

**AZ ÉLŐDONOROS MÁJTRANSZPLANTÁCIÓ
OPTIMALIZÁLÁSA -
DONOR ELŐKEZELÉSEK HATÁSAI MÁJRESZEKCIÓT
KÖVETŐEN ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLEN**

Doktori tézisek

Dr. Benkő Tamás

**Semmelweis Egyetem
Patológiai Doktori Iskola**



Témavezető: Dr. Kóbori László PhD, egyetemi docens
Hivatalos bírálók: Dr. Lengyel Gabriella PhD, egyetemi adjunktus
Dr. Monostory Katalin PhD, tudományos főmunkatárs
Szigorlati bizottság: Prof. Sándor József, egyetemi tanár
Dr. Mersich Tamás PhD, adjunktus
Dr. Szijártó Attila PhD, egyetemi tanársegéd

Budapest
2009

Bevezetés

A napjainkban is végzett klinikai szervtranszplantáció alapjait 1955 és 1967 között számos európai, nagy-britanniai és észak amerikai központ munkatársai dolgozták ki és bár a veseátültetést tartották az előnyöket élvező beavatkozásnak, mégis a májtranszplantáció köré szerveződő kutatások eredményeit tudták leginkább alkalmazni más szervek beültetése során.

A májtranszplantációs kutatások során derült fény a hasúri szervek egymásra gyakorolt élettani kölcsönhatásaira, jutott előre a veleszületett anyagcsere megbetegedések mechanizmusainak és kezelésének ismerete, illetve olyan növekedési faktorok megismerése, melyeknek szerepe van a májszövet növekedésében és regenerációjában.

Az immunszuppresszió, a sebészi technikák és a posztoperatív gondozás fejlődésével napjainkra a májtranszplantáció számos krónikus májbetegség gyógyító megoldásává vált, ez azonban a várólistákon a betegek számának jelentős növekedéséhez vezetett, mely maga után vonta a jelen klinikai májátültetés egyik megoldatlan problémáját, a súlyos szervhiányt.

Mind a split májátültetés, mind az élődonoros májátültetés kidolgozásának célkitűzése volt ezen statisztikák javítása.

Az élődonoros májátültetés (LDLT) előnyei között az egészséges donorból nyerhető jó minőségű szervet, a transzplantáció időpontjának és a megfelelő szöveti egyezés kiválasztását említhetjük. Hátránya a LDLT-nak a donor egészségi állapotának jelentős fokú veszélyeztetése. A nemzetközi irodalomból ismert a donorok számos posztoperatív szövődmény lehetősége, így vált elsődleges szemponttá az LDLT során a donorok védelme.

Szemben a cadaverből nyert szervdonációval, az élődonorból történő szervkivétel legtöbbször tervezett beavatkozás, melynek során lehetőségünk van a gondos donor előkészítésre, olyan előkezelések alkalmazására, melyek jótékony hatással bírnak a graftra és nem kártékonyak a donor szervezetre – vagy esetleg még előnyös hatásúak is azáltal, hogy védik a bennmaradó májszövetet. Irodalmi áttekintésünk alapján ilyen előkezelések potenciális hatóanyagai lehetnek az α -tocopherol (E vitamin), a flavonoid silibinin, egy nem esszenciális aminosav az L-glicin, vagy hormonális faktorként a tri-jódtironin.

α -Tocopherol

Az α -tocopherol egy hatékony, zsíroldékony antioxidáns, ami számos ischaemia/reperfúziós kísérlet során bizonyította már, hogy a májszövetre protektív hatású, illetve a hideg által okozott károsodások, valamint a hideg indukálta apoptózis ellen véd.

Silibinin

A silymarin nevű növényi hatóanyag, melyet a Máriatövis terméséből izolálnak jól ismert hepatoprotektív hatással bír. A teljes kivonat neve a silymarin, mely három izomerre bontható, a silibininre, a silidaninra és a silichristinre. A silibinin gátolja a hypoxia indukálta apoptózist csakúgy, mint a reperfüzió okozta, illetve az oxidatív gyulladásos komponensek által okozott károsodásokat.

L-glicin

Az L-glicin a legegyszerűbb nem esszenciális aminosav. Számos bizonyíték van arra, hogy effektív anti-inflammatorikus, immunomodulatív és cytoprotektív hatása van. Ezek teszik lehetővé, hogy a májsejtek és egyéb sejttípusok hypoxia okozta károsodása ellen védő hatású. Mindezek mellett kimutatták a Kupffer sejtek aktivációjára kifejtett gátló hatását, ezáltal a szervkivétel során történő manipuláció által okozott szövetkárosodás csökkentését.

Tri-jódtironin (T3)

A máj regenerációját feltáró mechanizmusok megismerésével, számos stratégia kidolgozása vált lehetővé (növekedési faktor injektálása, prekondicionálási technikák stb.), melyek mindegyike a hepatocyták regenerációs készségét fokozza. Ezek közül az exogén tri-jódtironin szervezetbe juttatása olyan májregenerációs választ stimulál, mely a DNS szintézis mértékét és időzítését befolyásolja.

A májreszekciót követő kielégítő májfunkció biztosításához, elengedhetetlenül szükséges a vaszkuláris és biliáris struktúrák megóvása, vagy helyreállítása. A szükséges artériás és portális vérellátás jelentőségéről bőséges irodalmi adat áll rendelkezésre, de nagyon kevés vizsgálat zajlott a vénás kiáramlás és a máj funkcionális illetve regenerációs kapacitásának összefüggésében. Az élődonoros májátültetéssel kapcsolatban vált ismertté, hogy a vénás kiáramlás csökkenése, akár a donor vagy a recipiens szervezetében történik, az artériás és portális vérellátás károsodását vonzza maga után, mely végül a máj regenerációs képességét és működését is károsan befolyásolja.

Azon betegek májfunkciója és regenerációs kapacitása, akik kisebb májszövet veszteséget szenvednek el jelentősen jobb, mint azoké, akik több mint 60%-át elveszítik a teljes térfogatnak. Ez az észrevétel olyan lineáris összefüggést feltételez, miszerint a graft, vagy a maradék májszövet mérete befolyásolja a regenerációs képességet. Ezen

következtetések molekuláris háttere, a pro- és antiregeneratív cytokinek és a transzkripciós faktorok szerepe mindmáig nem kellően tisztázott.

Célkitűzések

1. Az α -tocopherol, silibinin és L-glicin előkezelések hatásának vizsgálata a máj károsodására 90%-os patkány máj reszekciót követően.
2. A tri-jódtironin adásának hatásvizsgálata a máj regenerációjára 70%-os patkány májreszekciót követően, illetve az állatok túlélésére 90%-os májreszekciót követően.
3. Általunk kidolgozott patkánymodellen vizsgáltuk a májreszekciót követő vena hepatica szűkítés hatásait a májműködésre és májregenerációs képességére.
4. Transzkripciós faktorok valamint pro- és antiregeneratív cytokinek aktivációjának meghatározása különböző mértékű májreszekció elvégzését követően.

Anyag és módszer

1. Előkezelés α -tocopherollal, silibinnel és L-glicinnel

Állatok és módszerek

Minden állatot a Németországban érvényben lévő Állatvédelmi Törvény és az adott Intézet utasításai szerint, valamint a reszekció végzéséhez szükséges helyi felügyelet engedélyével kezeltünk. Hat-nyolc hetes hím Wistar patkányokat használtunk és osztottunk öt csoportra:

- 48 patkány kapott 3 napig műtét előtt naponta gyomorszondán keresztül α -tocopherolt (E vitamin; Uno-Vit-600, C.P.M. Contract-Pharma, Bruckmühl, Germany; 100 mg/ttkg).
- 48 a műtétet megelőzően 5 napon keresztül 100 mg/ttkg dózisban intraperitoneálisan silibinint injektáltunk (silibinin-dihidrogén szukcinát; Madaus adománya, Cologne, Germany, fiziológiás sóoldatban feloldva).
- 48 állat 5 napig műtét előtt glicinnel dúsított táplálékban részesült (5% L-glycine; Fa. Sniff, Soest, Germany; a standard patkánytáp is tartalmaz glicint de csak 0.87%-ban).
- A kombinált terápiás csoportban a patkányok mindhárom előkezelést kapták egyszerre.
- A kontroll csoport nem részesült előkezelésben.

Műtéti beavatkozás

Isofluran inhalációs narkózisban a korábban Higgins és Anderson által ismertetett módon 90%-os májreszekciót végeztünk. Kontroll vizsgálatként “áloperáció” történt, melynek során az altatott állatok máját mobilizáltuk, de nem reszekáltuk. Az “altatott” csoportban az állatok csak narkózisban, műtéti beavatkozásban nem részesültek.

Minták

A patkányokat a műtétet követően 0, 6, 12, 24, 48, 72 és 168 óra valamint 4 hét múlva leöltük. A maradék májszövetet eltávolítottuk, súlyát lemértük, formalinba vagy folyékony nitrogénbe helyeztük. Transzamináz enzimszinteket: aszpartát aminotranszferáz (AST), alanin aminotranszferáz (ALT), alkalikus foszfatáz (ALP) és összbilirubin szintet mértünk illetve prothrombin időt (PI) határoztunk meg a vérmintából standard laboratóriumi módszerek szerint.

Szövetteni vizsgálat

A szövetmintákat 4 %-os formaldehid oldatban fixáltunk, majd paraffinba ágyazva 5 μ m metszeteket készítettünk, hematoxylin-eosinnal festettünk. Más metszeteket naphtol-AS-D-Chloracetát-észteráz (ASDCL) festéssel jelöltünk.

Western blot

Szövetmintákat extrakciós pufferrel homogenizáltunk a Nuclear protein extraction kit utasítása szerint (Pierce: NE-PER kit). A protein koncentrációt Bio-Rad kit utasításai szerint határoztuk meg. A nukleáris extractumokat 7.5 % SDS-polyacrylamide gélelektroforézissel futattuk (SDS-PAGE) majd egy nitrocellulóz membránra helyeztük (Schleicher and Schuell). A hypoxia-inducible factor 1 α -át (HIF-1 α) egér HIF-1 α ellenes nyúl poliklonális antitesttel határoztuk meg (Novus Biologicals). α -tubulin (Sigma) szolgált kontrollként.

TUNEL festés

A TUNEL reakciót a megadott protokollok szerint végeztük (*In Situ* Cell Death Detection Kit). A hepatocita apoptózist mikroszkóp alatt 100x nagyításban 10 véletlenszerűen választott látótérben való TUNEL pozitív sejtek számolásával kvantifikáltuk.

Real Time - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Egy lépéses RT-PCR-t végeztünk iCycler iQ Real Time PCR (Bio-Rad Laboratories) és QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) használatával a gyártó által megadott utasítások szerint. Koncentrációs hibák elkerülése érdekében a β -actin house keeping gént használtuk referencia kontrollként.

2. Előkezelés tri-jódtironinnal (T3)

Állatok és módszerek

A tri-jódtironint (Sigma) 10 nappal a műtéti beavatkozás előtt oldott állapotban 4 mg/ttkg dózisban a kora reggeli órákban intraperitoneálisan injektáltuk a patkányoknak.

- Az tri-jódtironin stimuláló hatásának vizsgálata céljából 6-6 patkány kapott hatóanyagot a fent említett koncentrációban, vagy placébót, majd 10 nappal később 70%-os májreszekciót végeztünk, melyet követően 24 óra múlva leöltük az állatokat.
- Az tri-jódtironin túlélésre gyakorolt hatásának vizsgálata céljából 20 állat kapott hatóanyagot a fent említett koncentrációban vagy placébót, majd 10 nappal később 90%-os májreszekciót végeztünk, melyet követően 4 nappal öltük le a még túlélő állatokat.

Máj-testtömeg arány (LBWR)

A megfigyelési idő leteltét követően a maradék májszövetet eltávolítottuk, súlyát lemértük (A). A számot osztottuk a leöléskor mért teljes testtömeg súlyával (B), a kapott arányszámot 100-al szorozva a máj-testtömeg rátát kapjuk. $LBWR (\%) = A/B \times 100$.

Ki-67 immunhisztokémia

A sejtproliferáció kimutatására Ki-67 immunfestést végeztünk. Egér Ki-67 antigén ellenes antitestet használtunk, (Fa. DCS) hogy meghatározzuk azon májsejtek százalékos arányát, melyek regenerációs aktivitást mutatnak májreszekciót követően. Az ún. "Proliferációs index" öt-öt 100 μ m-n belüli periportális és perivenuláris látóterében számolt Ki-67-pozitív sejtek százalékos arányát mutatja.

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) immunhisztokémia

Az elsődleges antitestként nyúl anti-VEGF antitestet használtunk, melyet 1:600 arányban hígítottunk (Zymed laboratories). A VEGF expresszióját 5 véletlenszerűen választott látóterében gyengének (+), közepesnek (++) vagy kifejezettnek (+++) írtuk le.

RNS izolálás

Teljes RNS izolálást végeztünk az állatok májszövetéből Trizol (Gibco) használatával úgy, ahogy a gyártó utasításában szerepelt. Az RNS épségét és minőségét spektrofotometriával és 1% ethidium bromide agaróz gélelektroforézissel igazoltuk (Gibco).

Complementary DNS Array (cDNS)

Esetspecifikus cDNS arrayt végeztünk, mely 134 korábban leírt patkánygén vizsgálatát jelentette. A cDNS klón megjelenés alapján végül 18 gént választottunk ki, melyeket a „Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin” bocsátott rendelkezésünkre. A klónokat megsokszorozva plazmid DNS-t izoláltunk Qiagen Mini Prep Kit (Qiagen) használatával és a terméket PCR-al határoztuk meg. A maradék 116 gént elválasztottuk a teljes patkány cDNS-től úgy, hogy a Omniscript Reverse Transcriptase kit-et (Qiagen) használtuk. Kontrollként a gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz (13 GAPDH) és a β -actin génpróbák szerepeltek.

RT-PCR

Egy lépéses RT-PCR-t végeztünk Rotor-Gene 2000 real-time Amplification System (Corbett Research) és QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével a gyártó és forgalmazó utasításai szerint.

3. Vena hepatica szűkítése

Műtéti technika

A beavatkozást isofluran anesztéziában végeztük. A patkányokat a következő három csoportra osztottuk:

- A szubtotális anatómiai hepatectomia stimuláló hatásának vizsgálatához: 5 patkányon végeztünk Emond és tsai., valamint Higgins és tsai. szerinti 90%-os májreszekciót.
- A beszűkített vena hepatica szerepének vizsgálatához: 5 patkányon végeztünk anatómiai 70%-os májreszekciót kiegészítve a bal lateralis májlebeny vena hepatica-jának 50%-os 7-0-ás Prolene öltéssel történő beszűkítésével. (70%+ PH). Az állatok májlebenyét a műtőasztalon 10 percig obszerváltuk, azonnali esetleges perfúziós kiesés kizárása céljából.
- Kontrollcsoportként hagyományos 70%-os májreszekciót végeztünk, vena hepatica beöltés nélkül.

A műtéti beavatkozást követően 0, 24, 48, 72, és 120 óra múlva leöltünk az állatokat (n = 75). A 120 órát választottuk a legkésőbbi időpontnak, mert ezt követően - irodalmi adatok alapján - regenerációs vagy funkcionális aktivitás változás nem detektálható.

Az már korábban említett kísérleti munkákban részletesen leírt vizsgálatokon kívül (laborvizsgálatok, LBWR, génexpressziós vizsgálatok, Ki-67) a következőket végeztük el:

Galaktóz eliminációs kapacitás

Galaktóz eliminációs kapacitás meghatározásához (GEC), a műtét során 0.5ml 50% galaktózt injektáltunk a vena portaeba. A beadást megelőzően illetve 20 és 60 perc eltelte között 10 percnként vettünk vért. A beadást követő 1 óra múlva húgyhólyag punctio-val vizeletet nyertünk. A galaktóz eliminációs kapacitást a korábbi közlemények alapján: a teljes beadott galaktóz mennyiségének és a megfelelő időpontban mért koncentráció arányának mérésével vizsgáltuk korrigálva a vizeletben történő kiválasztódás koncentrációjával.

4. Cytokinek és transzkripciós faktorok aktivációjának vizsgálata a májreszekció nagyságának függvényében.

Állatok és módszerek

Hat-nyolc hetes Wistar patkányokat altattunk isofluran-nal. 70%-os és 90%-os májreszekciót végeztünk Higgins és tsai., illetve Emond és tsai. szerint. Négy csoportot alkottunk:

- Kontroll csoport
- Áloperáltak
- 70% reszekció
- 90% reszekció

Szérum és májszövet mintákat vettünk műtét közben, majd műtétet követően 2, 12, 24, 48, 72 óra és 7 nap után. Minden csoportban és időpontonként 4-4 patkány szerepelt.

Az már korábban említett kísérleti munkákban részletesen leírt vizsgálatokon kívül (laborvizsgálatok, LBWR, génexpressziós vizsgálatok, Ki-67) a következőket végeztük el:

ELISA

NF- κ B (NF- κ B p65 ELISA KIT), és STAT3 (STAT3 (pY705) ELISA KIT) ELISA vizsgálatokat a gyártó leírásainak megfelelően végeztük. Negatív és pozitív kontrollok használata mellett határoztuk meg a standard görbéket minden assayhez.

Statisztikai vizsgálatok

Minden a májsejt károsodás, májregeneráció vizsgálatához szükséges csoportban 6 állat szerepelt időpontonként, a HIF-1 α akkumulációját 4 patkány/csoport/időpont határoztuk

meg. A májenzim, prothrombin idő (PI) meghatározások egymást követő dupla mérésekkel történtek. Az eredményként kapott adatokat átlag \pm standard deviációban tüntettük fel. Az így kapott csoportos adatokat variációs analízissel (ANOVA) vetettük össze, Dunnett post hoc összehasonlítással. A $p < 0.05$ alatt értékeket tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

1. α -tocopherol, silibinin és L-glicin előkezelések eredményei

Az előkezelések semmilyen általános állapotot befolyásoló káros hatását nem tapasztaltuk. Az állatok átlagos testsúlya 336.3 ± 38.5 g volt a műtét időpontjában, a csoportok között szignifikáns eltérés nélkül. A 90%-os májreszekciót minden csoportban átlagosan 23.1 ± 5.0 perc alatt végeztük el, míg a narkózis átlagos ideje 36.4 ± 5.6 perc volt.

A reszekált máj tömege 3.15 ± 0.16 g / 100 g testtömegre, ami közvetlen a műtét után leölt állatok esetében (a maradék májszövet: 0.33 ± 0.05 g / 100 g testtömegre) 89.5% májreszekciót jelent. A reszekált májtömeg mérete szignifikánsan nem különbözött a csoportok között.

Túlélési arány

A korai posztoperatív időszakot (≥ 48 óra) a kezeletlen kontroll csoportban 18-ból 16 állat élte túl, 17/18 patkány a glicinnel előkezelt csoportban, 15/18 a silibininrel kezelt csoportban és csak 13/18 és 14/18 az E vitaminnal és a kombinált előkezelt csoportban. A hosszú távú túlélés 90% parciális hepatectomia után az összes csoportban hasonló volt (5/6), kivéve az α -tocopherol és a kombinált esetekben itt 6-ból 4 állat élte túl.

A májkárosodás laboreltérései

A 90%-os májreszekciót követő májsejt károsodás mértékét az aszpartát aminotranszferáz (AST), alanin aminotranszferáz (ALT) és az alkalikus foszfatáz (ALP) meghatározásával demonstráltuk. A glicin előkezelés több mint 50%-al csökkentette mindkét transzamináz enzimszint emelkedését. A silibinin előkezelés az AST szintet kevésbé az ALT-t viszont szignifikánsan csökkentette. Az α -tocopherol, illetve a kombinált előkezelések nem okoztak szignifikáns csökkenést. A májreszekció okozta alkalikus foszfatáz enzimszint emelkedést mindhárom előkezelés csökkentette.

A máj szintetikus funkciója

A 90%-os reszekciót követő első három napban a patkányok egy részén észleltünk klinikailag és szérum paraméterek alapján is icterust. A glicin előkezelés szignifikánsan csökkentette a szérum bilirubin szintet, míg a silibinin és az E vitamin kezelések (csakúgy, mint a kombinált kezelés) nem voltak jótékony hatásúak. A prothrombin idő a kontroll csoportban az első 24 órában emelkedett majd egy hét múlva érte el ismét a kiindulási értéket. A glicin előkezelés ezen görbe dinamikáján nem változtatott, de kevésbé volt kifejezett az emelkedés mint előkezelés nélkül.

A maradék májszövet regenerációja

A különböző időpontokban leölt patkányok maradék májszövege (a lobus caudatus) a posztoperatív 2. naptól kezdve szemmel láthatóan növekedett. Nem volt szignifikáns eltérés a csoportok között (nem reszekált állatok 3.34 ± 0.26 g/100 g testtömeg vs. reszekált patkányok 1.39 ± 0.46 –tól 1.67 ± 0.29 g/100 g testtömegig).

Szöveti és immunhisztokémiai eredmények

A glicinnel előkezelt állatok májszövetét szövettani feldolgozást követően vizsgálva nem láttunk nekrozisra utaló elváltozásokat, szemben a kezeletlenekével, bár zsíros degenerációra utaló jelek a későbbi időpontokban megjelentek. ASDCL festéssel váltak láthatóvá a kontroll csoportban a perisinusoidalis tereket infiltráló granulocyták, míg a glicinnel kezelt máj feldolgozása során látottak a normál májszövethez voltak hasonlóak (7.1 ± 2.5 granulocyta látóterenként kezeletlen állatok maradék májszövetében; 5.9 ± 4.3 granulocyta a glicinnel előkezelt állatok maradék májszövetében; $p > 0.05$). TUNEL festés során a korai posztoperatív időszakban csökkent apoptotikus aktivitást láttunk glicin előkezelés során, míg a későbbi időpontokban (48h) ezt a különbséget nem láttuk az előkezelt és a kezeletlen csoport között. (27 ± 9 TUNEL pozitív sejt – főleg hepatocyták – 10 látóterenként a nem előkezelt csoport maradék májszövetében; 5 ± 4 TUNEL pozitív sejt a glicinnel előkezelt állatoknál műtét után 24h-val; $p < 0.01$).

Gyulladásos faktorok aktivációja

Sem a műtét után azonnal, sem 12 óra múlva nem tudtuk az IL-1- β gyulladásos cytokin aktivációját detektálni, egyik csoportban sem (RT-PCR; a kimutatott érték a nem operált állatok értékével egyezett). Ezzel szemben, az ICAM-1 adhéziós molekula korai

indukciója volt megfigyelhető 90%-os májreszekciót követően, és ennek gátlása glicin előkezelés után.

HIF-1 α aktivációja

A kizárólag narkózisban részesült állatok hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) aktivációja kismértékben volt kimutatható, és az áloperált csoportban is (kizárólag a májlebnyek mobilizálása történt) alig kimutathatóvá csökkent. Ezzel szemben 90%-os hepatectomia után jelentős fokú HIF-1 α emelkedés mutatkozott, amit a glicin előkezelés szignifikánsan csökkentett.

2. A tri-jódtironin (T3) előkezelés hatásai

T3 előkezelés hatása a máj-testtömeg arányra (LBWR)

A T3-al előkezelt, majd 70%-os májreszekción átesett állatoknál 24 óra után a LBWR volt, ami szignifikánsabb magasabb érték, mint az előkezeletlen csoportban (LBWR: $1.9 \pm 0.12\%$ vs. $1.65 \pm 0.19\%$; $p = 0.049$). Hasonló eredményt kaptunk 90%-os reszekciós csoportban (T3 előkezelt állatok: $1.57 \pm 0.15\%$ vs. placebo $1.2 \pm 0.14\%$; $p = 0.025$).

T3 előkezelés hatása a proliferációs indexre (Ki-67)

Ahogy várható volt a reszekált patkányok maradék májszövetében kifejezett proliferációs aktivitást detektáltunk az érintetlen májszövethez képest. Ez az érték jelentősen emelkedett T3 előzetes adását majd reszekciót követően 24 órával (78.6 ± 9.46) összehasonlítva a csak placebo kapott csoportban látottakkal (41.30 ± 19.92) ($p < 0.001$). 4 nappal 90%-os májreszekció után $68.32 \pm 18.38\%$ -a a hepatocytáknak mutatott proliferációs aktivitást a T3 előkezelt csoportban, míg $42.76 \pm 14.73\%$ a kontroll állatok májszövetében ($p < 0.001$).

T3 előkezelés hatása a VEGF expresszióra

A T3-al előkezelt állatok májszövetében kifejezette erős VEGF expressziós aktivitást detektáltunk (+++), ami a placébó csoportban csak gyenge (+) vagy mérsékelt (++) volt.

T3 előkezelés hatása a túlélésre

A T3 előkezelés túlélésre kifejtett hatását vizsgáltuk a subtotalis májreszekciós modellen. A 90%-os májreszekció elvégzését követően 96 órán át megfigyeltük az állatokat. Ezalatt

7 patkányt veszítettünk a 20-ból a T3-al előkezelt csoportban, míg 11-et a csak placébót kapott állatok közül. ($p = 0.1318$).

T3 hatása a génexpresszióra

Ahhoz hogy tovább vizsgálhassuk a T3 modulátor hatásai mögött rejlő mechanizmusokat, 134 regerációban ismertén aktív gén, eset specifikus complementary DNS array-t készítettük elő. T3 előkezelés után 70%-os májreszekción átesett patkányok 24 órát követően nem mutattak jelentős génexpressziós eltérést a kezeletlen állatokhoz képest. A továbbiakban sem tudtunk a két csoport között kimutatni szignifikáns különbséget. 90%-os hepatectomia során a T3 injekciót kapott állatok RT-PCR-al megerősített Fms-related tyrosine kinase 1 (Flt1), Peroxisome proliferator-aktivált receptor (PPAR), és complement 3 (C3) expressziója szignifikánsan magasabb volt, mint a placébót kapott állatoké.

3. A vena hepatica beszűkítés következményei

Túlélési arány

Egyetlen patkányt sem veszítettünk el 70%-os májreszekciót követően. 25 % mortalitás volt megfigyelhető 70%+ csoportban (vena hepatica szűkítés) és 26% a 90%-os reszekción átesett csoportban. Az állatok elvesztése a posztoperatív 48 és 72 óra között történt.

Szövetteni és immunhisztokémiai vizsgálati eredmények(Ki-67)

A műtétet követő 120 óra múlva sem a klasszikus sem a 70%+ csoportban nem volt szignifikáns a különbség a proliferációs index tekintetében ($6.6 \pm 3\%$ vs. $7.5 \pm 2\%$). 70%-os reszekciót követően 24-48 óra múlva jelentősen emelkedett proliferációs aktivitást detektáltunk. Ezek az értékek magasabbak voltak, mint azokban az állatokban ahol a 70% reszekciót kiegészítettük a vena hepatica szűkítésével. Azon patkányok maradék májszövetében, akik 90%-os reszekción estek át magasabb mitotikus aktivitást figyeltünk meg. A proliferációs index görbe kinetikája hasonló képet mutatott a hagyományos és a 70%+ reszekciót követően; lassú emelkedés a 24 órában, majd 48 óránál gyors emelkedés, 72 és 120 után ismételt csökkenéssel. A 90%-os reszekción átesett állatoknál már 12 illetve 24 óra után jelentősen emelkedett proliferációs index volt látható, de ezek sem voltak statisztikailag szignifikánsan magasabb értékek összehasonlítva a 70%+ csoporttal ($p > 0.05$).

Galaktóz eliminációs kapacitás (GEC)

A GEC egy olyan funkcionális teszt, melynek segítségével az általunk beadott és a máj által feldolgozott galaktóz szérumszintjét határozzuk meg. Nem volt szignifikáns különbség a 90%-os és a 70%+ reszekción átesett csoportok között ($7.96 \text{ mg min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ vs. $8.46 \text{ mg min}^{-1} \text{ g}^{-1}$). Ezzel ellentétben a csak hagyományos 70%-os májreszekción átesett állatok GEC értékei szignifikánsan magasabbak voltak ($11.74 \text{ mg min}^{-1} \text{ g}^{-1}$) összehasonlítva a 90%-os ($p < 0.001$) és 70%+ csoportokkal ($p < 0.002$).

Génexpresszió analízis

Ahhoz hogy tovább vizsgálhassuk a vénás kiáramlás károsodásának modulátor hatásai mögött rejlő mechanizmusokat, a regenerációban ismerten aktív gének eset specifikus complementary DNS array-t készítettük elő. A fentebb említett 134 gén közül 14-et találtunk (TGF- β , Ftl, TNF- α , TGF- β receptor1, FLT1, VEGF- δ , PPAR, NFkB- α , IRAK-M, PDGF- α , C3, Cyclin G1 (Ccn1), Ferritin, heavy polypeptide 1 (Fth1) and V-jun) melyek a kontroll állatokéval összehasonlítva aktiválódtak obszervációnk során. Érdekes, hogy összehasonlítva a csoportokat az expresszió kinetikája nem változott szignifikánsan. Ezeket a leleteinket 3 véletlenszerűen választott génen megerősítettük RT-PCR segítségével is (TGF- β receptor1, PDGF- β és Irak-M).

4. A májreszekció méretének hatása a transzkripciós faktorok és citokinek expressziójára

Máj regeneráció

A máj testtömeg hányados (LBWR) átlaga $4.06\% \pm 0.35\%$ volt a kontroll és az áloperált állatok csoportjában. 70%-os májreszekciót követően 7 napig a maradék májszövetet vizsgálva, a közvetlen posztoperatív időhöz képest ($0.74\% \pm 0.06\%$), folyamatos emelkedést láttunk $2.70\% \pm 0.15\%$ értékig. A legkorábbi szignifikáns LBWR különbséget már 2 illetve 12 óra ($0.88\% \pm 0.15\%$ vs. $1.39\% \pm 0.07\%$; $p = 0.006$) elteltével láttuk.

Transzamináz és LDH szérumszintek

Az AST és az ALT értékek szignifikánsan magasabbak voltak 70% reszekciót követően a kontroll csoportokhoz képest. Mindkét enzim 12 órával műtét után érte el a csúcshinteket (AST, 12 h: $1055 \pm 55 \text{ U/l}$ a 70%-os reszekciós csoportban vs. $2204 \pm 739 \text{ U/l}$ a 90%-os csoportban, $F = 0.011$; ALT, 12 h: $753 \pm 110 \text{ U/l}$ a 70% vs. $1706 \pm 725 \text{ U/l}$ a 90%-os

reszekáltaknál, $p = 0.011$). Az LDH szintek 70%-os májreszekciót követően szignifikánsan nem változtak a kontrollhoz képest, kivéve a 7. napon (70% reszekció LDH: 2060 U/I vs. áloperált 890 U/I; $p = 0.033$).

NF- κ B és STAT3 aktiváció

Ahogy, azt irodalmi ismereteink alapján is vártuk, az NF- κ B aktivációja 70%-os májreszekciót követően a korai regenerációs szakban volt emelkedett (0 h: 273.33 ± 24.45 pg, $P = 0.024$; 2 h: 285.34 ± 36.49 pg, $p = 0.009$; 12h: 313.21 ± 17.22 pg, $p = 0.001$). Az NF- κ B ebben a csoportban egyébként 7 napon keresztül mutatott emelkedett értékeket a kontroll áloperált csoporthoz képest. 90%-os májreszekciót követően az NF- κ B aktivációja 24 órával később jelentkezett, ekkor azonban szignifikánsan magasabb értékeket mutatott (475.66 ± 144.29 , $p = 0.048$) a csúcst pedig 48 óra múltán érte el (747.18 ± 146.36 pg, $p = 0.02$). A foszforilált STAT3 (pY705) meghatározásához ELISA módszert használtunk. Ennek aktivációja volt megfigyelhető 70%-os májreszekciónál már a sebészeti ténykedés közben is 16 szoros és 90%-os reszekciónál 3 szoros mértékben. A sebészeti beavatkozást követően 2 órával a 70%-os csoportban szignifikánsan emelkedett STAT3 aktivitást detektáltunk (138 szoros) csakúgy, mint a 90%-os májreszekált csoportban (197 szoros). Az értékek 24 óra elteltével a kiindulási szintre csökkentek vissza.

Pro- és anti-regeneratív cytokinek expressziója

A 70%-os májreszekción átesett állatok TNF- α expressziója 6 órával a műtétet követően emelkedett összehasonlítva a kontroll csoporttal, a maximumot 24 óra elteltével érte el, majd visszacsökkent a kiindulási értékekre. Összehasonlítva, 90%-os reszekciót követően nem detektáltunk szignifikáns emelkedést a TNF- α expresszió tekintetében. Az Interleukin-6 megjelenése 70%-os májreszekciót követően bifázisos tendenciát mutatott, 2 és 12 órás posztoperatív csúcsokkal, míg 90%-os reszekció esetén csak 2 órával műtét után volt szignifikáns az emelkedés. A posztoperatív HGF szintje lassan emelkedett 12 órán keresztül, nem mutatva különbséget a csoportok között. Korai szignifikáns TGF- α expressziós emelkedés csak a 70%-os reszekciós csoportban volt detektálható, későbbi időpontokban ismét alacsonyabb értékek voltak kimutathatók, míg 90%-os reszekciónál 7 napi folyamatosan emelkedő értékeket láttunk. A korai időpontokban enyhe emelkedést detektáltunk a TGF- β expressziója tekintetében mindkét csoportban, a csúcst 12 óra

elteltével érte el, de csak a 70%-os májreszekció esetében (8.25-szörös mértékben a kontrollhoz képest). Ezt követően a TGF- β expressziója visszatért a kiindulási értékre.

Az apoptotikus aktivitás meghatározása

A kontroll állatok TUNEL indexe (TUNEL pozitív sejtek aránya) megközelítően 0.12% volt. Közvetlenül 70%-os májreszekciót követően ez az érték 0.44%, majd 24 órával később 0.27% és 48 óra múltán 0.20%-ra változott. A kontroll értéket 7 nap múlva értük el (0.15%). 90%-os májreszekciót követően az apoptotikus aktivitás ugyan később 24 óra múltán csúcsosodott, 48 óra után csökkent 0.18%, azonban 7 nappal később egy újabb csúcs jelent meg (0.63%) ellentétben a 70%-os májreszekált csoporttal.

Következtetések

- Nem tapasztaltuk a glicin, E vitamin, silibinin előkezelésnek negatív hatását sem a patkányok pre-operatív általános állapota, sem a műtét utáni túlélésének tekintetében, bár az α -tocopherol mindennapos gyomorszondán keresztüli adása, jelentős stressz faktort jelentett az állatok számára. A patkányok testsúly növekedése a posztoperatív időszakban a glicin csoportban enyhén nagyobb, a silibinin és a kombinált csoportban jelzetten kisebb, az E vitamin csoportban pedig jelentősen kisebb volt. Ezen kívül a laborvizsgálatokban az α -tocopherol enyhén toxikus hatását is detektáltuk, ami valószínűleg a nem megfelelő dózis választás következménye.
- A glicin előkezelés szignifikánsan csökkentette a transzamináz enzimszinteket (AST, ALT) és az alkalikus foszfatáz szintjét, ami májreszekciót követő alacsonyabb májsejt károsodást mutat. Ezt a hatást úgy tapasztaltuk, hogy a jelen modellben nem szerepel technikailag ischaemia/reperfúzió. A glicin előkezelés hepatoprotektív hatását a szövettani vizsgálat során is észleltük, valamint a TUNEL festés is alacsonyabb apoptotikus aktivitást igazolt.
- A glicin előkezelés ezen túl csökkenti az ICAM-1 adhéziós molekula indukcióját is, valamint a HIF-1 α aktivációját 90%-os májreszekciót követően.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a glicin előkezelés szignifikánsan csökkenti a 90%-os májreszekciót követő szöveti májkárosodást. Ezért élődonoros transzplantáció során a donor előkezelés hasznos lehetne a maradék májszövet és esetleg a beültetendő graft védelme érdekében. Ezen túlmenően a glicin előkezelés nemcsak a transzplantáció során lehet

jótevény hatású, hanem egyéb olyan esetekben is amikor a páciensen májresekciót tervezünk végrehajtani.

- Tri-jódtironinnal előkezelte állatok máj-testtömeg aránya magasabb volt, mint a kezeletlen kontrolloké, magasabb fokú regenerációs aktivitást feltételezve. Ezeket az adatokat alátámasztotta a hepatocyták szignifikánsan magasabb proliferációs indexe is (Ki-67). Ezen adatok magyarázhatóak a neovascularisatio-ért felelős VEGF expresszióval is, mely T3 előkezelés mellett jelentősen nagyobb fokú volt.
- A T3 előkezelés jelentősen nem befolyásolta májsejt károsodás mértékét, és a túlélési rátát sem. Nem találtunk eltérést a szérum laborértékek (AST, ALT és LDH) vizsgálata során a két csoport között. A génindukciós vizsgálataink sem mutattak szignifikáns különbséget.

Összefoglalva kijelenthetjük, hogy a T3-al előkezelte állatok májregenerációs aktivitása jelentősen növekszik 70%-os és 90%-os májresekciót követően. A jelenség valószínűleg a neovascularisatio növekedésével magyarázható, ahogy immunhisztokémiai vizsgálataink is igazolták. Ezért lehet a tri-jódtironin előkezelés ígéretes stratégia a regenerációs aktivitás növelésére akár élődonoros májtranszplantáció, vagy egyéb általános sebészeti májresekciók esetén.

- A vénás kiáramlás károsításával végzett májresekció után a proliferációs index hasonló kinetikát mutatott, mint a klasszikus 70%-os májresekciót követően. Azon patkányok hepatocytái, melyeken 90%-os májresekciót végeztünk magasabb proliferációs értékeket mutattak, igaz összehasonlítva a 70%+ resekcióval nem szignifikáns mértékben.
- A 70% májresekciót követő vena hepatica szűkítéses csoportban a hematoxin eosinnal festett májmetszetekben a hepatocyták perivenuláris sejtduzzanatot mutattak, eosinohil testecskék jelentek meg a cytoplasmikus anyagban, szemben azokkal az állatokkal, melyeken hagyományos 70%-os resekciót végeztünk.
- Szignifikáns eltérés mutatkozott a májszövet károsodás mértékének laboratóriumi jelei (transzamináz szintek) a génextpressziós aktivitás és a galaktóz eliminációs kapacitás tekintetében a 70%+ és a 90%-os májresekció között. Ugyanezeket a különbségeket hagyományos 70%-os resekció esetén nem detektáltuk.

Összefoglalva elmondhatjuk, állatmodellen igazoltuk, hogy reszekciót követően a máj regenerációs kapacitása, működése függ a vénás kiáramlástól. A máj regenerációs képessége jobban függ a vénás drainage-től és a volumen vesztéstől, mint a működése. Ezen adatok azt igazolják, hogy májreszekció esetén inkább a vénás kiáramlás meglétét kell szem előtt tartani, szemben a máj bennmaradó mennyiségének mértékével. Inkább kevesebb – de elégséges - maradék májszövet intakt vagy helyreállított vénás kiáramlással, mint bennhagyott több májszövet elégtelen drainage-al.

- Összehasonlítva az áloperált patkányokkal a máj-testtömeg index csakúgy, mint a transzamináz enzimszint aktivitás jelentősen nőtt 70%-os reszekciót követően.
- Ahogy az irodalomban is láthattuk, az NF- κ B és STAT3 aktivációja 70%-os májreszekciót követően a korai regenerációs fázisban emelkedett és végig magas maradt, míg 90%-os reszekció esetén csak később emelkedett és hamar lecsengett az aktivitása.
- 70%-os májreszekciót követően a TNF- α , IL-6, HGF expressziója jelentősen növekedett a kontrollhoz képest. A TUNEL assay-vel igazolt apoptotikus aktivitás 70%-os reszekciót követően közvetlen a műtét után volt magas, míg 90%-os reszekció után később, csak 24 óra múltán.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a máj regenerációjában szerepet játszó molekuláris mechanizmusok nagyrészt az elveszített májtömeg mennyiségétől függenek. Ezt mutatja a 90%-os májreszekciót követő csak megkésett NF- κ B szint növekedés, illetve a pro- és antiregeneratív cytokinek alacsonyabb aktivitása is. Ezért van jelentősége azon módszereknek, melyek célja ezen faktorok korai és nagyobb aktivitásának elérése, így javítva a betegek májreszekciót követő klinikai kimenetelét.

Közlemények

A dolgozathoz kapcsolódó közlemények

1. **Tamas Benko**, Stilla Frede, Yanli Gu, Jan Best, Hideo Andreas Baba, Jörg Friedrich Schlaak, Herbert de Groot, Joachim Fandrey, and Ursula Rauen. Glycine pretreatment ameliorates liver injury after partial hepatectomy in the rat. *J Invest Surg*. In Press. UIVS-2009-0047.R1 *IF: 1,05*
2. Bockhorn M, Frilling A, **Benko T**, Best J, Sheu SY, Trippler M, Schlaak JF, Broelsch CE. Tri-iodothyronine as a stimulator of liver regeneration after partial and subtotal hepatectomy. *Eur Surg Res*. 2007;39(1):58-63. *IF: 0,92*
3. Bockhorn M, **Benkő T**, Opitz B, Sheu SY, Sotiropoulos GC, Schlaak JF, Broelsch CE, Lang H. Impact of hepatic vein deprivation on liver regeneration and function after major hepatectomy. *Langenbecks Arch Surg*. 2007 Sep 12; *IF: 1,577*
4. Sowa JP, Best J, **Benko T**, Bockhorn M, Gu Y, Niehues EM, Bucchi A, Benedetto-Castro EM, Gerken G, Rauen U, Schlaak JF. Extent of liver resection modulates the activation of transcription factors and the production of cytokines involved in liver regeneration. *World J Gastroenterol*. 2008 Dec 14;14(46):7093-100. *IF: 2,081*

Egyéb közlemények

1. P Sótonyi, É Keller, J Járny, B Nemes, **T Benko**, A Kovács, A Torakán, I Rajs. A light stabilizer Tinuvin 770-induced toxic injury of adult rat cardiac myocytes. *Forensic Science International*, 2001;119:322-27. *IF:1.052*
2. Bockhorn M, **Benkő T**, Opitz B, Schlaak JF, Broelsch CE, Lang H. Einfluss des Lebervenenauflusses auf die regeneration und funktion der leber nach erweiterter Teilentfernung. *Chirurgisches Forum 2007 für experimentelle und klinische Forschung*. Forumband 36. German
3. **Benko T**, Fehérvári I, Rác K, Friedrich O, Gálfy I, Török S, Rempert A, Járny J, Bodor E, Szabolcs Z. Az első sikeres kombinált szív- és vesetranszplantáció Magyarországon. *Orv Hetil*. 2008 Jan 27;149(4):147-52.
4. Kóbori L , Németh T, Nagy P, Dallos G, Sótonyi P, Fehérvári I, Nemes B, Görög D, Patonai A, Monostory K, Doros A, Sárváry E, Fazakas J, Gerlei Zs, **Benkő T**, Piros L, Járny J, De Jong KP. Experimental results and clinical impact of using autologous rectus fascia sheath for vascular replacement. *Acta Vet Hung*. 56(3), 2008, pp411-420 *IF:0,624*

5. Heuer M, **Benkő T**, Cicinnati VR, Kaiser GM, Sotiropoulos GC, Baba HA, Treckmann JW, Broelsch CE, Paul A. Effect of low-dose rapamycin on tumor growth in two human hepatocellular cancer cell lines. *Transplant Proc.* 2009 Jan-Feb;41(1):359-65. *IF:1,055*

Poszterek

1. J Best, **T Benkő**, M Goralski, P Grünwald, M Trippler, M Bockhorn, G Gerken, U Rauen, JF Schlaak. Analysis of the transcriptional response after partial hepatectomy – use of customized gene arrays. GASL, Leipzig, Germany 2006.
2. **T Benkő**, H Baba, H de Groot, U Rauen. Effekte einer Glycin-Vorbehandlung bei der Leberteilektomie an der Ratte. 17. Workshop for Experim. and Clin. Livertransplantation and Hepatology. *Transplantationsmedizin*; ISSN0946-9648, Suppl. I-2006
3. J Best, **T Benkő**, M Goralski, P Grünwald, M Trippler, M Bockhorn, G Gerken, U Rauen, JF Schlaak. Hepatische Genexpression nach Leberteilektomie – Etablierung eines Inhouse-cDNA-Makroarrays. 17. Workshop for Experim. and Clin. Livertransplantation and Hepatology. *Transplantationsmedizin*; ISSN0946-9648, Suppl. I-2006
4. L Kóbori, T Németh, P Nagy, B Füle, Sz Toth, G Dallos, **T Benkő**, L Piros, D Görög, M Sloof, J Jaray, K De Jong: Experimental vascular graft for liver transplantation. *The Second Scientific meeting of the Japan-Hungarian Surgical Society*
5. **T Benkő**, A Doros, I Fehérvári, D Görög, B Nemes, Z Máthé, L Piros, E Sárvári, Z Gerlei, K Monostory, J Járny, L Kóbori. Role of oxidative stress and arterial blood supply after liver transplantation. ESOT 2007, *Transplant International*. September 2007 - Vol. 20 Issue s2.
6. M Heuer, **T Benko**, VR Cicinnati, GC Sotiropoulos, HA Baba, M Hertl, A Frilling, CE Broelsch. Effect of Low Dose Rapamycin on Tumor Growth in Two Human Hepatocellular Cancer Cell Lines. *American Transplant Congress, Toronto, Canada 2008. American Journal of Transplantation, June 2008, Suppl.*
7. **T Benkő**, H Baba, L Kóbori, H de Groot, U Rauen. Glycine ameliorates liver injury after partial hepatectomy in rats. ELITA 2009, *Transplant International*. April 2009, Vol22, Suppl-1.
8. **T Benkő**, H Baba, L Kóbori, H de Groot, U Rauen. Glycine ameliorates liver injury after partial hepatectomy in rats. ESOT 2009, Paris, *Transplant International* August 2009, Vol. 22, Suppl-2.,

Köszönetnyilvánítás

Elsők között szeretném megköszönni németországi témavezetőmnek a Duisburg-Essen Egyetem Physiological Chemistry Institute igazgatójának **Professor Ursula Rauennek**, hogy biztosította számomra a helyet, a technikai háttérrel, a szakmai segítséget, melyek nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre. Az Intézet minden asszisztensének, akik aktívan résztvettek a minták feldolgozásában szeretnék köszönetet mondani. Közülük is kiemelném **N. Boschenkov, B. Lammers, P. Freitag** and **D. Möllmann** nevét. A munka a Deutsche Forschungsgemeinschaft támogatását élvezte (Klinische Forschergruppe “Optimierung der Leberlebendspende”, KFO 117) a németországi tartózkodásomat, pedig a DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst) ösztöndíja biztosította. Megemlíteném **Maximilian Bockhorn** és **Professor Jörg Schlaak** nevét, akik a tri-jódtironin előkezelés és génexpressziós vizsgálatok során segítettek az Essen-i egyetem Gastroenterológiai kutatólaborjában, az mRNS, RT-PCR, cDNS arrays; Western blot analízis módszerek ismeretével és alkalmazásával.

Meg szeretném köszönni klinikai témavezetőmnek, kollégámnak és barátomnak **Kóbori Lászlónak** is a támogatását, az Ő kivételes klinikai gondolkodása és májtranszplantációban való jártassága számos alkalommal nyújtott segítséget.

Köszönet illeti **Márton Emőkét** és **Laczik Ceciliát**, akik segítették előrehajtásomat a Semmelweis Egyetem Doktori Iskolájának útvesztőjében.

Szeretném megköszönni **Járay Jenő** Professzor Úrnak, hogy lehetővé tette, hogy eleinte diákkörösként, majd munkatársaként bekapcsolódhattam a Transzplantációs és Sebészeti Klinika tudományos életébe.

Köszönöm **Lengyel Gabriella, Monostory Katalin, Toronyi Éva** és **Varga Marina** kritikus bírálatait és jó tanácsaikat, melyeket igyekeztem megfogadni.

Örök hála illeti a **Treckmann családot**, különösen sógoromat Jürgent, aki nélkül nem tudtam volna eljutni egy ilyen jól felszerelt és professzionális kutató munkát végző intézetbe.

Köszönettel tartozom a Transzplantációs és Sebészeti Klinika valamennyi dolgozójának, hogy a munkámhoz a szükséges támogatást megadták.

Végül és nem utolsó sorban szeretném megköszönni feleségemnek, fiaimnak a nélkülözést, a türelmet és a nem szűnő szeretetet, mellyel munkámat segítették és segítik.