

Morfológiai és funkcionális változások akcelerált májregeneráció során

Doktori értekezés

Dr. Budai András

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Szijártó Attila, DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Oláh Attila, DSc., egyetemi tanár

Dr. Hagymási Krisztina, Ph.D.,

egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Wéber György, Ph.D., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Szabó Andrea, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Dávid Csaba Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest

2020

Tartalomjegyzék

| | |
|--|-----------|
| Rövidítések jegyzéke | 5 |
| 1. Bevezetés | 8 |
| 1.1. Történelmi kitekintés: A PVO technikák evolúciója | 11 |
| 1.2. Az ALPPS | 12 |
| 1.3. Az ALPPS és a konvencionális PVO technikák főbb jellemzői | 13 |
| 1.4. A máj regenerációja | 15 |
| 1.5. A májfunkció változásai regeneráció során | 21 |
| 1.6. Mitokondriális élettan és az organelláris energiatermelés | 22 |
| 1.7. Mitokondriális biogenezis | 24 |
| 1.8. A mitokondriumok és fizikai felkészítés kapcsolata | 26 |
| 1.9. A rehabilitáció | 28 |
| 2. Célkitűzések | 30 |
| I. kísérletsorozat célkitűzései | 30 |
| II. kísérletsorozat célkitűzései | 31 |
| 3. Módszerek | 32 |
| 3.1. Etikai nyilatkozat | 32 |
| 3.2. Állatok tartása | 32 |
| 3.3. Állatok beosztása | 33 |
| 3.4. Tesztelési protokoll | 33 |
| 3.5. Műtéti beavatkozások | 34 |
| 3.6. Morfometriai vizsgálatok | 35 |
| 3.6.1. A májtömeg változások és a regeneráció vizsgálata | 35 |
| 3.6.2. Szövetteni vizsgálatok | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 3.6.3. Elektronmikroszkópia | 35 |
| 3.7. Mitokondriális vizsgálatok | 36 |
| 3.7.1. Mitokondrium izolálás | 36 |
| 3.7.2. Mitokondriális légzés vizsgálata | 36 |
| 3.7.3. Mitokondriális ATP termelés vizsgálata | 37 |
| 3.7.4. Mitokondriális NAD(P)H háztartás vizsgálata | 37 |
| 3.7.5. Mitokondriális ROS (reaktív oxigéngyök) termelés vizsgálata | 38 |
| 3.8. qPCR (kvantitatív polimeráz láncreakció) vizsgálatok | 38 |
| 3.8.1. RNS izolálás | 38 |
| 3.8.2. cDNS (komplementer dezoxiribonukleinsav) szintézis | 39 |
| 3.8.3. Valós idejű, kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR) | 39 |
| 3.9. Western blot vizsgálatok | 40 |
| 3.9.1. Protein izolálás | 40 |
| 3.9.2. Gélelektroforézis, transzfer és jelölés | 40 |
| 3.10. Statisztikai analízis | 41 |
| 4. Eredmények | 42 |
| 4.1. I. Kísérlet: Sejt-energetikai változások vizsgálata PVL és ALPPS során | 42 |
| 4.1.1. Lebentömeg változások PVL és ALPPS műtétet követően | 42 |
| 4.1.2. A sejtciklusba lépés aktivitásának változásai PVL-t és ALPPS-t követően | 43 |
| 4.1.3. A PVL-t és ALPPS-t követő, terminális oxidációban bekövetkező változások | 45 |
| 4.1.4. A PVL-t és ALPPS-t követő ATP termelésében bekövetkező változások | 47 |
| 4.1.5. NAD(P)H egyensúly változások PVL-t és ALPPS-t követően | 49 |
| 4.1.6. A szabadgyök termelés változásai PVL-t és ALPPS-t követően | 51 |
| 4.1.7. A respiráció kontroll változásai PVL és ALPPS után | 52 |
| 4.1.8. RNS expresszióban bekövetkező változások | 53 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1.9. Gyulladásos válaszreakcióban bekövetkező változások PVL és ALPPS hatására | 54 |
| 4.1.10. A mitokondriális biogenezisben bekövetkező változások | 55 |
| 4.1.11. Mitokondriális proteintartalom változások | 57 |
| 4.1.12. Mitokondriális méretváltozások | 58 |
| II. kísérlet: A rehabilitáció hatásainak vizsgálata ALPPS-t követő májregeneráció során | 59 |
| 4.2.1. Az ALPPS és ALPPS+P csoportok pre-és posztoperatív testtömegei | 59 |
| 4.2.2. A fizikailag felkészített és nem felkészített, ALPPS műtéten átesett állatok RML lebenyeinek regenerációjára | 60 |
| 4.2.3. Az oxigénfelhasználás változásai ALPPS-t követően fizikai felkészítésben részesült és nem részesült állatok esetében | 62 |
| 4.2.4. Az ATP termelés változásai ALPPS esetén fizikai felkészítést követően | 64 |
| 4.2.5. A P/O (termelt ATP/fogyasztott oxigén) hányados változása prehabilitációban | 66 |
| 4.2.6. A NAD(P)H egyensúly változásai prehabilitációt követően | 67 |
| 4.2.7. Gyulladásos válaszreakció ALPPS-t és prehabilitációt követően | 69 |
| 4.2.8. A rehabilitáció hatásai a mitokondriális biogenezisre ALPPS kezelt állatcsoportokban | 71 |
| 4.2.9. A rehabilitáció légzési komplex szintézisre gyakorolt hatásai | 73 |
| 5. Megbeszélés | 75 |
| 6. Következtetések | 91 |
| Az I. kísérletsorozat főbb következtetései: | 91 |
| A II. kísérletsorozat főbb következtetései: | 92 |
| 7. Összefoglalás | 93 |
| 8. Summary | 94 |

| | |
|---------------------------------|------------|
| 9. Irodalomjegyzék | 95 |
| 10. A jelölt publikációi | 120 |
| 11. Köszönetnyilvánítás | 121 |

Rövidítések jegyzéke

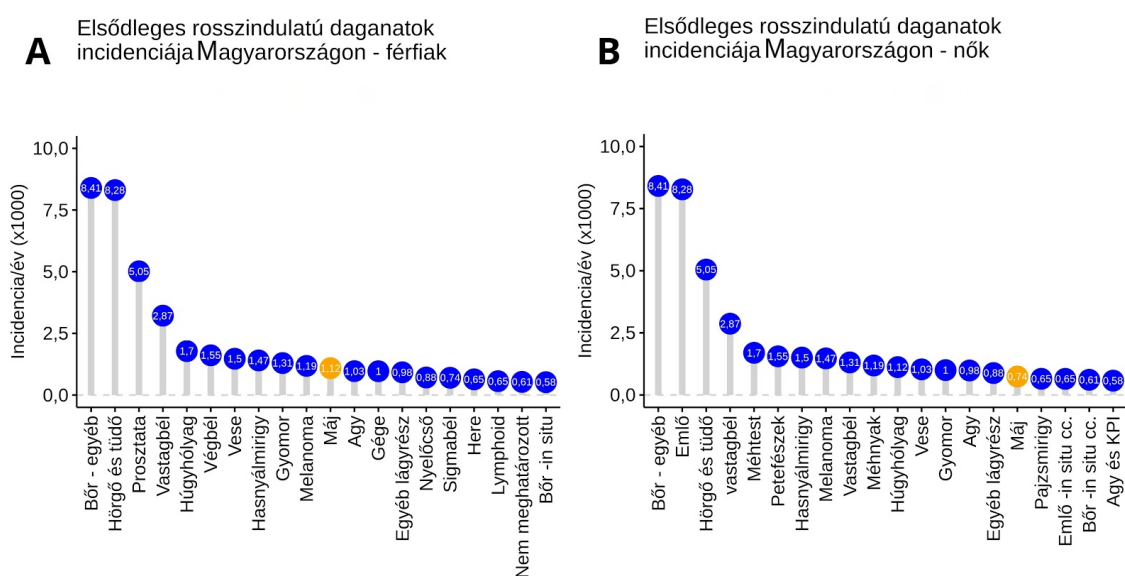
| | |
|---------|---|
| ADP | Adenozin-difoszfát |
| ALPPS | Associating Liver Partition and Portal vein Ligation for Staged hepatectomy (egyben kísérleti állatcsoport) |
| ALPPS+P | Associating Liver Partition and Portal vein Ligation for Staged hepatectomy és fizikai rehabilitáció (állatcsoport) |
| ALTPS | Associating liver tourniquet and portal ligation for staged hepatectomy |
| AMP | Adenozin-monofoszfát |
| AMPK | 5' AMP activated kinase - 5' AMP aktiválta kináz |
| ATP | Adenozin-trifoszfát |
| BSA | Bovine serum albumin - bovin szérum albumin |
| cDNS | Komplementer dezoxiribonukleinsav |
| CI | I. légzési komplexum |
| CII | II. légzési komplexum |
| CL | Caudate lobe - kaudális lebeny |
| EDTA | Etilén-diamin-tetraecetsav |
| EGF | Epidermal Growth Factor - epidermális növekedési faktor |
| EGTA | Egtazik-sav |
| FADH | Flavin-adenin-dinukleotid |
| FGF | Fibroblast Growth Factor – fibroblaszt növekedési faktor |
| FGF 15 | Fibroblast Growth Factor 15 – fibroblaszt növekedési faktor 15 |
| FGF 19 | Fibroblast Growth Factor 19 - fibroblaszt növekedési faktor 19 |
| FLR | Future liver remnant – visszamaradó májparenchyma |
| FLRV | Future liver remnant volume – visszamaradó májparenchyma volumen |

| | |
|--------------------------------|--|
| FXR | Farnesoid-X Receptor |
| GM | Glutamát-malát |
| H ₂ O ₂ | Hidrogén-peroxid |
| H ₂ PO ₄ | Dikálium-hidrogén-foszfát |
| HCl | Hidrogén-klorid |
| HEPES | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethaneszulfonsav |
| HGF | Hepatocyte growth factor - hepatocytá növekedési faktor |
| IGF | Insulin-like growth factor - Inzulinszerű növekedési faktor |
| IL-1RA | Interleukin 1 receptor antagonist - Interleukin 1 receptor antagonista |
| IL-1 α | Interleukin 1 Alpha - Interleukin 1 Alfa |
| IL-1 β | Interleukin 1 Beta - Interleukin 1 Béta |
| IL-6 | Interleukin 6 |
| KOH | Kálium-hidroxid |
| LLL | Left lateral lobe - bal laterális lebeny |
| LML | Left median lobe - bal középső lebeny |
| MCT2 | Monokarboxilát-transzporter 2 |
| MgCl ₂ | Magnézium-klorid |
| MMP9 | Matrix metalloproteinase 9 - Mátix metalloproteináz 9 |
| mRNS | Hírvivó ribonukleinsav |
| mtDNS | Mitokondriális dezoxiribonukleinsav |
| NADH | Nikotinamid-adenin-dinukleotid |
| NADPH | Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát |
| NF- κ B P65 | Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells P65 - Nukleáris faktor kappa könnyúlánca enhanszer P65 |
| NO | Nitrogén-monoxid |

| | |
|----------------|---|
| NRF1 | Nuclear respiratory factor 1 - Nukleáris respiratorikus faktor 1 |
| NRF2 | Nuclear respiratory factor 2 - Nukleáris respiratorikus faktor 2 |
| O ₂ | Oxigén |
| OXPHOS | Oxidatív foszforiláció |
| PDGF | Platelet Derived Growth Factor - Vérlemezke eredetű növekedési faktor |
| PGC1- α | Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha - Peroxiszóma proliferátor aktiválta receptor gamma koaktivátor 1 alfa |
| PHLF | Posthepatectomy liver failure - Poszthepektómiás májelégtelenség |
| PHx | Parciális hepatectomia |
| PVDF | Polivinil-difluorid |
| PVE | Portal vein embolization - Portális véna embolizáció |
| qPCR | Quantitative polymerase chain reaction - kvantitatív polimeráz láncreakció |
| RALPPS | Radiofrequency-assisted Associating Liver Partition and Portal vein Ligation for Staged hepatectomy |
| RLL | Right lateral lobe - jobb laterális lebeny |
| RML | Right median lobe - jobb mediális lebeny |
| ROS | Reaktív oxigéngyök |
| SIRT1 | Sirtuin 1 |
| Suc | Szukcinát |
| TBS | Tris buffered saline - Tris pufferelt sóoldat |
| TGF- β | Transforming growth factor beta - Transzformáló növekedési faktor béta |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor |

1. Bevezetés

A máj elsődleges és másodlagos daganatos betegségei a fejlődő és fejlett világban egyaránt vezető halálokként jelennek meg (1). Magyarországon az elsődleges májdaganatok ritkábbnak számítanak, mint a világ májgyulladás által endémiás területein (1. ábra/A, B). Figyelembe véve, hogy a vastagbél daganatban szenvedő páciensek közel fele betegségük során közel 50%-os eséllyel akvirál májáttéteket, valamint az egyéb tumoros megbetegedések során számolni lehet metasztatikus kialakulásával, belátható, hogy hazánkban is rendkívül magas az érintettek száma (2). A máj rosszindulatú daganatai emiatt egyben súlyos közegészségügyi problémát jelentenek, rutinszerű szűrővizsgálatuk pedig még a rizikócsoportokban sem megoldott.



1. ábra: Az elsődleges rosszindulatú daganatok incidenciája Magyarországon (2015). Adatok forrása: Nemzeti Rákregiszter. (Ábra a szerző személyes anyagából.)

Annak ellenére, hogy az elmúlt 30 év jelentős fejlődést hozott az onkoterápiás megoldások terén, mégis a máj tumoros megbetegedéseinek legjobb hosszútávú túlélését kínáló, valóban kuratív kimenetellel bíró kezelését továbbra is a daganatos szövettömeg ép sebészi szélekkel történő eltávolítása jelenti. Sajnálatos módon, a májdaganatok sokáig lappangó természetete miatt a diagnózis felállítása idején a páciensek jelentős része már előrehaladott állapotban van, ezért közel 45%-uk primeren kiterjesztett hepatektómiát igényel (3, 4). A máj rendkívüli regenerációs képességgel és nagy

funkcionális rezervoárral rendelkezik, mégis a kiterjesztett műtétek esetében előfordulhat, hogy a daganat eltávolítása során az R_0 (visszamaradó tumortól mentes) reszekció eléréséhez túlzottan nagy mennyiségű parenchyma eliminálása válik szükségessé (5). Ilyen esetekben megnő a poszthepektómiás májelégtelenség (PHLF -post-hepatectomy liver failure) kialakulásának veszélye (6). Emiatt a visszamaradó parenchyma mennyiségi elégtelensége miatt számos beteg primeren inoperábilisnek minősül a diagnózis felállításának pillanatában. Kutatói és klinikai törekvéseknek hála, az elmúlt 30 évben számos olyan sebészi stratégiát dolgoztak ki, amelyek elsődleges célja a PHLF elhárítása volt a visszamaradó parenchyma volumenének (és rendelkezésre álló funkcionális kapacitásának) megnövelése révén. Ezek közül kiemelkedő jelentőségű a tumoros májfél vena portae ágainak lezárása embolizáció (PVE- portal vein embolization – portális vena embolizáció), vagy sebészi ligatúra (PVL – portal vein ligation – portális vena ligatúra) segítségével (PVO – Portális vena okklúzió), amelynek következtében az „ép” májfél volumen növekedése idézhető elő (5). A PVO technikák alkalmazása révén nagyszámú olyan beteg vált ismételten kuratív célzatú beavatkozásra alkalmassá, akik azelőtt a kis térfogatú visszamaradó májparenchyma mérete (és áttételesen jövőbeli funkcionális elégtelensége miatt) primeren kontraindikáltak voltak (7). Ugyanakkor a PVO-ra épülő sebészeti technikáknak is számos negatívuma van, amelyek közül kiemelendő, hogy alkalmazásukkal csak viszonylag lassú (4-8 hét alatt végbemenő) regeneráció idézhető elő. Emiatt több beteg ismételten alkalmatlanná válhat a kuratív célzatú második reszekciót megelőző hosszabb kivárási idő alatt (8, 9).

Erre a problémára 2007-ben egy véletlen folytán fedezték fel a megoldást, amikor Schlitt és munkatársai első ízben hajtottak végre ALPPS (ALPPS - Associating Liver Partition and Portal vein ligation for Staged hepatectomy) műtétet, ami a máj tumoros és ép részei között elvégzett transzszekciót, és a tumoros májfél portális okklúzióját magába foglaló sebészi stratégia (10). Ezzel az eljárással a klasszikus PVO technikákkal szemben gyorsabb és jelentősen nagyobb májvolumen-növekedés idézhető elő (11). Így a sebészi megoldások repertoárja immár egy idő által kritikusan limitált esetben is jól alkalmazható stratégiával bővült (12).

Sajnos előnyös tulajdonságai mellett az ALPPS is rendelkezik néhány rendkívül súlyos hátránnyal. Alkalmazásakor szignifikánsan magasabb mortalitási és morbiditási incidenciát figyeltek meg (akár 50% mortalitás és 79% súlyos morbiditás a perioperatív időszakban) (12–14). Különösen aggasztó, hogy ALPPS alkalmazásakor tapasztalt megemelkedett betegveszteség fő oka PHLF annak ellenére, hogy volumetriai vizsgálatok alapján a második, kuratív célzatú reszekció idején a túléléshez megfelelő mennyiségű visszamaradó májparenchyma áll rendelkezésre (15, 16). Mindebből arra lehetett következtetni, hogy ALPPS-t követően az aktív regeneráció alatt szignifikáns mértékű májfunkció-csökkenés következik be, amelyet az utóbbi évek során szcintigráfias vizsgálatok segítségével igazoltak (17, 18). A máj regenerációja rendkívül energiafüggő folyamat, amelynek ATP fedezetét elsősorban az oxidatív foszforiláció (OXPHOS) biztosítja (19). Feltételezhető, hogy a máj ALPPS-t követő funkcionális kapacitáscsökkenésének hátterében, az intramitokondriális homeosztázis és a nukleo-mitokondriális kapcsolatok zavara húzódik meg.

1.1. Történelmi kitekintés: A PVO technikák evolúciója

Májreszekció sokáig csak abban az esetben volt kivitelezhető, ha a megfelelő méretű (és sokáig funkciómeghatározás hiányában feltételezetten megfelelően működő) visszamaradó májparenchyma állt rendelkezésre (6, 20). Sajnálatos, hogy éppen emiatt a megkötés miatt sok beteg már a diagnózis felállítása idején a sebészi ellátásra alkalmatlannak bizonyult. A májreszekciók kiterjesztésének evolúciójában az első nagy lépést a Kinoshita és Makuuchi által alkalmazott vena portae embolizáció jelentette, amely során a kuratív célzatú májreszekciót megelőzően 6-8 héttel a daganatos májfél portális okklúzióját hajtották végre (21, 22). Ennek következtében a visszamaradó parenchymában olyan regeneratív folyamatok indultak be, amelyeknek következtében az FLR (future liver remnant - visszamaradó májparenchyma) volumene megnőtt, míg a portális keringésből kirekesztett májszegmentumok mérete jelentősen csökkent, létrehozva az ún. „atrófia-hipertrófia komplex” jelenségét (23). A daganatos májfél vena portae ágának pre-reszekciós okklúziójával előidézett FLR regenerációjával így sok esetben még igen nagy méretű daganatok eltávolítása is lehetségessé vált, miközben a PHLF kialakulásának kockázata jelentős mértékben mérséklődött. A reszekálhatóság fokozásának következő állomását az elsőként Adam és munkatársai által 2000-ben bemutatott kétlépcsős hepatektómia jelentette (7). Ez az eljárás eredeti formájában nem tartalmazott PVO-t, végrehajtása csupán a daganatok szekvenciális, több egymást követő műtét során történő eltávolítását jelentette. A későbbiek során Jaeck 2004-ben ezt a megoldást egészítette ki a preoperatív vena portae embolizációval, valamint Kianmanesh és munkatársai az első műtét során elvégzett vena portae ligatúrával (24, 25). Valamennyi, fentebb felsorolt sebésztechnikai manőver jelentősen kibővítette a kuratív reszekcióra alkalmas betegek körét, ugyanakkor az eljárások közös hátránya, hogy az általuk indukált májregeneráció viszonylag lassan, 4-8 hét alatt éri el a megfelelő mértéket, ezért meglehetősen sok idő áll rendelkezésre az alapbetegség progressziójára (26). Ennek, és a néhány esetben az elégtelen mértékű regenerációnak köszönhetően az előkészített, azaz előzetes PVO-n átesett betegek akár harmada

ismételten inoperábilisnek minősülhet a hosszú, beavatkozások közötti várakozási idő miatt (27).

1.2. Az ALPPS

A konvencionális PVO technikák által biztosítható, viszonylag lassú májregeneráció problémájára a 2007-ben Schlitt és munkatársai által véletlenül felfedezett ALPPS jelentette a megoldást (10). Ezen műtét során az első beavatkozás alkalmával a daganatos májfél vena portae ágának lekötése mellett az ép és daganat által érintett területek közötti parenchyma átvágását is elvégzik (11). Ennek következtében ez idáig ismeretlen okból szignifikánsan gyorsabb regeneráció indul az FLR-ben, így az első és a második műtét közötti várakozási idő 7-10 napra rövidülhetett (28, 29).

A 2007 és 2012 közötti időszakban elsősorban a technika validálása zajlott. Az ez irányú törekvések és a módszer fejlődésének nyomon követésére 2012-ben létrehozták a nemzetközi ALPPS regisztert, amelynek elsődleges feladata az egyes centrumok által elvégzett és jelentett ALPPS beavatkozások kategorizálása, kiértékelése volt. Az itt gyűjtött adatok értékelését követően az ALPPS-t övező kezdeti lelkesedés hamar alábbhagyott, helyét sokkal inkább heves, a sebészi szakmát mélyen megosztó viták vették át, amint az első magas mortalitásról és morbiditásról (esetenként 28%-ot meghaladó perioperatív mortalitás, és 64%-ot meghaladó súlyos komplikációs arány) szóló jelentések napvilágot láttak (14, 30, 31). Ezeket az eredményeket figyelembe véve világossá vált, hogy az ALPPS további metodológiai finomítására van szükség. Az ezt követő törekvéseknek köszönhetően jött létre a hibrid-ALPPS (ALPPS és portális véna embolizáció), mini-ALPPS, ALTPS (Associating Liver Tourniquet and portal Ligation for Staged hepatectomy) és RALPPS (Radio-ablációval párosított ALPPS) (12, 32, 33). Valamennyi új fejlesztésben közös, hogy az I. műtét invazivitásának csökkentésével (a sebészeti beavatkozás okozta stressz mérséklésével) próbálják biztonságosabbá tenni ezt az igen különleges kétlépcsős májreszekciót.

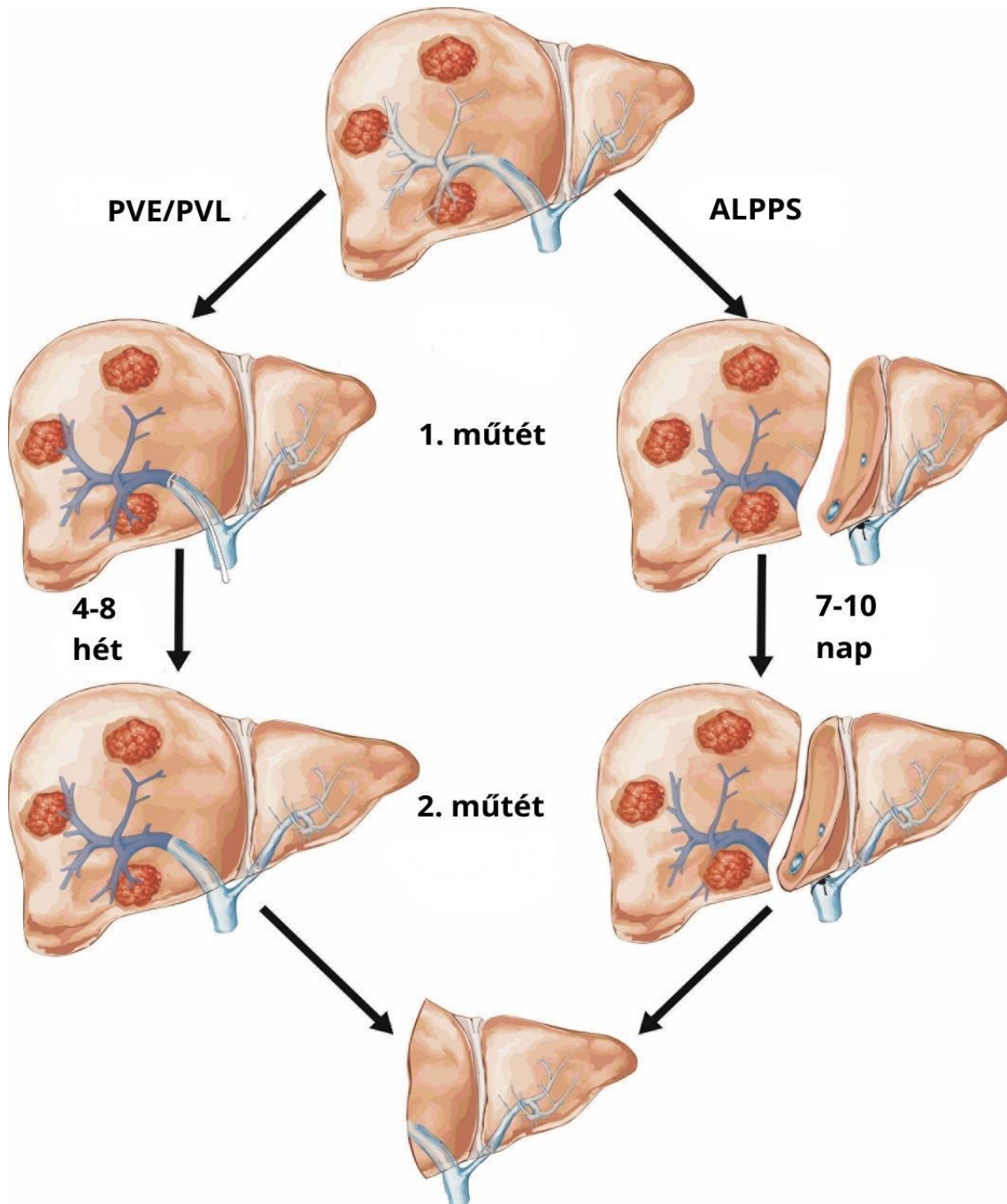
A technikai fejlesztések mellett 2015-ben első ízben rendezték meg az ALPPS konszenzus konferenciát, amelynek fő hozadéka egy igen szigorú betegszelekciós

rendszer volt (34, 35). E kritériumrendszert alkalmazva, és a beteg számára optimális ALPPS variánst kiválasztva a perioperatív mortalitás és morbiditás jelentős mértékben csökkenthetővé vált. Ugyanakkor kihangsúlyozandó, hogy a szignifikáns javulás ellenére továbbra is igen magas szövődmény incidenciával és betegveszteséggel kell számolni az ALPPS alkalmazásakor (35–38).

1.3. Az ALPPS és a konvencionális PVO technikák főbb jellemzői

ALPPS-t alkalmazva a konvencionális PVO technikákkal szemben sokkal nagyobb mértékű regeneráció indukálható a visszamaradó májparenchymában (40-190% volumennövekedés vs. 20-50% volumennövekedés PVO esetében) (29, 39). Emellett a visszamaradó májszövet tömegnövekedése akár szignifikánsan gyorsabban is végbemehet (7-10 nap vs. 4-8 hét PVO esetén) (2. ábra). Mindezen tulajdonságainak köszönhetően ALPPS-t alkalmazva jelentősen lerövidíthető az 1. és 2. műtét közötti várakozási idő, így kevesebb teret engedve a tumoros betegség progressziójának. Ennél fogva ALPPS esetében meglehetősen alacsony, 1% alatti a 2. kuratív célzatú műtét alapbetegség progressziója miatti kontraindikációja (36, 40, 41).

Ugyanakkor kockázatok és szövődmények nélküli műtéti beavatkozás nem létezik. Ezen a téren az ALPPS sajnos meglehetősen előnytelen mutatókkal rendelkezik a konvencionális PVO technikákkal szemben. Az ALPPS egyértelműen legnagyobb hátránya a rendkívül magas szövődmény és betegvesztési arány (akár 50% perioperatív mortalitás és 79% morbiditás) (14, 28). Ugyan az elmúlt 5 év során eszközölt technikai finomítások és újítások, valamint a szigorú betegszelekciós kritériumok látványosan csökkentették az ALPPS negatív mutatóit, a PVO-hoz képest még mindig látványosan előnytelenebb halálozási- és szövődmény mutatókkal rendelkeznek, továbbá, a szigorú szelekciós kritériumok alkalmazása jelentős mértékben csökkenti az operálható betegek körét, így az ALPPS sokkal inkább egy szükséghelyzetben, mintsem általánosan alkalmazható eljárás a májdaganatok kezelésében, amely ugyanakkor részét kell képezze a személyre szabott orvoslás során választható műtétek repertoárjának.



2. ábra: Az ALPPS és PVO technikák felépítése. Rövidítések: ALPPS - associating portal vein ligation and liver partition for staged hepatectomy, PVL - portális véna ligatúra, PVE - portális véna embolizáció. Ángyán Gergő illusztrációja.

1.4. A máj regenerációja

A máj rendkívüli regeneratív képessége már régóta, messze a modern sebészet előtti időkben ismert és felismert jelenség volt, ugyanakkor a feltárását célzó, kiterjedt kutatások ellenére a mai napig sok tisztázatlan részlete van. Az irodalomban a legtöbb információ a májszövet 2/3-ának eltávolításával kivitelezett parciális hepatektómiára (PHx) épülő kísérletes állatmodellekből áll rendelkezésre (42, 43). E vizsgálatok alapján a folyamat 3 egymást követő szakaszra osztható:

1. **Priming:** a szövetalkotó sejtek felkészülése a sejtciklusba lépésre;
2. **Proliferációs fázis:** a hepatocyták és egyéb szövetalkotók számbéli sokszorozódása
3. **Lezárás és végleges struktúra kialakítása:** az aktív osztódási stádium utáni, végső szöveti szerkezet létrehozására irányul. Kis amplitúdójú mitózishullámok és a nem megfelelő elhelyezkedésű parenchymális és extraparenchymális sejtek eliminációja indukált apoptózissal.

Alapesetben a máj szöveti állományának nagy részét kitevő májsejtek maximum 0,01 százaléka osztódik, azaz normális körülmények között a máj egy mitogenitás szempontjából meglehetősen inaktív szerv (44). PHx elvégzése után azonban a hepatocyták akár 95%-a is beléphet a sejtciklusba. Patkányok esetében a legmagasabb sejtosztódási arány 24 órával a májszövet eltávolítását követően figyelhető meg. A sejtek számbeli sokszorozódása meghatározott térbeli és időrendi ütemezésben zajlik. Elsőként a májsejtek lépnek be a periportális terek felől pericentrális irányba haladó osztódási hullámba. Ekkor a hepatocyták avaszkuláris szigeteket formálnak, amelyekben csak később jönnek létre erek és epeutak. 2-3 nap elteltével az endotélsejtek osztódása követi a folyamatot, amelynek következtében proto-érképletek törnek be a májsejt-szigetekbe. Ezen folyamat során a rágcsáló máj 5-7 nappal a PHx után visszanyeri a kiindulási tömegét (42, 45). Ember esetében a volumenpótlás minimum 3-6 hét leforgása alatt játszódik le. Kiemelendő, hogy a máj regenerációjakor ép parenchyma esetében ún. hepatocytás regeneráció történik, azaz a májszövet pótlását

nem összejtek, hanem többnyire differenciált májsejtek végzik (43). A nem hepatocytás regeneráció folyamata abban az esetben indul el, ha a májsejtek legalább 50%-a valamilyen károsító hatás miatt elveszti a sejtciklusba lépés képességét (46, 47).

Az irodalomban 4 fő elmélet létezik a máj regenerációjának leírására, modellezésére:

1. Funkcionális parenchymavesztés elmélete
2. Bloodborne teória (humorális mediátorok szerepének hangsúlyozása)
3. Haemodinamikai elmélet
4. Gyulladásos elmélet

A funkcionális parenchyma veszteséget, mint regenerációt vezérlő folyamatot elsőként a Rozga és munkatársai által végzett kísérletekben vélték azonosítani. Kutatómunkájuk során megfigyelték, hogy portális véna ligatúra után a portális keringésből részesülő lebenyek tömegnövekedése, és a lekötöttek sorvadása azonos ütemű és mértékű volt, azaz a folyamat során a máj tömege nem változott (48). A későbbiekben ezt a jelenséget az irodalomban atrófia-hipertrófia komplexumnak nevezték el (49). Az elsődleges feltételezés az volt, hogy a portális lekötést elszenvedő lebenyek funkcionális tömegüket veszítik, az ipszilaterális portálisan keringő részek pedig erre a kiesésre reagálva növelik meg a tömegüket. Ezt a hipotézist részben cáfolja Lambotte felvetése, miszerint a lekötött lebenyek atrófiája túl lassan következik be ahhoz, hogy a regenerációt ez indítsa el (50, 51). Továbbá a regenerálódó és portális keringésből kizárt lebenyekben is megfigyelhetőek voltak a PHx folyamán dokumentált kezdeti változások. Ebből arra következtettek, hogy a szöveti reparáció ezen korai szakasza független a funkcionális májtömegetől és a májszövet pótlásának folyamatát valamely más faktor(ok) is befolyásolhatják.

A „bloodborne”, vagy másik nevén „humorális” teória alapján a máj regenerációját szövetnedvekkel (elsősorban vér útján) májba jutó növekedési faktorok és azok hatásait moduláló mediátorok irányítják (52, 53). Ennek egyik kiterjesztése az ún. „gut-liver axis” elmélet, miszerint a proliferáció szabályzásért felelős mediátorok, különösképpen az interleukin 6 (IL-6), Tumor nekrosis faktor- α (TNF- α), a

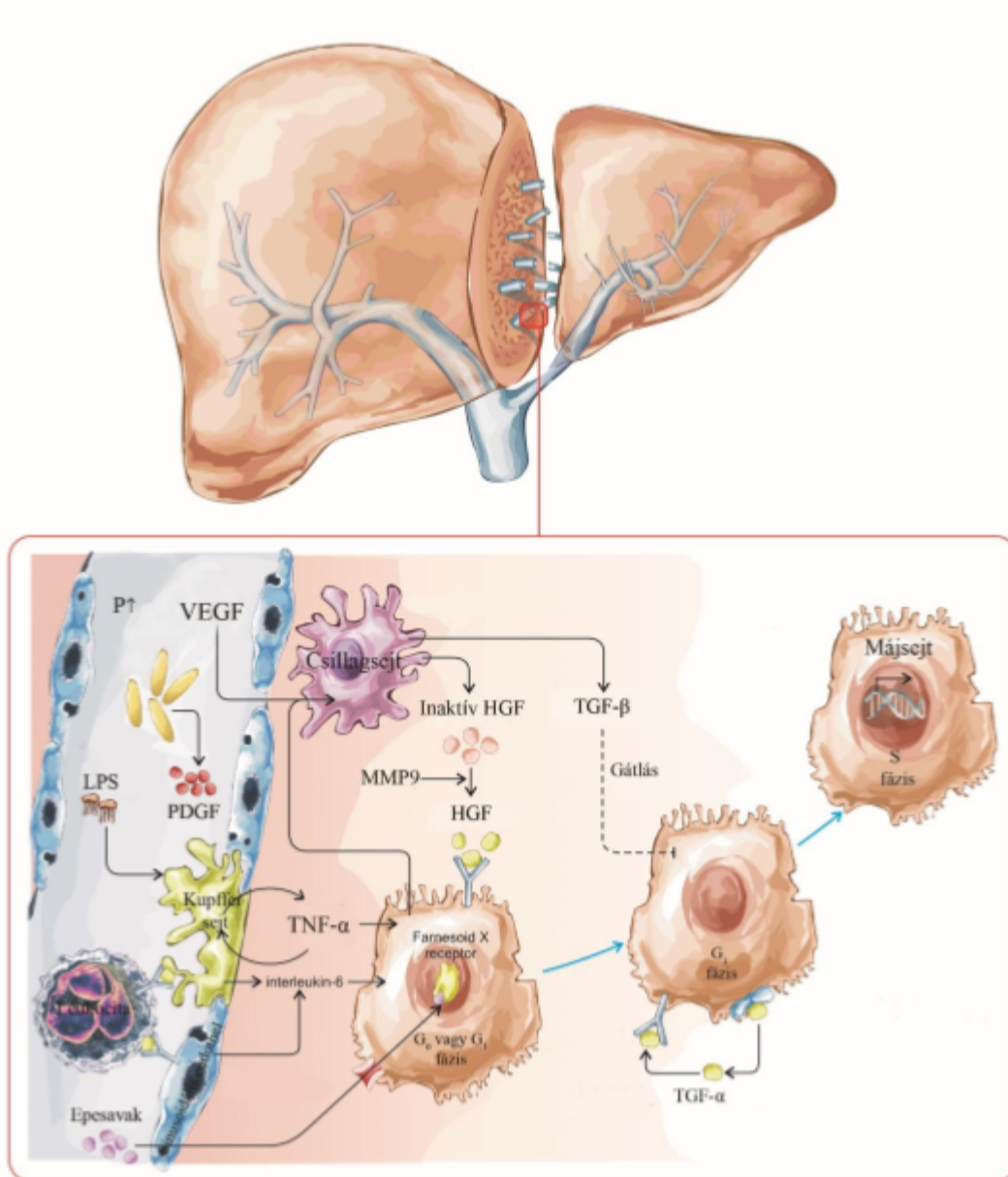
vérlemezke-drivált növekedési faktor (platelet derived growth factor [PDGF]) szupercsalád számos tagjának, a fibroblaszt növekedési faktor 15 vagy 19 (fibroblast growth factor 15/19 [FGF15/19 – az irodalom fajspecifikusan más megnevezéssel illeti ugyanazt a remnantot]) és epesavak koncentrációja megemelkedik a portális vérben a máj reszekcióját, vagy a portális ágak lezárását követően (54–56). Ennek elsődleges okaként a megemelkedett portális nyomást vélelmezték, amely az enterocyták aktiválásán keresztül serkenti az epesav származékok béltraktusból történő visszavételét. Továbbá, a nyomás növekedése a bélrendszerben lokalizálódó immunkomponensek, különösképpen a monocyta-makrofág és lymphocyta eredetű sejtek aktiválását idézheti elő, amelyek ennek következtében jelentős mennyiségű gyulladást okozó citokint választanak ki (52, 57). Ezek a mediátorok a portális keringéssel direkt érik el a májat, ott fokozva a proliferatív aktivitást. Ugyanezen elmélet alapján kiemelt szereppel bírhatnak a májat a portális keringés által elérő aktivált vérlemezkék, amelyek számos mediátort és növekedési faktort szállítva, vagy helyben szintetizálva erős stimuláló hatást fejthetnek ki a májsejtekre (58). Sajnos, a pontos mechanizmust ez idáig nem sikerült azonosítani, de alapvetően két lehetséges folyamatot írtak le. Egyfelől a vérlemezkék akkumulálódnak a szinuszoidális terekben, ahol aztán nagy mennyiségű IGF (inzulinszerű növekedési faktor), HGF (hepatocyta növekedési faktor), és VEGF felszabadításba kezdenek. Másfelől a hepatocyták képesek a vérlemezkék Disse terekből történő felvételére, így egyszerre jutnak nagy mennyiségű regulátor molekulához (58, 59).

A harmadik regenerációt magyarázó elmélet a sejtosztódás irányításában nagy szerepet tulajdonít a portális nyomás növekedésével előidézett hemodinamikai változásoknak. Ez az ún. „shear-stress hipotézis”, amely alapján a megnövekedett portális nyomás a szinuszoidális endotélsejtek glikokálixára nagyobb nyíróerőket helyez, melynek következtében azok aktiválódnak és nagy mennyiségű NO (nitrogén-monoxid) termelésbe kezdenek (59–61). Az így termelt NO erős direkt mitogénként viselkedik (62). Továbbá, a szinuszoidális endotél aktiválódása élénkíti a májban fellelhető immunkomponenseket, melyek közül a Kupffer sejtek erre a stimulusra lokálisan nagy

mennyiségű, a májregeneráció beindításában kiemelt szereppel bíró IL-6-ot (Interleukin 6) bocsátanak ki (61, 63, 64).

A negyedik nagy elmélet az ún. „gyulladásos teória”, ennek értelmében a máj regenerációját a májsejteket elérő, lokálisan termelt gyulladásos mediátorok vezérlik (42, 65, 66). Ennek értelmében bármilyen, azaz fizikai, anoxiás, farmakológiai stb. károsodás esetén a májszövet reparációját megindító mediátorok szabadulnak fel. Ezek közül kiemelkedő szereppel bírnak az olyan kulcs-citokinek, mint az IL-1 (Interleukin 1), IL-6 és TNF- α (tumor nekrosis faktor alfa), amelyek a májsejtek sejtciklusba lépésének előkészítéséhez elengedhetetlenek (56, 67, 68). A májon belül található makrofágoknak különösen fontos szerep jut, mivel ártalomkor nagy mennyiségű citokin és proteáz termelésbe kezdenek (43, 54). Ez utóbbi fehérjék elsősorban az erőteljes direkt mitogén a HGF felszabadításában játszanak szerepet, amely hírvivő az iniciációs fázist követően a proliferáció irányításában bír központi szereppel (69–71).

Jól látható, hogy bármelyik úton is indul el, a májregeneráció iniciálásában elsőként a gyulladással kapcsolatba hozható mediátorok aktiválódása figyelhető meg. Ezt követően a specifikusabb hepatocytá sokszorozódásért, szöveti strukturálódásért felelős jelátviteli molekulák (elsősorban HGF, FGF (fibroblaszt növekedési faktor) család tagjai, valamint TGF- α (transzformáló növekedési faktor alfa)) koncentrációja emelkedik meg. A májregeneráció lezárásáért elsősorban az erős inhibitorikus funkcióval rendelkező TGF- β (transzformáló növekedési faktor béta) a felelős. Ugyanakkor kihangsúlyozandó, hogy a máj regenerációjának pontos (tehát a megfelelő volumen elérésekor történő) leállításáért felelős mechanizmusokat a mai napig nem sikerült pontosan azonosítani. Mindenesetre jól dokumentált tény, hogy a szöveti állomány pótlásának lezárása nem elvágólagos, a reparációs folyamatok azonnali és teljes leállításával jellemezhető esemény. Sokkal inkább sorozatos, csillapodó intenzitású osztódási és apoptózis hullámok felelősek a végleges szöveti szerkezet kialakításáért. Ennek során a nem megfelelő elhelyezkedésű parenchymális és sztromális sejtek eliminálódnak, így véglegesen kialakulnak az újdonszerveződött szinuszoidális gerendák (42, 43, 69, 71, 72).



3. ábra: Az ALPS-t követő főbb változások. Rövidítések: PDGF - platelet derived growth factor (vérlemezke eredetű növekedési faktor), P - portális nyomás, HGF - hepatocytá növekedési faktor, LPS - lipopoliszacharid, MMP9 - mátrix metalloproteáz 9, TGF- β - transzformáló növekedési faktor β , TNF- α - tumor nekrozis faktor α , VEGF - vaszkuláris-endoteliális növekedési faktor. Ágyán Gergő illusztrációja.

A májvolumen pótlásának folyamatait tekintve az ALPPS és PVO technikák esetében mindegyik elmélet működni látszik, bár feltehetően más és más kinetikával (3. ábra).

ALPPS esetében nagyobb mértékű portális nyomásnövekedéssel lehet számolni (73). Ennek oka az, hogy a parenchyma in-situ transzszekciójával megszakadnak az intrahepatikus porto-portális kollaterálisok (74, 75). Azaz, a májkapuérből érkező vér sokkal kisebb térfogatú parenchymán, ennek megfelelően nagyobb ellenállással szemben kell áthaladjon, emiatt a bélhuzam területén megemelkedik a vénás nyomás, ami az enterocyták fokozott aktivációját vonhatja maga után, ennek következtében ezek a sejtek a vékonybél lumenéből portális vérbe több epesavat recirkulálnak, ami a farnesoid-x receptoron (FXR) hatva erős proliferációs jelet generál (57, 76). A megnövekedett portális nyomás emellett a béltraktusban és mezentériumban rezidens immunkomponensek aktiválása révén nagy mennyiségű gyulladási mediátor és növekedési faktor kiválasztását idézi elő. Ezek az erős regeneráció-indukciós képességgel rendelkező hírvivő molekulák (elsősorban pro-inflammatórikus citokinek) a májat a portális vérrel nagy koncentrációban érik el (52, 53, 65). A „shear-stress hipotézis” értelmében a visszamaradó parenchymán átfolyó nagyobb vérmennyiség erőteljesebb endotél aktivációt okoz, ami az NO mediálta mitogén útvonal jelentékeny excitációját vonhatja magával (60, 63). A májparenchyma in-situ transzszekciójával járó parenchymasérülés pedig erőteljes lokális gyulladási válaszreakciót indít be, ami a környező szövetet elárasztja citokinekkal és növekedési faktorokkal. Ez utóbbi elméletet Schlegel és munkatársai már részlegesen igazolták (77). Kísérleteik során ALPPS-t követően szignifikáns mértékű TNF- α és IL-6 koncentráció emelkedést mértek, majd az így kezelt állatok vérére PVL-en átesettekbe transfundálva hasonló mértékű regenerációt tudtak előidézni (77, 78). Ez a kísérlet így egyben a humorális elmélet működését is részlegesen alátámasztja, hiszen a nagyobb fokú lebenytömeg növekedést ez esetben szolubilis faktoroknak kellett előidéznie (3. ábra).

1.5. A májfunkció változásai regeneráció során

A máj regenerációja a hepatocyták polarizációjának megváltozásával és átmeneti dedifferenciációjával jár, aminek következtében számos specifikus sejtleletani folyamat átmeneti csökkenése, lassulása figyelhető meg (54, 79). Emiatt makro- és mikroszinten is májfunkció vesztés tapasztalható. Az utóbbi évek ez irányú vizsgálatai igazolták, hogy a szöveti reparáció alatt a májparenchyma méretének és funkciójának regenerációja között diszkrepancia lép fel (23, 80). Mindemellett kihangsúlyozandó, hogy a májfunkció egy rendkívül plasztikus fogalom, amely magába foglalja a szintetikus, detoxikáló és kiválasztó működést. Így összetettsége miatt jelenleg nem rendelkezünk olyan univerzális, kvantitatív vizsgálati módszerrel, amely valamennyi tényezőt képes lenne mérni. Az irodalomban jelenleg két elmélet létezik. Az egyik szerint a máj regenerációjakor a hepatocyták számbeli sokszorozódása előnyt élvez a funkcionális regenerációval szemben. A másik, kevésbé elfogadott, és sok esetben cáfolható hipotézis alapján a funkcionális normalizáció kifejezettebb, mint a májsejtek számbéli növekedése. Az ellentmondás magyarázata az eltérő funkcionális komponensek vizsgálatában keresendő (23, 81). Ugyan előfordulhat, hogy bizonyos folyamatok gyorsabban nyerik vissza kiindulási kapacitásukat, ugyanakkor az elmúlt évek klinikai és állatkísérletes vizsgálatai alapján a máj funkcionális kapacitásának növekedése PVO-t és ALPPS-t követően a volumen növekedésével szemben szignifikáns elmaradást mutat (82). Az utóbbi sebészi stratégia esetében a funkcionális kapacitás csökkenése a térfogatra vetített 50%-ot is meghaladja (18, 83, 84).

A máj működésének bármelyik komponenséről is legyen szó, valamennyi életfontosságú, fenntartásuk pedig rendkívül energiaigényes (85, 86). Ennek biztosításában elsősorban az ép mitokondriális hálózat játszik szerepet. Ezen sejtszervecskék felelnek a máj energiaellátásának több mint 90%-áért a májregeneráció során és azon kívül (54). Bármilyen károsító tényező, amely ezt a rendkívül érzékeny rendszert érinti, súlyos sejt-energetika megingásokat, esetenként válságot okozhat (87, 88).

1.6. Mitokondriális élettan és az organelláris energiatermelés

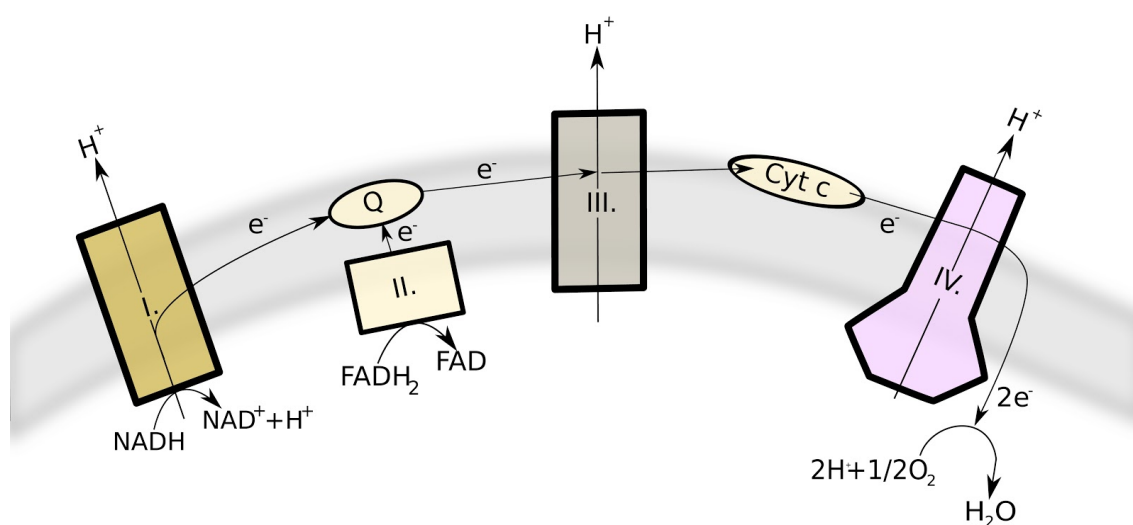
A májsejtek működéséhez (és így a májfunkció fenntartásához) szükséges energia elsősorban a glükóz oxigén dependens metabolizmusából származik. Ennek a folyamatnak a mitokondriumok biztosítanak biológiai teret, amelyek kis méretű, polimorf organizmusok, amelyek a Sagan és munkatársai által megalkotott endoszimbionta elmélet szerint ősi alfa-proteobaktériumoktól eredeztethető, akvirált sejtszervecskék (89–91). Ezek az organellumok az eukarióta sejten belül szemi-autonóm módon működnek, ugyanis genetikai állományuk túlnyomó része a sejtmagba transzlokálódott, így működésük erősen függ a nukleo-mitokondriális kapcsolatok épségétől (92).

Bár elsőre egyszerű sejtszervecskének tűnnek, a mitokondriumok rendkívül sok feladatot látnak el az eukarióta sejten belül és bizonyos esetekben azon kívül (93). Kiemelt szerepük van többek között a sejthalál, az autofágia és az inflammaszóma-képzés szabályozásában (94–96). Az általuk ellátott funkciók közül azonban a legfontosabb az oxidatív úton történő ATP-termelés folyamata, amely az eukarióta sejt energiaellátásának 80-90%-át adja, és amely nélkül az általunk ismert összetett élet nem létezne (97, 98). A gerinceseket felépítő eukarióta sejteken belül az energiatermelésnek alapvetően két útja létezik. Az egyik a sejt citoplazmájában végbemenő glikolízis, amely oxigénfelhasználást nem igényel (anaerob út), viszont hatékonysága ennek megfelelően alacsony. Ez esetben glükóz molekulánként mindössze 2 ATP nyerhető, ami komplex felépítésű organizmusok életfunkcióinak tartós fenntartására nem elegendő. Az energiatermelés másik útja a mitokondriumokhoz köthető oxidatív foszforiláció folyamata (OXPHOS), amely során oxigén felhasználásával glükózegységre (vagy acetil gyökre) lebontva sokkal több, 36-38 ATP állítható elő (99).

A nagy hatékonyságú, oxigénfüggő ATP szintézis az OXPHOS-on keresztül történik. Ez alatt szűk értelemben a mitokondriális belső membránon és intermembrán térben elhelyezkedő 5 enzimkomplex által végrehajtott, nagy hatékonyságú energiatermelési folyamat értendő (100). Ugyanakkor, ez az élettani jelenség

tárgyalásakor szükségszerű szót ejteni az ezt szubsztrátokkal ellátó Szent-Györgyi-Krebs ciklusról (citrát-ciklus) is, amelynek megfelelő működése nélkül nem áll rendelkezésre elegendő mennyiségű légzési szubsztrát a terminális oxidációban lezajló folyamatokhoz (101).

A citrát-ciklus 9 komplex fehérjét magába foglaló enzimapparátusa mitokondriális mátrixban található. Ez a folyamat egyben a metabolizmus egyik csomópontja, hiszen a glikolízisből, zsírsavak β -oxidációjából, valamint a ketontestek és fehérjék katabolizmusából származó acetyl-gyökök (acetyl-koenzim-A) is ezen a komplex apparátuson keresztül alakulnak a terminális oxidációban felhasználható légzési szubsztrátokká (pl. szukcinát), miközben nagy mennyiségű NADH (nikotinamid-adenin-dinukleotid) és FADH (flavin-adenin-dinukleotid) (kofaktorok) keletkezik. Ezek a terminális oxidáció 1. és 2. légzési komplexének működéséhez elengedhetetlenek (101, 102). Ilyen értelemben a citromsav ciklus felelős az OXPHOS szubsztrát ellátottságáért, vagyis bármiféle károsodás, amely ezt a folyamatot érinti, súlyos zavarokat okozhat a mitokondriális energiatermelésben (101). A Szent-Györgyi-Krebs ciklusban termelődött szubsztrátok és kofaktorok részben a későbbiek során a terminális oxidáció elektrontranszport láncában használandók fel (4. ábra).



4. ábra: Az elektrontranszport lánc felépítése: I. - NADH-dehidrogenáz, II. - szukcinát dehidrogenáz, III. - Q-citokróm c oxidoreduktáz, IV. - citokróm-c oxidáz., Q - ubikinon, Cyt c - Citokróm c, H^+ - proton, NAD - nikotinamid-adenin-dinukleotid, FAD: flavin-adenin-dinukleotid, H_2O - vízmolekula. A szerző saját ábrája.

Az elektrontranszport lánc I. komplexe katalizálja a belső membránhoz szállított, 2 db elektront vivő NADH oxidációját 1 db ubikinon (Q) molekula redukciója mellett (QH₂). A folyamat eredményeképpen 4 proton pumpálódik az intermembrán térbe és létrejön egy ubikinol (QH₂) molekula (103, 104). A II. OXPHOS komplexum egyszerre képezi részét a citromsav ciklusnak és az elektrontranszport-láncnak, ezutóbbiban második belépési pontként szolgál a légzési szubsztrátok számára (105). A komplex működéséhez egy FAD molekula is szükséges, mivel ez veszi át a szukcinát fumaráttá oxidálódása közben felszabaduló hidrogénionokat, ezzel lehetővé téve egy újabb ubikinon redukcióját. Ezen folyamat kevesebb energiaszabadulást eredményez, és kevésbé táplálja a protongradiens felépülését. A III. légzési komplexet két alegység alkotja, így működése is jóval összetettebb az előző kettőnél. Az általa katalizált folyamatban 1 ubikinon molekula 2 citokróm c molekulát redukál, amely reakció során végül 4 elektron helyeződik át a mitokondriális mátrixból az intermembrán térbe.

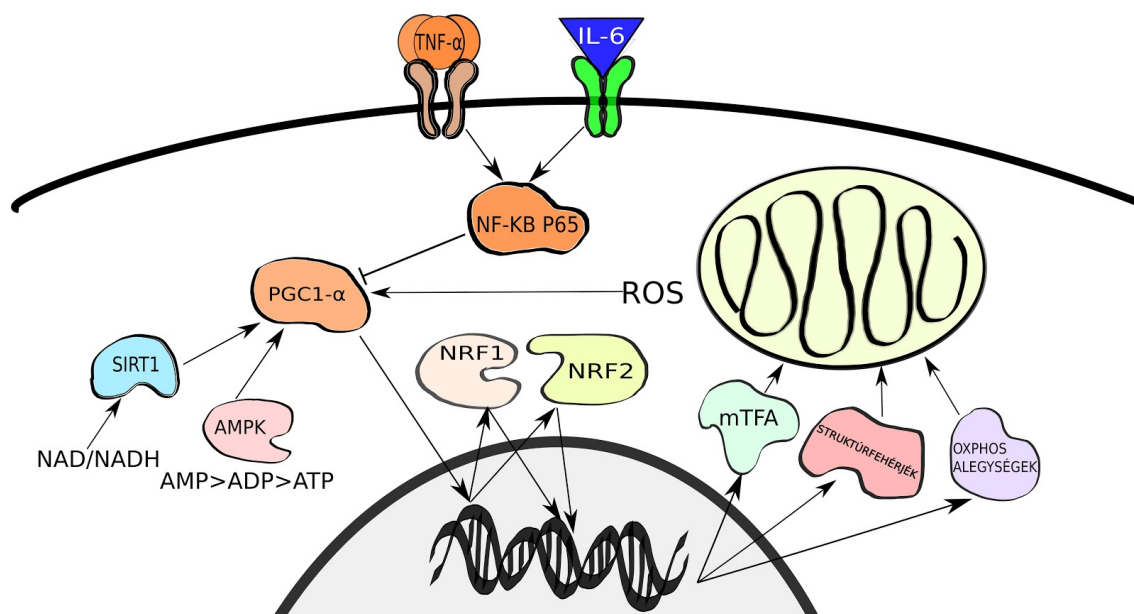
A IV. komplex az elektrontranszport lánc utolsó tagja, amely az elektronok terminális akceptorra, azaz oxigénre juttatásáért felelős. E reakció során a citokróm c molekulák oxidációja mellett az oxigén redukciója zajlik, miközben az intermembrán térbe újabb protonok transzportálódnak (104, 106–108). Az oxidatív foszforiláció során felépített protongradienst végül az ATP-szintáz használja fel ATP előállítására. Ez az összetett fehérje nincs közvetlen kapcsolatban az elektrontranszport lánc alkotóegységeivel, ugyanakkor funkcionális értelemben szorosan kapcsolódik a fentebbiekben bemutatott rendszerhez (109).

1.7. Mitokondriális biogenezis

A mitokondriumok nagyjából 1,4 milliárd évvel ezelőtt jelentek meg. Evolúciójuk során genetikai állományuk nagy része az eukarióta sejtmagba transzlokálódott, így szemi-autonóm organellumokká alakultak át (89, 98). Ez annyit tesz, hogy elviekben önálló sokszorozódásra képesek a sejten belül, ugyanakkor ehhez a folyamathoz, valamint az ezt követő érési fázishoz (maturáció) elengedhetetlen a sejtmagba áthelyeződött örökítőanyaguk aktiválása (110–112).

A meglévő mitokondriumok sejten belüli osztódását és fenntartását a biogenezis folyamatai vezérlik, amelyek magukba foglalják a mitokondriális és a sejtmagba transzlokálódott genom replikációját, a mitokondriális fehérjék szintézisét és organellumokba történő transzportját (5. ábra).

A mitokondriumok sejten belüli újdonszerveződését számos folyamat iniciálhatja, melyek közül a celluláris stressz kiemelt jelentőségű (113). A PGC1- α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) az egyik legfontosabb mediátor, ami ezt a jelpályát működteti. Ezt a kiemelt szereppel bíró koaktivátort több, egymástól merőben független inger aktiválhatja (114). A PGC1- α foszforilációját követően a sejtmagba transzlokálódik, és bár direkt géninterakciókat nem létesít, specifikus fehérje-fehérje kapcsolatokon keresztül fokozza a mitokondriális genom átíródásért és fehérjeszintézisért felelős mediátorok valamint expressziós faktorok szintézisét, aktivitását. Ezek közül kiemelt szereppel bír az NRF1 és NRF2 (nukleáris respiratórikus faktor 1 és 2), amelyek a mitokondriális struktúrfehérjék kifejeződéséért és későbbiek során transzportjáért felelősek (115–117). Az NRF1 a celluláris stressz indukálta folyamatokban súlyozottabb szereppel bír, mivel ez a molekula szabályozza a mitokondriális külső membrán ubikviter transzporterének a TOM (translocase of outer membrane) fehérje alegységeinek kifejeződését, és membránba történő kihelyezését. Hiányában nukleo-mitokondriális kommunikációs zavar alakul ki (118).



5. ábra: A mitokondriális biogenezis intracelluláris folyamatának vázlata. A PGC1- α -t különféle sejten érő inzultusok hatására foszforilálhatja a SIRT család számos tagja, valamint az AMPK. A sejten belül képződő ROS ismeretlen mechanizmussal úgyiszentén aktivitásfokozódást okozhat. Mindezek hatására a PGC1- α a sejtmagba transzlokálódik, ahol koaktivátorként serkenti az NRF1 és NRF2 expressziós faktorok génjeinek átíródását, majd fehérjeszintézisét. Az NRF1 és 2 a mitokondriális fehérjék kifejeződéséért felelős fő transzkripciós faktorok, melyek a sejtmagba helyeződött mitokondriális genom aktiválásán keresztül a mitokondriális fehérjék szintézisét serkentik. A túlzott gyulladásoos aktivitás az NF- κ B jelpályán keresztül direkt gátlást fejthet ki a PGC1- α -ra. A szerző saját ábrája.

A metabolizmus kontrollban betöltött központi szerepének köszönhetően a PGC1- α több jelátviteli útvonalat is összeköt, így aktiválása számos módon lehetséges. A sejt belső energiaszintjének megingásakor az AMP/ATP arány AMP (adenozin-monofoszfát) irányba toródása aktiválja az AMPK (AMP aktiválta protein kinázt), amely a PGC1- α foszforilációjával aktiválja azt (119). A NAD/NADH egyensúly megbomlása esetében hasonlóképpen viselkedik a Sirtuin 1 (SIRT1) fehérje (120).

1.8. A mitokondriumok és fizikai felkészítés kapcsolata

A mitokondriumok rendkívül komplex működésű sejtszervecskék, amelyek intra- és extracelluláris hatásokra is nagyon érzékenyen reagálnak. Energiatermelésük különféle hatóanyagokkal, exogén, vagy endogén mediátorokkal történő befolyásolása az újkori orvostudomány egyik virágzó területe. Ugyanakkor az is megjegyzendő, hogy a gerincesek rendkívül fejlett, belső, mitokondriális teljesítményt szabályozó rendszerrel

rendelkeznek, amelynek egyik kiemelt része a harántcsíkolt izomzat endokrin szervként való működése (121, 122).

A vázizomzat a test tömegének jelentős részét kitevő szervrendszer, amely egyben központi szerepet tölt be az anyagcserében (121). Mindamellet, hogy az itt felhalmozott fehérjemennyiség szükség esetén mobilizálható, a vázizomzat működése során számos mediátort juttat a keringésbe, amelyek távoli szerveken hatást fejthetnek ki (121, 123). E molekulák (myokinek) sorából kiemelendő az IL-6, amely annak ellenére, hogy kulcsfontosságú gyulladással járó hirtű, számos regeneratív folyamat beindításában kiemelt jelentőséggel bír. Meglepő módon testnedv követően szignifikáns mennyiségű IL-6 kerül a keringésbe, ugyanakkor ez nem jár patológiás gyulladással járó folyamatok megjelenésével (124). Ez az IL-6 kettős hatásmechanizmusával magyarázható. Egyrészt, ez a citokin az NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) jelútján keresztül hatva jelentős gyulladással járó szignálizáció beindításra képes (68). Másrészt a fizikai aktivitás fokozódáskor a keringésbe juttatott IL-6 az NF- κ B jelútja kikerülésével anti-inflammatorikus jelútakat aktiválhat, ezzel hosszútávon csökkentve a TNF- α koncentrációját (125). Ezen felül az IL-6 ilyen jellegű, pulztilis felszabadulása hosszabb távon csökkenteni képes az IL-1 β szintézist, míg erőteljesen serkenti az IL-1RA (Interleukin 1 Receptor Antagonista) termelődését. Ennek következtében az utóbbi receptor antagonisták perifériás vérben mérhető koncentrációja akár egy nagyságrenddel megemelkedhet (126). Az IL-1RA az IL-1 receptorához kötve kompetitív antagonistaként ellensúlyozza az IL-1 α és β pro-inflammatorikus hatását (127). Mindez miatt kiemelkedően fontos, hogy az IL-1 (α és β variáns egyaránt) gyulladással járó mester regulátor, ami számos major és minor citokin expresszióját és ürülését szabályozza (128). Az IL-1 α és β által szabályozott molekulák sorából kiemelendők az IL-6 és a TNF- α mester citokinek, amelyek a májregeneráció iniciálásában és a gyulladás káros hatásainak előidézésében is egyaránt részt vesznek. Rendszeres testnedv hatására az IL-1RA koncentrációja akár egy nagyságrenddel is megemelkedhet, amelynek következtében az edzett egyénekben a gyulladással járó folyamatok valamelyest korlátozott formában manifesztálódhatnak (127, 129).

A testedzés hatására bekövetkező gyulladáshoz mediátorkinetikai változások mellett a mitokondriális biogenezisben is számottevő hatások érvényesülnek (130). Az elmúlt évek során több állatkísérletes tanulmány készült arra vonatkozóan, hogy rendszeres testmozgás hatására miként változik a mitokondriális újdonszövődés. Ezek a kísérletes munkák egyöntetűen amellel tesznek bizonyosságot, hogy rendszeres fizikai aktivitás hatására szignifikánsan megemelkedik a mitokondriális fehérjék és az mtDNA (mitokondriális DNA) mennyisége, valamint ezen organellek funkcionális kapacitása. Sutherland és munkatársai kísérleteiken keresztül bemutatták, hogy rendszeres testedzés hatására a mitokondriális biogenezis mester regulátorának számító PGC1- α és a mitokondriális genom átíródásáért felelős mTFA (mitokondriális transzkripció faktor alfa) koncentrációja sokszorosára nő. Mindemellel megfigyelhető volt a mitokondriumok számbeli sokszorozódása is (131, 132).

Az, hogy a fizikai aktivitás fokozása miképpen fejt ki kapacitáló hatást a májsejtek mitokondriumaira, egyelőre nem tisztázott. A rehabilitáció jótékony hatásainak kialakításáért a „vázizom mint endokrin szerv” elmélet alapján többnyire szolubilis, vér útján a májba jutó vegyületeket, mediátorokat tartanak valószínűnek. Ezek közül kiemelt szerepet tulajdonítanak a vázizomzat intenzív működése során nagy mennyiségben keletkező laktátnak vegyület a májat elérve a monokarboxilát-transzporter 2-vel (MCT2) kerül a hepatocytákba (133). Itt belép a glükoneogenezisbe, ahol ismételt glükózzá alakul. Ez rendkívül energiaigényes folyamat, mely – különösen, ha figyelembe vesszük az intenzív izommunka által keletkező laktát mennyiségét – az AMP/ATP arány átmeneti csökkentésével az AMPK aktivitásának fokozását idézi elő. Az AMPK a PGC1- α foszforilációjával aktiválja azt, ezzel iniciálva a stressz indukálta mitokondriális biogenezist (134).

1.9. A rehabilitáció

A fentiekben részletezett biogenetikus és mitokondriális működéssel kapcsolt folyamatokat a modern orvostudomány a betegek ellátásában is egyre inkább használni kívánja, ugyanakkor koncepció és megfelelő célok nélkül ez idáig csak kísérletes eredmények álltak rendelkezésre (117). A közelmúltban ez a helyzet változni látszott, és

elsősorban neurodegeneratív és metabolikus betegségek esetén merült fel célzott, biogenezis terápiák lehetősége (135, 136). A későbbiekben daganatos megbetegedésekben is potenciált láttak a mitokondriális újdonszülődés befolyásolásában (137). Sajnálatos módon hasonló törekvések a sebészi ellátás kapcsán ilyen direkt módon nem fogalmazódtak meg, holott már számos megoldás áll rendelkezésre.

Az elmúlt évtizedekben a sebészeti, aneszteziológiai és perioperatív ellátásban bekövetkezett jelentős fejlődés ellenére a betegek nagy hányada a műtétet követően nem nyeri vissza teljes fizikai kapacitását (munkavégző képességét), és sok esetben ezzel összefüggésbe hozhatóan nehézségekkel kerül szembe a társadalomba, munkába történő visszatéréskor (138). Ennek kapcsán az utóbbi 20 évben számos rehabilitációval foglalkozó tanulmány született, valamint klinikai alkalmazásba vettek több, az eredményeire alapozott rehabilitációs programot. Ezek koncepciója sajnos csak a posztoperatív időszakra korlátozódik, céljuk a reparáció, ugyanakkor időzítetttségükből fakadóan kevés hatással bírnak a beteg műtét közbeni és közvetlenül azt követő, különféle noxákkal szembeni sérülékenységére, valamint nem befolyásolják az egyén stressztoleranciáját (139–141).

Erre a problémára kínál megoldást a prehabilitáció koncepciója, amely a műtét időpontja elé helyezi a fizikai és a pszichés felkészítés időszakát. Ismeretes, hogy gyenge fizikai teljesítőképesség, állóképesség esetében a perioperatív mortalitás és szövődményszám szignifikáns emelkedésével kell számolni (142, 143). A prehabilitáció egy, a preoperatív szakban végzett komplex felkészítő program, amelynek célja a fizikális, tápláltsági és mentális állapot javítása, ezáltal a szövődmény és halálozási ráta csökkentése (144). További előnye, hogy a beteg „passzív szenvedő” állapotát, aktív, a saját gyógyulásában központi szereppel bíróra cseréli (139). Ugyanakkor azt is fontos kiemelni, hogy a klinikumban eddig alkalmazásba vett prehabilitációs programok meglehetősen kezdeti fázisban vannak és feltehetően a nagyfokú változatosság, a nyomonkövetés, valamint javallati rendszerek hiányosságai miatt meglehetősen vegyes kép alakult ki a hatásosságukról (123, 145, 146).

2. Célkitűzések

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

I. kísérletsorozat célkitűzései

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

II. kísérletsorozat célkitűzései

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

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

3. Módszerek

3.1. Etikai nyilatkozat

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

3.2. Állatok tartása

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

3.3. Állatok beosztása

1. táblázat: Állatok allokációja az I. kísérletben:

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

2. táblázat: Állatok allokációja II: kísérletben:

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

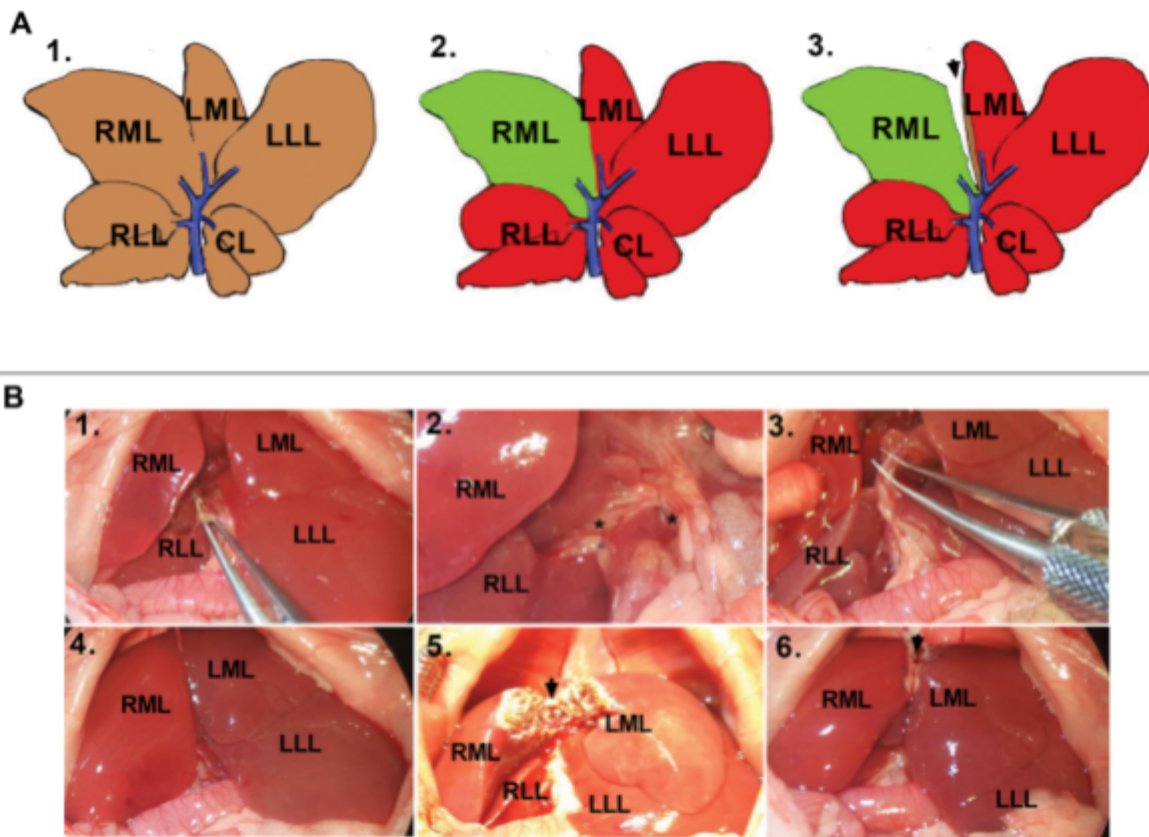
Rövidítések: ALPPS: associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy, ALPPS+P: ALPPS és rehabilitáció, PVL: portális véna ligatúra, PCR: polimeráz láncreakció.

3.4. Testedzési protokoll

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

3.5. Műtéti beavatkozások

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



6. ábra: A PVL és ALPPS műtét. A jobb laterális (RLL), bal mediális (LML), bal laterális (LLL) és kaudális lebenyek (CL) ligatúrája után (PVL) (A/1., 2. és B/ 1.-3.) a parenchyma disszekcióját végeztük U alakú beöltések segítségével (ALPPS). A transzszekció elvégzését követően a sebszéleket elektrokauterizáltuk (A/3. és B/ 4.-6.) Ábra: Budai et al. Eur Surg Res. Switzerland; 2017; 58: 140–157.

3.6. Morfometriai vizsgálatok

3.6.1. A májtömeg változások és a regeneráció vizsgálata

Az állatok életének kioltását követően azok mája „*in toto*” került eltávolításra. Lebenyekre bontásukat követően súlyukat analitikai mérleg segítségével mértük le (Mettler-Toledo, Svájc, Zürich). A regenerációs ráta számítása a következő képlet segítségével történt:

$$\frac{\text{testtömegre vonatkoztatott májlebensúly}}{\text{kontrollcsoport testtömegre vonatkoztatott azonos májlebensúly}} \times 100 (\%)$$

3.6.2. Szövettani vizsgálatok

A májlebensúly mérését követően a regenerálódó RML-ből (right median lobe - jobb mediális lebeny) 4 mm vastag szövethasábok kimetszése történt, amelyek ezt követően 24 órás fixálásban részesültek 4%-os semleges pufferelt paraformaldehidben. A mintákat felszálló alkoholsoros kiszárítás után paraffinba ágyasztuk. Az így kapott szövettani blokkokból 4µm-es szövettani metszetek készültek. A metszetek xilolban történő deparaffinálását és alkoholos mosását követően (2x15 perc) pH 9.0-en történő feltárását végeztük el (30 perc, 95°C). A feltárt metszetek blokkolása 3%-os BSA (bovine serum albumin) pufferben történt, amelyet 1 óra primer anti-Ki67 (Agilent, Santa Clara, CA, USA), majd 1 óra szekunder antitestekkel történő inkubálás követett (antitestek listáját: 4. táblázat). Az elkészült metszetek fedése Everbrite Hardset (Biotium, LaJolla, Ca, USA) fedőanyaggal történt.

3.6.3. Elektronmikroszkópia

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a szövetminták 2%-os glutáraldehiddel és 4%-os paraformaldehiddel történő perfundálással lettek kezelve. Ezt követően az előfixált szerveket még 2 óra glutáraldehides (2%) utófixálásban részesítettük. Az így előkészített mintákból 1x1x1 mm-es darabok készültek, amelyeket felszálló

alkoholsoros dehidráció után Araldite-ba ágyasztunk. Ezekből a mintákból azután egy ultramikrotóm segítségével ultravékony metszetek készültek, amelyeket ólom-acetát kontrasztálásban részecskéztünk. Az anyagvizsgálat H-7500 típusú, Hitachi transzmissziós elektronmikroszkóppal történt (Hitachi, Tokyo, Japán).

3.7. Mitokondriális vizsgálatok

3.7.1. Mitokondrium izolálás

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

3.7.2. Mitokondriális légzés vizsgálata

A mitokondriális légzés (oxigénfogyasztás) vizsgálata során a terminális respirációs lánc I. (NADH-dehidrogenáz, CI) és II. (szukcinát dehidrogenáz, CII) komplexeinek oxigénfogyasztás vizsgálata történt meg (147). A mitokondriális oxigénfogyasztási próbákat Oxygraph-2K (Oroboros Instruments, Innsbruck, Ausztria) magas-felbontású respirometriás rendszerrel 37°C-on végeztük 2 ml-es küvetákban (148). Az oxigén-érzékelők rutin kalibrálása légköri szaturáción és oxigénmentes

médiumban egyaránt elvégzésre került. A mérések során state 4 (**bazális állapot** – csak ADP és mitokondrium található a reakcióelegyben) és szubsztráttal energizált state 3 (**indukált állapot** – szubsztrát, ADP és izolált mitokondriumok hozzáadása a reakcióelegyhez) légzésvizsgálatokat végeztünk. A mitokondriumokat glutamáttal és maláttal (GM) (5 Mm egyenként), vagy szukcináttal (Suc) (5 Mm) energizáltuk. A mitokondriális légzési kontroll rátát ADP (2 Mm) jelenlétében határoztuk meg.

A méréseket standard reakciómédiumban (125 mM KCl (Kálium-klorid), 20 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethaneszulfonsav), 2 mM K_2HPO_4 (Dikálium-hidrogén-foszfát), 1 mM $MgCl_2$ (Magnézium-klorid), 0,1 mM EGTA (Egtazik-sav), pH 7,0 [KOH] és 0,025% zsírsav-mentes BSA) hajtottuk végre.

3.7.3. Mitokondriális ATP termelés vizsgálata

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

3.7.4. Mitokondriális $NAD(P)H$ háztartás vizsgálata

A mátrix $NAD(P)H$ autofluoreszcencia vizsgálata PTI Deltascan fluoreszcens spektrofotométerrel (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ, USA),

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

3.7.5. Mitokondriális ROS (reaktív oxigéngyök) termelés vizsgálata

A mérések H₂O₂ (hidrogén-peroxid) és Amplex UltraRed (Thermo Scientific, Boston, MA) fluoreszcens pigment tartalmú közegben történtek. Az inkubációs médiumhoz torma peroxidáz adását követően (5 unit/2 ml), az Amplex UltraRed reagenssel (1 μM), majd a mitokondriális izolátummal inkubáltuk. A H₂O₂ képződést glutamát és malát (5-5 Mm egyenként) vagy szukcinát hozzáadásával indítottuk meg, a fluoreszcenciát 37°C-on PTI Deltascan fluoreszcencia spektrofotométer segítségével detektáltuk (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ, USA) 550 nm excitációs és 585 nm emissziós hullámhosszok mellett. A kalibrációs jelet ismert mennyiségű H₂O₂ segítségével hoztuk létre minden mérés végén (147).

3.8. qPCR (kvantitatív polimeráz láncreakció) vizsgálatok

3.8.1. RNS izolálás

A szövetminták mRNS (hírvivő ribonukleinsav) tartalmának izolálását NucleoSpin® RNA II kit (Macherey-Nagel #740955.250, Düren, Németország) segítségével végeztük el a gyártó ajánlatainak megfelelően. Az izolált mintákhoz jégen történő kiolvasztás után R1 buffert, valamint β-mermerkaptóetanolt (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI) adtunk, majd a szövet homogenizálását követően az RNS (ribonukleinsav) tartalom izolálását végeztük szilikagél csövek segítségével, amelyekből az RNS elúciót 60 μl ultratisztított víz hozzáadásával valósítottuk meg.

3.8.2. cDNS (komplementer dezoxiribonukleinsav) szintézis

A cDNS szintézise Tetro cDNA Synthesis kit (Bioline #BIO-65026 Luckenwalde, Germany) használatával valósult meg. A reakcióelegy a következő összetevőket tartalmazta: 1 µg RNS, 1 µl random primer, 1 µl 10mM dNTP, 1 µl RNase inhibitor, és 0,25 µl 200 U/µl koncentrációjú reverz transzkriptáz. Az elegy 10 perc 25°C-on történő inkubálását követően 60 perc 42°C-on, majd 5 perc 80°C-os reakciófuttatás követett. A létrehozott cDNS könyvtárak tárolása -20 °C-on történt.

3.8.3. Valós idejű, kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR)

Az RT-qPCR vizsgálatokat SybrGreen detektálásra épített eljárás segítségével valósítottuk meg. A qPCR-hez használt reakcióelegy a következő összetevőkből állt: 1 µl EvaGreen (Biotium, Fremont, CA, USA) pigment, 10µl 2x iTaq supermix (Bio-Rad, Hercules, MA), 2,5 µl, 10 nmol koncentrációjú specifikus primer pár összesen 20µl térfogatra hígítva. Az amplifikációkat LightCycler 480 (Roche, Bazel, Svájc) típusú készülékkel végeztük el (3. táblázat: primerpárok).

3. táblázat: A PCR vizsgálatok során használt primerpárok:

| Gén | Primer | Szekvencia |
|---------------|---------|--------------------------|
| PGC1-α | Forward | CGCACAACTCAGCAAGTCCTC |
| | Reverse | CCTTGCTGGCCTCCAAAGTCTC |
| NRF-1 | Forward | GCCACCTTACAAGGCGGGGG |
| | Reverse | ACTCCATCTGGGCCATTAGCATCT |
| mTFA | Forward | CCTCGCCTGTCAGCCTTAT |
| | Reverse | CCTCCACATGGCTGCAATTTTT |
| B2m | Forward | CCACCGGAGAATGGGAAGCCC |
| | Reverse | TCTCGGTCCCAGGTGACGGT |

Rövidítések: Peroxiszóma proliferátor aktiválta receptor gamma koaktivátor 1 alfa, Nukleáris respiratórikus faktor 1, mTFA - Mitochondriális transzkripció faktor alfa, B2m - Béta 2 mikroglobulin.

3.9. Western blot vizsgálatok

3.9.1. Protein izolálás

A Western blot vizsgálatokhoz szükséges protein izolátumok elkészítése 35 mg májszövet RIPA (radioimmunprecipitációs assay puffer) (Sigma, St. Louis, MI, USA) pufferben történő homogenizálásával történt, melyet Next Advance Bead Beater 24 (NextAdvance, Boston, MA, USA) cirkóniumgyöngyös szövetzúzó segítségével hajtottunk végre. Ezt követően a homogenizált szövet ülepitését végeztük 4 °C-on 14500 RPM fordulatszámon történő centrifugálás mellett. A későbbi kísérletek során az így kapott tiszta, fehérjedús felülúszót használtuk fel.

3.9.2. Gélelektroforézis, transzfer és jelölés

A 3.9.1. pontban leírt módon nyert fehérje izolátumok pontos koncentráció meghatározása Bradford reakció segítségével történt. Ezt követően az izolátumok stabilizálását végeztük el Laemmli oldat hozzáadásával, és 5 perc 95 °C-on történő főzéssel. Valamennyi stabilizált oldatból 15 µg fehérjét tartalmazó mennyiség került felvitelre 5-15%-os SDS-PAGE gélekre (Bio-Rad, Hercules, MA, USA). A proteinfuttatást követően (95 Volt hordozófeszültség) azok PVDF membránokra (polivinil-difluorid) (WesternBright-Cl, Advansta, Menlo Park, CA, USA) történő elektrotranszferjére került sor, 0,5 Amper áramerősség mellett. A teljes proteintartalom vizualizálása Ponceau vörös pigmenttel történt, a későbbiek során a teljes jelölt fehérjetartalom szolgált belső kontrollként. Ezt követően a membránok mosását TBST (tris buffered saline-tween) oldatban végeztük el (3x15 perc). A membránok primer antitestekkel történő jelölését és blokkolását 3%-os, megfelelő koncentrációra hígított antitesteket tartalmazó BSA-TBS oldattal hajtottuk végre (4. táblázat). A primer antitestek vizualizációja specifikus szekunder antitestek alkalmazásával történt (Advansta, Menlo Park, CA, USA).

4. táblázat: A kísérletek során Western blotra felhasznált antitestek jegyzéke.

| Kísérlet | Antigén | Azonosító | Gyártó | Hígítás és Felhasználás | |
|----------|-----------------------------------|-------------|----------------------------------|-------------------------|----|
| | | | | | |
| I-II. | NRF1 | #sc-33771 | Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA) | 1/5000 | WB |
| I-II. | NRF2 | #16396-I-AP | Proteintech (Rosemont, IL, USA) | 1/1000 | WB |
| I-II. | PGC1-α | #KP-9803 | Merck (Darmstadt, Németország) | 1/9000 | WB |
| I-II. | mTFA | #sc-166965 | Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA) | 1/1000 | WB |
| I-II. | TNF-α | #ab6671 | Abcam (Cambridge, UK) | 1/1000 | WB |
| I-II. | NF-Kβ P65 | #ab16502 | Abcam (Cambridge, UK) | 1/3000 | WB |
| I-II. | Cytochrome-c | #MA5-11674 | Invitrogen (Waltham, MA, USA) | 1/2500 | WB |
| II. | IL-1B | ab9722 | Abcam (Cambridge, UK) | 1/1000 | WB |
| II. | IL-1RA | ab124962 | Abcam (Cambridge, UK) | 1/5000 | WB |
| II. | NDUFB8 (CI) | ab110242 | Abcam (Cambridge, UK) | 1/4000 | WB |
| II. | SDHB (CII) | ab14714 | Abcam (Cambridge, UK) | 1/4000 | WB |
| II. | UQCRC2 | ab14745 | Abcam (Cambridge, UK) | 1/4000 | WB |
| II. | MTCO1 | ab14705 | Abcam (Cambridge, UK) | 1/4000 | WB |
| II. | ATP5A | ab14748 | Abcam (Cambridge, UK) | 1/4000 | WB |

Rövidítések: NRF1: Nukleáris respiratórikus faktor 1, NRF2: Nukleáris respiratórikus faktor 2, PGC1- α : Peroxisome proliferátor aktiválta receptor gamma koaktivátor 1 alfa, mTFA: Mitokondriális transzkripció faktor alfa, TNF- α : Tumor nekrosis faktor alfa, NF-K β P65: Aktivált B-sejt nukleáris faktor kappa könnyűlánc enhancer P65 (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells P65), IL-1B: Interleukin 1 béta, IL-1RA: Interleukin 1 receptor antagonista, NDUFB8: NADH-dehidrogenáz [ubikinol] 1 béta szubkomplex alegység 8, SDHB: szukcinát-dehidrogenáz komplex vas-szulfúr alegység B, UQCRC2: Citokróm b-c1 komplex alegység 2, MTCO1: Citokróm oxidáz 1, ATP5A: ATP szintáz alfa alegység.

3.10. Statisztikai analízis

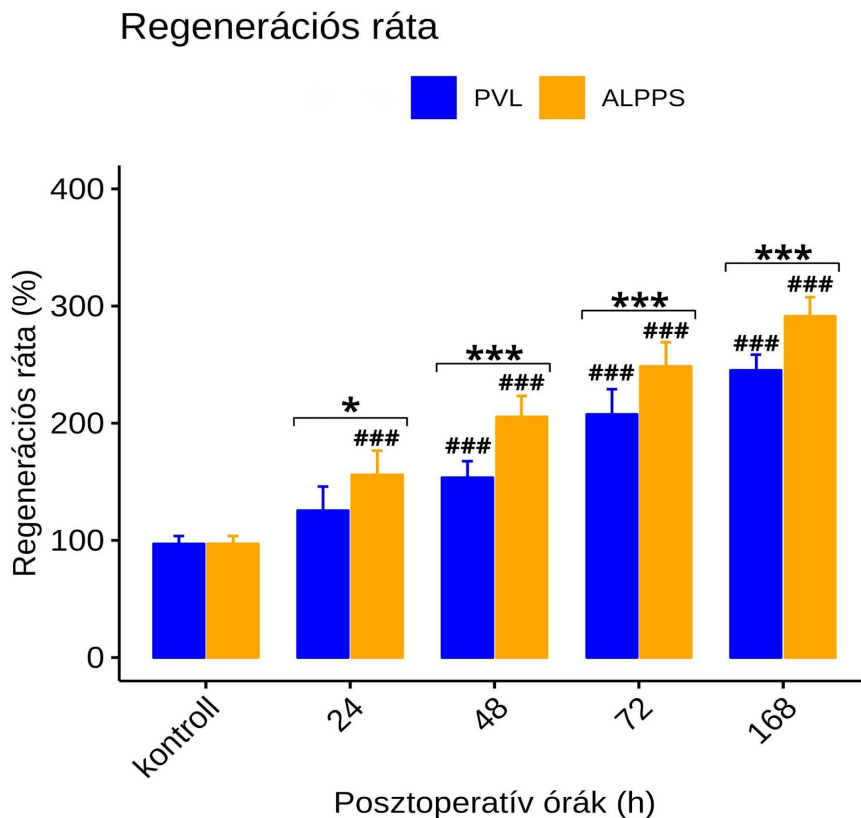
A mérések során kapott eredmények statisztikai kiértékelése GraphPad Prism v7.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) szoftver segítségével történt. Az egyes csoportok közötti statisztikai különbséget kétutas ANOVA és Bonferroni-féle post-hoc analízisekkel végeztük. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, amennyiben $p < 0,05$. Az eredmények közlése átlag \pm SD formában történt. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok eredményeinek számszerűsítése és a szükséges görbe-analízisekhez OriginPro 2017 szoftvert használtunk.

4. Eredmények

4.1. I. Kísérlet: Sejt-energetikai változások vizsgálata PVL és ALPPS során

4.1.1. Lebentömeg változások PVL és ALPPS műtétet követően

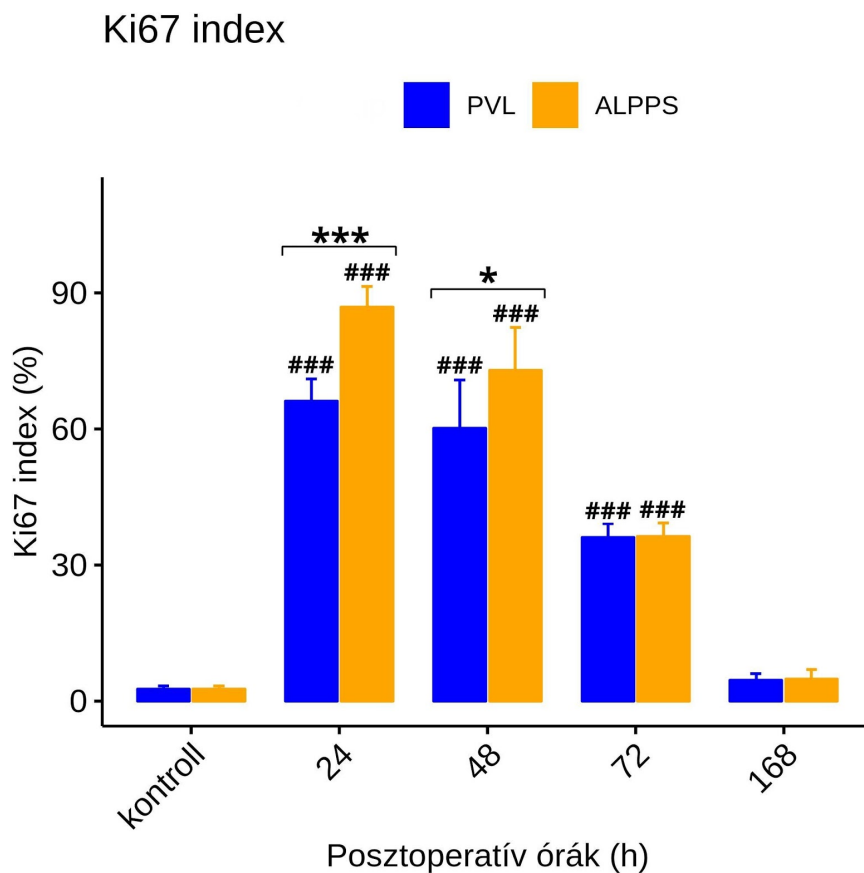
A PVL kezelt állatokban a regenerálódó RML tömegnövekedése a posztoperatív 48. órától szignifikáns mértékben meghaladta a kontroll csoportban mért értékeket. Az ALPPS operációval kezelt állatok regenerálódó lebenyeinek növekedése szignifikáns mértékben meghaladta a PVL csoportban mérhető abszolút lebentömeg növekedést. Ez a növekmény az ALPPS kezelt egyedekben dinamikusabbnak bizonyult a PVL-en átesett állatokhoz képest 24h: $p=0,404$, 48h: $p<0,001$, 72h: $p<0,001$, 168h: $p<0,001$, PVL vs. ALPPS) (7. ábra).



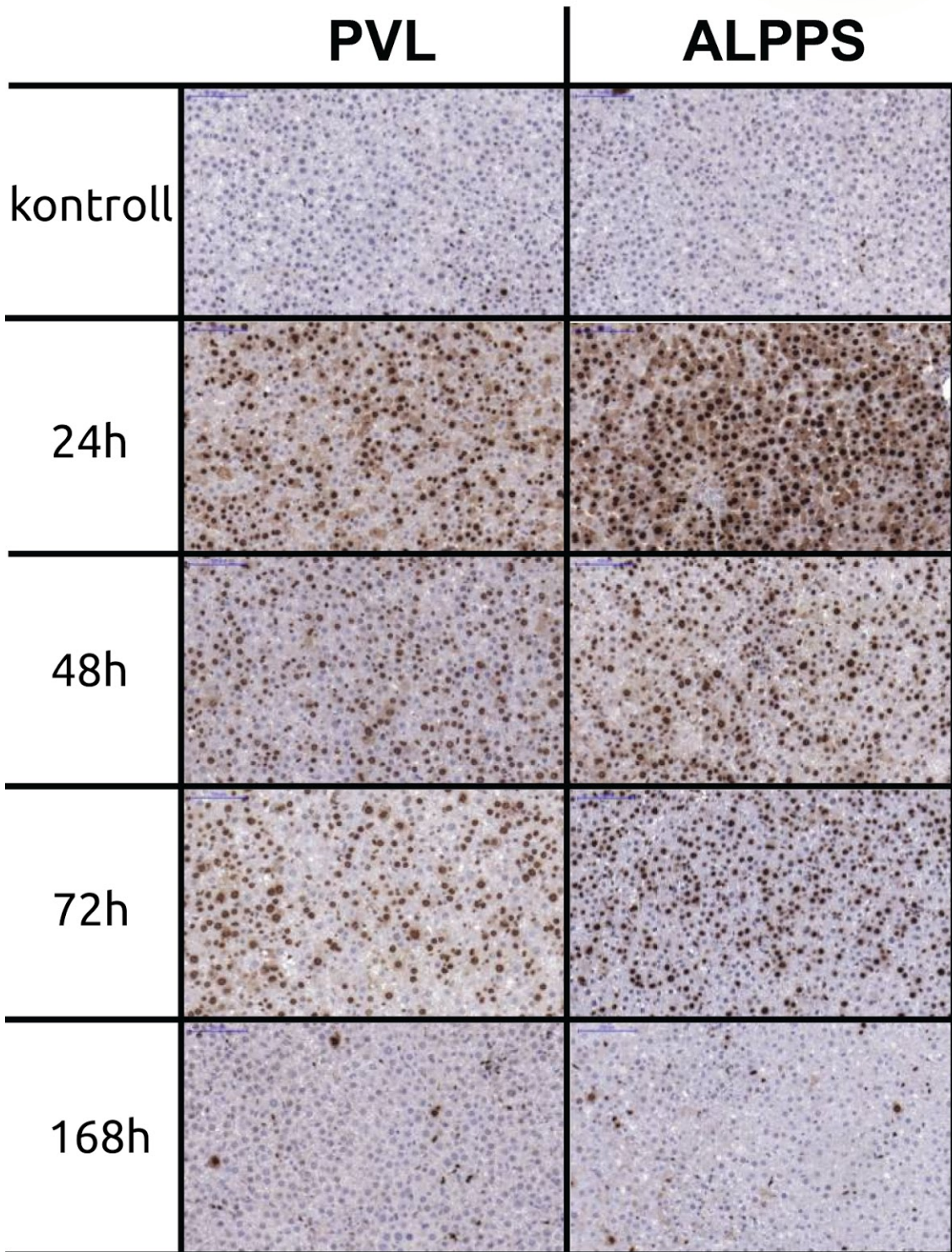
7. ábra: A regenerációs ráta változása PVL-t és ALPPS-t követően. *: $p<0,05$, ***: $p<0,001$ PVL vs. ALPPS. ###: $p<0,001$ vs. kontroll. Statisztikai próba: kétutas ANOVA, Bonferroni-féle post-hoc teszt. Az adatok átlag \pm SD formában kerülnek bemutatásra, $n=5$.

4.1.2. A sejtciklusba lépés aktivitásának változásai PVL-t és ALPPS-t követően

Mind a PVL, mind pedig ALPPS elvégzését követően szignifikáns mértékű Ki67 index emelkedés figyelhető meg, amely legmagasabb értékét a műtéteket követő 24. órában érte el, és szignifikánsan magasabb maradt a kontrollcsoporthoz képest a 48. és 72. óra folyamán. A 24. órában mérhető legmagasabb osztódási számot követően mindkét állatcsoportban a Ki67 index graduális csökkenése figyelhető meg, amely a 168. órára a bazális értékhez konvergál. Mindezen változásokból kiemelendő, hogy az ALPPS csoportban a Ki67 index emelkedés jelentősen meghaladta a PVL csoportban mérhető értékeket a 24. és 48. posztoperatív órában. (24h: $p < 0,001$, PVL vs. ALPPS; 48h: $p = 0,001$, PVL vs. ALPPS) (8. és 9. ábra).



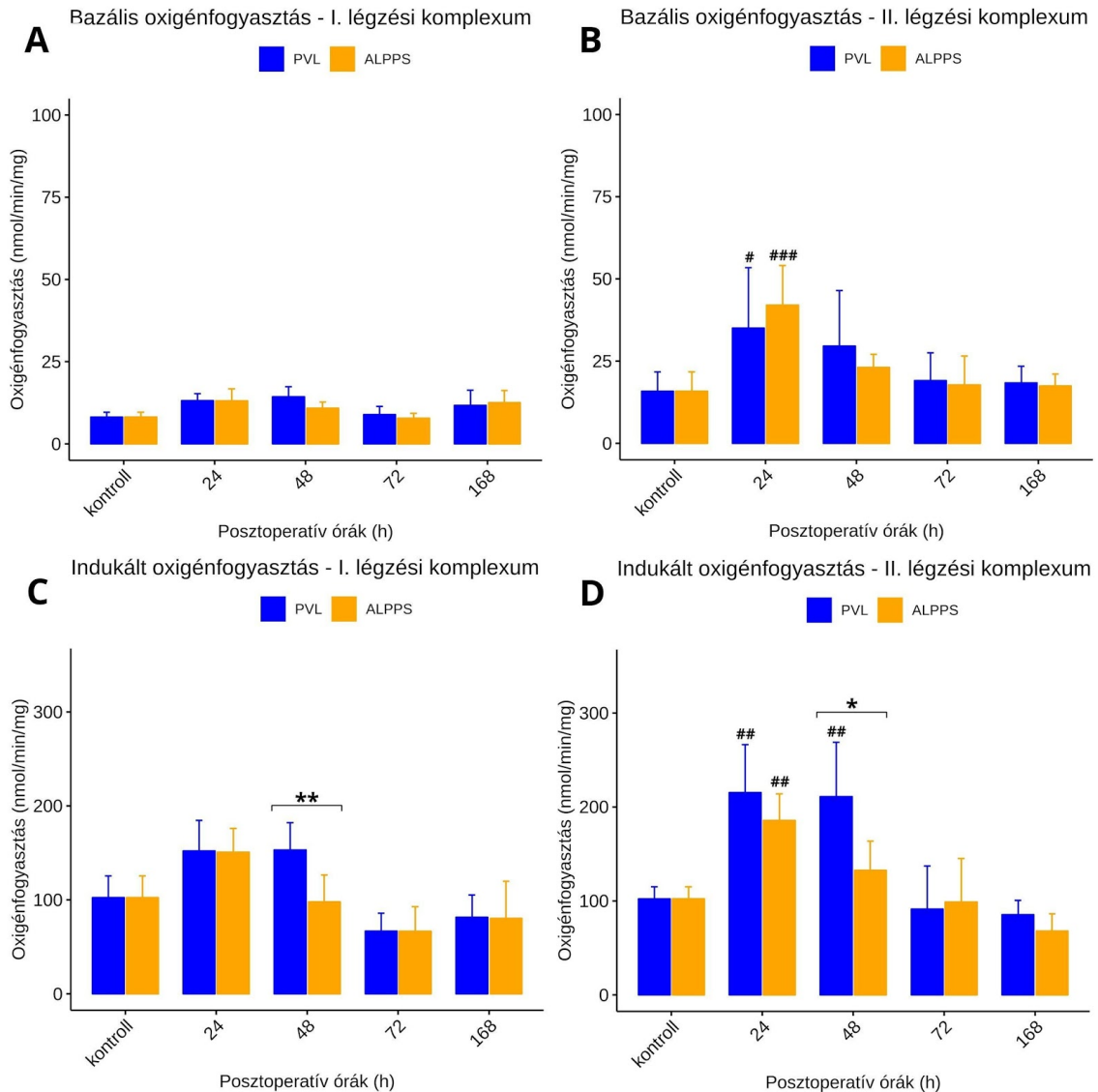
8. ábra: A Ki67 index változásai PVL-t és ALPPS-t követően. *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$ PVL vs. ALPPS. ###: $p < 0,001$ vs. kontroll. Statisztikai próba: kétutas ANOVA, Bonferroni-féle post-hoc teszt. Az adatok átlag \pm SD formában kerülnek bemutatásra, $n=5$.



9. ábra: Ki67 reakció intenzitás PVL és ALPPS műtétet követően. Bár mindkét állatcsoportban emelkedett számú sejtciklusba lépés figyelhető meg, ALPPS esetében intenzívebb jelölődés azonosítható PVL-hez képest a posztoperatív 24., 48. és 72. órákban.

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

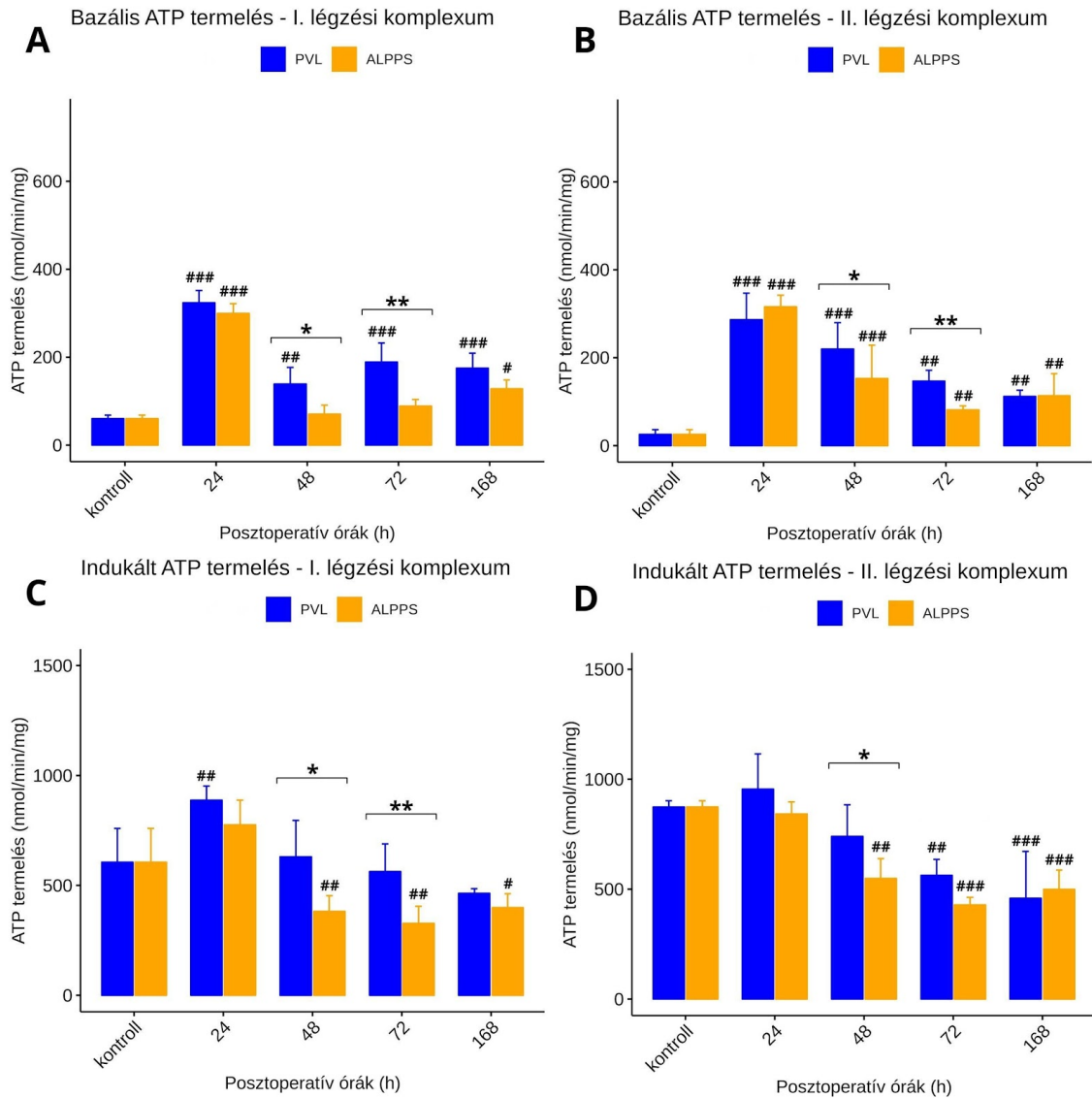
PVL-t és ALPPS-t követően az I. légzési komplex bazális O_2 fogyasztásában szignifikáns eltérés nem volt mérhető (10. ábra/A). A II. légzési komplexum esetében az ALPPS csoportban a kontroll értékekhez képest szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető a 24. óra folyamán (10. ábra/B). Az I. légzési komplex indukált működése esetében a kontrollcsoporthoz képest egyik állatcsoportban sem változott szignifikáns mértékben az oxigénfogyasztás, ugyanakkor a 48. órában az ALPPS csoport értékei szignifikáns mértékben alacsonyabbnak bizonyultak a PVL csoportban mértékhez képest ($p=0,004$) (10. ábra/C). A II. légzési láncalkotó indukciója esetén a PVL csoportban szignifikáns emelkedés volt látható a kontrollcsoport értékeihez képest a 24. és 48. óra során. Az ALPPS csoport esetében ugyancsak szignifikáns emelkedést mutatott a kontrollcsoport értékeihez képest a 24. órában, ugyanakkor a 48. órára az oxigén fogyasztás csökkenése volt megfigyelhető, amely által a PVL és ALPPS csoportok között szignifikáns eltérés alakult ki ($p=0,017$) (10. ábra/D).



10. ábra: Az oxigénfogyasztás változásai PVL-t és ALPPS-t követően. Az I. légzési komplexum oxigénfogyasztása bazális állapotban nem különbözött az állatcsoportok között (A). A II. komplexum esetében bár a kontroll értékhez képest emelkedett a felhasználás, de az állatcsoportok között nem volt statisztikai különbség (B). Indukált állapotban mind az I. és a II. légzési komplexum esetében 48 órával a műtét után szignifikánsan magasabb volt a PVL csoportban az ALPPS csoportéhoz képest (C, D). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ PVL vs. ALPPS, #: $p < 0,05$, ###: $p < 0,001$ vs. kontroll. Statisztikai próba: kétutas ANOVA, Bonferroni-féle post-hoc teszt. Az adatok átlag \pm SD formában kerülnek bemutatásra, $n=5$.

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

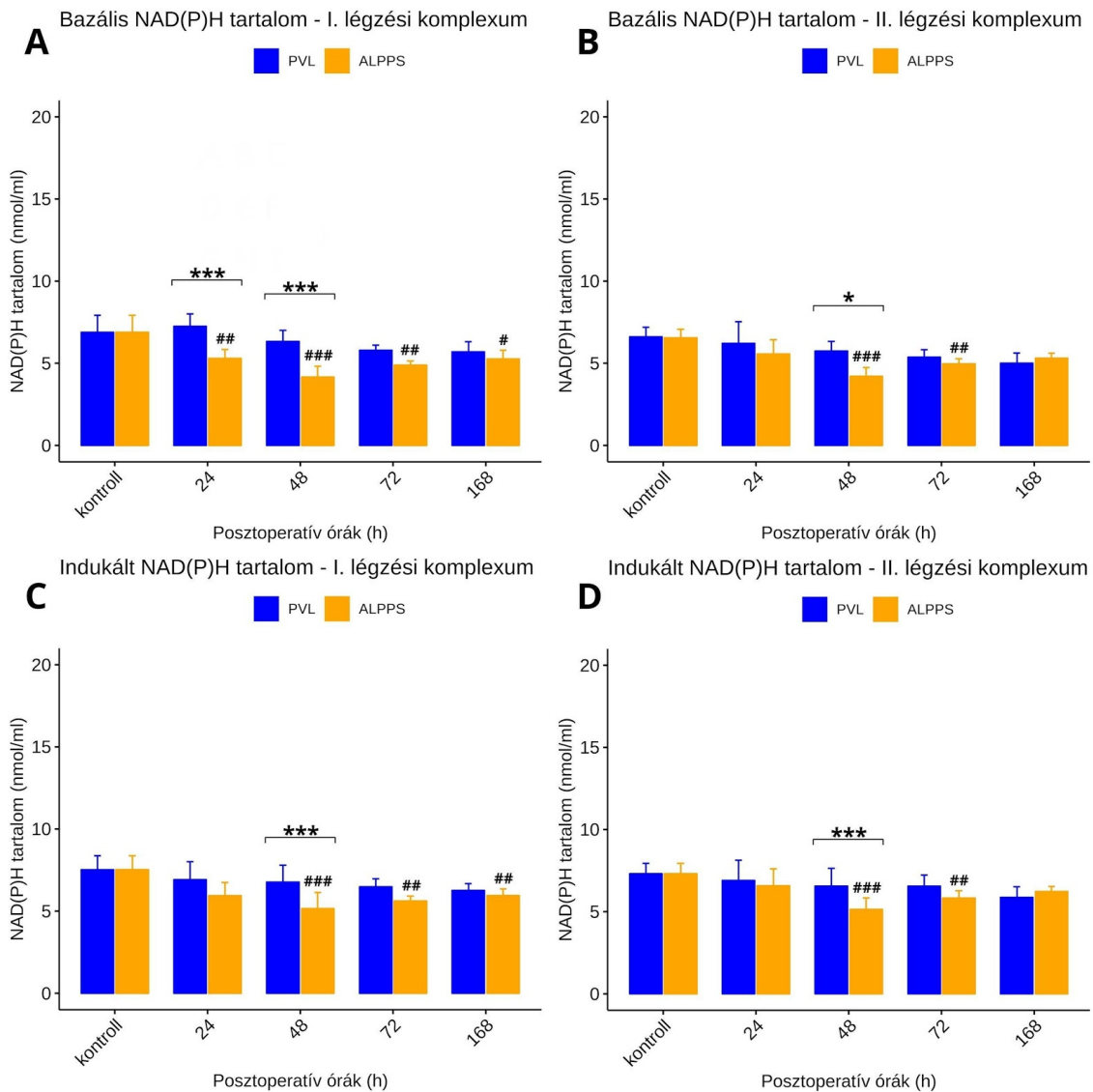
PVL-t követően a bazális CI ATP termelés nőtt a vizsgálatok első 24 órája során. Ez a növekmény a 48. óra elteltével csökkenést mutatott, ugyanakkor a bazális értékekhez képest még mindig szignifikánsan magasabbnak bizonyult. Így ebben a csoportban az ATP termelés szignifikánsan fokozott volta egészen a 168. óráig fennmaradt a CI esetén. Mindezen változások eredményeképpen a PVL csoportban szignifikánsan magasabb ATP termelési értékek voltak mérhetőek az ALPPS csoporthoz viszonyítottn a posztoperatív 48. és 72. óra folyamán (48h: $p=0,014$, 72h: $p<0,001$). A CII vizsgálatok az eredmények némiképp eltértek. A bazális aktivitás a PVL csoportban szignifikánsan emelkedett a kontrollcsoporthoz képest a 24., 48. és 72. óra folyamán, ugyanakkor a 168. óra elteltével az ATP termelés mértéke visszatért a kiindulási érték közelébe. Az ALPPS csoport vizsgálatok a bazális ATP termelésben bekövetkező változások élesen eltértek. A CII esetében szignifikáns mértékű ATP szintézis fokozódás volt látható az első 24 óra folyamán, ugyanakkor ez a felfokozott szintetikus aktivitás hirtelen csökkenést mutatott a posztoperatív 48. órára, amelynek következtében szignifikánsan alacsonyabb értékek mutatkoztak a PVL csoporthoz képest a 48. posztoperatív óra során ($p=0,019$) (11. ábra/A-B). Az indukált CI ATP termelés vizsgálatok a PVL csoport esetében szignifikánsan emelkedett aktivitást figyeltünk meg a kontrollcsoporthoz képest. Az ALPPS csoportban szignifikáns eltérés nem volt kimutatható a kontrollcsoport értékeihez képest. Ugyanakkor, a posztoperatív 48. óra folyamán az ALPPS csoportban a PVL csoporthoz képest szignifikánsan alacsonyabb ATP termelés volt megfigyelhető ($p=0,038$). Indukált CII aktivitás esetében a PVL csoportban a kontrollcsoporthoz képest szignifikánsan alacsonyabb ATP termelés volt mérhető a posztoperatív 72. és 168. órában. Az ALPPS csoport esetében az indukált CII ATP termelése a posztoperatív 48., 72. és 168. órában is szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkozott a kontrollcsoporthoz képest. A 48. órában tapasztalt ATP termelés csökkenés következtében az ALPPS csoportban a PVL csoporthoz képest szignifikánsan csökkent értékek voltak mérhetőek ($p=0,029$) (11. ábra/C-D).



11. ábra: A PVL-t és ALPPS-t követő ATP termelés változásai. Az I. és II. légzési komplexumon keresztül bazális teljesítmény kezdeti emelkedést követően szignifikánsan magasabb szinten maradt a PVL csoportban az ALPPS-hez képest (A, B). Indukált ATP termelés esetében bár mindkét állatcsoportban csökkenés figyelhető meg, ALPPS esetében az ATP termelés visszaesése a PVL csoport értékeihez képest szignifikáns fokú (C, D). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ PVL vs. ALPPS, #: $p < 0,05$, ##: $p < 0,01$, ###: $p < 0,001$ vs. kontroll. Statisztikai próba: kétutas ANOVA, Bonferroni-féle post-hoc teszt. Az adatok átlag \pm SD formában kerülnek bemutatásra, $n=5$.

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

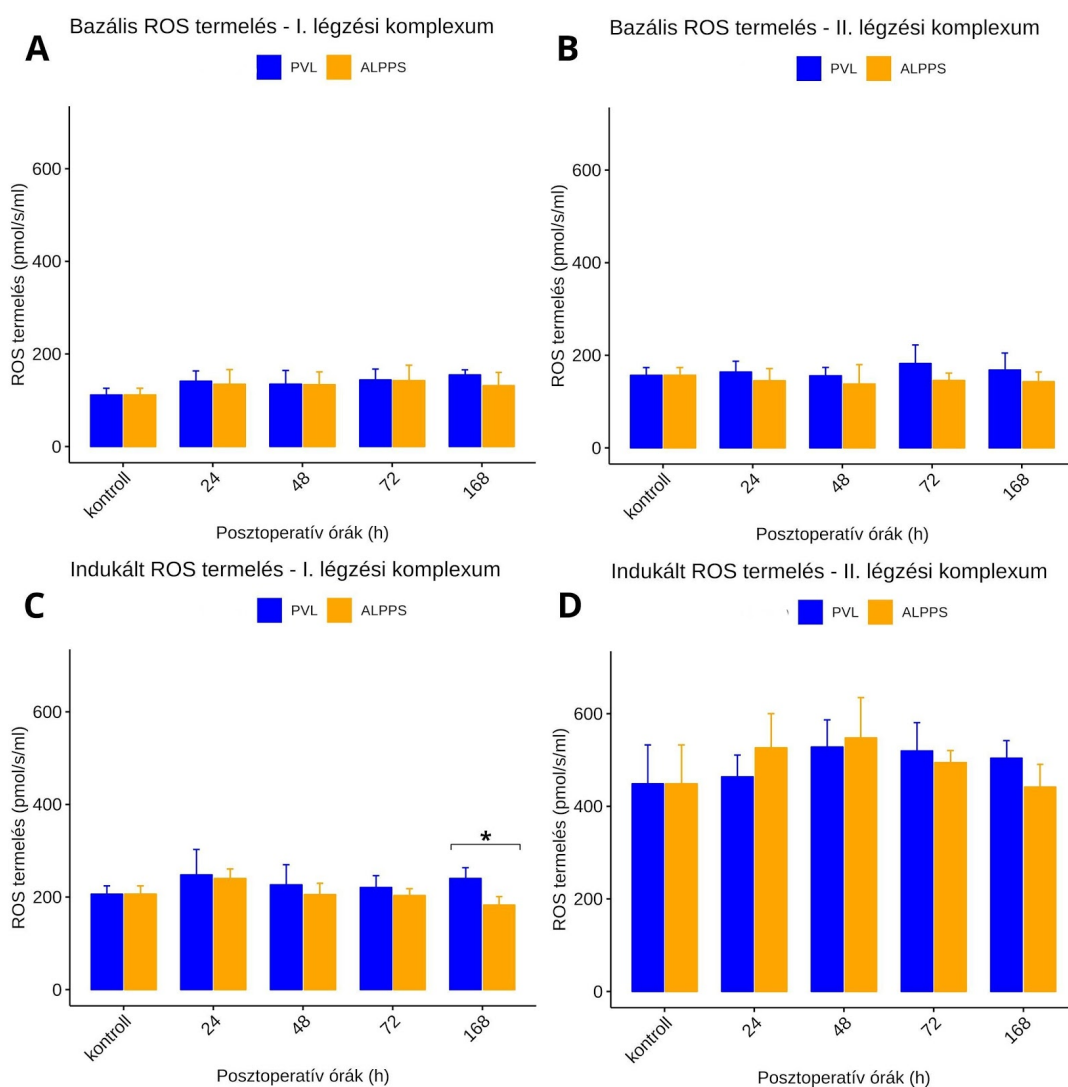
A bazális CI aktivitás során mért NAD(P)H egyensúlyi változásokat illetően a PVL csoportban nem volt megfigyelhető szignifikáns eltérés a kiindulási értékekhez képest. Az ALPPS csoport esetében ugyanakkor a posztoperatív 48. órában szignifikánsan alacsonyabb értékeket mértünk a kontroll értékhez képest. A PVL és ALPPS csoportok összehasonlításakor a PVL csoportban mért NAD(P)H koncentráció az ALPPS csoporttal összevetve szignifikánsan magasabbnak mutatkozott a posztoperatív 24. és 48. óra során (24h: $p=0,041$; 48h: $p=0,049$) (12. ábra/A). A bazális CII aktivitás esetében a PVL csoportban a kontroll értékekhez képest nem voltak szignifikáns változások mérhetőek. Az ALPPS csoportban mért NAD(P)H koncentráció értékek a bazális koncentrációkhoz képest szignifikáns csökkenést mutattak a posztoperatív 48. órától kezdődően a kísérletek végéig (12. ábra/B). Ezen koncentrációcsökkenés eredményeképp az ALPPS csoportban a PVL kezelthez képest szignifikánsan alacsonyabb NAD(P)H tartalom volt megfigyelhető a 48. posztoperatív órában ($p=0,026$). Indukált CI aktivitás esetében a PVL csoportban nem történt szignifikáns változás a NAD(P)H tartalommal illetően, míg az ALPPS csoportban a kiindulási értékhez viszonyítottan szignifikánsan lecsökkent az intramitokondriális NAD(P)H koncentráció a posztoperatív 48. és 72. órában. Mindezen változások eredményeképp a 48. posztoperatív órában az ALPPS csoportban a PVL csoporthoz viszonyítva szignifikánsan lecsökkent NAD(P)H koncentráció volt kimutatható ($p=0,002$) (12. ábra/C). Indukált CII aktivitás esetében hasonló tendenciákat figyeltünk meg. A PVL által indukált májregeneráció során a NAD(P)H tartalom nem mutatott szignifikáns eltéréseket a kiindulási koncentrációkhoz viszonyítottan (12. ábra/D).



12. ábra: A NAD(P)H egyensúly változásai PVL-t és ALPPS-t követően. A műtétek után a bazális NAD(P)H tartalom szignifikánsan alacsonyabb értéket vett fel az ALPPS kezelt csoportban a PVL-hez képest 24 és 48 órával az I. légzési komplexum (A) és 48 órával a II. légzési komplexum esetén (B). A mitokondriális működés indukációjakor az ALPPS csoportban 48 órával a műtétet követően alakult ki jelentősebb csökkenés, mely ebben az időpontban mindkét enzimkomplexum esetén szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a PVL csoport értékeihez képest (C és D). *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$ PVL vs. ALPPS, #: $p < 0,05$, ##: $p < 0,01$, ###: $p < 0,001$ vs. kontroll. Statisztikai próba: kétutas ANOVA, Bonferroni-féle post-hoc teszt. Az adatok átlag \pm SD formában kerülnek bemutatásra, $n=5$.

4.1.6. A szabadgyök termelés változásai PVL-t és ALPPS-t követően

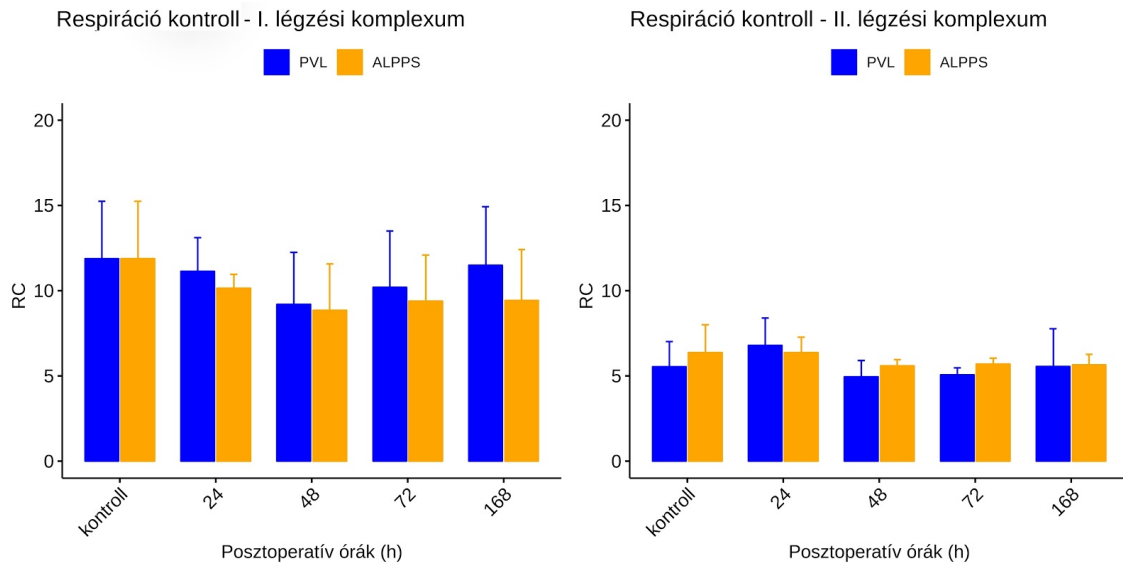
A kísérletek során szignifikáns reaktív oxigén gyök (ROS) termelésbéli különbség sem a PVL, sem pedig az ALPPS csoport egyedeiben nem volt mérhető a kontrollcsoportban mért értékekhez képest (12. ábra/A, B, D). Állatcsoportok közötti különbség csupán az indukált CI aktivitás esetén, a posztoperatív 168. óra folyamán volt megfigyelhető. Ekkor a PVL csoportban mért ROS termelés szignifikáns mértékben meghaladta az ALPPS csoportban mérhetőt ($p=0,039$) (13. ábra/C).



13. ábra a ROS termelés változásai PVL-t és ALPPS-t követően. Egyedül az indukált aktivitású I. légzési komplexum esetében volt szignifikáns különbség a két állatcsoportban (C), míg minden más esetben hasonló értékeket mértünk (A, B, D). *: $p<0,05$ PVL vs. ALPPS Statisztikai próba: kétutas ANOVA, Bonferroni-féle post-hoc teszt. Az adatok átlag \pm SD formában kerülnek bemutatásra, $n=5$.

4.1.7. A respiráció kontroll változásai PVL és ALPPS után

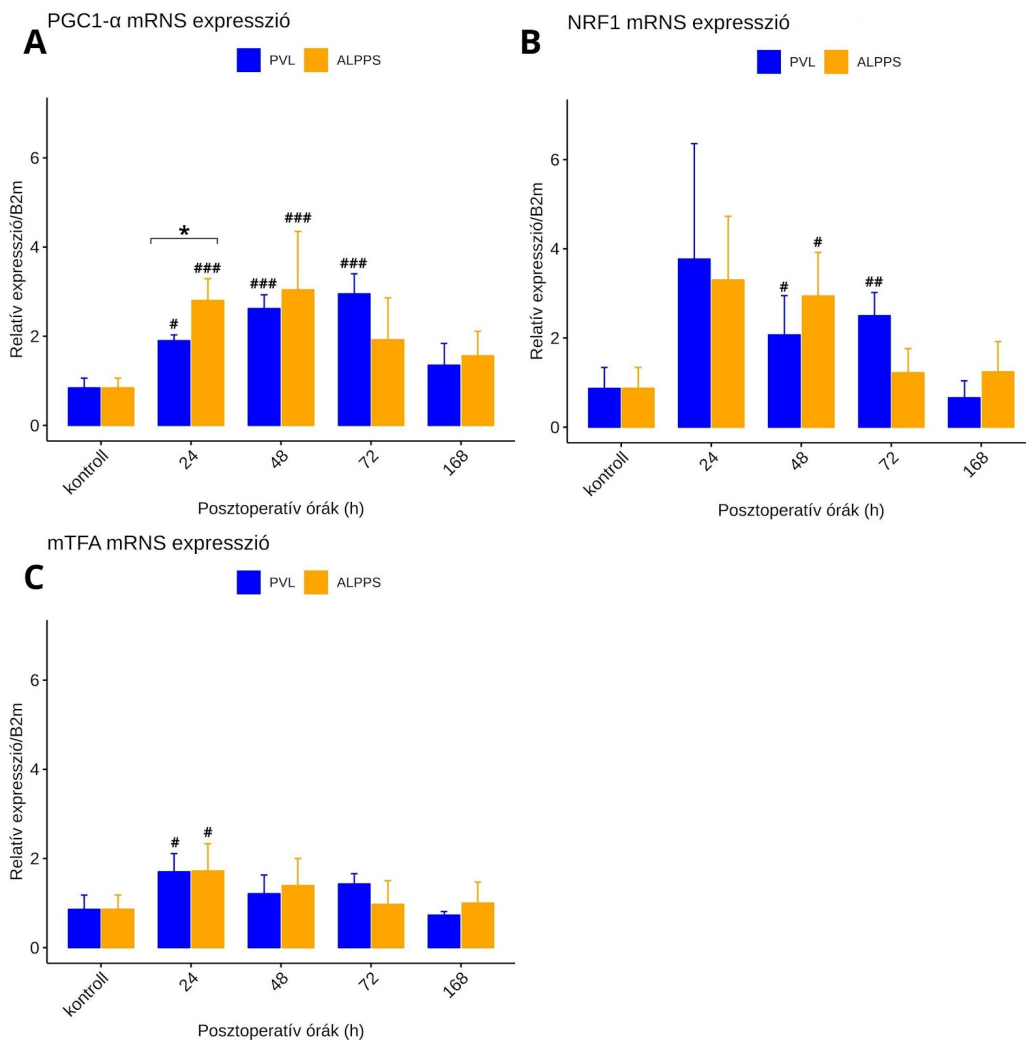
A respiráció kontroll vizsgálata során sem a PVL csoportban, sem pedig az ALPPS kezelt állatokban nem volt kimutatható szignifikáns eltérés a kontrollcsoporthoz viszonyítva, vagy a kezelési modalitások között (14.ábra).



14. ábra: A respiráció kontroll változásai. Méréseink során egyetlen összehasonlításban sem volt szignifikáns különbség kimutatható az állatsoportok között, vagy a kontrollcsoportokhoz viszonyítottan. Statisztikai próba: kétutas ANOVA, Bonferroni-féle post-hoc teszt. Az adatok átlag \pm SD formában kerülnek bemutatásra, n=5.

4.1.8. RNS expresszióban bekövetkező változások

Műtétet követően a PGC1- α mRNS expressziója a PVL kezelt állatokban szignifikáns emelkedést mutatott a kontrollcsoporthoz képest 24, 48 és 72 órával az operációk után. Az ALPPS csoport esetében ugyancsak emelkedett expressziós aktivitás volt megfigyelhető a 24. és 48. posztoperatív óra folyamán. A 24. posztoperatív órában az ALPPS csoportban a PVL csoporthoz mérten szignifikánsan emelkedett PGC1- α expressziós értékek voltak mérhetőek ($p=0,041$) (15. ábra/A). Az NRF1 és mTFA mRNS expressziója a kontroll csoporthoz képest ugyan fokozott volt mindkét állatcsoportban, de egymáshoz viszonyítottnak nem mutatkozott statisztikai eltérés (15.



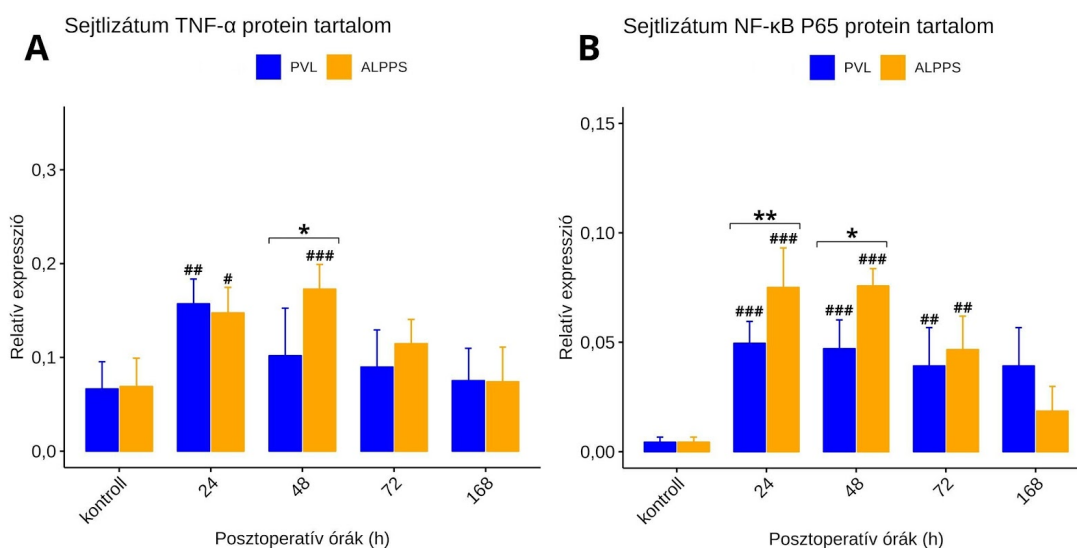
15. ábra/B, C).

15. ábra: mRNS expresszió változások PVL és ALPPS után. PGC1- α esetében a 24. posztoperatív órában szignifikánsan magasabb érték volt mérhető az ALPPS csoportban (A). NRF1 és mTFA esetében a kontrollhoz képest emelkedett értékeket figyeltünk meg,

*csoportok közti különbség nélkül (B, C). *: $p < 0,05$ PVL vs. ALPPS. #: $p < 0,05$, ##: $p < 0,01$, ###: $p < 0,001$ vs. kontroll. Statisztikai próba: kétutas ANOVA, Bonferroni-féle post-hoc teszt. Az adatok $\text{átlag} \pm \text{SD}$ formában kerülnek bemutatásra, $n=5$.*

4.1.9. Gyulladásos válaszreakcióban bekövetkező változások PVL és ALPPS hatására

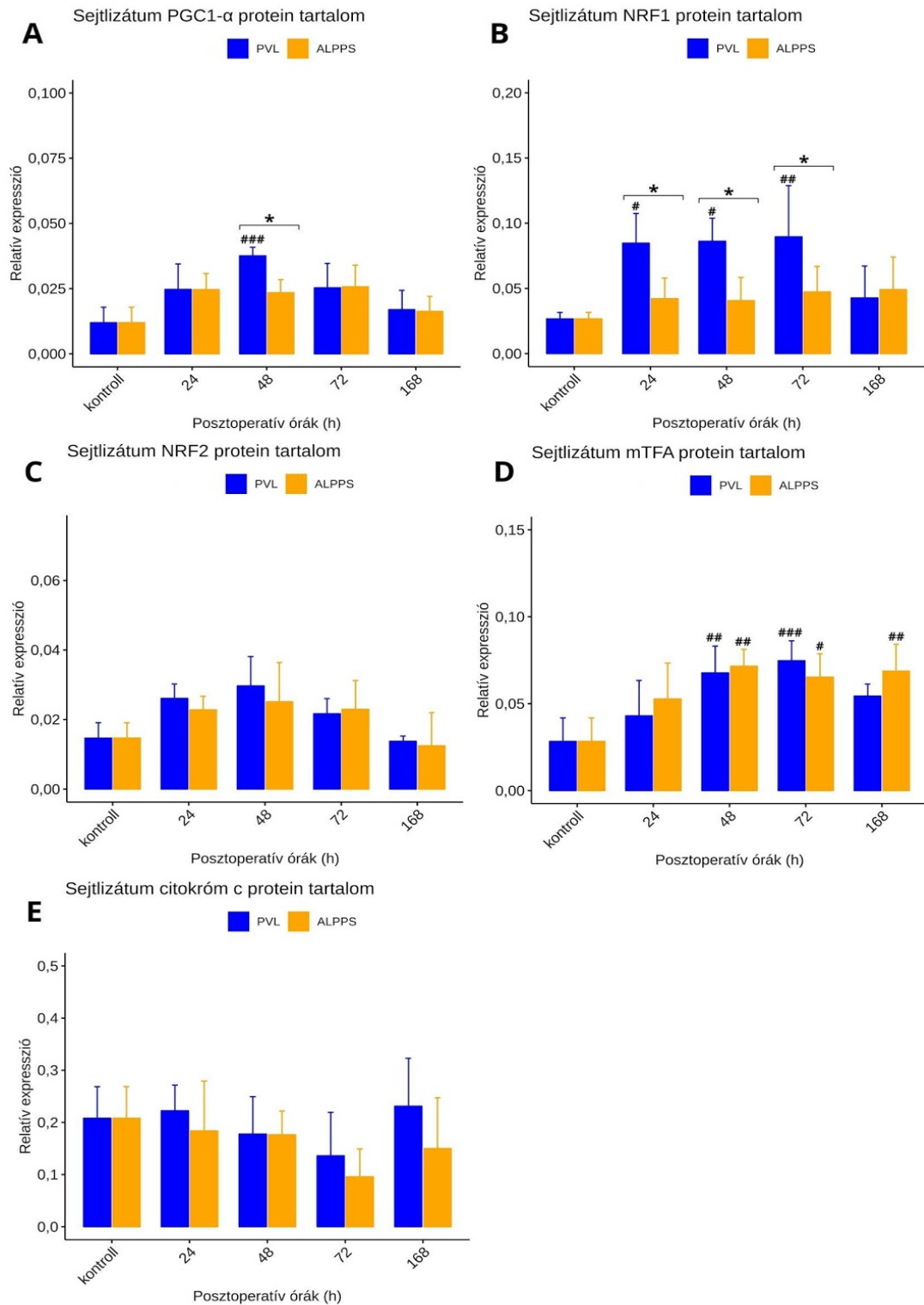
PVL-t követően a májszövetben mérhető TNF- α protein koncentrációja az első 24 óra folyamán szignifikáns emelkedést mutatott a kontrollcsoporthoz képest ($p=0,009$), de a 48. órától a kiindulási értékekhez viszonyítva szignifikáns koncentrációkülönbség már nem volt mérhető (16. ábra/A). Az ALPPS csoportban a szöveti TNF- α koncentrációja a kontrollcsoporthoz képest szignifikáns mértékben emelkedett az első két posztoperatív napon, legmagasabb mérhető koncentrációját pedig a posztoperatív 48. órára érte el. A 48. óra folyamán mért emelkedett szöveti koncentráció egyben szignifikánsan magasabbnak bizonyult a PVL csoportban mért értékhez képest is (24h: $p=0,019$; 48h: $p=0,012$). Az NF- κ B P65 esetében mindkét állatcsoportban szignifikáns mértékű emelkedést mértünk az első 72 posztoperatív óra során, ugyanakkor a PVL-t követően ennek a mediátornak koncentrációi értékei szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyultak az ALPPS csoportban mértékhez képest 24 és 48 órával a műtétek után (24h: $p=0,0054$, 48h: $p=0,039$) (16. ábra/B). Mindkét vizsgált gyulladásos mediátor koncentrációja a kontrollcsoport értékeihez vált hasonlónak 168 órával a műtétek után.



16. ábra: TNF- α és NF- κ B koncentrációváltozása. PVL-t és ALPPS-t követően a TNF- α koncentrációja szignifikáns növekedést mutatott, gyanakkor a PVL csoportban a 24. posztoperatív óra után lecsökkent, míg az ALPPS csoportban szignifikánsan magasabb koncentráció értéken maradt. Az NF- κ B esetében mindkét állatcsoportban jelentős növekedés látható, ugyanakkor az ALPPS csoport értékei a PVL-ét jelentősen meghalagták az első 72 óra folyamán. *: $p<0,05$, **: $p<0,01$ PVL vs. ALPPS. #: $p<0,05$, ##: $p<0,01$, ###: $p<0,001$ vs. kontroll. Statisztikai próba: kétutas ANOVA, Bonferroni-féle post-hoc teszt. Az adatok átlag \pm SD formában kerülnek bemutatásra, $n=5$.

4.1.10. A mitokondriális biogenezisben bekövetkező változások

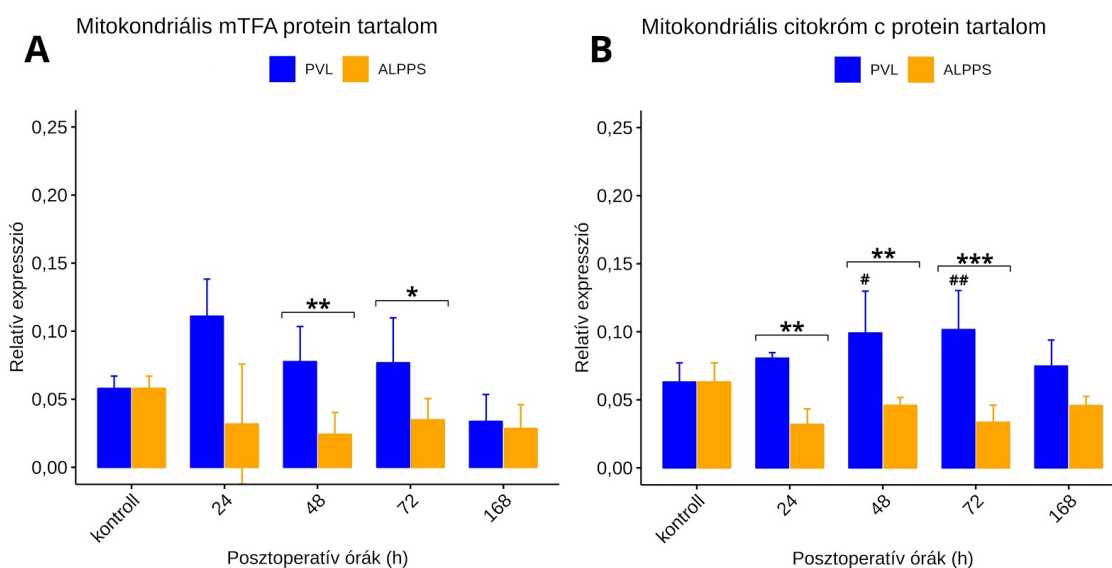
A PVL csoportban a szöveti PGC1- α koncentráció szignifikáns mértékű növekedést mutatott a kontrollcsoport értékeihez képest a posztoperatív 48. órában, majd ismét a kiindulási értékhez konvergált. Az ALPPS csoportban egyik időpontban sem volt kimutatható mérhető különbség a kontrollcsoporthoz viszonyítva. Ugyanakkor a 48. órában mért PGC1- α koncentráció szignifikáns mértékben alacsonyabbnak bizonyult a PVL csoportban mért értékhez képest ($p=0,040$) (17. ábra/A). A májszöveti NRF1 protein koncentrációja a kontrollcsoportéval összevetve szignifikánsan megnövekedett a PVL csoport esetében az első 3 posztoperatív napon. ALPPS esetében szignifikáns mértékű NRF1 koncentráció változás nem volt mérhető egyik vizsgálati időpontban sem. Ezek az eltérések együttesen szignifikáns különbségek kialakulásához vezettek a PVL és ALPPS csoportok között a 24., 48. és 72. posztoperatív órában (24h: $p=0,045$; 48h: $p=0,028$, 72h: $p=0,047$) (17. ábra/B). Az NRF2 esetében nem jelentkezett szignifikáns proteintartalom eltérés sem a kontrollcsoportokhoz képest, sem pedig az egyes kezelési modalitásokat egymáshoz viszonyítva (17. ábra/C). A májszövetből izolált mTFA koncentrációja mindkét állatcsoport esetében szignifikáns mértékű emelkedést mutatott a kontrollcsoportokhoz képest a 48. és 72. posztoperatív órában. Ezen felül az ALPPS csoport esetében 168 óra elteltével is szignifikánsan magasabb mTFA koncentráció volt mérhető a kontrollcsoporthoz képest (17. ábra/D). A teljes májszövetből izolált citokróm-c koncentrációjában egyik mérési időpontban sem bizonyult szignifikánsan különbözőnek a két állatcsoportot egymáshoz, vagy a kontroll értékekhez hasonlítva (17. ábra/E).



17. ábra: A mitokondriális biogenezis fehérjéinek változásai. A PGC1-A és NRF1 koncentrációi a műtéket követően szignifikánsan magasabbnak adódtak a PVL csoportban (A, B). Az NRF2, mTFA és teljes sejtlizátumból nyert citokróm c koncentrációban a két állatscsoport között nem mutatkozott szignifikáns különbség (C-E). *: $p < 0,05$ PVL vs. ALPPS. #: $p < 0,05$, ##: $p < 0,01$, ###: $p < 0,001$ vs. kontroll. Statisztikai próba: kétutas ANOVA, Bonferroni-féle post-hoc teszt. Az adatok átlag \pm SD formában kerülnek bemutatásra, $n=5$.

4.1.11. Mitokondriális proteintartalom változások

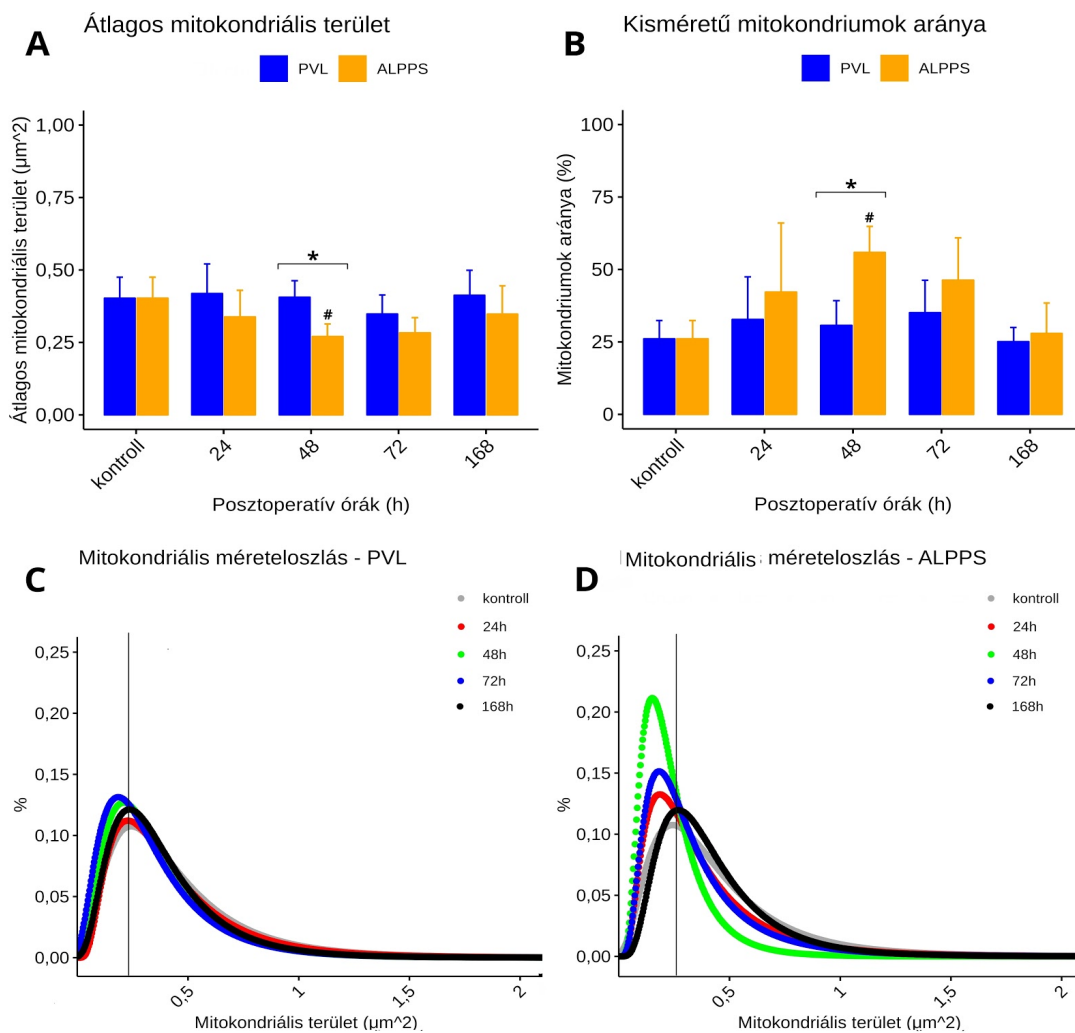
A mitokondriális izolátumokból mért mTFA koncentrációjában a PVL csoport esetében szignifikáns változás nem volt kimutatható a kontrollcsoporthoz képest. Ugyanezen változások mellett az ALPPS csoportban a kontroll értékekhez viszonyított statisztikai mértékű eltérés nem jelentkezett az mTFA intramitokondriális koncentrációjában. Mindezen proteintartalom eltérések miatt az ALPPS csoportban mért mTFA koncentráció a PVL csoporthoz képest szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkozott (48h: $p=0,002$, PVL vs. ALPPS, 72h: $p=0,028$ PVL vs. ALPPS) (18. ábra/A). A mitokondriális citokróm-c koncentrációja a PVL csoportban szignifikáns mértékben megemelkedett a kontroll értékekhez képest a posztoperatív 48. és 72. óra folyamán, valamint az ALPPS csoporthoz viszonyítottan szignifikánsan magasabb értékek voltak mérhetőek az első 3 posztoperatív napon (24h: $p=0,0012$; 48h: $p=0,0018$; 72h: $p<0,001$) (18.ábra/B).



18. ábra. Mitokondriális fehérjekoncentráció változások PVL-t és ALPPS-t követően. A mitokondriális mTFA koncentrációja a műtétet követő első 48 óra (A), a mitokondriális citokróm c koncentrációja az első 72 óra folyamán szignifikánsan magasabb volt a PVL csoportban (B). *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$ PVL vs. ALPPS, #: $p<0,05$, ##: $p<0,01$ vs. kontroll. Statisztikai próba: kétutas ANOVA, Bonferroni-féle post-hoc teszt. Az adatok átlag \pm SD formában kerülnek bemutatásra, $n=5$.

4.1.12. Mitokondriális méretváltozások

PVL-t követően a mitokondriális méret a kontrollcsoporthoz viszonyítottan egyik mérési időpontban sem mutatott szignifikáns mértékű eltéréseket. ALPPS esetében viszont a 48. posztoperatív órára az átlagos mitokondriális átmetszeti terület szignifikáns csökkenést mutatott a kontroll és a PVL csoportokhoz képest ($p=0,035$, PVL vs. ALPPS) (19. ábra/A). Ezzel egyidőben a 0,24 négyzetmikrométernél kisebb mitokondriumok arányában szignifikáns növekedést regisztráltunk a PVL és a kontrollcsoportokhoz képest ($p=0,032$, PVL vs. ALPPS) (19. ábra/B, C, D).

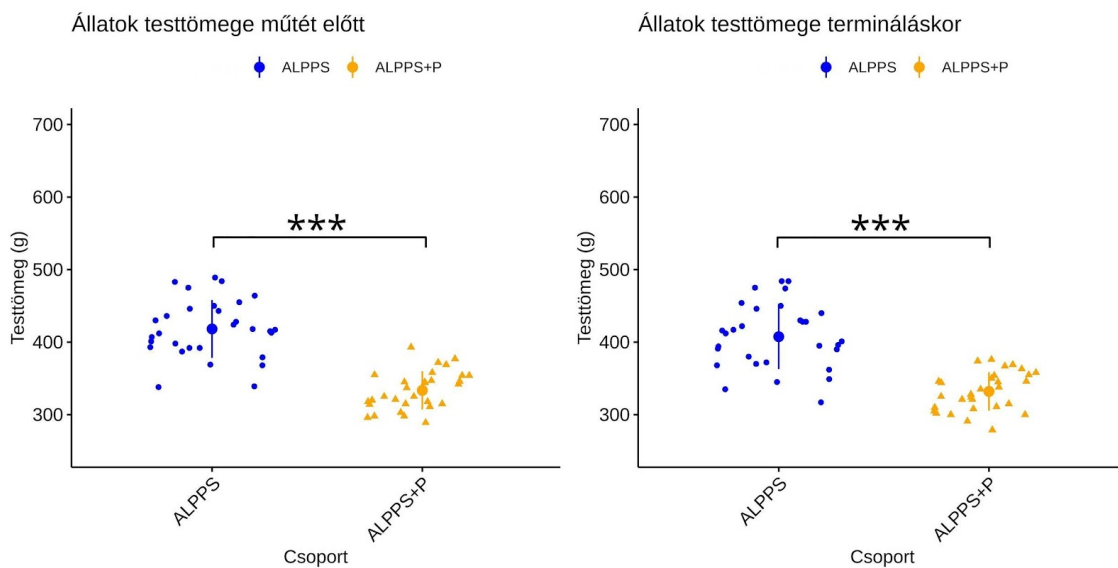


19. ábra. Mitokondriális méretváltozások. ALPPS-t követően 48 órával az átlagos mitokondriális terület szignifikánsan csökkent a PVL csoporthoz képest, míg ugyanezen időpontban szignifikánsan megnőtt a 0,24 négyzetmikrométernél kisebb mitokondriumok aránya. *: $p<0,05$ PVL vs. ALPPS, #: $p<0,05$ vs. kontroll. Statisztikai próba: kétutas ANOVA, Bonferroni-féle post-hoc teszt. Az adatok átlag \pm SD formában kerülnek bemutatásra, $n=5$.

II. kísérlet: A prehabilitáció hatásainak vizsgálata ALPPS-t követő májregeneráció során

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

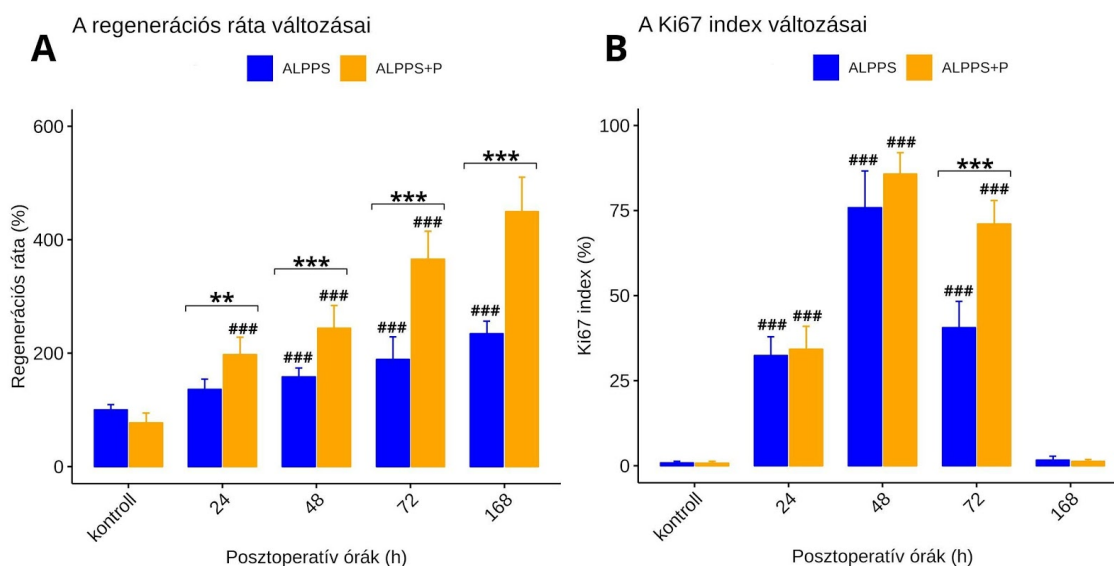
A fizikai felkészítésben részesült ALPPS+P állatok testtömege mind a műtétek előtt, mind pedig azok után szignifikánsan alacsonyabbnak adódott az ALPPS csoportban mért értékekhez képest ($p < 0,001$) (20. ábra).



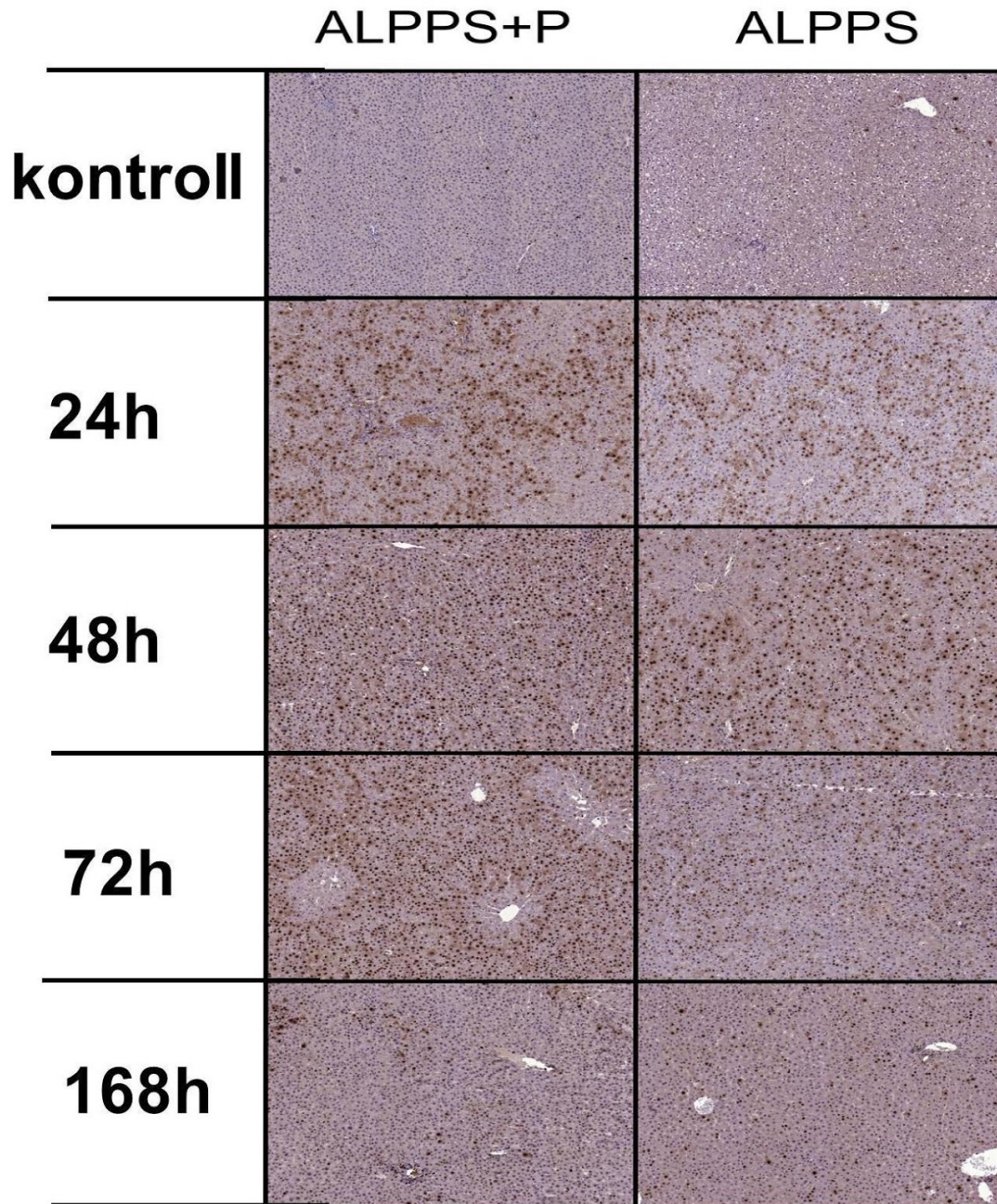
20 ábra: Az állatok testtömege mind műtétet megelőzően, mind pedig a termináláskor magasabbnak adódott a nyugodt körülmények között élő ALPPS csoportban az edzésben részesült ALPPS+P csoporthoz képest. ***: $p < 0,001$ ALPPS vs. ALPPS+P. Statisztikai próba: kétutas ANOVA, Bonferroni-féle post-hoc teszt. Az adatok átlag \pm SD formában kerülnek bemutatásra, $n=6$.

4.2.2. A fizikailag felkészített és nem felkészített, ALPPS műtéten átesett állatok RML lebenyeinek regenerációjára

Az ALPPS csoport esetében a regenerációs ráta a kontrollcsoporthoz képest szignifikáns emelkedést mutatott a 24. posztoperatív órától kezdve a felkészített csoport esetében a regenerációs ráta növekedése sokkal dinamikusabbnak bizonyult, amellyel így nem csak a kontrollcsoporthoz képest, de a fizikai felkészítésben nem részesülő, azonos időbeni csoporthoz képest is szignifikáns növekmény volt látható (24h: $p=0,012$, 48, 72 és 168h: $p<0,001$) (21. ábra/A). A Ki67 index az ALPPS és ALPPS+P csoportokban egyaránt szignifikáns emelkedést mutatott 24, 48 és 72 órával a műtétet követően, ugyanakkor az ALPPS+P csoportban a Ki67 pozitív sejtek száma a 72. órában szignifikánsan magasabb értékkel jelent meg az ALPPS csoporthoz viszonyítva ($p<0,001$) (21. ábra/B, 22. ábra).



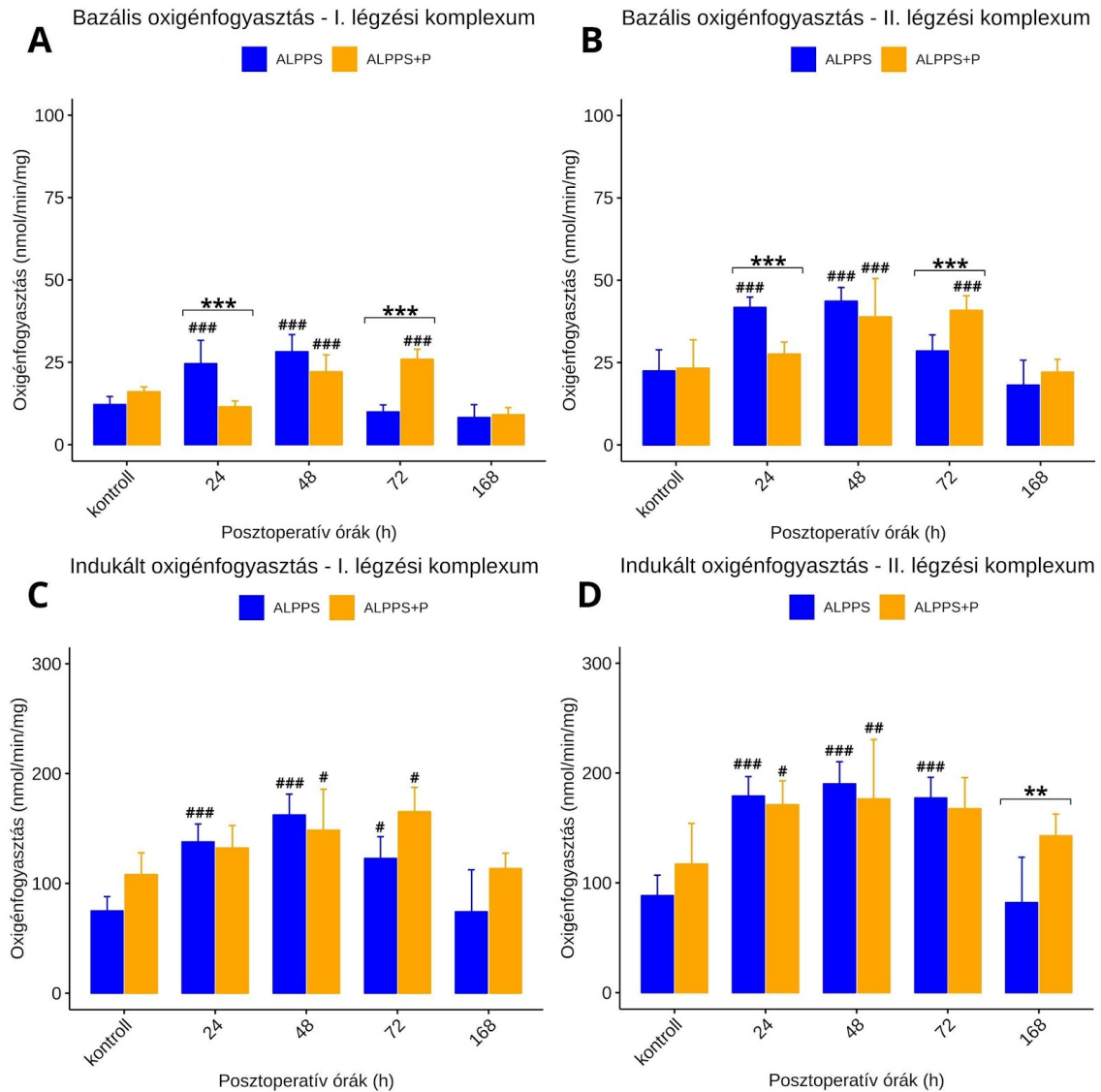
21.ábra: A regenerációs ráta és a Ki67 index változásai prehabilitációval és anélkül. A regenerációs ráta már 24 órával a műtétek után szignifikánsan magasabb értéket vett fel az ALPPS+P csoportban az ALPPS csoporthoz képest, mely különbség az utolsó mérési pontig fennállt (A). A Ki67 index mindkét állatscsoportban szignifikánsan megemelkedett, ugyanakkor az ALPPS+P csoportban még a 72. posztoperatív órá folyamán is rendkívül magas maradt (B). *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$ ALPPS vs. ALPPS+P, ###: $p<0,001$ vs. kontroll. Statisztikai próba: kétutas ANOVA, Bonferroni-féle post-hoc teszt. Az adatok átlag \pm SD formában kerülnek bemutatásra, $n=6$.



22. ábra: ALPPS és ALPPS+P állatokból nyert májmintákon végzett Ki67 immunhisztokémia reprezentatív képei.

4.2.3. Az oxigénfelhasználás változásai ALPPS-t követően fizikai felkészítésben részesült és nem részesült állatok esetében

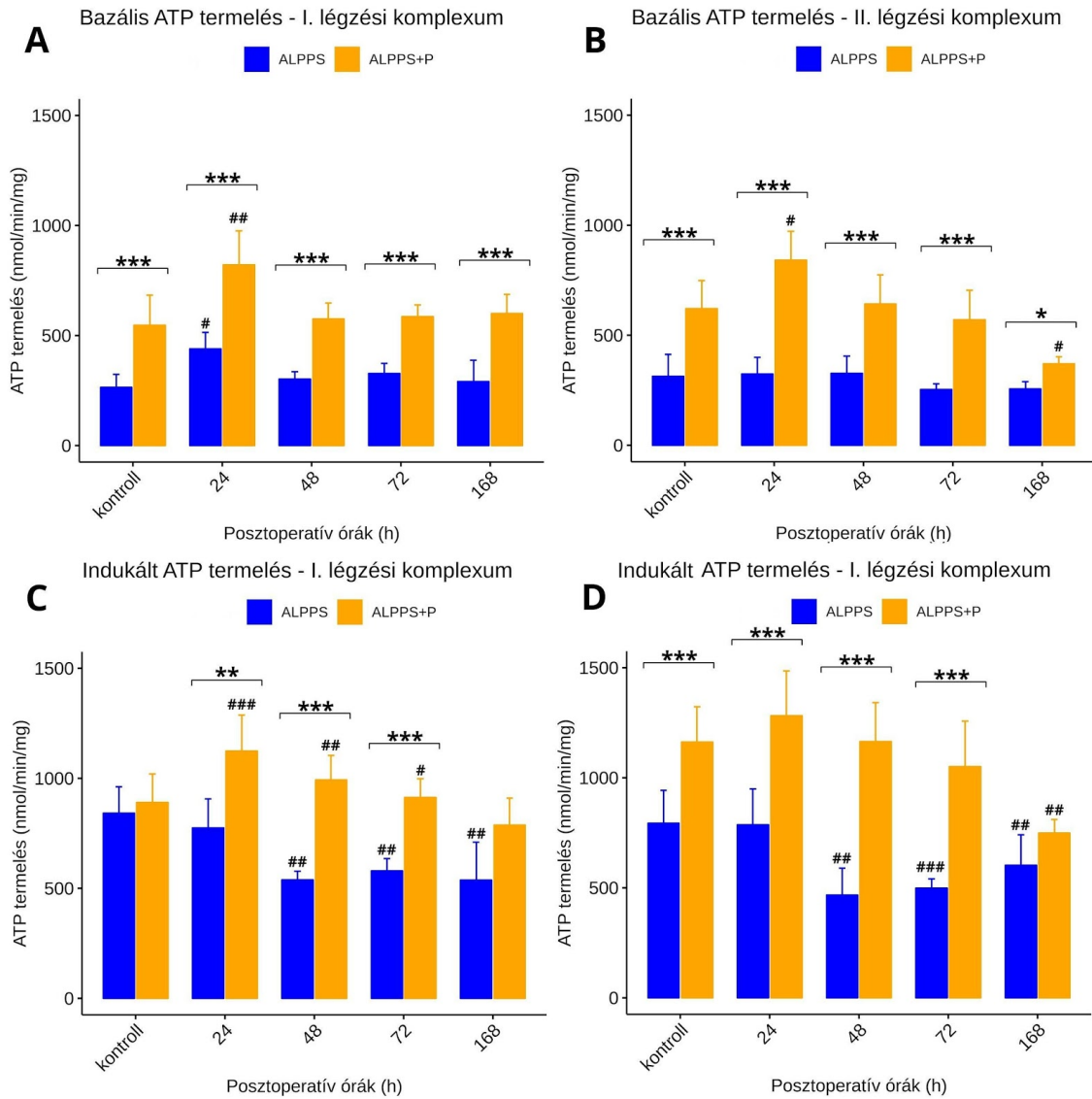
Az ALPPS állatcsoport esetében a CI bazális oxigénfogyasztása 24 és 48 órával a műtétet követően szignifikáns mértékben meghaladta a kontrollcsoport értékeit. Az ALPPS+P csoportban az oxigénfelhasználás a kontrollcsoportéhoz képest szignifikánsan megemelkedett a 48. és 72. posztoperatív órára. Mindezen változások eredményeképpen a 24. óra folyamán az ALPPS csoportban mért oxigénfelhasználás paradox módon szignifikánsan magasabbnak bizonyult az ALPPS+P csoportéhoz képest ($p < 0,001$), míg a 72. posztoperatív órára ez a reláció megfordult, és az ALPPS+P csoport egyedeiben volt mérhető szignifikánsan magasabb oxigénfogyasztás az ALPPS műtéten átesettekhez képest ($p = 0,027$) (23. ábra/A). A II. légzési komplex esetében hasonló tendenciákat figyeltünk meg a bazális oxigénfogyasztás változásait illetően. Az ALPPS csoport egyedeiben a kontrollcsoportéhoz képest szignifikánsan emelkedett a bazális oxidáció mértéke a 24. és 48. órára. Az ALPPS+P kezelt állatokban a II. légzési komplexen keresztüli bazális oxigén fogyasztás szignifikáns emelkedést mutatott a 48. és 72. órában a kontrollcsoport értékeihez képest. E változások eredményeként a 24. posztoperatív órában az ALPPS-on átesett, nem felkészített egyedek májából izolált mitokondriumok bazális CII oxigén felhasználása szignifikánsan magasabbnak bizonyult az ALPPS+P csoport értékeihez viszonyítva ($p < 0,001$). A 72. posztoperatív órára ez az arány megfordult a két csoport között, így a fizikailag felkészített csoportban szignifikánsan magasabb oxidációs értékek voltak mérhetőek a nem felkészített csoport értékeihez képest ($p = 0,007$) (23. ábra/B). Az indukált CI aktivitás esetében az ALPPS csoportban a kontrollcsoport értékeihez képest szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető a posztoperatív 24. és 48. óra folyamán. Az ALPPS+P egyedekben ugyancsak szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető (23. ábra/C). Az indukált CII oxigén fogyasztás esetében szignifikáns oxidáció-fokozódás jelentkezett az ALPPS csoportban a 24., 48., 72. óra folyamán, valamint a fizikai felkészítésben részesült állatok esetében a 48. óra során. A két állatcsoport között csak a 168. órában volt szignifikáns különbség az indukált CII oxigén felhasználási értékekben ($p < 0,01$) (23. ábra/D).



23.ábra. Az oxigénfogyasztás változásai ALPPS-t és ALPPS+P-t követően. Bazális funkció esetében először az ALPPS csoport értékei emelkedtek szignifikánsan mind a kontroll, mind pedig az ALPPS+P csoportokhoz képest, míg 72 óra elteltével ez az eltérés megfordult (A, B). Indukált funkció esetében mindkét állatscsoportban hasonló emelkedés ment végbe, de csoportok közötti szignifikáns különbség csak a II. komplexum esetében volt mérhető 168 órával a műtétek után (C, D). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ ALPPS vs. ALPPS+P, #: $p < 0,05$, ##: $p < 0,01$, ###: $p < 0,001$ vs. kontroll. Statisztikai próba: kétutas ANOVA, Bonferroni-féle post-hoc teszt. Az adatok átlag \pm SD formában kerülnek bemutatásra, $n=6$.

4.2.4. Az ATP termelés változásai ALPPS esetén fizikai felkészítést követően

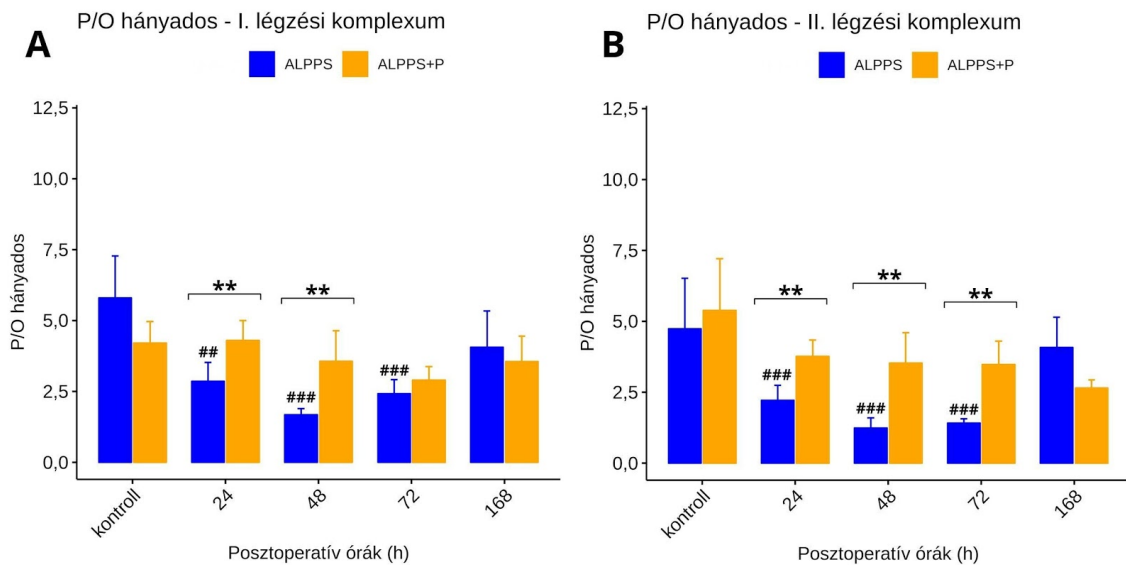
Az ALPPS esetében a posztoperatív 24. órában szignifikáns különbség volt kimutatható a bazális ATP termelés mértékében mindkét légzési komplex esetében (CI; $p < 0,001$, ALPPS vs. ALPPS+P valamennyi időpontban, CII; 0h, 24h, 48h és 72h: $p < 0,001$, 168h: $p = 0,015$) (22. ábra/A, B). Az indukált CI ATP termelés az ALPPS állatcsoport esetében a kontrollcsoporttal összevetve szignifikáns csökkenést mutatott a 48. és 72. majd 168. posztoperatív órában is. Az ALPPS+P csoport esetében a kontrollcsoportéhoz képest szignifikáns emelkedés volt tapasztalható a posztoperatív 24., 48. és 72. órában. Továbbá, ugyanezen állatcsoportban mért ATP termelés szignifikánsan magasabb értéket mutatott a csak ALPPS kezelt állatcsoportéhoz képest a posztoperatív 24. és 72. óra közötti intervallumban (24h: $p = 0,0019$, 48 és 72h: $p < 0,001$) (24. ábra/C). Az indukált CII ATP termelése nem mutatott szignifikáns eltérést a saját kontrollcsoport értékeihez képest a nem felkészített állatcsoportban. A fizikai felkészítésben részesült egyedekben mért indukált CII ATP termelés a kontroll és 72. óra közötti valamennyi mérési időpontban szignifikánsan magasabbnak mutatkozott a nem felkészített csoport értékeihez mérten ($p < 0,001$) (24. ábra/D).



24. ábra: Az ATP termelés bazális funkció esetében szignifikánsan magasabbnak adódott az ALPPS+P csoportban az ALPPS csoporthoz képest. Indukált állapotban hasonló tendenciákat figyeltünk meg, az I. légzési komplexum esetében a 24, 48 és 72 órával, II. komplexum esetén ezen felül a kontroll csoport értékek is szignifikánsan magasabbnak adódtak az ALPPS+P csoportban. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ ALPPS vs. ALPPS+P, #: $p < 0,05$, ##: $p < 0,01$, ###: $p < 0,001$ vs. kontroll. Statisztikai próba: kétutas ANOVA, Bonferroni-féle post-hoc teszt. Az adatok átlag \pm SD formában kerülnek bemutatásra, $n=6$.

4.2.5. A P/O (termelt ATP/fogyasztott oxigén) hányados változása prehabilitációban

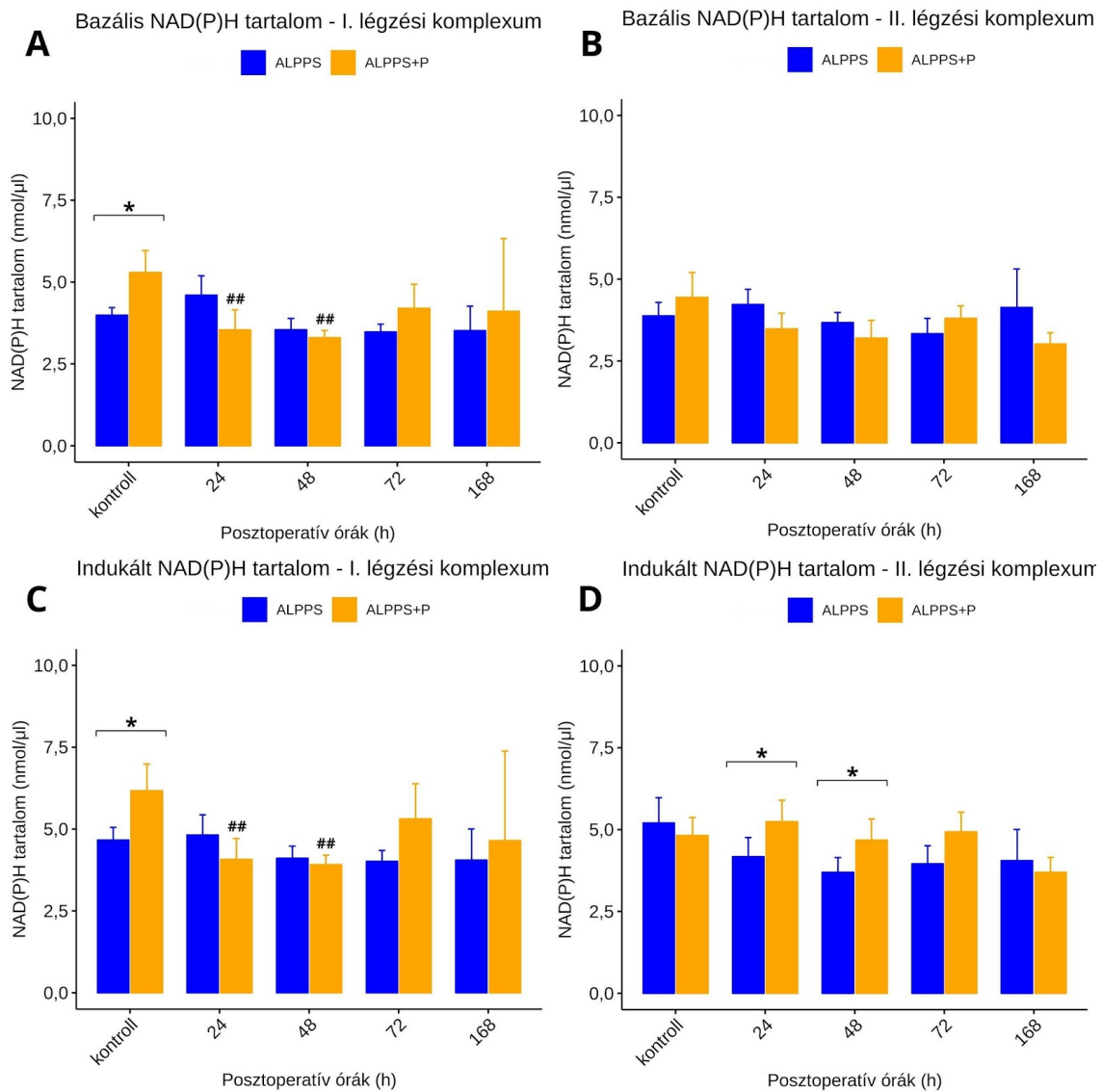
Az ALPPS csoportban a P/O arány a posztoperatív 24., 48. és 72. órában az I. és II. légzési komplex esetében is szignifikáns csökkenést mutatott a kontrollcsoporthoz képest. Az ALPPS+P csoport esetében a P/O arány stabil maradt, amelynek következtében az I. légzési komplex esetében a 24. és 48. posztoperatív órában (24h: $p=0,0039$, 48h: $p=0,0015$) (25. ábra/A) a II. légzési komplex esetén a 24., 48. és 72. órában szignifikánsan magasabb értékek voltak mérhetőek az ALPPS csoporthoz viszonyítva (24h: $p=0,0032$, 48h: $p=0,0012$, 72h: $p=0,0018$) (25. ábra/B).



25.ábra: A P/O hányados változásai. Az I. légzési komplexum P/O hányadosa szignifikánsan magasabbnak bizonyult az ALPPS+P csoportban 24 és 48 órával a műtétek után. A III. légzési komplexum esetében szintén az ALPPS+P csoport esetében volt szignifikánsan magasabb érték mérhető, ezáltal a 24, 48 és 72. posztoperatív órában. *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$ ALPPS vs. ALPPS+P, ##: $p<0,01$, ###: $p<0,001$ vs. kontroll. Statisztikai próba: kétutas ANOVA, Bonferroni-féle post-hoc teszt. Az adatok átlag \pm SD formában kerülnek bemutatásra, $n=6$.

4.2.6. A NAD(P)H egyensúly változásai rehabilitációt követően

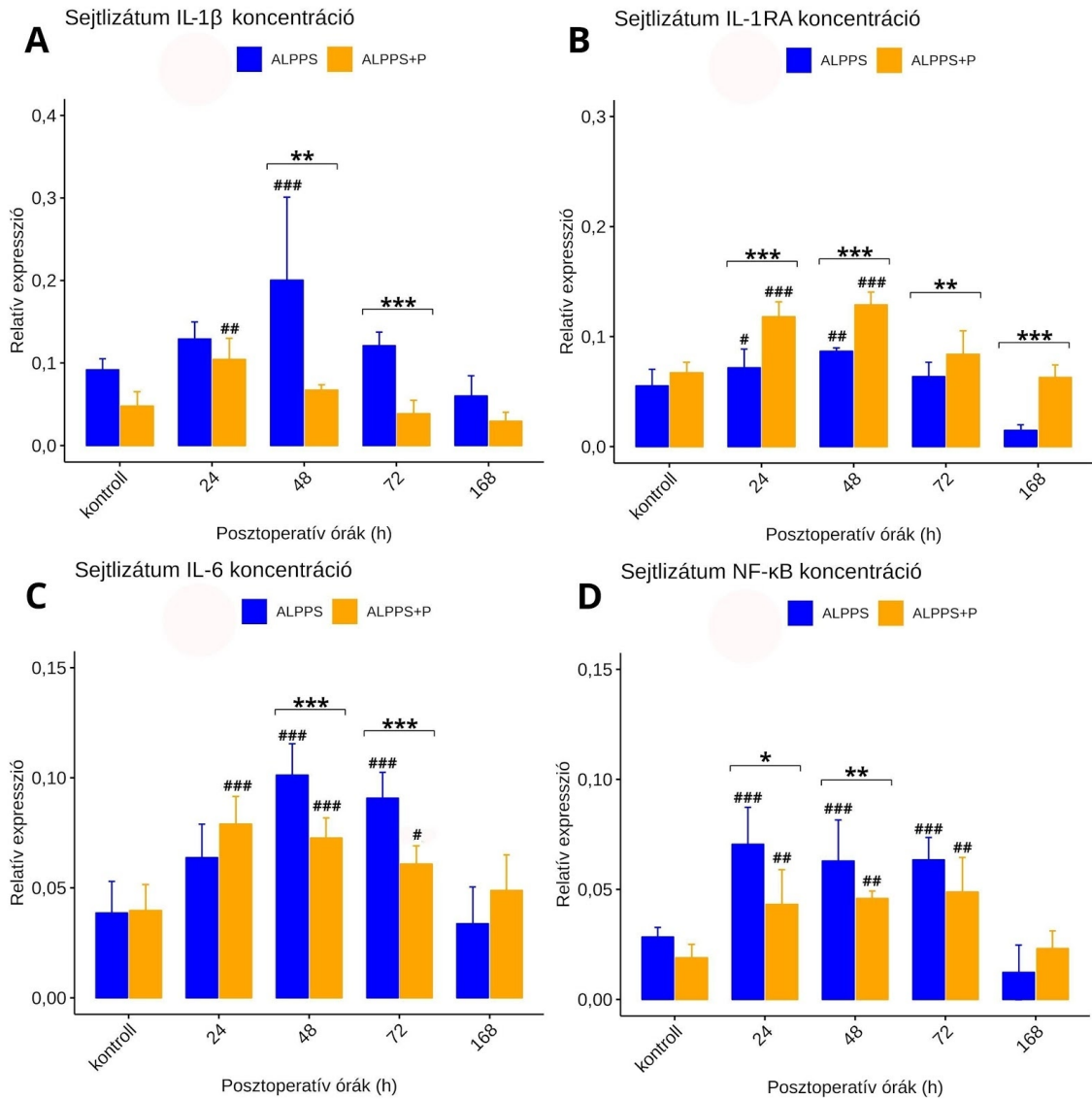
Bazális CI aktivitás alatt a mitokondriális NAD(P)H tartalom a kontrollcsoporthoz képest nem mutatott szignifikáns eltérést a fizikai felkészítésben nem részesült csoportban, míg a rehabilitációban résztvevő állatok esetében a kontrollcsoporthoz képest szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a posztoperatív 24. és 48. órában. Emellett kiemelendő, hogy a kontrollcsoportok esetében az ALPPS+P egyedeknél a mitokondriális NAD(P)H tartalom szignifikánsan magasabb volt a felkészítésben nem részesített állatokhoz képest ($p=0,033$) (26. ábra/A). A bazális CII aktivitás esetében mért NAD(P)H tartalomváltozások a kontrollcsoporthoz képest egyik vizsgált állatpopulációban sem bizonyultak szignifikáns mértékben eltérőnek. Ugyanakkor bazális CII működés esetében a posztoperatív 24. órában az ALPPS+P csoportban szignifikánsan magasabb NAD(P)H tartalom volt mérhető a csak ALPPS-ban részesült állatokban mért értékekhez képest ($p=0,037$) (26. ábra/B). Indukált CI aktivitás közben a bazális CI működés során látott változásokhoz hasonlóak voltak megfigyelhetőek. A fizikai felkészítésben nem részesülő állatcsoportok egyikében sem volt tapasztalható a kontrollcsoporttól szignifikánsan különböző NAD(P)H egyensúlybéli eltérés, míg a rehabilitált csoportban a posztoperatív 24. és 48. órában szignifikánsan alacsonyabb NAD(P)H koncentráció volt mérhető a kontroll értékekhez képest. Indukált CII aktivitás esetében ugyancsak szignifikánsan magasabb kontroll NAD(P)H koncentráció volt mérhető a fizikai felkészítésben részesült állatok esetében ($p=0,0032$) (26. ábra/C). Indukált CII aktivitáskor a bazális értékeknél esetében mértékhez hasonlóan egyik állatcsoport sem mutatott szignifikáns eltéréseket a kontrollcsoportjaikhoz viszonyítottan. Ugyanakkor a két állatcsoport között jelentős különbségek mutatkoztak. Indukált CII aktivitás esetében a fizikai felkészítésben részesült állatokban szignifikánsan magasabb NAD(P)H koncentráció volt mérhető a nem felkészített csoporthoz viszonyítva (24h: $p=0,040$, 48h: $p=0,046$) (26. ábra/D).



26.ábra: A NAD(P)H tartalom változásai rehabilitációt követően és anélkül. Az I. légzési komplexum esetében mind bazális és indukált funkció esetében szignifikánsan magasabbnak bizonyult a kontrollcsoportok értékeit összehasonlítva az ALPPS+p csoportban az ALPPS csoporthoz képest. A II. komplexum esetén indukciókor a posztoperatív 24. és 48. órában volt szignifikánsan magasabb NAD(P)H tartalom mérhető az ALPPS+P csoportban. *: $p < 0,05$, ALPPS vs. ALPPS+P, ##: $p < 0,01$, vs. kontroll. Statisztikai próba: kétutas ANOVA, Bonferroni-féle post-hoc teszt. Az adatok átlag \pm SD formában kerülnek bemutatásra, $n=6$.

4.2.7. Gyulladásos válaszreakció ALPPS-t és prehabilitációt követően

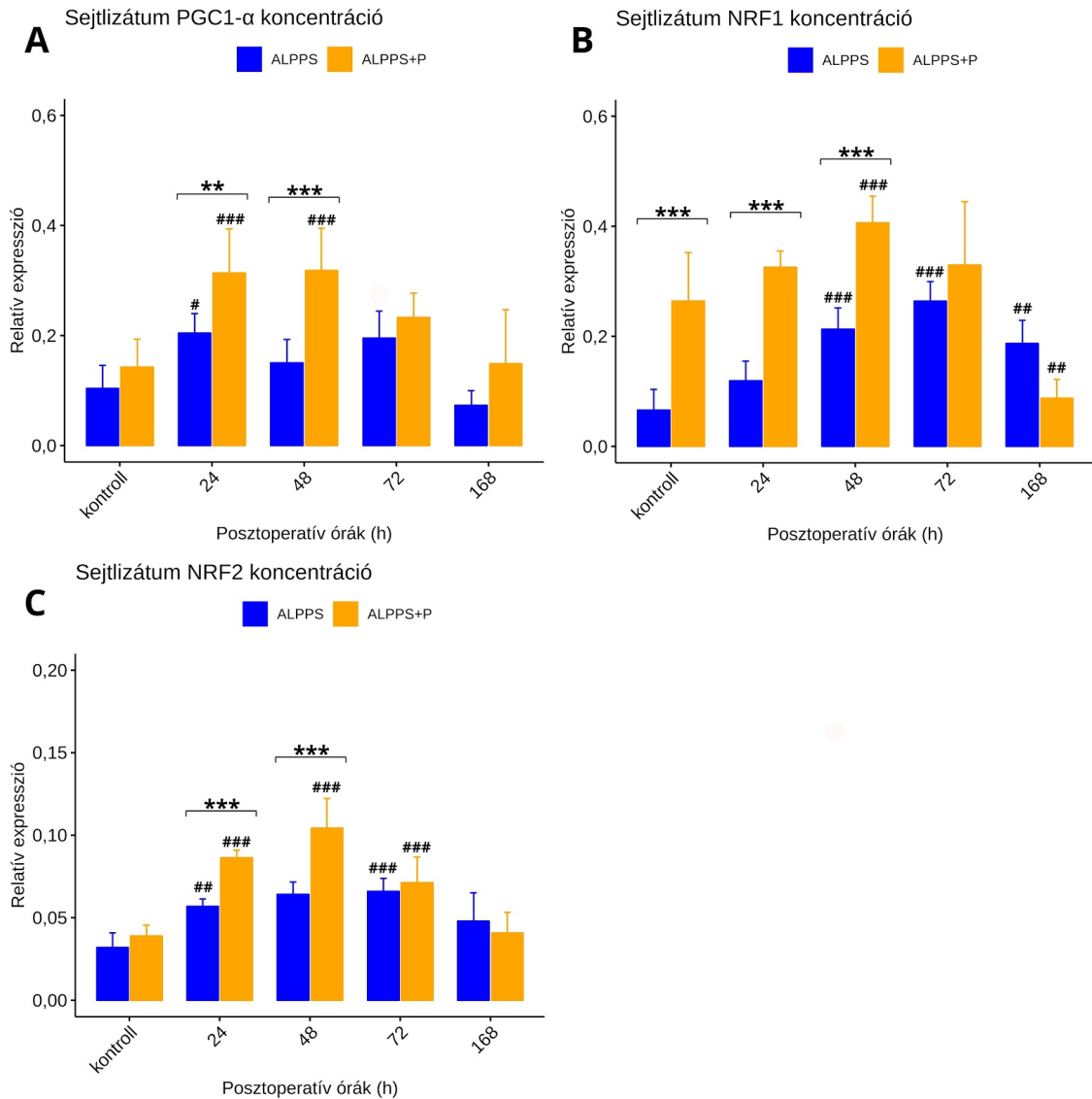
Az IL-1 β koncentrációja szignifikánsan magasabbnak mutatkozott az ALPPS csoportban az ALPPS+P csoporthoz hasonlítva a műtétek után 48 és 72 óra elteltével (48h: $p=0,0019$, 72h: $p<0,001$) (25. ábra/A). Az ALPPS+P csoportban a beavatkozásokat követően 24 és 48 órával szignifikáns mértékű IL-1RA koncentrációemelkedés volt megfigyelhető a kontrollcsoporthoz képest, valamint a 24. órát követően valamennyi vizsgált időpontban az ALPPS csoporthoz képest (24h, 48h és 168h: $p<0,001$, 72h: $p=0,0042$). 48 órával az ALPPS csoportban az IL-1RA szöveti koncentrációja szignifikáns mértékben növekedett a kontrollcsoporthoz képest (27. ábra/B). Az IL-6 koncentráció változásai hasonló kinetikát mutattak. ALPPS-t követően szignifikáns mértékű koncentrációnövekedés volt megfigyelhető a kontrollcsoporttal szemben 24, 48 és 72 óra elteltével. Az ALPPS+P csoporttal szemben 48 és 72 órával a műtétek után ugyancsak szignifikánsan magasabb IL-6 koncentrációk voltak mérhetőek a csak ALPPS kezelt állatokban ($p<0,001$) (27. ábra/C). Az NF- κ B P65 koncentrációja mindkét állatcsoportban megemelkedett a kontrollcsoportokhoz képest 24, 48, és 72 órával az operációk után, ugyanakkor a 24. és 48. órában az ALPPS csoport értékei szignifikánsan magasabbak voltak az ALPPS+P csoporténál (24h: $p=0,035$, 42h: $p=0,004$) (27. ábra/D).



27. ábra: A gyulladásos válaszreakció változásai prehabilitációt követően, valamint anélkül. Az IL-1 β koncentrációja az ALPPS csoportban szignifikánsan magasabbnak adódott 48 órával a műtét után (A). Az IL-1RA koncentrációja az ALPPS+P csoportban a 24 posztoperatív órától kezdődően szignifikánsan magasabb volt, mint az ALPPS csoportban (B). Az IL-6 koncentrációja az ALPPS csoport esetében szignifikánsan magasabbnak bizonyult az ALPPS+P csoportban az ALPPS csoporthoz képest (C). Az NF- κ B koncentrációja a posztoperatív 24 és 48. órában szignifikánsan magasabbnak bizonyult az ALPPS csoportban a prehabilitált csoporthoz képest (D). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ ALPPS vs. ALPPS+P, #: $p < 0,05$, ##: $p < 0,01$, ###: $p < 0,001$ vs. kontroll. Statisztikai próba: kétutas ANOVA, Bonferroni-féle post-hoc teszt. Az adatok átlag \pm SD formában kerülnek bemutatásra, $n=6$.

4.2.8. A rehabilitáció hatásai a mitokondriális biogenezisre ALPPS kezelt állatcsoportokban

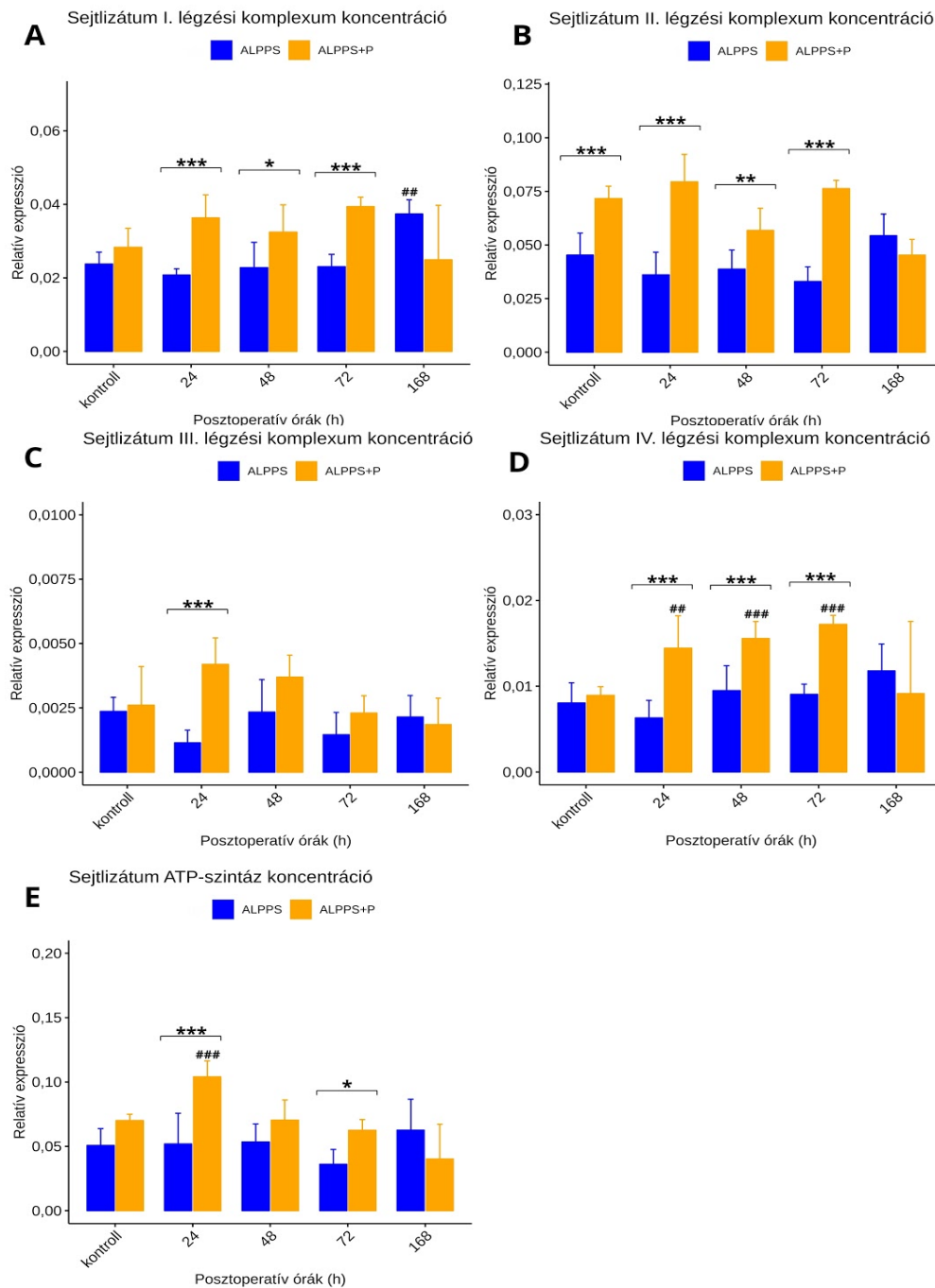
ALPPS-t követően a teljes sejtlizátum PGC1- α tartalma a kontrollcsoport értékeihez képest csupán a posztoperatív 24. órában mutatott szignifikáns változást. Az ALPPS+P csoportban PGC1- α koncentrációja viszont a 24. és 48. órában is szignifikánsan magasabbnak bizonyult a saját kontrollcsoportjának értékeihez képest, illetve ugyanezen időpontokban az ALPPS csoportban mérhető értékekhez hasonlítva is (28. ábra/A). A teljes sejtlizátumból mért NRF1 tartalom hasonló kinetikával változott. Az ALPPS csoportban az NRF1 koncentrációja emelkedettnek bizonyult 48, 72 és 168 órával a műtétek után. Az ALPPS+P csoport egyedeiben a kontroll, illetve a 24. 48. posztoperatív órában mért értékek magasabbnak mutatkoztak az ALPPS csoportban mérhető értékekhez képest ($p < 0,001$) (28. ábra/B). Az NRF2 koncentrációja az ALPPS csoportban a műtéteket követően 24, 48 és 72 órával szignifikáns emelkedést mutatott a kontrollcsoporthoz képest. Az ALPPS+P csoportban úgyszintén, ugyanezen időpontokban szignifikáns NRF2 koncentrációemelkedés volt megfigyelhető a kontrollcsoporthoz képest, amely a 24. és 48. órában szignifikáns mértékben meghaladta az ALPPS csoportban mért értékeket ($p < 0,001$) (28. ábra/C).



28.ábra: A mitochondriális biogenezis változásai ALPPS-t követően prehabilitációval és anélkül. A sejtlizátum PGC1- α tartalma szignifikánsan megnőtt az ALPPS+P csoportban a kontroll és az ALPPS értékekhez képest is 24 és 48 órával a műtétet követően (A). A sejtlizátum NRF1 tartalom az ALPPS+P csoportban magasabbnak adódott az ALPPS csoporthoz képest a kontrollcsoportokban, valamint az első 3 posztoperatív napon (B). Az NRF2 esetében szignifikáns csoportok közti különbség volt mérhető 24 és 48 órával a műtétet követően (C). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ ALPPS vs. ALPPS+P, #: $p < 0,05$, ##: $p < 0,01$, ###: $p < 0,001$ vs. kontroll. Statisztikai próba: kétutas ANOVA, Bonferroni-féle post-hoc teszt. Az adatok átlag \pm SD formában kerülnek bemutatásra, $n=6$.

4.2.9. A prehabilitáció légzési komplex szintézisre gyakorolt hatásai

A teljes sejtlizátumok I. légzési komplexum tartalma az ALPPS csoportban csupán a 168. órában mutatott szignifikáns emelkedést a kontrollcsoporthoz képest. Az ALPPS+P csoportban ennek a légzési komplexumnak a koncentrációja nem mutatott változást a saját kontrollcsoportjához viszonyítottn, ugyanakkor szignifikánsan magasabbnak bizonyult az ALPPS csoport értékeinél 24, 48, és 72 órával a műtétet követően (24h és 72h: $p < 0,001$, 48h: $p = 0,038$) (29. ábra/A). A II. légzési komplexum koncentrációinak változásában hasonló dinamika volt megfigyelhető azzal a különbséggel, hogy ennek az enzimkomplexumnak a protein koncentrációja már a kontrollcsoportok összehasonlításakor is szignifikánsan magasabb értéket mutatott az ALPPS csoportban (kontroll, 24h és 72h: $p < 0,001$, 48h: $p < 0,01$) (29. ábra/B). A III. légzési komplexum oxidoreduktáz koncentrációinak vizsgálatokor egyik állatcsoportban sem jelentkezett szignifikáns eltérés a kontrollcsoportokhoz képest, ugyanakkor az ALPPS csoportban 24 óra elteltével szignifikánsan alacsonyabb koncentrációk voltak mérhetőek az ALPPS+P csoporthoz képest ($p < 0,001$) (29. ábra/C). A IV. légzési komplexum koncentrációja az ALPPS csoportban a műtétet követően nem mutatott eltérést a kontrollcsoporttal összevetve. Az ALPPS+P csoport esetében a kontrollcsoporthoz képest szignifikáns mértékű növekedés volt látható a műtétet követő 24., 48. és 72. óra folyamán. Ugyanezen időpontokban az ALPPS+P csoport értékei szignifikánsan meghaladták az ALPPS csoportét (24h, 48h és 72h: $p < 0,001$) (29. ábra/D). Az ATP-szintáz vizsgálatokor az ALPPS csoportban szignifikáns változás nem volt kimutatható. Az ALPPS+P csoportban a 24. posztoperatív órában szignifikáns növekedés volt detektálható a kontrollcsoport értékeihez képest. A két állatcsoportot összehasonlítva az ALPPS+P csoportban mérhető koncentráció értékek szignifikánsan magasabbak voltak az ALPPS csoportban mérhetőkhöz képest 24 és 72 órával a műtétet után (24h: $p < 0,001$, 72h: $p = 0,028$) (29. ábra/E).



29.ábra: Az OXPHOS enzimek változásai. Az I. légzési komplexum koncentrációja szignifikánsan megemelkedett az ALPPS+P az ALPPS csoporthoz képest csoportban az első 3 posztoperatív napon (A). A II. komplexum esetében a kontroll csoportban és az első 3 posztoperatív napon tapasztaltunk hasonló tendenciákat (B). A III. komplexum esetében csak az 1. posztoperatív napon láttunk csoportok közti különbséget (C). A IV. komplexum esetében az első 3 posztoperatív napon volt magasabb érték mérhető az ALPPS+P csoportban az ALPPS csoporthoz képest (D). Az ATP szintáz koncentrációja szignifikánsan magasabbnak bizonyult az ALPPS+P csoportban az ALPPS csoporthoz képest a 24. és 72. posztoperatív órában. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ ALPPS vs. ALPPS+P, #: $p < 0,05$, ##: $p < 0,01$, ###: $p < 0,001$ vs. kontroll. Statisztikai próba: kétutas ANOVA, Bonferroni-féle post-hoc teszt. Az adatok átlag \pm SD formában kerülnek bemutatásra, $n=6$.

5. Megbeszélés

Jelen korunkban a máj tumoros megbetegedéseinek kezelése esetében – az onko-és radioterápiás modalitások rohamos fejlődése ellenére – továbbra is a sebészi eltávolítás az, amely a legjobb hosszútávú kimenetellel kecsegtet (149). Ugyanakkor, a daganatok visszamaradó tumor-reziduumok nélküli, “tisza széllel” történő kimetszésének következtében akár extrém parenchyma veszteség is kialakulhat. Bár a máj szintetikus, detoxikáló és kiválasztó kapacitása is jelentősen meghaladja a test fenntartásához szükséges szintet, kiterjesztett hepatektómiák esetén mégis előfordulhat, hogy a visszamaradó májszövet mennyisége (és egyben funkciója) elégtelenné válik és SFSS alakul ki. Ezen megfigyelés alapján látható, hogy májreszekciók esetében a visszamaradó parenchyma volumene erős, független limitáló tényezője az elvégezhető műtéti beavatkozásoknak (5). Ennek fényében számos eljárás született a reszekálhatóság kiterjesztésére, valamint biztonságosabbá tételére. Ezek közül az ALPPS a legújabb, egyben jelenleg az egyik legradikálisabb megoldásként nevesíthető (10). Bár a rendkívül gyors és nagymértékű regenerációra visszavezethető előnyei vitathatatlanok, sajnos az eddig alkalmazott kétlépcsős hepatektómiák közül mégis a legkockázatosabb (14, 150).

A 2007-es bemutatását követően egészen 2012-es első „hivatalos” bejelentéséig viszonylag kevés ALPPS műtétet hajtottak végre. Kezdetben igen nagy lelkesedés övezte az eljárást, ami az első szövődményekről és mortalitásról szóló közlemények megjelenésével gyorsan alábbhagyott, és sok esetben mélyen megosztóvá vált a prominens májsebészeti iskolák között (10, 12, 31, 150–152). A későbbiekben rengeteg módosítást és javallati rendszert dolgoztak ki annak érdekében, hogy a rendkívül kedvezőtlen, szövődmény- és betegvesztési mutatókat kedvezően befolyásolják (34). A technikai módosításokat illetően egyértelmű tendencia látszik. Az ALPPS valamennyi biztonsági megfontolású változtatásával az első műtét invazivitásának csökkentésével, és így a regeneráció terhe mellett fellépő műtéti megterhelés mérséklésével kívánták a kedvezőtlen hatásokat kiküszöbölni, több-kevesebb sikerrel (32, 153–155). Ezen felül 2015-ben az első ALPPS konszenzus konferencián egy rendkívül szigorú javallati- és

betegszelekciós rendszert hoztak létre (35, 156). Ennek eredményeként a műtéti invazivitás csökkentésével, és a műtétre alkalmas betegek szigorú szűrésével már jelentős mértékben mérséklődött a sebészi stratégia korai morbiditási és mortalitási rátája (37). Ugyanakkor megjegyzendő, hogy még ezek a mutatók is elfogadhatatlanul magasak, valamint bebizonyosodni látszik, hogy az ALPPS inkább egy egzotikus, többnyire csak speciális esetekben alkalmazandó eljárás, amely részét kell képezze a személyre szabottan választható terápiának (34, 36, 38, 156).

Az ALPPS első és különösen második műtéte idején fontos a máj funkcionális kapacitásának pontos ismerete (15, 17). A 2015-ös ALPPS konszenzus konferenciát követően számos kutatási program indult annak felderítésére, hogy a klinikumban alkalmazott vizsgálómódszerekkel kimutatható-e olyan májfunkció változás, amely magyarázatául szolgálhat a nyugtalanítóan magas mortalitási és morbiditási mutatókra. Ezekből a vizsgálatokból származó ismertetések közül a legnyugtalanítóbb a de Santibañes és munkatársai által 2017-ben kiadott értekezés, amelyben megállapítják, hogy ALPPS esetében a májvolumennel korrigált májfunkció közel 50%-os elmaradást mutat a visszamaradó parenchyma tömegnövekedéséhez képest (15, 17). Ehhez hozzátéve azt a tényt, hogy a vizsgálatok alapjául szolgáló funkciómérések az csak I. és II. műtétet megelőzően készültek, valószínűsíthető, hogy ALPPS alkalmazása esetén a két beavatkozás közötti regeneráció alatt létrejön egy rövid, ám a beteg számára annál nagyobb veszélyt jelentő, aktívan ez idáig nem vizsgált időablak, amikor a máj volumene már megfelelő méretű, ugyanakkor funkciója a túléléshez elégtelen.

A jelen dolgozatban bemutatott kísérletek elsősorban a funkcionális regenerációban bekövetkező defektus létrejöttének és a következményes magas mortalitás és morbiditás lehetséges okainak felderítésére irányultak. A máj szerteágazó biológiai funkcióinak fenntartása, valamint regenerációja extrém mértékben energiaigényes folyamatok, amelyek effektív végbemeneteléshez nagy mennyiségű ATP előállítására van szükség (157). Komplex eukarióta sejtekből felépülő szervnek megfelelően a működéshez szükséges energia túlnyomó része az oxidatív foszforiláció során keletkezik, az egyéb, ATP termeléssel járó folyamatok a máj esetében csupán kis jelentőséggel bírnak (157). Az érdekes megfigyelés, miszerint ALPPS esetében

tapasztalt magas a PHLF incidenciája, mely egyben felveti, hogy az így előidézett, gyors májregeneráció egyben a májszövet súlyos energetikai válságát okozhatja (158, 159). Az elmúlt évek során számos kísérletet végeztek az ALPPS által indukált májregeneráció hátterének feltérképezésére (77, 78, 160). Ugyanakkor e vizsgálatok többnyire a technika előnyeire és lehetséges háttérmechanizmusaira, mintsem káros hatásainak felderítésére irányultak, sejtenergetikával foglalkozó átfogó, kísérletes tanulmány pedig ez idáig nem készült (77, 160–162). A jelen dolgozatban bemutatott kísérletek célja a máj sejtenergetikai változásainak vizsgálata volt, a mitokondriális funkció, morfológia és biogenezis változásainak részletes vizsgálatán keresztül.

Az ALPPS egy különleges sebészi stratégia, mind hatását, mind pedig feltalálásának és alkalmazásának történetét tekintve. A megalkotását körülölgő átütő lelkesedéstől, egészen a betegveszteséget és morbiditást övező megosztottságon és vitákon keresztül egészen a jelen kori konszenzus általi “megújításáig” hosszú út vezetett (35, 37). Ennek részét kellett és kell, hogy képezzék azon kísérletes modellek amelyek alkalmasak az emberi szervezetben végbemenő változások pontos modellezésére. Sajnálatos módon ez rendkívüli kihívás, így a jelen dolgozatban bemutatott vizsgálatokat is kiterjedt modellalkotás kellett, hogy megelőzze.

Az ALPPS vizsgálatokor több, egymással összefüggő tényezőt kell összehangolni. Humán esetében ALPPS-t alkalmazva egy vérkeringését tekintve szeparált lebenyt, vagy májrészletet hoznak létre, amelyen egyben rendkívül erős proliferációs stimulusk is kifejtik hatásukat. Ennek megfelelően egy ideális állatmodellben -akárcsak ember esetében- a regenerálódó májlebenynek rendelkeznie kell egy portális, egy artériás bemenettel és egy vénás elvezetéssel (41, 163). Emellett az in situ parenchyma tanszsekción alkalmazásakor széles metszési síkkal kell dolgozni, mely által átmetszésre kerülnek a porto-portális anasztomózisok, valamint erős gyulladásos válaszreakció indukálódik. Megfelelő esetben egy harmadik tulajdonságot is figyelembe kell venni, mégpedig azt, hogy a felhasznált élőlény fiziológiailag álljon közel az emberhez (74, 75). Míg az első tulajdonság a vérkeringés változásainak pontos modellezésére szolgál, addig a második, a humán esetben is megfigyelt intenzív gyulladásos válaszreakció kiváltására, valamint a kolletáris hálózat átvágásának

szimulálására használható fel. A kísérletek során a Semmelweis Egyetem, I.sz. Sebészeti Klinikájának Kísérletes Sebészeti Részlegében kifejlesztett ALPPS és PVL patkánymodelleket használtuk (75). Kísérletes rágcső modellünkben több kritérium is teljesül, valamint más kutatócsoportok (Yao, Dhar, Schlegel, Garcia-Pérez, vagy Wei és munkatársai) által alkalmazott eljárásokkal ellentétben, esetünkben nem került sor addicionális lebenyreszekcióra, így a máj össztömegének megváltoztatásával járó további interferenciát nem okozunk a regeneráció folyamatában (75, 77, 162, 164). Emellett az általunk portális keringésben hagyott parenchyma mennyisége a teljes májvolumen 20-23%-a, így a humán esetben határesetinek tartott FLR mérettel dolgozunk. Sajnos humán és patkány között jelentős fiziológiai különbségek vannak, így kisállatokban nem minden aspektus modellezhető, ugyanakkor a dolgozatban bemutatott vizsgálatok tárgyát képező folyamatok és mediátorok meglehetősen ősiek, és gerincesek között jól konzerváltak, így egyes részleteikben is jól megfeleltethetőek az emberi szervezetben megfigyelt és végbemenő folyamatoknak, (75, 102, 110, 165, 166).

Az I. kísérletsorozatban az ALPPS kezelt állatokban gyorsabb és nagyobb fokú májregeneráció zajlott a PVL műtéten átesett egyedekhez viszonyítva, amely már az első posztoperatív napot követően szignifikáns különbséget eredményezett a két csoport esetében mérhető lebenytömeg változások között. Ezekkel az eredményekkel egybevetve az ALPPS kezelt állatok regenerálódó lebenyeiben szignifikánsan magasabb Ki67 index volt mérhető 24 és 48 órával a műtétet követően. Ennek megfelelően feltételezhető, hogy az ALPPS során megfigyelhető szignifikánsan dinamikusabb májlebeny-volumennövekedés nem passzív folyadék akkumuláció (ödéma) következménye, hanem sejtes regeneráció eredményeként létrejövő tömegnövekedés.

Ezek, a kutatásunk során észlelt megfigyelések nagymértékben megegyeznek az irodalomban eddig közölt eredményekkel (28, 77, 160, 162, 167). Ugyanakkor megjegyzendő, hogy az általunk alkalmazott modellek esetében a Ki67 index már a 24. órában igen erőteljes emelkedést mutatott az ALPPS kezelt csoportokban, míg az irodalomban a Ki67 index csúcsa inkább a 48. óra környékén jelentkezik.

Ennek több magyarázata is lehet. Egyfelől, az I. kísérletben kis testtömegű, fiatal felnőtt egyedek kerültek felhasználásra. Ebben az életkorban a patkányok test- és szervtömegei még exponenciálisan növekednek, valamint ebben az időszakban kifejezetten erőteljes a növekedési faktorokra adott válasz (168). Az irodalomban fellelt kísérletek ennél valamelyest idősebb állatokat használtak, illetve más patkánytörzseket, amelyek esetleg eltérő növekedési ütemmel bírhatnak. A másik kézenfekvő magyarázat, hogy az általunk használt Ki67 antitest epitópja egy, már korán megjelenő fehérje fragment, így a sejtciklusba lépés korai fázisában is igen erőteljes reakciót ad. Ugyanakkor kihangsúlyozandó, hogy a Ki67 pozitív reakció önmagában nem jelöl definitív sejtosztódást, ám a rendkívül dinamikus lebenytömeg-növekedést figyelembe véve indokolt lehet a nagyfokú reaktivitás (169).

Annak magyarázatára, hogy mi váltja ki ezt a rendkívüli mértékű volumennövekedést, számos elmélet született. Az eddig publikált kísérletes eredmények alapján kiemelkedő szereppel bírhat a gyulladással járó hiperaktivitása (67, 77, 78, 160, 161). Az ez irányú kutatásokból kiderül, hogy ALPPS-t követően a májparenchymában, valamint a szérumban is szignifikáns mértékű TNF- α és IL-6 koncentráció emelkedést figyeltek meg. E munkák közül külön kiemelkedőek Schlegel, valamint Shi publikációi, melyek szerint a nagymértékű lokális gyulladással arányosan fokozódik a máj kinetikus növekedési rátája. A jelen kísérletek során a két szerző által publikált eredményekhez hasonlókat kaptunk, így feltételezhető, hogy az általunk alkalmazott modellben is hatással volt a gyulladással járó mediátorok nagyobb mértékű felszabadulása a regeneráció folyamatára (73, 77, 78).

Az ALPPS több hepatocytát „kényszerít” sejtciklusba lépésre, ezáltal szignifikánsan nagyobb fokú szöveti expanziót okoz (74, 77). Ugyanakkor az utóbbi évek során számos kutatócsoport számolt be a máj funkcionális regenerációjának jelentős mértékű elmaradásától, amely egyes kutatócsoportok szerint akár a volumen növekedéséhez képest 50%-kal is alacsonyabb lehet (9, 170, 171). Ezt az állítást látszik alátámasztani az a megfigyelés, miszerint az ALPPS-t követő leggyakoribb posztoperatív halálok a PHLF, ami egyben erős indikátora annak, hogy bizonyos esetekben a visszamaradó parenchyma térfogata már megfelelő, ám a máj funkcionális

kapacitása nem elegendő a test egészének kiszolgálására (15, 16, 172). Mivel a máj regenerációjának számos folyamata rendkívül energiaigényes, nem zárható ki, hogy a fentebb leírt funkcióvesztés és az ALPPS-t követő maladaptív folyamatok – és végső esetben az ezekből kialakuló következményes PHLF – hátterében a hepatocyták belső energiatermelésének súlyos károsodása áll.

Mivel a mitokondriális oxidatív foszforiláció (OXPHOS) felel a regenerációban résztvevő, polarizálódó és osztódó májsejtek energiaellátásáért, a jelen dolgozatban bemutatott kísérleteink során célul tűztük ki ennek vizsgálatát az ATP termelés, O₂ fogyasztás, ROS termelés és NAD(P)H egyensúly vizsgálatán keresztül.

Kutatómunkánk fókuszában, elsősorban az I. és II. légzési láncot alkotó fehérjekomplexumok vizsgálata állt. Ennek oka kettős. Egyfelől e nagyméretű, összetett fehérjék képezik az OXPHOS egyedüli légzési szubsztrát belépési pontjait. Ennek következtében bármilyen károsító hatás, amely ezeket a láncalkotókat érinti, jelentős mértékben visszaveti az egész terminális oxidáció kimeneti teljesítményét (energia-outputját) (173). Másfelől, ez a két légzési komplex az, amelyet külön-külön is nagy pontossággal lehet vizsgálni. Ennek oka a terminális elektrontranszport-lánc felépítésében keresendő, mivel az egyes láncalkotók – az I. és II. komplexet kivéve – egymással kapcsoltan helyezkednek el. Azaz a III. és IV. légzési komplexumok kimeneti teljesítménye, aktivitása, csakis az I. és/vagy II. légzési láncalkotóval kapcsoltan vizsgálható és izolált funkcionális értékelésük így nem lehetséges a mitokondriumok integritásának megbontása nélkül (166, 174).

Az I. és II. légzési láncalkotó vizsgálata során bazális (state 4) és indukált (state 3) funkciómeghatározást végeztünk. Ennek oka, hogy ez a két mitokondriális légzési állapot feleltethető meg legjobban ezen organelumok normális (sejten belüli) működési formájának (148, 173). Bazális aktivitás során a mitokondrium kizárólag az endogén szubsztrátjait használja fel, ennek megfelelően a bazális funkció elemzés az OXPHOS előtöltő mechanizmusairól ad információt. Az indukált állapotban a mitokondriális légzés és energiatermelés maximumának vizsgálata végezhető el. Az így végzett

mérésekkel az OXPHOS épsége és maximális funkcionális kapacitása számszerűsíthető (174).

PVL-t követően a bazális és indukált O_2 fogyasztás, valamint ATP termelés is szignifikáns növekedést mutatott a 24. és 72. posztoperatív órák között. Figyelembe véve azt, hogy ebben az intervallumban a legintenzívebb a máj műtétet követő regenerációja, feltételezhető, hogy a PVL által indukált volumennövekedés sejt-energetikailag kiegyensúlyozott, így a regeneráció és a funkció fenntartása is megfelelő energiaellátottsággal rendelkezik. Ezek a megfigyelések egybevágnak a Katoh által közölt eredményekkel, amelyek szerint a PVL-t követő májregeneráció során a hepatocyták megnövekedett mitokondriális funkciója, protein- és örökítőanyag tartalma volt észlelhető (175).

ALPPS esetében azonban jelentősen eltérő változásokat figyeltünk meg. A beavatkozásokat követően az O_2 fogyasztás és az ATP termelés is átmeneti emelkedést mutatott, majd a 48. posztoperatív órára valamennyi esetben szignifikáns csökkenés volt jellemző a PVL csoporthoz és bizonyos esetekben a kontroll értékekhez mérten is. Figyelembe véve azt, hogy a 48. óra folyamán a sejtosztódási folyamatok még rendkívül intenzíven zajlanak, a sejtenergetikai kompenzáció ilyen mértékű megtorpanása az energetikai egyensúly átmeneti destabilizálódását idézheti elő, a nagyfokú ATP felhasználás, és az elmaradozó termelés miatt kialakult diszkrepancia következtében.

Annak eldöntése érdekében, hogy az I. és II. légzési komplexumok teljesítménye miért esett vissza a mitokondriális légzési lánc kapcsoltságának (coupling) vizsgálatát is elvégeztük.

A respirációs kontroll a két kezelt állatcsoport között nem mutatott szignifikáns különbséget. Mindezt kiegészítve azzal, hogy az O_2 fogyasztás sem változott számottevően az ALPPS kezelt csoportban (a légzési lánc szétkapcsolásakor megnövekszik), valamint, hogy a ROS termelésben sem figyelhető meg érdemi eltérés a két állatcsoport között, megállapítható, hogy a tapasztalt bazális és indukált ATP termelés csökkenés nem az OXPHOS folyamatainak szétkapcsolásából, hanem sokkal inkább a Szent-Györgyi-Krebs ciklus, vagy az OXPHOS egyes részfolyamatait

végrehajtó funkcionális alegységek megkevesbedéséből (mennyiségének csökkenéséből) származik (102, 176).

Ezeket a megfigyeléseket látszanak megerősíteni az intramitokondriális NAD(P)H koncentrációkban bekövetkező változások. PVL-t követően a NAD(P)H koncentrációk nem mutattak érdemi eltérést a kiindulási értékekhez képest. Ebben az esetben csupán kismértékű, jól kompenzált oszcillációk voltak megfigyelhetőek. Az ALPPS csoportban azonban az intramitokondriális NAD(P)H koncentráció szignifikáns csökkenést mutatott a műtéti beavatkozást követően. Mindezen változások azt jelzik, hogy a légzési komplexek működésének csökkent hatékonysága mellett jelentősen csökken az OXPHOS-t szubsztrátokkal ellátó Szent-Györgyi-Krebs-ciklus működésének hatékonysága. Ennek megfelelően az ALPPS esetében tapasztalt energetikai maladaptáció a mitokondriális működésben bekövetkező, többértű károsodás következménye.

A mitokondriális funkció megfelelő szinten tartásának alapfeltétele a jól működő biogenezis, azaz, az organellumok részeinek, vagy egészének újdonszerveződése, cseréje (113). Ez a folyamat az intramitokondriális (pl. mitokondriális DNS replikáció) és nukleo-mitokondriális interakcióktól egyaránt függ, így ezek közül bármelyik károsodása szignifikánsan ronthatja az organellumban lezajló anyagcsere folyamatokat (113, 118).

A máj regenerációja során bekövetkező biogenezis változások feltárásához a PGC1- α által koordinált stressz-indukálta jelút vizsgálata végeztük el. Ez a potenciális koaktivátor szereppel bíró mediátor fehérje-fehérje interakciókon keresztül fokozza több expressziós faktor aktivitását. Ennek eredményeképpen szignifikáns befolyást gyakorol az NRF1, NRF2 (expressziós faktorok) kifejeződésére, amelyek a mitokondriális fehérjék átírásáért felelős mediátorok (116, 177–179).

Eredményeink alapján a PGC1- α expressziója szignifikáns mértékben megnövekedett a PVL csoportban 48 órával az operációt követően. Ugyanakkor, az ALPPS csoport egyedeiben hasonló koncentráció-növekedés nem volt megfigyelhető,

ami egyben szignifikánsan alacsonyabb koncentrációkat eredményezett ebben a csoportban a PVL csoport egyedeiben mért értékekhez képest.

Ez alapján ismételten megállapítható, hogy a PVL indukálta májregeneráció esetében a fő, mitokondriális újonképződésért felelős jelpálya elsődleges stressz mediátorának jelentős mértékű expresszió fokozódása azt a célt szolgálja, hogy a máj regenerációjához elegendő sejt-energetikai fedezet álljon rendelkezésre. Ugyanakkor ALPPS-t követően e jelpálya elégtelen működését figyeltük meg. Az ALPPS-t követő lecsökkent teljes sejtes lizátum fehérje koncentrációk magyarázatához figyelembe kell venni a műtét által generált igen erőteljes gyulladáshoz való válaszütemet. Előzetes kísérleteinkben Schlegel és Shi szignifikáns mértékű IL-6 és TNF- α mRNS átírásáról és kifejeződéséről számolt be (77, 78). Ez a két (fő) gyulladáshoz vezető mediátor fontos szerepet bír a májregeneráció kezdetében, ugyanakkor túlzott koncentráció emelkedésük súlyos diszfunkció kialakulását eredményezheti. Irodalmi adatok alapján a TNF- α elhúzódó koncentráció emelkedése a PGC1- α mennyiségének csökkenését idézheti elő (180). Magyarázatul szolgálhat erre Alveraz-Guardia és kutatócsoportjának az a megfigyelése, hogy az NF- κ B P65 – amely mediátoron konvergál mind a TNF, mind pedig az IL-6 jelpálya – fehérje-fehérje interakción keresztül csökkenteni képes a PGC1- α koncentrációját (181). Ennek a negatív interakciónak köszönhetően maradhatott el az a PGC1- α koncentráció növekedés az ALPPS csoportban, amely a PVL kezelt állatokban prominenssé vált a posztoperatív 48. órára.

A PGC1- α által koordinált jelpálya mediátorai közül az NRF1 esetében szignifikáns emelkedés mutatkozott PVL-t követően, míg ALPPS után a kontrollcsoport egyedeiben mért koncentrációkhoz képest szignifikáns eltérés nem volt detektálható. Mindezek a változások szignifikáns különbségeket eredményeztek a két állatcsoport között 48 és 72 órával a műtétet követően. E trend magyarázatául szolgálhat, hogy a PGC1- α igen erős befolyással rendelkezik az NRF1 protein expressziójára (182, 183). Minthogy ALPPS-t követően a PGC1- α koncentrációjában nem figyelhető meg az a fajta adaptív emelkedés, amely a PVL által indukált regenerációt jól jellemezi, feltételezhető, hogy ezen reakció elmaradásának következménye az NRF1 fehérje mennyiségének változatlansága. Mindezt igazolni látszik az is, hogy irodalmi adatok

alapján a PGC1- α génkiütése, vagy erőteljes szupressziója az NRF1 expressziójának erőteljes csökkenését idézte elő. Érdekes módon az NRF2, valamint az mTFA teljes sejtes lizátumból származó koncentrációjában nem volt megfigyelhető szignifikáns mértékű növekedés. Az NRF2 esetében ez a jelenség könnyedén magyarázható a mediátor erősen konvergens upstream jelpályájával, amely többszörös kapcsolatai révén feltehetően csökkenti a PGC1- α ingadozásai által keltett interferenciákat (117, 177). Az mtFA esetében hasonló mechanizmusról beszélhetünk. Viszont e protein szintéziséért és mitokondriumba jutásáért az NRF1 és NRF2 egyaránt felelős, így előfordulhat, hogy a koncentráció értékek ezen kettős expressziós faktor hatás következtében maradtak változatlanok (177).

Fontos megjegyezni, hogy a mitokondriumok az eukarióta sejten belül korlátozottan autonóm struktúrák, az endoszimbiózis során örökítőanyaguk 95-98%-a sejtmagba transzlokálódott (112). Ennek megfelelően működésük alapfeltétele a nukleo-mitokondriális működés megfelelő volta. A kísérletek során ezért e rendkívül bonyolult kapcsolatrendszer épségének feltérképezése céljából elvégeztük a mitokondriális fehérjefrakció vizsgálatát is.

Ez esetben a mitokondriális citokróm-c és mTFA koncentrációk szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyultak az ALPPS csoportban a PVL csoportban mért értékekhez képest a posztoperatív 1., 2., és 3. nap folyamán. A jelenség lehetséges magyarázata abban rejlik, hogy a PGC1- α , valamint NRF1 és NRF2 együttesen szabályozzák a mitokondriális Translocase of Outer Membrane (TOM) fehérjekomplex alegységeinek kifejeződését, és a mitokondriális külső membránon történő kihelyeződését (118).

Az ALPPS csoport esetében az elmaradt PGC1- α és NRF1 koncentráció emelkedés eredményeképpen a TOM komplexumok átíródása és külső mitokondrium membránra történő kihelyezése szignifikánsan csökkenhetett. Ennek következtében nukleo-mitokondriális kapcsolatavar alakulhatott ki, amely során a mitokondriumokba történő fehérjetranszport jelentős károsodást szenvedett. Ezt a felvetést megerősíteni látszanak azon eredményeink, miszerint a teljes sejtes lizátumból nyert citokróm-c és mTFA koncentrációértékek a két állatcsoportban nem különböztek, míg a

mitokondriális frakció vizsgálatok az ALPPS csoportban a PVL csoporthoz képest szignifikánsan alacsonyabb koncentrációk voltak mérhetőek. Azaz, ezek a fehérjék átíródtak a citoplazmában, azonban a sérült transzporfolyamatok révén nem jutottak be a mitokondriumokba.

Az ALPPS által előidézett rapid májregeneráció rendkívüli segítség lehet azon betegek számára, akiknek a daganat elhelyezkedése, mérete, vagy biológiai viselkedése miatt gyors sebészi beavatkozásra van szüksége (40). Ugyanakkor figyelembe kell venni, hogy alkalmazásakor a máj regenerációja és funkcionális kapacitás növekedése között erőteljes diszkrépancia lép fel, aminek következtében jelentősen csökken azon funkcionális rezerv kapacitás, amely a regeneráció okozta terhelésen felül jelentkező, például a szövődmények által generált biológiai stressz megfelelő elhárítására használható. Ezeket a felvetéseket látszanak igazolni Olthof és munkatársainak vizsgálata, melynek során jelentős diszkrépanciát fedeztek fel az ALPPS-t követően regenerálódó májlebenyek funkcionális kapacitása és volumen növekedése között (17).

A klinikai vizsgálatok során a figyelem középpontjába került és kutatócsoportunk által is igazolt funkcionális kapacitás csökkenés elhárítására számos megoldás létezik. Az ALPPS esetében 2015 óta szigorú betegszelekciós szempontokat vezettek be a szövődmények, és az igen magas mortalitási mutatók visszaszorításának érdekében, ugyanakkor ezen mutatók még jelenleg is elfogadhatatlanul magasak (35, 37).

Az elmúlt években a szigorúbb sebészi betegszelekció előtérbe helyezése mellett a vizsgálatok középpontjába került az ún. rehabilitáció, mely ez esetben a funkcionális kapacitás kiterjesztésére lehet megfelelő (144).

Ez a komplex perioperatív program magába foglalja a páciens műtétre történő fizikai felkészítését, a táplálás és tápláltság optimalizálását, valamint a pszichoszociális támogatását. Ugyan a rehabilitációs programok mindennapi klinikai életbe iktatása még gyerekcipőben jár, és a vizsgálati- kezelési módszertan standardizálásának hiánya miatt meglehetősen vegyesek az eredmények, a következetesen végigvitt tanulmányok esetében látott eredmények bizakodásra adnak okot (123, 139, 145, 184). A második

kísérletsorozatunkban ezért az állatok műtétet megelőző fizikai felkészítését végeztük el a testmozgás (ez esetben fizikai rehabilitáció) hatásainak vizsgálata érdekében.

Az irodalomban számos publikáció lelhető fel azzal kapcsolatban, hogy a testmozgás miképpen fejtheti ki jótékony hatását. A hipotézisek közül kiemelkedik a vázizomzatot endokrin szervként azonosító elmélet, amely alapján a (nem patológiás) terhelésnek kitett izomzat olyan citokineket és növekedési faktorokat bocsát a vérkeringésbe, amelyek távoli szervekre, vagy szervekben jótékonyan hatnak (121, 130).

Ennek alapján a vázizomzattól felszabaduló mediátorok a távoli szervekhez humorális úton eljutva kondicionáló hatást fejtenek ki, amelynek következtében az adott szerv a későbbi megterheléssel szemben szignifikánsan ellenállóbb lesz (121).

A II. kísérlet során az említett hipotézist alapul véve végeztük el vizsgálatainkat. Az ALPPS+P (rehabilitációs) kezelésben részesült állatok testtömege szignifikánsan alacsonyabb volt a műtétek és a terminálás előtt is az ALPPS csoport egyedeihez viszonyítva. Az ALPPS csoport egyedei ez esetben a hat hét nyugalmi körülmények között eltöltött idő után jelentős mennyiségű testzsírt akviráltak.

A regeneráció vizsgálatakor érdekes módon, a regenerációs csúcs az idősebb ALPPS és ALPPS+P egyedekben 24 órával eltolódott az I. kísérletsorozatban megfigyelthez képest. Ennek magyarázata az állatok életkorának változásában keresendő, mivel az életkor előrehaladtával a regeneratív stimulusra adott válaszreakció lassabban alakul ki (az I. kísérletsorozat egyedei 7 hetes, addig a II. kísérletben felhasznált patkányok kétszer ennyi, 13-15 hetes korukban kerültek felhasználásra) (168).

Érdekes módon a regenerációs ráta vizsgálatakor az ALPPS+P csoport egyedeiben szignifikánsan nagyobb lebenytömeg-növekedés volt mérhető az ALPPS csoporttal szemben. Ez az eltérés két folyamattal is magyarázható. Az egyik, hogy az ALPPS+P csoportban az osztódó májsejtek száma még a 72. posztoperatív óra folyamán is rendkívül magas maradt, míg az ALPPS csoportban ekkor már a proliferáció mérséklődése zajlott. Másfelől az intenzív mozgás alatt az állatok aktívabban

mobilizálták a májukban felhalmozott tartalékokat, így a kontrollcsoportban mért lebentömegek kisebbnek mutatkoztak. Ugyanakkor, a műtéteket követően az állatok testmozgást nem végeztek, így a májlebenyekben ismételen felhalmozhatták a glikogén és lipidkészleteket.

A regenerációban bekövetkező változások mellett figyelmet fordítottunk a mitokondriális funkció nyomon követésére is. A mitokondriális oxigénfogyasztás vizsgálata során az ALPPS és ALPPS+P csoportokban mérhető O_2 felhasználás mértéke nem különbözött jelentős mértékben a két állatcsoport között. Mindez több okra vezethető vissza. A mitokondriális légzési lánc szétkapcsoltságára vonatkozóan kiderült az I. kísérletsorozatban, hogy nem áll fenn az elektrontranszport láncolat számottevő megszakadása. Ugyanezen változások feltételezhetők a jelen kísérlet esetében is. Ugyanakkor az ATP termelés vizsgálatakor az ALPPS+P csoportban szignifikánsan magasabb mutatók voltak megfigyelhetőek mind bazális, mind pedig indukált állapotban az ALPPS csoport egyedeiben mérhető értékekhez képest. Az ATP termelés és oxigén fogyasztás kapcsolatának vizsgálatához P/O hányados számítását is elvégeztünk. Ennek alapján látható, hogy az ALPPS+P csoportban mind az I., mind pedig a II. légzési láncalkotón keresztül szignifikánsan magasabb az oxigénfelhasználás hatékonysága. Előzetesen csupán sportélettani publikációkban közöltek adatokat a máj mitokondriális funkciójának testmozgás hatására bekövetkező hatásairól. Crescenzo és munkatársai vizsgálataikban a jelen bemutatott kísérlethez hasonlóan a testedzés hatására a máj mitokondriumainak jelentős oxidatív kapacitás növekedését figyelték meg (88).

Annak pontosabb megértése érdekében, hogy mi állhat e kifejezett energiatermelés növekedés hátterében a mitokondriális biogenezis vizsgálatát végeztük el. Az I. kísérletsorozathoz hasonlóan a stressz mediálta biogenetikus jelpálya alkotóit vizsgáltuk ez esetben is, így a PGC1- α , NRF1 és NRF2 koncentrációiban bekövetkező változásokat kísértük figyelemmel.

A PGC1- α fehérje mennyisége szignifikáns emelkedést mutatott az ALPPS+P csoportban az ALPPS csoport értékeihez viszonyítva. Az ALPPS+P csoportban látott

jelentős koncentrációemelkedés visszavezethető a 6 hetes testedzési programra. Scarpulla és munkatársai tanulmányaikban bizonyították, hogy a PGC1- α koncentrációját számos hatás befolyásolja, közöttük az AMPK által koordinált jelpálya aktivitása, mely az AMP/ATP arány AMP irányába történő eltolódása során, mintegy energiaszint-érzékelő lép működésbe (119, 178, 185, 186). A fokozott fizikai aktivitás esetén a májat nagyobb mennyiségű, az izomszövet működésekor termelődő laktát éri el, amelynek ismételten glükózzá alakítása rendkívül ATP igényes folyamat, ami átmeneti energiadeficitet okozhat (134). Az ALPPS+P csoportban látott rapid PGC1- α koncentráció növekedés feltételezhetően egyfelől ezzel a mechanizmussal hozható összefüggésbe. A rehabilitált csoportban úgyszintén rendkívül fontos tényező lehet – a PGC1- α dinamikus koncentráció növekedését tekintve – a gyulladós válaszreakció dinamikájának és intenzitásának megváltozása.

Kísérleti eredményeink alapján valamennyi mért gyulladós mediátor koncentrációiban jelentős különbségek fedezhetők fel az ALPPS és ALPPS+P csoportok összehasonlításakor. Mindemellett az IL-1RA májszöveti koncentrációja szignifikánsan megemelkedett az ALPPS+P csoportban az ALPPS csoport értékeihez viszonyítottn. Ezzel együtt kifejezett csökkenés volt tapasztalható a májszövet IL-6, IL-1 β tartalmában, valamint az intracelluláris jelpálya NF- κ B P65 expressziójában. Az IL-1RA az IL-1 családba tartozó anti-inflammatórikus citokin, amely az IL-1 α és IL-1 β pro-inflammatórikus citokinek kompetitív antagonistájaként funkcionál (129). Az IL-1RA túlnyomó részét májszövetben a Kupffer sejtek, valamint azok előalakjai termelik (42, 43). Megfelelő expressziója a máj regeneratív folyamatai során elengedhetetlenül fontosnak bizonyul, mivel ez a molekula kulcsszerepet tölt be a gyulladós válaszreakció fékmentartásában. Hatását elsősorban az IL-1 jelpálya szuppresszióján keresztül éri el, amelynek következtében csökken a szöveti IL-1 α és IL-1 β terhelés. Az említett mediátorok csökkent felszabadulása az IL-6 és TNF- α termelésének és kiválasztásának mérséklődését idézi elő (127, 187–189). Mindezen változások több módon is jótékonyan befolyásolhatják a mitokondriális biogenezis fő stressz-mediátorának, a PGC1- α szintézisét és koncentrációját. Egyfelől az ALPPS+P csoportban az IL-1RA koncentrációemelkedéssel párhuzamosan az IL-1 β

koncentrációja jelentős mértékben csökkent az ALPPS csoportban mérthez képest. Az IL-1 β egy ún. mester citokin, amely további gyulladáshoz vezető mediátorok termelését és felszabadulását képes elindítani a májszövetben, másfelől az IL-6, TNF- α és IL-1 β az NF- κ B P65 mediálta módon aktiválja az intracelluláris gyulladáshoz vezető reakciókat (190). Ez utóbbi a hírvivő molekula direkt protein-protein reakción keresztül a PGC1- α koncentráció csökkenését képes előidézni (181). Jelen esetben az ALPPS csoport egyediben az I. és II. kísérletsorozat alkalmával is bizonyítást nyert a gyulladáshoz vezető jelpálya fokozott aktiválódása, valamint ugyanezen állatcsoportban a PGC1- α koncentrációinak következményes elmaradása volt megfigyelhető, reprodukálható módon. Az ALPPS+P csoportban látott IL-1RA koncentráció növekedés, az IL-1 jelpálya aktivitásának tompításán keresztül mérsékelte mind az IL-1 β , mind pedig az IL-6 szöveti kifejeződését. Hatására az NF- κ B P65 aktív formájának intracelluláris megjelenése is mérsékeltebb emelkedést mutatott ebben az állatcsoportban, aminek következtében az NF- κ B P65 kisebb eliminációs hatást tudott kifejteni a PGC1- α -ra. Ennek köszönhetően ez utóbbi hírvivő jelentős koncentráció emelkedést érhet el.

A PGC1- α számos expressziós faktor, illetve sejtmagi receptor koaktivációján keresztül serkenti a két fő mitokondriális fehérje átírásáért felelős mediátor az NRF1 és NRF2 szintézisét (117, 182, 183). Ezen felül e két molekula felelős a nukleo-mitokondriális kommunikáció fenntartásáért, így szerepük több fronton is kiemelkedő a megfelelő sejt-energetikai háztartás kialakításában. Az ALPPS csoportban a II. kísérletsorozat esetén is szignifikánsan alacsonyabb NRF1 és csak mérsékelten emelkedett NRF2 koncentrációk voltak mérhetőek. Ez esetben az adaptív, erőteljes koncentrációemelés az I. és II. kísérletben is bizonyított, túlaktivált gyulladáshoz vezető válaszreakciónak köszönhető, amely a PGC1- α adaptív koncentráció-emelésének elmaradását eredményezte. Az ALPPS+P csoportban ezzel ellenkező módon mindhárom mediátor koncentrációja szignifikánsan megemelkedett az ALPPS csoportban mért értékekhez képest, jellemzően az első 72 posztoperatív órában zajló, igen intenzív regeneráció időszakában.

Az NRF1 és NRF2 szabályozza többek között a mitokondrium belső membránján helyet foglaló légzési lánc és ATP-szintáz alegységek kifejeződését és

mitokondriumba történő transzportját (178). Emiatt a II. kísérletsorozatban valamennyi légzési láncalkotó fehérjekoncentrációjának mérését is elvégeztük. Az ALPPS csoportban egyik láncalkotó esetében sem volt szignifikáns mértékű változás kimutatható a kontrollcsoporthoz képest a teljes sejtes lizátumok esetében. Az ALPPS+P csoportban ugyanakkor valamennyi légzési komplexum fehérjekoncentrációjának szignifikáns emelkedése volt megfigyelhető az ALPPS+P csoporthoz képest. Figyelembe véve, hogy az NRF1 és NRF2 felelős ezeknek a fehérjéknek a szintéziséért, valamint mitokondriumokba juttatásáért, feltételezhető, hogy a fizikai aktivitás hatására a nukleo-mitokondriális kapcsolatok nagyfokú stabilizálódása jött létre. Ezen felül a gyulladáshoz való válaszreakció kontrollálásával eliminálódtak mindazon negatív tényezők, amelyek rendkívül érzékeny mitokondriális hálózat megromlását eredményezik. A hipotézist tovább erősíti a rehabilitáció hatására jelentősen megnövekedett és stabilizált ATP szintézis, amely az I. és II. kísérletsorozatban is szignifikáns károsodásokat szenvedett ALPPS-t követően.

Zárszóként, és egyben a kutatómunka legnagyobb korlátozó tényezőjeként fontos hangsúlyozni, hogy a jelen bemutatott munkába foglalt eredmények kizárólag kísérletek során keletkeztek. A rágcsálókban végzett alapvető vizsgálatok eredményeinek emberben történő megfeleltetése sok esetben nehézségekbe ütközik, vagy egyenesen lehetetlen a rendkívül nagymértékű metabolikus és expressziós mintázatbeli eltérések miatt. A mitokondriális vizsgálatoknál azonban fontos tényező, hogy ezeknek az organelleknek a felépítése és funkciója, valamint a velük kapcsolatba hozható jelátviteli utak a nagyfokú konzerváltság miatt rendkívüli hasonlóságokat mutatnak az egyes emlősfajok között. Az erős konvergencia miatt akár kiméra-organellek is létrehozhatók (191). Így megállapítható, hogy a rágcsálókból nyert adatok -megkötésekkel ugyan-, de értelmezhetőek akár humán vonatkozásban is.

6. Következtetések

Az I. kísérletsorozat főbb következtetései:

1. A vizsgálatok során alkalmazott ALPPS modell a rágcsáló kísérletekre vonatkozó megkötésekkel jól, és reprodukálható módon modellezte a humán műtétek követő változásokat. Alkalmazása során a PVL-hez képest szignifikánsan magasabb regeneratív válaszreakció keletkezett, amely mikroszkópos szinten sokkal intenzívebb proliferáció és sejtosztódás formájában nyilvánult meg.
2. Az ALPPS-t rendkívül erős gyulladáshoz vezető jelpálya aktiválódás követi, ami interferenciákat okozhat a mitokondriumok újdonszaporodásáért és karbantartásáért felelős biogenezis folyamatában.
3. A nagyobb fokú regeneráció mellett a biogenezis folyamatában létrejövő károsodások miatt a mitokondriális funkció jelentős visszaesése volt megfigyelhető (elsősorban) abban a stádiumban, amikor a sejtosztódás a legintenzívebb. Humánra vonatkoztatva ez az időszak a posztoperatív 10-14. napnak feleltethető meg, amely sokszor egybeesik az ALPPS második műtétjének idejével. Így előfordulhat, hogy a megfelelő májvolumen ellenére a sejt-energetikai rezervoárok alacsony töltöttsége miatt funkcionális deficit alakul ki.
4. A biogenetikus folyamatok károsodása fizikailag is azonosíthatóan manifesztálódik. ALPPS-t követően a mitokondriumok számbeli sokszorozódása figyelhető meg, ugyanakkor ezen organellek kis méretűek, éretlenek. Ez utóbbi állítást megerősítik a mitokondriális frakció fehérjeösszetételében bekövetkező negatív változások is.

A II. kísérletsorozat főbb következtetései:

1. A fizikai aktivitás preoperatív időszakban történő fokozása szignifikáns változásokat idézett elő a máj regenerációjának dinamikájában. A fizikai felkészítésben részesült állatpopulációban a regenerációba lépő májsejtek száma hosszabb ideig maradt magas, ami szignifikánsan nagyobb lebenytömeg-növekedést idézett elő.
2. A nagyfokú lebenytömeg növekedés mellett, a fizikai felkészítésben részesült állatok májából izolált mitokondriumok erőteljes funkció-fokozódása volt megfigyelhető, amely megfelelő energiát biztosított a regeneráció folyamatának stabil fenntartására és további akcelerálására.
3. Az energetikai „output” megemelkedésének hátterében a stressz indukálta mitokondriális biogenezis mediátorainak koncentráció-fokozódása állt. Ennek következtében a mitokondriális működésért felelős fehérjék májsejten belüli mennyisége megemelkedett az előkezelésben nem részesülő állatcsoporthoz képest.

7. Összefoglalás

Az ALPPS (Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy) gyorsabb és nagyobb mértékű regeneráció előidézésére képes, lehetővé téve a kuratív májreszekciók korábbi elvégzését. Előnyei mellett azonban magas morbiditás és mortalitás jellemezi, melynek hátterében a májszövet sejt-energetikai folyamatainak megbomlása állhat. Jelen kísérletek célja az ALPPS-t és PVL-t követő sejt energetikai folyamatok feltérképezése, valamint, a preoperatív fizikai kondicionálás hatásainak vizsgálata volt.

A kísérleteket hím Wistar patkányokon (n=160) ALPPS-t és PVL-t (vena portae ligatúra) végeztünk, valamint ALPPS kezelt állatokat fizikai rehabilitációban részesítettünk. A műtét előtt (0. óra) és az azt követő 1., 2., 3. és 7. napon az állatok máját eltávolítottuk, tömegüket megmértük. Meghatározásra került a Ki67 index, valamint megtörtént a mitokondriális biogenezist jellemző mediátorok fehérje koncentráció vizsgálata. Elektronmikroszkóppal feltérképeztük a mitokondriális ultrastruktúra változásai, valamint a mintákból izolált mitokondriumok oxigénfogyasztásában és ATP termelésében bekövetkező változásokat vizsgáltuk.

ALPPS-t követően a májlebenyek tömegnövekedése és proliferációja szignifikáns mértékben meghaladta a PVL csoportban látottakat. ALPPS esetén az PGC1- α és NRF-1 kifejeződése szignifikánsan csökkent. Az ALPPS csoport egyedeiben szignifikánsan nőtt a 0,24 μm^2 -nél kisebb területű mitokondriumok aránya. A PVL csoporthoz képest ugyanakkor a mitokondriumok oxigénfogyasztása és ATP termelése elmaradt. Fizikai rehabilitáció esetén az ALPPS okozta regeneráció tovább gyorsult, miközben a gyulladásos válaszreakció mérséklődését figyeltük meg.

Az ALPPS indukálta regenerációt a nagyfokú, ám ineffektív mitokondriális biogenezis miatt, a máj energetikai instabilitása jellemzi, mely felelős lehet az ALPPS-en átesett betegek fokozott morbiditásáért, mortalitásáért. Ugyanakkor a preoperatív fizikai felkészítés ezeket a negatív hatásokat erőteljesen ellensúlyozni képes a biogenezis fokozásán és a gyulladásos válaszreakció mérséklésén keresztül.

8. Summary

ALPPS (Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy) is able to induce significantly faster and more pronounced liver regeneration in order of the curative resection. Alongside its benefits it confers significantly higher morbidity and mortality rates, which might be the result of the cellular energetic destabilization of the liver tissue. In this study we aimed to assess the cellular energetic processes (mitochondrial biogenesis, morphology and function) as well as the investigation of the effects of preoperative physical conditioning after ALPPS and PVL.

Male wistar rats (n=160) were subjected to ALPPS and PVL (portal vein ligation), also a group of ALPPS treated animals were subjected to physical prehabilitation. The livers of the animals were extracted without operation (0 hour) and 1, 2, 3 and 7 days after operation for weight measurement. The Ki67 index measurement as well as the assessment of protein concentration of the mitochondrial biogenesis mediators were carried out. Electron microscopy was used for mitochondrial ultrastructural analysis, and the alterations of oxygen consumption and ATP production was measured on isolated mitochondria.

The weight gain and proliferation of the liver lobes were significantly higher after ALPPS compared to the PVL group. The expression of PGC1- α and NRF dropped significantly. Meanwhile, the fraction of small sized mitochondria rose significantly in the ALPPS group compared to the PVL. When compared to the PVL group the oxygen consumption and ATP production was lesser in the ALPPS group. The ALPPS induced liver regeneration further accelerated after ALPPS and mitochondrial biogenesis was more intense.

The ALPPS induced liver regeneration can be associated with highly upregulated but very ineffective mitochondrial biogenesis, which might be the cause behind the elevated mortality and mortality. However, through the dampening of the inflammatory response and the elevation of mitochondrial biogenesis, these negative effects can be counteracted significantly with preoperative physical conditioning.

9. Irodalomjegyzék

1. Abbas S, Lam V, Hollands M (2011) Ten-year survival after liver resection for colorectal metastases: systematic review and meta-analysis. *ISRN Oncol* 2011:763245.
2. Marley AR, Nan H (2016) Epidemiology of colorectal cancer. *Int J Mol Epidemiol Genet* 7(3):105–114.
3. Liu H, Zhu S (2009) Present status and future perspectives of preoperative portal vein embolization. *Am J Surg* 197(5):686–690.
4. Tang Z, Zhou X, Lin Z, Yang B, Ma Z, Ye S, Wu Z, Fan J, Liu Y, Liu K, Qin L, Tian J, Sun H, He B, Xia J, Qiu S, Zhou J (1999) Surgical treatment of hepatocellular carcinoma and related basic research with special reference to recurrence and metastasis. *Chin Med J* 112(10):887–891.
5. Guglielmi A, Ruzzenente A, Conci S, Valdegamberi A, Iacono C (2012) How much remnant is enough in liver resection? *Dig Surg* 29(1):6–17.
6. Rahbari NN, Garden OJ, Padbury R, Brooke-Smith M, Crawford M, Adam R, Koch M, Makuuchi M, Dematteo RP, Christophi C, Banting S, Usatoff V, Nagino M, Maddern G, Hugh TJ, Vauthey J-N, Greig P, Rees M, Yokoyama Y, Fan ST, Nimura Y, Figueras J, Capussotti L, Buchler MW, Weitz J (2011) Posthepatectomy liver failure: a definition and grading by the International Study Group of Liver Surgery (ISGLS). *Surgery* 149(5):713–724.
7. Adam R, Miller R, Pitombo M, Wicherts DA, de Haas RJ, Bitsakou G, Aloia T (2007) Two-stage hepatectomy approach for initially unresectable colorectal hepatic metastases. *Surg Oncol Clin N Am* 16(3):525–36, viii.
8. van Gulik TM, de Graaf W, Dinant S, Busch ORC, Gouma DJ (2007) Vascular

occlusion techniques during liver resection. *Dig Surg* 24(4):274–281.

9. Cieslak KP, Huisman F, Bais T, Bennink RJ, van Lienden KP, Verheij J, Besselink MG, Busch ORC, van Gulik TM (2017) Future remnant liver function as predictive factor for the hypertrophy response after portal vein embolization. *Surgery* 162(1):37–47.
10. Schnitzbauer AA, Lang SA, Goessmann H, Nadalin S, Baumgart J, Farkas SA, Fichtner-Feigl S, Lorf T, Goralcyk A, Horbelt R, Kroemer A, Loss M, Rummele P, Scherer MN, Padberg W, Konigsrainer A, Lang H, Obed A, Schlitt HJ (2012) Right portal vein ligation combined with in situ splitting induces rapid left lateral liver lobe hypertrophy enabling 2-staged extended right hepatic resection in small-for-size settings. *Ann Surg* 255(3):405–414.
11. de Santibanes M, Alvarez FA, Santos FR, Ardiles V, de Santibanes E (2014) The associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy approach using only segments I and IV as future liver remnant. *J Am Coll Surg* 219(2):e5–9.
12. Lang H, de Santibanes E, Schlitt HJ, Malago M, van Gulik T, Machado MA, Jovine E, Heinrich S, Ettorre GM, Chan A, Hernandez-Alejandro R, Robles Campos R, Sandstrom P, Linecker M, Clavien P-A (2018) 10th Anniversary of ALPPS-Lessons Learned and quo Vadis. *Ann Surg*. doi:10.1097/SLA.0000000000002797.
13. de Santibanes M, Boccalatte L, de Santibanes E (2017) A literature review of associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS): so far, so good. *Updates Surg* 69(1):9–19.
14. Schadde E, Raptis DA, Schnitzbauer AA, Ardiles V, Tschuor C, Lesurtel M, Abdalla EK, Hernandez-Alejandro R, Jovine E, Machado M, Malago M, Robles-Campos R, Petrowsky H, Santibanes ED, Clavien P-A (2015) Prediction of Mortality After ALPPS Stage-1: An Analysis of 320 Patients From the International ALPPS Registry. *Ann Surg* 262(5):780–786.

15. Serenari M, Collaud C, Alvarez FA, de Santibanes M, Giunta D, Pekolj J, Ardiles V, de Santibanes E (2018) Interstage Assessment of Remnant Liver Function in ALPPS Using Hepatobiliary Scintigraphy: Prediction of Posthepatectomy Liver Failure and Introduction of the HIBA Index. *Ann Surg* 267(6):1141–1147.
16. Serenari M, Zanello M, Schadde E, Toschi E, Ratti F, Gringeri E, Masetti M, Cillo U, Aldrighetti L, Jovine E (2016) Importance of primary indication and liver function between stages: results of a multicenter Italian audit of ALPPS 2012-2014. *HPB* 18(5):419–427.
17. Olthof PB, Tomassini F, Huespe PE, Truant S, Pruvot F-R, Troisi RI, Castro C, Schadde E, Axelsson R, Sparrelid E, Bennink RJ, Adam R, van Gulik TM, de Santibanes E (2017) Hepatobiliary scintigraphy to evaluate liver function in associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy: Liver volume overestimates liver function. *Surgery* 162(4):775–783.
18. Truant S, Baillet C, Deshorgue AC, Leteurtre E, Hebbar M, Ernst O, Huglo D, Pruvot F-R (2016) Drop of Total Liver Function in the Interstages of the New Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy Technique: Analysis of the “Auxiliary Liver” by HIDA Scintigraphy. *Annals of surgery* 263(3):e33–4.
19. Caballano-Infantes E, Terron-Bautista J, Beltran-Povea A, Cahuana GM, Soria B, Nabil H, Bedoya FJ, Tejedo JR (2017) Regulation of mitochondrial function and endoplasmic reticulum stress by nitric oxide in pluripotent stem cells. *World J Stem Cells* 9(2):26–36.
20. Hackl C, Brunner SM, Schmidt KM, Schlitt HJ (2018) [Surgical innovations in treatment of metastatic colorectal cancer : Complexity of metastatic surgery as example for personalized medicine]. *Chirurg* 89(3):191–196.
21. Makuuchi M, Thai BL, Takayasu K, Takayama T, Kosuge T, Gunven P, Yamazaki S, Hasegawa H, Ozaki H (1990) Preoperative portal embolization to increase

- safety of major hepatectomy for hilar bile duct carcinoma: a preliminary report. *Surgery* 107(5):521–527.
22. Kinoshita H, Sakai K, Hirohashi K, Igawa S, Yamasaki O, Kubo S (1986) Preoperative portal vein embolization for hepatocellular carcinoma. *World J Surg* 10(5):803–808.
 23. Kovacs T, Mathe D, Fulop A, Jemnitz K, Batai-Konczos A, Veres Z, Torok G, Veres DS, Horvath I, Szigeti K, Homolya L, Szijarto A (2017) Functional shift with maintained regenerative potential following portal vein ligation. *Sci Rep* 7(1):18065.
 24. Jaeck D, Oussoultzoglou E, Rosso E, Greget M, Weber J-C, Bachellier P (2004) A two-stage hepatectomy procedure combined with portal vein embolization to achieve curative resection for initially unresectable multiple and bilobar colorectal liver metastases. *Ann Surg* 240(6):1037–1051.
 25. Kianmanesh R, O’Toole D, Sauvanet A, Ruszniewski P, Belghiti J (2005) [Surgical treatment of gastric, enteric pancreatic endocrine tumors. Part 2. treatment of hepatic metastases]. *J Chir* 142(4):208–219.
 26. Hoekstra LT, van Lienden KP, Doets A, Busch ORC, Gouma DJ, van Gulik TM (2012) Tumor progression after preoperative portal vein embolization. *Ann Surg* 256(5):812–818.
 27. Alvarez FA, Castaing D, Figueroa R, Allard MA, Golse N, Pittau G, Ciacio O, Sa Cunha A, Cherqui D, Azoulay D, Adam R, Vibert E (2018) Natural history of portal vein embolization before liver resection: a 23-year analysis of intention-to-treat results. *Surgery* 163(6):1257–1263.
 28. Eshmuminov D, Tschuor C, Raptis DA, Boss A, Wurnig MC, Sergeant G, Schadde E, Clavien P-A (2017) Rapid liver volume increase induced by associating liver partition with portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS): Is it edema,

- steatosis, or true proliferation? *Surgery* 161(6):1549–1552.
29. Schadde E, Schnitzbauer AA, Tschuor C, Raptis DA, Bechstein WO, Clavien P-A (2015) Systematic review and meta-analysis of feasibility, safety, and efficacy of a novel procedure: associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy. *Ann Surg Oncol* 22(9):3109–3120.
 30. Olthof PB, Schnitzbauer AA, Schadde E (2018) The HPB controversy of the decade: 2007-2017 - Ten years of ALPPS. *Eur J Surg Oncol*. doi:10.1016/j.ejso.2018.06.005.
 31. Vigano L, Cimino MM, Adam R, Torzilli G (2017) Improving the Safety of ALPPS Procedure: The Optimal Compromise Between Dropout and Mortality Risk. Comment on Schadde E et al Prediction of Mortality After ALPPS Stage-1: An Analysis of 320 Patients From the International ALPPS Registry. *Ann Surg*. 2015;2. *Annals of surgery* 266(6):e101–e102.
 32. Pekolj J, Alvarez FA, Biagiola D, Villegas L, Ardiles V, de Santibanes E (2018) Totally Laparoscopic Mini-ALPPS Using a Novel Approach of Laparoscopic-Assisted Transmesenteric Portal Vein Embolization. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*. doi:10.1089/lap.2018.0039.
 33. Rong Z, Lu Q, Yan J (2017) Totally laparoscopic radiofrequency-assisted liver partition with portal vein ligation for hepatocellular carcinoma in cirrhotic liver. *Medicine* 96(51):e9432.
 34. Donati M, Basile F, Oldhafer KJ (2015) Present status and future perspectives of ALPPS (associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy). *Future oncology (London, England)* 11(16):2255–2258.
 35. Oldhafer KJ, Stavrou GA, van Gulik TM (2016) ALPPS--Where Do We Stand, Where Do We Go?: Eight Recommendations From the First International Expert Meeting. *Ann Surg* 263(5):839–841.

36. Linecker M, Bjornsson B, Stavrou GA, Oldhafer KJ, Lurje G, Neumann U, Adam R, Pruvot F-R, Topp SA, Li J, Capobianco I, Nadalin S, Machado MA, Voskanyan S, Balci D, Hernandez-Alejandro R, Alvarez FA, De Santibanes E, Robles-Campos R, Malago M, de Oliveira ML, Lesurtel M, Clavien P-A, Petrowsky H (2017) Risk Adjustment in ALPPS Is Associated With a Dramatic Decrease in Early Mortality and Morbidity. *Ann Surg* 266(5):779–786.
37. Stavrou GA, Donati M, Fard-Aghaie MH, Zeile M, Huber TM, Stang A, Oldhafer KJ (2017) Did the International ALPPS Meeting 2015 Have an Impact on Daily Practice? The Hamburg Barmbek Experience of 58 Cases. *Visceral medicine* 33(6):456–461.
38. Linecker M, Stavrou GA, Oldhafer KJ, Jenner RM, Seifert B, Lurje G, Bednarsch J, Neumann U, Capobianco I, Nadalin S, Robles-Campos R, de Santibanes E, Malago M, Lesurtel M, Clavien P-A, Petrowsky H (2016) The ALPPS Risk Score: Avoiding Futile Use of ALPPS. *Ann Surg* 264(5):763–771.
39. Schadde E, Malago M, Hernandez-Alejandro R, Li J, Abdalla E, Ardiles V, Lurje G, Vyas S, Machado MA, de Santibanes E (2015) Monosegment ALPPS hepatectomy: extending resectability by rapid hypertrophy. *Surgery* 157(4):676–689.
40. Schadde E, Hernandez-Alejandro R, Lang H, de Santibanes E, Clavien P-A (2015) ALPPS Offers a Better Chance of Complete Resection in Patients with Primarily Unresectable Liver Tumors. Results of a Multicentre Analysis: Reply. *World journal of surgery* 39(7):1850–1851.
41. Alvarez FA, Ardiles V, de Santibanes M, Pekolj J, de Santibanes E (2015) Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy offers high oncological feasibility with adequate patient safety: a prospective study at a single center. *Ann Surg* 261(4):723–732.
42. Taub R (2004) Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell*

Biol 5(10):836–847.

43. Michalopoulos GK (2010) Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol* 176(1):2–13.
44. Kim RD, Kim JS, Watanabe G, Mohuczy D, Behrns KE (2008) Liver regeneration and the atrophy-hypertrophy complex. *Semin Intervent Radiol* 25(2):92–103.
45. Michalopoulos GK (2018) The Regenerative Altruism of Hepatocytes and Cholangiocytes. *Cell Stem Cell* 23(1):11–12.
46. Dezső K, Nagy P, Paku S (2019) Human liver regeneration following massive hepatic necrosis: Two distinct patterns. *J Gastroenterol Hepatol*. doi:10.1111/jgh.14721.
47. Rókusz A, Veres D, Szücs A, Bugyik E, Mózes M, Paku S, Nagy P, Dezső K (2017) Ductular reaction correlates with fibrogenesis but does not contribute to liver regeneration in experimental fibrosis models. *PLoS One* 12(4):e0176518.
48. Rozga J, Jeppsson B, Bengmark S (1986) Portal branch ligation in the rat. Reevaluation of a model. *Am J Pathol* 125(2):300–308.
49. Schweizer W, Duda P, Tanner S, Balsiger D, Höflin F, Blumgart LH, Zimmermann A (1995) Experimental atrophy/hypertrophy complex (AHC) of the liver: portal vein, but not bile duct obstruction, is the main driving force for the development of AHC in the rat. *J Hepatol* 23(1):71–78.
50. Aouacheria A, Baghdiguian S, Lamb HM, Huska JD, Pineda FJ, Hardwick JM (2017) Connecting mitochondrial dynamics and life-or-death events via Bcl-2 family proteins. *Neurochem Int*. doi:10.1016/j.neuint.2017.04.009.
51. Lambotte L, Li B, Leclercq I, Sempoux C, Saliez A, Horsmans Y (2000) The compensatory hyperplasia (liver regeneration) following ligation of a portal branch is initiated before the atrophy of the deprived lobes. *J Hepatol* 32(6):940–945.

52. Wiest R, Albillos A, Trauner M, Bajaj JS, Jalan R (2017) Targeting the gut-liver axis in liver disease. *J Hepatol* 67(5):1084–1103.
53. Tacke F (2017) Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases. *J Hepatol* 66(6):1300–1312.
54. Michalopoulos GK (2017) Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology* 65(4):1384–1392.
55. Hayashi H, Nagaki M, Imose M, Osawa Y, Kimura K, Takai S, Imao M, Naiki T, Kato T, Moriwaki H (2005) Normal liver regeneration and liver cell apoptosis after partial hepatectomy in tumor necrosis factor-alpha-deficient mice. *Liver Int* 25(1):162–170.
56. Starkel P, Horsmans Y, Sempoux C, De Saeger C, Wary J, Lause P, Maiter D, Lambotte L (1999) 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* 29(5):1463–1470.
57. Olthof PB, Huisman F, Schaap FG, van Lienden KP, Bennink RJ, van Golen RF, Heger M, Verheij J, Jansen PL, Olde Damink SW, van Gulik TM (2017) Effect of obeticholic acid on liver regeneration following portal vein embolization in an experimental model. *Br J Surg* 104(5):590–599.
58. Kirschbaum M, Adelmeijer J, Alkozai EM, Porte RJ, Lisman T (2016) Evidence against a role for platelet-derived molecules in liver regeneration after partial hepatectomy in humans. *Transl Res* 2(3):97–106.
59. Poisson J, Lemoine S, Boulanger C, Durand F, Moreau R, Valla D, Rautou P-E (2017) Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *J Hepatol* 66(1):212–227.
60. Schoen JM, Wang HH, Minuk GY, Lauth WW (2001) Shear stress-induced nitric

oxide release triggers the liver regeneration cascade. *Nitric Oxide* 5(5):453–464.

61. Braet F, Shleper M, Paizi M, Brodsky S, Kopeiko N, Resnick N, Spira G (2004) Liver sinusoidal endothelial cell modulation upon resection and shear stress in vitro. *Comp Hepatol* 3(1):7.
62. Watts RN, Ponka P, Richardson DR (2003) Effects of nitrogen monoxide and carbon monoxide on molecular and cellular iron metabolism: mirror-image effector molecules that target iron. *Biochem J* 369(Pt 3):429–440.
63. Nishii K, Brodin E, Renshaw T, Weesner R, Moran E, Soker S, Sparks JL (2018) Shear stress upregulates regeneration-related immediate early genes in liver progenitors in 3D ECM-like microenvironments. *J Cell Physiol* 233(5):4272–4281.
64. Sato Y, Tsukada K, Hatakeyama K (1999) Role of shear stress and immune responses in liver regeneration after a partial hepatectomy. *Surg Today* 29(1):1–9.
65. Markose D, Kirkland P, Ramachandran P, Henderson NC (2018) Immune cell regulation of liver regeneration and repair. *Journal of Immunology and Regenerative Medicine* 2:1–10.
66. Tashiro S (2009) Mechanism of liver regeneration after liver resection and portal vein embolization (ligation) is different? *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 16(3):292–299.
67. Garcia-Perez R, Revilla-Nuin B, Martinez CM, Bernabe-Garcia A, Baroja Mazo A, Parrilla Paricio P (2015) Associated Liver Partition and Portal Vein Ligation (ALPPS) vs Selective Portal Vein Ligation (PVL) for Staged Hepatectomy in a Rat Model. Similar Regenerative Response? *PLoS One* 10(12):e0144096.
68. Hunter CA, Jones SA (2015) IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* 16(5):448–457.
69. Ishii T, Sato M, Sudo K, Suzuki M, Nakai H, Hishida T, Niwa T, Umezu K, Yuasa

- S (1995) Hepatocyte growth factor stimulates liver regeneration and elevates blood protein level in normal and partially hepatectomized rats. *J Biochem* 117(5):1105–1112.
70. Böhm F, Köhler UA, Speicher T, Werner S (2010) Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines. *EMBO Mol Med* 2(8):294–305.
71. Michalopoulos GK (1995) 2 - Hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor (Met) in liver regeneration, neoplasia, and disease. ed Jirtle RLBT-. LRAC (Academic Press, San Diego), pp 27–49.
72. Gilgenkrantz H, Collin de l'Hortet A (2018) Understanding Liver Regeneration: From Mechanisms to Regenerative Medicine. *Am J Pathol* 188(6):1316–1327.
73. Shi JH, Hammarstrom C, Grzyb K, Line PD (2017) Experimental evaluation of liver regeneration patterns and liver function following ALPPS. *BJS open* 1(3):84–96.
74. Croome KP, Mao SA, Glorioso JM, Krishna M, Nyberg SL, Nagorney DM (2015) Characterization of a porcine model for associating liver partition and portal vein ligation for a staged hepatectomy. *HPB* 17(12):1130–1136.
75. Budai A, Onody P, Fulop A, Hahn O, Szijarto A, Kovacs T, Dunay M, Nemeth T (2017) Animal Models for Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy (ALPPS): Achievements and Future Perspectives. *Eur Surg Res*. doi:10.1159/000453108.
76. Eloranta JJ, Kullak-Ublick GA (2005) Coordinate transcriptional regulation of bile acid homeostasis and drug metabolism. *Arch Biochem Biophys* 433(2):397–412.
77. Schlegel A, Lesurtel M, Melloul E, Limani P, Tschuor C, Graf R, Humar B, Clavien PA (2014) ALPPS: from human to mice highlighting accelerated and novel mechanisms of liver regeneration. *Ann Surg* 260(5):837–839.

78. Shi H, Yang G, Zheng T, Wang J, Li L, Liang Y, Xie C, Yin D, Sun B, Sun J, Wang H, Pan S, Jiang H, Lau W, Liu L (2015) A preliminary study of ALPPS procedure in a rat model. *Sci Rep* 5:17567.
79. Li D, Madoff DC (2016) Portal vein embolization for induction of selective hepatic hypertrophy prior to major hepatectomy: rationale, techniques, outcomes and future directions. *Cancer biology & medicine* 13(4):426–442.
80. Fülöp A, Budai A, Czigány Z, Lotz G, Dezsó K, Paku S, Harsányi L, Szigártó A (2015) Alterations in hepatic lobar function in regenerating rat liver. *J Surg Res* 197(2). doi:10.1016/j.jss.2015.04.033.
81. de Graaf W, Bennink RJ, Heger M, Maas A, de Bruin K, van Gulik TM (2011) Quantitative assessment of hepatic function during liver regeneration in a standardized rat model. *J Nucl Med* 52(2):294–302.
82. Olthof PB, Jarnagin WR, van Gulik TM (2017) Acknowledging the flaws to advance with the strengths of ALPPS. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 19(5):473–474.
83. Cieslak KP, Olthof PB, van Lienden KP, Besselink MG, Busch ORC, van Gulik TM, Bennink RJ (2015) Assessment of Liver Function Using (99m)Tc-Mebrofenin Hepatobiliary Scintigraphy in ALPPS (Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy). *Case Rep Gastroenterol* 9(3):353–360.
84. Serenari M, Collaud C, Alvarez FA, De Santibanes M, Giunta D, Pekolj J, Ardiles V, De Santibanes E (2018) Reply to Letter to the Editor: “The HIBA Index for ALPPS, Preliminary Results to Interpret With Caution.” *Ann Surg* 267(5):e98.
85. Alexandrino H, Rolo A, Teodoro JS, Donato H, Martins R, Serodio M, Martins M, Tralhao JG, Caseiro Alves F, Palmeira C, Castro E Sousa F (2017) Bioenergetic adaptations of the human liver in the ALPPS procedure - how liver regeneration correlates with mitochondrial energy status. *HPB* 19(12):1091–1103.

86. Alexandrino H, Varela AT, Teodoro JS, Martins MA, Rolo AP, Tralhao JG, Palmeira CM, Castro E Sousa F (2016) Mitochondrial bioenergetics and posthepatectomy liver dysfunction. *Eur J Clin Invest* 46(7):627–635.
87. Nishikawa T, Bellance N, Damm A, Bing H, Zhu Z, Handa K, Yovchev MI, Sehgal V, Moss TJ, Oertel M, Ram PT, Pipinos II, Soto-Gutierrez A, Fox IJ, Nagrath D (2014) A switch in the source of ATP production and a loss in capacity to perform glycolysis are hallmarks of hepatocyte failure in advance liver disease. *J Hepatol* 60(6):1203–1211.
88. Crescenzo R, Bianco F, Falcone I, Coppola P, Dulloo AG, Liverini G, Iossa S (2012) Mitochondrial energetics in liver and skeletal muscle after energy restriction in young rats. *Br J Nutr* 108(4):655–665.
89. Sagan L (1967) On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* 14(3):255–274.
90. Schwartz RM, Dayhoff MO (1978) Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts. *Science* 199(4327):395–403.
91. Wang Z, Wu M (2015) An integrated phylogenomic approach toward pinpointing the origin of mitochondria. *Sci Rep* 5:7949.
92. McFarland R, Taylor RW, Turnbull DM (2007) Mitochondrial disease--its impact, etiology, and pathology. *Curr Top Dev Biol* 77:113–155.
93. Anand R, Langer T, Baker MJ (2013) Proteolytic control of mitochondrial function and morphogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1833(1):195–204.
94. Kumar A, Dhawan A, Shinde A (2018) Autophagy and Mitochondria: Targets in Neurodegenerative Disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. doi:10.2174/1871527317666180816100203.
95. Prochnicki T, Latz E (2017) Inflammasomes on the Crossroads of Innate Immune Recognition and Metabolic Control. *Cell Metab* 26(1):71–93.

96. Zhang B-F, Xing L, Cui P-F, Wang F-Z, Xie R-L, Zhang J-L, Zhang M, He Y-J, Lyu J-Y, Qiao J-B, Chen B-A, Jiang H-L (2015) Mitochondria apoptosis pathway synergistically activated by hierarchical targeted nanoparticles co-delivering siRNA and lonidamine. *Biomaterials* 61:178–189.
97. Frostner A, Na A, Ss A, Alves M, Dm B, Bm B, Sant'anna B, Ac S, Da B, Da B, Jt B, Gr B, Cb H, Cr H, Sc H, Ip H, Dk H, Sjr H, Yz Z (2018) *Mitochondrial respiratory states and rates: Building blocks of mitochondrial physiology Part 1*.
98. Roger AJ, Munoz-Gomez SA, Kamikawa R (2017) The Origin and Diversification of Mitochondria. *Curr Biol* 27(21):R1177–R1192.
99. Tarasov AI, Griffiths EJ, Rutter GA (2012) Regulation of ATP production by mitochondrial Ca(2+). *Cell Calcium* 52(1):28–35.
100. Wilson DF (2017) Oxidative phosphorylation: regulation and role in cellular and tissue metabolism. *J Physiol* 595(23):7023–7038.
101. Akram M (2014) Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. *Cell Biochem Biophys* 68(3):475–478.
102. Jones JG (2016) Hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetologia* 59(6):1098–1103.
103. Atucha NM, Nadal FJA, Iyu D, Garcia-Estan J (2002) [Role of vascular nitric oxide in experimental liver cirrhosis]. *Nefrologia* 22 Suppl 5:25–28.
104. Papa S, Martino PL, Capitanio G, Gaballo A, De Rasmio D, Signorile A, Petruzzella V (2012) The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria. *Adv Exp Med Biol* 942:3–37.
105. Huang S, Millar AH (2013) Succinate dehydrogenase: the complex roles of a simple enzyme. *Curr Opin Plant Biol* 16(3):344–349.
106. Bezawork-Geleta A, Rohlena J, Dong L, Pacak K, Neuzil J (2017)

- Mitochondrial Complex II: At the Crossroads. *Trends Biochem Sci* 42(4):312–325.
107. Alcazar-Fabra M, Navas P, Brea-Calvo G (2016) Coenzyme Q biosynthesis and its role in the respiratory chain structure. *Biochim Biophys Acta* 1857(8):1073–1078.
 108. Dimroth P, Kaim G, Matthey U (2000) Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F(1)F(o) ATP synthases. *J Exp Biol* 203(Pt 1):51–59.
 109. Jonckheere AI, Smeitink JAM, Rodenburg RJT (2012) Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inherit Metab Dis* 35(2):211–225.
 110. Dyall SD, Brown MT, Johnson PJ (2004) Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* 304(5668):253–257.
 111. Hazkani-Covo E, Zeller RM, Martin W (2010) Molecular Poltergeists: Mitochondrial DNA Copies (numts) in Sequenced Nuclear Genomes. *PLoS Genet* 6(2):e1000834.
 112. Timmis JN, Ayliffe MA, Huang CY, Martin W (2004) Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet* 5(2):123–135.
 113. Jornayvaz FR, Shulman GI (2010) Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem* 47:69–84.
 114. Scarpulla RC (2006) Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem* 97(4):673–683.
 115. Puigserver P, Spiegelman BM (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 24(1):78–90.
 116. Evans MJ, Scarpulla RC (1990) NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded

- respiratory genes in animal cells. *Genes Dev* 4(6):1023–1034.
117. Aleksunes LM, Manautou JE (2007) Emerging role of Nrf2 in protecting against hepatic and gastrointestinal disease. *Toxicol Pathol* 35(4):459–473.
118. Eisenberg-Bord M, Schuldiner M (2017) Ground control to major TOM: mitochondria-nucleus communication. *FEBS J* 284(2):196–210.
119. Wan Z, Root-McCaig J, Castellani L, Kemp BE, Steinberg GR, Wright DC (2014) Evidence for the role of AMPK in regulating PGC-1 alpha expression and mitochondrial proteins in mouse epididymal adipose tissue. *Obesity* 22(3):730–738.
120. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P (2005) Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434(7029):113–118.
121. Iizuka K, Machida T, Hirafuji M (2014) Skeletal muscle is an endocrine organ. *J Pharmacol Sci* 125(2):125–131.
122. Hoffmann C, Weigert C (2017) Skeletal Muscle as an Endocrine Organ: The Role of Myokines in Exercise Adaptations. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7(11). doi:10.1101/cshperspect.a029793.
123. Moran J, Guinan E, McCormick P, Larkin J, Mockler D, Hussey J, Moriarty J, Wilson F (2016) The ability of prehabilitation to influence postoperative outcome after intra-abdominal operation: A systematic review and meta-analysis. *Surgery* 160(5):1189–1201.
124. Benatti FB, Pedersen BK (2015) Exercise as an anti-inflammatory therapy for rheumatic diseases-myokine regulation. *Nat Rev Rheumatol* 11(2):86–97.
125. Starkie R, Ostrowski SR, Jauffred S, Febbraio M, Pedersen BK (2003) Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production in humans.

FASEB J 17(8):884–886.

126. Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Moller K, Pedersen BK (2003) IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(2):E433–7.
127. Dinarello CA (1997) Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 8(4):253–265.
128. Banerjee M, Saxena M (2012) Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: role in type 2 diabetes. *Clin Chim Acta* 413(15-16):1163–1170.
129. Dinarello CA (2000) The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. *N Engl J Med* 343(10):732–734.
130. Little JP, Safdar A, Benton CR, Wright DC (2011) Skeletal muscle and beyond: the role of exercise as a mediator of systemic mitochondrial biogenesis. *Appl Physiol Nutr Metab* 36(5):598–607.
131. Sutherland LN, Bomhof MR, Capozzi LC, Basaraba SAU, Wright DC (2009) Exercise and adrenaline increase PGC-1{alpha} mRNA expression in rat adipose tissue. *J Physiol* 587(Pt 7):1607–1617.
132. Stallknecht B, Vinten J, Ploug T, Galbo H (1991) Increased activities of mitochondrial enzymes in white adipose tissue in trained rats. *Am J Physiol* 261(3 Pt 1):E410–4.
133. Santos-Alves E, Marques-Aleixo I, Rizo-Roca D, Torrella JR, Oliveira PJ, Magalhaes J, Ascensao A (2015) Exercise modulates liver cellular and mitochondrial proteins related to quality control signaling. *Life Sci* 135:124–130.
134. E L, Lu J, Burns JM, Swerdlow RH (2013) Effect of exercise on mouse liver and brain bioenergetic infrastructures. *Exp Physiol* 98(1):207–219.
135. Uittenbogaard M, Chiaramello A (2014) Mitochondrial biogenesis: a therapeutic target for neurodevelopmental disorders and neurodegenerative diseases. *Curr*

Pharm Des 20(35):5574–5593.

136. Roy Chowdhury S, Banerji V (2018) Targeting Mitochondrial Bioenergetics as a Therapeutic Strategy for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Oxid Med Cell Longev* 2018:2426712.
137. Pustynnikov S, Costabile F, Beghi S, Facciabene A (2018) Targeting mitochondria in cancer: current concepts and immunotherapy approaches. *Transl Res* 202:35–51.
138. Lee L, Tran T, Mayo NE, Carli F, Feldman LS (2014) What does it really mean to “recover” from an operation? *Surgery* 155(2):211–216.
139. Wynter-Blyth V, Moorthy K (2017) Prehabilitation: preparing patients for surgery. *BMJ (Clinical research ed)* 358:j3702.
140. Sahoo MR, Gowda MS, Kumar AT (2014) Early rehabilitation after surgery program versus conventional care during perioperative period in patients undergoing laparoscopic assisted total gastrectomy. *J Minim Access Surg* 10(3):132–138.
141. Hoogeboom TJ, Dronkers JJ, Hulzebos EHJ, van Meeteren NLU (2014) Merits of exercise therapy before and after major surgery. *Curr Opin Anaesthesiol* 27(2):161–166.
142. Wilson RJT, Davies S, Yates D, Redman J, Stone M (2010) Impaired functional capacity is associated with all-cause mortality after major elective intra-abdominal surgery. *Br J Anaesth* 105(3):297–303.
143. Robinson TN, Wu DS, Pointer L, Dunn CL, Cleveland JCJ, Moss M (2013) Simple frailty score predicts postoperative complications across surgical specialties. *Am J Surg* 206(4):544–550.
144. Le Roy B, Selvy M, Slim K (2016) The concept of prehabilitation: What the

- surgeon needs to know? *J Visc Surg* 153(2):109–112.
145. Hijazi Y, Gondal U, Aziz O (2017) A systematic review of prehabilitation programs in abdominal cancer surgery. *Int J Surg* 39:156–162.
 146. Cabilan CJ, Hines S, Munday J (2015) The effectiveness of prehabilitation or preoperative exercise for surgical patients: a systematic review. *JBIR database of systematic reviews and implementation reports* 13(1):146–187.
 147. Tretter L, Horvath G, Holgyesi A, Essek F, Adam-Vizi V (2014) Enhanced hydrogen peroxide generation accompanies the beneficial bioenergetic effects of methylene blue in isolated brain mitochondria. *Free Radic Biol Med* 77:317–330.
 148. Pesta D, Gnaiger E (2012) High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods Mol Biol* 810:25–58.
 149. Giglio MC, Giakoustidis A, Draz A, Jawad ZAR, Pai M, Habib NA, Tait P, Frampton AE, Jiao LR (2016) Oncological Outcomes of Major Liver Resection Following Portal Vein Embolization: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Surg Oncol* 23(11):3709–3717.
 150. Tanabe KK (2015) Are we thinking? A commentary on “is partial-ALPPS safer than ALPPS? A single-center experience.” *Ann Surg* 261(4):e93.
 151. Deal R, Frederiks C, Williams L, Olthof PB, Dirscherl K, Keutgen X, Chan E, Deziel D, Hertl M, Schadde E (2018) Rapid Liver Hypertrophy After Portal Vein Occlusion Correlates with the Degree of Collateralization Between Lobes—a Study in Pigs. *J Gastrointest Surg* 22(2):203–213.
 152. Linecker M, Petrowsky H, Clavien P-A (2017) Reply to the Letter: Improving the Safety of ALPPS Procedure: The Optimal Compromise Between Drop-out and Mortality Risk? Comment on: Schadde E et al Prediction of Mortality After ALPPS Stage-1: An Analysis of 320 Patients From the International ALPPS Reg.

Annals of surgery 266(6):e102–e103.

153. Lai Q, Melandro F, Rossi M (2018) Hybrid Partial ALPPS: a Feasible Approach in Case of Right Trisegmentectomy and Macrovascular Invasion. *Ann Surg* 267(4):e80–e82.
154. Li J, Kantas A, Ittrich H, Koops A, Achilles EG, Fischer L, Nashan B (2016) Avoid “All-Touch” by Hybrid ALPPS to Achieve Oncological Efficacy. *Annals of surgery* 263(1):e6–7.
155. Peng S-Y, Wang X-A, Huang C-Y, Zhang Y-Y, Li J-T, Hong D-F, Cai X-J (2017) Evolution of associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy: Simpler, safer and equally effective methods. *World journal of gastroenterology* 23(23):4140–4145.
156. Donati M, Stavrou GA, Oldhafer KJ (2013) Current position of ALPPS in the surgical landscape of CRLM treatment proposals. *World J Gastroenterol* 19(39):6548–6554.
157. Fu D, Mitra K, Sengupta P, Jarnik M, Lippincott-Schwartz J, Arias IM (2013) Coordinated elevation of mitochondrial oxidative phosphorylation and autophagy help drive hepatocyte polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(18):7288–7293.
158. Golse N, Bucur PO, Adam R, Castaing D, Sa Cunha A, Vibert E (2013) New paradigms in post-hepatectomy liver failure. *J Gastrointest Surg* 17(3):593–605.
159. Helling TS (2006) Liver failure following partial hepatectomy. *HPB* 8(3):165–174.
160. Langiewicz M, Schlegel A, Saponara E, Linecker M, Borger P, Graf R, Humar B, Clavien PA (2017) Hedgehog pathway mediates early acceleration of liver regeneration induced by a novel two-staged hepatectomy in mice. *J Hepatol* 66(3):560–570.

161. Langiewicz M, Graf R, Humar B, Clavien PA (2018) JNK1 induces hedgehog signaling from stellate cells to accelerate liver regeneration in mice. *J Hepatol*. doi:10.1016/j.jhep.2018.04.017.
162. Wei W, Zhang T, Zafarnia S, Schenk A, Xie C, Kan C, Dirsch O, Settmacher U, Dahmen U (2016) Establishment of a rat model: Associating liver partition with portal vein ligation for staged hepatectomy. *Surgery* 159(5):1299–1307.
163. de Santibanes E, Alvarez FA, Ardiles V, Pekolj J, de Santibanes M (2016) Inverting the ALPPS paradigm by minimizing first stage impact: the Mini-ALPPS technique. *Langenbecks Arch Surg* 401(4):557–563.
164. Dhar DK, Mohammad GH, Vyas S, Broering DC, Malago M (2015) A novel rat model of liver regeneration: possible role of cytokine induced neutrophil chemoattractant-1 in augmented liver regeneration. *Ann Surg Innov Res* 9:11.
165. Huisman F, van Lienden KP, Damude S, Hoekstra LT, van Gulik TM (2014) A review of animal models for portal vein embolization. *J Surg Res* 191(1):179–188.
166. Formosa LE, Dibley MG, Stroud DA, Ryan MT (2017) Building a complex complex: Assembly of mitochondrial respiratory chain complex I. *Semin Cell Dev Biol*. doi:10.1016/j.semcdb.2017.08.011.
167. Schadde E, Hertl M, Breitenstein S, Beck-Schimmer B, Schlapfer M (2017) Rat Model of the Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy (ALPPS) Procedure. *J Vis Exp* (126). doi:10.3791/55895.
168. Schmucker DL, Sanchez H (2011) Liver Regeneration and Aging: A Current Perspective. *Curr Gerontol Geriatr Res* 2011:526379.
169. Rudolph P, Peters J, Lorenz D, Schmidt D, Parwaresch R (1998) Correlation between mitotic and Ki-67 labeling indices in paraffin-embedded carcinoma specimens. *Hum Pathol* 29(11):1216–1222.

170. Oldhafer F, Ringe KI, Timrott K, Kleine M, Ramackers W, Cammann S, Jager MD, Klempnauer J, Bektas H, Vondran FWR (2016) Monitoring of liver function in a 73-year old patient undergoing “Associating Liver Partition and Portal vein ligation for Staged hepatectomy”: case report applying the novel liver maximum function capacity test. *Patient Saf Surg* 10:16.
171. Olthof PB, van Gulik TM, Bennink RJ (2018) The HIBA Index for ALPPS, Preliminary Results to Interpret With Caution. *Ann Surg* 267(5):e97–e98.
172. Serenari M, Alvarez FA, Ardiles V, de Santibanes M, Pekolj J, de Santibanes E (2018) The ALPPS Approach for Colorectal Liver Metastases: Impact of KRAS Mutation Status in Survival. *Dig Surg* 35(4):303–310.
173. Gnaiger E, Abumrad NA, Acuna-Castroviejo D, Adiele RC, Ahn B, Ali SS, Alton L, Alves MG, Amati F, Amoedo ND, Andreadou I, Aragó M, Aral C, Arandarčikaitė O, Armand AS, Arnould T, Avram VF, Bailey DM, Bajpeyi S, Bajzikova M, Bakker BM, Barlow J, Ac BSS, Batterson P, Battino M, Bazil J, Beard DA, Bednarczyk P, Bello F, Bergdahl A, Berge RK, Bergmeister L, Bernardi P, Berridge MV, Bettinazzi S, Bishop D, Blier PU, Blindheim DF, Boardman NT, Boetker HE, Borchard S, Boros M, Børsheim E, Borutaite V, Botella J, Bouillaud F, Bouitbir J, Boushel RC, Bovard J, Breton S, Brown DA, Brown GC, Brown RA, Brozinick JT, Buettner GR, Burtscher J, Calabria E, Calbet JA, Calzia E, Cannon DT, Canto AC, Cardoso LHD, Carvalho E, Cassar S, Cassina AM, Castelo MP, Castro L, Cavalcanti-de-Albuquerque JP, Cervinkova Z, Chabi B, Chakrabarti L, Chakrabarti S, Chaurasia B, Chen Q, Chicco AJ, Chinopoulos C, Chowdhury SK, Cizmarova B, Clementi E, Coen PM, Cohen BH, Coker RH, Collin A, Crisóstomo L, Dahdah N, Dalgaard LT, Dambrova M, Danhelovska T, Darveau CA, Das AM, Dash RK, Davidova E, Davis MS, De Goede P, De Palma C, Dembinska-Kiec A, Detraux D, Devaux Y, Di Marcello M, Dias TR, Distefano G, Doermann N, Doerrier C, Dong L, Donnelly C, Drahota Z, Duarte FV, Dubouchaud H, Duchon MR, Dumas JF, Durham WJ, Dymkowska D, Dyrstad SE, Dyson A, Dzialowski EM, Eaton S, Ehinger J, Elmer E, Endlicher R, Engin AB, Escames G, Ezrova Z,

Falk MJ, Fell DA, Ferdinandy P, Ferko M, Ferreira JCB, Ferreira R, Ferri A, Fessel JP, Filipovska A, Fisar Z, Fischer C, Fischer M, Fisher G, Fisher JJ, Ford E, Fornaro M, Galina A, Galkin A, Gallee L, Galli GL, Gan Z, Ganetzky R, Garcia-Rivas G, Garcia-Roves PM, Garcia-Souza LF, Garipi E, Garlid KD, Garrabou G, Garten A, Gastaldelli A, Gayen J, Genders AJ, Genova ML, Giovarelli M, da Silva R GT, Goncalves DF, Gonzalez-Armenta JL, Gonzalez-Freire M, Gonzalo H, Goodpaster BH, Gorr TA, Gourlay CW, Granata C, Grefte S, Guarch ME, Gueguen N, Gumeni S, Haas CB, Haavik J, Haendeler J, Haider M, Hamann A, Han J, Han WH, Hancock CR, Hand SC, Handl J, Hargreaves IP, Harper ME, Harrison DK, Hassan H, Hausenloy DJ, Heales SJR, Heiestad C, Hellgren KT, Hepple RT, Hernansanz-Agustin P, Hewakapuge S, Hickey AJ, Ho DH, Hoehn KL, Hoel F, Holland OJ, Holloway GP, Hoppel CL, Hoppel F, Houstek J, Huete-Ortega M, Hyrossova P, Iglesias-Gonzalez J, Irving BA, Isola R, Iyer S, Jackson CB, Jadiya P, Jana PF, Jang DH, Jang YC, Janowska J, Jansen K, Jansen-Dürr P, Jansone B, Jarmuszkiewicz W, Jaskiewicz A, Jedlicka J, Jespersen NR, Jha RK, Jurczak MJ, Jurk D, Kaambre T, Kaczor JJ, Kainulainen H, Kampa RP, Kandel SM, Kane DA, Kapferer W, Kappler L, Karabatsiakos A, Karavaeva I, Karkucinska-Wieckowska A, Kaur S, Keijer J, Keller MA, Keppner G, Khamoui AV, Kidere D, Kilbaugh T, Kim HK, Kim JKS, Klepinin A, Klepinina L, Klingenspor M, Klocker H, Komlodi T, Koopman WJH, Kopitar-Jerala N, Kowaltowski AJ, Kozlov AV, Krajcova A, Kristal BS, Krycer JR, Kuang J, Kucera O, Kuka J, Kwak HB, Kwast K, Laasmaa M, Labieniec-Watala M, Lagarrigue S, Lai N, Land JM, Lane N, Laner V, Lanza IR, Laranjinha J, Larsen TS, Lavery GG, Lazou A, Lee HK, Leeuwenburgh C, Lehti M, Lemieux H, Lenaz G, Lerfall J, Li PA, Liepins E, Liu J, López LC, Lucchinetti E, Ma T, Macedo MP, Maciej S, La MM-C, Majtnerova P, Makarova E, Makrecka-Kuka M, Malik AN, Markova M, Martin DS, Martins AD, Martins JD, Maseko TE, Maull F, Mazat JP, Mc Kenna HT, Mc Kenzie M, Menze MA, Merz T, Meszaros AT, Methner A, Michalak S, Moellering DR, Moiso N, Molina AJA, Montaigne D, Moore AL, Moreau K, Moreno-Sánchez R, Moreira BP, Mracek T, Muccini AM, Munro D, Muntane J,

Muntean DM, Murray AJ, Musiol E, Nabben M, Nair KS, Nehlin JO, Nemeč M, Neuffer PD, Neuzil J, Neviere R, Newsom SA, Nozickova K, O'Brien KA, O'Gorman D, Olgar Y, Oliveira B, Oliveira MF, Oliveira MT, Oliveira PF, Oliveira PJ, Orynbayeva Z, Osiewacz HD, Pak YK, Pallotta ML, Palmeira CM, Parajuli N, Passos JF, Passrigger M, Patel HH, Pavlova N, Pecina P, Pedersen TM, da Silva F P da SG, Pereira SP, Ja PV, Perks KL, Pesta D, Petit PX, Pettersen IKN, Pichaud N, Pichler I, Piel S, Pietka TA, Pino MF, Pirkmajer S, Plangger M, Porter C, Porter RK, Procaccio V, Prochownik EV, Prola A, Pulinilkunnil T, Puskarich MA, Puurand M Mitochondrial respiratory states and rates. doi:10.26124/mitofit:190001.v3.

174. Frostner A, Alves M, Dm B, Bm B, Sant'anna B, Ac S, Battino M, Gorr T, Gourlay C, Cb H, Dk H, Kt H, Cl H, Gonzalez I, Ba I, Cb J, Dh J, Nr J, Rk J, Wüst R (2018) *Mitochondrial respiratory states and rates: Building blocks of mitochondrial physiology MitoEAGLE Network Supporting co-authors.*
175. Katoh T, Tanaka M, Nimura Y, Kanai M, Nagino M, Ozawa T (1991) Enhancement of rat liver mitochondrial function by portal branch ligation secures subsequent extended hepatectomy. *Biochem Int* 24(1):107—116.
176. Mills EL, Kelly B, O'Neill LAJ (2017) Mitochondria are the powerhouses of immunity. *Nat Immunol* 18(5):488–498.
177. Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC (2005) Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol* 25(4):1354–1366.
178. Scarpulla RC (2011) Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta* 1813(7):1269–1278.
179. Gonzalez-Donquiles C, Alonso-Molero J, Fernandez-Villa T, Vilorio-Marques L, Molina AJ, Martin V (2017) The NRF2 transcription factor plays a dual role in

- colorectal cancer: A systematic review. *PLoS One* 12(5):e0177549.
180. Palomer X, Alvarez-Guardia D, Rodriguez-Calvo R, Coll T, Laguna JC, Davidson MM, Chan TO, Feldman AM, Vazquez-Carrera M (2009) TNF-alpha reduces PGC-1alpha expression through NF-kappaB and p38 MAPK leading to increased glucose oxidation in a human cardiac cell model. *Cardiovasc Res* 81(4):703–712.
 181. Alvarez-Guardia D, Palomer X, Coll T, Davidson MM, Chan TO, Feldman AM, Laguna JC, Vazquez-Carrera M (2010) The p65 subunit of NF-kappaB binds to PGC-1alpha, linking inflammation and metabolic disturbances in cardiac cells. *Cardiovasc Res* 87(3):449–458.
 182. Spiegelman BM (2007) Transcriptional control of mitochondrial energy metabolism through the PGC1 coactivators. *Novartis Found Symp* 287:60–69.
 183. Li PA, Hou X, Hao S (2017) Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration. *J Neurosci Res* 95(10):2025–2029.
 184. Gometz A, Maislen D, Youtz C, Kary E, Gometz EL, Sobotka S, Choudhri TF (2018) The Effectiveness of Prehabilitation (Prehab) in Both Functional and Economic Outcomes Following Spinal Surgery: A Systematic Review. *Cureus* 10(5):e2675.
 185. Thirupathi A, de Souza CT (2017) Multi-regulatory network of ROS: the interconnection of ROS, PGC-1 alpha, and AMPK-SIRT1 during exercise. *J Physiol Biochem*. doi:10.1007/s13105-017-0576-y.
 186. Ojuka EO (2004) Role of calcium and AMP kinase in the regulation of mitochondrial biogenesis and GLUT4 levels in muscle. *Proc Nutr Soc* 63(2):275–278.
 187. Gehrke N, Hövelmeyer N, Waisman A, Straub BK, Weinmann-Menke J, Wörns MA, Galle PR, Schattenberg JM (2018) Hepatocyte-specific deletion of IL1-RI

- attenuates liver injury by blocking IL-1 driven autoinflammation. *J Hepatol* 68(5):986–995.
188. Chennaoui M, Drogou C, Gomez-Merino D (2008) Effects of physical training on IL-1beta, IL-6 and IL-1ra concentrations in various brain areas of the rat. *Eur Cytokine Netw* 19(1):8–14.
189. Tilg H, Moschen AR, Szabo G (2016) Interleukin-1 and inflammasomes in alcoholic liver disease/acute alcoholic hepatitis and nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 64(3):955–965.
190. Lawrence T (2009) The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(6):a001651.
191. Friedman JR, Nunnari J (2014) Mitochondrial form and function. *Nature* 505(7483):335–343.

10. A jelölt publikációi

A disszertáció alapjául szolgáló publikációk:

1. Budai A, Fulop A, Hahn O, Onody P, Kovacs T, Nemeth T, *et al.* Animal Models for Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy (ALPPS): Achievements and Future Perspectives. *Eur Surg Res. Switzerland*; 2017; **58**: 140–157. **(Q2)**
2. Budai A, Horvath G, Tretter L, Radak Z, Koltai E, Bori Z, *et al.* mitokondrial function after associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy in an experimental model. *Br J Surg. England*; 2019 Jan; **106**: 120–131. **(D1)**

A jelölt egyéb publikációi:

1. Fulop A, Szijarto A, Harsanyi L, Budai A, Pekli D, Korsos D, *et al.* Demonstration of metabolic and cellular effects of portal vein ligation using multi-modal PET/MRI measurements in healthy rat liver. *PLoS One. United States*; 2014; **9**: e90760. **(Q1)**
2. Fulop A, Budai A, Czigany Z, Lotz G, Dezso K, Paku S, *et al.* Alterations in hepatic lobar function in regenerating rat liver. *J Surg Res. United States*; 2015 Aug; **197**: 307–317. **(Q1)**
3. Lauber DT, Tihanyi DK, Czigany Z, Kovacs T, Budai A, Drozgyik D, *et al.* Liver regeneration after different degrees of portal vein ligation. *J Surg Res. United States*; 2016 Jun; **203**: 451–458. **(Q2)**

11. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Szijártó Attilának az elmúlt 8 év folyamán nyújtott segítségét, tanácsait, támogatását. Dr. Fülöp Andrásnak a kísérletek, valamint a publikációk elkészítése során nyújtott fáradhatatlan segítségét és iránymutatását. Dr. Kovács Tibornak és Dr. Tihanyi Dórának a barátságukat és professzionalizmusukat, amely nélkül a doktori képzésben töltött évek nehezen teltek volna. Dr. Lukáts Ákosnak, aki nem csak a tudományban, hanem az üzletben is remek partner. Dr. Kiss Andrásnak, Dr. Vass Lászlónak, Dr. László Renátának, Dr. Horváth Ilonának és Dr. Horváth Rékának amiért mentorálásukkal segítettek és a mai napig is segítenek a patológia rejtelseinek megismerésében. Kontsek Endrének és Pesti Adriánnak, akik évek óta társaim a bajban itthon és külföldön egyaránt. Dr. Fűri Istvánnak és Dr. Tornai Dávidnak (Worcester-team) a hajnalig tartó műszakok közepette is remek laborhangulatot és az eszeveszett munkatempót. Családomnak, hogy mindvégig mellettem álltak a nehézségek és gyakran a távolság ellenére is.