (4-OH) változása, egységni fehérje mennyiséghez viszonyítva. Két utas ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt. Jelölések: &: $p<0,05$ NLL aktuális vs. NLL kontroll; #: $p<0,05$ LL aktuális vs. NLL aktuális; ●: eredmények átlaga $\pm$ S.D., $n=4$.

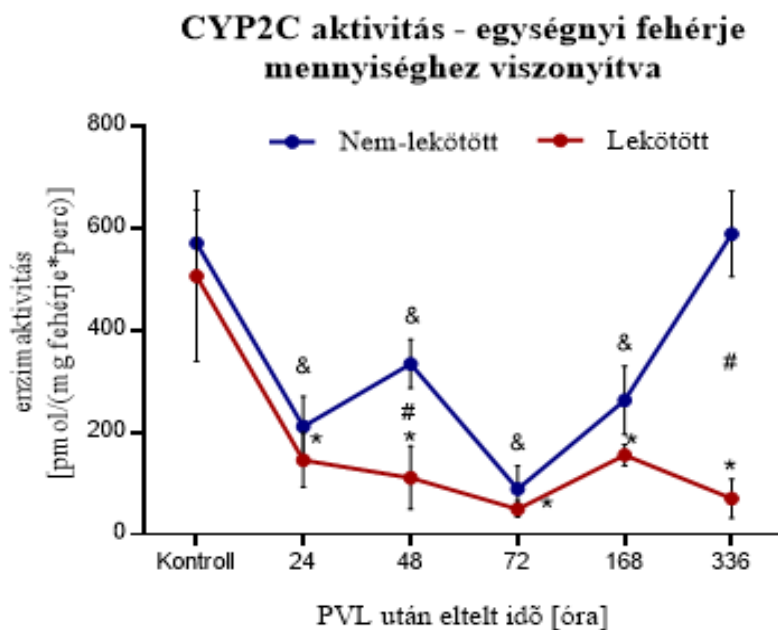


6. ábra: CYP1A család enzimaktivitásának változása, egységnyi fehérje mennyiséghez viszonyítva. Két utas ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt. Jelölések: &: $p < 0,05$ NLL aktuális vs. NLL kontroll; #: $p < 0,05$ LL aktuális vs. NLL aktuális; ●: eredmények átlaga $\pm$ S.D., $n=4$.



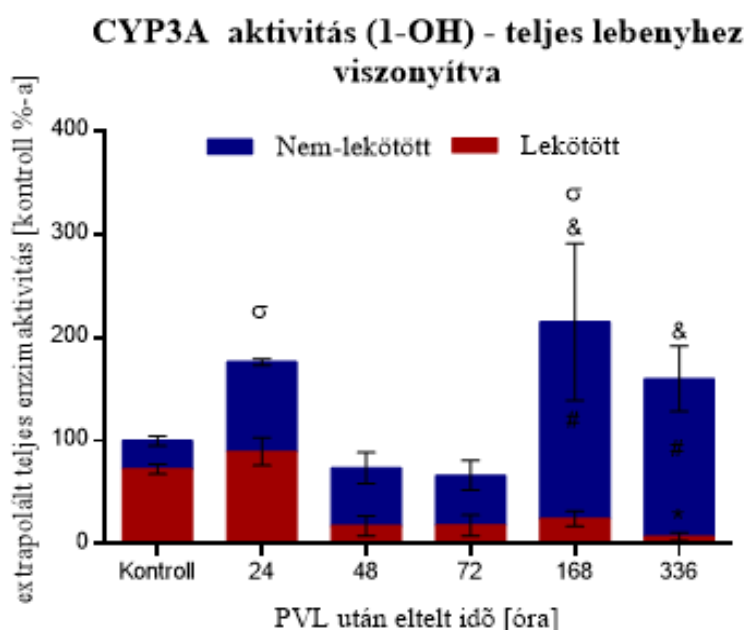
7. ábra: CYP2B család enzimaktivitásának változása, egységnyi fehérje mennyiséghez viszonyítva. Két utas ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt. Jelölések: *: $p < 0,05$ LL aktuális vs. LL kontroll; &: $p < 0,05$ NLL aktuális vs. NLL kontroll; #: $p < 0,05$ LL aktuális vs. NLL aktuális.

A másik csoportot a CYP2C enzimcsalád izotípusai adták. A fenti görbék lefutásával ellentétben, a tolbutamid-4-hidroxilációs aktivitásnál deprimáció volt látható, mely az atrofizáló lebenynél permanensnek, a hipertrofizálónál átmenetinek tekinthető. A kísérlet végére, ez utóbbi lebenycsoport értékei visszatértek az alapszintre, így a késői órákban (168-336. óra) jelentős szignifikáns különbség keletkezett LL és NLL értékei között. [Lásd 8. ábra]

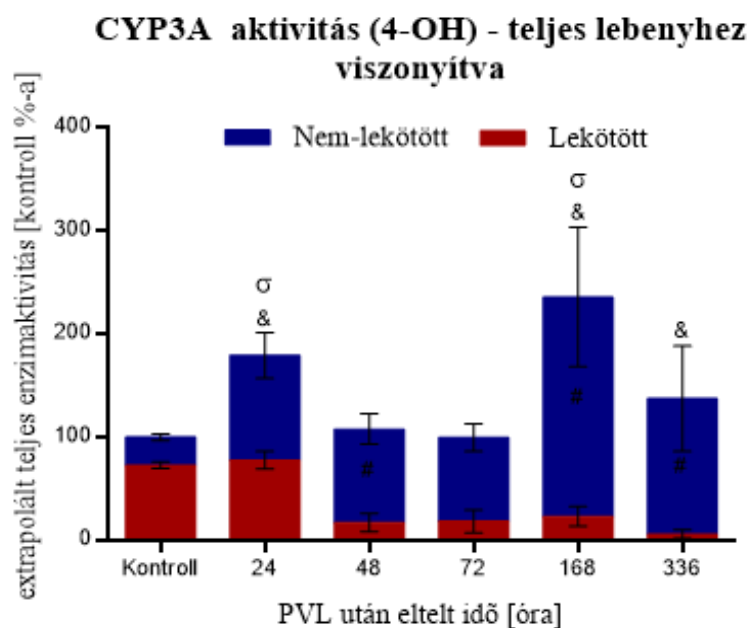


8. ábra: CYP2C család enzimaktivitásának változása, egységnyi fehérje mennyiséghez viszonyítva. Két utas ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt. Jelölések: *: $p < 0,05$ LL aktuális vs. LL kontroll; &: $p < 0,05$ NLL aktuális vs. NLL kontroll; #: $p < 0,05$ LL aktuális vs. NLL aktuális; ●: eredmények átlaga $\pm$ S.D., $n=4$.

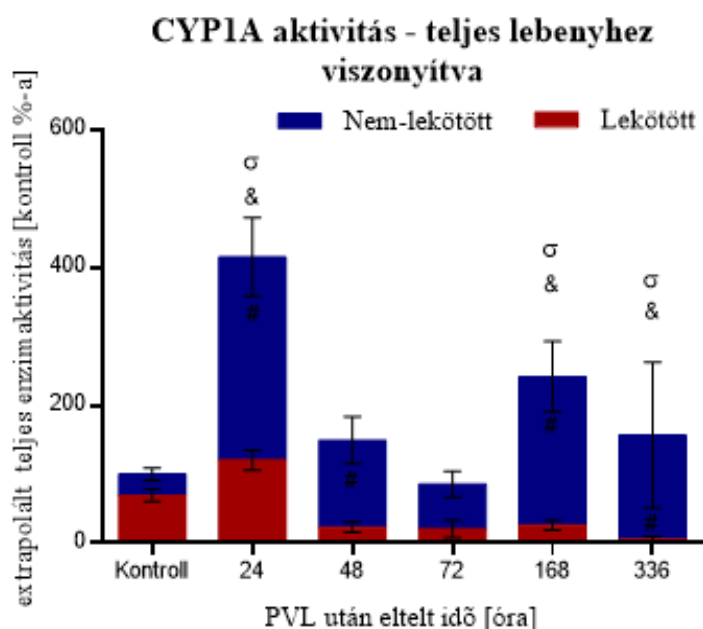
Ahhoz, hogy a teljes CYP funkciót megkapjuk, az egységnyi fehérjéhez viszonyított értékeket az LL vagy az NLL súlyával extrapoláltuk. Az így kapott értékek grafikonjai a megfelelő mikroszómális enzimaktivitásokhoz viszonyítva, nagyon hasonló karakterisztikát mutattak. Ám a súlyozás a különbségeket még jobban kiemelte, így szignifikáns eltérést tudunk leírni még a 336.óránál is a CYP1A, 2C és 3A esetében, míg a CYP2B-nél szintén nagyobb interlobuláris eltérést tapasztaltunk. [Lásd 9-13. ábra]



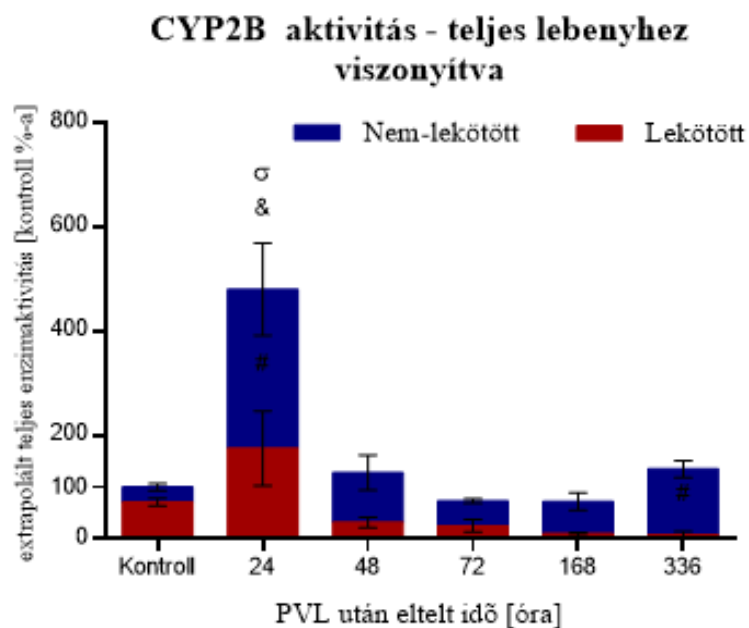
9. ábra: CYP3A extrapolált enzimaktivitásának (1-OH) változása, teljes lebenyhez viszonyítva. Két utas ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt. Jelölések: *: $p < 0,05$ LL aktuális vs. LL kontroll; &: $p < 0,05$ NLL aktuális vs. NLL kontroll; #: $p < 0,05$ LL aktuális vs. NLL aktuális; σ: $p < 0,05$ vs. kontroll, ●: eredmények átlaga $\pm$ S.D., $n=4$.



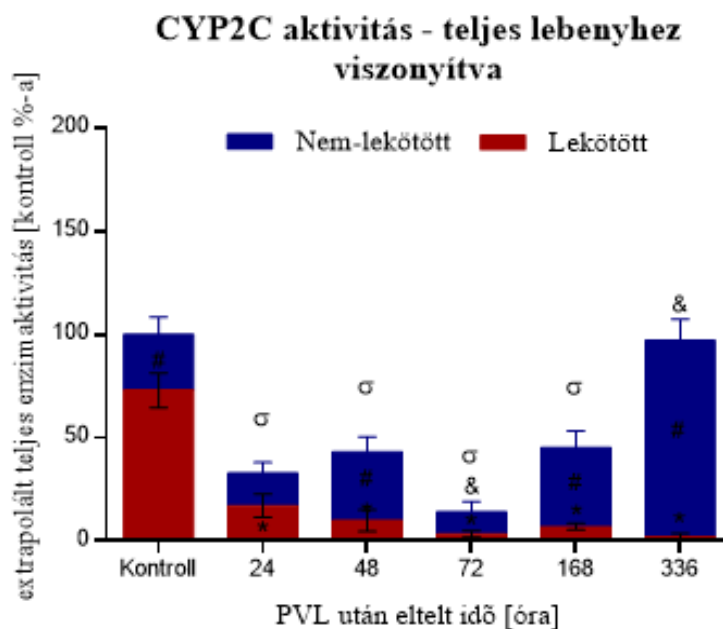
10. ábra: CYP3A extrapolált enzimaktivitásának (4-OH) változása, teljes lebenyhez viszonyítva. Két utas ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt. Jelölések: *: $p < 0,05$ LL aktuális vs. LL kontroll; &: $p < 0,05$ NLL aktuális vs. NLL kontroll; #: $p < 0,05$ LL aktuális vs. NLL aktuális; σ : $p < 0,05$ vs. kontroll.



11. ábra: CYP1A extrapolált enzimaktivitásának változása, teljes lebenyhez viszonyítva. Két utas ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt. Jelölések: *: $p < 0,05$ LL aktuális vs. LL kontroll; &: $p < 0,05$ NLL aktuális vs. NLL kontroll; #: $p < 0,05$ LL aktuális vs. NLL aktuális; σ : $p < 0,05$ vs. kontroll.



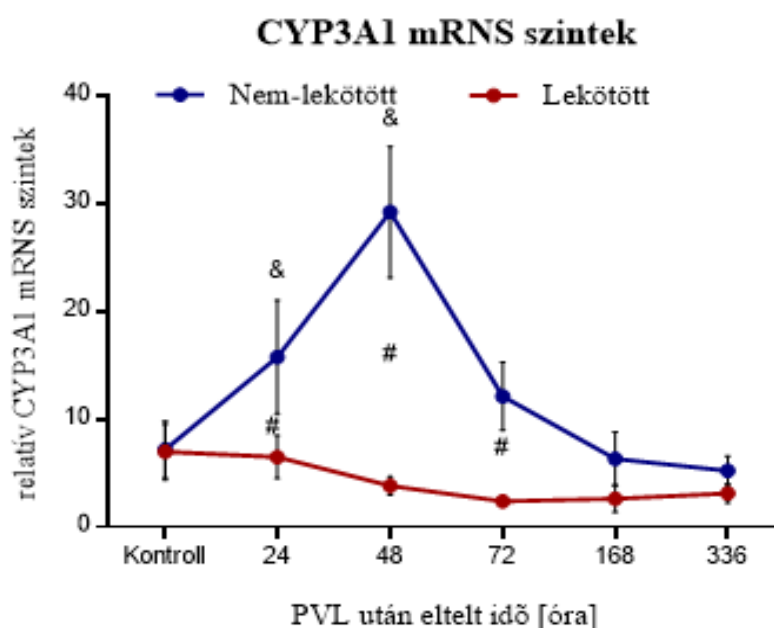
12. ábra: CYP2B extrapolált enzimaktivitásának változása, teljes lebenyhez viszonyítva. Két utas ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt. Jelölések: &: $p < 0,05$ NLL aktuális vs. NLL kontroll; #: $p < 0,05$ LL aktuális vs. NLL aktuális; σ : $p < 0,05$ vs. kontroll.



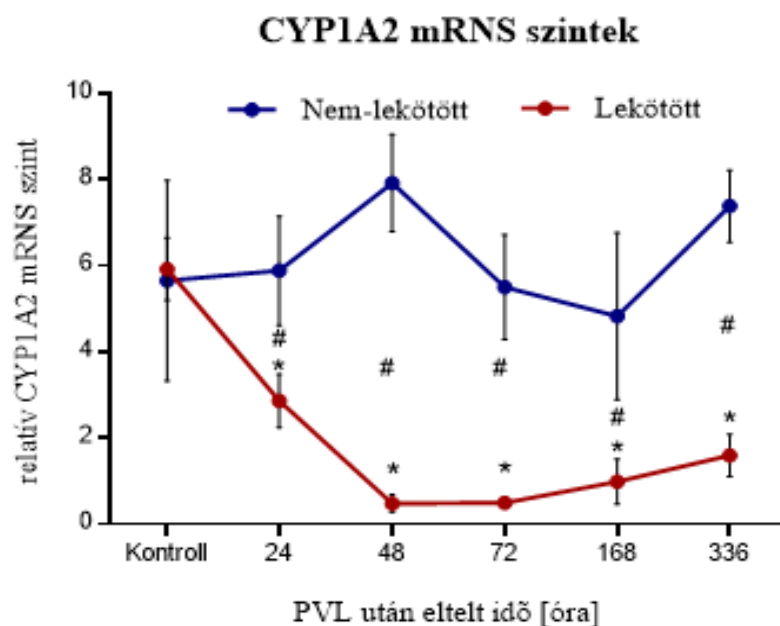
13. ábra: CYP2C extrapolált enzimaktivitásának változása, teljes lebenyhez viszonyítva. Két utas ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt. Jelölések: *: $p < 0,05$ LL aktuális vs. LL kontroll; &: $p < 0,05$ NLL aktuális vs. NLL kontroll; #: $p < 0,05$ LL aktuális vs. NLL aktuális; σ : $p < 0,05$ vs. kontroll.

IV.3.2. Transzkripció meghatározása

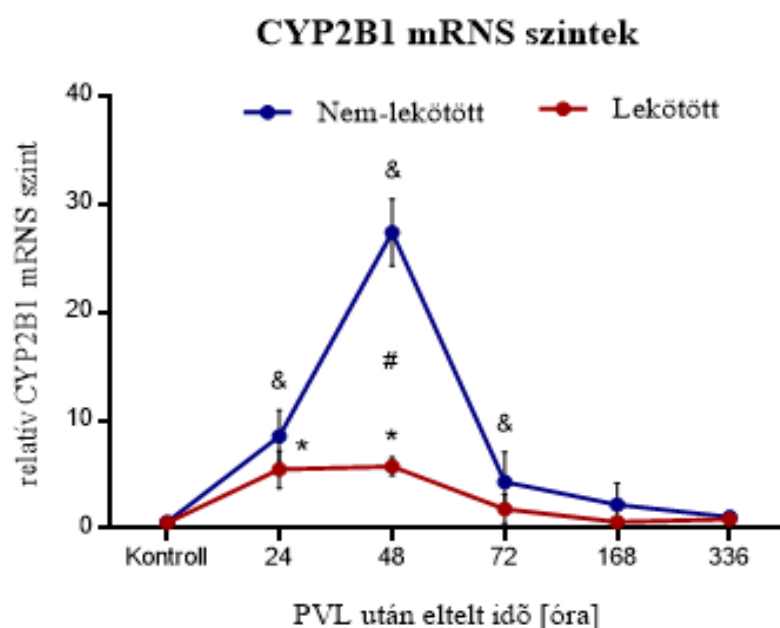
Az ezimaktivitás változásainak hátterében az adott fehérjének megfelelő mRNS szinteket vizsgáltuk. Az első csoport tagjai esetében az mRNS szint változásai igazolták az enzymaktivitás eltéréseit. Így a lekötött lebeny esetében a transzkripció változások a CYP3A1-nél permanens stagnálást, míg a CYP1A és 2B-nél mérsékelt csökkenést mutatott. Ezzel szemben a nem lekötött lebenyek korai, jelentős expresszió fokozódás ment végbe, mely a 48.óránban érte el csúcspontját és a 72. órára tért vissza a kiindulási értékre. Ennek eredményeképp a korai posztoperatív időszakra (24-48.óra) szignifikáns különbséget tudunk leírni a vizsgált lebenycsoportok között. [Lásd 14-17.ábra] Ettől picit eltért a CYP1A2 görbéje, melynél egészen a vizsgálat végéig (336.óra) fennmaradt a szignifikánsan jelentős eltérés, ami az LL-ben történt azonnali és határozott csökkenést mutató, és a vele párhuzamosan NLL-ben fenntartott és a 48. órában kiugrást mutató mRNS szinteknek köszönhető. [Lásd 15. ábra]



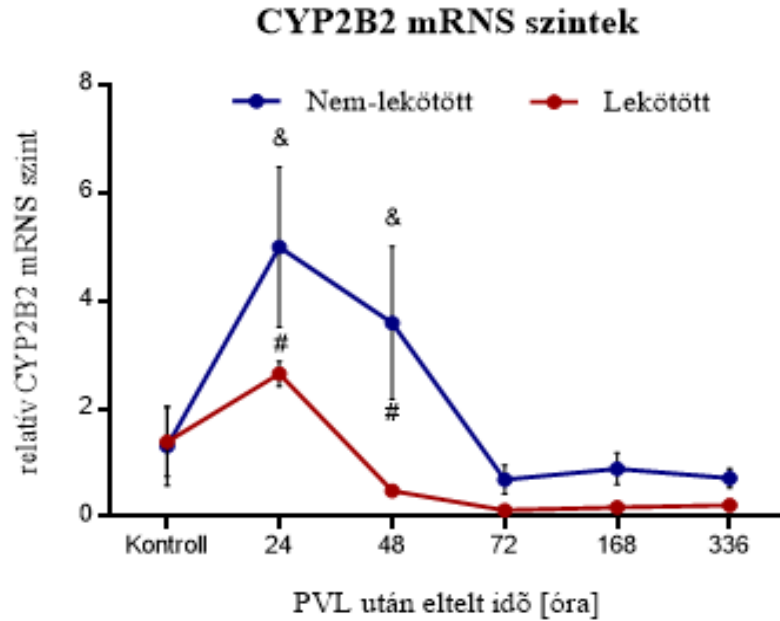
14. ábra: CYP3A1 mRNS szintjeinek változása – PVL után eltelt idő függvényében. Két utas ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt. Jelölések: &: $p < 0,05$ NLL aktuális vs. NLL kontroll; #: $p < 0,05$ LL aktuális vs. NLL aktuális; ●: eredmények átlaga $\pm$ S.D., $n=4$.



15. ábra: CYP1A2 mRNS szintjeinek változása – PVL után eltelt idő függvényében. Két utas ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt. Jelölések: *: $p < 0,05$ LL aktuális vs. LL kontroll; #: $p < 0,05$ LL aktuális vs. NLL aktuális; ●: eredmények átlaga $\pm$ S.D., $n=4$.

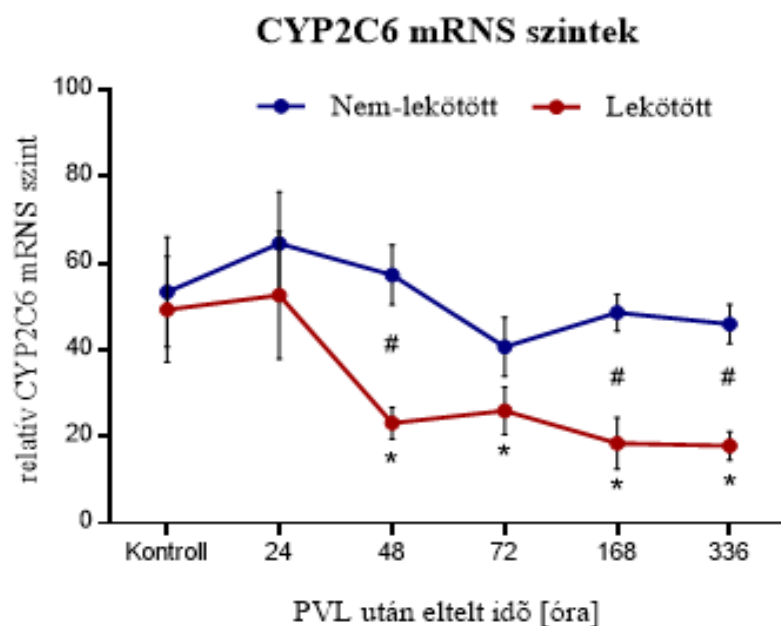


16. ábra: CYP2B1 mRNS szintjeinek változása – PVL után eltelt idő függvényében. Két utas ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt. Jelölések: *: $p < 0,05$ LL aktuális vs. LL kontroll; &: $p < 0,05$ NLL aktuális vs. NLL kontroll; #: $p < 0,05$ LL aktuális vs. NLL aktuális; ●: eredmények átlaga $\pm$ S.D., $n=4$.

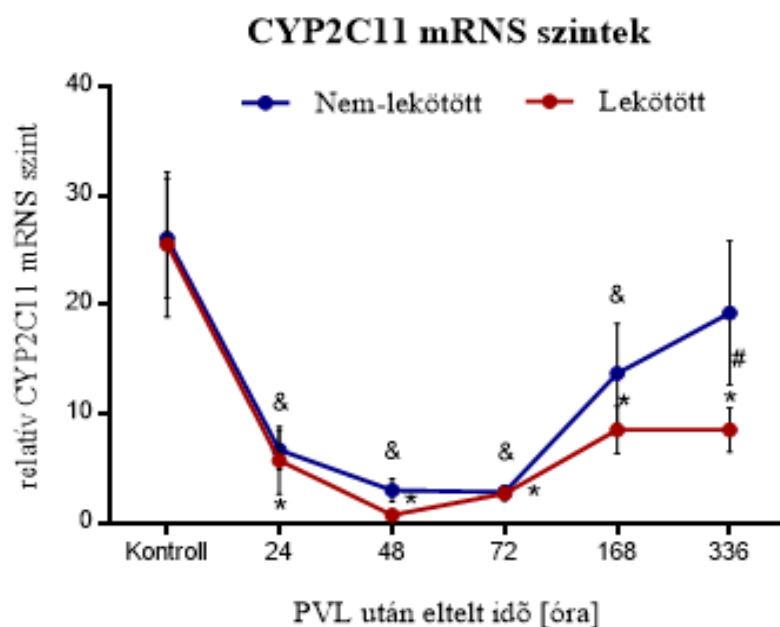


17. ábra: CYP2B2 mRNS szintjeinek változása – PVL után eltelt idő függvényében. Két utas ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt. Jelölések: &: $p < 0,05$ NLL aktuális vs. NLL kontroll; #: $p < 0,05$ LL aktuális vs. NLL aktuális; ●: eredmények átlaga $\pm$ S.D., $n=4$.

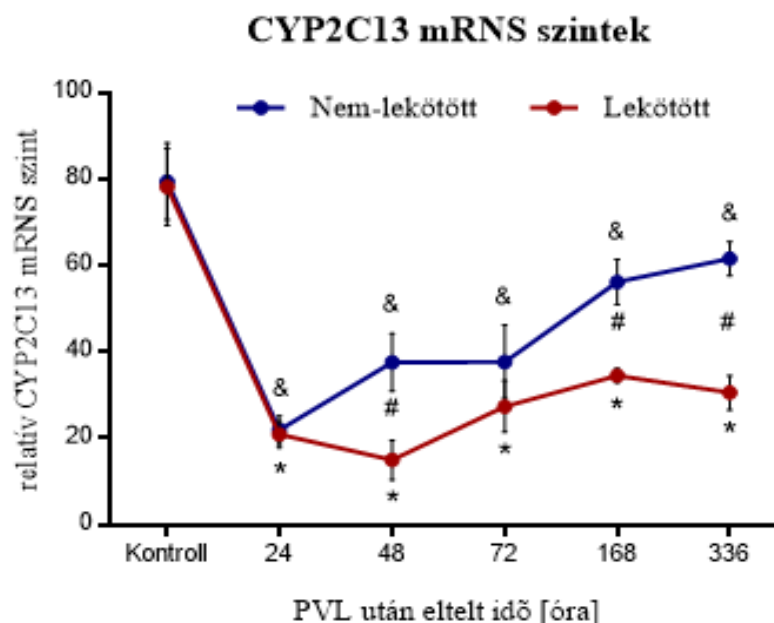
A fenti ábráktól eltérően, a második csoport tagjai, így a CYP2C6, C11, C13 a kiértékelés során másféle görbe karakterisztikát mutattak. Az aktivitással párhuzamosan változó mRNS szinteknél deprimáció volt látható. A lekötött, azaz atrofizáló lebeny esetében ez a csökkenés szignifikánsnak és permanensnek bizonyult, addig a nem lekötött, azaz hipertrofizáló lebenynél csupán átmeneti volt. Így a két lebenycsoport értékei itt is külön váltak, amely a késői posztoperatív időszakban (168-336. óra) mindegyiknél, illetve már a 48. órában is a CYP2C6 és C13 - nál szignifikáns különbséget eredményeztek. [Lásd 18-20. ábra.] Ezeket az ábrákat az első csoport grafikonjaival összevetve, megállapíthatjuk, hogy a CYP2C izotípusainál is az NLL-ben vált dominánssá az mRNS transzkripció folyamata, hasonlóan a az 1A, 2B és 3A családhoz.



18. ábra: CYP2C6 mRNS szintjeinek változása – PVL után eltelt idő függvényében. Két utas ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt. Jelölések: *: $p < 0,05$ LL aktuális vs. LL kontroll; #: $p < 0,05$ LL aktuális vs. NLL aktuális; ●: eredmények átlaga $\pm$ S.D., $n=4$.



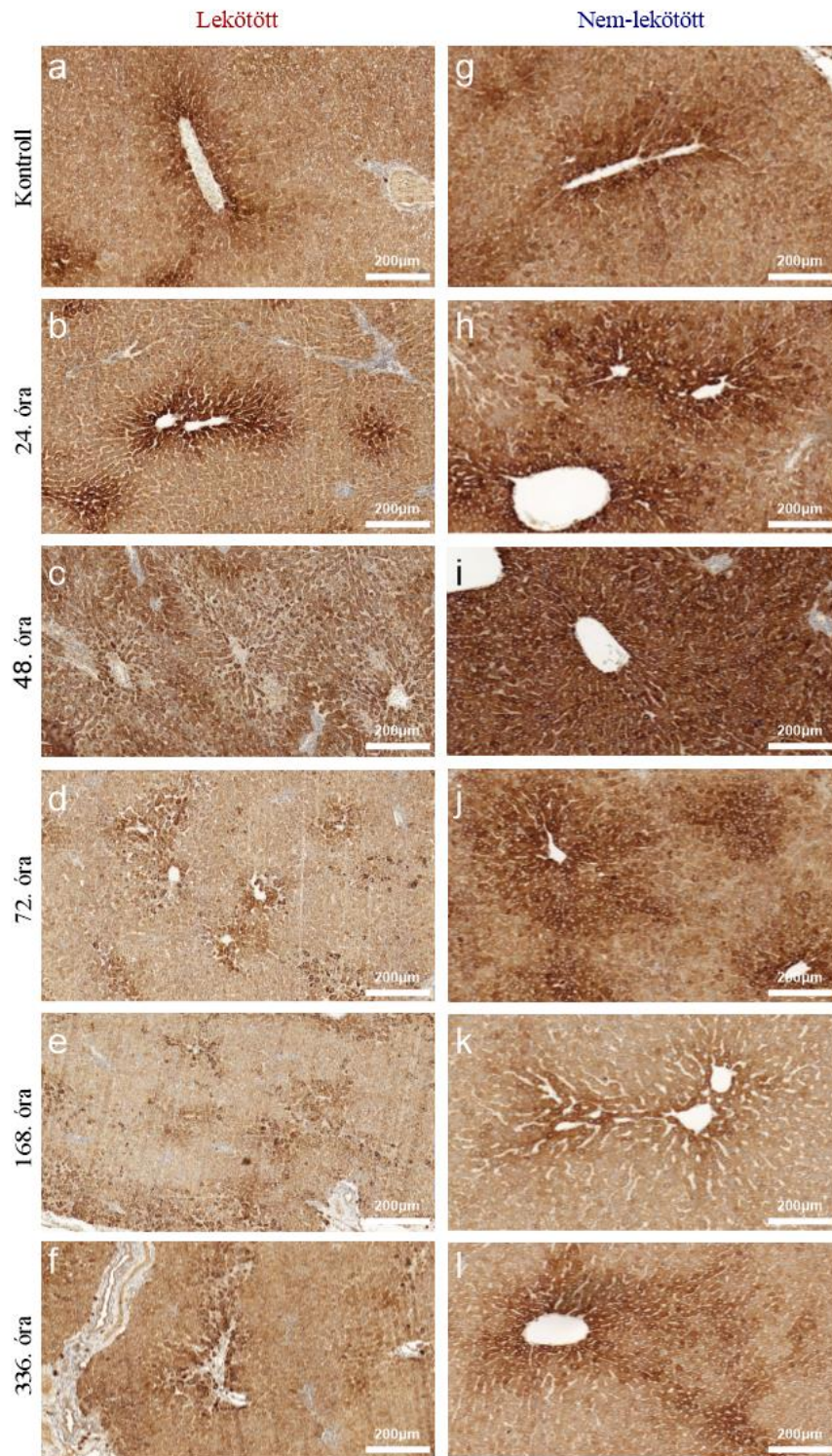
19. ábra: CYP2C11 mRNS szintjeinek változása – PVL után eltelt idő függvényében. Két utas ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt. Jelölések: *: $p < 0,05$ LL aktuális vs. LL kontroll; &: $p < 0,05$ NLL aktuális vs. NLL kontroll; #: $p < 0,05$ LL aktuális vs. NLL aktuális; ●: eredmények átlaga $\pm$ S.D., $n=4$.



20. ábra: CYP2B1 mRNS szintjeinek változása – PVL után eltelt idő függvényében. Két utas ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt. Jelölések: *: $p < 0,05$ LL aktuális vs. LL kontroll; &: $p < 0,05$ NLL aktuális vs. NLL kontroll; #: $p < 0,05$ LL aktuális vs. NLL aktuális; ●: eredmények átlaga $\pm$ S.D., $n=4$.

IV.4. Immunhisztokémia

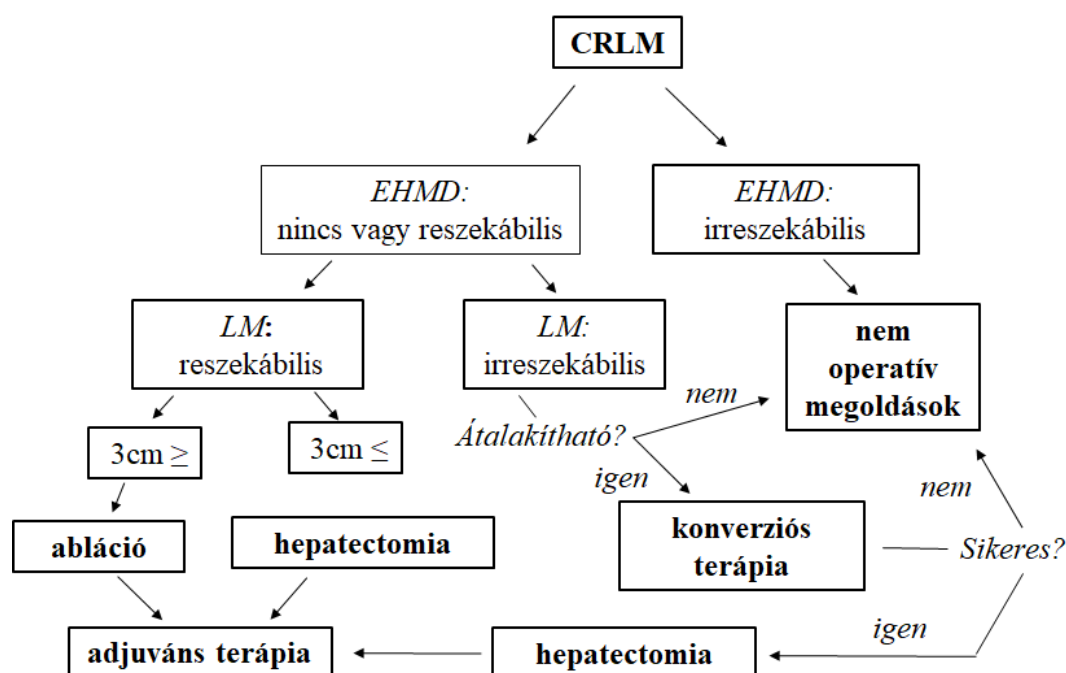
Immunhisztokémiai vizsgálatunk elvégzését követően a metszetekről fotókat készítettünk. Az így kapott reprezentatív képeken a kontroll esetében a CYP3A1 protein fiziológiás helyzetnek megfelelően, pericentrális elhelyezkedést mutatott. A későbbi terminálási időpontoknál a nem lekötött leány esetében csupán a korai posztoperatív időszakban (24-72 óra) megtartott maradt a struktúra, míg a lekötötnél a pericentrális expresszió csökkent és tartósan alacsony is maradt a 336.óráig. [Lásd 21. ábra] Ez a megfigyelés jól korrelált az enzimaktivitás változásaival.



21. ábra: Paraffinba ágyazott standard immunhisztokémiai vizsgálat - CYP3A1 protein expresszió. Hematoxin-eozin festés. Jelzések: a, g: nem ligált, kontroll csoport májmintái; b, c, d, f: PVL-en átesett állatok lekötött lebenyeiből származó minták; h, i, j, l : PVL-en átesett állatok nem lekötött lebenyeiből származó minták; fehér rúd: 200 µm.

V. Megbeszélés

A kolorektális karcinóma májmetasztázisainak (CRLM) kezelése korántsem tartozik a klinikum legevidensebb kérdései közé. Terápiás megoldásként a legjobb túlélést egyértelműen a sebészi reszekció jelenti, ám a megfelelő betegállomány kiválasztása jelentős problémát tud okozni a klinikai gyakorlatban. Az onkosebészet és a modern multimodális szemlélet megjelenésének köszönhetően viszont a lehetőségek tárháza kibővült; így ma már érdemes minden esetben adott megbetegedésre, helyi specifikációkra épülő és páciensenként személyre szabott kezelési protokollt felállítani. A szakirodalmi ajánlások szerint az optimális CRLM terápiás stratégiát a következő folyamatábra szemlélteti. (Az ábrát egy 2018-ban publikált, Xu F. és munkatársai által készített ajánlás alapján készítettem.[2])



22. ábra: CRLM kezelési stratégiája. CRLM: kolorektális karcinóma májmetasztázisa; EHMD: extrahepatikus terjedésű áttét; LM: májmetasztázis

A kolorektális eredetű hepatikus metasztázisok kezelése során az elsődleges kérdéses pont az extrahepatikus májáttétek („extra-hepatic metastatic disease” - EHMD) jelenléte vagy hiánya. Bár a 90-es években az EHMD egyértelműen kontraindikálta a LR elvégzését, mára ez megváltozott: izolált tüdő metasztázisoknál, amennyiben a betegnek elegendő májtartaléka (FLR) van egy

nagyobb műtét kibírásához, az operáció elvégezhető.[84][85] Amennyiben a CRLM-es páciensek nem-, vagy kicsi, izolált EHMD-vel rendelkeznek és a májattétjeik eltávolítása után is elegendő nagyságú FLR marad vissza, akkor egy vagy kétüléses hepatektómia elvégzése ajánlott, adjuváns kemoterápiával kiegészítve; azonban a 3 cm-nél kisebb LM-ek esetében, metasztazektómia helyett különböző ablatív technikák is elegendőek lehetnek, melyek kisebb megterhelésük miatt előnyben részesítendők. [19] Ha a jelenleg érvényes kritériumoknak megfelelően a páciens irreszekábilis jelzésű áttétekkel rendelkezik, akkor protokollárisan konverziós eljárásokat szükséges alkalmaznunk, melyek segítségével a hepatikus tumor zsugorítható, avagy a visszamaradó funkcionális terület növelhető. Erre specifikus megoldást jelenthet a vena portae okklúziós eljárások (PVL, PVE, ALPPS) alkalmazása, melyeket a cél FLR elérését követően második ülésben ugyancsak reszekció kísér.[18][53][60] PVO mellett természetesen számos, nem feltétlenül operatív „átalakító” eljárás áll a rendelkezésünkre, így egy másik megközelítésre ad lehetőséget a konverziós kemoterápia használata. Azokban az esetekben azonban, ahol nem reszekálható extrahepatikus terjedéssel kell számolnunk, vagy az konverziós, volumen manipulációs technikák ellenére sem érjük el a műtéthez szükséges indikációs paramétereket, alternatív eszközöket (radiokemoterápia, arteria hepatica infúzió, transzhepatikus kemoembolizáció, végső esetben transzplantáció) érdemes keresnünk.[2][24]

A számos terápiás megoldás közül jelen kísérletben az indukált májregeneráció mechanizmusát kiváltó okklúziós eljárások közül a porta véna ligatúra által kiváltott változásokat vizsgáltuk. Összefoglalva a szakmai áttekintésben hosszabban kifejtésre került eljárás lényegét: PVL során a reszekálandó, áttétekkel rendelkező lebenyek sorvadását tudjuk kiváltani a tumormentes területek növekedésének javára. Ezzel az eljárással az eredetileg inoperábilisnak tekintett betegek is operálhatóvá válnak, mivel az első ülésben végzett lekötés után 4-6 héttel elérhetjük a szükséges cél FLR-t, ezáltal nagyobb biztonsággal végezhetjük második lépésben a kuratív “kimetszést”. [50] Biztonság alatt azt a hosszú távú túlélésre kifejtett jótékony hatást értem, amelyet a megfelelő funkciójú visszamaradó terület segítségével a poszthepatektómias májelégtelenség elkerülésével érhetünk el. A jobb túlélés és a pácienskör kiszélesedése mellett a perioperatív gyógyszerelés pontosabb kivitelezése is lehetővé válik a megfelelő FLR elérése által. Ehhez azonban a második körben elvégzett műtét előtt már ismernünk kell a reszekciót követően “bent maradó” májterületek állapotát.

Preoperatíván történő FLR állapotfelmérése során nem csak a méret és térfogat ismerete szükséges, hanem a funkcionális kapacitás is. Tekintve, hogy a májnak, mint szervezeti egységnek számos feladata van, így a gyógyszerelés szempontjából a drogmetabolizmus közelebbi vizsgálatát érdemes elvégezni, melyre jelenleg a klinikumban nincs kellően pontos és könnyen kivitelezhető mérőeszköz. [71] A folyamatot végző kulcsenzimek: a citokróm p450 rendszer fehérjéi, melyek univerzális stratégiának számítanak a fajok között; így vizsgálatuk preklinikai szinten kényelmesen kivitelezhető állatmodellek segítségével. [74] A fő cél azonban a kísérleti stádiumot meghaladva egy olyan preoperatíván alkalmazható diagnosztikus megoldás kidolgozása és jövőbeni alkalmazása, mely a máj posztoperációs részfunkcióit képes elég pontosan megítélni ahhoz, hogy a nem kívánatos szövődményeket, így a májelégtelenséget, elégtelen vagy toxikus szintű gyógyszer mennyiséget elkerüljük. Ezáltal elősegítve a személyre szabott medicina fejlődését: egy olyan szemléletmód kialakulását, mely a páciens kezelése során nemcsak a rendelkezésre álló multimodális eszközöket használja fel, hanem tisztában van a beteg pontos aktuális állapotával, és ennek ismerete mentén indul el a terápiás stratégia kiválasztása során.

Kísérletünk során igazoltuk az irodalomban már régóta ismert, egyes portális erek lekötésével bekövetkező morfológiai változásokat patkány májban. A lekötéssel okkludált lebenyek sejtjei nekro-apoptizálnak, mely a terület atrófiáját vonja maga után. Ezzel szemben a kompenzatorikusan megjelenő sejtproliferációs folyamatoknak köszönhetően a megőrzött portális keringéssel bíró területek hipertrófián mennek keresztül.[34] Jelen tanulmányunk során, a műtétet követően különböző időintervallumokban terminált állatok lebenyeinek szeparálását követően, az eltérő lebenycsoportok egyrészt szemmel látható jelentős változást mutattak, másrészt a tömegmérések is igazolták, immáron számszerűsítve a súlybeli differenciákat is. Ezt a szerkezeti átalakulást többek között munkacsoportunk egy korábbi kísérlete is igazolta, melynek alapvető célja ugyancsak a metabolikus folyamatok vizsgálatára irányult, ám adatokkal szolgált a funkció és térfogatváltozások egymáshoz való viszonyáról is, melyről azonban a későbbiekben ejtek szót. Annyit előljáróban azonban fontos megemlíteni, hogy Fülöp és munkatársai ezen tanulmányban a májszövet méretváltozását mágnesesrezonanciát felhasználó képalkotó eljárás segítségével is azonosította.[86] Azonban a posztoperatíván bekövetkező szövődmények kialakulását lényegében nem a méretbeli különbségek fogják okozni, hanem a máj munkavégzésében bekövetkező disszonanciák. Tekintve, hogy ez mind

a poszthepatektómiás májelégtelenség incidenciáját, mind a reszekcióig eltelt köztes időt, így a tumor progressziójának lehetőségét is károsan befolyásolja, változásának pontos követése és detektálása egyáltalán nem elhanyagolható ismeret a klinikum szempontjából. Így annak megítélése, hogy a két paraméter egymáshoz való viszonya korrelál-e, a kísérleti stádiumok egy következő célkitűzéseként újabb lépcsőfokot jelentett a folyamat hátterének teljesség igényével történő felderítésére és leírására. Generalizált, globális szinten elemezve a máj funkcionalitását, a szakirodalomban fellelhető adatok, meglepő módon nem mutatnak egységességet. 2015-ben munkacsoportunk indocianin zöld festék (ICG) és epeúti drainage segítségével vizsgálta a globális és lebenyekre vonatkoztatott májműködést. Tekintve, hogy ICG-t a hepatocyták szelektíven veszik fel és metabolizmus nélkül szekretálják az epébe, így szérumban megjelenő szintjük mennyisége és a detektálásig eltelt idő paraméterei alapján azonosíthatóvá válnak a szerv teljesítménybeli kapacitásai. Ez alapján a kutatócsoportunk azt találta, hogy PVL-t követően két napig a globális funkcióban visszaesés jelentkezik, majd a nem ligált lebenyek volumen expanzióját meghaladó funkcionővekmény végül globális szintre is kiterjed, azaz a munkabírás beelőzi a szemmel látható alaki eltéréseket. [87] Ezzel azonban szöges ellentétben állnak Takemura és munkatársai által preklinikai szinten végzett vizsgálat eredményei, mely során patkánymodellben kivitelezett PVL-t követően midazolamos altatás során az alvásidő megnyúlását majd normalizálódását tapasztalták. Megállapításuk szerint míg a morfológiai változások kiegyensúlyozódnak a 168. órára, addig a funkció lemaradva, csak a második hét végére éri el közel a globális kiindulási értéket. [88] Utóbbi tanulmány eredményei nagyon hasonlóan alakultak jelenlegi kísérletünk tapasztalataihoz. Alvási tesztünk során, melyet velük ellentétben mi intraperitoneálisan beadott pentobarbitállal végeztünk, ugyancsak a globális drogmetabolizmus csökkenését írtuk le, hiszen az oldalra fordulási reflex kiesése és megjelenése közti idő nálunk is szignifikáns megnyúlást mutatott. Azonban ennek értékei még a 336. órára sem teljesen tértek vissza eredeti szintjükre. Összességében tehát annyi biztosan elmondható, hogy PVL olyan folyamatsorozatot indít be a máj egységében, mely átmenetileg felborítja azt, és kollektíven rátekintve a funkcionális teherbírására, arra egyértelműen destruktív hatással bír. Az, hogy ez a morfológiai változásokat milyen iramban képes követni vagy megelőzni, sajnos máig sem tisztázott, így a válasz egységesítése további vizsgálatokat igényel.

A máj a szervezet szempontjából számtalan részfunkcióval bír: átalakító, szintetizáló és raktározó tulajdonságokkal rendelkezik, melyek segítségével mind az intermediér anyagcsere, mind a biotranszformáció számára kiemelt jelentőségű helyszíneként funkcionál. [71] Természetesen korántsem mindegy, hogy egy hepatektómiát követően miként változik a glikogén tárolási kapacitás, vagy az epetermelés üteme, azonban a perioperatív időszakban mégis talán a legkiemeltebb jelentőségű a farmakológiai eredetű terápiás szerek átalakításában, azaz a drogmetabolizmus folyamatában beállt különbségek ismerete, melyek kiemelt szerepüket a megfelelő gyógyszerelés kialakításával nyerik el. Ez pedig hozzájárul a helyes kezelési protokoll kialakításához és a prognosztikai faktorok kedvező irányba történő befolyásolásához. A folyamat kulcsenzimjei, a citokróm p450 rendszer fehérjéi evolúciós szinten univerzális stratégiának számítanak; így példának okáért az emberhez hasonlóan a majom, a kutya, a macska, a patkány vagy akár a disznó esetében is a testidegen anyagok lebomlása több, általuk katalizált és vezényelt kémiai reakció révén jön létre. Aktivitásukat számtalan külső és belső tényező befolyásolja, így érthetővé válik, hogy egy olyan külvilágból származó, intenzív behatás, amilyennek egy műtét tekinthető, mely a lokális roncsoló hatások mellett a szervezet egészének integritását is megbontja, miért boríthatja fel, növelheti meg vagy csökkentheti alap működésüket. [73][74] Természetesen maga a daganatos megbetegedés is indukálja transzkripciós szintű változásait, melyek összességében elegendőnek bizonyulhatnak a terápia során a drogok nem megfelelő eliminációjához, ezáltal az intoxikációs szintek eléréséhez és a terápia sikertelenségéhez. Jelenlegi kísérletünk során a gyógyszermetabolizmusért szinte kizárólagosan felelős CYP 1, 2 és 3 család néhány tagját vizsgáltuk, melyek az interspecies homogenitásuk alapján, vagy patkányban, illetve emberben ismert magasfokú metabolizáló jelentőségük miatt kerültek kiválasztásra. Szelekciónk fő okait összefoglalva: a CYP1A2 nagyfokú patkány-ember közti homológiájuk miatt, a CYP2B1 és B2 az aneszteziológia során használt barbiturát szubsztrátjaik miatt, a patkánymodellben legfontosabbnak számító CYP2C izoenzimjeit, illetve a CYP3A1-et emeltük ki; utóbbit a humánban legnagyobb biológiai jelentőségű CYP3A4-el való, némi indukciós különbséggel tett megfeleltethetősége miatt. Ezek az enzimek tehát korlátozottan bár, de lehetőséget biztosítanak arra, hogy kísérletes körülmények között modellezzük a PVL hatására bekövetkező fehérjefunkció és ennek hátterében álló transzkripciós szintű szabályozás változásait.[73][74][75]

Mielőtt azonban az enzimaktivitásokat taglaló, általunk leírt eredményeket és a szakirodalom által szolgáltatott, már korábban is ismeretes tényeket áttekintենek, érdemes megemlíteni azt a nagyon is lényeges aspektust, mely a részlegesség mellett a regionalitást is a funkcionalitás klinikailag releváns jellemzőjeként említi. Ez annyit jelent, hogy a tumoros májterületek eltávolítása után értelemszerűen a „nem leköttött” lebenyrészek maradnak a páciensben; így a gyógyszerelés szempontjából, technikailag nem az a fontos kérdés, hogy milyen a máj drogmetabolizmusa a műtétet követően, ennél jóval pontosabb megfogalmazás a bennmaradó parenchyma-nak a drog-elimináló funkcionalitását firtató diagnosztikus cél kitűzése. Mivel posztoperatíván NLL fogja ellátni a máj összes feladatát, így annak elkülönítése, hogy a homogenitás milyen arányban, milyen módon tolódik el a leköttött és nem leköttött területek között, legalább annyira értékes információ, mint drogmetabolizmusban beállt változások pontos időbeli ismerete.[34] Jelenleg a klinikumban ICG clearance mellett, mely inkább globális diagnosztikára alkalmas, a ^{99m}Tc -mebrofenin hepatobiliáris szcintigráfia („hepatobiliary scintigraphy” - HBS) alkalmazása jelent megoldást a regionális funkcionális viszonyok mérésére. Ez az eljárás vizuális és kvantitatív információt is szolgáltat a máj lokálisan szelektív felvétellel és kiválasztással kapcsolatos működéséről. Ennek az a tény az alapja, hogy a mebrofenin és ICG hepatikus felvétele a szerves anionokéhoz képest hasonlóan zajlik, a mebrofenint az OATP1B1 („organic-anion-transporting polypeptid 1B1”) veszi fel, míg az indocianin-zöld festéket az NTCP („ Na^+ -taurocholate cotransporting polypeptid”) nevű transzporter végzi.[89] HBS hatékonyságát de Graaf és munkatársai igazolták egy általuk készített összehasonlító elemzés során, melyben a ^{99m}Tc -galaktozil humán szérum albumin („ ^{99m}Tc -Technetium-galactosyl human serum albumin” - ^{99m}Tc -GSA) szcintigráfia, ^{99m}Tc -mebrofenin hepatobiliáris szcintigráfia (HBS), az indocianin zöld (ICG) clearance-teszt és a galaktóz eliminációs kapacitás („galactose elimination capacity” - GEC) használhatóságát vizsgálták patkánymodellben, a műtétet követő máj regenerálódás során. Azonban a HBS kivételével a többi eljárás nem szolgáltatott kellően pontos információkat, tekintve, hogy a GEC értékeit a májfunkciótól eltérő tényezők is befolyásolják, a GSA pedig hajlamos alábecsülni a regenerálódás mértékét a térfogati változásokhoz képest. [90]

Kísérletünkben, annak érdekében, hogy a májregeneráció során fellépő változások mindkét, a klinikumot tekintve kiemelt jelentőségű tényezőjével (a regionális viszonyokkal és egy adott részfunkcióval) kapcsolatban eredményeket

tudjunk felmutatni, a terminált állatok májszegmenseinek enzimatis és transzkripciós szintű vizsgálatát végeztük el. Összefoglalva a citokróm enzimek vizsgálatára irányuló módszereink eredményeit a következőket találtuk: PVL elvégzését követően, mivel a máj szerkezeti egysége felborult, a drogmetabolizmusért felelős enzimek jelenlétében, aktivitásában és átírásában is jelentős változások álltak be. Immunhisztokémiai vizsgálatunk során a fiziológiásan pericentrális elhelyezkedésű proteinek expressziója a lekötött lebenyekben látható módon csökkentek, mely a festés során vizuálisan is követhető volt, és a jelenség az alvási idő során tapasztalt globális drogmetabolizmus deficitjével egybe esett. A már korábban átírt és az okklúzióig megfelelően funkcionáló enzimek aktivitásában és az ezzel párhuzamosan, a megnövekvő igénynek megfelelően az újabb fehérjék átírásának indukciójában, ugyancsak változás állt be mely eredmények esetében a CYP1A, 2B és 3A alcsalád izotípusai elkülönültek a CYP2C fehérjétől. Az enzimaktivitást tekintve az első csoportban egy aspecifikus növekedést követően deklináció, majd csupán a nem lekötött lebenyekben túlkompenzáció volt megfigyelhető. Ezért a korai órákban beindult transzkripciós fokozódás volt felelőssé tehető, mely a hipertrofikus lebenyekben a 48. órában érte el csúcspontját és a 72. órára normalizálódott. A másik csoportban, melybe a "C" betűvel jelzett alcsalád izoenzimjei tartoztak, mind az aktivitásban, mind a transzkripciós folyamatokban csökkenés állt be, mely ugyancsak az intakt területek esetében, a kísérlet végére rendeződött.

Elsődleges tapasztalatként érdemes ezt a különbséget górcső alá venni, hisz a két csoport közti differencia szemmel láthatóan feltűnő az „eredmények” fejezetben prezentált görbék esetében. Ám érdemes azt is megfigyelnünk, hogy a csökkenések-növekedések tendenciája mindkét fehérjecsoport esetében hasonló maradt: azaz a szuppresszió az atrófián áteső lebenyeknél tartósnak, a hipertrófiánál átmenetinek bizonyult, így az eltérést csak az első csoport kezdeti kiugró értékei adták. Ez a kiugrás feltehetően a sebészi beavatkozás következtében létrejövő stressznek tulajdonítható, mely feltevést alátámasztja az a megállapítás, hogy nem sokkal a műtétet követően, mind NLL, mind LL esetében egyformán jelentkező fokozódásról van szó, mely jelenség korábban már Starkel munkássága során is megfigyelhető volt.[91] Ez azonban felveti a kérdést, vajon a citokróm 2C6, 2C11 és 2C13-as enzimekre miért nem volt ilyen hatással az operáció. Emögött a fehérje transzkripció regulációjának komplexitása állhat, mely eltérő enzimek esetében eltérő dependenciát mutat. Mivel a

CYP2C számtalan izotípussal, és különféle szubsztrát-sepcificitással és szexuális dimorfizussal rendelkezik, így az egyik legösszetettebb családnak tekinthető. Átírásuk pedig kifejezetten nem és hormonfüggő, így elképzelhető, hogy a ligatúrát követően az átmenetileg csökkent funkcionalitással bíró máj nem képes az ösztrogént lebontani, ami így felhalmozódva rövid ideig bár, de akadályozza a hímekben a tesztoszteron-függő fehérje képződés megindulását. A hormonális státusztól független citokrómok esetében értelemszerűen nincs ilyesfajta elmaradás. [75]

Az aktivitás és transzkripció változásainak kronológiai sorrendje és a lebenycsoportok közti egyensúlyi viszonyok eltolódása egy sokrétű kérdéskör, melyet hasznos a jelenleg ismeretes szakirodalmi bizonyítékok fényében szemrevételezni. Starkel és munkatársai 2000-ben végzett kísérletük során 70%-os PVL-t hajtottak végre patkánymodelleken, majd HPLC segítségével a CYP3A és 2E1 enzimek aktivitásának és velük párhuzamosan IHC segítségével az indukálható nitrogén-oxid szintáz („inducible nitric oxide synthase” – iNOS) expressziójának változásait figyelték meg. Eredményeiket tekintve azt találták, hogy a beavatkozást követő első 2-5 órában a citokrómok metabolikus átmenetileg és egyidejűleg lecsökkent, míg iNOS megjelenése fokozott indukciót mutatott. Mivel a vizsgált paraméterekben nem volt különbség a két lebenycsoport között, ezért a műtéti stressznek és az ennek következtében kialakuló gyulladásos folyamatnak tulajdonították a változást. Ez annyit jelent, hogy az esetünkben is tapasztalt aktivitásban jelentkező deprimáció, mely mindkét CYP csoportunkban a korai órákban jelentkezett (CYP 1A, 2B és 3A-nál az aspecifikus növekedést követően), feltehetően a szerv mechanikus sértése következtében kialakuló komplex metabolikus változásokat indukáló gyulladás következtében alakult ki, köszönhetően az IL-6 citokin lokális, ugrásszerű megjelenésének.[91] Takemura és társai, hozzánk hasonlóan, állatmodellben vizsgálták a PVL-t követő eltérő gyógyszer metabolizmust. In vitro és in vivo módszerek (többek között midazolam-os altatás, hepatocita mikroszóma kinyerés és Western blot) segítségével, különböző CYP izoformák, mint például a CYP2C11 és CYP3A2, intracelluláris szintjét és aktivitását határozták meg. Bár náluk nem jelentkezett a kezdeti aspecifikus növekedés, de eredményeiket tekintve hozzánk hasonló változásokat detektáltak: a morfológiai változások a 7. napra, a funkcionális eltérések a 14. napra rendeződtek, a korai funkció csökkenés okának pedig egyértelműen a nitrogén-monoxid jelenlétét írták le. [88]

Mivel az aktivitást az operatív megterhelés, a következményes gyulladás és az indukált nitrogén-monoxid a korai időszakban gátolja, így beindulnak a hemodinamikai és metabolikus viszonyok változásának induktív hatására a helyreállítást célzó komplex sejtproliferációs és génszintű átírási folyamatok. Bár a fehérjék mRNS transzkripciója szinte azonnal megindul, mégis idő kell hozzá, hogy hatásuk érzékelhető legyen. Az aktivitás csökkenése és a transzkripció növekedése közti idő eltolódás a humorális teóriának megfelelően annak köszönhető, hogy PVO eljárások következtében IL-6, TNF- α és NO halmozódik fel, melyek a képződő citokrómokat poszttranszlációsán módosítják, ezzel átmenetileg gátolva és lassítva működőképességük kialakulását. [46][47] Ha megpróbáljuk időrendben lemodellezni a folyamat sorrendiségét, a kísérletünk során kapott eredményeket figyelembe véve a következő becsléseket írhatjuk le: egyes lebenyterületek keringésből való kirekesztését követően, míg az első 24-48 órában LL-ben nekrozis alakul ki, addig kompenzatorikus módon NLL-ben fokozódik a hepatociták mitotikus aktivitása és sejtproliferáció indul meg; a morfológia mellett a funkció helyreállítását célzó fehérje képződési folyamatok is beindulnak, melyek kifejezett transzkripciós fokozódásukat a második-harmadik napon érik el. A fehérjék mRNS-ről történő átírása és az ezt követő transzlációs, poszttranszlációs munkálatok nagyjából két nap alatt eredményeznek új enzimeket, melyek a PVO-t követő átmeneti funkciózavar miatt csak körülbelül egy hét alatt képesek a tőlük elvárt fokozott aktivitási szinten működni. [87][88]

Így összességében elmondható, hogy ligatúrát követően komplex hemodinamikai, metabolikus és molekuláris, génszintű változások indulnak be, melyek a beavatkozás eredményeképp „megbolygatott” szerv térfogat-, és működésbeli helyreállítását célozzák meg. Általunk tapasztalt eredmények az irodalomban már ismert tényeket igazolták, és új ismeretekkel bővítették az indukált májregenerációs eljárások hatásait firtató kollektív szakmai áttekintést. A dolgozatom rövid szinopszisaként: a colorectalis carcinoma máj metasztázisainak kuratív sebészi megoldásaként végzett kétlépcsős májreszekció első ülésében porta vena ligatúrát lehet végrehajtani, mely a tumormentes területeken sejtproliferáció megindulását eredményezi, ezáltal az atrofizáló kontralaterális területekkel szemben, hipertrofikus növekményt hoz létre. A beavatkozás a morfológiai átalakulások mellett globális funkciózavarral is jár, mely az intakt területekben meginduló kompenzatorikus folyamatoknak köszönhetően végül normalizálódik. A drogmetabolizmus szempontjából a citokróm enzimek működésének alakulása mérvadó: a generalizált

funkcióvesztés miatt NLL-ben transzkripció fokozódás indul be, mely a lekötött lebenyekben tartósan csökkent aktivitást igyekszik ellensúlyozni. Így a deprimált enzimaktivitás a nem lekötött területeken csupán átmenetinek tekinthető. Ezek a folyamatok indukált módon lehetővé teszik az ép májterületek megfelelő méretűvé és működésűvé tételét, így potenciálisan elérhetővé válik az áttétek második ülésben történő reszekciója.

A folyamat ismerete klinikai szempontból nagy jelentőségű lehet, hisz amennyiben a két operáció között pontosan meg tudjuk becsülni FLR gyógyszermetabolizáló képességét, könnyen elkerülhetjük az enzimek elégtelen vagy túlzott elimináló képességéből eredő perioperatív farmakológiai kezelés félresiklását; ezáltal javíthatjuk a páciens prognózisát és elősegíthetjük a személyre szabott kezelését. Kiemelendő azonban, hogy vizsgálatunk állatkísérleteken alapul, így direkt klinikai konzekvencia nem vonható le belőle. Annak érdekében, hogy a HBS, MegX és CYPteszt helyett egy jóval pontosabb (mind időben, mind térben), hatékonyabb és célzottabb (kifejezetten drogmetabolizmust célzó) diagnosztikai eljárást dolgozzunk ki, további preklinikai és klinikai szintű vizsgálatok szükségesek.

VI. Következtetések

Kísérletünk végső összegzéseként és jelen dolgozat zárásaként a következő konzekvenciákat vonhatjuk le:

1. Egyes lebenycsoportokhoz futó vena portae ágak ligatúráját követően, a máj szerkezetileg átalakul; így létrehozva a munkacsoport eddigi vizsgálatainak, és a szakirodalomban régóta ismert változásoknak megfelelő atrófia-hipertrófia komplexet. Mindeközben teljes tömege lényegében nem változik.
2. A morfológiai változások mellett a máj funkciója - vizsgálatunkban kiemelten a drogmetabolizáló képessége - átmenetileg globálisan csökken és inhomogénné válik a hipertrófián átesett lebenyek javára.
3. A funkcionális egyensúly eltolódásának hátterében a lekötött lebenyekben tapasztalható, a gyógyszer lebontás szempontjából jelentős citokróm enzimek tartós diszfunkcióját kompenzálva, a nem lekötött lebenyekben beinduló adaptív transzkripciós válasz áll. Így a kezdeti időszakban, a nem okkludált részekben megfigyelhető csökkent fehérje aktivitási szintek - a lokális gyulladásból eredően és neo-formálásukhoz szükséges intermedier időnek köszönhetően, csupán ideiglenesek.
4. Ám a citokróm enzimek között aktivitásban és expresszióban eltérések jelentkezhetnek, tekintve, hogy egy viszonylag széles szubsztrát-specifitású, számtalan taggal rendelkező szupercsaládról van szó, mely transzkripciójának regulációja enzimenként eltérő, izotípus függő dependencia-profilat mutat.
5. A regeneráció során újonnan képződő enzimek jelenléte természetesen struktúrálisan is kimutatható és követhető, mely újabb szinten bizonyítja a PVL-t követő mikro-, és makroszkóposan jelentkező morfológiai és funkcionális változások validitását.

VII. Összefoglalás

Bevezetés: Nagykiterjedésű májtumorok kuratív kezelésének széles körben alkalmazott módszere a tumoros területekhez futó vena portae ágak leköttetése (PVL), mely a leköttetett portális beáramlású lebenyek (LL) atrófiáját és a nem-leköttetett lebenyek (NLL) hipertrófiáját váltja ki. A morfológiai változásokon túl a funkcionális eltérések klinikai relevanciája meghatározó a posztoperatív májelégtelenség elkerülése becslésében. A májfunkció központi aspektusaként a drogmétabolizmus és citokróm p450 (CYP) kulcsenzimeinek kapacitás-változásai PVL során jelentős gyógyszer-szövődményekhez (intoxikáció, elégtelen gyógyszerhatás) vezethetnek.

Célkitűzés: A máj drogmétabolizmus és CYP enzimek homeosztázisának többszintű vizsgálata PVL-indukálta májregeneráció patkány modellében.

Anyagok és módszerek: Hím Wistar patkányokon (210-230 g, n=24) a máj parenchyma ~80%-át érintő PVL-t végeztünk, majd 24/48/72/168/336 órát követően és preoperatív (kontroll) (n=4-4 db) pentobarbitál alvási tesztet, ezt követően szöveti mintavételt végeztünk. Meghatározásra került LL és NLL tömegváltozásainak mértéke, illetve homogenizátumaikból a CYP1A,-2B,-2C, és -3A enzimek aktivitása és a vonatkozó izoenzimek mRNS expressziói HPLC és PCR segítségével. Végül paraffinba ágyazott klasszikus immunhisztokémiai (IHC) eljárással vizsgáltuk LL és NLL CYP3A1 protein expresszióját.

Eredmények: PVL hatására LL atrófiája és NLL hipertrófiája jött létre. Az alvási teszt a drogmétabolizmus átmeneti, globális diszfunkcióját mutatta. A CYP1A, -2B, -3A enzimek aktivitásai kezdeti aspecifikus növekedést, csökkenő tendenciát, majd csupán az NLL esetében nagyfokú túlkompenzációt (168. óra) és helyreállást (336. órára) mutattak. Továbbá az LL permanens mRNS expresszió csökkenése mellett az NLL korai, jelentős expresszió fokozódása volt látható. Eközben a CYP2C enzimek aktivitása és expressziója hirtelen, jelentősen csökkent, mely az LL-ben állandósult, míg az NLL esetén a 336. órára normalizálódott. A CYP3A1 IHC LL és NLL szignifikáns különbségét észlelte a korai (24-72h) időszakban.

Következtetés: A PVL-t követően az atrófia-hipertrófia komplex mellett a máj drogmetabolizmusa átmenetileg globálisan csökken. Hátterében az LL enzimaktivitásának és transzkripciójának tartós romlása áll, míg NLL izotípus függő aktivitás csökkenése és normalizálódása egy adaptív transzkripcionális reguláció következménye.

VIII. Summary

Introduction:

For extensive hepatic malignancies, portal vein ligation (PVL) is a widely used curative therapeutic option leading to the hypertrophy of non- ligated (NLL) and the atrophy of ligated (LL) lobes. Besides morphological changes, functional evaluation carries specific clinical relevance for the prevention of liver failure and cytochrome p450 enzyme (CYP) dysfunction-induced perioperative drug-related complications. Our aim was the analysis of liver drug metabolism and CYP homeostasis after PVL in rat.

Methods:

PVL affecting 80% liver parenchyma was carried out on male Wistar rats (210-230 g, n=20) with the exception of controls (n=4). Pentobarbital (30 mg/kg) sleeping test was performed preoperatively (controls) and 24h/48h/72h/168h/336h after PVL. The LL and NLL were weighed; CYP1A, -2B, -2C and CYP3A enzymes activities and mRNA expressions were determined by HPLC and RT-PCR from microsomal preparations. CYP3A1 protein expression was analysed with formalin-fixed paraffin-embedded immunochemistry.

Results:

After PVL, LL atrophy and NLL hypertrophy developed. The sleeping test found transitionally dysfunction of global metabolism. The activity of CYP1A, -3A, -2B families showed initial aspecific increasement, downward tendency followed by an overcompensation (168h) and normalisation (336h) only in NLL. NLL mRNA expression was suddenly increased, whereas permanently decreased in LL. CYP2C activities and expressions were bilaterally rapidly decreased whereas only temporarily in NLL. Immunochemistry showed significantly different CYP3A1 protein expression of LL and NLL.

Conclusions:

PVL induced liver regeneration and temporary depression in global drug metabolism. Beyond a permanent deterioration of LL function, the NLL displayed an adaptive, isotype-dependent transcriptional activation.

Irodalomjegyzék

1. Reeves, M.E., Surgical treatment of colorectal cancer hepatic metastasis. *J Gastrointest Oncol*, 2012. 3(1): p. 1-2.
2. Xu, F., et al., Current status of surgical treatment of colorectal liver metastases. *World J Clin Cases*, 2018. 6(14): p. 716-734.
3. Hoe, A.L., G.T. Royle, and I. Taylor, Breast liver metastases--incidence, diagnosis and outcome. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 1991. 84(12): p. 714-716.
4. Ferlito, A., et al., Incidence and sites of distant metastases from head and neck cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 2001. 63(4): p. 202-7.
5. Ayoub, J.P., et al., Unknown primary tumors metastatic to liver. *Journal of Clinical Oncology*, 1998. 16(6): p. 2105-2112.
6. Bosch, F.X., et al., Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*, 2004. 127(5 Suppl 1): p. S5-s16.
7. Tan, E.K. and L.L. Ooi, Colorectal cancer liver metastases - understanding the differences in the management of synchronous and metachronous disease. *Ann Acad Med Singapore*, 2010. 39(9): p. 719-15.
8. Ekberg, H., et al., Determinants of survival in liver resection for colorectal secondaries. *Br J Surg*, 1986. 73(9): p. 727-31.
9. van Dam, R.M., et al., Outcomes of extended versus limited indications for patients undergoing a liver resection for colorectal cancer liver metastases. *HPB (Oxford)*, 2014. 16(6): p. 550-9.
10. Allard, M.A., et al., Long-term outcomes of patients with 10 or more colorectal liver metastases. *Br J Cancer*, 2017. 117(5): p. 604-611.
11. Ihnat, P., P. Vavra, and P. Zonca, Treatment strategies for colorectal carcinoma with synchronous liver metastases: Which way to go? *World J Gastroenterol*, 2015. 21(22): p. 7014-21.
12. Esposito, F., et al., Primary Tumor Versus Liver-First Approach for Synchronous Colorectal Liver Metastases: An Association Francaise de Chirurgie (AFC) Multicenter-Based Study with Propensity Score Analysis. *World J Surg*, 2018. 42(12): p. 4046-4053.

13. Vallance, A.E., et al., The timing of liver resection in patients with colorectal cancer and synchronous liver metastases: a population-based study of current practice and survival. *Colorectal Dis*, 2018. 20(6): p. 486-495.
14. Le Souder, E.B., et al., Considering the cost of a simultaneous versus staged approach to resection of colorectal cancer with synchronous liver metastases in a publicly funded healthcare model. *J Surg Oncol*, 2018. 117(7): p. 1376-1385.
15. Stureson, C., et al., Liver-first strategy for synchronous colorectal liver metastases - an intention-to-treat analysis. *HPB (Oxford)*, 2017. 19(1): p. 52-58.
16. Yin, Z., et al., Timing of hepatectomy in resectable synchronous colorectal liver metastases (SCRLM): Simultaneous or delayed? *Hepatology*, 2013. 57(6): p. 2346-57.
17. Rahbari, N.N., et al., Posthepatectomy liver failure: a definition and grading by the International Study Group of Liver Surgery (ISGLS). *Surgery*, 2011. 149(5): p. 713-24.
18. Takahashi, S., et al., Predictors for early recurrence after hepatectomy for initially unresectable colorectal liver metastasis. *J Gastrointest Surg*, 2013. 17(5): p. 939-48.
19. Gillams, A., et al., Thermal ablation of colorectal liver metastases: a position paper by an international panel of ablation experts, The Interventional Oncology Sans Frontieres meeting 2013. *Eur Radiol*, 2015. 25(12): p. 3438-54.
20. Ruers, T., et al., Radiofrequency ablation combined with systemic treatment versus systemic treatment alone in patients with non-resectable colorectal liver metastases: a randomized EORTC Intergroup phase II study (EORTC 40004). *Ann Oncol*, 2012. 23(10): p. 2619-26.
21. Aliyev, S., et al., Efficacy of laparoscopic radiofrequency ablation for the treatment of patients with small solitary colorectal liver metastasis. *Surgery*, 2013. 154(3): p. 556-62.
22. Imai, K., et al., Long-term outcomes of radiofrequency ablation combined with hepatectomy compared with hepatectomy alone for colorectal liver metastases. *Br J Surg*, 2017. 104(5): p. 570-579.

23. Maeda, Y., et al., Long-Term Outcomes of Conversion Hepatectomy for Initially Unresectable Colorectal Liver Metastases. *Ann Surg Oncol*, 2016. 23 Suppl 2: p. S242-8.
24. Nozawa, H., et al., Conversion to Resection in Patients Receiving Systemic Chemotherapy for Unresectable and/or Metastatic Colorectal Cancer- Predictive Factors and Prognosis. *Clin Colorectal Cancer*, 2018. 17(1): p. e91-e97.
25. Tomasello, G., et al., FOLFOXIRI Plus Bevacizumab as Conversion Therapy for Patients With Initially Unresectable Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Pooled Analysis. *JAMA Oncol*, 2017. 3(7): p. e170278.
26. Carrato, A., et al., First-line panitumumab plus FOLFOX4 or FOLFIRI in colorectal cancer with multiple or unresectable liver metastases: A randomised, phase II trial (PLANET-TTD). *Eur J Cancer*, 2017. 81: p. 191-202.
27. Brandi, G., et al., Adjuvant chemotherapy for resected colorectal cancer metastases: Literature review and meta-analysis. *World J Gastroenterol*, 2016. 22(2): p. 519-33.
28. Frerichs, F.T.V., *A Clinical Treatise on Diseases of the Liver*. Vol. 3. 1879: New York : W. Wood.
29. Rous, P. and L.D. Larimore, RELATION OF THE PORTAL BLOOD TO LIVER MAINTENANCE : A DEMONSTRATION OF LIVER ATROPHY CONDITIONAL ON COMPENSATION. *J Exp Med*, 1920. 31(5): p. 609-32.
30. Honjo, I., et al., Ligation of a branch of a portal vein for carcinoma of the liver. Vol. 130. 1975. 296-302.
31. Makuuchi, M., et al., Preoperative portal embolization to increase safety of major hepatectomy for hilar bile duct carcinoma: a preliminary report. *Surgery*, 1990. 107(5): p. 521-7.
32. Kinoshita, H., et al., Preoperative portal vein embolization for hepatocellular carcinoma. *World J Surg*, 1986. 10(5): p. 803-8.
33. Bilodeau, M., et al., Evaluation of hepatocyte injury following partial ligation of the left portal vein. *J Hepatol*, 1999. 30(1): p. 29-37.
34. Szijártó, A. and A. Fülöp, Triggered liver regeneration: from experimental model to clinical implications. *European surgical research. Europäische*

- chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes, 2015. 54(3-4): p. 148-161.
35. Taub, R., Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. 5(10): p. 836-47.
 36. Kim, R.D., et al., Liver regeneration and the atrophy-hypertrophy complex. *Semin Intervent Radiol*, 2008. 25(2): p. 92-103.
 37. Marcos, A., et al., Liver regeneration and function in donor and recipient after right lobe adult to adult living donor liver transplantation. *Transplantation*, 2000. 69(7): p. 1375-9.
 38. Bucher, N.L., REGENERATION OF MAMMALIAN LIVER. *Int Rev Cytol*, 1963. 15: p. 245-300.
 39. Kollmar, O., et al., Portal branch ligation induces a hepatic arterial buffer response, microvascular remodeling, normoxygenation, and cell proliferation in portal blood-deprived liver tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. 292(6): p. G1534-42.
 40. R. Duncan, J., et al., Embolization of Portal Vein Branches Induces Hepatocyte Replication in Swine: A Potential Step in Hepatic Gene Therapy. Vol. 210. 1999. 467-77.
 41. Rocheleau, B., et al., Hepatic artery buffer response following left portal vein ligation: its role in liver tissue homeostasis. *Am J Physiol*, 1999. 277(5): p. G1000-7.
 42. Lautt, W.W., Relationship between hepatic blood flow and overall metabolism: the hepatic arterial buffer response. *Fed Proc*, 1983. 42(6): p. 1662-6.
 43. Um, S.H., et al., Hemodynamic changes after ligation of a major branch of the portal vein in rats: comparison with rats with portal vein constriction. *Hepatology*, 1994. 19(1): p. 202-9.
 44. Schoen, J.M., et al., Shear stress-induced nitric oxide release triggers the liver regeneration cascade. *Nitric Oxide*, 2001. 5(5): p. 453-64.
 45. Maeno, H., et al., Expression of hypoxia inducible factor-1alpha during liver regeneration induced by partial hepatectomy in rats. *Liver Int*, 2005. 25(5): p. 1002-9.
 46. Starkel, P., et al., After portal branch ligation in rat, nuclear factor kappaB, interleukin-6, signal transducers and activators of transcription 3, c-fos, c-myc,

- and c-jun are similarly induced in the ligated and nonligated lobes. *Hepatology*, 1999. 29(5): p. 1463-70.
47. Su, A.I., et al., Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(17): p. 11181-6.
 48. Stärkel, P., et al., After portal branch ligation in the rat, cellular proliferation is associated with selective induction of c-Ha-ras, p53, cyclin E, and Cdk2. *Gut*, 2001. 49(1): p. 119-130.
 49. Campbell, J.S., et al., Expression of suppressors of cytokine signaling during liver regeneration. *The Journal of clinical investigation*, 2001. 107(10): p. 1285-1292.
 50. Honjo, I., et al., Ligation of a branch of the portal vein for carcinoma of the liver. *Am J Surg*, 1975. 130(3): p. 296-302.
 51. Are, C., et al., Feasibility of laparoscopic portal vein ligation prior to major hepatectomy. *HPB (Oxford)*, 2008. 10(4): p. 229-33.
 52. van Gulik, T.M., et al., Controversies in the use of portal vein embolization. *Dig Surg*, 2008. 25(6): p. 436-44.
 53. Vyas, S., et al., Portal vein embolization and ligation for extended hepatectomy. *Indian journal of surgical oncology*, 2014. 5(1): p. 30-42.
 54. Jegatheeswaran, S., et al., The liver-first approach to the management of colorectal cancer with synchronous hepatic metastases: a systematic review. *JAMA Surg*, 2013. 148(4): p. 385-91.
 55. Ironside, N., et al., Systematic review of perioperative and survival outcomes of liver resections with and without preoperative portal vein embolization for colorectal metastases. *HPB (Oxford)*, 2017. 19(7): p. 559-566.
 56. Huiskens, J., et al., Does portal vein embolization prior to liver resection influence the oncological outcomes - A propensity score matched comparison. *Eur J Surg Oncol*, 2018. 44(1): p. 108-114.
 57. Isfordink, C.J., et al., Portal vein ligation versus portal vein embolization for induction of hypertrophy of the future liver remnant: A systematic review and meta-analysis. *Surg Oncol*, 2017. 26(3): p. 257-267.
 58. Xiao, N., et al., The paradigm of tumor shrinkage and rapid liver remnant hypertrophy for conversion of initially unresectable colorectal liver metastasis: a case report and literature review. *World J Surg Oncol*, 2017. 15(1): p. 148.

59. Schnitzbauer, A.A., et al., 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. *Ann Surg*, 2012. 255(3): p. 405-14.
60. Sandstrom, P., et al., ALPPS Improves Resectability Compared With Conventional Two-stage Hepatectomy in Patients With Advanced Colorectal Liver Metastasis: Results From a Scandinavian Multicenter Randomized Controlled Trial (LIGRO Trial). *Ann Surg*, 2018. 267(5): p. 833-840.
61. Ratti, F., et al., Strategies to Increase the Resectability of Patients with Colorectal Liver Metastases: A Multi-center Case-Match Analysis of ALPPS and Conventional Two-Stage Hepatectomy. *Ann Surg Oncol*, 2015. 22(6): p. 1933-42.
62. Moris, D., et al., Operative Results and Oncologic Outcomes of Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy (ALPPS) Versus Two-Stage Hepatectomy (TSH) in Patients with Unresectable Colorectal Liver Metastases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *World J Surg*, 2018. 42(3): p. 806-815.
63. Sparrelid, E., et al., Rescue ALPPS is efficient and safe after failed portal vein occlusion in patients with colorectal liver metastases. *Langenbecks Arch Surg*, 2017. 402(1): p. 69-75.
64. Shindoh, J., et al., Optimal future liver remnant in patients treated with extensive preoperative chemotherapy for colorectal liver metastases. *Annals of surgical oncology*, 2013. 20(8): p. 2493-2500.
65. Martel, G., et al., Comparison of techniques for volumetric analysis of the future liver remnant: implications for major hepatic resections. *HPB (Oxford)*, 2015. 17(12): p. 1051-7.
66. Clavien, P.A., et al., Protection of the liver during hepatic surgery. *J Gastrointest Surg*, 2004. 8(3): p. 313-27.
67. Okamoto, E., et al., Prediction of the safe limits of hepatectomy by combined volumetric and functional measurements in patients with impaired hepatic function. *Surgery*, 1984. 95(5): p. 586-92.
68. Wakiya, T., et al., Evaluation of the usefulness of the indocyanine green clearance test for chemotherapy-associated liver injury in patients with colorectal cancer liver metastasis. *Ann Surg Oncol*, 2014. 21(1): p. 167-72.

69. Erdogan, D., et al., Preoperative assessment of liver function: a comparison of ^{99m}Tc-Mebrofenin scintigraphy with indocyanine green clearance test. *Liver Int*, 2004. 24(2): p. 117-23.
70. Ercolani, G., et al., The lidocaine (MEGX) test as an index of hepatic function: its clinical usefulness in liver surgery. *Surgery*, 2000. 127(4): p. 464-71.
71. Gyires Klára, F.Z., Ferdinandy Péter, *Farmakológia és klinikai farmakológia*. 2017, Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt. .
72. Zanger, U.M. and M. Schwab, Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*, 2013. 138(1): p. 103-41.
73. Temesvari, M., et al., Estimation of drug-metabolizing capacity by cytochrome P450 genotyping and expression. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012. 341(1): p. 294-305.
74. Martignoni, M., G.M. Groothuis, and R. de Kanter, Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2006. 2(6): p. 875-94.
75. Zuber, R., E. Anzenbacherova, and P. Anzenbacher, Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J Cell Mol Med*, 2002. 6(2): p. 189-98.
76. Budi, T., et al., Clinical significance of CYP2C9-status guided valproic acid therapy in children. *Epilepsia*, 2015. 56(6): p. 849-55.
77. Toth, K., et al., Phenoconversion of CYP2C9 in epilepsy limits the predictive value of CYP2C9 genotype in optimizing valproate therapy. *Per Med*, 2015. 12(3): p. 199-207.
78. van der Hoeven, T.A. and M.J. Coon, Preparation and properties of partially purified cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase from rabbit liver microsomes. *J Biol Chem*, 1974. 249(19): p. 6302-10.
79. Lowry, O.H., et al., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951. 193(1): p. 265-75.
80. Lindsay, S. and D. Kealey, *High performance liquid chromatography*. 1987: John Wiley and Sons, New York, NY; None. Medium: X; Size: Pages: 264.

81. Sundstrom, M., et al., A high-sensitivity ultra-high performance liquid chromatography/high-resolution time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-HR-TOFMS) method for screening synthetic cannabinoids and other drugs of abuse in urine. *Anal Bioanal Chem*, 2013. 405(26): p. 8463-74.
82. Zahedi Rad, M., et al., Competitive Protein-binding assay-based Enzyme-immunoassay Method, Compared to High-pressure Liquid Chromatography, Has a Very Lower Diagnostic Value to Detect Vitamin D Deficiency in 9-12 Years Children. *International journal of preventive medicine*, 2015. 6: p. 67-67.
83. Peinnequin, A., et al., Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol*, 2004. 5: p. 3.
84. Scheele, J., et al., Resection of colorectal liver metastases. *World J Surg*, 1995. 19(1): p. 59-71.
85. Luo, D., et al., Prognostic value of distant metastasis sites and surgery in stage IV colorectal cancer: a population-based study. *Int J Colorectal Dis*, 2018.
86. Fülöp, A., et al., Demonstration of Metabolic and Cellular Effects of Portal Vein Ligation Using Multi-Modal PET/MRI Measurements in Healthy Rat Liver. *PLOS ONE*, 2014. 9(3): p. e90760.
87. Fulop, A., et al., Alterations in hepatic lobar function in regenerating rat liver. *J Surg Res*, 2015. 197(2): p. 307-17.
88. Takemura, S., et al., 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*, 2006. 134(2): p. 285-91.
89. de Graaf, W., et al., Transporters involved in the hepatic uptake of (99m)Tc-mebrofenin and indocyanine green. *J Hepatol*, 2011. 54(4): p. 738-45.
90. de Graaf, W., et al., Quantitative assessment of hepatic function during liver regeneration in a standardized rat model. *J Nucl Med*, 2011. 52(2): p. 294-302.
91. Starkel, P., et al., 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*, 2000. 20(5): p. 405-10.

Függelék

Plágium - Nyilatkozat

/Nyilatkozat szakdolgozat készítésére vonatkozó szabályok betartásáról/

Alulírott Nagy Petronella (Neptunkód: AXZ5NN) jelen nyilatkozat aláírásával kijelentem, hogy a “Drogmetabolizmus vizsgálata vena portae ligatúrát követően” című szakdolgozat/diplomamunka (a továbbiakban: dolgozat) önálló munkám, a dolgozat készítése során betartottam a szerzői jogról szóló 1999. évi LXXVI. tv. rendelkezéseit, valamint az Egyetem által előírt, a dolgozat készítésére vonatkozó szabályokat.

Jelen nyilatkozat aláírásával tudomásul veszem, hogy amennyiben bizonyítható, hogy a dolgozatot nem magam készítettem vagy a dolgozattal kapcsolatban szerzői jogsértés ténye merül fel, a Semmelweis Egyetem megtagadja a dolgozat befogadását.

Tudomással bírok arról is, hogy a szerzői jog megsértése miatt az arra jogosultak velem szemben felléphetnek, s az egyéb jogkövetkezményekkel – így polgári jogi, szabálysértési jogi, illetve büntetőjogi következményekkel – járhat.

Budapest, 2019.02.06.

hallgató aláírása

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani mentoromnak, Dr. Szijártó Attilának, a Semmelweis Egyetem I.számú Sebészeti Klinika igazgatóhelyettesének. Pár évvel ezelőtt - útkeresésem egyik állomásaként - nagy lelkesedéssel kerestem fel, reménykedve abban, hogy tanulhatok tőle egy keveset a sebészetről. Ám végül ennél jóval többet tett értem: lehetőséget teremtett arra, hogy a Kísérleti Műtő tagjává válhassak - ahol nemcsak a tudományos kutatások alapjait sajátíthattam el, de egy olyan közösség részese lehettem, amely mindig példaértékű elhivatottsággal viseltetett az orvoslás iránt. Bízom benne, ez a fajta “szép” szakmai hozzáállás elkísér majd a pályám során!

Ugyancsak az elsők közt szeretném megemlíteni másik témavezetőmet, Dr. Fülöp Andrást, aki hatalmas segítséget nyújtott diplomamunkám elkészítéséhez. Köszönöm neki mindazt az elnéző türelmet és pontos, egyértelmű útmutatást, mellyel az elmúlt félév során “megfogta a kezem” és segített legyőzni a folyamatosan jelenlévő mumusom: a halogatást.

Köszönet illeti természetesen Prof. Dr. Harsányi Lászlót, a Semmelweis Egyetem I.számú Sebészeti Klinika igazgatóját és Prof. Dr. Kupcsulik Pétert, a Kísérleti Műtő létrehozóját, akik megteremtették a kísérlet kivitelezéséhez szükséges biztos tárgyi feltételeket. Továbbá szeretnék köszönetet mondani kollaborációs partnereinknek is: a Magyar Tudományos Akadémia TTK munkacsoportjának, illetve a Semmelweis Egyetem II.számú Patológiai Intézet tagjainak a közreműködést.

Nagy-nagy hálával tartozom Dr. Kovács Tibornak, a Kísérleti Műtő korábbi PhD hallgatójának. Ő volt az, aki a diákköri tevékenységem kezdetétől protezsált és vezetett engem; megtanította a finom manualitás technikáit, felkészített a konferenciákra és segített eligazodni a hivatalos formalitások világában. Mindezt szakszerű hozzáértéssel és jószándékkal tette. Sokat tanultam Tőle!

A Kísérleti Műtő három éven át volt a mindennapi életem része. Sok régi és új tag segített ez idő alatt, akik nem csak kollégáim, de sok esetben barátaim is voltak. Szeretném közülük kiemelni Lévay Klárát és Dr. Bencsics Mátét, akikkel mindig élvezetes volt késő estig kísérletezni, prezentációt szerkeszteni, előadás szöveget írni vagy akár állatházat takarítani. Ezek az emlékek biztosan felejthetetlenek maradnak!

A sor vége felé, de annál nagyobb jelentőséggel szeretném megemlíteni Dr. Illés Kristófot. Maradandó emlék marad a számomra az első találkozásom a

kutatócsoporttal, ahol nagy zavarban, kissé dadogva próbáltam bemutatkozni a csapatnak. Ám érdektelenség helyett egyetlen személy mégis merev figyelemmel kísérte a kínlődásomat, ami paradox módon átsegített a szorongáson. Ő volt az az illető. Köszönöm neki, hogy azóta is rendíthetetlenül hitt bennem mindig, amikor én magam nem; és megfogta a kezem számtalan nehéz szituációban, amikor igazán támogatásra volt szükségem. Tette mindezt nyers őszinteséggel, szeretetteljes megértéssel, csendes jelenléttel. Megtisztelt engem a barátságával.

A szakmai berkeken túl, legnagyobb hálával mégis szüleimnek tartozom: édesanyámnak Lanszky Melindának és nevelőapámnak Szabó Ferencnek. Ők azok az emberek a világban, akik mindig mellettem állnak; akik soha nem szűnő szeretettel és teljes bizalommal fordulnak felém; akik a legrosszabb pillanataimban is kitartóan támogatnak, segítenek engem lelkiileg és anyagilag egyaránt. Ő általuk tanultam meg, hogy a munkához alázattal, az élethez becsülettel, az emberekhez figyelemmel érdemes odafordulni. Nekik köszönhetően sosem félek az álmaimat követni.