

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# Hepatoportoenterostomia în atrezia biliară – studiu clinic și experimental

Doctorand **Raluca-Cristina Apostu**

---

Conducător de doctorat Prof.dr. **Constantin Ciuce**

---

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
**IULIU HAȚIEGANU**  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	15
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Atrezia biliară-date generale</b>	19
1.1. Epidemiologie	19
1.2. Variante ale atreziei biliare	19
1.3. Embriologie	20
1.4. Etiopatogeneză	21
<b>2. Diagnostic</b>	21
2.1. Evaluarea clinică	22
2.2. Evaluari de laborator	22
2.3. Evaluarea imagistică	22
2.4. Biopsia hepatică	23
<b>3. Scoruri în diagnostic și monitorizare</b>	24
<b>4. Tratament</b>	24
4.1. Hepatoportoenterostomia (HPE)	25
4.2. Revizia HPE	27
4.3. Proceduri alternative la HPE	28
<b>5. Tratament postoperator</b>	29
<b>6. Supraviețuire cu ficat nativ</b>	30
6.1. Vârsta la diagnostic	30
6.2. Drenajul biliar postoperator	31
6.3. Complicații	32
<b>7. Supraviețuire pe termen lung</b>	34
<b>8. Factori de prognostic</b>	36
8.1. Biomarkeri preoperatori	36
8.2. Biomarkeri postoperatori	39
<b>9. Indicațiile transplantului hepatic</b>	40
<b>10. Modele experimentale</b>	42
10.1. Inducerea atreziei biliare	42
10.2. Reconstrucția căilor biliare	42
10.3. Selecția animalelor	43
10.4. Anatomia	43
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
<b>1. Ipoteza de lucru</b>	47
<b>2. Metodologie generală</b>	49
<b>3. Studiul 1 – Evaluarea hepatoportoenterostomiei la copiii cu atrezie biliară – analiză biologică și histologică</b>	55
3.1. Introducere	55
3.2. Ipoteza de lucru	55

3.3. Material și metodă	56
3.4. Rezultate	61
3.5. Discuții	73
3.6. Concluzii	77
<b>4. Studiul 2 – Crearea unui model experimental de hepatoportoenterostomie pe ficat cu colestază la șobolan</b>	79
4.1. Introducere	79
4.2. Ipoteza de lucru	80
4.3. Material și metodă	80
4.4. Rezultate	85
4.5. Discuții	87
4.6. Concluzii	90
<b>5. Studiul 3 – Evaluarea modificărilor hepatice la 30 zile după ligatura selectivă de ducte biliare la șobolan</b>	91
5.1. Introducere	91
5.2. Ipoteza de lucru	92
5.3. Material și metodă	92
5.4. Rezultate	95
5.5. Discuții	107
5.6. Concluzii	110
<b>6. Discuții generale</b>	111
<b>7. Concluzii generale</b>	113
<b>8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	115
<b>REFERINȚE</b>	117
<b>ANEXE</b>	125
Anexa 1	125
Anexa 2	126

**Cuvinte cheie:** hepatoportoenterostomie, atrezia biliară, transplant, colestază, fibroză, TGF- $\beta$ 1,  $\alpha$ -SMA, experimental

# INTRODUCERE

Atrezia biliară este o patologie rară neonatală, a cărei etiologie nu a fost elucidată până în prezent, în pofida numeroaselor studii efectuate. Această patologie înglobează o multitudine de fenotipuri care se exprimă prin caracteristici clinice comune, dar diferă prin evoluție și supraviețuire.

Subiectul prezintă importanță prin evoluția nefavorabilă a nou-născuților diagnosticați tardiv, în absența unui gest chirurgical corector pentru drenajul biliar.

Cea mai mare supraviețuire la pacienții cu atrezie biliară se înregistrează după transplantul hepatic. Efectuarea acestuia este condiționată de disponibilitatea donatorilor, dimensiunile grefei și starea generală a primitorului. Hepatoportoenterostomia, chiar și la vârste avansate, asigură supraviețuirea pe termen lung la 50% dintre pacienți, la celelalte cazuri permițând temporizarea transplantului astfel încât mortalitatea să fie minimă.

Având în vedere raritatea patologiei, efectuarea hepatoportoenterostomiei este de preferat să se realizeze în centre cu experiență, de către echipe specializate. Complexitatea managementului cazurilor cu necesar de transplant hepatic obligă la realizarea acestuia doar în centrele specializate. În România există doar două centre specializate în efectuarea transplantului hepatic, la București și Iași. La nivel național, datele privind prevalența atreziei biliare sunt nedefinite. În prezent, nu există o raportare unitară a acestor cazuri. O incidență similară cu cea raportată la nivel european este de așteptat.

Multe modele experimentale se asociază cu condiții specializate de manipulare. Reproducerea, chiar și parțial a modificărilor caracteristice atreziei biliare pe un model accesibil și fiabil, utilizând un animal rezistent, cu caracteristici anatomice asemănătoare sistemelor umane, de dimensiuni corespunzătoare și, mai mult, definirea unui model de hepatoportoenterostomie, este necesară în vederea asigurării accesibilității și continuării studiului mecanismelor implicate. Până în prezent reproducerea anastomozei în maniera celei pediatrice nu s-a descris pe modele experimentale și nu se regăsește în multiplele studii legate de reconstrucția căilor biliare.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

În partea de contribuție personală sunt incluse trei studii – un studiu clinic și două studii experimentale. Studiul clinic s-a realizat pe baza formularului de consimțământ informat, în conformitate cu Declarația de la Helsinki privind studiile clinice. Protocoalele experimentale au respectat ghidurile naționale și internaționale privind îngrijirea și utilizarea animalelor de laborator. Acestea au fost aprobate de comisia de etică a Universității de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca (81/01.02.2018) și respectă Declarația de la Helsinki privind studiile pe animale.

### **Studiul 1. Evaluarea hepatoportoenterostomiei la copiii cu atrezie biliară – analiză biologică și histologică**

**Introducere.** Metodele de tratament disponibile în prezent în atrezia biliară sunt paliative. O dată cu stabilirea diagnosticului, tratamentul de primă intenție constă în efectuarea

hepatoportointerostomie de urgență. Eficiența procedurii este dependentă de precocitatea diagnosticului, experiența echipei chirurgicale, stadiul bolii la diagnostic. Acest studiu a avut drept scop evaluarea hepatoportointerostomie prin analiza pacienților cu atrezie biliară la care s-a efectuat procedeul chirurgical, din punct de vedere al evoluției, parametrilor biochimici, infecției cu citomegalovirus (CMV), complicațiilor, necesității transplantului și supraviețuirii.

**Material și metodă.** S-au evaluat retrospectiv 14 pacienți cu suspiciunea diagnostică de atrezie biliară, confirmare intraoperatorie diagnostică și efectuare a hepatoportointerostomie. Pacienții au fost investigați și monitorizați în cadrul Spitalului Clinic de Urgență pentru copii, Clinica Pediatrie II, iar intervenția chirurgicală s-a efectuat la Spitalul Clinic Județean de Urgență, Clinica Chirurgie I, în perioada 2010-2016. Suspiciunea diagnostică s-a stabilit prin analiză biochimică și imagistică. La toți pacienții explorarea chirurgicală a confirmat diagnosticul, cu efectuarea intervenției și a biopsiei hepatice. Parametrii biochimici au fost înregistrați pre- și postoperator. Pacienții au fost monitorizați la 1, 3, 6, 12 luni, ulterior anual sau în caz de apariție a complicațiilor. Supraviețuirea s-a evaluat până la 4 ani postoperator.

**Rezultate.** Ecografia a necesitat completare cu MRCP în 5 cazuri în vederea stabilirii diagnosticului. Scorul Metavir s-a evaluat preoperator astfel: F4 la 8 pacienți (57%), F3 la 4 pacienți (29%) și F2 la 2 pacienți (14%). La 4 ani postoperator 75% dintre pacienții cu F4 au necesitat transplant, la toți ceilalți pacienți înregistrându-se o avansare în grad, fără a se atinge gradul maxim. Vârsta medie la diagnostic a fost de 70 de zile. S-a identificat o corelație semnificativă între vârsta la intervenția chirurgicală < 60 de zile și supraviețuirea ( $p=0.02$ ). Valorile gamma-glutamil-transferazei (GGT) au fost nemodificate la 2 pacienți la prezentare. Valorile bilirubinei totale (BT) și directe (BD) au prezentat o variație semnificativă la pacienții cu transplant comparativ cu cei cu ficat nativ ( $p=0.02$ ). Raportul BD/BT nu a prezentat diferențe semnificative între cele două grupuri ( $p>0.05$ ). Rata de remisie a icterului a fost semnificativ mai mare la 6 luni postoperator față de prima lună postoperator ( $p=0.005$ ). Intraoperator, la toți pacienții s-a identificat un ficat nodular, cirotic, cu stază biliară marcată. Histopatologic s-au identificat malformație de placă ductală, proliferare ductulară marcată, dopuri biliare ductale, fibroză în punți, noduli de regenerare. Celulele stelate hepatice Ito au produs  $\alpha$ -SMA, fiind intens pozitive. Opt pacienți au fost IgM-CMV pozitivi, cu supraviețuire semnificativ mai mare comparativ cu cei negativi ( $p=0.04$ ), în context de transplant. Transplantul s-a realizat la 6 pacienți în centre de specialitate. Supraviețuirea pacienților transplantați a fost semnificativ mai mare decât a pacienților cu ficat nativ ( $p=0.004$ ). Supraviețuirea cu ficat nativ la 4 ani a fost de 75%.

**Concluzii.** Vârsta medie la diagnostic a fost în intervalul optim intervenției chirurgicale, deși analiza s-a efectuat într-un centru cu volum redus de cazuri. Hepatoportointerostomia temporizează evoluția bolii, nu o sistează. Efectuarea intervenției între 45-60 de zile postnatal se însoțește de cele mai bune rezultate pe termen lung. Remisia parțială a icterului postoperator nu reduce supraviețuirea pe termen lung cu ficat nativ. GGT poate fi considerat marker de severitate a bolii. Asocierea infecției cu CMV este urmată de evoluție nefavorabilă pe termen scurt și necesar de transplant.

**Studiul 2. Crearea unui model experimental de hepatoportointerostomie pe ficat cu colestază la șobolan**

**Introducere.** Singura modalitate eficientă de rezolvare pe termen lung a colestazei din atrezia biliară este transplantul hepatic. Acesta nu este însă larg accesibil, fiind însoțit și de dificultăți tehnice la recipienți de mici dimensiuni, necesitatea imunosupresiei sau apariția complicațiilor. Progrese s-au obținut cu ajutorul tehnicilor chirurgicale cu rol intermediar, precum hepatoportoenterostomia. Acest studiu a avut drept scop definirea unui model experimental de hepatoportoenterostomie, după inducerea colestazei prin ligatura selectivă a ductelor biliare.

**Material și metodă.** Modelul a fost conceput ca un procedeu microchirurgical în doi timpi. S-au utilizat 20 de șobolani Wistar, la care în prima etapă s-a indus colestaza hepatică prin rezecția între ligaturi a ductelor biliare. Ligatura s-a realizat selectiv, la doi lobi hepatici din patru, median și stâng lateral, proximal și la 0.5 cm distal, cu rezecția segmentului ductal dintre ligaturi. S-a evaluat prezența conexiunilor parenchimotoase, în vederea secționării la identificare.

După 30 de zile, în a doua etapă, s-a reintervenit chirurgical la 16 șobolani, cu explorarea hilului hepatic. Lotul de control a fost alcătuit din patru șobolani, la care s-a practicat rezecția ductelor biliare. Țesutul fibros identificat la nivelul hilului celor doi lobi ligaturați s-a excizat, împreună cu o ramă de parenchim hepatic adiacent. La acest nivel s-a efectuat hepatoportoenterostomia, cu ajutorul unei anse jejunale, care s-a preparat pentru montajul în Y a la Roux. Intraoperator s-a practicat biopsie hepatică. După 7 zile s-a reintervenit chirurgical și s-a evaluat macroscopic anastomoza.

Piesele de biopsie hepatică au fost fixate în soluție de formaldehidă 10%, pentru examinare histopatologică. Piesele au fost colorate cu hematoxilină-eozină, iar imunohistochimic s-a evaluat expresia  $\alpha$ -SMA și TGF- $\beta$ 1.

**Rezultate.** Modelul a fost viabil în 90% din cazuri. Decesul s-a înregistrat secundar hemoragiei intraoperatorii, în cursul celei de-a doua intervenții chirurgicale. Nu s-au evidențiat conexiuni parenchimotoase între lobi hepatici. Intraoperator s-au identificat aderențe la nivelul hilului hepatic. La nivelul zonelor de rezecție a ductelor biliare s-a identificat țesut fibros, care s-a excizat. La evaluarea anastomozei nu s-a evidențiat dehiscentă sau peritonită biliară. Ficatul a prezentat microscopic fibroză incipientă, cu colestază cronică, moderată și expresia celulară a  $\alpha$ -SMA și TGF- $\beta$ 1, markeri de fibroză.

**Concluzii.** Ligatura selectivă a ductelor biliare la șobolan declanșează formarea fibrozei și expresia markerilor specifici. Hepatoportoenterostomia se poate realiza în maniera celei pediatrice prin abord microchirurgical. Prototipul este viabil, reproductibil și permite atât studiul patologiilor colestatice, cât și al modificărilor hepatice post-hepatoportoenterostomie. Studiul diverselor terapii postoperatorii se poate lua în considerare.

### **Studiul 3. Evaluarea modificărilor hepatice la 30 de zile după ligatură selectivă de ducte biliare la șobolan**

**Introducere.** Supraviețuirea în atrezia biliară este dependentă de evoluția fibrozei, chiar și după efectuarea hepatoportoenterostomiei, dar și de vârsta la intervenția chirurgicală. Studii recente promovează ca interval optim operator cel de 30-45 de zile postnatal. Regenerarea hepatică se poate realiza prin intermediul celulelor stem sau al miofibroblaștilor. Celulele stelate hepatice prezintă rol principal în fibrogeneză, fiind implicate în interacțiuni complexe intercelulare, caracterizate prin expresia de markeri specifici. Ligatura ductelor biliare la șobolan reprezintă un

model inductor al modificărilor fibrotice portale și proliferării ductelor biliare asemănător atreziei biliare. Scopul acestui studiu a constat în evaluarea efectului ligaturii supra-selective a ductelor biliare asupra evoluției fibrozei și a colestazei la șobolan, la un interval de timp optim pentru o posibilă intervenție chirurgicală.

Evaluarea răspunsului hepatic la obstrucția biliară este important prin posibilitatea de a interveni terapeutic, dar și a identifica noi metode de tratament, în contextul absenței terapiilor antifibrotice eficiente.

**Material și metodă.** Protocolul experimental este asemănător cu cel descris în studiul 2, prima etapă. În zilele 7, 14 și 30 s-au recoltat probe biologice pentru determinarea nivelurilor serice ale transaminazei glutamoxalacetice (TGO), transaminazei glutampiruvice (TGP), bilirubinei (BT), gamma-glutamyltransferazei (GGT), fosfatazei alcaline (FA). Ulterior șobolanii au fost sacrificați, iar lobiile hepatice (ligaturați și indemni) au fost prelevați și fixați în soluție de formaldehidă 10%, ulterior în parafină. Pentru examinare au fost secționati și colorați cu hematoxilină-eozină. Imunohistochimic s-a evaluat expresia  $\alpha$ -SMA și TGF- $\beta$ 1 la nivel celular, prin incubare cu anticorpi monoclonali specifici, iar fibroza s-a încadrat în grade conform scorului Batts-Ludwig. Analiza s-a realizat cu ajutorul unui microscop optic. S-au evaluat comparativ modificările la nivelul lobilor cu obstrucție biliară și a celor indemni.

**Rezultate.** Transaminazele (TGO, TGP) și FA au prezentat o creștere treptată a valorilor, cu maxim în ziua 30. Valorile BT și GGT s-au menținut la limita superioară a intervalului normal. TGO și TGP au prezentat în ziua 30 valori semnificativ mai mari comparativ cu controlul și dozările anterioare ( $p < 0.05$ ). Colestaza a fost susținută prin creșterea FA, semnificativă la 7 și 30 de zile ( $p < 0.05$ ). Valorile BT și GGT au fost semnificativ mai mari la 7 și 30 de zile, comparativ cu controlul ( $p < 0.05$ ). Examinarea histopatologică a pus în evidență în hematoxilină-eozină hiperplazia celulelor Kupffer la nivel sinusoidal și celule stelate activate Ito periportal și intralobular focal. La nivelul lobilor obstruați, TGF- $\beta$ 1 a fost exprimat de celulele sinusoidale, celulele plasmocitoide din spațiile portale, difuz în citoplasma hepatocitelor și la polul biliar al hepatocitelor centrolobulare, sub formă de granule citoplasmice. Celulele Ito au fost TGF- $\beta$ 1 pozitive. Apoptoza a fost documentată prin identificarea hepatocitelor eliminate în lumenul sinusoidal, intens pozitive la TGF- $\beta$ 1. Celulele Ito transformate miofibroblastice au fost intens pozitive pentru  $\alpha$ -SMA, expresia fiind mai redusă la nivelul hepatocitelor adiacente. Markerul a fost difuz exprimat în celulele stelate periportale și la nivelul plăcii bordante periportale. La nivelul lobilor indemni TGF- $\beta$ 1 a fost exprimat de hepatocitele centrolobulare și mediolobulare, iar  $\alpha$ -SMA a fost pozitiv în peretele vaselor portale. Fibroza a fost semnificativă la nivelul lobilor ligaturați ( $p < 0,05$ ). Principalele celule cu expresie TGF- $\beta$ 1 au fost celulele Ito ( $p=0.001$ ) și hepatocitele mediolobulare ( $p=0.04$ ) în parenchimul obstruat. Celulele Ito au exprimat semnificativ și  $\alpha$ -SMA în parenchimul obstruat ( $p=0.035$ ).

**Concluzii.** Prezența fibrozei a fost demonstrată la 30 de zile de la ligatura selectivă a ductelor biliare la șobolan, prin identificarea celulelor cu rol principal în declanșarea și producerea fibrozei și expresia markerilor specifici  $\alpha$ -SMA și TGF- $\beta$ 1. Modificările decelate în evoluție, histologic și biochimic, au fost particulare, diferite de alte modele colestatice. Acest model permite evaluarea diverselor terapii țintite pe celule sau mecanisme implicate în fibrogeneză.

## Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Aceasta teză evidențiază rolul hepatoportoenterostomiei în managementul pacienților cu atrezie biliară, cu evidențierea posibilității de a obține rezultate pe termen lung comparabile cu centrele specializate, corelate cu diferiți biomarkeri implicați în mecanismele patogenetice ale acestei afecțiuni.

Implementarea hepatoportoenterostomiei pe model animal *in vivo* este originală și deschide calea cercetărilor având ca rezultat prelungirea supraviețuirii acestor pacienți. Analiza modelului de colestatică prin ligatura selectivă de ducte biliare, definește un model experimental inovativ, care poate fi utilizat în studiul diferitelor patologii colestatice. Unul dintre avantajele majore ale acestuia constau în posibilitatea monitorizării modificărilor hepatice și a controlului pe același animal.

Crearea modelului experimental de hepatoportoenterostomie, efectuată pe ficat colestatic este originală. Abordul microchirurgical a permis efectuarea unui prototip accesibil și reproductibil.

Evaluarea extensivă a acestui model este necesară, cu analiza modificărilor hepatice postoperatorii, a complicațiilor și avantajelor pe termen lung. Ne propunem să realizăm acest lucru prin studii post-doctorale viitoare.

Atrezia biliară prezintă numeroase aspecte neelucidate, rolul tratamentului chirurgical fiind major în supraviețuire. Limitările acestuia prin existența unor factori încă necaracterizați, care intervin la pacienții fără rezultat, obligă la continuarea cercetărilor în acest sens.

Evaluarea clinică prezintă limitări prin înregistrarea și analiza pacienților dintr-un singur centru de volum redus, fără a permite o analiză multicentrică. În cadrul modelului *in vivo* limitările constau în absența rezultatelor pe termen lung.

Aceasta teză a realizat o evaluare de ansamblu a unei proceduri cu rol esențial în managementul unei patologii rare, evaluare atât clinică, cât și experimentală. Extensia acestor cercetări va permite o definiție precisă a managementului acestor pacienți și elaborarea de protocoale, atât de necesare în această patologie rară.



---

PhD THESIS SUMMARY

# Hepatoportoenterostomy in biliary atresia – clinical and experimental study

PhD student **Raluca-Cristina Apostu**

---

PhD supervisor Prof.dr. **Constantin Ciuce**

---

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
**IULIU HAȚIEGANU**  
CLUJ-NAPOCA

# TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	15
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	
<b>1. Biliary atresia-general data</b>	19
1.1. Epidemiology	19
1.2. Biliary atresia variants	19
1.3. Embryology	20
1.4. Ethioptogenesis	21
<b>2. Diagnostic</b>	21
2.1. Clinical evaluation	22
2.2. Laboratory evaluations	22
2.3. Imaging evaluation	22
2.4. Liver biopsy	23
<b>3. Scores in diagnosis and monitoring</b>	24
<b>4. Treatment</b>	25
4.1. Hepatportoenterostomy (HPE)	25
4.2. HPE revision	27
4.3. Alternative procedures to HPE	28
<b>5. Postoperative treatment</b>	29
<b>6. Native liver survival</b>	30
6.1. Age at diagnosis	30
6.2. Postoperative biliary drainage	31
6.3. Complications	32
<b>7. Long-term survival</b>	34
<b>8. Prognostic factors</b>	36
8.1. Preoperative biomarkers	36
8.2. Postoperative biomarkers	39
<b>9. Indications for liver transplantation</b>	40
<b>10. Experimental models</b>	41
10.1. Induction of biliary atresia	42
10.2. Bile duct reconstruction	42
10.3. Animal selection	43
10.4. Anatomy	43
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	

<b>1. Study hypothesis</b>	47
<b>2. Research method</b>	49
<b>3. Study 1 – Evaluation of hepatportoenterostomy in children with biliry atresia – biological and histological analysis</b>	55
3.1. Introduction	55
3.2. Study hypothesis	55
3.3. Material and method	56
3.4. Results	61
3.5. Discussions	72
3.6. Conclusions	77
<b>4. Study 2 – Creation of an experimental model of hepatportoenterostomy on liver with cholestasis in rats</b>	79
4.1. Introduction	79
4.2. Study hypothesis	80
4.3. Material and method	80
4.4. Results	85
4.5. Discussions	86
4.6. Conclusions	90
<b>5. Study 3 – Assessment of hepatic changes 30 days after selective bile duct ligation in rats</b>	91
5.1. Introduction	91
5.2. Study hypothesis	92
5.3. Material and method	92
5.4. Results	94
5.5. Discussions	106
5.6. Conclusions	110
<b>6. General discussions</b>	111
<b>7. General conclusions</b>	113
<b>8. Originality and innovative contributions of the thesis</b>	115
<b>REFERENCES</b>	117
<b>ANNEXES</b>	125
Annex 1	125
Annex 2	126
Annex 3	127

**Keywords:** hepatportoenterostomy, biliary atresia, transplant, cholestasis, fibrosis, TGF- $\beta$ 1,  $\alpha$ -SMA, experimental

# INTRODUCTION

Biliary atresia is a rare neonatal pathology that has not been elucidated to date. Despite the many studies conducted and the new elements related to the etiology or evolution, which are detected with each research and which have different connections with the disease, many questions remain.

The subject is important through the multiples unknown related to the disease, as well as through the group of patients. Given the pediatric impairment, with the need to conduct studies, investigations, evaluations, all nearly invasive, on a fragile population with ethical implications, conducting randomized trials or even research on batches of medium/large patients is difficult.

The highest survival in these patients is post-transplant. The availability of donors, the size of the transplant and the general condition of the recipient are conditioning its performance. Hepatoportoenterostomy, even in old age, ensures long-term survival in 50% of patients, in other cases allowing the timing of the transplant so that mortality is minimal.

Given the growing need to centralize cases so that specialized teams can perform the management, the purpose of the clinical study was to analyze hepatoportoenterostomy in cases of biliary atresia in a low-volume center, comparing results with other specialized centers, in the idea of identifying the factors that influence long-term survival and defining issues that need updating.

Many experimental models are associated with specialized handling conditions. Even partial reproduction of changes in biliary atresia on an accessible and reliable model, using a resilient animal with human-like anatomical features of appropriate size and, moreover, the definition of a hepatoportoenterostomy model, is necessary to ensure accessibility and further study of the mechanisms. To date, the reproduction of anastomosis in the pediatric manner has not been described in experimental models and is not found in multiple studies related to the bile duct reconstruction.

## PERSONAL CONTRIBUTION

The personal contribution part includes three studies – one clinical and two experimental studies. The experimental protocols were developed in accordance with national and international guidelines for the care and use of laboratory animals. The studies were approved by the Ethics Committee of the “Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca (81/01.02.2018) and they follow the Declaration of in Helsinki on animal studies.

### **Study 1. Evaluation of hepatoportoenterostomy in children with biliary atresia – biological and histological analysis**

**Introduction.** The treatment methods currently available in biliary atresia are palliative. Once the diagnosis is established, the first-line treatment consists of performing an emergency hepatoportoenterostomy. The efficiency of the procedure depends on the precocity of the diagnosis,

the experience of the surgical team and the stage of the disease at diagnosis. This study aimed to evaluate hepatoportoenterostomy by analyzing patients with biliary atresia who underwent surgery, in terms of evolution, biochemical parameters, cytomegalovirus (CMV) infection, complications, need for transplantation and survival.

**Material and method.** We retrospectively evaluated 14 patients with the diagnostic suspicion of biliary atresia, intraoperative diagnostic confirmation and hepatoportoenterostomy performed. The patients were investigated and monitored in the Emergency Clinical Hospital for Children, Pediatric Clinic II and the surgery was performed at the Emergency County Clinical Hospital, First Surgical Clinic, during 2010-2016. The diagnostic suspicion was established by biochemical and imaging analysis. In all patients, intraoperative exploration confirmed the diagnosis and surgical procedure and liver biopsies were performed. Biochemical parameters were recorded pre- and postoperatively. Patients were monitored at 1, 3, 6, 12 months, then annually or in case of complications. Survival was assessed for up to 4 years postoperatively.

**Results.** Ultrasound required supplementation with MRCP in 5 cases to establish the diagnosis. The Metavir score was assessed preoperatively as follows: F4 in 8 patients (57%), F3 in 4 patients (29%) and F2 in 2 patients (14%). At 4 years postoperatively, 75% of patients with F4 required transplantation, with all other patients registering a degree of advancement, without reaching the maximum degree. The mean age at diagnosis was 70 days. A significant correlation was identified between age at surgery <60 days and survival ( $p=0.02$ ).

Gamma-glutamyl-transferase (GGT) values were unchanged in 2 patients at presentation. Total (BT) and direct (BD) bilirubin values showed a significant variation in transplant patients compared to those with native liver ( $p=0.02$ ). The BD/BT ratio did not show significant differences between the two groups ( $p>0.05$ ). The jaundice remission rate was significantly higher at 6 months postoperatively compared to the first month postoperatively ( $p=0.005$ ).

Intraoperatively, a nodular, cirrhotic liver with marked biliary stasis was identified in all patients. Histopathologically, ductal plaque malformation, marked ductular proliferation, ductal bile plugs, bridged fibrosis, regeneration nodules was identified. Ito liver stellate cells produced  $\alpha$ -SMA, being intensely positive. Eight patients were IgM-CMV positive, with significantly higher survival compared to negative ones ( $p=0.04$ ), in the context of transplantation. The transplant was performed on 6 patients in specialized centers.

The survival of transplant patients was significantly higher than that of patients with native liver ( $p=0.004$ ). Survival with native liver at 4 years was 75%.

**Conclusions.** The average age at diagnosis was in the optimal range of surgery, although the analysis was performed in a center with a low volume of cases. Hepatoportoenterostomy delays the evolution of the disease. It does not stop it. Performing the intervention between 45 and 60 days postnatal is accompanied by the best long-term results. Partial remission of postoperative jaundice does not reduce long-term survival with native liver. GGT can be considered a marker of disease severity. Unfavorable short-term outcome and necessary transplantation follow the association of CMV infection.

**Study 2. Creation of an experimental model of hepatoportoenterostomy on liver with cholestasis in rats**

**Introduction.** The only effective way to resolve long-term cholestasis in biliary atresia is liver transplantation. However, it is not widely accessible, being accompanied by technical difficulties in small containers, the need for immunosuppression or the occurrence of complications. Progress has been made with intermediate surgical techniques, such as hepatopertoenterostomy. This study aimed to define an experimental model of hepatopertoenterostomy, after induction of cholestasis by selective ligation of the bile ducts.

**Material and method.** The model was designed as a two-stage microsurgical procedure. Twenty Wistar rats were used and, in the first stage, the resection of the bile ducts between ligatures induced hepatic cholestasis. The ligation was performed selectively, in two hepatic lobes out of four, median and left lateral, proximal and 0.5cm distal, with resection of the ductal segment between the ligatures. The presence of parenchymal connections was assessed for identification.

After 30 days, in the second stage, surgery was performed on 16 rats, exploring the hepatic hilum. The control group consisted of four rats, in which the resection of the bile ducts was performed. The fibrous tissue identified at the hilum of the two ligated lobes was excised, along with an adjacent hepatic parenchyma frame. At this level, hepatopertoenterostomy was performed using a jejunal loop, which was prepared for the Y in Roux mount. A liver biopsy was performed intraoperatively. After 7 days, surgery was performed again and the anastomosis was macroscopically evaluated.

The liver biopsy pieces were fixed in 10% formaldehyde solution for histopathological examination. The pieces were stained with hematoxylin-eosin and  $\alpha$ -SMA and TGF- $\beta$ 1 expression were evaluated immunohistochemically.

**Results.** The model was viable in 90% of cases. Death was secondary to intraoperative bleeding during the second surgery. There were no parenchymal connections between the liver lobes. Intraoperatively, adhesions were identified at the level of the hepatic hilum. In the bile duct resection areas fibrous tissue was identified, which was excised. No dehiscence or biliary peritonitis was observed during the evaluation of the anastomosis. The liver showed microscopic incipient fibrosis, with chronic, moderate cholestasis and cellular expression of  $\alpha$ -SMA and TGF- $\beta$ 1, markers of fibrosis.

**Conclusions.** Selective ligation of the bile ducts in rats triggers the formation of fibrosis and the expression of specific markers. Hepatopertoenterostomy can be performed pediatrically by microsurgical approach. The prototype is viable, reproducible and allows the study of both cholestatic pathologies and post-hepatopertoenterostomy liver changes. The study of various postoperative therapies can be considered.

### **Study 3. Evaluation of liver changes 30 days after selective bile duct ligation in rats**

**Introduction.** Survival in biliary atresia depends on the evolution of fibrosis, even after hepatopertoenterostomy was performed, but also on age at surgery. Recent studies promote the interval of 30-45 days after birth as the optimal one for surgery to be performed. Liver regeneration can be achieved through stem cells or myofibroblasts. Liver stellate cells play a major role in fibrogenesis, being involved in complex intercellular interactions, characterized by the expression of specific markers. Bile duct ligation in rats is a known model to induce the portal fibrotic changes

and bile duct proliferation similar to biliary atresia. This study aimed to evaluate the effect of supra-selective bile duct ligation on the evolution of fibrosis and cholestasis in rats, at an optimal time interval for possible surgery. The evaluation of the hepatic response to biliary obstruction is important due to the possibility of intervening therapeutically, but also to identify new treatment methods, in the absence of effective antifibrotic therapies.

**Material and method.** The experimental protocol is similar to that described in study 2, the first stage. On days 7, 14 and 30, biological samples were collected to determine serum levels of glutamoxalacetic transaminase (TGO), glutampiruvic transaminase (TGP), bilirubin (BT), gamma-glutamyltransferase (GGT), alkaline phosphatase (FA). Subsequently, the rats were sacrificed and the hepatic lobes (ligated and non-ligated) were taken and fixed in 10% formaldehyde solution, then in paraffin. For the examination, they were sectioned and stained with hematoxylin-eosin. Immunohistochemically,  $\alpha$ -SMA and TGF- $\beta$ 1 expression was evaluated at the cellular level, by incubation with specific monoclonal antibodies and, fibrosis was graded according to the Batts-ludwig score. The analysis was performed using light microscopy. Changes in obstructed and non-obstructed lobes were assessed comparatively.

**Results.** Transaminases (TGO, TGP) and FA showed a gradual increase in values, with a maximum on day 30. BT and GGT values remained at the upper limit of the normal range. TGO and TGP showed significantly higher values on day 30 compared to control and previous determination ( $p < 0.05$ ). Significant FA increase at 7 and 30 days ( $p < 0.05$ ) sustained cholestasis. BT and GGT values were significantly higher at 7 and 30 days compared to control ( $p < 0.05$ ).

Histopathological examination revealed in hematoxylin-eosin Kupffer cell hyperplasia in the sinusoids and Ito activated stellate cells with periportal and focal, intralobular disposition. In obstructed lobes, TGF- $\beta$ 1 was expressed by sinusoidal cells, plasmacytoid cells from portal spaces, diffuse into the cytoplasm of hepatocytes and at the biliary pole of centrilobular hepatocytes, as cytoplasmic granules. Ito cells were TGF- $\beta$ 1 positive. Apoptosis has been documented by the identification of hepatocytes eliminated in the sinusoidal lumen, intensely positive for TGF- $\beta$ 1. Myofibroblast-transformed Ito cells were intensely positive for  $\alpha$ -SMA, with a lower expression in adjacent hepatocytes. The marker was diffusely expressed in periportal stellate cells and in the periportal border plate. In the non-obstructed lobes, TGF- $\beta$ 1 was expressed by centrolobular and mediolobular hepatocytes and,  $\alpha$ -SMA was positive in the portal vessels wall.

Fibrosis was significant in the ligated lobes ( $p < 0.05$ ). The main cells with TGF- $\beta$ 1 expression were Ito cells ( $p = 0.001$ ) and mediolobular hepatocytes ( $p = 0.04$ ) in obstructed parenchyma. Ito cells had a significant expression also for  $\alpha$ -SMA, in the obstructed parenchyma ( $p = 0.035$ ).

**Conclusions.** The presence of fibrosis was demonstrated 30 days after selective ligation of the bile ducts in rats, by identifying cells with a major role in the onset and production of fibrosis and the expression of specific markers  $\alpha$ -SMA and TGF- $\beta$ 1. The changes detected in the evolution of the hepatic transformation process, histological and biochemical, were particular, different from other cholestatic models. This model allows the evaluation of various targeted therapies on cells or mechanisms involved in fibrogenesis.

## **Originality and innovative contributions of the thesis**

This thesis highlights the role of hepatoportoenterostomy in biliary atresia patients management, demonstrating the possibility of obtaining long-term results comparable to specialized centers, correlated with different biomarkers involved in the pathogenetic mechanisms of this disease. The implementation of hepatoportoenterostomy on an *in vivo* animal model is original and opens the way to prolong these patients survival by research. Cholestasis model analysis, by selective ligation of the bile ducts, defines an innovative experimental model, which can be used in the study of various cholestatic pathologies. Its major advantage is the ability to monitor liver changes and have the control on the same animal. Extensive evaluation of this model is necessary, with the analysis of postoperative liver changes, complications and long-term benefits. We aim to achieve this through future postdoctoral studies. Biliary atresia has many unexplained aspects, the role of surgical treatment being major in survival. Its limitations due to the existence of some as yet uncharacterized factors, which intervene in patients without results, force the continuation of research in this regard. The clinical evaluation has as limits the registration and analysis of patients in a single low-volume center, without the possibility of a multicenter analysis. The absence of long-term results limits this *in vivo* model. This thesis allowed an overall evaluation of a procedure with an essential role in the management of a rare pathology, both clinical and experimental. The extension of this research will allow a precise definition of the management of these patients and the development of protocols, very necessary in this disease.