

Szerkezeti változások patkánymájban egyedfejlődés, regeneráció és onkogenezis során

Doktori értekezés

dr. Papp Veronika

Semmelweis Egyetem
Patológiai tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Paku Sándor, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Nagy Nándor, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Rácz Bence, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szalay Ferenc, egyetemi tanár, az MTA
doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Lengyel Gabriella, Ph.D., egyetemi
docens
Dr. Rókusz László, Ph.D., orvos ezredes

Budapest
2013

TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|---|-----------|
| RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE..... | 6 |
| BEVEZETÉS..... | 8 |
| 1. A máj anatómiája..... | 8 |
| 2. A máj mikroanatómiája..... | 12 |
| 3. Májregeneráció..... | 14 |
| 4. A májregeneráció humán vonatkozásai..... | 21 |
| 5. Kérdésfelvetés..... | 21 |
| 5.1. A lebenykés szerkezet változása az egyedfejlődés és a regeneráció során..... | 21 |
| 5.2. A hepatokarcinogenezis és a májregeneráció korai lépéseinek összehasonlítása..... | 22 |
| CÉLKITŰZÉS..... | 26 |
| MÓDSZEREK..... | 27 |
| 1. Kísérleti állatok..... | 27 |
| 2. Kísérleti módszerek..... | 27 |
| 2.1. Állatkísérleti protokollok..... | 27 |
| 2.1.1. 2/3-os tradicionális parciális hepatektómia..... | 27 |
| 2.1.2. AAF/PH kísérlet..... | 27 |
| 2.1.3. Kémiai hepatektómiával módosított Solt-Farber modell - M-S-F (DEN/AAF/CCl₄)..... | 28 |
| 2.1.4. Kémiai hepatektómiával módosított AAF/PH kísérlet - REG-1 (AAF/CCl₄) kísérlet..... | 28 |
| 2.1.5. Ismételt regeneráció - REG-2 (2xAAF/CCl₄) kísérlet..... | 28 |
| 2.1.6. A lebenykék méretének meghatározása a centrális vénák műgyantával történő feltöltésével..... | 28 |

| | |
|--|----|
| 2.1.7. A centrális és a portális rendszer együttes feltöltése – a lebenyt borító lebenykék abszolút számának és az egy centrális vénát körülvevő portális ágak számának meghatározása..... | 29 |
| 2.2. Morfometriai vizsgálatok..... | 30 |
| 2.2.1. A lebenykék területének, kerületének meghatározása..... | 30 |
| 2.2.2. A hepatociták méretének meghatározása..... | 32 |
| 2.2.3. A regenerációs fókuszok számának és méretének meghatározása..... | 33 |
| 2.2.4. A kis epeutak által elfoglalt terület meghatározása..... | 34 |
| 2.3. Immunfluoreszcens vizsgálatok - a kis epeutak fenotipizálása..... | 36 |
| 2.4. A lebenykék zonalitására vonatkozó vizsgálatok..... | 37 |
| 3. Kísérleti rendszerek..... | 38 |
| 3.1. A lebenykés szerkezet változásainak vizsgálata az egyedfejlődés és a regeneráció során..... | 38 |
| 3.1.1. A lebenykés szerkezet változásainak vizsgálata az egyedfejlődés során..... | 38 |
| 3.1.2. A lebenykés szerkezet változásainak vizsgálata a hepatociták segítségével történő májregeneráció során..... | 39 |
| 3.1.3. A lebenykés szerkezet változásainak vizsgálata a progenitor sejtek részvételével történő májregeneráció során..... | 39 |
| 3.2. A hepatokarcinogenezis és a májregeneráció korai lépéseinek összehasonlítása..... | 41 |
| 3.2.1. Kémiai hepatektómiával módosított Solt-Farber modell, M S-F, (DEN/AAF/CCl ₄); a hepatokarcinogenezis korai lépéseinek vizsgálata..... | 41 |
| 3.2.2. Kémiai hepatektómiával módosított AAF/PH kísérlet, REG-1 (AAF/CCl ₄); az őssejtek részvételével zajló májregeneráció korai lépéseinek vizsgálata..... | 42 |
| 3.2.3. Ismételt regeneráció, REG-2 (2xAAF/CCl ₄); az őssejtek részvételével zajló kétszeres májregeneráció korai lépéseinek vizsgálata..... | 42 |

| | |
|---|-----------|
| EREDMÉNYEK..... | 44 |
| 1. A máj lebenykés szerkezetének módosulása az egyedfejlődés és a májsejtek illetve a progenitor sejtek segítségével történő májregeneráció során..... | 44 |
| 1.1. A máj felszínét borító lebenykék területének és kerületének meghatározása..... | 44 |
| 1.2. A lebenykék és a centrális vénák körüli portális ágak számának meghatározása a máj növekedése során..... | 49 |
| 2. A májsejtek méretének változása az egyedfejlődés és a kétféle regeneráció során..... | 53 |
| 3. A regeneráció és a hepatokarcinogenezis korai szövettani történéseinek vizsgálata..... | 56 |
| 3.1. Citokeratin (Ov6) pozitív kis epeutak területének meghatározása | 57 |
| 3.1.1. Citokeratin (Ov6) pozitív kis epeutak területének meghatározása - a DEN-kezelést követően..... | 57 |
| 3.1.2. Citokeratin (Ov6) pozitív kis epeutak területének meghatározása – mindhárom modellben a kémiai hepatektómia előtt..... | 59 |
| 3.1.3. Citokeratin (Ov6) pozitív kis epeutak területének..... | 61 |
| meghatározása - a kémiai hepatektómiát követően | |
| 3.1.4. További, nekrozist előidéző modellek vizsgálata..... | 65 |
| 3.2. A hepatokarcinogenezis és a regeneráció során képződő fókuszok eredetének, szerepének összehasonlítása..... | 66 |
| 3.3. Citokeratin (Ov6) pozitív duktuluszok immunfenotípusának további jellemezése..... | 72 |
| 3.3.1. A DEN-kezeléssel előidézett intraparenchimális duktuluszok immunfenotípusának jellemezése..... | 72 |
| 3.3.2. Az AAF/CCL ₄ -kezeléssel előidézett duktuluszok immunfenotípusának jellemezése – közvetlenül a 2. kémiai hepatektómia előtt..... | 76 |
| 3.3.3. A kémiai hepatektómiát követően megjelenő intraparenchimális duktuluszok immunfenotípusának jellemezése mindhárom modellben..... | 77 |

| | |
|--|------------|
| 4. Tumorképződés a vizsgált modellekben..... | 82 |
| MEGBESZÉLÉS..... | 83 |
| 1. A máj lebenyék szerkezetének vizsgálata az egyedfejlődés során..... | 83 |
| 2. A májlebenyek méretének és számának vizsgálata patkánymájban parciális hepatektómiát követően..... | 84 |
| 3. A regenerált máj jellemzése AAF/PH kísérletben..... | 86 |
| 4. Az intraparenchimális duktuláris képletek jellemzése..... | 87 |
| 5. A progenitor sejtkompartment amplifikációjának hatása a májregenerációra..... | 87 |
| KÖVETKEZTETÉSEK..... | 89 |
| ÖSSZEFOGLALÁS..... | 90 |
| ABSTRACT (ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÁS)..... | 91 |
| IRODALOMJEGYZÉK..... | 92 |
| SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE..... | 104 |
| KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS..... | 105 |

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AAF: 2-acetilaminofluoren

AAF/CCl₄ modell: 2-acetilaminofluoren/ kémiai hepatektómia modell

AAF/PH modell: 2-acetilaminofluoren/ parciális hepatektómia modell

AC: anterior kaudális lebeny

AFP: α -fötóprotein

AP1: aktivátor protein 1 (transzkripciós faktor)

CDE: kolin deficiens diéta etioninnal kiegészítve

citP450: citokróm P450 enzim

CK-7: citokeratin-7

CK-19: citokeratin-19

CL: kaudális lebeny (caudate lobe)

CP: parakavális rész

DEN: dietil-nitrózamin

Des: dezmin

DLK: delta-like protein

EGF: epidermális növekedési faktor

FITC: fluorescein isotiocianát

G-CSF: granulocita kolóniastimuláló faktor

HGF: hepatocita növekedési faktor

HNF1: hepatikus nukleáris faktor 1

HSP-47: hősokk-protein-47

IL-6: interleukin-6

IRL: alsó jobb lebeny (inferior right lobe)

L: laminin

LLL: bal laterális lebeny (left lateral lobe)

LML: bal középső lebeny (left medial lobe)

LPS: lipopoliszacharid

ML: középső lebeny (median lobe)

M S-F: kémiai hepatektómiával módosított Solt-Farber modell, DEN/2-AAF/CCl₄ modell

Ov6: ovális sejt marker (oval cell marker)

PBS: pufferoldat (pH buffer solution)

PC: poszterior kaudális lebeny

PH: parciális hepatektómia

RML: jobb középső lebeny (right medial lobe)

REG-1: kémiai hepatektómiával módosított AAF/PH kísérlet, AAF/CCl₄ modell

REG-2: ismételt regeneráció, 2xAAF/CCl₄ modell

S-F: Solt-Farber kísérlet

SMA: α -simaizom-aktin

SRL/RLL: felső/laterális jobb lebeny (superior/lateral right lobe)

STAT3: transzkripciós szignál transzducer és aktivátor

T3: trijódtironin

TGF- α : transzformáló növekedési faktor- α

TGF- β : transzformáló növekedési faktor- β

Thy-1: CD90, N-glikozilált glikofoszfatidilinozitol sejt felszíni fehérje

TNF- α : tumor nekrozis faktor- α

TRITC: tetrametilrodamin isotiocianát

BEVEZETÉS

1.A máj anatómiája

A máj mirigyes szerkezetű hámszerv, amely számos anyagcsere-folyamatban játszik fontos szerepet: glikogéntárolás, zsírok képződése és átalakítása, aminosavak képződése és átalakítása, méregtelenítés, szérumfehérjék szintetizálása, bilirubin kiválasztása. A magzati életben vérképző szervként funkcionál.

Emberben a máj két felszíne – egy domború rekeszi, és egy laposabb zsigeri – hegyesszögben találkozik átlósan keresztezve az epigasztriumot. A máj elülső felszínén a középvonaltól kissé jobbra tapadó szalag (ligamentum falciforme hepatis) a májat jobb és bal lebenyre osztja. A zsigeri felszín egy H-alakú barázdarendszer tagolja négy részre: függőleges száraitól jobbra, illetve balra eső részeket a jobb, illetve a bal lebenyhez tartozónak vesszük, a két függőleges szár közé eső felszín alsó részét lobus quadratusnak, felső részét lobus caudatusnak hívjuk. A haránt szarát a máj kapuja (porta hepatis) alkotja, ide lép be két-két ágra válva a máj két odavezető ere, az arteria hepatica propria, és a portális véna. Innen lép elő ugyancsak két ággal a ductus hepaticus. A haránt szár fölötti barázdát a vena cava inferiornak a májba mélyen belefekvő szakasza tölti ki. A belépő ereket a májkaputól kezdődően jelentékeny mennyiségű kötőszövet kíséri, amely az erek elágazódásának megfelelően finom sővényrendszerre oszlik, a máj szöveti lebenyeit választja el egymástól. Emberben ez a kötőszövet igen csekély mennyiségű, ellentétben a sertésmájjal. A felszíni hashártyaborítás alatt azonban újra megvastagszik a kötőszövet, ezt a rendszert hívjuk Glisson-toknak. A belépő erek már a porta előtt 2 ágra válnak, amit további oszlások követnek. A mindig együtt haladó nagyobb lumenű vénát és kisebb artériát harmadik képletként egy köb- vagy hengerhámossal bélelt epeút kíséri. A három képletet együtt portális triásznak nevezzük. A portális érképletek elágazása bizonyos szabályosságot mutat, a másodlagos ágak által ellátott májállomány-részeket a máj szegmentumaiként foghatjuk fel. A szegmentumok határai az állományban nem jelentkeznek, csupán az egyes ágak különböző színnel festett anyagokkal való feltöltésével tehetők láthatóvá. Mivel határaik megközelítően a szagittális síkban futnak, a szegmentumos elrendezés a máj sebészeti úton való

részleges eltávolítására (pl. daganatok esetében) ad lehetőséget, a megmaradt rész jó vérellátásának biztosításával. A portális érkepletek legfinomabb, ún. interlobuláris ágai az emberben majdnem csak jelzett mennyiségű interlobuláris sövényekben helyezkednek el. Belőlük a vér a májlebenyke szinuszaiba, onnan pedig a lebenyke közepén húzódó centrális vénába jut, amely aztán a lebenyke alapján kilépve nagyobb önálló, gyenge falú elvezető vénába nyílik (vv. sublobulares). Ez utóbbiak egymással összeszajadzva a vv. hepaticae rendszerét képezik, amelyek még tovább egyesülve szájadzanak a vena cava inferiorba. A hepaticus vénák a portális erekhez hasonló, de velük szemben alternálón fél-fél szegmentummal eltolódott elágazódási szegmentumokat képeznek. (*Szentágothai-Réthy, 2002*)

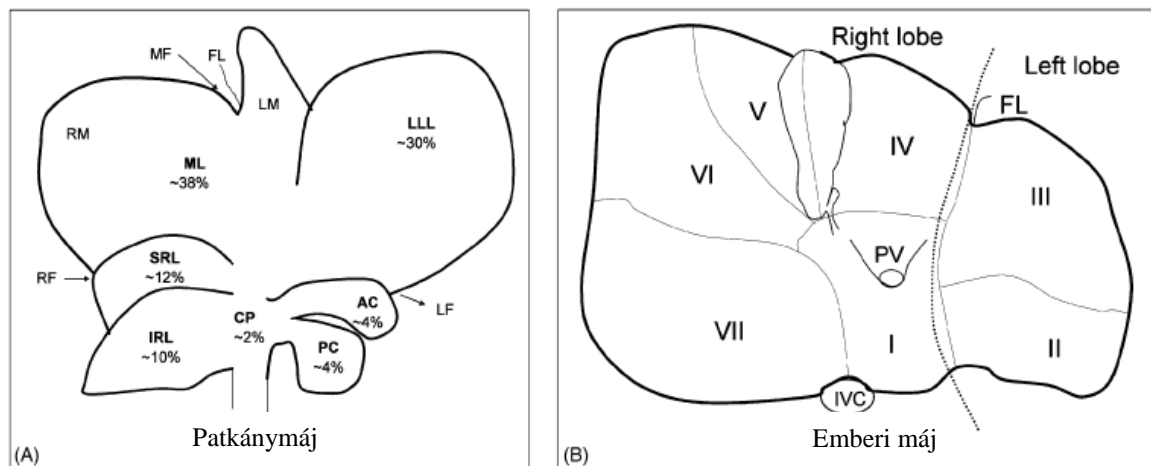
Májsebészeti beavatkozások laboratóriumi modellezéséhez a patkány az egyik leggyakrabban használt kísérleti állat, gyakorlatilag minden műtéttípus elvégezhető rajta (pl. májszegment rezekció, porto-szisztémás söntök kialakítása, teljes máj és szegment transzplantáció, embolizáció). Nehézséget csak kis mérete okoz, de korszerű mikroszkópok, és az anatómiai felépítés pontos ismerete mellett a komplikációk elkerülhetőek, és az eredmények, következtetések összehasonlíthatósága is megőrizhető marad. (*Krinke és mtsai, 2000*)

A patkány mája - az emberével ellentétben - tágabb értelemben 4 különálló lebenyből épül fel (*Bismuth H, 1982*), amelyeket az őket ellátó portális ágak után neveztek el, és amelyek további alegységekre oszthatóak (több szerző más-más nomenklatúrát használ, de az itt ismertetett a leggyakoribb). A legnagyobb lebeny a középső lebeny (median lobe, ML), amely a máj tömegének 38%-át teszi ki, és a ligamentum falciforme-n keresztül rögzül a rekeszizomhoz és a hasfalhoz. Egy vertikális irányú hasadás két részre osztja, a jobb és bal középső lebenyre (right medial lobe – RML, left medial lobe – LML). A második legnagyobb lebeny a bal laterális lebeny (left lateral lobe – LLL), amely a máj tömegének 30%-a, felszíne konvex, 2/3 részét a ML fedi, szabad felszíne pedig a rekeszizomhoz simul. A 2/3-os parciális hepatektómia során ez a két lebeny kerül eltávolításra, ami körülbelül 68%-a a máj össztömegének.

A jobb lebeny a vena cava inferiortól jobbra fekszik, a ML teljesen fedi. A máj tömegének 22%-át alkotja, és egy horizontális irányú hasadék két részre osztja: laterális vagy felső (lateral/superior right lobe-LRL/SRL) és alsó (inferior right lobe-IRL) jobb

lebenyre. A májregeneráció vizsgálatakor méréseinket a laterális (vagy felső) jobb lebenyen végeztük el.

A vena cava inferiortól balra, a bal laterális lebeny által fedve helyezkedik el a kaudális lebeny (CL), 8-10%-a a máj tömegének, amely 2 részre osztható. A parakávális rész (caudate process) körül fogja a vena cava inferiort és összeköti a jobb lebenyt a kaudális, vagy másnéven a Spiegel-lebennyel, amely egy elülső (anterior caudate lobe-ACL) és hátsó (posterior caudate lobe-PCL) részből épül fel. Az ACL a gyomor és a nyelőcső előtt, a PCL ezek mögött fekszik, mindkettőt a heptoduodenális és hepatogasztrikus ligamentum borítja. (Martins PNA és mtsai, 2007), (1. ábra)



1. ábra: (A) A máj viszcerális felszíne és a lebenyek relatív tömege. Kaudális lebeny: parakavális rész (CP), anterior kaudális lebeny (AC), poszterior kaudális lebeny (PC). Jobb lebeny: felső jobb lebeny (SRL), alsó jobb lebeny (IRL). Mediális lebeny (ML): jobb mediális lebeny (RM), bal mediális lebeny (LM). Bal laterális lebeny (LLL). Máj bal felének részei: bal laterális lebeny, kaudális lebeny, bal mediális lebeny; máj jobb felének részei: jobb mediális lebeny, jobb lebeny. (B) Emberi máj viszcerális felszíne szegmentekre osztva Couinaud után. A VIII-as szegmentum az V-ös fölött fekszik, az ábrán nem látható. (Martins PNA és mtsai, 2007)

Egyes elképzelések szerint a patkánymáj lebenyei a humán májlebenyek ekvivalensei: a kaudális lebeny megegyezik az I-es és IX-es, a LLL a II-es, a ML a III-as, IV-es, V-ös és VIII-as, a RL pedig a VI-os és VII-es szegmentummal. (Kongure K és mtsai, 1999) Itt azonban meg kell említeni, hogy a rágcsálók és a főemlősök közti filogenetikai

távolság több mint 80 millió év! (*Kanno N és mtsai, 2000*) Funkcionális anatómiai szempontból a patkány mája közelebb áll a sertéséhez, mint az emberéhez. Lényeges különbség azonban, hogy a patkánynak nincs epehólyagja, ellentétben a sertés- és az emberi májjal. (*Bhunchet E és mtsai, 1988*) A patkánymájban lévő kis intrahepatikus epeutak az emberi epeutaknak, míg a nagy epeutak a humán interlobuláris epeutaknak felelhetnek meg. (*Gershbein LL és mtsai, 1954; Alpini G és mtsai, 1996;*) Az extrahepatikus epeutak egymással számos variáció szerint kommunikálhatnak, pl. a mediális lebeny bal részéből az epe a bal laterális lebeny epeútjai felé vezetődik, ezért a LLL eltávolítása kolesztázist okozhat a ML-ben. A közös extrahepatikus epeút hosszabb lefutású, a portális vénától és hepatikus artériától távolabb helyezkedik el, mint az emberben, ezért könnyebben kanulálható, kísérleti céllal. A portális véna patkányban 3, míg az emberben csak két fő ágra oszlik, a lobuláltság miatt a portális rendszer a májvénákkal csak mikroszkópikus szinten kommunikál. A vena cava inf. patkányban intrahepatikus lefutású, míg emberben retroperitoneálisan helyezkedik el. Az artériás rendszer legérdekesebb különbsége, hogy patkányban léteznek az ún. hepatoözofoágális kollaterális artériák, amelyek a májat a rekeszizom feletti artériás keringésbe is bekapcsolják. Ez a megfigyelés is kísérlettervezés szempontjából lehet lényeges. (*Martins PNA és mtsai, 2007*) A legfontosabb különbségeket a patkány és az emberi máj között az 1. táblázatban foglaltuk össze:

1.táblázat: Különbségek a humán és a patkánymáj között

| Patkánymáj | Emberi máj |
|--|--|
| Több különálló lebeny | A lebenyek nem különülnek el |
| Hosszú truncus coeliacus | Rövid truncus coeliacus |
| Intrahepatikus vena cava inferior | Retroperitoneális vena cava inferior |
| Hiányzó epehólyag | Van epehólyag |
| Közös epevezeték a portális vénától balra fut, hosszú intrapancreatikus szakasszal | Közös epevezeték a portális vénától jobbra fut, rövid intrapancreatikus szakasszal |
| Gyakori a kollaterális artériás keringés (hepatoözofágéális artériák) | Nincs kollaterális artériás keringés |
| Gyakori kommunikáció a portális és a hepaticus vénás rendszer között | Nincs kommunikáció a portális és a hepaticus vénás rendszer között |
| A kaudális lebeny határozottan elkülönül | A kaudális lebeny nem különül el határozottan |
| A portális véna 3 főágra oszlik | A portális véna 2 főágra oszlik |
| A máj jobb és bal fele közel megegyező tömegű | A máj jobb lebenye nagyobb mint a bal |

2. A máj mikroanatómiája

A máj klasszikus szöveti egysége a hatszögletű, gúla vagy csonkagúla alakú lebenyke, vagy másnéven primer egység, melyek mérete a májon belül a hilustól a felszín felé haladva csökken. (Teutsch HF és mtsai, 1999) Arról még ma is vita folyik, hogy a lebenyke valódi funkcionális egységnek tekinthető-e. (MacSween NM és mtsai, 2002) Többféle felosztás is létezik, az egyik legismertebb a Rappaport-féle acinus, amely keresztmetszetben rombusz alakú terület. (Mall FP, 1906; Saxena R és mtsai, 1999) Ezekből mindig 3 alkot egy lebenyke nagyságú, de valóságban 3 lebenykehez tartozó portális egységet. (Bhunchet E, Wake K, 1998) Egy-egy ilyen portális egység vagy portális lebeny közepén halad egy portális triász, és hat éle közül háromra jut egy-

egy centrális véna, míg másik három élére egy-egy érmentes lebenyközti csomópont. (*Szentágothai-Réthelyi, 2000* A cholehepaton fogalmát is definiálták már, ebben az esetben a portális triász epeútja alkotja a lebenyke középpontját. (*Ekataksin W, Wake K, 1997*) Azonban mivel a lobulus, mint szöveti egység azokban a fajokban is jól definiálható, melyek nem rendelkeznek valódi interlobuláris vaszkuláris szeptummal, mint pl. az általunk is vizsgált patkány, mi is a klasszikus lebenykét tekintettük szöveti egységnek. (*Ekataksin W, Wake K, 1997; Matsumoto T és mtsai, 1982*) Teutsch és mtsai emberi máj sorozatmetszeteiből a lebenykeket 3 dimenzióban rekonstruálva megalkották a szekunder egység fogalmát is, amely eredményeik szerint 1,9 mm magas, felszíne 14,7 mm², térfogata pedig 5,1 mm³. 14 lebenyke alkotja, centrális vénáik közös elvezető ágban egyesülnek. (*Teutsch HF és mtsai, 1999; Teutsch HF, 2005*)

A májlebenyke a hossz tengelyére vonatkoztatva sugaras elrendeződésű hámsejtlemезekből épül fel. Az egyes lemezek egyetlen májsejtrétegből állnak. Ezek száma a lebenyke középvonalától kifelé haladva nő, a májlebenyke-terület növekedésének köszönhetően. A lobulus periferiáját a portális érkötegek felé egy májsejtekből álló, a felszínnel párhuzamos határoló sejtlemez zárja le (ilyen határlemez nem található a centrális véna körül). A sugaras elrendeződésű sejtlemезek közeit fenestrált endotelsejtekből álló szinuszoidok bélelik. Ezen endotelsejtek között helyezkednek el a fagocitáló Kupffer-féle csillag sejtek és az A-vitamint tároló periszinuszoidális stellate, vagy magyarul csillag sejtek.

A májszövet 90 %-át hepatociták alkotják. Mivel egyetlen rétegből álló gerendákat képeznek, kétféle felszínnel rendelkeznek. A szinuszoidok felé tekintő felszínek sűrű mikrobolyhokkal borítottak, amelyek pillérszerűen támasztják a szinuszoidok fenestrált endotelsejtjeit, és velük közrefogják a Disse-tereket. Ugyancsak a felszínek barázdáiba mélyed bele a májszövet rácsrostváza. A májsejtek közötti érintkezési felszínek emberben elég simák, két vagy három májsejt egymással érintkező felszínén található fél- vagy harmadbarázdák pontosan összeilleszkedve képezik a máj epecsatornácskáit, amelyeknek falát a májlebenyken belül a májsejtek sejthártyája alkotja. A májlebenyke szélén az epekapillárisok a részben hepatociták részben specializált hámsejtek alkotta Hering-féle csatornában folytatódnak, amelyek végül a valódi epejáratokba nyílnak. Ezen utóbbiak a portális triász elemeként az interlobuláris kötőszövetben haladnak, eleinte köbhámból, majd később hengerhámból

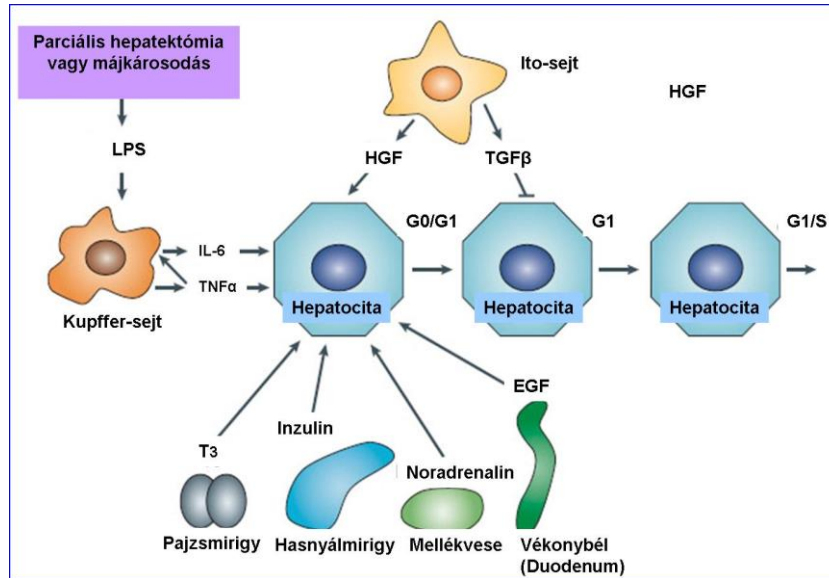
állnak, a nagyobb epeutak pedig már kötőszövetes fallal is rendelkeznek. Végül két nagyobb epejárat lép ki a májból, amelyek aztán ductus hepaticussá egyesülnek. (Szentágothai-Réthelyi; 2002)

3. Májregeneráció

A máj kiváló regenerációs képességgel rendelkezik. Ha az aktív, működő májszövetet károsodás vagy veszteség éri, az ép, vagy visszamaradt rész proliferációval válaszol. (Michalopoulos GK és mtsai, 1997) A regenerációra képes egyéb szövetekkel ellentétben, mint például a csontvelő vagy a bőr, a májregeneráció nem őssejt vagy progenitor sejt függő. A májat felépítő érett, differenciált sejtek (hepatociták, biliáris epiteliális sejtek, fenestrált endoteliális sejtek, Kupffer-sejtek, Ito-sejtek) nyugalmi állapotban ritkán osztódnak, de megőrzik proliferációs képességüket. Ha a májsejtek osztódása valamilyen okból gátolt (pl. 2-acetylaminofluorene kezelés következtében), akkor a regeneráció a Hering-kanálisokban elhelyezkedő őssejtekből származó progenitor vagy másnéven ovális sejtek közreműködésével történik. (Wilson és mtsai, 1958; Wang X és mtsai, 2003; Taub R, 2004)

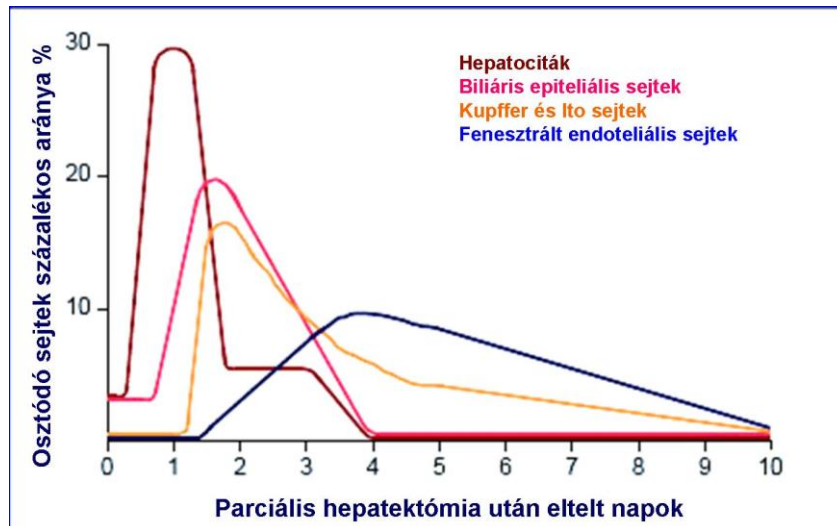
A májban az egyik legtöbbet tanulmányozott, malignus transzformációt nem mutató növekedési folyamat a parciális hepatektómiát követő regeneráció. A műtét során a patkányok májának 2/3-a eltávolításra kerül, ezt követően a megmaradt lebenyek kompenzatórikus hiperpláziája révén (az eltávolított lebenyek nem nőnek vissza) a máj tömege 7-9 nap alatt helyreáll. (Higgins GM és mtsai, 1931) Nagyobb testű emlősökben és embereken történt májrezekciók során bebizonyosodott, hogy a regeneratív proliferáció mértéke arányos az eltávolított májszövet tömegével, és azt is megfigyelték, hogy nagyobb testű állatból kisebbbe történt májátültetés során a máj tömege csökken, vagyis a máj mindig a szervezet zavartalan működéséhez szükséges méretet ölt (Michalopoulos GK és mtsai, 1997). A folyamatot számos lokális, és a test különböző kompartmentjeiből érkező szignál szabályozza; úgymint egyes növekedési faktorok (HGF: hepatocita növekedési faktor, EGF: epidermális növekedési faktor, TGF- α : transzformáló növekedési faktor), citokinek, IL-6 (interleukin-6), TNF- α (tumor nekrosis faktor α), inzulin, noradrenalin, T3 (trijódtironin). A májsejtek ép májban

ritkán osztódnak, parciális hepatektómiát követően azonban 95 %-uk a GO fázisból ismét belép a sejtciklusba az említett szabályozó faktorok hatására. (2. ábra)



2.ábra: A parciális hepatektómia és a máj károsodása elindítja a regeneráció folyamatát, melynek során számos szignál jelenik meg a májban (ilyen pl. a bélrendszerből a portális keringésen keresztül érkező LPS (lipopoliszacharid)), amely a Kupffer- és Ito-sejteket stimulálva IL-6, TNF α , és HGF felszabadulást vált ki. A test különböző kompartmentjeiből is érkeznek szabályozó szignálok: trijód-tironin (T3) a pajzsmirigyből, inzulin a hasnyálmirigyből, noradrenalin a mellékveséből, EGF (epidermális növekedési faktor) a duodenumból. Az említett szignálok együttes hatására lépnek be a hepatocitákat a sejtciklusba, indul meg a DNS szintézis és a proliferáció. Az Ito-sejtek által termelt TGF β gátolja a DNS szintézist, de az osztódás fázisa alatt a májsejtekre nem hat. (Michalopoulos GK, DeFrances M, 1997)

Parciális hepatektómiát követően elsőként a májsejtek osztódnak, a DNS-szintézis patkányokban a műtét után 10-12 órával indul meg, 24 óra után éri el a csúcát, majd csökkenni kezd. A 36. és a 48. óra között újabb, de kisebb csúcs jelentkezik. Ennek oka, hogy a hepatociták periportálisan kezdenek osztódni, majd a 36. és 48. óra között a pericentrális régiót is eléri az osztódási hullám. A többi sejtben 24 óra elteltével indul csak meg a DNS-szintézis, amely a 48. óra környékén éri el a maximumát. (3. ábra)



3. ábra: Az osztódó sejtek százalékos aránya a parciális hepatektómiát követő májregeneráció alatt. A 4 legfontosabb sejttypusban eltérő időpontban indul meg a DNS-szintézis, és annak hossza is különbözik. Elsőként a májsejtek osztódnak, a DNS-szintézis a műtét után 10-12 órával indul meg, 24 óra után éri el a csúcsát, majd csökkenni kezd. A többi sejtben 24 óra elteltével kezdődik el a DNS-szintézis, amely a 48. óra környékén éri el a maximumát. Ebben szerepet játszanak a regeneráló hepatociták által termelt növekedési faktorok is, amelyek parakrin módon fejtenek ki mitogén stimulust. (Schibler U, 2003)

A proliferációt a cirkadián ritmus is befolyásolja. Egereken végzett kísérletek bizonyították, hogy a májsejtekben zajló DNS szintézis a PH-t követő 36. órában éri el a csúcsát, attól függetlenül, hogy a nap melyik időszakában végezték el a műtétet, míg a mitosis minden esetben azonos időpontban indult el. (Schibler U, 2003) Parciális hepatektómia után a hypoxia is elősegíti a májsejtproliferációt és angiogenezist. (Maeno H és mtsai 2005) A regeneráció kinetikája és a résztvevő mediátorok abban az esetben is ugyanazok, amikor nekrosis okozza a májszövetben bekövetkező veszteséget, mint pl. egyszeri nagy dózisú szén-tetraklorid által okozott károsodást követően. (Solt DB és mtsai, 1983; Palmes D és mtsai, 2004) Progenitor sejtek ebben a modellben nem aktiválódnak. Az épen maradt hepatociták önmagukban képesek a májtömeg helyreállítására. (Michalopoulos GK és mtsai, 1997)

Ahhoz, hogy az eltávolított lebenyeket a máj pótolni tudja, a májsejtek 95 %-ának (idős állatokban erre csak 75 % képes) 1 vagy 2 osztódáson kell átesnie. (*Taub R, 2004*) A máj regenerációs képessége emellett azonban szinte korlátlan. Kísérletekkel és matematikai számításokkal igazolták, hogy egy hepatocita akár 34 osztódásra is képes, így egy sejtből $1,7 \times 10^{10}$ sejt is képződhet, ami 50 patkánymájat felépítő hepatocitának felel meg. Ugyancsak kísérletek bizonyították, hogy egyazon állaton akár 12 egymást követő alkalommal is elvégezhető volt parciális hepatektómia, a máj minden alkalommal regenerált. (*Grompe M és mtsai, 1996*)

A rendkívüli proliferációs kapacitás mellett talán még fontosabb megemlíteni, hogy a regeneráció időtartama alatt (2/3-os PH-t követően, amikor a megmaradt máj 90 %-a osztódik) a májfunciókban - úgymint glükóz szintézis és lebontás, albumin és más koagulációs fehérjék szintézise, epeelválasztás, toxikus molekulák lebontása - csak minimális negatív irányú változással találkozhatunk. (*Michalopoulos GK és mtsai, 1997; Zou Z és mtsai, 1998*) Az egyik legfontosabb szabályozandó funkció a glukoneogenezis fenntartása, hiszen a máj megmaradt 1/3-ának az egész szervezet számára szükséges glükózanyagcsere zavartalan működését kell biztosítani. Ezt számos transzkripciós faktor és enzim finom összehangolt működése teszi lehetővé (pl.: HNF1: hepatikus nukleáris faktor 1, STAT3, AP1). (*Taub R, 2004*)

Először az 1950-es években - a májregeneráció tanulmányozása során - vették észre, hogy sorozatos vagy intenzív májkárosodás esetén a disztális epeutakban proliferáció indul meg. Az itt lévő sejtekből hepatociták és interlobuláris epeutak képződnek, ebből következtek arra is, hogy közös őssejtből származnak. (*Wilson és mtsai, 1958*) Az őssejt kimutatására azonban még nem rendelkeztek speciális markerekkel.

Az embrionális őssejtek a blastocysta belső sejtjeiből származnak, pluripotensek, belőlük alakulnak ki a szomatikus őssejtek, amelyek aztán tovább differenciálódnak multipotens szövetspecifikus őssejtekké. (*Hwang WS és mtsai, 2004*) Ez utóbbiakból lesznek a progenitor sejtek, melyek érett szöveti sejtekké differenciálódnak. Ahhoz, hogy a szövetmegújító funkció fenntartható legyen, ún. aszimmetrikus osztódásra van szükség, vagyis osztódást követően az egyik utódsejt tovább differenciálódik, míg a másik őssejt marad. Erre azonban csak a szövetspecifikus őssejtek képesek, a progenitor sejtek már nem, belőlük csak érett szomatikus sejt/sejtek képződnek. Progenitor sejteket

nem csak a májban, hanem a bőrben és a bélrendszerben is találunk, ezek szintén kutatás tárgyát képezik. (*Szentágothai-Réthy, 2002*) A máj progenitor sejtjei az ún. ovális sejtek.

Az „ovális sejt” kifejezést először Farber használta azokra a nonparenchimális sejtekre, amelyek a máj karcinogénnel történt kezelését követően kezdtek el osztódni. (*Solt D, Farber E, 1976*) A tumorképződésben akkor még nem tulajdonítottak nekik jelentőséget, mivel csak a karcinogenezis kísérletek kezdetén voltak megfigyelhetőek. Az ovális sejtek kisméretűek, bazofil citoplazmával és halványkéken festődő ovális maggal rendelkeznek. Az ovális sejtek tanulmányozására az egyik leggyakrabban alkalmazott kísérlet az ún. AAF/PH modell. (*Tetamatsu M és mtsai, 1984*) Parciális hepatektómiát (PH) követően a hepatociták osztódásának gátlása mellett (AAF, 2-acetilaminofluorén) az ovális sejtek periportálisan osztódni kezdenek, a Heringkanálisok meghosszabításaként duktulusokat formálnak, majd a parenchimában csoportokba rendeződnek és májsejteké differenciálódnak. (*Evarts RP és mtsai, 1987; Paku S és mtsai, 2001; Wang X és mtsai 2003*) Ezeket a kis hepatocitákból álló csoportokat hívjuk regenerációs fókuszoknak. (*Evarts RP és mtsai, 1988; Dabeva MD és mtsai, 1993*) Az AAF dózistól függően az ovális sejtek differenciálódása különböző mértékű: alacsony dózis esetén (2,5 mg/kg/nap) minden ovális sejtől kis hepatocytá lesz, míg nagyobb dózis (5 mg/kg/nap) alkalmazása után csak egy részük differenciálódik, és a folyamat hosszabb időt igényel. (*Paku S és mtsai, 2004*) Emberi májban gyakran láthatók átmeneti hepatobiliáris sejtek osztódó epeutakban extenzív nekrozist követően is. (*Roskams TA és mtsai, 2004*) Differenciálódó sejtek kis csoportjait krónikus májgyulladásban és cirrózisban is leírták már. (*Proctor E és mtsai 1982, Falkowski O és mtsai, 2003*) Számos más módszerrel is előidézhető az ovális sejtek osztódása. Ilyen pl. egerek esetében kolin-deficiens diéta alkalmazása etioninnal kiegészítve (*Akhurst B és mtsai, 2005; Ueberham E és mtsai, 2010*) DNS-alkiláló szerek alkalmazása. (*Oertel M és mtsai, 2008*)

Az ovális sejtek fakultatív progenitor sejt állományt képeznek. Aktiválódásuk során primitív hepatoblasztokra jellemző markereket is expresszálnak, mint pl. AFP (alfa-fötöproteín), DLK (delta-like protein), CK-7 (citokeratin -7), albumin. Különböző kísérleti protokollokkal előidézett ovális sejtek azonban eltérő antigén mintázattal is rendelkezhetnek. (*Jelnes P és mtsai, 2007*)

Patkányban jelenleg két olyan fehérje ismert, ami a kifejezett májban csak az ovális sejtekben termelődik és az epeutak hámsajtjeiben nincs jelen. Az egyik az AFP, ami patkánymájban a leginkább elfogadott ovális sejt marker. Az AAF/PH és a CDE modellekben az aktiválódott őssejtek AFP-t termelnek. (*Bisgaard HC és mtsai, 1994*) Az AFP mRNS-e AAF kezelésre (PH nélkül) megjelenik a terminális epeutakban, amiből az következik, hogy a nyugalomban lévő őssejtek nem expresszálják az AFP-t, csak azok, amelyek valamilyen hatásra aktiválódnak. (*Paku S és mtsai, 2004*)

A másik azonosított transzmembrán fehérje a DLK (delta-like protein). (*Tanimizu N és mtsai 2004*) A progenitor sejtek mediálta regeneráció során a DLK jellemzően a mélyen a parenchimába nyúló ovális sejtek által alkotott duktulusokban és az azokhoz kapcsolódó kis májsejtekben található, a periportális traktusban nem detektálható. (Az AFP expresszió is magasabb a centrális vénához közelebb elhelyezkedő ovális sejtekben, ezen kívül számos egyéb marker megjelenésében is zonális különbség mutatkozik. (*Bartels H és mtsai, 1990; Duncan SA, 2003; Jelnes P és mtsai, 2007*) A DLK tehát a már májsejt irányba elkötelezett sejtekben expresszálódik. Ez összhangban van a magzati májban megfigyelhető termelődésével, ahol a hepatocytákban kimutatható, a fejlődő epeutakban viszont nem. (*Tanimizu N és mtsai, 2004*)

A citokeratinok olyan keratin tartalmú intermedier filamentumok, amelyek epitheliális sejtek citoplazmájában lévő citoszkeleton alkotórészei. Nagyjából 20 típusuk ismert. Két nagy csoportra oszthatók: savas tulajdonságú I-es és bázikus vagy neutrális II-es típusú citokeratinokra. A citokeratin-19 az előbbi, míg a citokeratin-7 az utóbbi csoporthoz tartozik. Expressziójuk szerv- és szövetspecifikus, sőt, az epithelium differenciációs fokát is mutatja, ezért fontos szerepet játszik tumorok diagnosztizálásában. (*Franke WW és mtsai, 1979; Barak V és mtsai, 2004*) A patkány májában a Hering-kanálisok CK-19 pozitívak és CK-7 negatívak, később azonban az AAF/PH modellben ovális sejtek aktiválódása, osztódása során CK19+/CK7+ mintázatot mutatnak. A CK19+/CK7- kompartment nem veleszületett, az egyedfejlődés során alakul ki. (*Paku S és mtsai, 2005*)

Az ovális sejtek által alkotott csöveket, melyeket laminin pozitív bazális membrán vesz körül, más sejtek is kísérik (ITO sejtek miofibroblasztok), melyeket leggyakrabban Des (dezmin) és SMA (α -simaizom aktin) markerekkel jellemezzük.

A csillagsejtek nyugvó és aktivált állapotban is dezmint expresszálnak ami egy III-as típusú intermedier filamentum. (*Mabuchi A és mtsai, 2004*) In vitro TGF β , TGF α és szérum hatására képes miofibroblasztá alakulni. (*Ramadori G, Saile B, 2002*) Ez a jelenség in vivo is kimutatható krónikus májbetegségekben, pl. CCl₄-dal előidézett fibrosis során. (*Nagata K, 1998; Beaussier M, 2007*) Átalakulásuk után simaizom aktint expresszálnak, kollagént termelnek.

A laminin az epeutakat körülvevő bazális membránban található. A proliferáló progenitor sejtek körül is kimutatható bazális membrán, amit a differenciálódás során elveszítenek. Kísérleteinkben a kis epeutak lokalizálására használtuk.

Egyes eredmények azt bizonyították, hogy az ovális sejtek a hemopoietikus sejtekből származtathatók (a máj a magzati életben vérképző szervként funkcionál). (*Peetersen BE és mtsai, 1999; Theise ND és mtsai, 2002*) Egerekbe és patkányokba a saját csontvelőjük kiirtását követően donor csontvelőt transzplantáltak, ezt követően pedig a májukban a csontvelői sejtek által is expresszált Thy-1 sejtfelszíni fehérjét mutattak ki. (*Kuo TK és mtsai, 2008*) A Thy-1 vagy CD90 N-glikozilált glikofoszfatidilinozitol sejtfelszíni fehérje, amely jellegzetes immunglobulin domainnel, a thymocyt-antigénnel rendelkezik. Ezért korábban a csontvelői sejteken kimutatható Thy-1 sejtfelszíni fehérjét ovális sejt markernek tartották (*Shu SN és mtsai, 2004; Pi L és mtsai, 2005; Laurson J és mtsai, 2005*), azonban bebizonyosodott, hogy csak az őket körülvevő miofibroblasztokon található meg. (*Dezső K és mtsai, 2007*)

A májban a regeneráció során történő strukturális változásokról csak keveset tudunk. (*Fausto N és mtsai, 1994*) Az endoteliális sejtek és a portális vénák ágai esszenciális szerepet töltenek be az organogenezis és a regeneráció folyamatában. (*McKellar M, 1949; Matsumoto K és mtsai, 2001; Lemaigre FP, 2009; Hoehme S és mtsai, 2010*) Ekataksin már korábban leírta a porto-centrális távolság meghosszabbodását (szövetteni metszeteken mérve), és a lebenyek számának növekedését fejlődő emberi májban. (*Ekataksin W és mtsai, 1999; Landing BH és mtsai, 1991*) Sertésben emellett a hepatociták száma és mérete is növekedést mutat. (*Johnson FP, 1919; Ekataksin W és mtsai, 1999; Vollmar B és mtsai, 2002*) Többszörös parciális hepatektómiát követően pedig szintén megfigyelték a lebenyek számának növekedését. (*Simpson GEC, 1963, Yashina IN, 1971*)

4. A májregeneráció humán vonatkozásai

Ma humán tekintetben a krónikus májbetegségek és ezek végstádiuma, a májcirrózis incidenciája fokozatosan nő. A tendencia köszönhető az egyre gyakrabban előforduló vírusfertőzéseknek, a nagymértékű alkoholfogyasztásnak, de a veleszületett májbetegségeknek is. A fulmináns májelégtelenség és a cirrózis ma egyetlen módszerrel, a transzplantációval gyógyítható. Ezért folynak intenzív kutatások az őssejtek aktiválására és átültethetőségére vonatkozóan. (*Crosby HA és mtsai, 2002; Zhang L és mtsai, 2008; Zhao Q és mtsai 2009; Holt N és mtsai, 2010*) Növekedési faktorok (G-CSF) alkalmazása őssejtek aktiválására hatékonyan bizonyult akut szívizomelhalás és veseelégtelenség esetén. Emellett vizsgálják a hemopoetikus őssejtek és a plerixafor (Mozobil, a hemopietikus őssejtek transzplantáció céljából való gyűjtésének elősegítésére alkalmazzák elsősorban, G-CSF-rel együtt adva) hatását is akut májelégtelenségben. (*Mark AL és mtsai, 2010; Wesson RN és mtsai, 2011; Micallef IN és mtsai, 2012*) A regeneráció során végbemenő strukturális változások emberben nehezen követhetőek. Egy vizsgálat során kadaver recipiensek és májszegment (jobb lebeny) transzplantáció recipienseinek májbiopsziáit hasonlították össze a műtétet követő 3 hónap alatt. A szegmenttranszplantáció után a májsejtek osztódása azonnal megindult, azok mérete nem változott, a portális ágak száma pedig szignifikánsan csökkent. A lebenyek méretét nem vizsgálták. (*Huang RQ és mtsai, 2004*)

5. Kérdésfelvetés

5.1. A lebenyészerve szerkezet változása az egyedfejlődés és a regeneráció során

A máj regenerációs kapacitása, mint fentebb említettük, rendkívül nagy. (*Higgins GM és mtsai, 1931*) Mérete a szervezet igényeihez igazodik, mégpedig azzal a céllal, hogy méregtelenítő, szintetizáló funkciója a homeosztázis fenntartására elegendő legyen. (*Michalopoulos GK és mtsai, 1997*) Az emberi máj tömege átlagosan 1,5 kg, amely kb. 2,5%-a a testtömegnek, míg a patkány mája annak 5%-át alkotja. Normális esetben a posztnatális időszakban csak az egyedfejlődés során megy végbe jelentős méretbeli

növekedés. (*Ekataksin W és mtsai, 1991; Teutsch HF, 1999*) Minden életkorban előfordulhat azonban, hogy sebészi beavatkozást követően (pl. májrezekció tumor miatt, élődonoros májtranszplantáció donora) veszít a máj tömegéből, vagy toxikus, esetleg hipoxiás nekrosis következtében a funkcionáló májtömeg csökken. Mindkét esetben megegyeznek a proliferációt kiváltó és fenntartó molekulák, de az ontogenezis és a regeneráció dinamikája eltérő, hiszen a regenerációnak nagyságrendekkel gyorsabban kell végbemennie, hogy a teljes máj a kiesett funkcióját mielőbb pótolni tudja.

A fiziológias és regeneratív májnövekedést molekuláris szinten számos munkacsoport tanulmányozta már korábban. (*W és mtsai, 1999; Landing BH és mtsai, 1991; Vollmar B és mtsai, 2002*) Az azonban, hogy a két növekedési folyamat alatt a máj szerkezetében milyen változások következnek be, pontosan nem ismert.

Kísérleteinkben 2 különböző növekedési modellt vizsgáltunk: 1. az egyedfejlődés során tapasztalt májnövekedést, 2. a sebészi és a kémiai hepatektómiát követően mind a hepatociták, mind pedig a progenitor sejtek útján végbemenő regenerációt.

A májlebenykék változásának mindegyik modellben 3 lehetséges módja van:

- a. új lebenykék képződnek,
- b. a lebenykék mérete megnő,
- c. a lobulusok számának növekedése együtt jár azok megnagyobbodásával is.

A lebenykék szerkezeti - és egyben funkcionális - egységek is, méretük, számuk az őket felépítő sejtek mennyiségétől, és nagyságától nagymértékben függ. Ezért kísérleteink során azt a tényt sem hagyhattuk figyelmen kívül, miszerint a lebenykék esetleges megnagyobbodása a májsejtek méretének illetve számának növekedéséből is adódhat.

5.2. A hepatokarcinogenezis és a májregeneráció korai lépéseinek összehasonlítása

Az egyedfejlődés alatt és az egyszerű 2/3-os parciális hepatektómiát követően a hepatociták osztódása felelős a máj megnagyobbodásáért, az őssejtek a Heringkanálisokban nem aktiválódnak. (*Michalopoulos GK és mtsai, 1997*) Azonban ha a májsejtek osztódásának gátlása mellett alkalmazunk mitogén stimulust, megindul az őssejtekből származó progenitor sejtek proliferációja. A Heringkanálisok meghosszabbításaként ovális magvú sejtekből felépülő, lumennel rendelkező, kis

epeutakra emlékeztető morfológiájú képletek nőnek a parenchimába. Sejtjeik mind hepatocita, mind pedig cholangiocita irányába képesek differenciálódni. A májsejt irányú differenciálódást követően a kis, bazofil sejtmaggal rendelkező hepatociták kezdetben csoportokba tömörülnek, így kialakulnak a regenerációs fókuszok. (*Evarts RP és mtsai, 1987; Paku S és mtsai, 2001; Wang X és mtsai 2003*) Kísérleteink során választ kerestünk arra, hogy a hepatektómia utáni első néhány hétben lezajló változások (progenitor sejtek proliferációja, fókuszok képződése) befolyásolják-e a később helyreálló lebenykés szerkezetet: változik-e a lebenyek száma, mérete.

Korábbi munkánk során többször tapasztaltuk, hogy amennyiben a patkányok a hepatektómia előtt karcinogén előkezelésben részesülnek, a regenerációs fókuszok korábban alakulnak ki és a folyamat gyorsabban lezajlik. A jelenséget a következő megfigyeléssel hoztuk összefüggésbe. A rég ismert Solt-Farber karcinogenezis modellt alkalmazva (*Solt D és mtsai, 1976*) észrevettük, hogy a dietil-nitrózammal (DEN, $C_4H_{10}N_2O$, egy alkilált nitrózamin származék, ismert karcinogén és mutagén potenciállal bír), történő indukciót követően, a periportális és pericentrális nekrotikus regenerálódásával párhuzamosan kis epeutak jelennek meg a periportális régióban, amelyek tovább proliferálva nőnek a centrális véna irányába intralobulárisan. Morfológiájukat tekintve az ovális sejtekből álló dukális képletekre hasonlítanak, de sejtjeik laposabbak, az általuk formált cső lumene pedig szűkebb, mint az előbbieket esetében. Ezek a kis epeutak még 3 hónap elteltével is kimutathatók a kizárólag DEN kezelésben részesült állatoknál.

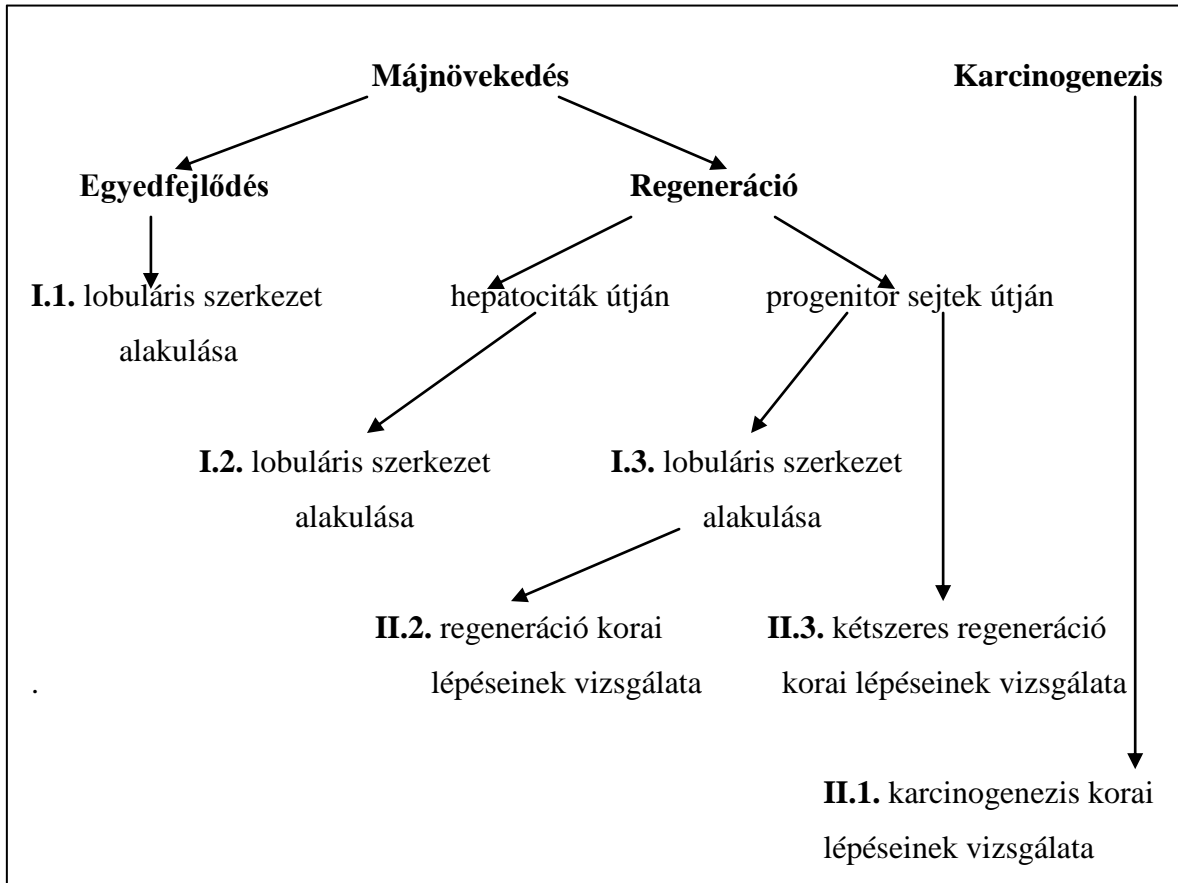
Progenitor sejtes regenerációt követően - AAF/PH modellben (*Paku S és mtsai, 2005*) a lebenykés szerkezet helyreállása után is hasonló, kis epeutakra emlékeztető képletek maradtak vissza a parenchimában. Felvetettük a lehetőséget, miszerint ezzel a két módszerrel (1. karcinogén indukció, 2. lezajlott regeneráció) megnöveljük a progenitor sejtek állományát, hiszen a kis epeutak a Hering-csatornák folytatásaként vannak jelen. E magyarázat szerint az egyszer már regenerált máj másodsorra gyorsabban és több fókusszal kell, hogy regenerálódjon. Ennek a két modellnek – úgymint karcinogén indukció és kétszeres regeneráció – szerkezeti változásait vetettük össze az egyszeri, progenitor sejtek útján történő regeneráció első heteiben bekövetkező változásaival. Kíváncsiak voltunk a regenerációs fókuszok megjelenésének idejében, méretében, és a kis epeutak mennyiségében megnyilvánuló eltérésekre. A Solt-Farber kísérlet során

megjelenő fókuszok esetleges rezisztens hepatocita eredetét számos tanulmány felvetette már, de ezt a mai napig nem sikerült egyértelműen bizonyítani. (*Anilkumar TV és mtsai, 1995; Sell S, 2010; Alison MR és mtsai, 2005*)

A kétszeres regeneráció során a sebészi parciális hepatektómia nem volt kivitelezhető, ezért mindhárom modellben az összehasonlíthatóság miatt kémiai hepatektómiát alkalmaztunk egyszeri nagy dózisu széntetraklorid orális adagolásával. (*Solt DB és mtsai, 1983; Castelain Ph és mtsai, 1989; Palmes D és mtsai, 2004*) Bár a sebészi hepatektómia reprodukálhatóbb kísérleteti körülményeket biztosít, mint a kémiai (a széntetraklorid felszívódását a gyomorból a standard körülmények ellenére számos tényező befolyásolhatja, mint például öklendezés, gyomor teltsége), ugyanazon az állaton kétszer egymást követően is könnyen elvégezhető. Kémiai hepatektómia során nem a máj tömegét csökkentettük, hanem centrális nekrosis előidézésével a működőképes májsejtek számát, és ezzel készítettük regenerációra a májat.

Úgy gondoltuk, hogy az említett kis epeutak kialakulása és perzisztálása kapcsolatba hozható az eltérő dinamikájú regenerációs történésekkel a DEN-indukciót és a lezajlott regenerációt követően, illetve az enélkül végbemenő regeneráció során. Kísérleteinkkel tehát azt a feltételezést igyekeztünk alátámasztani, miszerint kialakulhatnak és perzisztálhatnak inaktív ovális sejteket tartalmazó lumennel rendelkező képletek, amelyek egy esetleges regenerációs folyamatban „össejt pool”-ként funkcionálhatnak, felgyorsítva ezzel a regenerációt.

A máj növekedési folyamatait tehát az alábbi következő megközelítés alapján vizsgáltuk: (*4. ábra*)



4. ábra: A máj növekedési folyamatainak vizsgálata

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során a következő kérdésekre kerestük a választ:

- 1. Hogyan módosul a lebenykés szerkezet az egyedfejlődés és a májsejtek, illetve a progenitor sejtek részvételével történő májregeneráció során? A kétféle regenerációs folyamat végén van-e eltérés a lebenyekék számában, méretében, esetleg mindkettőben?**
- 2. Hogyan változik a májsejtek mérete az egyedfejlődés és a kétféle regeneráció során?**
- 3. A regeneráció és a hepatokarcinogenezis során képződő fókuszok eredetének, szerepének összehasonlítása.**

MÓDSZEREK

1. Kísérleti állatok

Munkánk során az Európai Unió állatkísérletekre vonatkozó irányelveit követtük.

Kísérleteinket hím Fischer 344 patkányokon végeztük el, melyek az Intézet saját tenyészetéből származtak. A kísérleteket 160 g testsúlyú állatokon indítottuk el a testtömegbeli különbségekből adódó mérési hibák elkerülésének érdekében, az ettől való eltéréseket külön jelöltük (pl. a fejlődő állatok esetében). Sebészi hepatektómia esetén minden mérést a jobb lateralis májlebenyen, míg kémiai nekrozist követően a mediális lebenyen végeztünk el.

2. Kísérleti módszerek

2.1. Állatkísérleti protokollok

2.1.1. 2/3-os tradicionális parciális hepatektómia

Éter anesztézia alatt a patkányok hasán medián metszést ejtettünk, majd a ML és a LLL alatt - azokat megemelve -, az afferens ereket lekötöttük. Ezt követően a két izolált lebenyt kimetszettük, a hasfalat és a bőrt összevarrtuk. (*Higgins GM és mtsai, 1931*)

2.1.2. AAF/PH kísérlet

A progenitor sejtek útján történő májregeneráció vizsgálata során a 160 g-os állatokon elvégzett 2/3-os PH előtt 6, azt követően pedig 5 napig AAF-t adagoltunk szondán keresztül (dózis: 7mg/ttkg/nap, 1%-os metilcellulózban szuszpendálva 2 mg/ml koncentrációban), a hepatociták osztódásának gátlása érdekében. A műtét napján AAF kezelést az állatok nem kaptak a műtéti stressz miatt. (*Solt DB és mtsai, 1977*)

2.1.3. Kémiai hepatektómiával módosított Solt-Farber modell - M-S-F (DEN/AAF/CCl₄)

160 g-os állatoknak intraperitoneálisan 200 mg/ttkg dózisban dietil-nitrózamint adtunk, majd a 14. naptól a 20. napig 7,5 mg/ttkg/nap dózisban szondán keresztül acetilaminofluorent (AAF) adagoltunk (1%-os metilcellulózban szuszpendálva 2 mg/ml koncentrációban). Ezután a 21. napon 20 %-os szén-tetrakloriddal 10ml/ttkg dózisban szintén szondán keresztül ún. kémiai parciális hepatektómiát végeztünk. A 22. naptól a 27. napig (6 napon át) ismét AAF-t adagoltunk szondával 7,5mg/ttkg/nap dózisban. (*Solt DB és mtsai, 1983; Palmes D és mtsai, 2004*)

2.1.4. Kémiai hepatektómiával módosított AAF/PH kísérlet - REG-1 (AAF/CCl₄) kísérlet

160 g-os állatoknak intraperitoneálisan DEN helyett 0,2 ml fiziológiás sóoldatot adtunk. A kezelést követő 14. naptól kezdve elvégeztük a fent leírt leírt AAF/CCl₄ protokollt. (*Petersen BE és mtsai, 1998*)

2.1.5. Ismételt regeneráció - REG-2 (2xAAF/CCl₄) kísérlet

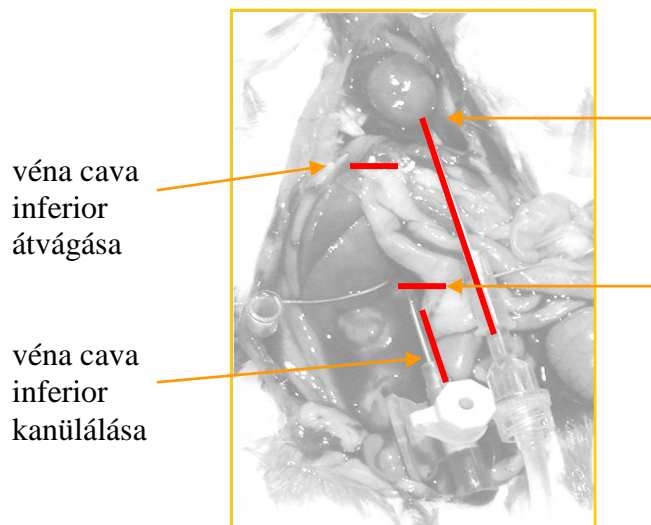
160 g-os állatoknak intraperitoneálisan 0,2 ml fiziológiás sóoldatot adtunk. A kezelést követő 14. naptól kezdve elvégeztük a módosított Solt-Farber modellben leírt AAF/CCl₄ protokollt.

A fiziológiás sóoldat injektálását követően 3 hónap elteltével a kísérletet megismételtük. (A 12. hét 1. napján AAF kezelést indítottunk, a kémiai hepatektómia a 13. hét 1. napján történt.)

2.1.6. A lebenykék méretének meghatározása a centrális vénák műgyantával történő feltöltésével

Az intraperitoneálisan alkalmazott Nembutallal (70 mg/kg) előidézett anesztézia beálltát követően a patkányok hasfalát megnyitottuk. A vena cava inferiorba, a renális vénák beszájadásától kraniálisan heparinnal átöblített, 18G-s kanült helyeztünk. A mellkas megnyitását követően a szív bal kamrájába tűt szúrtunk, amelyet egy PBS-t tartalmazó infúziós üveg szerelékéhez csatlakoztattunk. A szív pumpafunkcióját kihasználva a kísérleti állatot elvéreztettük. Annak érdekében, hogy könnyebben tudjon elfolyani a

gyanta elől a folyadék, a beavatkozás végén a portális vénát is átvágtuk, majd a vena cava inferiorra a máj felett lekötöttük. A kanülön, és a lekötés által retrográd módon a hepaticus vénákon keresztül színes és egyben fluoreszcens festéket tartalmazó polisztirol műgyantával feltöltöttük a centrális vénákat és részlegesen a szinuszoidokat sztereomikroszkópos ellenőrzés alatt. A gyantát (VUP 4652 vinilészter gyanta, gyorsító: NL 23) a beadás előtt katalizátorával (Trigonox 239) aktiváltuk, a polimerizáció után a vizsgálni kívánt lebenyt eltávolítottuk, tömegét a gyantával együtt lemértük. (5. ábra)



5. ábra: 2/3-os parciális hepatektómiát követően regenerált máj vena cava inferiorját a hasfal megnyitását követően kanüláltuk.

2.1.7. A centrális és a portális rendszer együttes feltöltése – a lebenyt borító lebenykék abszolút számának és az egy centrális vénát körülvevő portális ágak számának meghatározása

A centrális és a portális rendszer együttes feltöltését végeztük el kék és piros festéket tartalmazó műgyantával egymás után a portális vénába és a vena cava inferiorba helyezett 18 G-s, heparinnal átöblített kanülökön keresztül. A kanülálás után az állatot kivérettük, az előző kísérlethez hasonlóan a mellkast itt is megnyitottuk, majd a bal szívfélbe helyezett kanülön keresztül a keringést PBS-sel átöblítettük, a v. cava inferiorra a vena hepatica-k beszájadzása felett lekötöttük. A gyantákhoz a beadás előtt katalizátort kevertünk, majd először a portális vénába a kék gyantát injektáltuk, egészen

addig, amíg az a máj felszínén a portális triászok területén meg nem jelent. Miután a gyanta polimerizált, a vena cava inferiorba helyezett kanülön át a piros gyantát is a májba juttattuk. A feltöltést addig folytattuk, amíg az a máj felszínén ki nem rajzolta a centrális vénákat. Az eltávolított májlebenyen sztereomikroszkóp segítségével (tus 0,2 mm) meghatároztuk az egy lebenyt borító lebenykék abszolút számát, valamint a lebenyről készített fotókon az egy centralis vénát (piros) körülvevő portális ágak (kék) számát. (6. ábra)



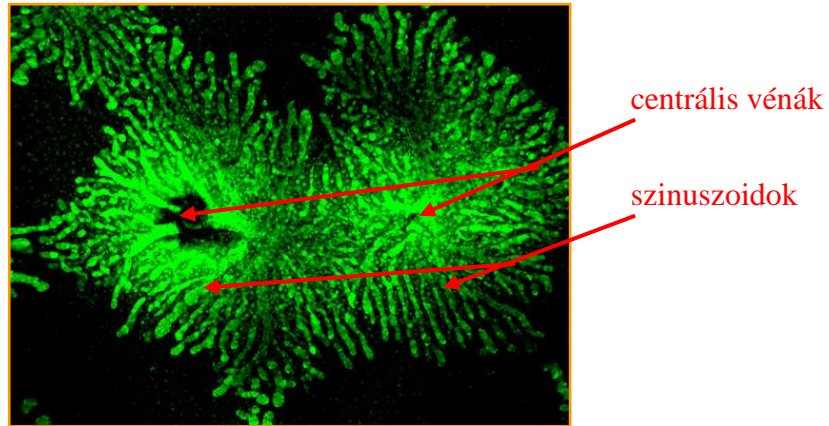
6. ábra: A centrális és a portális rendszer együttes feltöltését végeztük el piros és kék festéket tartalmazó műgyantával egymás után a portális vénába és a vena cava inferiorba helyezett kanülökön keresztül. Az eltávolított májlebenyen meghatároztuk az egy lebenyt borító lebenykék abszolút számát, valamint az egy centralis vénát (piros) körülvevő portális ágak (kék) számát. A pontok az egyes lebenykéket jelölik.

2.2. Morfometriai vizsgálatok

2.2.1. A lebenykék területének, kerületének meghatározása

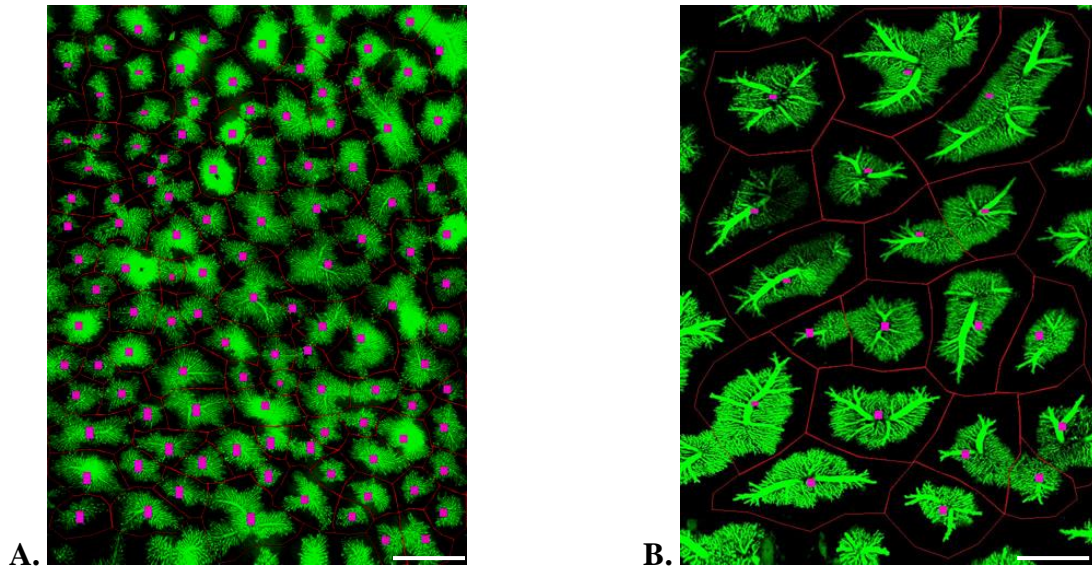
A vena cava inferioron keresztül műgyantával feltöltött lebeny felszínéről az eltávolítást követően inverz konfokális mikroszkóp (Bio-Rad MRC1024, Richmond, CA confocal system (Ex488/Em520±16nm)) segítségével 2 X-es nagyítású objektívvel felvételeket készítettünk. A vena cava inferiorba helyezett kanülön keresztül a retrográd feltöltésnek

köszönhetően a zölden világító kontrasztanyag a centrális vénákba, azokból pedig a szinuszoidokba jutott, de a portális triászokat nem érte el. A periportális zóna feketén jelent meg a felvételeken. (7. ábra)



7. ábra: A vena cava inferiorba helyezett kanülön keresztül a retrográd feltöltésnek köszönhetően a zölden világító kontrasztanyag a centrális vénákba, azokból pedig a szinuszoidokba jutott. A periportális zóna feketén jelent meg a felvételeken. 2X-es nagyítás

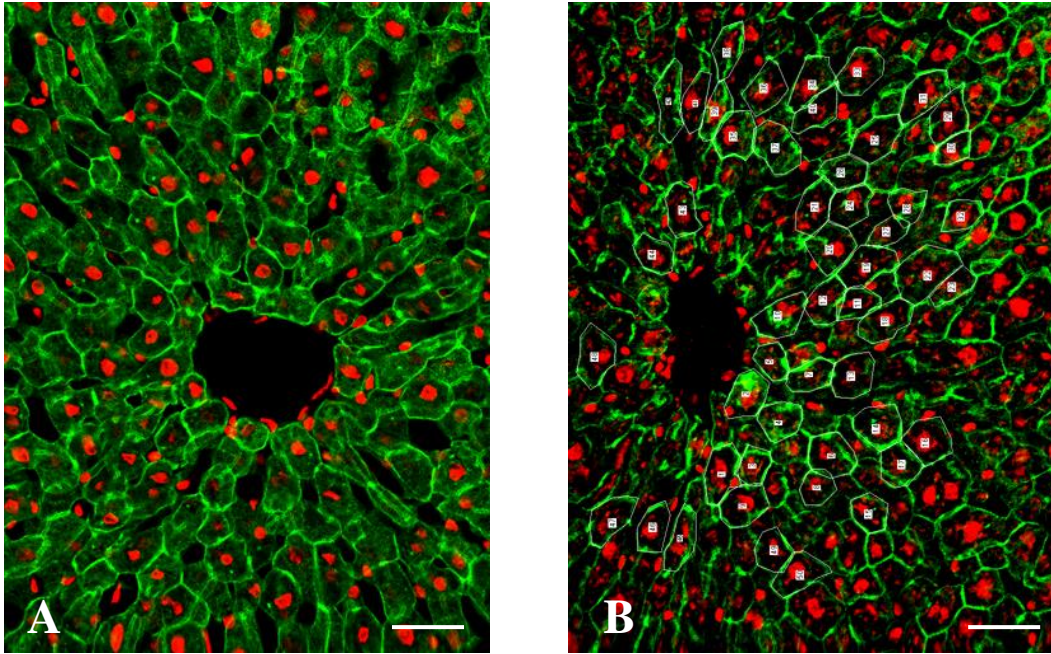
Az interlobularis határokat - amelyeket piros vonallal jelöltünk - Image J nevű program segítségével a szomszédos lebenykék szinuszoidjai között félúton, a fekete zóna középvonalában, vagyis a vaszkuláris szeptum mentén húztuk meg. Ott, ahol a lebenykék túltöltése miatt az egymással szomszédosak szinuszoidjai összeértek, az egymással szemben haladó szinuszoidok találkozásánál húztunk határvonalat. A program lehetőséget nyújtott a lebenykék területének, kerületének, és az egységnyi területre eső lebenykék számának meghatározására. A lebenykék adatait ezt követően átlagoltuk, így az egyes időpontokban eltávolított májakban bekövetkező szerkezeti változásokat egymáshoz viszonyítani tudtuk. (8. ábra)



8. ábra: A centrális rendszer feltöltését követően a máj felszínéről konfokális mikroszkóp segítségével készített felvételek, 2X-es nagyítással. **A.** 100g-os patkány, **B.** PH után 14.nap. A vonalak mérete 1mm.

2.2.2. A hepatociták méretének meghatározása

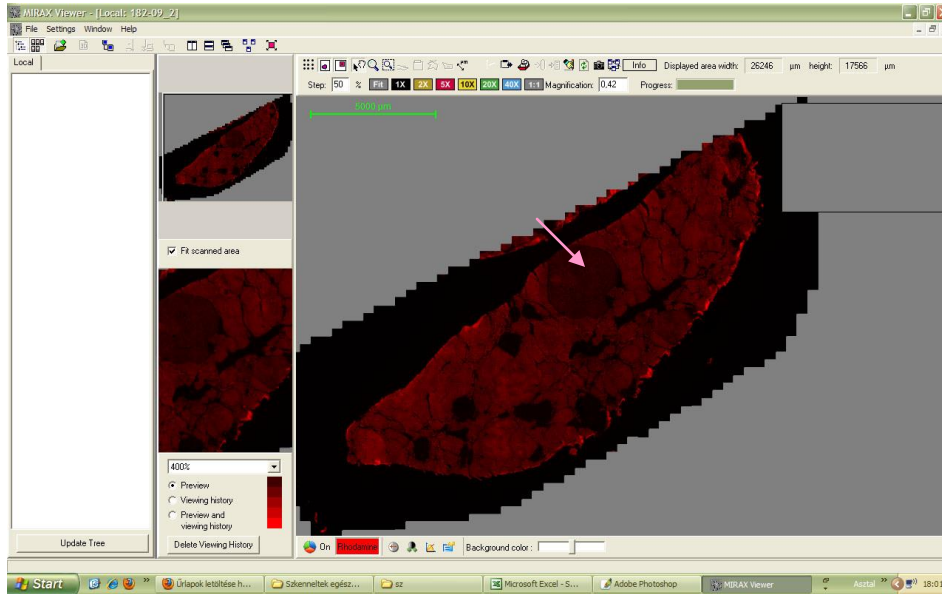
A vizsgált időpontokban feltöltés nélkül eltávolított májlebenyeket folyékony nitrogénnal lefagyasztottuk, majd kriomikrotom segítségével 10 μm vastagságú fagyasztott metszeteket készítettünk, melyeket 10 percig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on metanolban fixáltunk. Ezt követően (PBS-es mosás után) direkt jelölt (FITC, 494/520nm) pancitokeratin antitesttel (Dako, Glostrup, Denmark, katalógusszám: F0859, hígítás: 1:10, 60 perces inkubálás) láthatóvá tettük a hepatociták intermedier filamantumokat tartalmazó citoszkeletonját, ami a membrán alatt intenzívebb festődést mutatott. Ez lehetővé tette a sejthatárok azonosítását. A magfestéshez propidium-jodidot (10 perces inkubálás, 1:500 hígítás, 1mg/ml oldat) használtunk. A metszetekről konfokális mikroszkóppal (40 X-es nagyítással) felvételeket készítettünk, melyeken minden lebenyben 3-3 véletlenszerűen kiválasztott pericentrális területen 50-50 hepatocita területét és kerületét határoztuk meg a már említett Image J képanalizáló program segítségével. (9. ábra)



9. ábra: Pericentrális terület A: kontroll, B: AAF/PH utáni 84. napon eltávolított májból konfokális mikroszkóppal, 40X-es nagyítással. Zöld: direkt jelölt pancitokeratin antitest, piros: propidium-jodid. Image J képanalizáló program segítségével 50-50 hepatocita területét és kerületét határoztuk meg. A vonal mérete: 50 μm .

2.2.3. A regenerációs fókuszok számának és méretének meghatározása

A vizsgált patkányok máját eltávolítottuk. A májakat lebenyekre szétválasztva folyékony nitrogénnel lefagyasztottuk. A fagyasztott mediális lebenyből 10 μm vastag metszeteket készítettünk, melyeket 10 percen keresztül metanolban fixáltunk $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. PBS-sel történő öblítést követően kimutattuk a májsejtek endogén biotin tartalmát (Streptavidin TRITC, Jackson Lab, 016 020 084, hígítás: 1:100 30 percig). Az avidin a májsejtekben lévő biotinhoz kötődik, de a regenerációs fókuszok sejtjeit azok csökkent biotin tartalma miatt nem jelöli, ezért azok sötétebb foltként jelennek meg. Ezáltal számuk, méretük meghatározhatóvá válik. Az elkészült metszeteket ezt követően beszkeneltük (3D Histech Kft, Panoramic SCAN), majd a MIRAX Viewer nevű program segítségével a jól körülhatárolható fókuszokat leszámoltuk és meghatároztuk legnagyobb átmérőjüket. (11. ábra)



11. ábra: Mirax Viewer nevű program segítségével a szkennelt metszeteken megszámloltuk a regenerációs fókuszokat és lemértük azok átmérőjét, majd az így nyert adatokat átlagoltuk és egységnyi területre vonatkoztattuk. A nyíl fókusyra mutat.

2.2.4. A kis epeutak által elfoglalt terület meghatározása

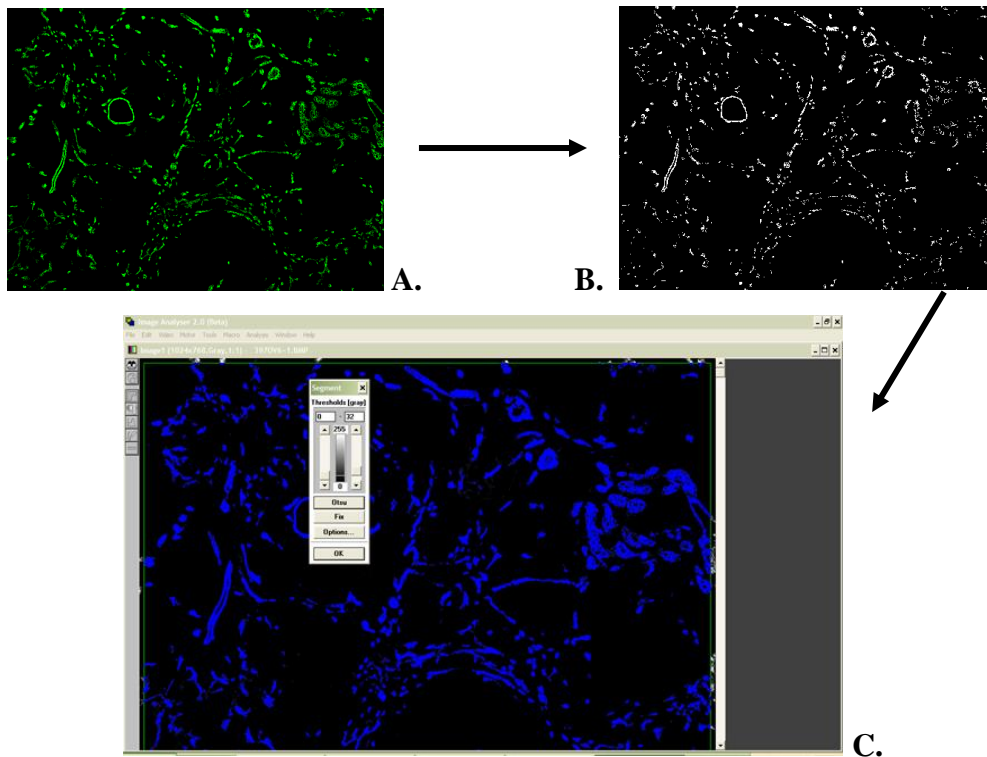
A vizsgált patkányok máját eltávolítottuk. A májakat lebenyekre szétválasztva folyékony nitrogénnel lefagyasztottuk. A fagyasztott májak mediális lebenyéből kriomikrotom segítségével 10 µm vastag metszeteket készítettünk, melyeket 10 percen keresztül metanolban fixáltunk -20 °C-on. PBS-sel történő öblítést követően anti-citokeratin (Ov6) antitesttel inkubáltuk a metszeteket 60 percen keresztül. Ezután ismét PBS-sel öblítés következett (3X5 perc), majd a szekunder antitesttel (anti-mouse FITC) 30 percig inkubáltuk őket. (2. táblázat)

Minden metszetről 10 X-es nagyítással 4 különböző területről felvételt készítettünk, minden felvétel pedig egyaránt tartalmazott portális és centrális területeket is.

2. táblázat: Alkalmazott antitestek

| Antitest | Típus | Gyártó | Katalógusszám | Hígítás |
|------------------|-------------------|-------------|---------------|---------|
| Ov6 | monoklonális egér | R&D Systems | MAB 2020 | 1:50 |
| FITC (494/520nm) | Anti-egér | Jackson Lab | 715-095-150 | 1:100 |

Az IMAN morfometriás programmal meghatároztuk a zöld területek, tehát a kis epeutak által elfoglalt terület százalékos arányát. Ebből következtetni tudunk azok változására, növekedésére. (12. ábra)



12. ábra: Az anti-Ov6/anti-lamininnel jelölt metszetekről készített felvételekből szétválasztottuk az anti-citokeratin antitesttel jelölt epeutakat (A.), majd az Adobe Photoshop nevű programmal fekete-fehér, bmp-fájlokká alakítottuk őket (B.). Az IMAN nevű program felismerte a fehér területeket, és meghatározta, hogy hány százalékát képezik a teljes területnek (C.). A kis epeutak kiterjedését ezzel az eljárással kvantitálni tudtuk. 10X-es nagyítás

2.3. Immunfluoreszcens vizsgálatok - a kis epeutak fenotipizálása

A fagyasztott májak mediális lebenyéből kriomikrotom segítségével több, 10 µm vastag metszetet készítettünk, melyeket 10 percen keresztül metanolban fixáltunk -20 °C-on. PBS-sel történő öblítést követően a következő antitest-kombinációkat alkalmaztuk: (3., 4. táblázat)

3. táblázat: Alkalmazott antitestek

| Antitest | Típus | Gyártó | Katalógusszám | Hígítás |
|-----------------|---------------------|---------------|----------------------|----------------|
| CK-7 | monoklonális egér | BioGenex | MU-255-UC | 1:50 |
| AFP | poliklonális birka | Nordic | ShARa/AFP | 1:100 |
| DLK-1 | poliklonális kecske | BioGenex | MU-255-UC | 1:100 |
| Dezmin | poliklonális nyúl | Lab Vision | RB-9014-P1 | 1: 100 |
| SMA | monoklonális egér | DAKO | MO851 | 1:100 |
| FITC 494/520nm | anti-nyúl | Jackson Lab | 711-095-152 | 1:100 |
| TRITC 555/582nm | anti-egér | Jackson Lab | 715-025-150 | 1:100 |
| FITC 494/520nm | anti-birka | Jackson Lab | 713-095-003 | 1:100 |
| FITC 494/520nm | anti-kecske | Jackson Lab | 705-095-147 | 1:100 |

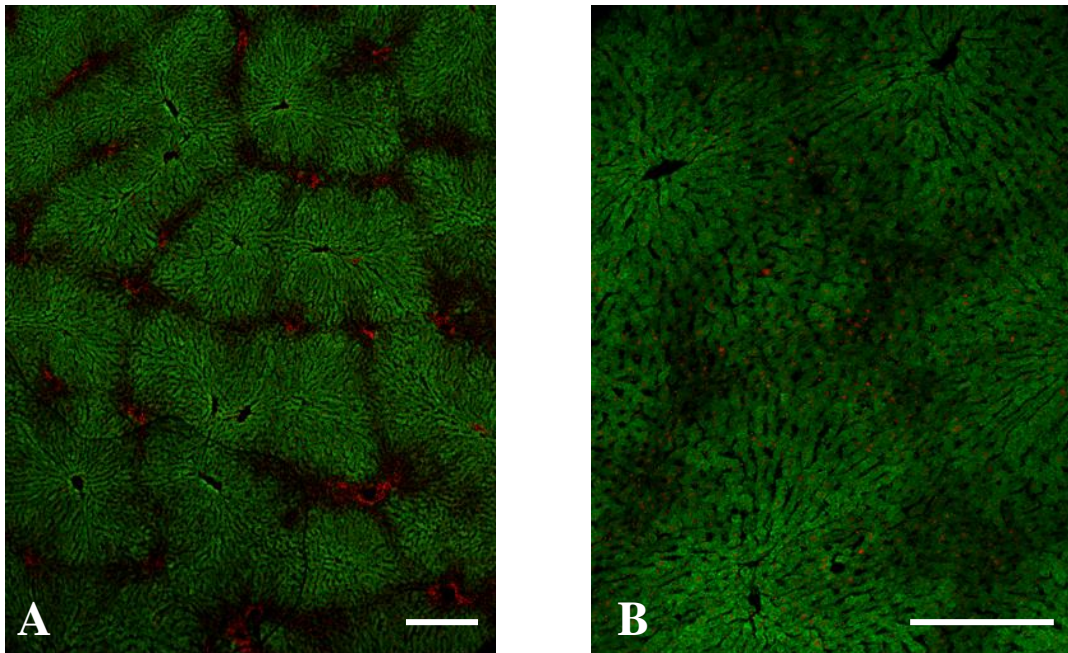
4. táblázat: Alkalmazott antitest-kombinációk

| | Antitest | |
|----|---|--|
| | Primer | szekunder |
| 1. | - anti-CK7 - anti-laminin | - anti-mouse FITC - anti-rabbit TRITC |
| 2. | - anti-AFP - anti-citokeratin (Ov6) | - anti-sheep FITC - anti-mouse TRITC |
| 3. | - anti-DLK-1 - anti-citokeratin (Ov6) | - anti-goat FITC - anti-mouse TRITC |
| 4. | - anti-dezmin - anti-citokeratin (Ov6) | - anti-rabbit FITC - anti-mouse TRITC |
| 5. | - anti-SMA - anti-laminin | - anti-mouse FITC - anti-rabbit TRITC |

A metszetekről aztán konfokális mikroszkóp segítségével 40X-es nagyítással felvételeket készítettünk. Az egyes molekulák expressziójának kimutatása lehetővé tette azoknak a kis epeutaknak a jellemzését, „fenotipizálását”, amelyek a progenitor sejtek osztódásával, növekedésével, differenciálódásával összefüggenek.

2.4. A lebenykék zonalitására vonatkozó vizsgálatok

Az eltávolított májlebenyeket a felszínükre gyakorolt enyhe nyomás alatt lefagyasztottuk, ezáltal sima felszínt nyertünk a szuperficiálisan elhelyezkedő lobulusok metszéséhez (kriomikrotom, 10 perces fixálás metanolban, -20 °C-on). A lobuluson belül centrálisan és midzonálisan elhelyezkedő hepatociták által expresszált citokróm P450 IIE1 enzim megjelölésével a szintén konfokális mikroszkóppal készített felvételeken lehetővé vált a zonalitás változásának nyomon követése (antitest: MBL, Woburn, MA, katalógusszám: BV-3084-3, hígítás: 1:100, 1 órán át szobahőmérsékleten inkubálva, majd FITC-vel jelölt szekunder antitesttel 30 percig inkubálva. (10. ábra)



10. ábra: A: Kontroll máj és B: AAF/PH után 3 hónappal eltávolított máj felszínéről készített metszetek, anti-citokromP450 IIE 1 antitesttel megjelölve és propídium-joddal megfestve. 2X-es és 4X-es nagyítás, a vonal mérete 500 μ m.

3. Kísérleti rendszerek

3.1. A lebenykés szerkezet változásainak vizsgálata az egyedfejlődés és a regeneráció során

3.1.1. A lebenykés szerkezet változásainak vizsgálata az egyedfejlődés során:

- 20, 50, 100, 160, 200 és 250 g-os állatok jobb laterális májlebenyén meghatároztuk a felszín alatti lebenykék kerületét, területét
- 50 és 160 g-os állatokon meghatároztuk a felszín alatti lebenykék számát
- 50, 160, 200 és 250 g-os állatokon lemértük a pericentrálisan elhelyezkedő hepatociták kerületét és területét

(13. ábra)

3.1.2. A lebenykes szerkezet változásainak vizsgálata a hepatociták segítségével történő májregeneráció során:

160 g-os felnőtt patkányokon tradicionális 2/3-os parciális hepatektómiát végeztünk éteranestézia alatt.

- 160 g-os kontroll állatokon és a PH utáni 1., 2. és a 4. napon, illetve 1, 2, 3 és 4 hét elteltével a jobb laterális májlebenyen meghatároztuk a felszín alatt elhelyezkedő lebenyek kerületét és területét

- 160 g-os, kontroll állatokon, illetve a PH után 2 és 4 héttel a jobb laterális májlebenyen meghatároztuk a felszín alatti lebenyek számát

- 160 g-os kontroll állatokon, illetve a PH után 4 héttel megszámláltuk az egy centrális vénát körülvevő portális ágakat

- 160 g-os kontroll állatokon, illetve 4 héttel a PH után lemértük a pericentrálisan elhelyezkedő hepatociták kerületét és területét

- 160 g-os kontroll állatokon és a PH után 4 héttel a zonalitásra vonatkozó vizsgálatokat végeztünk.

(13. ábra)

3.1.3. A lebenykes szerkezet változásainak vizsgálata a progenitor sejtek részvételével történő májregeneráció során:

Az AAF/PH kísérlet elvégzése után a parciális hepatektómiát követő 84. napon a jobb laterális lebenyen

- lemértük a felszín alatt elhelyezkedő lebenyek kerületét és területét,

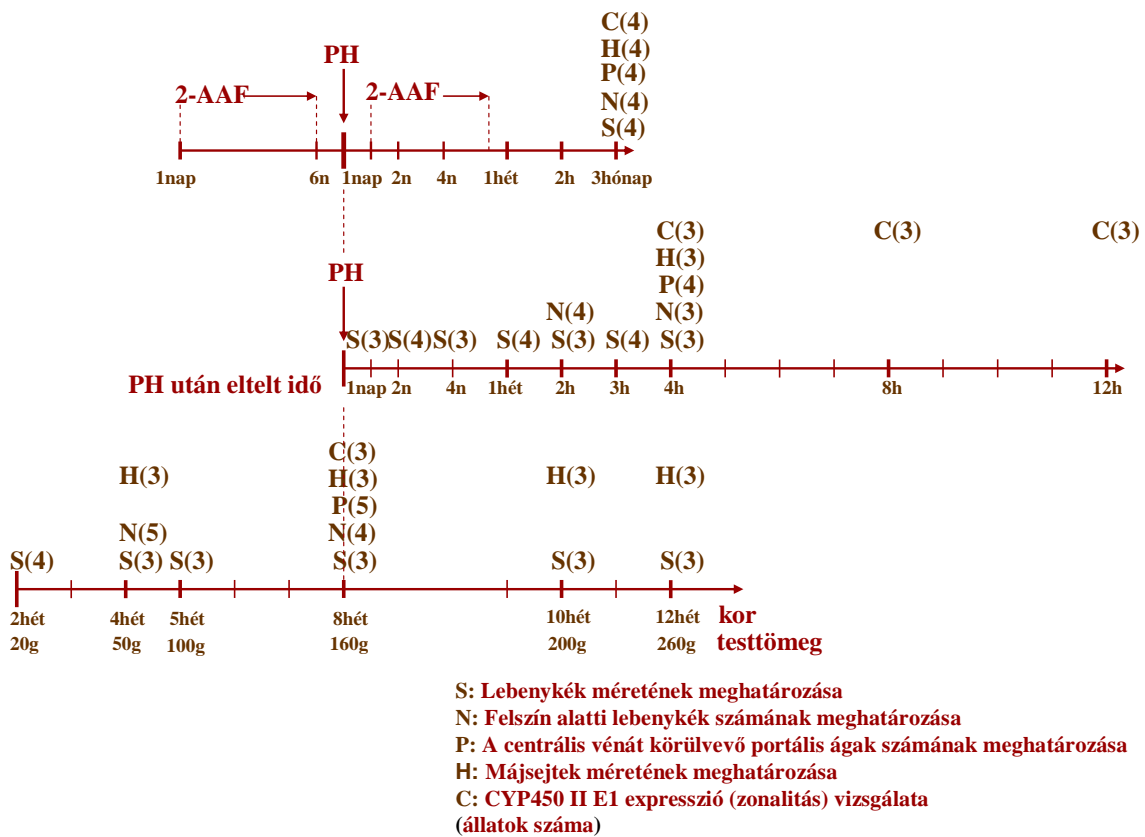
- meghatároztuk a felszín alatt elhelyezkedő lebenyek számát,

- megszámláltuk az egy centrális vénát körülvevő portális ágakat,

- lemértük a pericentrálisan elhelyezkedő hepatociták kerületét és területét,

- valamint a zonalitásra vonatkozó vizsgálatokat végeztünk.

(13. ábra)



13. ábra: A lobuláris szerkezet változására vonatkozó kísérletek az idő függvényében ábrázolva.

Az alsó vonal az egyedfejlődés során vizsgált állatokat mutatja, azok megközelítő testsúlyával együtt. A középső vonalon a hepatociták útján történő regenerációt ábrázoltuk a parciális hepatektómiát követően. Legfelül pedig a progenitor sejtek útján történő regeneráció alatt elvégzett kísérletek láthatók (az AAF adagolását és a PH-t is jelöltük). A betűk az adott időpontokban elvégzett kísérleteket jelölik. A számok a kísérlethez használt állatokat mutatják.

(n: nap, h: hónap)

3.2.2. Kémiai hepatektómiával módosított AAF/PH kísérlet, REG-1 (AAF/CCl₄); az őssejtek részvételével zajló májregeneráció korai lépéseinek vizsgálata:

- az AAF kezelés alatt annak 2. és 5. napján meghatároztuk a kis epeutak kiterjedését.

- a CCl₄-szondáztatás utáni 2., 4., 6., 8., 10., 12., 14. napon, fiz. sóoldat után 12 hét elteltével meghatároztuk az ov-6 pozitív ovális sejtek alkotta duktuluszok által elfoglalt terület arányát, valamint a fókuszok számát és területét.

- jellemeztük a duktuluszok immunfenotípusát

- 12 hónappal a kísérlet kezdetét követően daganatok kialakulását vizsgáltuk

(15. ábra)

3.2.3. Ismételt regeneráció, REG-2 (2xAAF/CCl₄); az őssejtek részvételével zajló kétszeres májregeneráció korai lépéseinek vizsgálata:

A kétszer elvégzett AAF/CCl₄ kezelés között az állatok 3 hónapig pihentek.

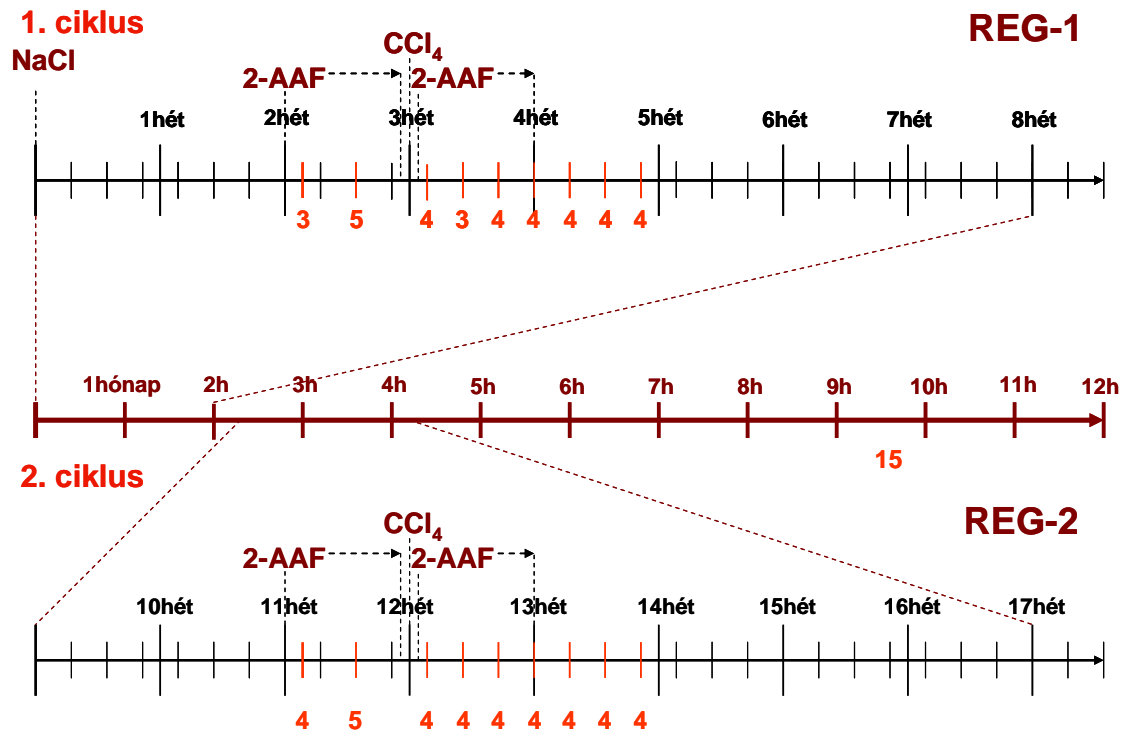
- a 2. AAF kezelés 2. és 5. napján meghatároztuk a kis epeutak kiterjedését

- a 2. CCl₄-szondáztatás utáni 2., 4., 6., 8., 10., 12., 14. napon meghatároztuk az ov-6 pozitív ovális sejtek alkotta duktuluszok által elfoglalt terület arányát, valamint a fókuszok számát és területét

- jellemeztük a duktuluszok immunfenotípusát

- 12 hónappal a kísérlet kezdetét követően daganatok kialakulását vizsgáltuk

(15. ábra)



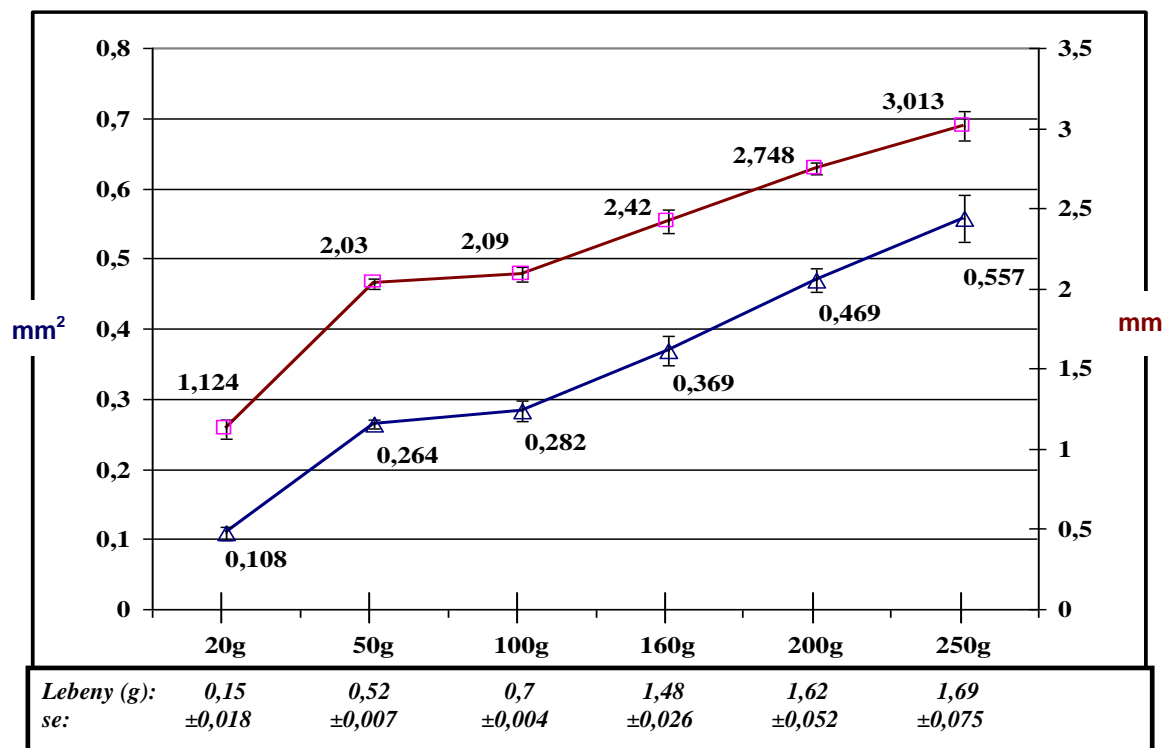
15. ábra: A REG-1 és a REG-2 kísérletben vizsgált időpontok, illetve az állatok száma (pirossal írva) a 12 hónapos kísérleti periódus alatt. A középső vonal mutatja a fizioiógias sóoldat beadását követően eltelt időt. A felső vonal az első 2 hónapot részletezi, az egyszeres regeneráción átesett állatokat jelöli. Az alsó vonal a 3. és 5. hónap megfelelő intervallumát emeli ki, a kétszeres regeneráción átesett állatokat jelöli.

EREDMÉNYEK:

1. A máj lebenykés szerkezetének módosulása az egyedfejlődés és a májsejtek illetve a progenitor sejtek segítségével történő májregeneráció során

1.1. A máj felszínét borító lebenykék területének és kerületének meghatározása

Az **egyedfejlődés** során a lebenykék méretét különböző korú állatokban határoztuk meg, a máj növekedésével való egyszerűbb összehasonlítás érdekében azonban a különböző időpontokban az állatok korát azok testtömegével jelöltük. Testtömegük a vizsgált periódus alatt 20 g-ról 250 g-ra, vagyis 12,5-szeresére, a vizsgált májlebeny tömege pedig 11,27-szorosára nőtt a 20 g-os állathoz viszonyítva. A lebenykék kerülete 1,124 mm-ről 3,013 mm-re, tehát 2,68-szorosára, területe pedig $0,108 \text{ mm}^2$ -ről $0,557 \text{ mm}^2$ -re, tehát 5,16-szorosára emelkedett. (16. ábra, 18. ábra)

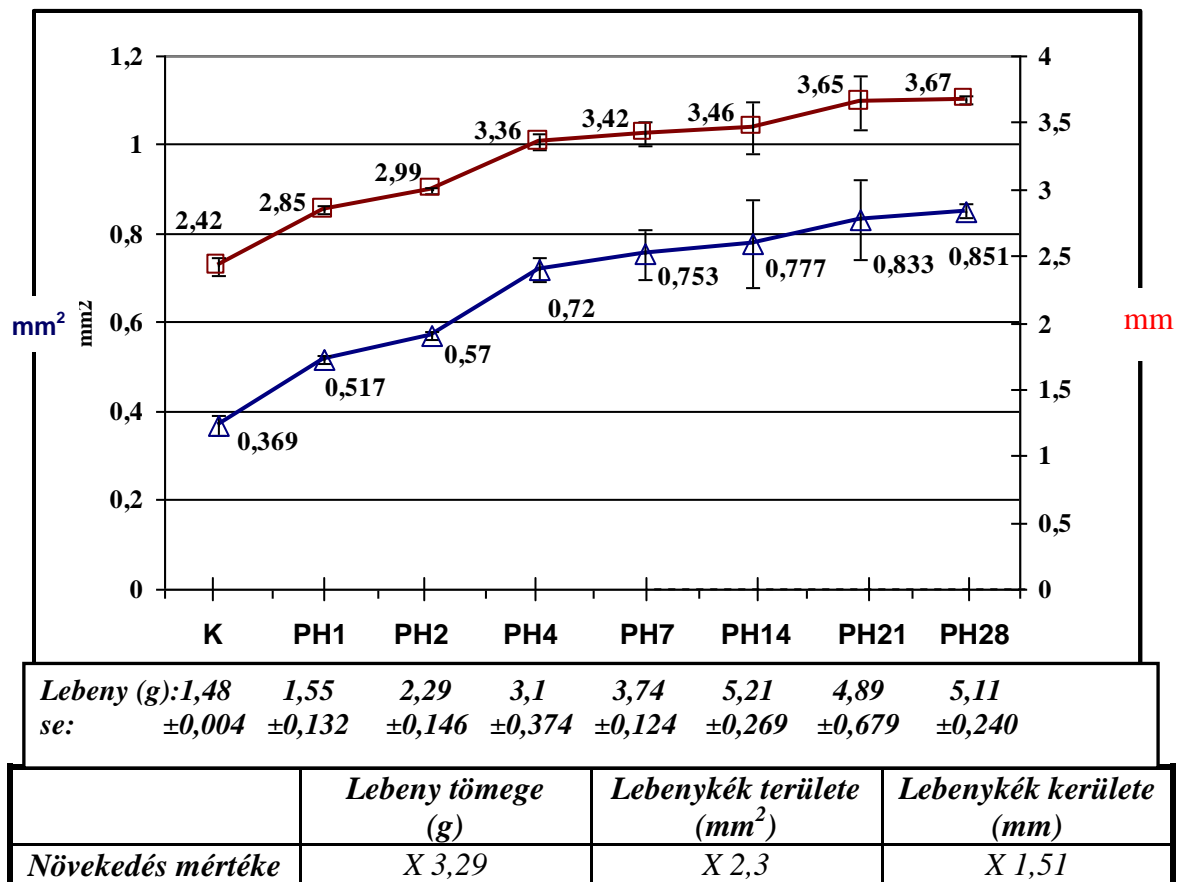


| | Testtömeg (g) | Lebny tömege (g) | Lebnykék területe (mm ²) | Lebnykék kerülete (mm) |
|--------------------------|---------------|------------------|--------------------------------------|------------------------|
| Növekedés mértéke | X 12,5 | X 11,27 | X 5,16 | X 2,68 |

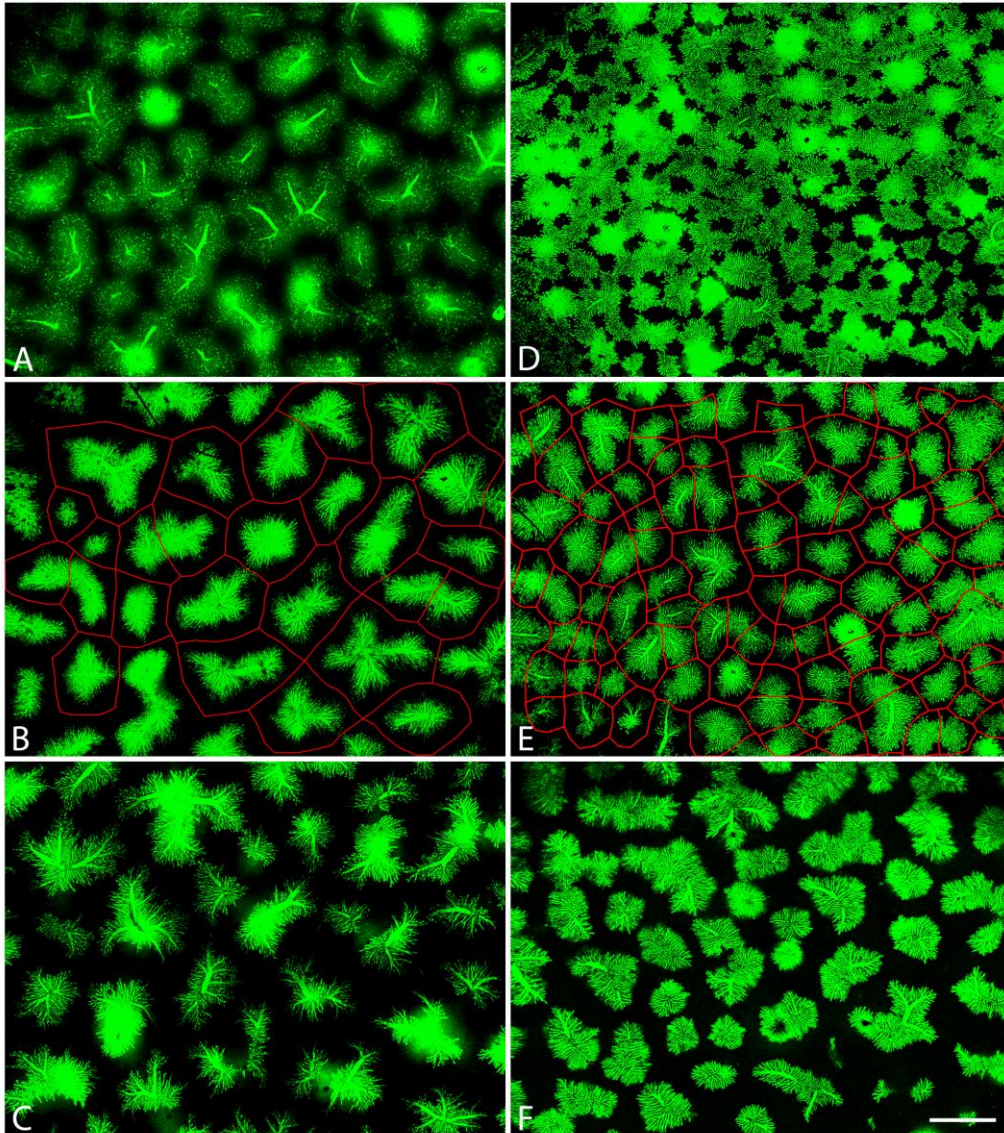
16. ábra: Lebnykék területének, kerületének és a jobb laterális lebny tömegének változása az egyedfejlődés során. Az ábrán a kék vonal a terület, a piros pedig a kerület alakulását jelzi a különböző testtömegű és korú állatoknál. Az ábra alatti táblázat a jobb laterális lebny tömegének növekedését (se: standard error) mutatja. A növekedés mértéke a 250 g-os felnőtt patkányok jobb laterális lebnyén mért paramétereiket viszonyítja a kontroll 20 g-os állatok azonos májlebnyének értékeihez.

A **májregeneráció** vizsgálatára két különböző modellt alkalmaztunk. Sebészi parciális hepatektómiát követően a hepatociták, az AAF/PH modellben pedig a progenitor sejtek részvételével zajló regenerációt vizsgáltuk. Mindkét modellben a hepatektómiát 160g-os patkányokon végeztük el és ezeket az állatokat tekintettük kontrollnak is.

A PH-t követő májregeneráció alatt mind a lebenyek területé, mind pedig a kerületé fokozatosan nőtt az első 7 napban, az ezt követő 3 hétben a növekedés már nem volt szignifikáns. Az általunk vizsgált periódusban a felszín alatti lebenyek átlagos kerületé 2,42 mm-ről 3,67 mm-re, tehát 1,51-szeresére, területé pedig 0,369 mm²-ről 0,851 mm²-re, tehát 2,3-szeresére nőtt, míg a vizsgált lebeny tömege 3,29-szoros növekedést mutatott a kontroll állat laterális lebenyén mért értékekhez viszonyítva. (17. ábra, 18. ábra)

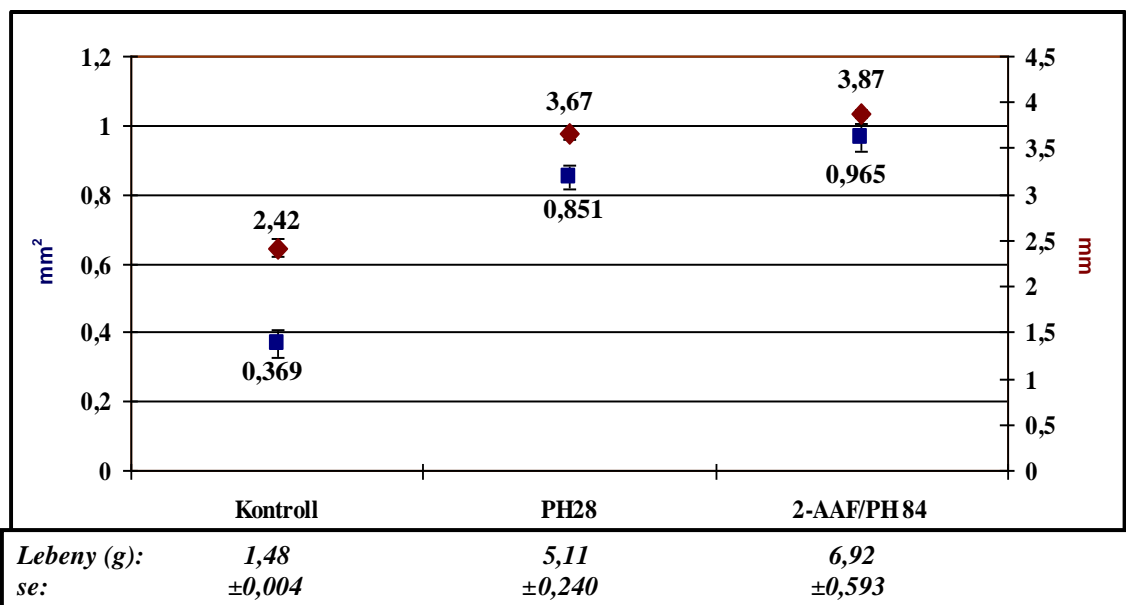


17. ábra: Lebenyek területének, kerületének és a jobb laterális lebeny tömegének változása a májregeneráció során. Az ábrán a kék görbe a terület, a piros pedig a kerület alakulását jelzi az egyes vizsgált időpontokban. Az ábra alatti táblázat a jobb laterális lebeny tömegének növekedését (se: standard error) mutatja. A növekedés mértéke a parciális hepatektómiát követő 28. napon eltávolított patkányok jobb laterális lebenyén mért paramétereiket viszonyítja a kontroll 160 g-os állatok jobb laterális májlebenszék értékeihez.



18. ábra: A felszín alatti lebenykék részleges feltöltése fluoreszcens műgyantával a vena cava inferioron keresztül. A, B, C: PH utáni 2., 4., 28. nap, D, E, F: 50, 160 és 250 g-os állatok mája. A retrográd feltöltés negatívan kirajzolta a lobulusok határait. A periportális zóna feketén jelent meg a felvételeken. A feltételezett interlobularis határokat a piros vonallal jeleztük, amelyeket a fekete zóna középvonalában, vagyis a vaszkuláris szeptum mentén húztunk meg. A felvételeken jól látszik a lebenykék növekedése mind a PH-t követően, mind pedig az egyedfejlődés alatt. A vonal mérete 1 mm. 2X-es nagyítás.

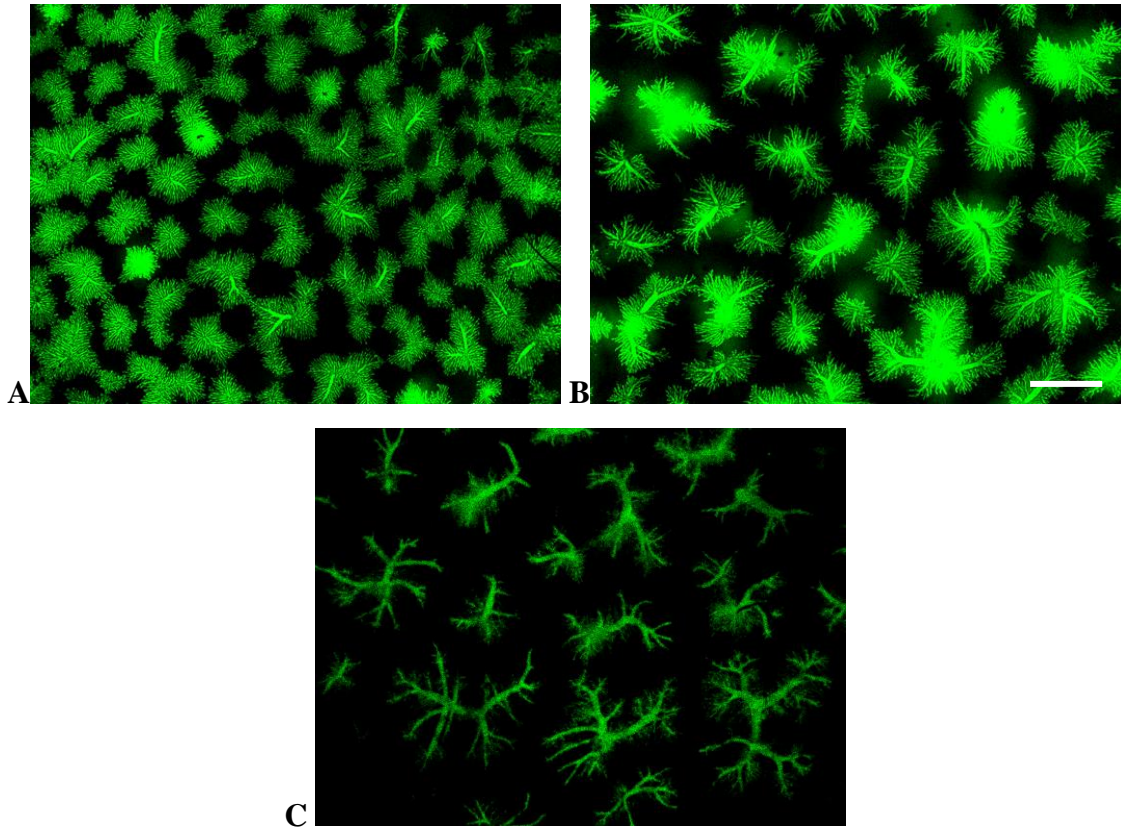
A progenitor sejtek révén történő regeneráció jellemzésére 84 nappal (3 hónappal) az AAF/PH kísérlet keretében végzett parciális hepatektómia után végeztük el a fent leírt méréseket. Az eredményeket összevetettük a kontroll 160g-os és a csak PH-t követően regenerált májakon (a 28. napon) mért értékekkel. A vizsgált laterális lebeny tömege a PH utáni 28. napon a kontrollhoz viszonyítva több mint 3-szorosára, az AAF/PH után közel 5-szörösére nőtt. A lebenykék kerülete a PH után másfélszeresére, az AAF/PH után 1,6-szorosára nőtt. A lebenykék területe pedig a PH után 2,3-szeresére, az AAF/PH után 2,62-szorosára növekedett. (19. ábra), (20. ábra)



| | <i>Testtömeg (g)</i> | <i>Lebeny tömege (g)</i> | <i>Lebenykék területe (mm²)</i> | <i>Lebenykék kerülete (mm)</i> |
|---|----------------------|--------------------------|--|--------------------------------|
| <i>Növekedés mértéke a PH utáni 28. napon</i> | X 1,6 | X 3,29 | X 2,3 | X 1,51 |
| <i>Növekedés mértéke a 2-AAF/PH utáni 84. napon</i> | X 2,19 | X 4,68 | X 2,62 | X 1,6 |

19. ábra: *Lebenykék területének, kerületének és a jobb laterális lebeny tömegének változása 2-AAF/PH után 84 nappal (3 hónappal) és a PH után 28 nappal, a 160 g-os kontroll állatok májlebenyein mért értékekhez viszonyítva. Az ábrán a kék pontok a terület, a pirosak pedig a kerület alakulását jelzik az egyes vizsgált időpontokban. Az ábra alatti táblázat a ptakányok testtömegének és a jobb laterális lebeny tömegének*

növekedését (se: standard error) mutatja. A növekedés mértéke a kísérletek végpontjaiban mért adatokat hasonlítja a kontroll 160 g-os állatok értékeihez.



20. ábra: A lebenykék retrográd feltöltése a vena cava inferioron keresztül. A: Kontroll 160 g-os patkány, B: PH után 28 nappal, C: AAF/PH után 84 nappal. A vonal mérete: 1mm, 2X-es nagyítás.

1.2. A lebenykék és a centrális vénák körüli portális ágak számának meghatározása a máj növekedése során

A centrális és a portális rendszer együttes feltöltése után meghatároztuk az egy lebenyt borító lebenykék abszolút számát, valamint az egy centrális vénát körülvevő portális ágak számát.

Az **egyedfejlődés** során a két vizsgált időpontot (50g-os és 160g-os állat) egymáshoz viszonyítva a felszín alatti lebenykék száma megközelítőleg 30 %-kal nőtt, a portális ágak száma pedig nem változott.

A hepatociták úján történő májregeneráció alatt a felszínt borító lebenykék száma a 160 g-os kontrolléhoz viszonyítva nem változott szignifikánsan, viszont a lobulust körülvevő portális ágak száma megnőtt (6,04-ről 8,13-ra).

A progenitor sejtek útján történő regeneráció során a felszínt borító lebenykék száma a PH utáni 28. napon eltávolított májakhoz és a 160 g-os kontrollhoz képest nem változott. A lobulust körülvevő portális ágak száma pedig ugyanúgy emelkedett, mint a PH után.

(5. táblázat, 21. ábra)

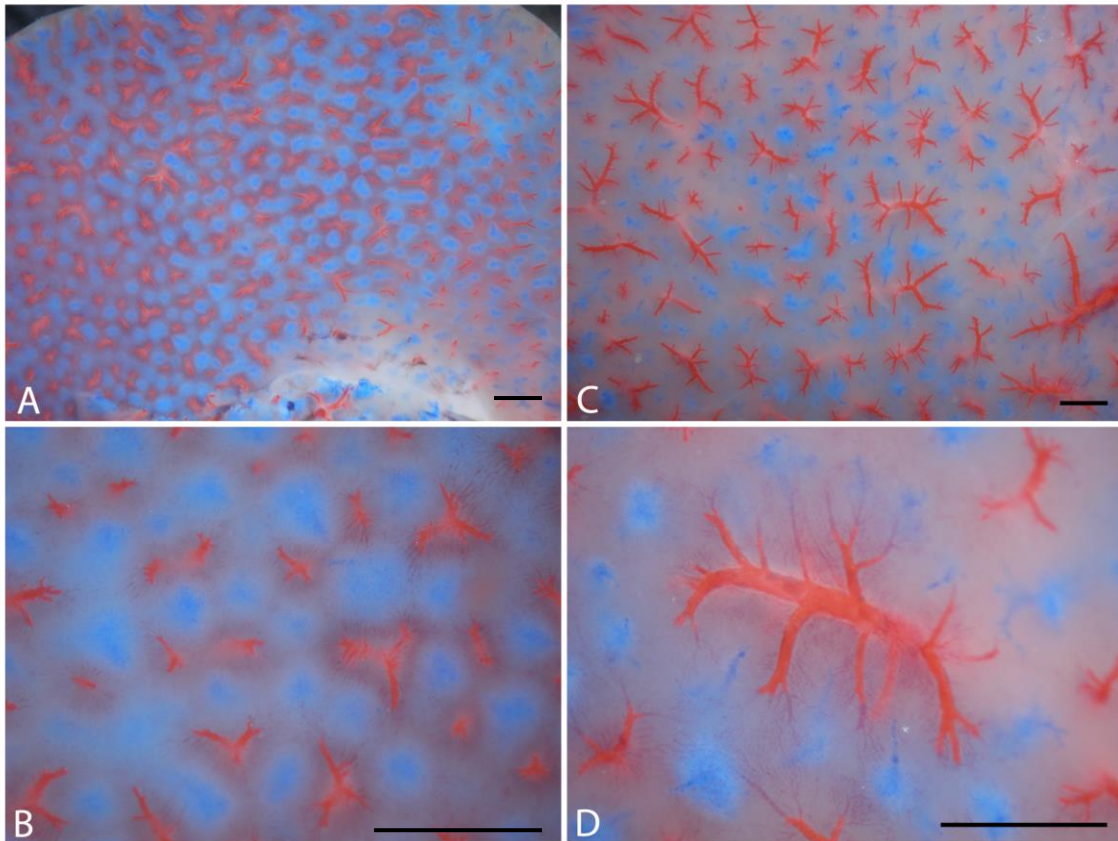
5. táblázat: A lebenyt borító lebenykék abszolút számának és az egy centrális vénát körülvevő portális ágak számának meghatározása

| | Egyedfejlődés (testtömeg) | | Hepatociták útján történő májregeneráció (PH után eltelt napok) | | Progenitor sejtek útján történő májregeneráció (PH után eltelt napok) |
|--------------------------------|------------------------------|-------------------|--|-------------------|---|
| | 50 g | 160 g | 14 | 28 | 84 |
| Lebenykék száma | 586 ±10,29 | 794,5 ± 37,1 * | 730,75 ± 54,15 | 719,33 ± 31,18 | 736 ±39 |
| Portális ágak száma | - | 6,04 ± 0,2 | - | 8,13 ± 0,38 # | 8,4 ±0,2 # |

* $p < 0,05$ a 160 g-os és az 50 g-os állatok között

$p < 0,05$ a 28 nappal a PH után, ill. 84 nappal az AAF/PH után vizsgált és a kontroll 160 g-os állatok között

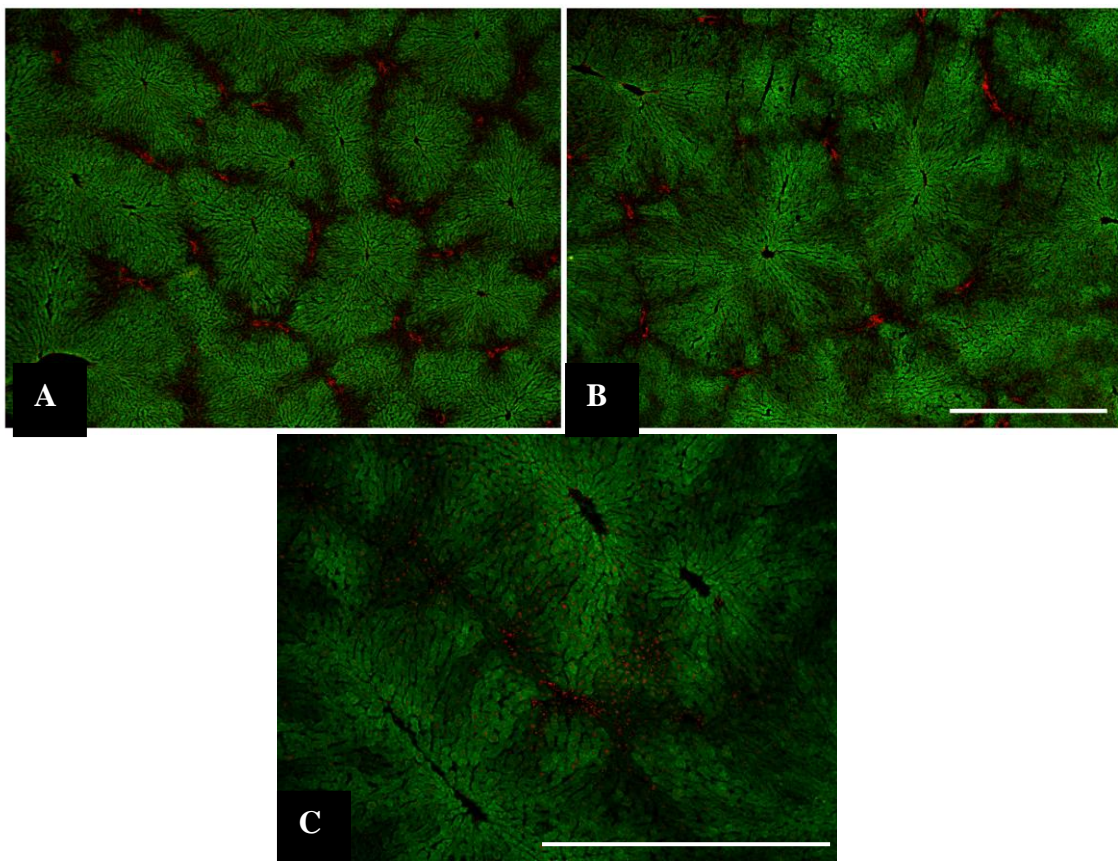
Az egyedfejlődés során a lebenykék száma nőtt, míg a portális ágak száma nem változott. Mindkét regenerációs modell során változatlan marad a lebenykeszám, viszont több portális ág veszi körül őket.



21. ábra: 160g-os kontroll állat (A, B) és a PH után 28. napon vizsgált patkány (C, D) májlebenyének felszínéről készített felvétel kettős feltöltést követően. A centrális vénákat piros, a portális ágakat kék műgyantával töltöttük fel.

Érdekességnek számít, hogy a regeneráció alatt a centrális vénák a felszín vetületében hosszabbá és elágazóbbá váltak. A vonal hossza 1mm.

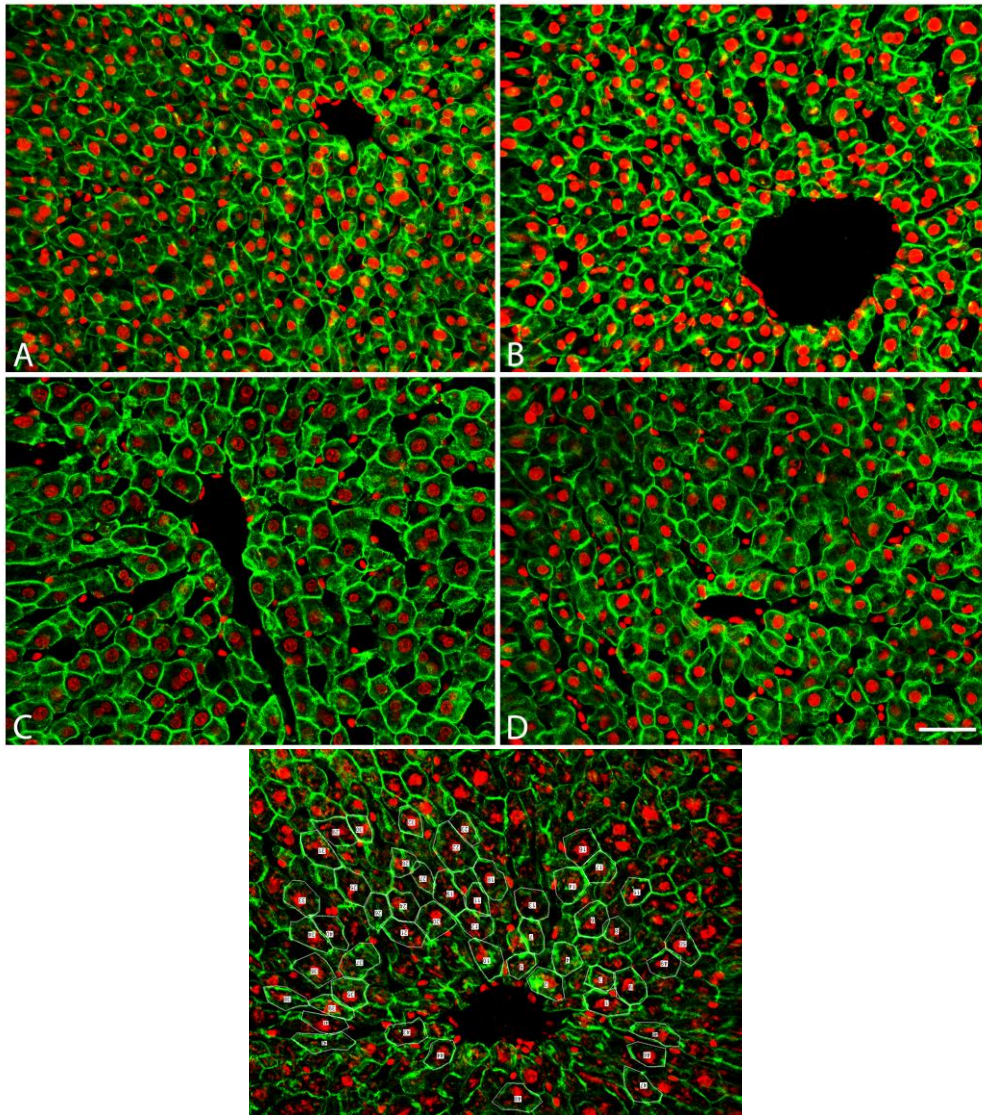
A regeneráció alatt - mindkét esetben – a lebenyke szerkezete jól láthatóan megváltozott. A felszín alatt elhelyezkedő centrális vénák hosszabbá és elágazóbbá váltak. A citP450 enzim eloszlásában bekövetkező változások pedig nem csak szerkezeti, hanem funkcionális átrendeződésre is utalnak. (Christoffels VM és mtsai, 1999) Míg a kontroll májban a pozitívan jelölődő sejtek szabályos pericentralis, zonális elrendeződést mutatnak (Ingelman-Sundberg M és mtsai, 1988), a regenerált májakban a megoszlás karélyozott jellegű. Ezek az eltérések a PH-t követően 3 hónap elteltével is megmaradnak. (22. ábra)



22. ábra: A citokróm P450 IIE 1 enzim immunhisztokémiai jelölése. A sejtmagokat propídium-jodiddal festettük meg. A citP450 enzim eloszlása a lebenykén belül mindkét típusú regeneráció során megváltozott. A kontroll májban (A) a pozitívan jelölődő sejtek szabályos pericentralis, zonális elrendeződést mutatnak. A regenerált májakban (B: hepatociták, C: progenitor sejtek útján) a megoszlás karélyozott jellege utal a funkcionális átrendeződésre. (A, B: 2X-es nagyítás, C: 4X-es nagyítás) A vonal mérete: 1 mm.

2. A májsejtek méretének változása az egyedfejlődés és a kétféle regeneráció során

Mivel a lobulusok növekedése a májsejtek megnagyobbodásának következménye is lehet, meghatároztuk azok méretét is kísérleti modelljeinkben. A májsejtek nagysága függ a lebenyékén belüli elhelyezkedésüktől is, ezért méréseinket csak a pericentrális hepatocitákon végeztük el. (Schmucker DL és mtsai, 1978) (23. ábra)

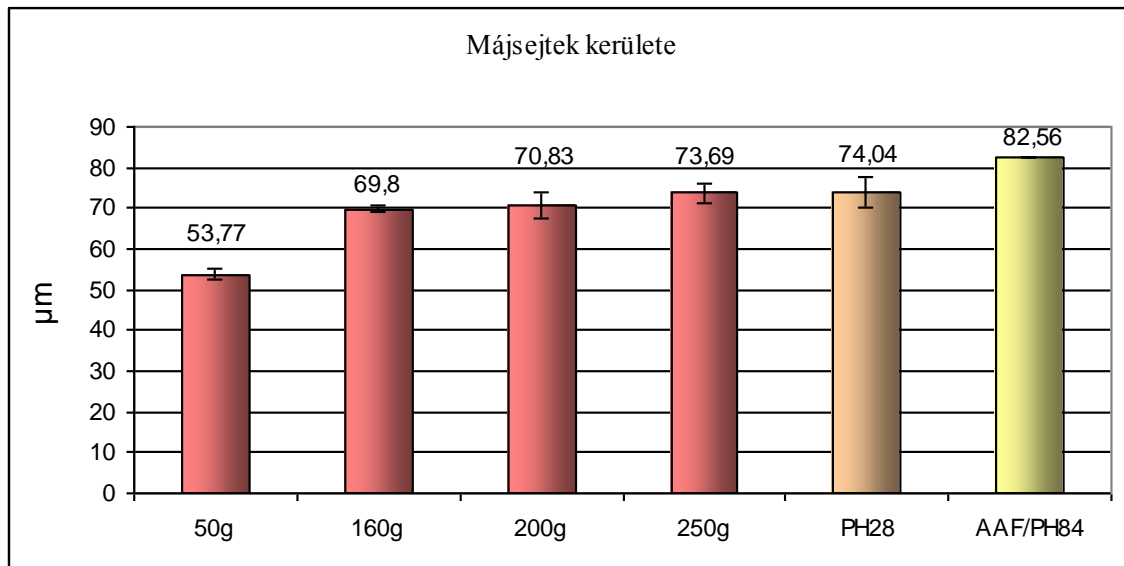
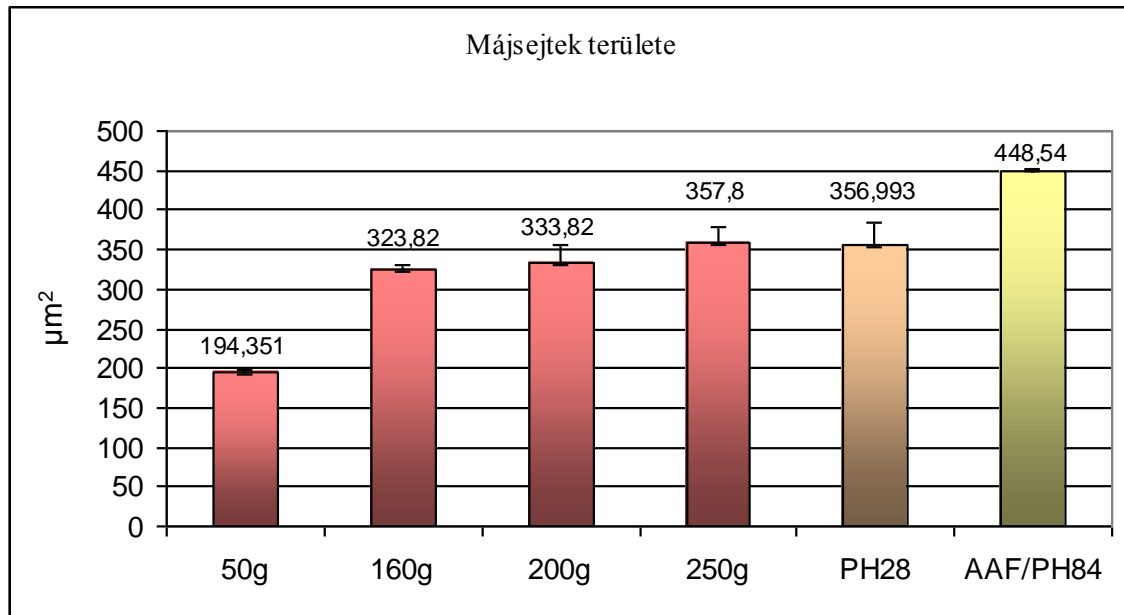


23. ábra: A hepatociták sejtmembránját citokeratin antitesttel, sejtmagjait pedig propidium-jodiddal jelöltük. A májsejteket az Image J program segítségével rajzoltuk körül és mértük le. A:50 g-os , B: 160 g-os, C: 250 g-os patkányok májából készített metszet, D:PH után 28. napon, E: AAF/PH után 84. napon eltávolított májából készített metszet. 40X-es nagyítás, a vonal mérete: 50 μ m.

Eredményeink azt mutatták, hogy míg **az egyedfejlődés** során az állat testtömege 50g-ról 160 g-ra nőtt, a vizsgált májlebeny tömege pedig 2,9-szeresére, a májsejtek mérete is változott: területük 1,66-szorosára, kerületük 1,29-szorosára nőtt. Az egyedfejlődés általunk vizsgált későbbi szakaszában a májsejtek mérete nem változott.

Bár **a hepatociták útján történő regeneráció** alatt a lebeny tömege több mint 3-szorosára nőtt, a májsejtek mérete nem változott.

A progenitor sejtek útján történő regeneráció alatt a lebeny tömege 4,68-szorosára, a májsejtek területe pedig 1,38-szorosára nőtt (24. ábra, 6. táblázat)



24. ábra: A májsejtek területének és kerületének változása az egyedfejlődés és a kétféle regeneráció általunk vizsgált végpontjai között. Az egyedfejlődés korai szakaszában a májsejtek mérete megnőtt. A PH után 28 nappal a kontroll 160 g-os állathoz viszonyítva a hepatociták mérete nem változott szignifikánsan. Az AAF/PH utáni 84. napon az állatok testtömege és a lebény tömege is nőtt a kontrollhoz viszonyítva, a májsejtek méretének növekedése az előbbiekhöz képest kisebb mértékű. Az értékeket a következő időpontokban adtuk meg: 40g-os, 160g-os, 200g-os 250g-os állatok, PH28: PH után 28 nappal, AAF/PH: az AAF/PH után 84 nappal.

6. táblázat: A hepatociták területének és kerületének változása az egyedfejlődés korai szakaszában, a 160 g-os kontrollhoz viszonyítva a hepatociták útján történő regeneráció során a PH utáni 28. napon (PH28) és a progenitor sejtek útján történő regeneráció során az AAF/PH utáni 84. napon (AAF/PH84).

| | <i>Lebény tömege (g)</i> | <i>Terület (µm²)</i> | <i>Kerület (µm)</i> |
|---|--------------------------|---------------------------------|---------------------|
| Növekedés mértéke az egyedfejlődés korai szakaszában (50-160 g) | X 2,9 | X 1,66 | X 1,29 |
| Növekedés mértéke a PH utáni 28. napon (a 160 g-os kontroll állathoz viszonyítva) | X 3,29 | X 1,1 | X 1,06 |
| Növekedés mértéke az AAF/PH utáni 84. napon (a 160 g-os kontroll állathoz viszonyítva) | X 4,68 | X 1,38 | X 1,18 |

3. A regeneráció és a hepatokarcinogenezis korai szövettani történéseinek vizsgálata

Az AAF/PH regenerációs és a M S-F hepatokarcinogenezis modell korai szöveti történései nagyon hasonlítanak egymásra. A parciális hepatoektómia után intenzív ovális sejtes proliferáció figyelhető meg, majd ezt követően regenerációs fókuszok jelennek meg a májban. Korábbi munkáink során azt tapasztaltuk, hogy a karcinogenezis modellben ezek a változások hamarabb és intenzívebben történnek. A jelenség magyarázatát keresve három különböző kísérleti rendszerben hasonlítottuk össze az ovális sejtes proliferáció és a fókuszképződés dinamikáját. Irodalmi adatok igazolják, hogy a sebészi parciális hepatektómia helyettesíthető CCl₄-kezelés okozta májnekrozissal (kémiai parciális hepatektómia). (Solt DB és mtsai, 1983; Petersen BE és mtsai, 1998) Ezért a könnyebb kivitelezhetőség és az ismételt kezelés lehetősége miatt az AAF/PH kísérletet AAF/CCl₄ kísérlettel helyettesítettük (REG-1), majd a kémiai hepatektómiát követő szövettani változások eredményeit összehasonlítottuk az egyszer már elvégzett AAF/ CCl₄ kísérlet után három hónappal megismételt AAF/ CCl₄

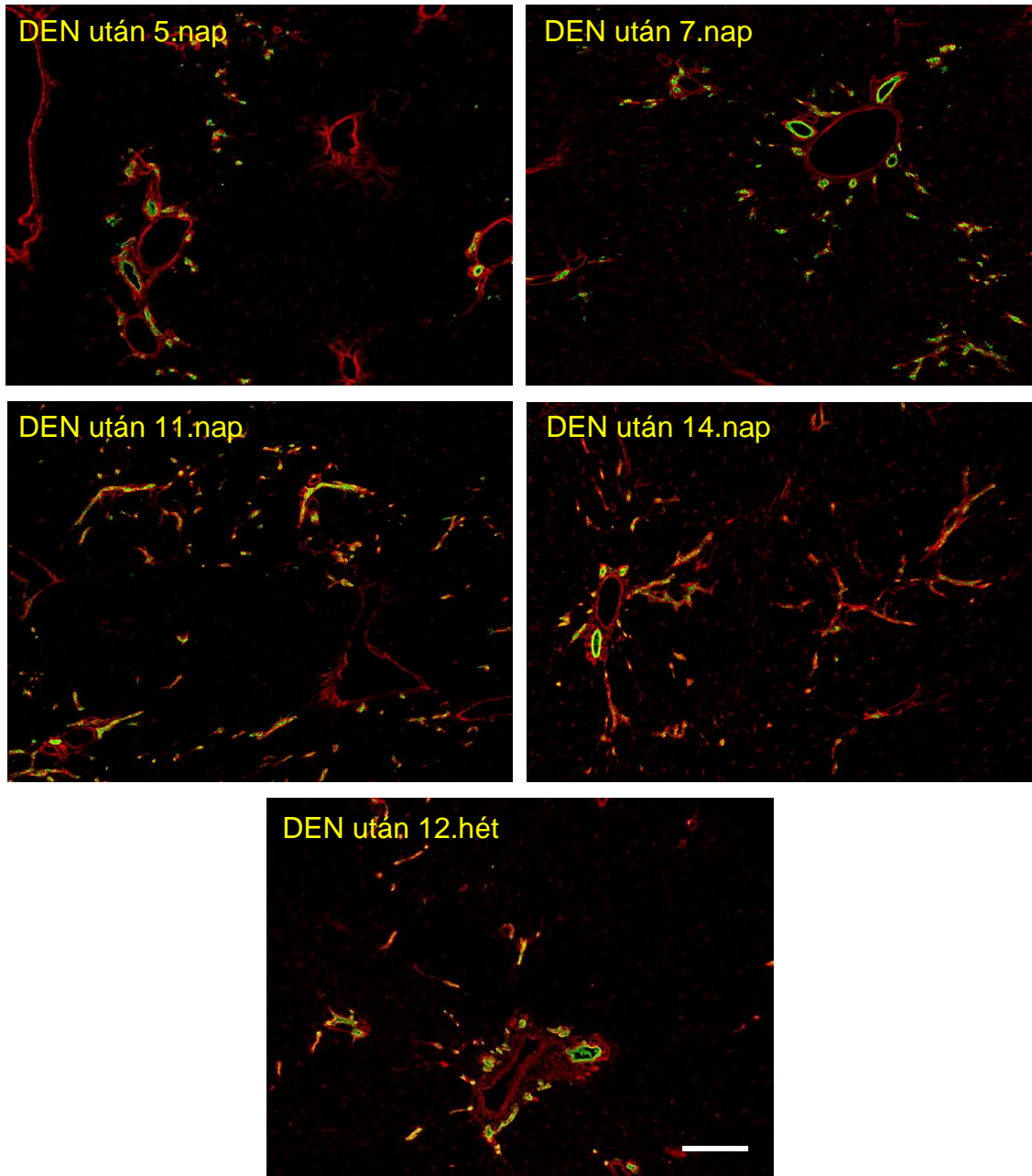
kísérlet (REG-2), valamint a módosított S-F kísérlet eredményeivel. Ez utóbbiban szintén a jobb összehasonlíthatóság miatt a sebészi PH-t szintén CCl₄-kezeléssel váltottuk ki.

A regeneráció és a hepatokarcinogenezis összehasonlító vizsgálata során meghatároztuk mindhárom kísérleti modellünkben a mitogén stimulust követően kialakuló regenerációs fókuszok számát és méretét, az Ov6-positív epeutak kiterjedését és fenotípusát.

3.1. Citokeratin (Ov6) pozitív kis epeutak területének meghatározása

3.1.1. Citokeratin (Ov6) pozitív kis epeutak területének meghatározása - a DEN-kezelést követően

Az egyszeri nagy dózisú (200mg/kg) DEN kezelés kiterjedt nekrozist idéz elő a máj állományában. Az ezt követő reparatív szöveti reakció elemzésekor megfigyeltük, hogy a parenchimában a portális területeken kívül is megjelennek epeutakra emlékeztető, de azoknál kisebb átmérőjű, szűk, hagyományos metszeteken nem látható lumennel rendelkező képletek. Elhelyezkedésük, fenotípusuk megegyezik a kezelést követően néhány napon belül megjelenő epeutakéval. A duktulusok még 3 hónappal a DEN kezelést követően is kimutathatók a lebenyke állományában, minden további kezelés nélkül is. (25. ábra) További kísérleteinkben jellemeztük ezen duktulusok fenotípusát, morfológiai módszerekkel pedig megvizsgáltuk méreteik változását kísérleti rendszerünkben.



25. ábra: Citokeratin (Ov6) pozitív kis epeutak növekedése a DEN kezelést követően a M S-F modellben. 12 hét elteltével még mindig kimutathatók citokeratin (Ov6) pozitív kis epeutak csak DEN kezelést követően. (Ov6/laminin) 10X-es nagyítás, a vonal mérete 50 μm .

A kontroll, ép májhoz viszonyítva az OV-6 pozitív terület aránya növekedett már az AAF adagolás megkezdése előtt is (lásd 7. táblázat, az ép májban megjelenő Ov6-pozitív terület nagyságát tekintve egységnyinek).

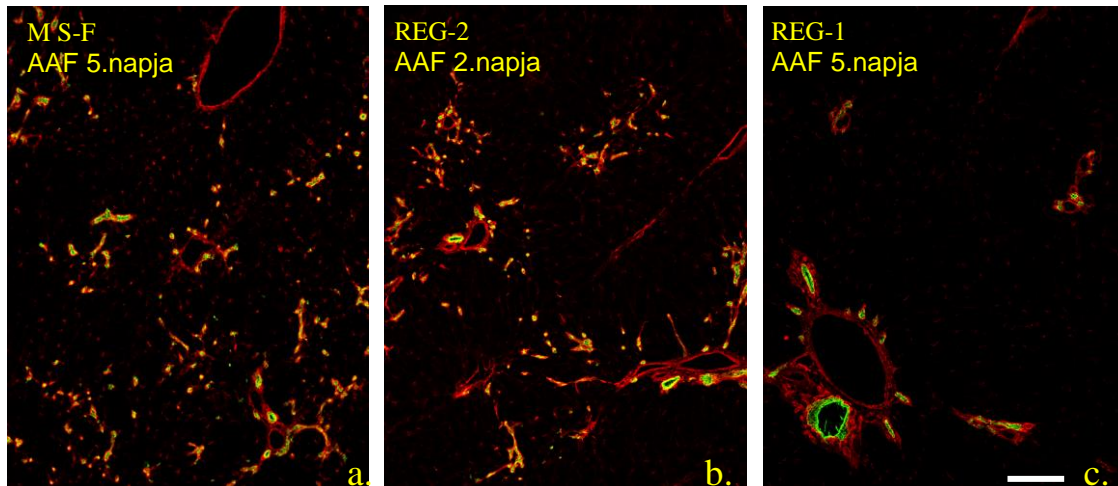
7. táblázat: Citokeratin (Ov6) pozitív epeutak növekedése a kontrollhoz viszonyítva.

| | Epeutak növekedése |
|-----------------|--------------------|
| Kontroll | 1 |
| DEN után 5.nap | X 1,31 |
| DEN után 7.nap | X 1,25 |
| DEN után 11.nap | X 1,78 |
| DEN után 14.nap | X 1,44 |

3.1.2. Citokeratin (Ov6) pozitív kis epeutak területének meghatározása - mindhárom modellben a kémiai hepatektómia előtt

Korábbi munkánk során megfigyeltük, hogy az AAF/PH kísérlet lezajlása után több hónappal, amikor a máj eredeti szerkezete már helyreállt, a májlebenyekben szűk lumenű duktuluszok maradtak vissza (*Paku S és mtsai, 2004*). Az általunk használt AAF/CCl₄ kísérletben is ugyanez történt, a duktuluszok 3 hónap elteltével is láthatók maradtak a parenchimában. Erre a jelenségre alapoztuk REG-2 modellünket, amelyben 3 hónap elteltével újabb regenerációt idéztünk elő a kísérleti állatokban.

Összehasonlítottuk mindhárom modellünkben a kémiai hepatektómia előtt az Ov6 pozitív duktuluszok által elfoglalt területek arányát. Azt találtuk, hogy mind a DEN kezelést követően, mind pedig a már egy AAF/CCl₄ cikluson átesett állatok májában jelentősen megnőtt az intralobuláris kis epeutak mennyisége (26. ábra, 8. táblázat).



26. ábra: a. M S-F modellben a kémiai hepatektómia előtt készített felvétel, *Ov6/laminin*.

b. REG-2 modellben a 2. kémiai hepatektómia előtt készített felvétel, *Ov6/laminin*.

c. REG-1 modellben a kémiai hepatektómia előtt készített felvétel, *Ov6/laminin*.

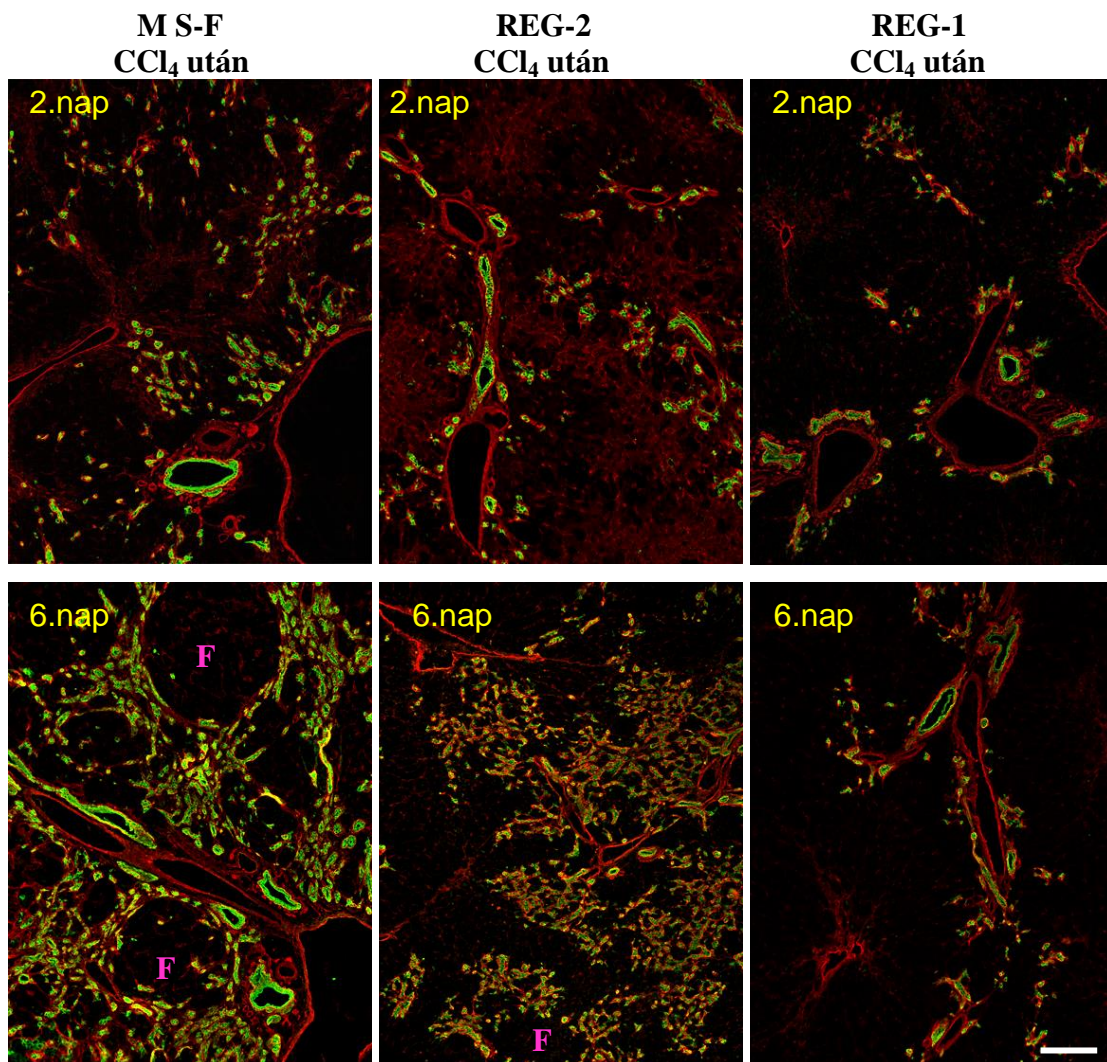
10X-es nagyítás, a vonal mérete 50 μ m.

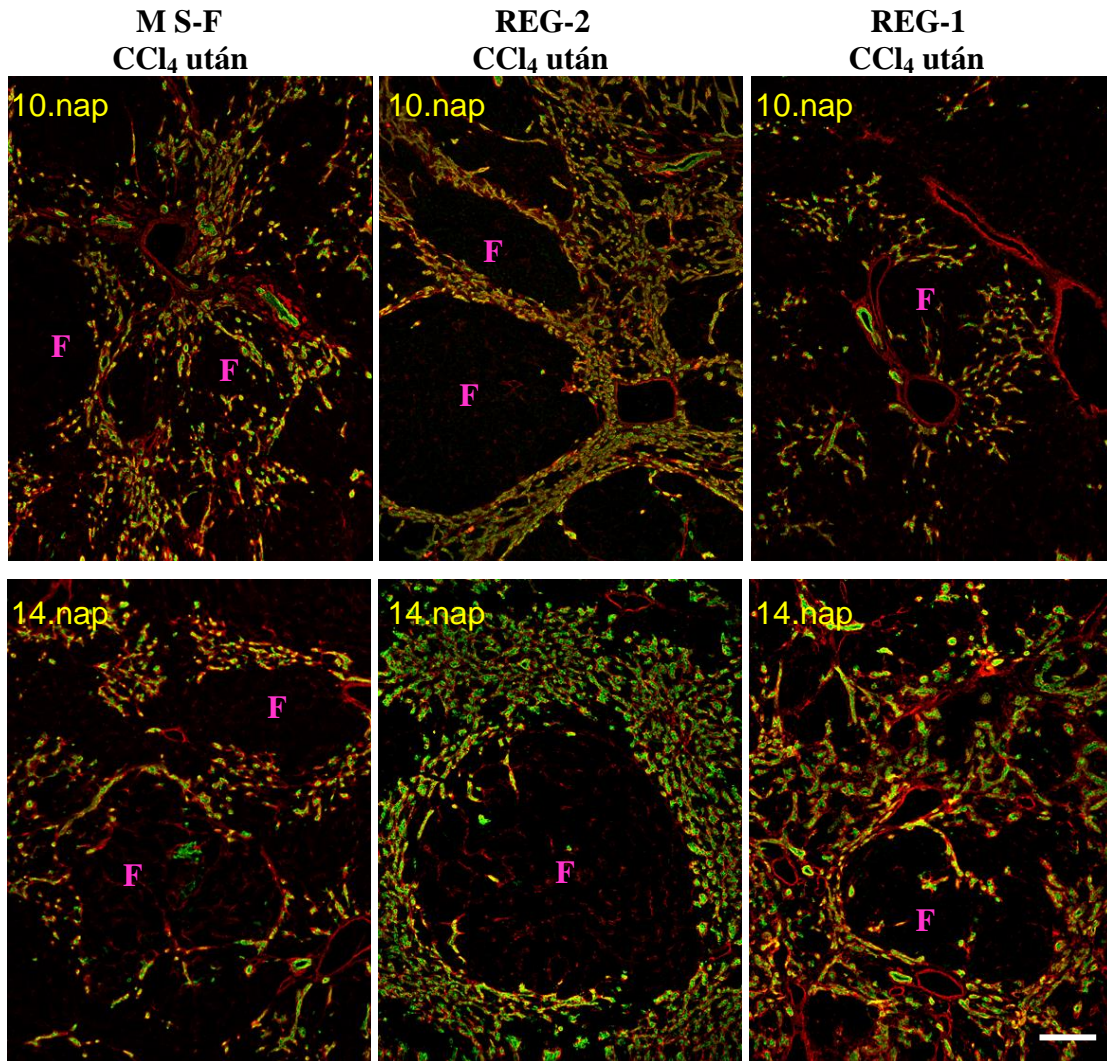
8. táblázat: *Ov6*-pozitív terület aránya a kontroll, ép májhoz viszonyítva mindhárom modellben a kémiai hepatektómia előtt

| | Ov6-pozitív terület aránya |
|---------------------------|----------------------------|
| Kontroll | 1 |
| M S-F, hepatektómia előtt | X 2,33 |
| REG-2, hepatektómia előtt | X 1,69 |
| REG-1, hepatektómia előtt | X 1 |

3.1.3. Citokeratin (Ov6) pozitív kis epeutak területének meghatározása - a kémiai hepatektómiát követően

A 3 modell mindegyikében a szén-tetraklorid kezelést követően ovális sejtekből álló csövek jelentek meg. Ezek mennyiségét kvantitáltuk az idő függvényében, hogy később megállapítható legyen, ez milyen összefüggésben áll a megjelenő regenerációs fókuszok mennyiségével. Ezáltal a regenerációs fókuszok megjelenését megelőző legfontosabb morfológiai/szöveti jelenség összehasonlíthatóvá vált. (27. ábra)





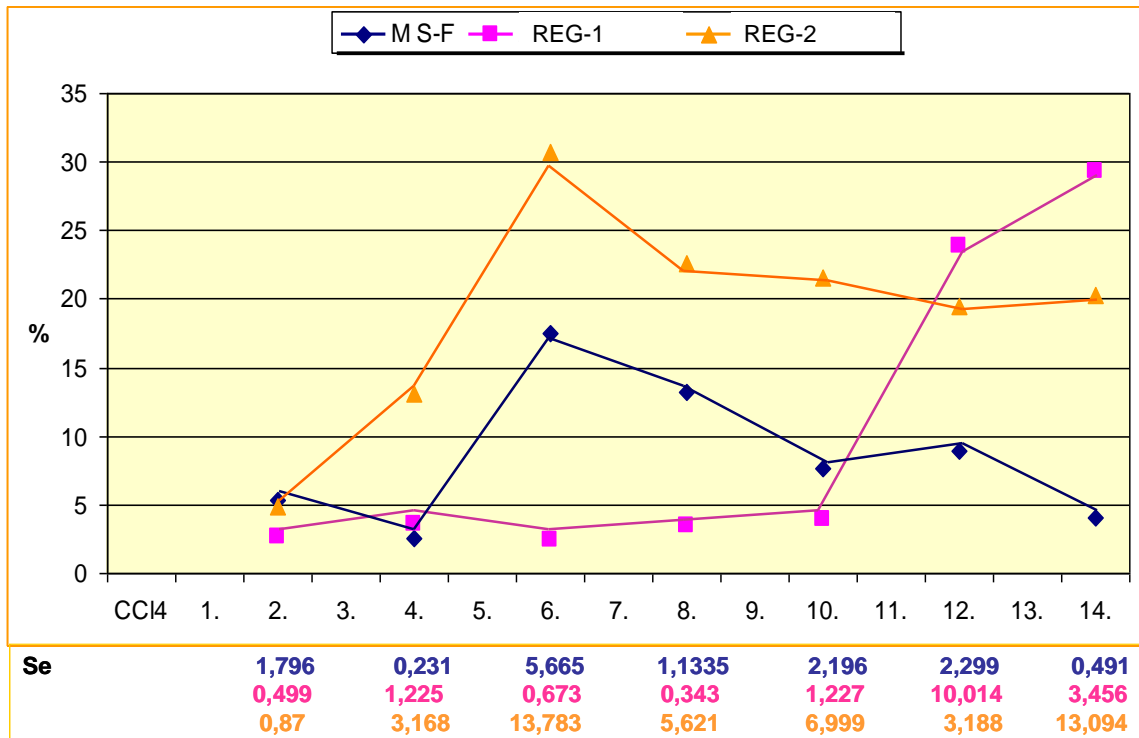
27. ábra: A 3 kísérleti modellben a kémiai hepatektómiát követő 2., 6., 10. és 14. napon eltávolított májából készített metszetek, 10X-es nagyítás. Az Ov6-pozitív duktusok zöld színnel, az őket és az ereket körülvevő bazális membrán (laminin) pedig piros színnel jelölődnek. Jól látszik, hogy a M S-F és a REG-2 modellben nagyobb arányban láthatók Ov6-pozitív epeutak és már a 6. naptól kezdve regenerációs fókuszok is megfigyelhetők. Ezzel szemben a REG-1 modellben a 2. napon csak normál májnak megfelelő mennyiségű Ov6-pozitív epeút látható, ezek a 14. napig fokozatosan nőnek, regenerációs fókuszok csak a 10. napon jelennek meg, azonban kisebb számban és méretben, mint a másik 2 modellben. F: fókuszok

A metszetekről készített felvételeken, meghatároztuk az Ov6-pozitív képletek által elfoglalt terület százalékos arányát a 3 modellben. A M S-F modellben a széntetraklorid kezelést követő 6. napon volt látható a legnagyobb mennyiségű ovális sejt, majd mennyiségük folyamatosan csökkent, a 14. npra elérte a kiindulási értéket.

Azoknál az állatoknál (REG-2 modell), amelyek másodszor is részesültek AAF/CCl₄ kezelésben, az ovális sejtek megjelenésének dinamikája hasonlított a M S-F modellben tapasztaltakhoz: a 6. napon volt látható a legtöbb, azonban a 14. npra még nem állt vissza a kiindulási állapot. A lényeges különbség azonban a M S-F modellhez viszonyítva az, hogy itt az ovális sejtek által elfoglalt terület a kezelést követően mindvégig nagyobb volt.

A REG-1 modellben, amikor a kísérleti állatok nem részesültek iniciátor előkezelésben, az ovális sejtek alkotta képletek csak a 12. napon kezdenek jelentős mértékben szaporodni, a 14. napon pedig a proliferáció még tart és tovább folytatódik.

A regenerációs fókuszok megjelenése és növekedése párhuzamos az ovális csövek mennyiségének csökkenésével: a M S-F illetve a REG-2. modellekben a 6. nap után, míg a REG-1. modellben a 14. napon láthatók jelentős méretű fókuszok. (28. ábra, 9. táblázat)



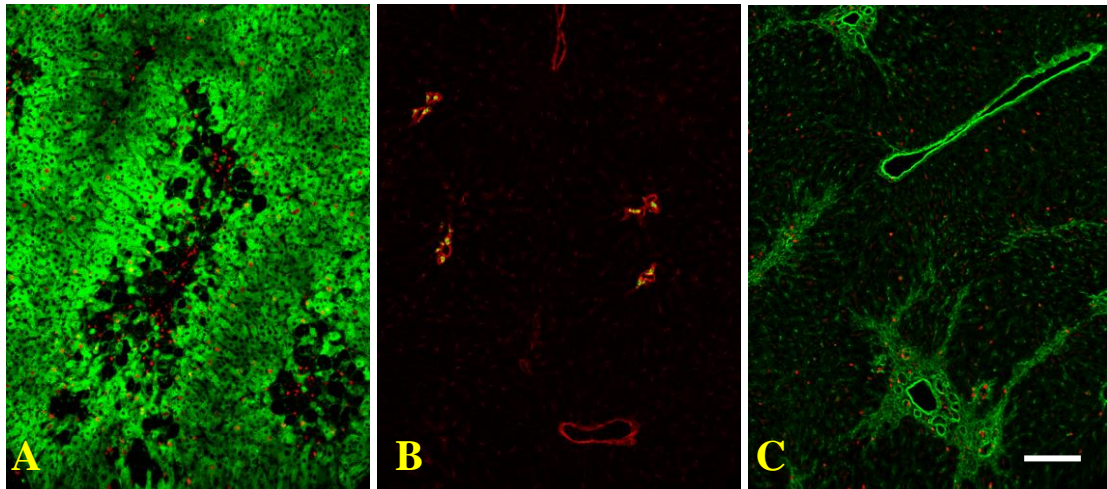
28. ábra: OV-6 pozitív képletek kiterjedése a MS-F, REG-1, és REG-2 modellben. Az Y tengelyen a kis epeutak százalékos arányát jelöltük a metszetről készült fotó egy látóterének teljes területéhez viszonyítva. Az X tengelyen a CCl_4 alkalmazását követően eltelt napok láthatók. Az egyes értékek a vizsgált állatok, és azok májából készült metszetek átlagértékei. A táblázat a standard hiba értékét mutatja.

9. táblázat: Ovális csövek növekedésének mértéke a CCl_4 kezelés előtti állapothoz viszonyítva a 3 modellben.

| | AAF 5. nap | CCl_4 után 6.nap | CCl_4 után 14.nap |
|-------|------------|---------------------------|----------------------------|
| MS-F | 1 | X 5,49 | X 1,25 |
| REG-2 | 1 | X 13,01 | X 8,58 |
| REG-1 | 1 | X 2,74 | X 32,6 |

3.1.4. További, nekrozist előidéző modellek vizsgálata

Egyszeri nagy dózisu CCl_4 -kezelés pericentrális, allyl-alkohol periportális májnekrózist idéz elő. (De Toranzo EG és mtsai, 1983; Czaja MJ és mtsai, 1995; Petersen BE és mtsai, 1998) A kísérleteket elvégezve egyik esetben sem voltak a teljes regenerációt követően a máj állományában az előző modellekben leírt portális területeken kívüli duktulusok megfigyelhetők. (29. ábra)



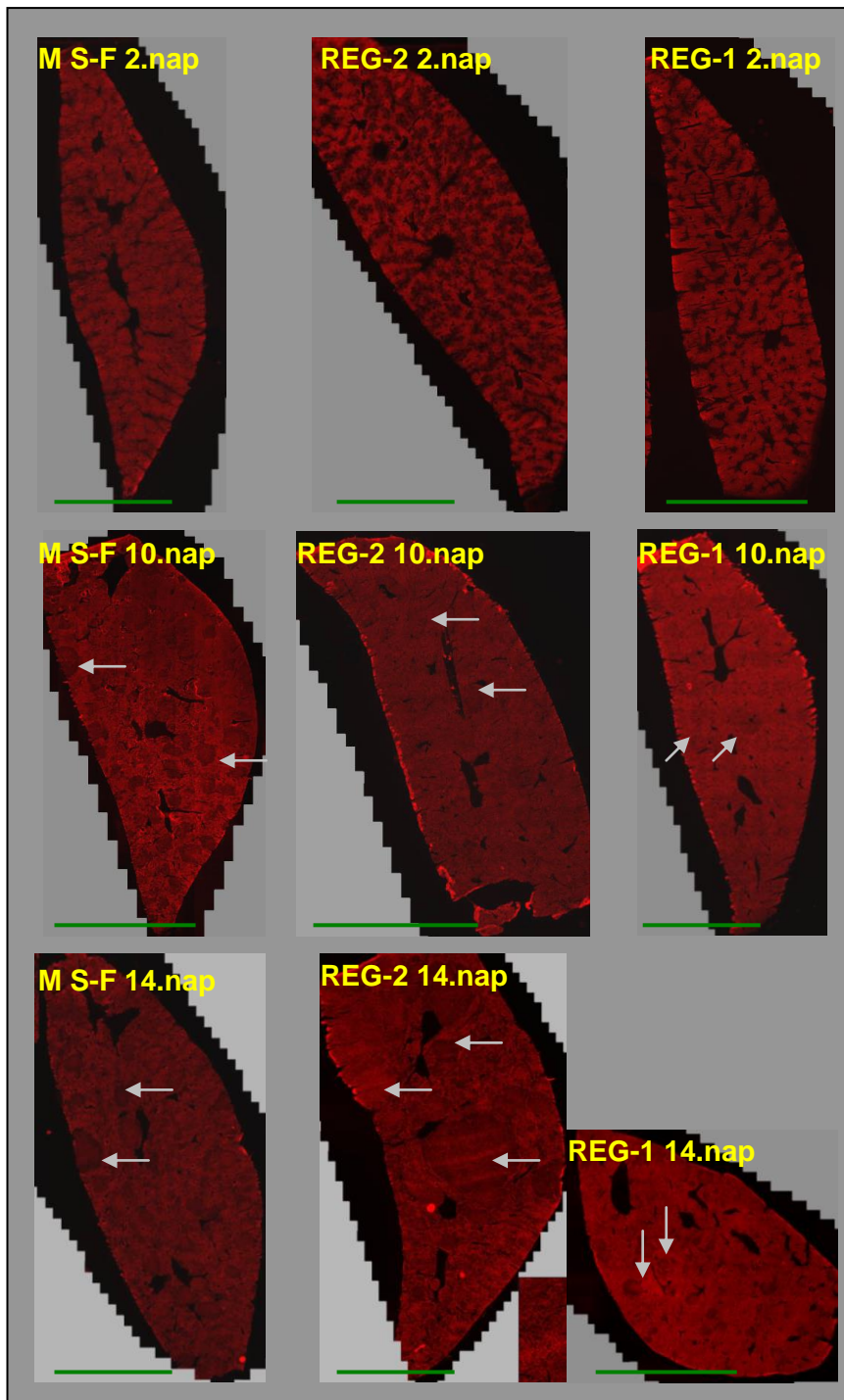
29. ábra: A: CCl_4 után 2. napon eltávolított májból készült metszet. A citokrom P450 IIE 1 nevű enzimet elsősorban a centrálisan elhelyezkedő hepatociták expresszálják (a képen zöld színnel jelölődik), ezek azonban jól láthatóan hiányoznak. A fekete területek a centrális nekrozist jelölik. 40X-es nagyítás.

B: CCl_4 után 14. napon eltávolított májból készült metszet, *ov6/laminin*. Kis epeutak nem jelentek meg intrlobulárisan. 40X-es nagyítás.

C: Allyl-alkohol után 3. napon eltávolított májból készült metszet. (Zöld: *anti-laminin*.) A periportális régióban nekrozis látható, kis epeutak azonban nem jelentek meg. 40X-es nagyítás, a vonal mérete 50 μm .

3.2. A hepatokarcinogenezis és a regeneráció során képződő fókuszok eredetének, szerepének összehasonlítása

Mindhárom modellben a mitogén stimulusként alkalmazott szén-tetraklorid kezelést követően a májsejtek osztódásának gátlása mellett a progenitor sejtek proliferálni kezdtek, differenciálódtak, majd a kis bazofil hepatociták csoportokba rendeződtek, amelyeket regenerációs fókuszoknak hívunk. (30. ábra)



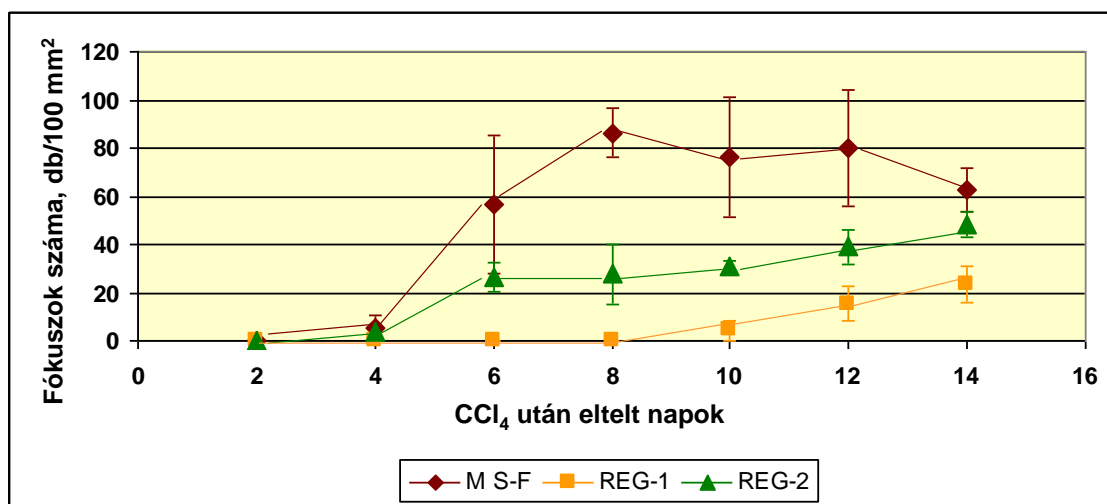
30. ábra: A kémiai hepatektómiát követő 2., 10., 14. napon készített metszetek szkennelve, mindhárom (M S-F, REG-2, REG-1) modellben. A regenerációs fókuszok megjelenése és növekedése jól látható. A zöld vonalak 5 mm-t jelölnek. A nyilak fókuszokra mutatnak.

A M S-F és a REG-2 modellekben a fókuszok először a kémiai hepatektómiát követő 4. napon, míg a REG-1 modellben csak a 10. napon jelentek meg. (10. táblázat)

10. táblázat: A fókuszokat tartalmazó májak aránya az egyes időpontokban, mindhárom modellben

| <i>Hepatektómia (CCl₄) után</i> | M S-F | REG-2 | REG-1 |
|--|--------------|--------------|--------------|
| <i>2. nap</i> | 0 % | 0 % | 0 % |
| <i>4. nap</i> | 50 % | 50 % | 0 % |
| <i>6. nap</i> | 100 % | 100 % | 0 % |
| <i>8. nap</i> | 100 % | 100 % | 0 % |
| <i>10. nap</i> | 100 % | 100 % | 50 % |
| <i>12. nap</i> | 100 % | 100 % | 100 % |
| <i>14. nap</i> | 100 % | 100 % | 100 % |

Mindhárom modellben meghatároztuk a 100 mm²-re eső fókuszok számát és azok átlagos átmérőjét. A fókuszok száma a M S-F modellben volt a legmagasabb, a 14. napon látható csökkenés a hepatocitákká történő differenciálódásnak, tehát a gyorsabb regenerációnak tudható be. A kétszeres regeneráció során is hozzávetőlegesen kétszer annyi fókusz képződik a 14. napra, mint a REG-1 modellben, és már 6 nappal korábban megjelennek a parenchimában. (31. ábra, 11. táblázat)

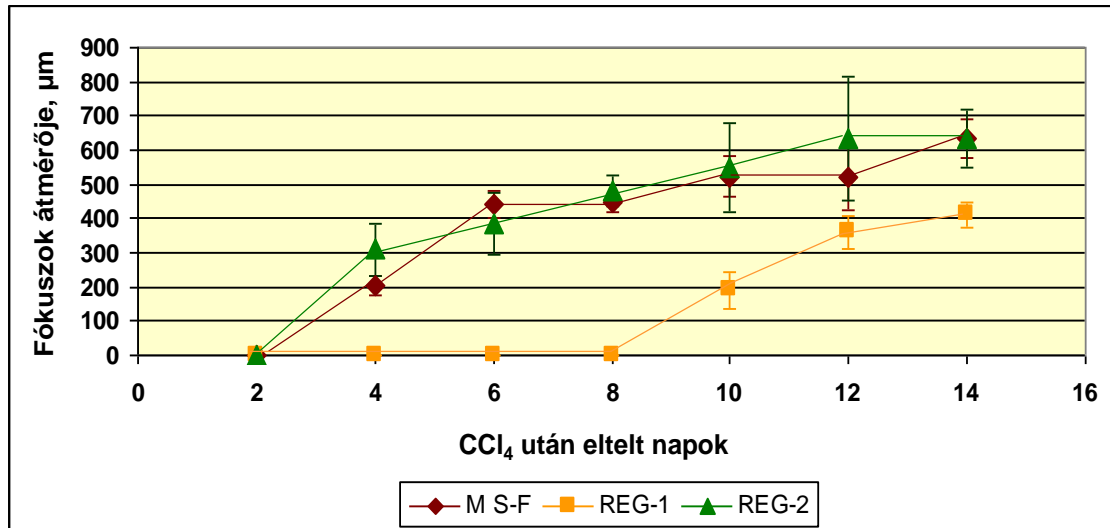


31. ábra: A regenerációs fókuszok átlagos száma (db/100 mm² az y-tengelyen ábrázolva) a M S-F, REG-1, REG-2 modellekben a kémiai hepatektómiát követő 2., 4., 6., 8., 10., 12., 14. napon (x-tengelyen ábrázolva).

11. táblázat: A fókuszok átlagos száma (db/100 mm²) az egyes időpontokban, mindhárom modellben

| Hepatektómia (CCl ₄) után | M S-F | REG-2 | REG-1 |
|---------------------------------------|-------|-------|-------|
| 2. nap | 0 | 0 | 0 |
| 4. nap | 5 | 4 | 0 |
| 6. nap | 57 | 27 | 0 |
| 8. nap | 86 | 28 | 0 |
| 10. nap | 76 | 31 | 4 |
| 12. nap | 80 | 39 | 15 |
| 14. nap | 63 | 48 | 24 |

A fókuszok átmérője a M S-F és a REG-2 modellben párhuzamosan nőtt (a legnagyobb fókuszokat a REG-2 modellben a 12. napon láttuk), míg a REG-1 modellben láthatóan lassabban alakultak ki és a vizsgált periódus alatt kisebbek maradtak. (32. ábra, 12. táblázat)

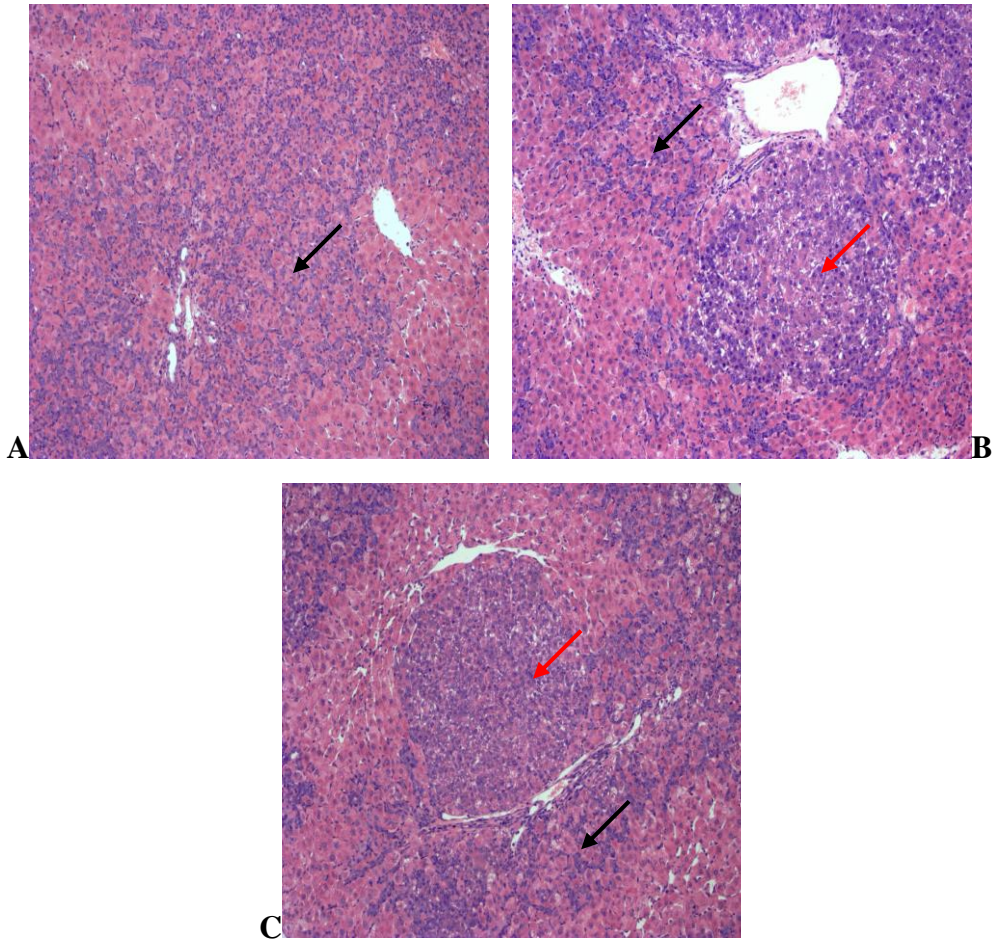


32. ábra: A regenerációs fókuszok átlagos mérete (átmérő μm -ben az y-tengelyen ábrázolva) a M S-F, REG-1, REG-2 modellekben a kémiai hepatektómiát követő 2., 4., 6., 8., 10., 12., 14.napon (x-tengelyen ábrázolva).

12. táblázat: A fókuszok átlagos átmérője (μm) az egyes időpontokban, mindhárom modellben

| Hepatektómia (CCl_4) után | M S-F | REG-2 | REG-1 |
|---|-------|-------|-------|
| 2. nap | 0 | 0 | 0 |
| 4. nap | 205 | 309 | 0 |
| 6. nap | 443 | 383 | 0 |
| 8. nap | 445 | 482 | 0 |
| 10. nap | 523 | 551 | 190 |
| 12. nap | 520 | 635 | 360 |
| 14. nap | 632 | 633 | 411 |

Munkánk során minden vizsgált májlebensből praaffinba is ágyasztunk mintát, amelyekből aztán hagyományos hematoxin-eozinnal festett metszetek készültek. Ezeket a lebenykék méretének meghatározásához, morfometriai méréseinkhez felhasználni nem tudtuk, de a kis epeutak, fókuszok növekedése, a lebenykében elfoglalt helye ezeken is jól megfigyelhető volt. (33. ábra)



33. ábra: Hematoxin-eozinnal festett metszetek a 3 vizsgált modellből. A: Ismételt regeneráció (REG-2 modell), a 2. CCl_4 adása utáni 4.nap. A portális régióból kiindulva számos ovális sejteket tartalmazó duktulusz látható.; B: Kémiai hepatektómiával módosított AAF/PH kísérlet (REG-1 modell), a CCl_4 adása utáni 14.nap. Az ovális csövek mellett már egy regenerációs fókusz is jelen van.; C: Módosított Solt-Farber modell, a CCl_4 adása utáni 8.nap. A metszeten ovális sejtekből álló duktuluszok és regenerációs fókusz látható. A fekete nyilak ovális csöveket jelölnek, a pirosak a regenerációs fókuszokat.

3.3. Citokeratin (Ov6) pozitív duktuluszok immunfenotípusának további jellemzése

Mindhárom modellben a kísérlet teljes időtartama alatt (1 év) megfigyelhetők voltak Ov6 pozitív kis epeutak a májparenchimánban, amelyek azonban a kísérlet egyes szakaszaiban eltérő tulajdonságokkal rendelkeznek. Fenotípusuk meghatározásából következtetni tudunk funkcióikra is, és magyarázatot kaphatunk arra is, miért megy végbe hamarabb a regeneráció a M S-F és a REG-2 modellben a REG-1 modellhez képest. Mivel a kis epeutak a metszeteken immunfluoreszcens technikával minden esetben Ov6-pozitívnak bizonyultak, további antitestetek alkalmaztunk jellemzésükre. Az antitestek egy része magukkal az ovális sejtekkel reagált (CK7, AFP, DLK), míg egy másik antitest csoportot (SMA, Des) az ovális sejt csöveket kísérő kötőszöveti sejteket jellemezésére használtuk. (Az AFP/Ov6 kombinációval jelölt metszetekről képeket nem mutatunk.) (33. ábra, 34. ábra)

3.3.1. A DEN kezeléssel előidézett intraparenchimális duktuluszok immunfenotípusának jellemzése

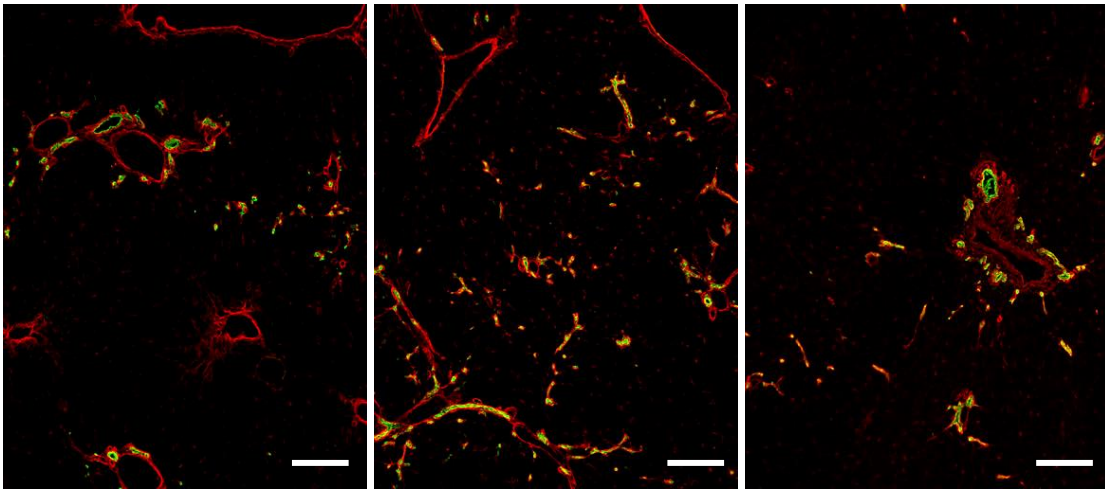
A kis epeutak sejtjei DLK-t, AFP-t, CK7-et nem expresszáltak. Kezdetben SMA és Des pozitivitást mutató aktivált miofibroblasztok kísérték őket. A SMA pozitivitás fokozatosan eltűnt, 3 hónap elteltével már nem volt kimutatható. Desmin pozitív sejtek mindig jelen voltak az is epeutak körül (34. ábra).

DEN után 5. nap

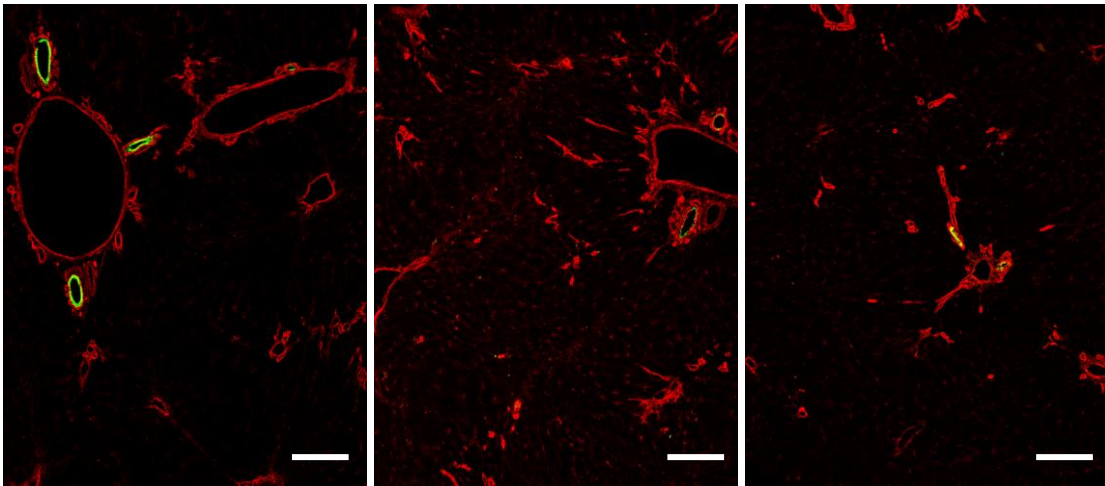
DEN után 14. nap

DEN után 12.hét

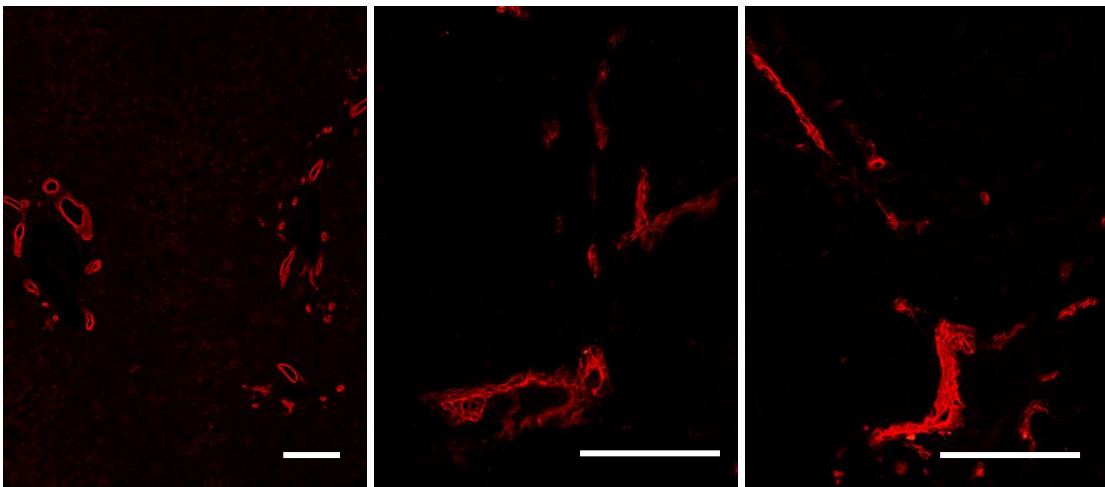
OV6/Laminin

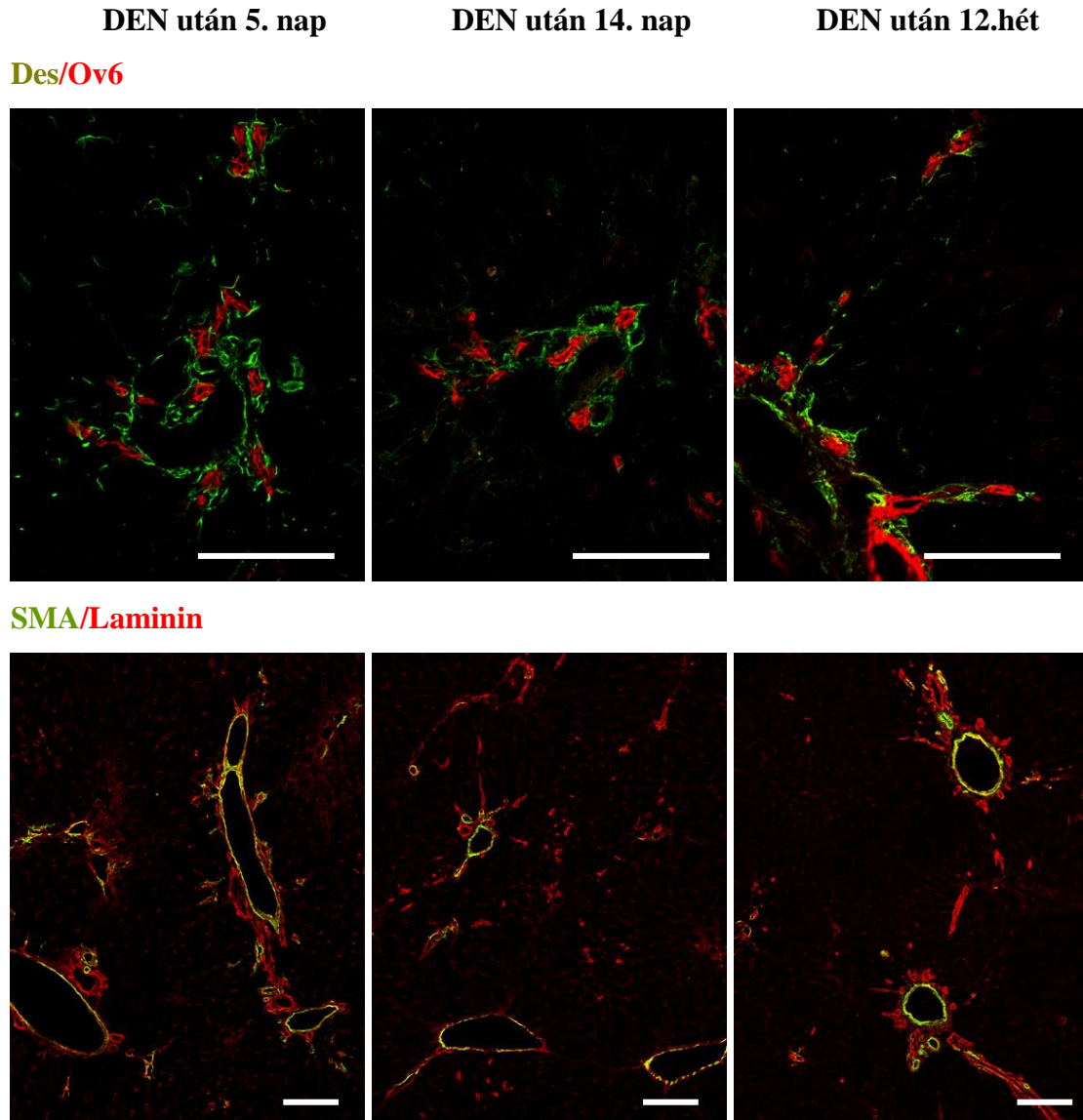


CK7/Laminin



DLK/Ov6





34. ábra: A DEN kezelés után 5, 14 nappal, és 12 héttel eltávolított májából készített metszetek antitest-kombinációkkal megjelölve: *anti-Ov6/anti-laminin*, *anti-CK7/anti-laminin*, *anti-DLK/anti-Ov6*, *anti-Des/anti-Ov6*, *anti-SMA/anti-aminin*. 40X-es és 100X-os felvételek, a vonal mérete 50 μ m.

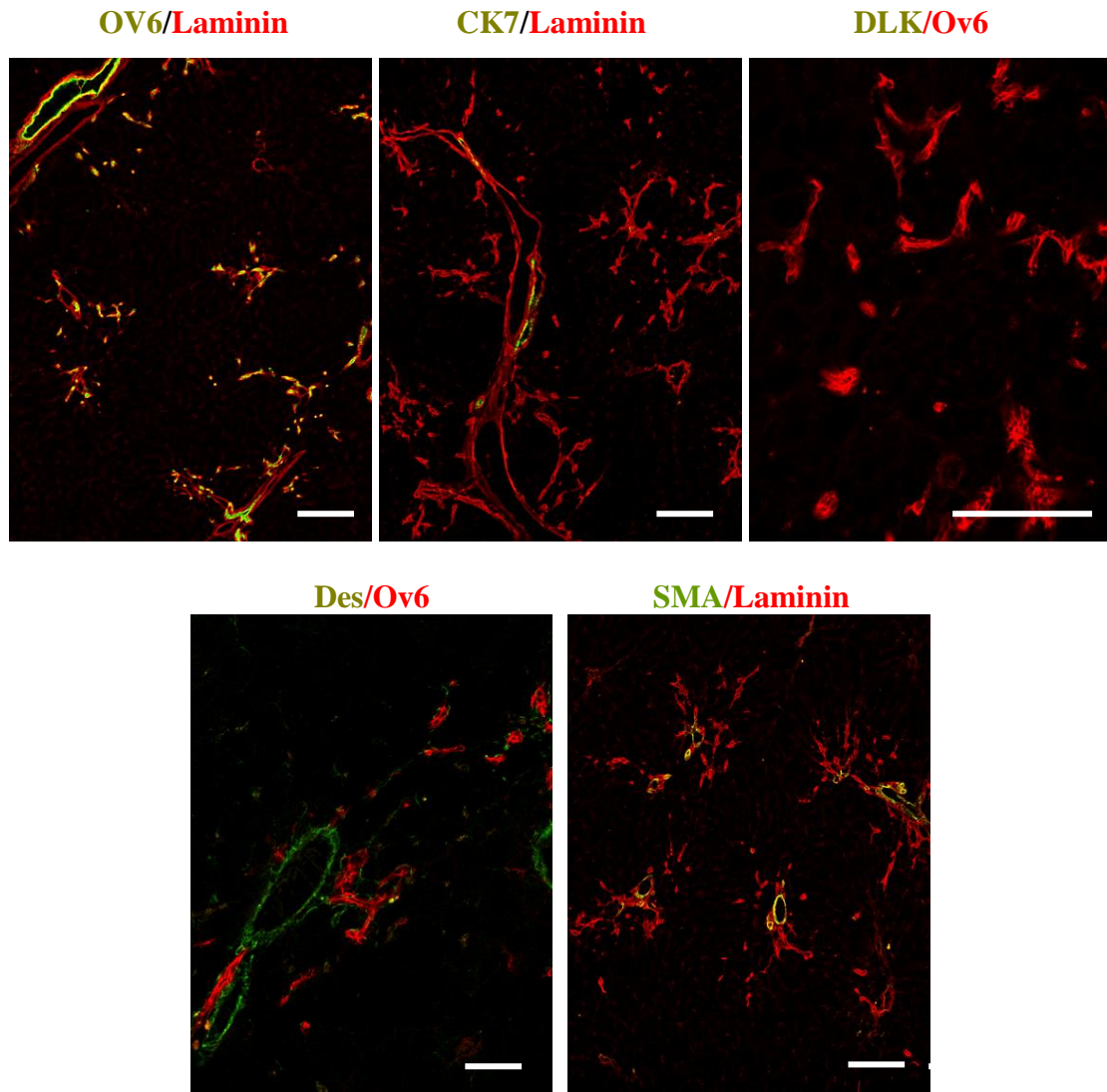
Az Ov6 pozitív kis epeutak immunfenotípusát a DEN kezelést követően a fenti metszeteken látott antitest kombinációk alapján a következőképpen határoztuk meg:
(13. táblázat)

13. táblázat: Ov6 pozitív kis epeutak immunfenotípusa

| | CK7 | AFP | DLK | Des | SMA |
|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| DEN után 5. nap | - | - | - | + | + |
| DEN után 14. nap | - | - | - | + | - |
| DEN után 12. hét | - | - | - | + | - |

3.3.2. Az AAF/CCl₄-kezeléssel előidézett duktuluszok immunfenotípusának jellemzése – közvetlenül a 2. kémiai hepatektómia előtt

Az AAF/CCl₄-kezelés után 3 hónappal dezmin pozitív sejtek vették körül az AFP, DLK, CK7 negatív epitelsejteket, melyek azonban nem expresszáltak SMA-t (35. ábra).



35. ábra: Az AAF/CCl₄-kezelés után 3 hónappal, közvetlenül a 2. kémiai hepatektómia előtt (2. AAF-kezelés 2. napján) eltávolított májából készített metszetek antitest-kombinációkkal megjelölve: *anti-Ov6/anti-laminin*, *anti-CK7/anti-laminin*, *anti-DLK/anti-Ov6*, *anti-Des/anti-Ov6*, *anti-SMA/anti-aminin*.

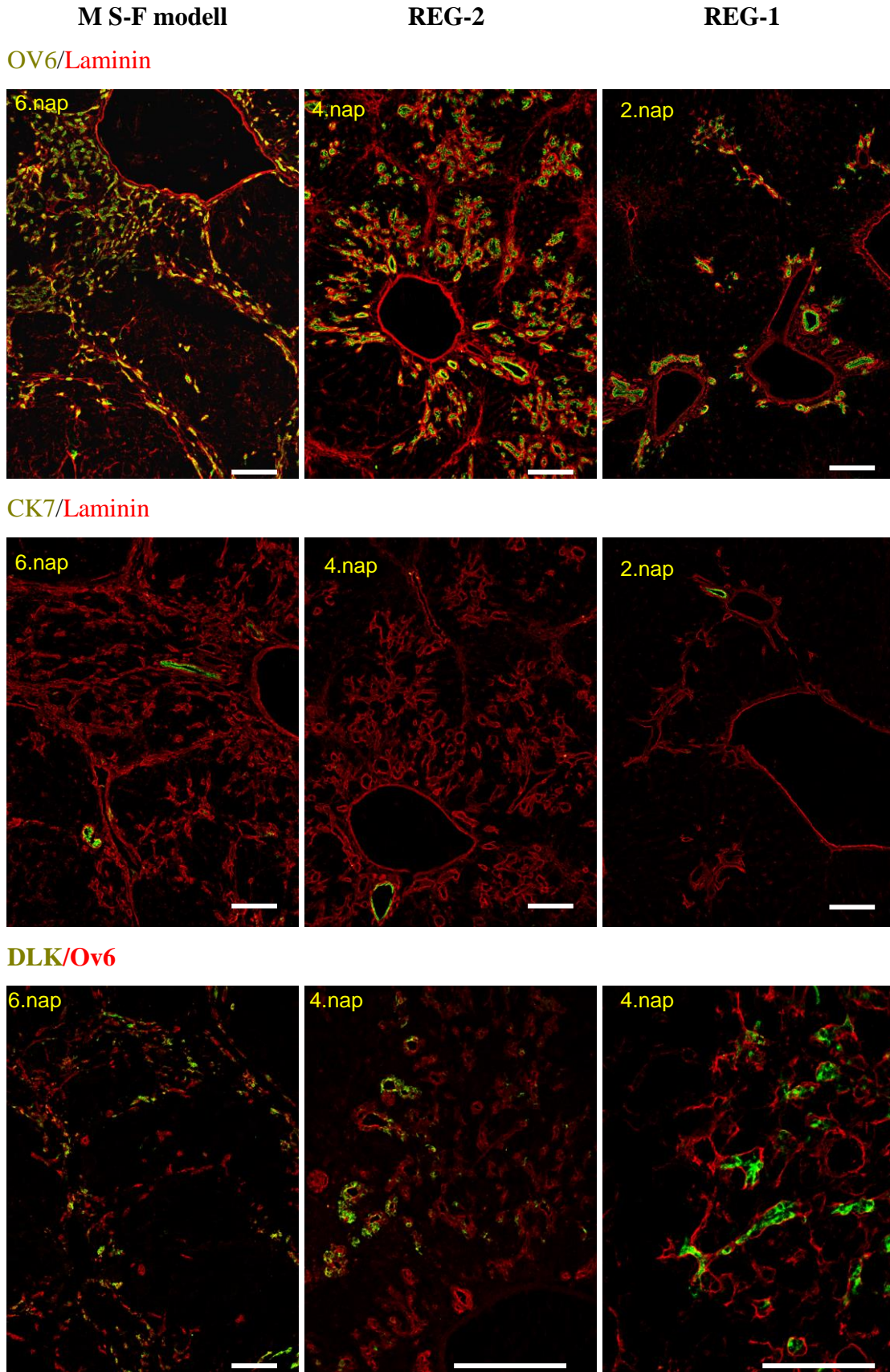
Az Ov6 pozitív kis epeutak immunfenotípusát az AAF/CCl₄-kezelés után 3 hónappal, a 2. kémiai hepatektómia előtt a fenti metszeteken látott antitest kombinációk alapján a következőképpen határoztuk meg: (14. táblázat).

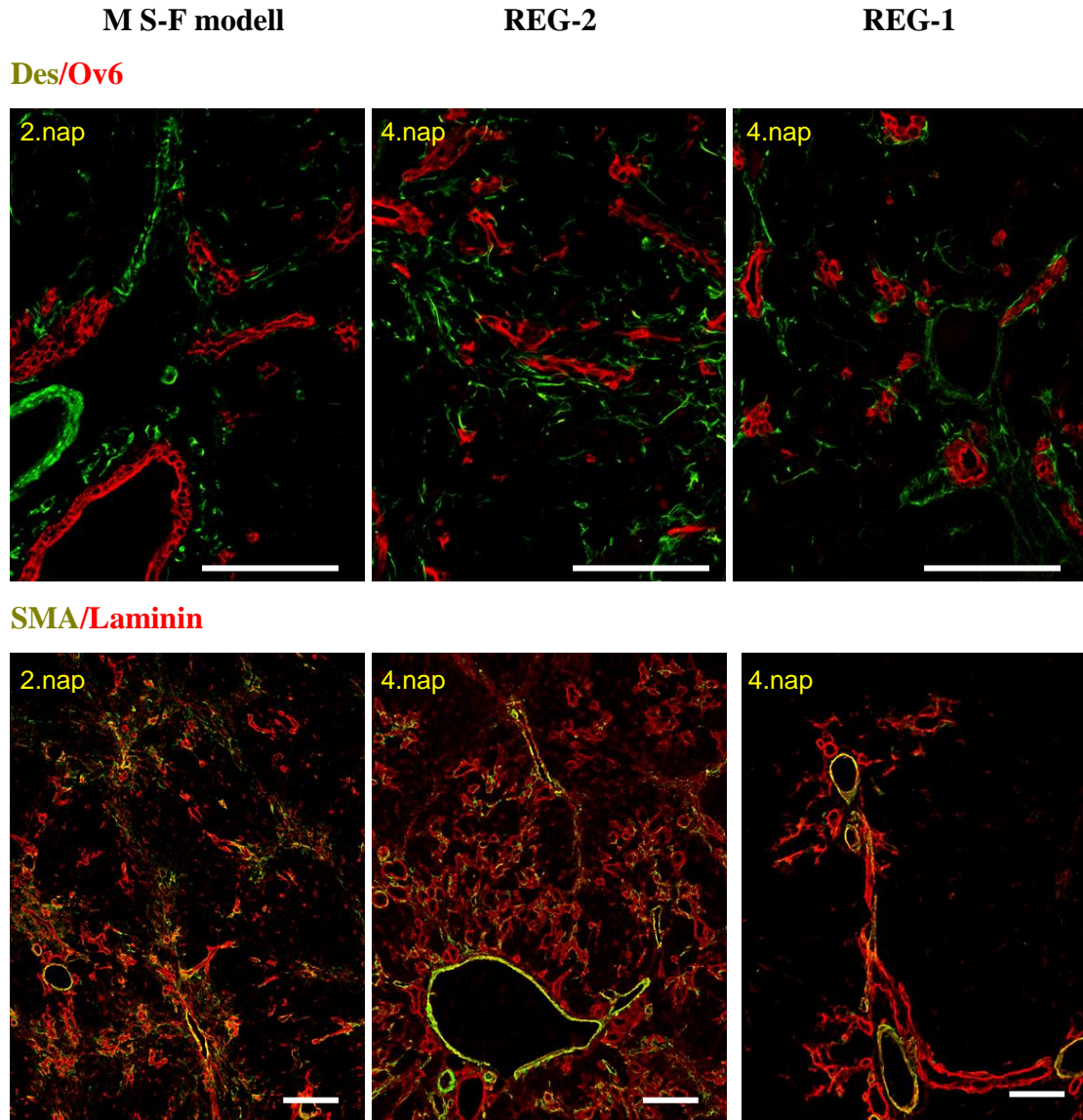
14. táblázat: Ov6 pozitív kis epeutak immunfenotípusa

| | CK7 | AFP | DLK | Des | SMA |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| AAF/CCl ₄ -kezelés után 3 hónappal | - | - | - | + | - |

3.3.3. A kémiai hepatektómiát követően megjelenő intraparenchimális duktuluszok immunfenotípusának jellemzése mindhárom modellben

A kémiai hepatektómia után a kis epeutak AFP, DLK pozitívak, CK7 negatívak voltak, az őket kísérő miofibroblasztok SMA és Des pozitívnak bizonyultak. (36. ábra)





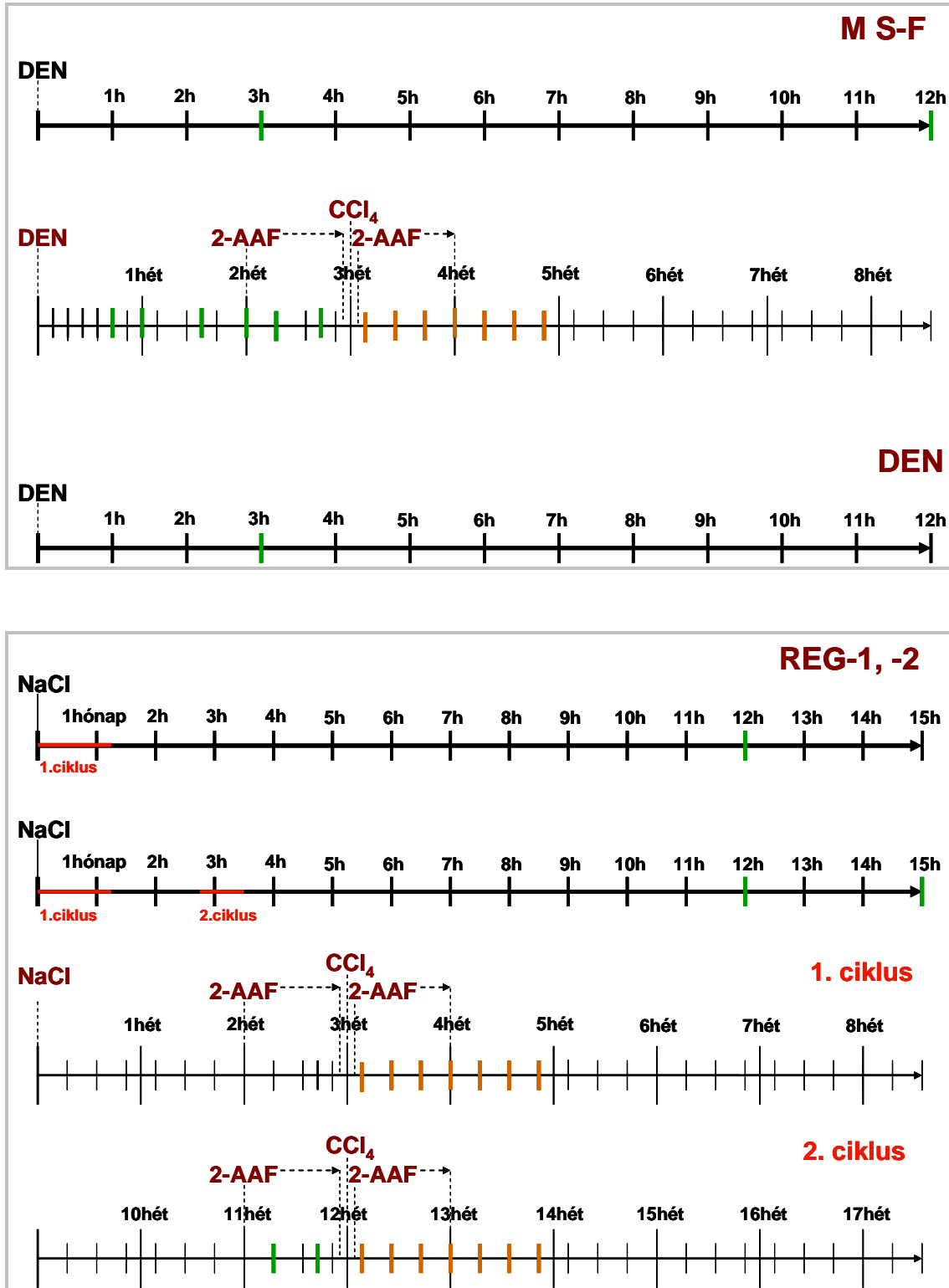
36. ábra: Mindhárom modellben a CCl_4 -kezelés/kémiai hepatektómia után különböző időpontokban (2., 4. vagy 6. nap) eltávolított májából készített metszetek antitest-kombinációkkal megjelölve: *anti-Ov6/anti-aminin*, *anti-CK7/anti-laminin*, *anti-DLK/anti-Ov6*, *anti-Des/anti-Ov6*, *anti-SMA/anti-laminin*.

A kémiai hepatektómiát követően megjelenő intraparenchimális duktuluszok immunfenotípusát a fenti metszeteken látott antitest kombinációk alapján a következőképpen határoztuk meg: (15. táblázat)

15. táblázat: A kémiai hepatektómiát követően megjelenő intraparenchimális duktuluszok immunfenotípusa

| | CK7 | AFP | DLK | Des | SMA |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|
| M S-F | - | + | + | + | + |
| REG-2 | - | + | + | + | + |
| REG-1 | - | + | + | + | + |

Az előbbieket alapján a kísérletek során látott epeút morfológiájú, lumennel rendelkező duktuluszokat két típusra oszthatjuk (DLK/AFP pozitívak és negatívak). Az ovális sejtekre jellemző markerek mindegyik modellben a hepatektómia után jelentek meg. A hepatektómia előtt az epeutak a Hering-csatornákra jellemző fenotípust mutatták. A következő ábrán az egyes modellekhez tartozó időtengelyeken megjelöltük azokat az időpontokat, amikor a kis epeutak tulajdonságai megegyeznek. (37. ábra)



37. ábra: Az egyes kísérleti modellekben eltérő időpontokban megjelenő Ov6-pozitív epeutak különböző fenotípussal rendelkeznek. A kísérleteket ábrázoló egyeneseken az általunk vizsgált markerekkel megegyező tulajdonságú kis epeutakkal rendelkező májak eltávolításának időpontjait azonos színnel jelöltük.

Zöldek azok az időpontok, amikor a májokban AFP és DLK negatív, de Ov6 pozitív epeutak jelentek meg és nőttek tovább: M S-F modellben a DEN kezelést követő 5., 7., 11. 14. nap, az AAF kezelés 2. és 5. napja, 3 és 12 hónappal a DEN után. A REG-1 modellben a NaCl után 12 hónappal. A REG-2 modellben a NaCl után 12 és 15 hónappal, a 2. AAF kezelés közben a 2. és 5. napon.

Sárgák azok az időpontok, amikor a májokban AFP, DLK és Ov6 pozitív epeutak jelentek meg és nőttek tovább: mindhárom modellben a CCl₄ utáni 2., 4., 6., 8., 10., 12., 14. nap.

4. Tumorképződés a vizsgált modellekben

A három vizsgált modellben (M S-F, REG-2, REG-1) 12 hónap elteltével megvizsgáltuk, milyen gyakorisággal fejlődik ki a májban szövettani módszerekkel igazolt tumor. A módosított Solt-Farber modellben a korábbi eredményeknek megfelelően az állatok nagy részében láttunk daganatképződést, míg a korai szövettani történéseket és a regenreáció folyamatát tekintve szinte megegyező REG-2 modellben csak 1 esetben jelent meg kóros sejtproliferáció. A REG-1 modellben a májak épek maradtak. (16. táblázat)

16. táblázat: Májdaganatok előfordulása a 3 vizsgált modellben 12 hónap elteltével

| | Állatok száma | Májdaganat előfordulása |
|--------------|---------------|-------------------------|
| M S-F | 11 | 8 |
| REG-2 | 13 | 1 |
| REG-1 | 24 | 0 |

MEGBESZÉLÉS

1. A máj lebenykés szerkezetének vizsgálata az egyedfejlődés során

A máj lebenykés szerkezete már az embrionális korban kialakul. (Szentágothai-Réthy, 2002) A máj születéskor meglévő tömege a felnőttkor eléréséig több mint tízszeresére növekszik egy összetett folyamat eredményeként (Gupta S, 2000; Vollmar B és mtsai, 2002), amely során munkánk alapján mind a lebenykék, mind pedig a hepatociták mérete és száma is növekedést mutat. A kérdés objektív vizsgálatára egy teljesen új, eddig még nem alkalmazott módszert fejlesztettünk ki. A máj az egyszerűbb felépítésű szervek közé tartozik, ennek ellenére a bevezetésben részletesen leírt okok miatt a hagyományos szövettani metszetek nem alkalmasak a lebenykék méretének és számának meghatározására. Az általunk kifejlesztett módszer azon a megfigyelésen alapul, hogy a májtok alatti ún. felszíni lebenykék tengelyei párhuzamosan helyezkednek el. (Teutsch HF és mtsai, 1999) A lebenykék közepén futó centrális vénákon keresztül a szinuszoidokat feltöltve kirajzolódik a lebenykék határa. Ez pedig lehetőséget ad arra, hogy a máj hierarchiájában azonos pozíciót elfoglaló lebenykék méretét és azok számát meghatározzuk. Ezzel a módszerrel természetesen csak a felszíni lebenykék paraméterei írhatók le megbízhatóan, azonban a mélyebben lévő lebenykék hasonló szerkezeti sajátosságai miatt következtetni tudunk a mélyben lezajló folyamatok tendenciájára is. Módszerünk nem alkalmas a májban, vagy egyes májlebenyekben levő lobulusok abszolút számának meghatározására.

Vizsgálataink szerint az egyedfejlődés korai szakaszában a felszín alatti lebenykék száma nő, új lebenykék képződnek. Ez az eredmény összhangban van azokkal a korábbi megfigyelésekkel, miszerint a fa ágrendszeréhez hasonlítható epeúrendszer a máj hílusa felől a periféria felé haladva alakul ki, és teljes fejlettségét patkányban csak 10-12 hetes korban éri el. (Vollmar B és mtsai, 2002.; Lemaigre FP, 2003; Libbrecht L és mtsai, 2005) Mivel az epeutak elágazódásával párhuzamosan új portális és centrális véna ágak is képződnek, újabb májlebenykék is kialakulhatnak ebben a periódusban. Eredményeink szerint is a 160 g-os testsúly eléréséig a máj állományában újabb lebenykék képződnek. Ezt követően azonban - bár a máj tömege még jelentősen nő -, a lebenykék száma már nem változik, méretük változása teszi lehetővé a máj további

növekedését. A lebenykék megnagyobbodását az egyedfejlődés során leírták humán és patkánymájban is (*Ekataksin V és mtsai, 1999; Vollmar B és mtsai, 2002*), sőt mégpedig a lebenykék száma és mérete is nő a korábbi publikációk szerint. (*Johnson FP, 1919; Ekataksin W és mtsai, 1999*)

Az egyedfejlődés során vizsgáltuk a hepatociták méretének alakulását is. A hepatociták nagysága egy lebenyken belül az ép májban is változik. (*Schmucker DL és mtsai, 1978*) Az összehasonlíthatóság kedvéért méréseink mindig a pericentralis zónában elhelyezkedő májsejtekre vonatkoztak. A cytokeratin intermedier filamentumok a citoplazmában találhatóak. A pancytokeratin antitest a hepatocitákban jellegzetes membránfestést is eredményez, ami különösen immunfluoreszcens technika alkalmazása során kirajzolja a sejthatárokat, lehetővé téve a sejtek méretének pontos meghatározását. Mérési eredményeink szerint az egyedfejlődés korai szakaszában a hepatociták mérete is növekszik a patkányok májában, később azonban már további gyarapodás nem tapasztalható.

2. A májlebenykék méretének és számának vizsgálata patkánymájban parciális hepatektómiát követően

A patkányok mája jól tagolt, elkülönült lebenyekből épül fel. (*Bismuth H, 1982*) Egyes lebenyek sebészi eltávolítását (parciális hepatektómia) követően a máj tömege a visszamaradt lebenyek növekedése révén áll helyre. (*Higgins GM és mtsai, 1931*) Ez a növekedési forma tehát biológiai értelemben inkább kompenzatórikus hiperpláziának és nem regenerációnak felel meg. Az elnevezéstől függetlenül az összetett növekedési reakció funkcionális értelemben teljes értékű regenerációt eredményez, ezért tanulmányozása nagyon fontos a szabályozott, nem daganatos növekedés megértéséhez. A kísérleti modell kb. 70 évvel ezelőtti leírása óta több ezer közlemény foglalkozott a növekedés dinamikájának molekuláris szintű szabályozásával (*Bisgaard HC és mtsai, 1998; Bisgaard HC és mtsai, 1999; Schibler U, 2003*). Meglepő módon azonban viszonylag keveset vizsgálták, hogy történnek-e szerkezeti változások a májban a regeneráció során. A máj eredeti lebenykes szerkezete egyértelműen megtartott marad a regeneráció alatt is. Mivel a regeneráció során a megmaradt lebenyek tömege

többszörösére nő (*Vollmar B és mtsai, 2002*), ennek együtt kell járnia új lebenyekék képződésével és/ vagy a lebenyekék méretének növekedésével. Érdekes módon erre az alapvető strukturális kérdésre nem található válasz az irodalomban, valószínűleg az „egyszerű” májszerkezet nem is olyan könnyű vizsgálhatósága miatt. (*Fausto N, 1994*) Ekataksin (*Ekataksin W és mtsai, 1999*) hagyományos szövettani metszeteken mérte le a porto-centrális távolságok alakulását a regeneráció előtt és után, ennek megnövekedéséből indirekt módon a lebenyekék méretének gyarapodására következtetett. Michalopoulos és De Frances (*1999*) a májregenerációról szóló legtöbbet idézett összefoglalójában viszont azt írja - részletes alátámasztó adatok nélkül -, hogy a regeneráció során a lebenyekék mérete átmenetileg megnő, majd osztódásuk révén helyreáll az eredeti méret és szerkezet. Az általunk kifejlesztett módszer kiválóan alkalmasnak bizonyult a kérdés pontos megválaszolására. A parciális hepatektómiát követően három hónappal, amikor a máj tömege és szöveti szerkezete már helyreállt, a tanulmányozott lebeny felszínén a lobulusok méretének növekedése volt megfigyelhető, ugyanakkor számuk nem változott. Tehát a hagyományos, hepatociták részvételével zajló regeneráció során a máj tömege kizárólag a lebenyekék méretének növekedésével valósult meg. A sejtek szintjén azonban pont fordított volt a helyzet, a hepatociták mérete nem változott, a máj növekedése a májsejtek osztódása és nem megnagyobbodása révén zajlott le. Extrém körülmények között a májsejtek is nőhetnek, de ilyenkor a máj állapota funkcióját tekintve instabil. (*Nagy P és mtsai, 2001*)

A regenerált lebenyekéket az ép májjal összehasonlítva azonban finom változások megfigyelhetőek voltak. Míg az ép májban a centrális vénák felszíni vetülete többnyire pontszerű megjelenésű volt, a regenerált májakban ezek a vénák vonalas, gyakran elágazódó rajzolatot mutattak. A regenerációt követően szintén megnőtt az egy centrális vénát körülvevő portális ágak száma, továbbá megváltozott a vizsgált (citokróm P450 IIE 1), zonálisan termelődő enzim megoszlása; a koncentrikus rajzolat helyett a megnagyobbodott lebenyekékben girlandszerű, karélyos megoszlás volt megfigyelhető.

A magasan fejlett élőlények regenerációs képessége erősen korlátozott, a regeneratív folyamatok nem képesek bonyolultabb struktúrák létrehozására. (*Elder D, 1979*) A májlebenyke egy ilyen bonyolult, hepatocita-gerendákból, epeutakból, erekből felépülő struktúra, a regeneráció pedig nem képes ezen képletek növekedésének finomabb

összehangolására. Ugyanakkor a leírt szerkezeti változások biztosítják, hogy a portocentrális távolságok ne változzanak lényegesen, ami fontos feltétele lehet a hatékony májműködésnek. A máj kiváló regenerációs képességét többször egymás után ugyanazon az állaton elvégzett parciális hepatektómiával is igazolták, amelyek során a máj tömege mindannyiszor ismételten helyreállt. (*Wagenaar GTM, 1993*) Jogosan merül fel a kérdés, hogy ilyen esetekben a máj tömege a lebenykék extrém megnagyobbodását eredményezi-e? Ennek a kísérletnek a megvalósítása - mivel az ismételt műtétek során már nem egész lebenyek eltávolításáról van szó -, nagy sebészi gyakorlatot és technikai felszereltséget igényel, ezért ezt a kérdést nem vizsgáltuk. A műtétek során a lebenyek integritása is sérül, valószínűleg ez is befolyásolja a regeneráció lezajlását.

3. A regenerált máj jellemzése AAF/PH kísérletben

Ha a hepatociták valamely oknál fogva nem képesek részt venni az elpusztult májtömeg pótlásában, aktivizálódnak a májban levő progenitor sejtek, és intenzív ovális sejtes proliferáció majd az ezt követő differenciálódási folyamat révén lassabban, de pótlódik az elvesztett májtömeg. A jelenség vizsgálatára egyik legjobban elterjedt kísérleti rendszer az úgynevezett AAF/PH modell. (*Dennis B és mtsai, 1977*) Ebben a modellben a hepatektómiát követő napokban a májban összetett szöveti reakció zajlik le, mely során az intenzív ovális sejtes proliferáció miatt a lebenykés szerkezet elmosódottá válik. Eredményeink szerint ennek ellenére hosszabb távon az eredeti szerkezet ugyancsak helyreáll. Három hónappal a kísérlet lezajlását követően a regenerált májban ugyanazokat a változásokat lehetett megfigyelni, mint a fent leírt, a hepatociták részvételével lezajló regeneráció után; azaz új lebenykék nem képződnek, a máj tömege a lebenykék megnagyobbodása révén áll helyre, körülöttük pedig megnő a portális ágak száma. Ez az eredmény is azt támasztja alá, hogy a progenitor sejtek alkotta „tartalék” regenerációs rendszer kissé lassúbb ugyan, de képes az elpusztult májtömeg teljes értékű pótlására.

Finom különbség azonban mégis megfigyelhető volt az eltérő módon regenerált májak között. Az AAF/PH kísérlet lezajlása után 3 hónappal a megnagyobbodott lebenykék

között a parenchimában szűk lumenű, vagy látszólag lumennel nem is rendelkező, kis sejtekből felépülő duktuláris képletek voltak megfigyelhetők (*Paku S és mtsai, 2005*). Ezeknek a képleteknek az elhelyezkedése emlékeztetett a kísérlet korábbi fázisában nagy számban jelenlévő ovális sejtek alkotta kötegekre, de a sejtek morfológiája inkább megfelelt az ép májban előforduló kisebb epeutakénak. A jelenség oka az lehet, hogy nem minden ovális cső differenciálódik.

4. Az intraparenchimális duktuláris képletek jellemzése

A fent leírt duktuláris képleteket az általunk alkalmazott modellek közül három hónappal az egyszeri DEN kezelést követően, illetve hasonló késői időpontban az AAF/CCL₄ modellben is megfigyeltük. Ezzel szemben ilyen duktulusok nem alakultak ki a kísérleti állatok májában parciális hepatektómiát követően, illetve szelektív periportális, vagy pericentrális nekrozist okozó allylalkohol vagy széntetraklorid kezelés után. Az ovális sejtektől eltérően - hasonlóan a munkacsoportunk által korábban az AAF/PH modellben megfigyeltekkel -, a duktulusok AFP és DLK negatívnak bizonyultak, és nem vették körül őket SMA pozitív aktivált ITO sejtek/miofibroblasztok sem. Ezzel szemben az epeúti hámsejtekhez hasonlóan erős Ov-6 pozitivitást mutattak. Munkacsoportunk korábbi kísérletei szerint a májban az őssejteknek otthont adó Hering-csatornák CK7 negativitásuk alapján különböztethetők meg a többi epeúttól. (*Paku S és mtsai, 2005*). Ezért perdöntő fontosságú volt a CK7 reakció, ami negatívnak bizonyult. Ez alapján fenotípusukban az egyszeri DEN kezelést követően illetve az AAF/CCL₄ kísérlet után a regenerált májokban jelenlévő intraparenchimális duktulusok megegyeznek az ép májban jelenlévő Hering-csatornákkal.

5 . A progenitor sejtkompartment amplifikációjának hatása a májregenerációra

A parenchimában nagyobb számban jelenlévő, a Hering-csatornákéval megegyező fenotípusú duktuláris képletek regenerációban betöltött szerepének vizsgálata érdekében a fent leírt két módszerrel (DEN-kezelés, ill. progenitor sejt mediálta regeneráció)

előidéztek azokat, majd ismét regenerációra készítettük a májat. Az AAF/PH kísérletben a sebészi hepatektómiát egyszeri nagy dózisu, centrális nekrozist előidéző CCl_4 kezeléssel helyettesítettük. Irodalmi adatok alapján (*Palmes D és mtsai, 2004*) e két kísérleti rendszer nagyon hasonló eredményekkel jár, a funkcionálisan aktív májtömeg veszteség nagyrészt megegyezik, és a CCl_4 alkalmazásával elkerülhető az igen nagy mortalitással járó ismételt sebészi parciális hepatektómia elvégzése. Ezeket az állatokat aztán progenitor sejt mediálta regenerációra készítettük egy újabb AAF/ CCl_4 ciklus alkalmazásával. A DEN kezelést követő AAF/ CCl_4 kísérlet a jól ismert Solt-Farber-féle hepatokarcinogenezis modell módosított változata. Ezt a két modellt aztán összehasonlítottuk azokkal az állatokkal, amelyeknél a kísérlet kezdetekor nem voltak jelen duktuluszok a parenchimában. A regeneráció „mértékét” kétféle paraméterrel jellemeztük: morфомetriai módszerekkel lemértük, hogyan alakul az idő függvényében az ovális sejtek által elfoglalt terület mérete, ill. megvizsgáltuk a differenciálódás helyének megfelelő fókuszok képződésének dinamikáját is. Mindkét vizsgált paraméter, az ovális sejtes proliferáció és a fókuszok is korábban jelentek meg azokban az állatokban, amelyekben előzetes kezeléssel megnöveltük a duktuluszok számát. Ez az eredmény igazolta, hogy a leírt kezelések utáni intraparenchimális duktuluszok nem csak fenotípusukban hasonlítanak a Hering-csatornákra, hanem funkcionálisan is képesek összejtéknént viselkedni. Tehát az összejt kompartment kiterjesztésével, amplifikációjával felgyorsítható a májregeneráció patkányokban.

A módosított Solt-Farber modellel kezelt és az egyszeri, ill. kétszeri AAF/ CCl_4 kísérleten átesett állatok egy csoportjában 12 hónapos túlélést követően ismét vizsgálatokat végeztünk. Az előbbi kísérleti csoport tagjainak 90%-ában alakult ki májrák igazolva, hogy a technikai jellegű módosítás érdemben nem befolyásolta a kísérlet kimenetelét. Ugyanakkor az AAF/ CCl_4 kezeléseken átesett 15 állat közül egyben alakult csak ki májdaganat, tehát az összejt kompartment amplifikálása nem jelent önmagában karcinogén kockázatot. Tudomásunk szerint ez az első olyan in vivo kísérleti modell, melyben igazoltuk, hogy az összejtek számának növelésével hatékonyabbá tehető a májregeneráció. Ennek figyelembe vételével újabb kísérleti irányzat alakulhat ki a májregeneráció hatékonyságának fokozására.

KÖVETKEZTETÉSEK

- I. Az egyedfejlődés során a májlebenykék számának növekedése és megnagyobbodása is hozzájárul a máj tömegének növekedéséhez. Az egyedfejlődés korai szakaszában a hepatociták méretének növekedése ugyancsak elősegíti a lebenykék megnagyobbodását**
- II. A máj tömege felnőtt állatokban a hepatociták és a progenitor sejtek részvételével megvalósuló regeneráció során is kizárólag a lebenykék méretének növekedésével áll helyre. Új lebenykék nem képződnek.**
- III. Nekrogén dózisú dietilnitrózamin-kezelés, valamint az AAF/CCl₄ kísérleti rendszerrel előidézett regeneráció során a májparenchimában duktuláris képletek jelennek meg, melyek sejtjei fenotípusukban és funkciójukban is megegyeznek a máj őssejtjeivel.**
- IV. A máj őssejt kompartmentjének amplifikációja felgyorsítja a regeneráció folyamatát.**

ÖSSZEFOGLALÁS

A máj kiváló regenerációs képességgel rendelkezik. Ha patkányok májának 2/3-át eltávolítjuk (parciális hepatektómia), a meghagyott lebenyek kompenzatórikus hiperpláziája révén a máj tömege 7-9 nap alatt regenerálódik, mivel a hepatociták megőrzik proliferációs képességüket. Ha a hepatociták osztódását szelektíven gátoljuk, a regeneráció a Hering-kanálisokban elhelyezkedő őssejtek származó progenitor sejtek osztódása útján megy végbe. A máj mérete az egyedfejlődés alatt is többszörösére nő. A kétféle regeneráció és az egyedfejlődés során a lebenyész szerkezet változásának 3 lehetséges módja van: 1. új lebenyek képződnek, 2. a lebenyek mérete megnő, 3. a lobulusok számának növekedése együtt járhat azok megnagyobbodásával is. Kísérleteinkben új módszer segítségével közvetlenül a felszín alatt levő - a máj hierarchiájában azonos pozíciót elfoglaló - lobulusok változásait vizsgáltuk. A szinuszoidokat műgyantával feltöltve kirajzolódott a lebenyek határa, amely lehetőséget adott azok méretének és számának meghatározására. A pericentrálisan elhelyezkedő májsejtek nagyságát is lemértük, mivel a lebenyek méretét a hepatociták növekedése is befolyásolhatja. Eredményeink alapján az egyedfejlődés során a májlebenyek számának növekedése és megnagyobbodása, a korai fázisban pedig a hepatociták növekedése is hozzájárul a máj tömegének gyarapodásához. Felnőtt patkányokban a lebenyek száma és a májsejtek mérete adott, parciális hepatektómiát követően a máj a lebenyek méretének növekedésével, és a hepatociták számának növelésével alkalmazkodik.

A progenitor sejtek útján történő regeneráció (AAF/PH kísérlet) lezajlása után 3 hónappal a májparenchimában szűk lumenű, immunfenotípusukban a Hering-csatornákkal megegyező duktuláris képletek voltak megfigyelhetők. További májkárosító modelleket vizsgálva a karcinogén dietil-nitrózammal (DEN) történt károsítás után már néhány nappal jelen voltak hasonló képletek. Az intraparenchimális duktulusok regenerációban betöltött szerepét mindkét modellben kémiai hepatektómiát követően tovább vizsgáltuk. A regenerációt az ovális sejtek által elfoglalt terület méretével, illetve a fókuszok képződésének dinamikájával jellemeztük. Mindkét vizsgált szövettani változás korábban jelent meg az állatokban, amelyekben előzetes kezeléssel megnöveltük a duktulusok számát. Tehát az őssejt kompartment kiterjesztésével, amplifikációjával felgyorsítható a májregeneráció patkányokban.

ABSTRACT

Liver has extremely high regeneration ability. However, if 2/3 of rats' liver is removed surgically (partial hepatectomy), liver mass regenerates within 7 to 9 days due to the compensatory hyperplasia of the remaining lobes. Hepatocytes maintain their proliferative capacity. If proliferation of hepatocytes is selectively blocked, the regeneration happens through the progenitor cells derived from stem cells in the Hering canals. The liver grows manifold until ontogenesis too. Three possible options are known of the architectural changes in the liver during the two types of regeneration and ontogenesis: 1. new lobules are created, 2. lobules size increases, 3. both the number and size of lobules increase. During our experiments – with a new method – we studied changes of lobules situated just under the surface of the organ, because they have the same localization within the hepatic structure. By filling sinusoids with synthetic resin, we were able to visualize lobule borders and measure their size and number. We assessed also the size of hepatocytes in the pericentral area, because possible enlargement of lobules may result from both the increase in size and in number of hepatocytes. According to our investigations, during ontogenesis the number and size of lobules situated under the surface increase, since new lobules develop. In the early stage of ontogenesis the size of hepatocytes also increases. In adult rats during regeneration liver volume increased only through the increase in lobule size and through the division of liver cells and not via their enlargement.

3 months after regeneration via progenitor cells (AAF/PH experiment), ductular structures with narrow lumen – like Hering canals - were seen in the parenchyma of the enlarged lobules. Ductular structures described above were also seen few days after single diethyl-nitrosamine (DEN) treatment. With the above-mentioned two methods we forced the formation of parenchymal ductular structures and investigated their role in the regeneration process after partial hepatectomy. The extent and phenotype of Ov6-positive biliary tracts present before and appearing after mitogen stimulation, as well as the number and size of regenerative foci were investigated during the comparative study of regeneration and hepatocarcinogenesis. Both parameters, i.e. oval cell proliferation and foci have appeared earlier in animals in which ductuli number was increased with prior treatment. Thus, by extending and amplifying the stem cell compartment liver regeneration can be accelerated in rats.

IRODALOMJEGYZÉK

Akhurst B, Matthews V, Husk K, Smyth MJ, Abraham LJ, Yeoh GC. (2005) Differential lymphotoxin-beta and interferon gamma signaling during mouse liver regeneration induced by chronic and acute injury. *Hepatology* 41(2):327-35.

Alison MR, Lovell MJ. (2005) Liver cancer: the role of stem cells. *Cell Prolif* 38(6):407-21.

Alpini G, Roberts S, Kuntz SM. (1996) Morphological, molecular, and functional heterogeneity of cholangiocytes from normal rat liver. *Gastroenterology* 110: 1636–43.

Anilkumar TV, Golding M, Edwards RJ, Lalani E, Sarraf CE, Alison MR. (1995) The resistant hepatocyte model of carcinogenesis in the rat: the apparent independent development of oval cell proliferation and early nodules. *Carcinogenesis*, 16:845-853.

Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R. (2004) Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clin Biochem.* 37(7):529-40.

Bartels H, Herbort H, Jungermann K. (1990) Predominant periportal expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase and tyrosine aminotransferase genes in rat liver. Dynamics during the daily feeding rhythm and starvation-refeeding cycle demonstrated by in situ hybridization. *Histochemistry* 94:637-644.

Beaussier M, Wendum D, Schiffer E, Dumont S, Rey C, Lienhart A, Housset C. (2007) Prominent contribution of portal mesenchymal cells to liver fibrosis in ischemic and obstructive cholestatic injuries. *Lab Invest* 87:292–303

Bhunchet E, Wake K. (1988) The portal lobule in rat liver fibrosis: a re-evaluation of the liver unit. *Hepatology* 27:481-487.

Bisgaard HC, Müller S, Nagy P, Rasmussen LJ, Thorgeirsson SS. (1999) Modulation of the gene network connected to interferon in liver regeneration from oval cells. *Am J Pathol* 155:1075–1085

Bisgaard HC, Nagy P, Ton PT, Hu Z, Thorgeirsson SS. (1994) Modulation of keratin 14 and alpha-fetoprotein expression during hepatic oval cell proliferation and liver regeneration. *J Cell Physiol* 159 (3): 475-84.

Bisgaard HC, Santoni-Rugiu E, Nagy P, Thorgeirsson SS. (1998) Modulation of the plasminogen activator/plasmin system in rat liver regenerating by recruitment of oval cells. *Lab Invest* 78:237–246

Bismuth H. (1982) Surgical anatomy and anatomical surgery of the liver. *World J Surg* 6: 3–9.

Castelain Ph, Deleener A, Kirsch-Volders M, Barbason H. (1989) Cell population kinetics and ploidy rate of early focal lesions duringhepatocarcinogenesis in the rat. *Br. J. Cancer* 60, 827-833

Christoffels VM, Sassi H, Ruijter JM, Moorman AFM, Grange T, Lamers WH. (1999) A mechanistic model for the development and maintenance of portocentral gradients in gene expression in the liver. *Hepatology* 29:1180-1192.

Crosby HA, Nijjar SS, de Goyet J de V, Kelly DA, Strain AJ. (2002) Progenitor cells of the biliary epithelial cell lineage. *Semin Cell Dev Biol* 13:397–403

Czaja MJ, Xu J, Alt E. (1995) Prevention of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by soluble tumor necrosis factor receptor. *Gastroenterology* 108(6):1849-54.

Dabeva MD, Shafritz DA. (1993) Activation, proliferation, and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in the D-galactosamine model of liver regeneration. *Am J Pathol*, 143:1606-1620.

Dennis B. Solt, DMD, Alan Medline, MD, Emmanuel Farber, MD, PhD. (1977) Rapid Emergence of Carcinogen-Induced Hyperplastic Lesions in a New Model for the Sequential Analysis of Liver Carcinogenesis *Am J of Pathol* 88.3.: 595-609

De Toranzo EG, De Ferreyra EC, De Fenos OM, Castro JA. (1983) Prevention of carbon tetrachloride-induced liver necrosis by several amino acids. *Br J Exp Pathol* 64(2):166-71.

Dezső K, Jelnes P, László P, Baghy K, Bődör C, Paku S, Tygstrup N, Bisgaard HC, Nagy P. (2007) Thy-1 is expressed in hepatic myofibroblasts and not oval cells in stem cell-mediated liver regeneration. *Am J Pathol* 171(5):1529-37.

Dezső K, Paku S, Papp V, Turányi E, Nagy P. (2009) Architectural and immunohistochemical characterization of biliary ductules in normal human liver. *Stem Cells Dev* 8:1417–1422

Duncan SA. (2003) Mechanisms controlling early development of the liver. *Mech Dev* 120:19-33.

Ekataksin W, Kaneda K. (1999) Liver microvascular architecture: an insight into the pathophysiology of portal hypertension. *Seminars in Liver Dis* 19:359-382.

Ekataksin W, Wake K. (1977) New concepts in biliary and vascular anatomy of the liver. *Prog Liver Dis* 15:1-30.

Ekataksin W, Wake K. (1991) Liver units in three dimensions. I. Organization of argyrophylic connective tissue skeleton in porcine liver with particular reference to the compound hepatic lobule. *Am J Anat* 191:113-153.

Ekataksin W, Wake K (1997) New concepts in biliary and vascular anatomy of the liver. In: Boyer JL, Ockner RK (eds) *Progress in liver diseases*, vol XV. Philadelphia, W B Saunders, pp 1–30

Elder D. (1979) Why is regenerative capacity restricted in higher organisms? *J Theor Biol* 81:563-568.

Evarts RP, Nagy P, Marsden E, Thorgeirsson SS. (1987) A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. *Carcinogenesis* 8:1737-1740.

Evarts RP, Nagy P, Nakatsukasa H, Marsden E, Thorgeirsson SS. (1988) In vivo differentiation of rat liver oval cells into hepatocytes. *Cancer Res*, 49:1541-1547.

Falkowski O, An HJ, Ianus IA, Chiriboga L, Yee H, West AB, Theise ND. (2003) Regeneration of hepatocyte “buds” in cirrhosis from intrabiliary stem cells. *J Hepatol* 39:357-364.

Fausto N, Webber EM. (1994) Liver regeneration. In: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Schafritz DA, eds. *Liver Biology and Pathobiology*. New York, NY:Raven Press, 1059-1084.

Franke WW, Schmid E, Osborn M, Weber K. (1979) Intermediate-sized filaments of human endothelial cells. *J Cell Biol* 81(3):570-80.

Gershbein LL, Elias H. (1954) Observations on the anatomy of the rat liver. *Anat Rec* 120: 85- 98.

Grompe M, Overturf K, Al-Dhallm Y, Finegold M. (1998) Therapeutic trials in the murine model of hereditary tyrosinaemia type I: A progress report. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 21: 518-31

Gupta S. (2000) Hepatic polyploidy and liver growth control. *Semin Cancer Biol* 10:161-171.

Higgins GM, Anderson RM. (1931) Experimental pathology of the liver. *Arch Pathol* 12:186-202.

Hoehme S, Brulport M, Bauer A, Bedawy E, Schormann W, Hermes M, et al. (2010) Prediction and validation of cell alignment along microvessels as order principle to restore tissue architecture in liver regeneration. *PNAS* 107:10371-10376.

Holt N, Wang J, Kim K, Friedman G, Wang X, Taupin V, Crooks GM, Kohn DB, Gregory PD, Holmes MC, Cannon PM. (2010) Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in vivo. *Nat Biotechnol* 28(8):839-47.

Huang RQ, Schiano TD, Amolat MJ, Miller CM, Thung SN, Saxena R. (2004) Hepatocellular proliferation and changes in microarchitecture of right lobe allografts in adult transplant recipients. *Liver Transplantation* 10:1461-1467.

Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, Park ES, Lee EG, Koo JM, Jeon HY, Lee BC, Kang SK, Kim SJ, Ahn C, Hwang JH, Park KY, Cibelli JB, Moon SY. (2004) Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* 12;303(5664):1669-74.

Ingelman-Sundberg M, Johansson I, Penttila KE, Glaumann H, Lindros KO. (1988) Centrilobular expression of ethanol inducible cytochrome P-450 (II E1) in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 157:55-60.

Jelnes P, Santoni-Rugiu E, Rasmussen M, Friis SL, Nielsen JH, Tygstrup N, Bisgaard HC. (2007) Remarkable heterogeneity displayed by oval cells in rat and mouse models of stem cell-mediated liver regeneration. *Hepatology* 45:1462-1470.

Johnson FP (1919) The development of the lobule of the pig's liver. *Am J Anat* 25:299–331

Kanno N, LeSage G, Glaser S. (2000) Functional heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium. *Hepatology* 31:555–61.

Kiernan F. (1833) The anatomy and physiology of the liver. *Philos Trans R Soc London (Biol)* 123:711-770

Kongure K, Ishizaki M, Nemoto M, Kuwano H, Makuuchi M. (1999) A comparative study of the anatomy of the rat and human livers. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 6: 171-5.

Krinke, George J. (2000) "History, Strains and Models". *The Laboratory Rat (Handbook of Experimental Animals)*. Gillian R. Bullock (series ed.), Tracie buntun (series ed.). Academic Press. pp. 3–16. ISBN 0-12-426400-X.

Kuo TK, Hung SP, Chuang CH, Chen CT, Shih YR, Fang SC, Yang VW, Lee OK. (2008) Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells. *Gastroenterology* 134(7):2111-21, 2121.e1-3.

Landing BH, Wells TR (1991) Considerations of some architectural properties of the biliary tree and liver in childhood. In: Abramowsky CR, Bernstein J, Rosenberg HS (eds) *Tranplantation pathology – hepatic morphogenesis. Perspectives Pediatric Pathology* vol 14. Karger, Basel, pp 122–142

Laurson J, Selden C, Hodgson HJ. (2005) Hepatocyte progenitors in man and in rodents—multiple pathways, multiple candidates. *Int J Exp Pathol* 86:1–18

Lemaigre FP. (2003) Development of the biliary tract. *Mech Dev* 120:81-87.

Lemaigre FP. (2009) Mechanisms of liver development: concepts for understanding liver disorders and design of novel therapies. *Gastroenterology* 137:62-79.

Libbrecht L, Spinner NB, Moore EC, Cassiman D, Van Damme-Lombaerts R, Roskams T. (2005) Peripheral bile duct paucity and cholestasis in the liver of a patient with Alagille syndrome. *Am J Surg Pathol* 29:820-826.

Mabuchi A, Mullaney I, Sheard P, Hessian P, Zimmermann A, Senoo H, Wheatley AM. (2004) Role of Hepatic Stellate Cells in the Early Phase of Liver Regeneration in Rat: Formation of Tight Adhesion to Parenchymal Cells. *Comp Hepatol* 14;3 Suppl 1:S29.

MacSween NM, Desmet VJ, Roskams T, Scothorne RJ. Developmental anatomy and normal structure. (2002) In: Mac-Sween NM, Burt AC, Portmann BC, Ishak KG, Scheuer PJ, Anthony PP, eds. *Pathology of the Liver*. London, England: Churchill Livingstone; 2002:2-66.

Maeno H, Ono T, Dhar D, TS, Yamanoi A, Nagasue N. (2005) Expression of hypoxia inducible factor-1alpha during liver regeneration induced by partial hepatectomy in rats. *Liver* 25:1002–1009

Mall FP. (1906) A study of the structural unit of the liver. *Am J Anat* 5:227–308

Mark AL, Sun Z, Warren DS, Lonze BE, Knabel MK, Melville Williams GM, Locke JE, Montgomery RA, Cameron AM. (2010) Stem cell mobilization is life saving in an animal model of acute liver failure. *Ann Surg* 252(4):591-6.

Martins PNA, Neuhaus P. (2007) Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. *Liver International* 27(3):384-92.

Matsumoto T, Kawakami M. (1982) The unit-concept of hepatic parenchyma. A re-examination based on angioarchitectural studies. *Acta Pathol Jpn* 32(suppl 2):285–314

Matsumoto K, Yoshitomi H, Rossant J, Zaret KS. (2001) Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science* 294:559-563.

McKellar M. (1949) The postnatal growth and mitotic activity of the liver of the albino rat. *Am J Anat* 85:263–295

Micallef IN, Jacobsen ED, Shaughnessy P, Gandhi PJ, Calandra G, van Rhee F, Uberti J. (2012) G-CSF plus plerixafor (Mozobil) to mobilize hematopoietic stem cells in patients with thrombocytopenia or leukopenia prior to auto-SCT. *Bone Marrow Transplant* 2012 Jul 9. doi: 10.1038/bmt.2012.125.

Michalopoulos GK, DeFrances M. (1997) Liver regeneration. *Science* 276:60-66.

Nagata K. (1998) Expression and function of heat shock protein 47: a collagen-specific molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *Matrix Biol* 16(7):379-86.

Nagy P, Teramoto T, Factor VM, Sanchez A, Schnur J, Paku S, et al. (2001) Reconstitution of liver mass via cellular hypertrophy in the rat. *Hepatology* 33:339-345.

Oertel M, Shafritz DA. (2008) Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochim Biophys Acta* 1782(2):61-74.

Paku S, Dezsó K, Kopper L, Nagy P. (2005) Immunohistochemical analysis of cytokeratin 7 expression in resting and proliferating biliary structures of rat liver. *Hepatology* 42:863-870

Paku S, Nagy P, Kopper L, Thorgeirsson SS. (2004) 2-acetylaminofluorene dose-dependent differentiation of rat oval cells into hepatocytes: confocal and electron microscopic studies. *Hepatology* 39 (5): 1353-61.

Paku S, Schnur J, Nagy P, Thorgeirsson SS. (2001) Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver. *Am J Pathol* 158:1313-1323.

Palmes D, Spiegel HU. (2004) Animal models of liver regeneration. *Biomaterials* 25(9):1601-11.

Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. (1999) Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284:1168–1170

Petersen BE, Goff JP, Greenberger JS, Michalopoulos GK. (1998) Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. *Hepatology* 27:433–445

Petersen BE, Zajac VF, Michalopoulos GK. (1998) Hepatic oval cell activation in response to injury following chemically induced periportal or pericentral damage in rats. *Hepatology* 27(4):1030-8.

Pi L, Oh SH, Shupe T, Petersen BE. (2005) Role of connective tissue growth factor in oval cell response during liver regeneration after 2-AAF/PHx in rats. *Gastroenterology* 128:2077–2088

Proctor E, Chatamra K. (1982) High yield micronodular cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 83:1183–1190

Ramadori G, Saile B. (2002) Mesenchymal cells in the liver—one cell type or two? *Liver* 22:283–294

Roskams TA, Theise ND, Balabaud CH, Bhagat G, Bhathal PS, Bioulac-Sage P, et al. (2004) Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology* 39:1739-1745.

Saxena R, Theise ND, Crawford JM. (1999) Microanatomy of the human liver—exploring the hidden interfaces. *Hepatology* 30(6):1339-46.

Schibler U. Circadian rhythms. (2003) Liver regeneration clocks on. *Science* 302:234-235

Schmucker DL, Mooney JS, Jones AL. (1978) Stereological analysis of hepatic fine structure in the Fischer 344 rat. *J Cell Biol* 78:319-337.

Sell S. (2010) On the stem cell origin of cancer. *Am J Pathol* 176:2584-2594.

Shu SN, Wei L, Wang JH, Zhan YT, Chen HS, Wang Y. (2004) Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. *World J Gastroenterol* 10:2818–2822

Simpson GEC, Finckh ES. (1963) The pattern of regeneration of rat liver after repeated partial hepatectomy. *J Pathol Bacteriol* 86:361–370

Solt DB, Cayama E, Tsuda H, Enomoto K, Lee G, Farber E. (1983) Promotion of liver cancer development by brief exposure to dietary 2-acetylaminofluorene plus partial hepatectomy or carbon tetrachloride. *Cancer Res* 43(1):188-91.

Solt D, Farber E. (1976) New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature* 263:701-703.

Szentágothai János, Réthelyi Miklós. (2002) *Funkcionális anatómia. Medicina Könyvkiadó Rt. Budapest*

Tanimizu N, Tsujimura T, Takahide K, Kodama T, Nakamura K, Miyajima A. (2004) Expression of Dlk/Pref-1 defines a subpopulation in the oval cell compartment of rat liver *Gene Expr Patterns* 5 (2): 209-18.

Taub R. (2004) Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:836-847

Tetamatsu M, Ho RH, Tohru K, Ekem JK, Farber E. (1984) Studies on the proliferation and fate of oval cells in the liver of rats treated with 2-acetyl-aminofluorene and partial hepatectomy. *Am J Pathol* 114:418-430.

Tetamatsu M, Mera Y, Ito N, Satoh K, Sato K. (1985) Relative merits of immunohistochemical demonstration of placental A, B and C forms of glutathione S transferase and histochemical demonstration of gammaglutamyl transferase as markers of altered foci during liver carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* 6:1621-1626.

Teutsch HF. (2005) The modular microarchitecture of human liver. *Hepatology* 42:317-325

Teutsch HF, Scheuerfeld D, Groezinger E. (1999) Three-dimensional reconstruction of parenchymal units on the liver of the rat. *Hepatology* 29:494-505.

Theise ND, Krause DS. (2002) Bone marrow to liver: the blood of Prometheus. *Semin Cell Dev Biol* 13:411-417

Ueberham E, Böttger J, Ueberham U, Grosche J, Gebhardt R. (2010) Response of sinusoidal mouse liver cells to choline-deficient ethionine-supplemented diet. *Comp Hepatol* 13:9:8.

Vollmar B, Pradarutti S, Richter S, Menger MD. (2002) In vivo quantification of ageing changes in the rat liver from early juvenile to senescent life. *Liver* 22:330-341.

Wagenaar GTM, Chamuleau AFM, Pool CW, deHan JG, Maas MAW, Korfage HAM, Lamers WH. (1993) Distribution and activity of glutamine synthase and carbamoylphosphate synthase upon enlargement of the liver lobule by repeated partial hepatectomies. *J Hepatol* 17:397-407.

Wang X, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M. (2003) The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. *PNAS* 100(Suppl 1):11881-11888.

Wesson RN, Cameron AM. (2011) Stem cells in acute liver failure. *Adv Surg* 45:117-30.

Wilson, Leduc. (1958) Role of cholangioles in restoration of the liver of the mouse after dietary injury. *J Pathol Bacteriol* 76 (2): 441-9 1958.

Yashina IN. (1971) Formation of liver lobules in repeatedly regenerating liver. *Sov J Dev Biol* 2:305–310.

Yoon S, Gerasimidou D, Kuwahara R, Hytioglou P, Yoo JE, Park YN, Theise ND. (2011) Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) marks hepatocytes newly derived from stem/progenitor cells in human. *Hepatology* 53:964-973.

Zhang L, Theise N, Chua M, Reid LM. (2008) The stem cell niche of human livers: symmetry between development and regeneration. *Hepatology* 48(5):1598-607.

Zhao Q, Ren H, Zhu D, Han Z. (2009) Stem/progenitor cells in liver injury repair and regeneration. *Biol Cell* 31;101(10):557-71.

Zou Z, Ekataksin W, Wake K (1998) Zonal and regional differences identified from precision mapping of Vitamin A storing lipid droplets of the hepatic stellate cells in pig liver: a novel concept addressing the intralobular area of heterogeneity. *Hepatology* 27:1098–1108

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

1. Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. Papp V, Dezső K, László V, Nagy P, Paku S. (2009) Architectural changes during regenerative and ontogenic liver growth in the rat. *Liver Transpl.* 15(2):177-83.
2. László V, Dezső K, Baghy K, Papp V, Kovalszky I, Sáfrány G, Thorgeirsson SS, Nagy P, Paku S. (2008) Triiodothyronine accelerates differentiation of rat liver progenitor cells into hepatocytes. *Histochem Cell Biol.* 130(5):1005-14.
3. Dezső K, Paku S, Papp V, Turányi E, Nagy P. (2009) Architectural and immunohistochemical characterization of biliary ductules in normal human liver. *Stem Cells Dev.* 18(10):1417-22.
4. Dezső K, Papp V, Bugyik E, Hegyesi H, Sáfrány G, Bődör C, Nagy P, Paku S. (2012) Structural analysis of oval cell mediated liver regeneration in rats. *Hepatology* doi: 10.1002/hep.25713.

2. Egyéb témában megjelent közlemény

2. Dezső K, Bugyik E, Papp V, László V, Döme B, Tóvári J, Tímár J, Nagy P, Paku S. (2009) Development of arterial blood supply in experimental liver metastases. *Am J Pathol.* 175(2):835-43.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek Dr. Paku Sándornak, valamint Nagy Péter Professzor Úrnak, hogy munkacsoportjukban dolgozhattam.

Köszönöm Prof. Kopper Lászlónak és Prof. Matolcsy Andrásnak, hogy PhD tanulmányaimat az általuk vezetett intézetben folytathattam.

Köszönöm Dr. Zalatnai Attilának az értekezésem bírálatát és annak javítására tett hasznos javaslatait.

Köszönettel tartozom Laczik Cecíliának tanulmányi ügyeim intézésében nyújtott segítségéért.

Köszönöm Dr. Dezső Katalinnak együttműködését, munkám segítségét.

Köszönöm Dr. Krenács Tibornak és a Molekuláris és Digitális Patomorfológiai Laboratórium munkatársainak metszeteink digitalizálását.

Köszönöm az Állatház dolgozóinak kísérleteink megtervezésében és kivitelezésében biztosított nélkülözhetetlen közreműködését.

Köszönöm Dr. Diczházi Csabának baráti és szakmai támogatását.

Hálás vagyok továbbá a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai Intézet munkatársainak, hogy munkám során segítettek és támogattak.

Köszönöm férjemnek, szüleimnek, családomnak és barátaimnak, hogy tanulmányaim során mindvégig mellettem álltak.