

A szomatikus őssejtek forrásául szolgáló kis epeutak részletes jellemzése

Doktori értekezés

dr. Dezső Katalin

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Prof.Dr. Nagy Péter, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr.Lengyel Gabriella, egyetemi adjunktus
Dr.Gonda Gábor, osztályvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Prof.Dr.Kulka Janina, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr.Simon Károly, főorvos
Dr.Nemes Balázs, egyetemi adjunktus

Budapest
2011

TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|---|----|
| I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE | 4 |
| II. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI HÁTTÉR | 6 |
| II.1. A máj mikroanatómiája | 6 |
| II.1.1. Az epeutak és Hering csatornák elhelyezkedése, felépítése a májban | 9 |
| II.2. A szomatikus őssejtek jelentősége | 11 |
| II.2.1. A máj szomatikus őssejtjei..... | 13 |
| II.2.1.1. Az ovális sejtek aktivációjának főbb jellegzetességei –az AAF/PHx modell..... | 16 |
| II.2.1.2. Az ovális sejtek markerei..... | 17 |
| II.2.2. Intrahepatikus progenitor sejtek előfordulása humán májokban | 20 |
| II.2.3. Thy-1, mint ovális sejt marker..... | 22 |
| III. CÉLKITŰZÉSEK | 24 |
| IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK | 25 |
| IV.1. Állatkísérletek | 25 |
| IV.1.1. Állatkísérleti modellek – az AAF/PHx modell | 25 |
| IV.1.2. Az osztódó sejtek jelölése BrdU (brómdeoxiuridin)-val..... | 25 |
| IV.2. Humán minták | 26 |
| IV.3. Morfológiai vizsgálatok | 27 |
| IV.3.1. Immunhisztokémia | 27 |
| IV.3.1.1. Kolokalizációs vizsgálatok | 29 |
| IV.3.2 Elektronmikroszkópos vizsgálatok | 29 |
| IV.3.2.1. Immunelektronmikroszkópia | 29 |
| IV.4. Génexpressziós vizsgálatok..... | 30 |
| IV.4. 1. Lézer mikrodisszekció, RNS izolálás | 30 |
| IV.4. 2. Reverz transzkripció..... | 30 |
| IV.4. 3. Valós idejű kvantitatív PCR | 31 |
| IV.5. Statisztikai analízis | 32 |
| V. EREDMÉNYEK..... | 33 |
| V.1. Az epeutak elrendeződése és immunfenotípusa ép patkány és humán májokban 33 | |
| V.1.1. Az epeutak elrendeződése és citokeratin immunfenotípusa patkánymájban | 33 |
| V.1.1.1. Az epeutak elrendeződése és citokeratin immunfenotípusa ép felnőtt patkány májában..... | 33 |
| V.1.1.2. Az epeutak citokeratin immunfenotípusa különböző korú patkányok ép májában | 37 |
| V.1.1.3. Proliferáló epeút-hámsejtek citokeratin expressziója | 38 |
| V.1.2. A Hering csatornák mikroanatómiája, immunfenotípusa és megoszlása humán májszövetben | 39 |
| V.1.2.1. A Hering csatornák mikroanatómiája ép humán májban..... | 39 |
| V.1.2.2. Az epeutak változása a korrall..... | 42 |
| V.1.2.3. A Hering csatornák immunfenotípusának jellemzése..... | 43 |

| | |
|---|----|
| V.2. Thy-1 expresszió a májban | 46 |
| V.2.1. Ép patkánymáj Thy-1 expressziója | 46 |
| V.2.2. Ép humán máj Thy-1 expressziója | 49 |
| V.2.3. Ovális sejteket tartalmazó patkánymáj Thy-1 expressziója | 50 |
| V.2.4. A Thy-1 expresszió vizsgálata mRNS szinten | 54 |
| V.2.5. Thy-1 expressziója humán májban, atípusos duktuláris reakció esetén..... | 55 |
| VI. MEGBESZÉLÉS | 56 |
| VII. KÖVETKEZTETÉSEK | 63 |
| VIII. ÖSSZEFOGLALÁS | 64 |
| IX. SUMMARY | 65 |
| X. IRODALOMJEGYZÉK | 66 |
| XI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE | 81 |
| XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS | 84 |

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

| | |
|--------|--|
| AAF | – 2-acetaminofluorén |
| AFP | – alfa-fetoprotein |
| BrdU | – brómdeoxiuridin |
| cDNS | – (<i>copy</i>) komplementer dezoxiribonukleinsav |
| CEA | – carcino-embriónális antigén |
| CK | – citokeratin |
| CV | – centrális véna |
| Cy5 | – cianinszármazék |
| DAB | – diaminobenzidin |
| DAPI | – <i>4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride</i> |
| Des | – dezmin |
| DLK | – <i>delta like protein</i> |
| DMBT | – <i>deleted in malignant brain tumors</i> |
| DNS | – dezoxiribonukleinsav |
| EMA | – epiteliális membrán antigén |
| EpCAM | – epiteliális sejtfelszíni molekula |
| ES | – embrionális őssejt |
| FITC | – fluoreszcein izotiocianát |
| GFAP | – <i>glial fibrillary acidic protein</i> |
| HA | – hepatikus artéria |
| HMS | – hepatikus mikrovaszkuláris alegység (<i>subunit</i>) |
| iPS | – indukált pluripotens őssejt |
| Lyve-1 | – <i>lymphatic vessel endothelial receptor 1</i> |
| mRNS | – <i>messenger</i> ribonukleinsav |
| N | – normalitás |
| NIH | – <i>National Institutes of Health</i> |
| OV-6 | – ovális sejt marker |
| panCK | – pancitokeratin |
| PBS | – <i>phosphate buffered saline</i> |

| | |
|---------|---|
| PFA | – paraformaldehyd |
| PHx | – parciális hepatektómia |
| PV | – portális véna |
| QRT-PCR | – <i>quantitative real time polimerase chain reaction</i> |
| RNS | – ribonukleinsav |
| SMA | – simaizom aktin |
| Thy-1 | – <i>thymus cell antigen-1</i> |
| TRITC | – tetrametil rodamin izotiocianát |

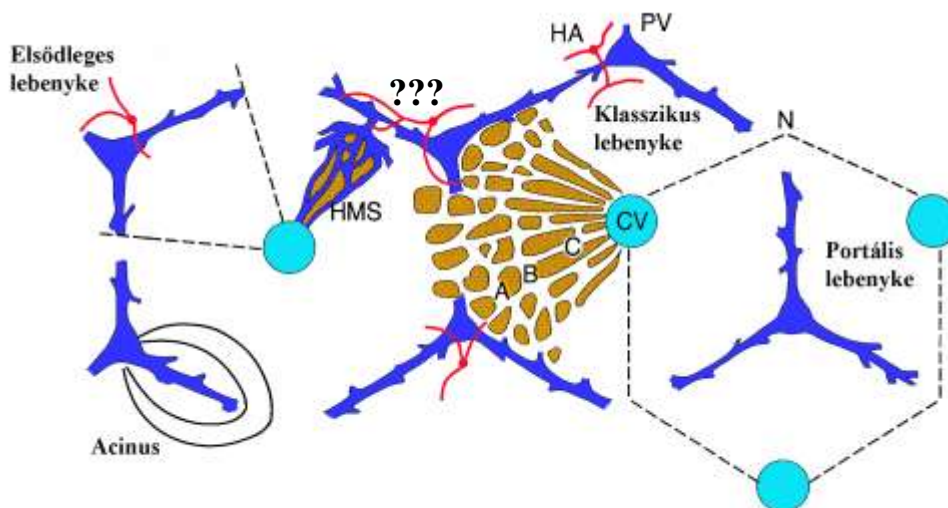
II. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI HÁTTÉR

II.1. A máj mikroanatómiája

A máj látszólag az egyszerűbb szöveti felépítésű szervek közé tartozik, mindössze három alapvető szerkezeti eleme van: (1) a portális vénából, májartériából és interlobuláris epeútból álló portális triász; (2) a centrális vagy hepatikus véna terminális ágai (3) és a két érkeplet között gerendákba rendezett hepatocitákból álló parenchima. Ennek ellenére máig sem sikerült egységesen elfogadott álláspontra jutni arról, hogy mi tekinthető a májszövet elemi funkcionális/strukturális egységének. A megállapodást az is nehezíti, hogy viszonylag jelentős eltérések vannak a leggyakrabban tanulmányozott fajok pl. humán, patkány, egér májának felépítésében is.

A májszövet legnyilvánvalóbbnak tűnő és máig is legtöbbet emlegetett alegysége a lebenyke vagy lobulus.

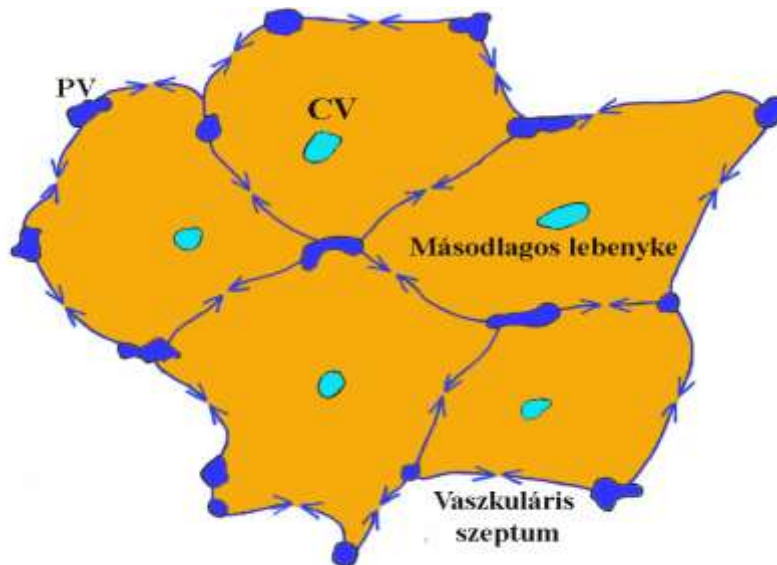
A klasszikus és a portális lebenyket több mint száz éve írták le, szerkezeti és metabolikus sajátságok alapján különítették el. A klasszikus Kiernan – féle májlebenyke (1.ábra) alakja hatszögletű, a szögletekben portális terek, a lebenyke közepén pedig a centrális véna található. A portális vagy Mall – féle lebenyke (1.ábra) központi eleme a portális véna, a szélein pedig a centrális vénák helyezkednek el (McCuskey 1994).



1.Ábra A máj mikroanatómiája-a fontosabb morfofunkcionális alegységek sémás ábrázolásával (PV – portális véna; CV – centrális véna; HA – hepatikus artéria; HMS – hepatikus mikrovaszkuláris alegység) Forrás: McCuskey 1994.

1954-ben Rappaport a máj mikrocirkulációja alapján javasolta az acinusnak, mint hepaticus alegységnek az elfogadását. A nagyjából rögbilabda alakú acinus (1.ábra) tengelyében található erek (terminális portális véna és vélhetően a májartéria ágai) körül a parenchima 3 zónája különíthető el, amiket viszonylag elektíven érintenek különböző kórfolyamatok.

1979-ben Matsumoto és munkatársai két humán máj angiográfiás és sorozatmetszetből történt rekonstrukciós vizsgálataik alapján azt állapították meg, hogy a klasszikus lebenykék határzónájában egy erekben igen gazdag, általuk vaszkuláris szeptumnak nevezett képlet alakul ki (2.ábra). Ennek megfelelően a májlebenyke zónái, szöges ellentétben a Rappaport féle acinus zónáival, kör alakban a centrális véna körül helyezkednek el. A vaszkuláris szeptum biztosítja a májlebenyke nagyjából egyenletes vérrellátását, ez különösen fontos, ugyanis a humán májban nincsenek anasztomózisok a portális véna és a májartéria ágrendszere között. A vaszkuláris szeptum tehát egy kötőszövetmentes, ereket (portális véna ágai) és epeutakat (Hering csatorna és epeduktulus) magába foglaló virtuális határzóna (Saxena és mtsai 1999, Teutsch és mtsai 1999, Teutsch 2005).



2.Ábra A másodlagos vagy klasszikus lebenyke és a vaszkuláris szeptum sémás ábrázolása (PV – portális véna; CV – centrális véna); Forrás: Teutsch és mtsai 1999

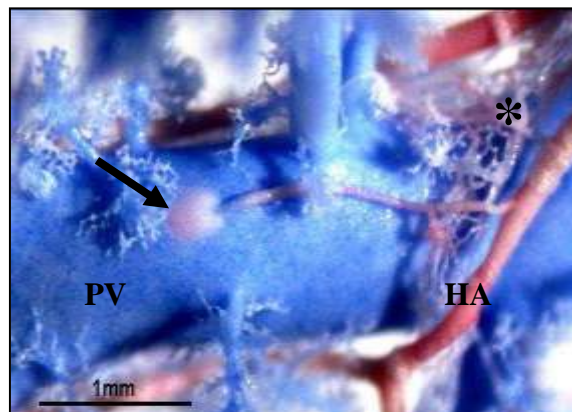
A klasszikus lebenykét ők szekunder lobulusnak (másodlagos lebenyke) nevezték, ami 6-8 tölcser alakú „primer lobulusból” vagy elsődleges lebenykekből (1.ábra) épül fel. A

tölcser alapját a két szomszédos terminális portális vénaág (portális venula) közötti vaszkuláris szeptum, csúcsát pedig a hozzájuk tartozó centrális vénaág alkotja.

Ekataksin és Wake főként sertés májából készült korróziós készítményeken tett pásztázó elektronmikroszkópos megfigyeléseik nyomán, egy a Matsumoto-féle primer lobulussal csaknem megegyező szerkezeti egységet definiáltak, mikrovaszkuláris alegység (HMS- hepatic microvascular subunit) néven (1.ábra). A HMS egy portális venula és a hozzá tartozó, általa ellátott szinuszoidokból épül fel (Ekataksin és Wake 1991).

A HMS és a területéhez tartozó májsejtek valamint Hering csatorna együttesen alkotják a „choleohépaton”-t, ami talán a legáltalánosabban elfogadott morfológiai-funkcionális elemi egysége a májszövetnek.

Lényeges szerkezetbeli különbség, hogy patkány- és egérmájban nincs vaszkuláris szeptum, a másodlagos lebenyke szélén elhelyezkedő szinuszoidok speciális elrendeződése biztosítja a portális véna által szállított vér egyenletes elosztását a lebenyke területén. Az artériás vér továbbítását a portális rendszer és a májartéria ágai között létrejövő rengeteg anasztomózis (3.ábra) teszi lehetővé (Teutsch és mtsai 1999).



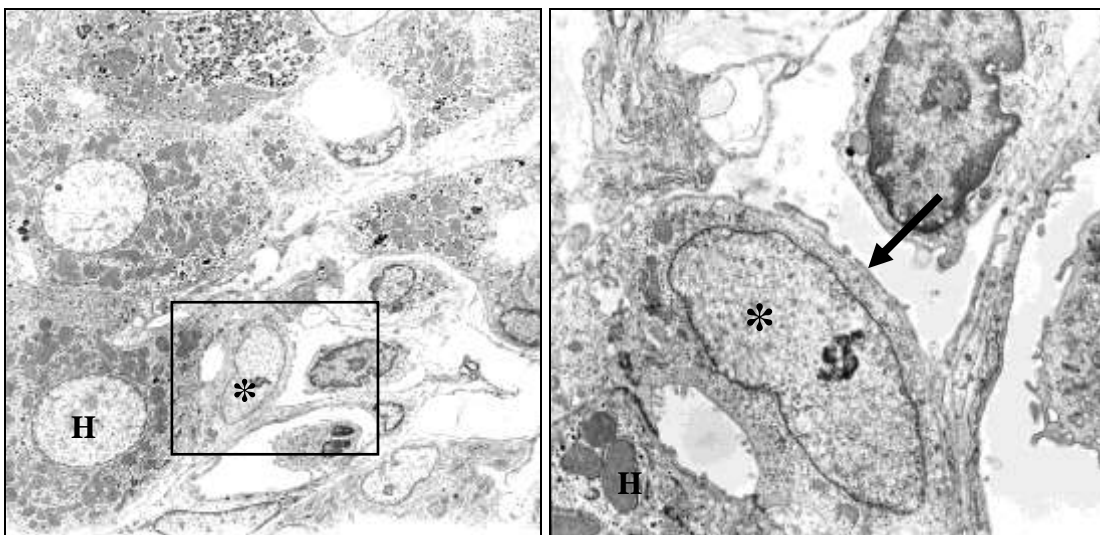
3.Ábra Ép.kontrol patkánymáj portális és artériás érrendszere

A májartéria (HA) piros -, illetve a portális vénaágak (PV) kék színű műgyantával való feltöltése után láthatóvá válik a peribiliáris kapilláris plexus (*) illetve a májartéria egy ága és a portális véna közötti anasztomózis (nyíl) is.

II.1.1. Az epeutak és Hering csatornák felépítése, elhelyezkedése a májban

A májsejtek által termelt epe összegyűjtéséről, elvezetéséről szintén összetett csatornahálózat gondoskodik. A hepatociták az epét a két szembenálló hepatocita membránjának betüremkedésével alkotott epekapillárisba vagy epekanalikulusba választják ki szigorúan polarizált elrendeződésű transzport molekuláik segítségével. Az epekanalikulusok az egész parenchimát behálózó rendszert alkotnak, melyen keresztül az epe eléri a májlebenyke széli területét. A parenchimában termelt epe a portális triászok tagját képező interlobuláris epeutakban gyűlik össze. Az epekanalikulusok és az interlobuláris epeutak közötti összeköttetést már közel sem egyértelműen jellemzett képletek, a leírójukról elnevezett ún. Hering csatornák vagy epeduktulusok biztosítják.

Ewald Hering 1867-ben (Hering 1867) berlini-kék festék májbeli kiválasztását tanulmányozva figyelt meg kapcsolatot a kanalikulusok rendszere és az epeduktulusok között. A további vizsgálatokat jelentősen hátráltatta, hogy ezek a képletek nem voltak egyértelműen azonosíthatóak hagyományos mikroszkópos vizsgálatokkal. Bár a múlt század első felében született néhány rájuk vonatkozó tanulmány, ezek azonban sem a leírásban, sem a terminológiában nem voltak egységesek (Letulle 1915, McIndoe 1928, Clara 1930, Elias 1949).



4.Ábra A periportális térben elhelyezkedő Hering csatorna elektronmikroszkópos képe patkánymájban. A fekete kerettel jelölt terület részletesebb képe látható a második ábrán, ahol a saját bazális membránnal rendelkező (nyíl), a Hering csatornát alkotó egyetlen epeút-hámsejt (*) a zárólemezke májsejtjéhez (H) csatlakozik.

Szerkezetükről az elektronmikroszkópia elterjedését követően egyre többet tudtunk meg. Általában rövid, néhány sejt hosszúságú képződményként írták le őket a portális mezők szélén. Alkotásukban közösen vesznek részt hepatociták és kolangiocitaszerű sejtek (4.ábra), közöttük sejtkapcsoló struktúrák alakulnak ki. Körülöttük folyamatos bazális membrán (U alakú) található (Philips 1987), a sejtek mikrovillusai pedig a lumenbe nyúlnak, ami valamivel tágasabb, mint a kanalikulusé.

A Hering csatornák tanulmányozása egészen a múlt század végéig, a májra vonatkozó szerkezeti és funkcionális vizsgálatok legelhanyagoltabb területei közé tartozott, míg fel nem merült annak a lehetősége, hogy a Hering csatornákat alkotó sejtek bizonyos körülmények között májbeli összejtéként képesek viselkedni (Theise és mtsai 1999, Saxena és Theise 2004). Ez esetben ez az epeút-szakasz lenne a hepatikus összejtek fenntartását és aktivizálódását biztosító összejt „fészek” vagy közismertebb nevén „niche”. Ezt követően nagyobb figyelem fordult erre a területre. Ezeket a képleteket fénymikroszkópos szinten azonban változatlanul csak a pozíciójuk alapján lehetett felismerni és semmilyen jellegzetes markerüket nem sikerült azonosítani. Jelölésükre többnyire az „epeút specifikus” intermedier filamentumokat, a citokeratin 7-et, vagy 19-et alkalmazták, melyek valóban szépen megfestik ezeket a szűk lumenű vagy gyakran fénymikroszkópos szinten lumennel nem rendelkező képleteket, de a nagyobb epeutaktól való elkülönítésükre alkalmatlanok. Saxena és Theise (2004) humán májon végzett szövettani vizsgálattal citokeratin pozitív epeutakat figyeltek meg a májlebenyékén belül, sorozatmetszeteken ezek folytonos kapcsolata kimutatható volt a periportális térrel, igazolva a Hering csatornák betérését a májparenchimába.

A Hering csatornák tehát az epekapillárisoktól egy teljes mértékben epeút hámsejtek által határolt csatornába, az epeduktulusba vezetnek. Az epeduktulusok a portális terek szélétől az interlobuláris epeutak felé tartanak. Ezek a képletek lefutásuk során elágazódhatnak, elnevezésüket szerkezeti felépítésük (teljesen vagy részlegesen határolt epeút-hámsejtek által) és elhelyezkedésük határozza meg. Az epeutak vérellátását a májartéria ágai biztosítják, gazdag, gyakran több rétegű érhálózatot (peribiliáris vaszkuláris plexust) alkotva a nagyobb képletek körül. A legkisebb epeutak artériás vérellátását illetően megoszlanak a vélemények, peribiliáris vaszkuláris plexus biztosan nem található körülöttük (Saxena és mtsai 1999).

II.2. A szomatikus őssejtek jelentősége

Napjainkban az őssejtek vizsgálata az orvosbiológiai kutatások legdivatosabb területei közé tartozik. Ha sikerülne megtanulnunk megbízhatóan szabályozni az őssejtek osztódását és differenciálódását, az számos orvosi probléma megoldásához jelentene kulcsot. Nincs ez másként a hepatológia területén sem. Az őssejtektől remélik a megoldást a fulmináns májelégtelenség kezelésére csakúgy, mint számos öröklődő anyagcserebetegség génszabályozási módszerrel történő gyógyításához.

Meglepő módon, az őssejtkutatás óriási elterjedtsége ellenére máig sem rendelkezünk az őssejtek egyértelmű, általánosan elfogadott definíciójával. Abban azonban teljes az egyetértés, hogy az őssejtek alapvető tulajdonsága az önmegújító (self reproduction) képesség. Ez általában aszimmetrikus osztódás révén valósul meg. Az egyik utódsejt pótolja a felhasznált őssejtet, míg a másik elindul a differenciálódás útján (Potten és Loeffler 1990).

A differenciálódási képességük alapján az őssejteknek több típusa különíthető el. A legszélesebb differenciálódási potenciállal a megtermékenyített petesejt rendelkezik, ami totipotens, azaz valamennyi embrionális és extraembrionális sejt/szövetféleség irányába képes differenciálódni.

Az embrionális őssejtek (ES) – a blasztociszta (hólyagcsíra) belső rétegéből származnak. Pluripotensek, belőlük a szervezetben található összes sejt típus létrejöhet (Rossant 2007).

Differenciálódási spektrumukat tekintve az embrionális őssejtekhez hasonló képességekkel rendelkeznek az indukált pluripotens őssejtek (iPS). Ezek szomatikus sejtekből, transzkripciós faktorok jól meghatározott csoportjának a segítségével, mesterségesen előállított őssejtek. Létezésük egyértelmű bizonyíték arra, hogy a differenciált sejtek genetikai állománya újraprogramozható, és ezzel a korábban véglegesen lezártak hitt differenciálódási képességek aktivizálhatóak. Ezzel kapcsolatos gyakorlati jelentőségük is. Ezzel a módszerrel elvileg akárkiből előállíthatóak a klinikai alkalmazáshoz szükséges differenciálódási képességekkel rendelkező őssejtek, kiküszöbölve a más egyedből származó embrionális őssejtek alkalmazása esetén felmerülő immunológiai problémákat. Az első indukált pluripotens

őssejteket fibroblasztokból állították elő, de azóta ez már egyéb sejtípusokból (pl. hepatocita, gyomor nyálkahártya hámsejtjei) is sikerült (Hankowski és mtsai, 2011).

Az adult vagy szomatikus őssejtekre a differenciálódási potenciál jelentős beszűkülése jellemző. Ezek a sejtek már meghatározott szövetekben (csontvelő, epidermisz, Lieberkühn kripta) találhatóak és az illető szövetek pusztuló sejtjeinek mindenkori pótlása, károsodásuk esetén pedig a regeneráció a feladatuk (Reyes és Verfaillie 2001).

Az ezredforduló tájkának egyik legnagyobb orvosbiológiai szenzációja volt a szomatikus őssejtek „plaszticitásának” felfedezése. Ez azt jelenti, hogy a különböző szövetek szomatikus őssejtjei spontán vagy bizonyos manipuláció hatására egyéb szövetfélések sejtjeivé, olykor a korábban átjárhatatlannak hitt csíralemez határokat is átlépve, képesek transzdifferentiálódni (Forbes és mtsai 2002). A megfigyelt jelenségek jelentős része később műterméknek bizonyult, de az esetek egy részében úgy tűnik, hogy a szomatikus őssejtek valóban rendelkeznek bizonyos plaszticitással.

A máj közismerten kiváló regenerációs képességgel rendelkezik, tömege jelentős részének elvesztését is képesek pótolni a differenciált hepatociták. Ebből kiindulva sokan úgy gondolták, hogy a májnak „nincsen szüksége” őssejtekre. Az utóbbi két évtized eredményei alapján azonban ma már általánosan elfogadott, hogy a máj is rendelkezik saját, szomatikus őssejtekkel, melyek nem vesznek részt a mindennapi sejtvesztés pótlásában, ezért gyakran nevezik őket fakultatív őssejtnak (Grisham 1980).

II.2.1. A máj szomatikus őssejtjei

A máj őssejtjeinek kutatása egészen az 1930-as évekig nyúlik vissza. Patkányokon végzett kémiai hepatokarcinogenezis kísérletekben Kinoshita figyelt fel először egy új, „őssejtszerű”, a májban található, differenciálódásra képes sejtpopuláció jelenlétére (Kinoshita 1937). Később egérmájban is megfigyeltek „indifferens” epeúthámsejteket, szerepet tulajdonítva nekik a regenerációban (Wilson és Leduc 1958). Mérföldkövet jelentett Farber megfigyelése, amely szerint különböző vegyületekkel indukált hepatokarcinogenezis modellekben kis, primitív epiteliális sejtek szaporodtak fel a periportális régióban. Ezek a sejtek fénymikroszkóppal 12-15 µm nagyságúak, keskeny citoplazmával rendelkeznek, jellegzetes formájú sejtmagjukról pedig ovális sejteknek nevezték el őket (Farber 1956).

Később 3'-methyl-4-dimethylamino azobenzennel előidézett karcinogenezis folyamat során elektronmikroszkóppal megfigyelték (Inaoka 1967, Ogawa és mtsai 1974) az ovális sejtek májsejtté történő átalakulását. Megállapították, hogy ez az átalakulás számos köztes sejtfórman keresztül valósul meg a súlyos és elhúzódó májsejtkárosodás után.

Watabe már 1971-ben a szérumban átmenetileg megemelkedett alfa-fetoprotein (AFP) szintet tapasztalt az ovális sejtek proliferációja során (Watabe 1971), de ezen sejtek AFP pozitivitását csupán később mutatták ki immunfluoreszcens és autoradiográfias módszerekkel (Dempo és mtsai 1973, Uriel és mtsai 1973). Az AFP egy úgynevezett onkofetális marker, ami jelen van az embrionális májban és a májrakok egy részében, jelenléte az ovális sejtekben ezekkel a sejtpopulációkkal való potenciális kapcsolat lehetőségére utal (Sell 1978).

Aztán az évek során számos egyéb karcinogenezis és daganatképződéssel nem járó kísérleti rendszerben tett megfigyelés igazolta, hogy a primitív ovális sejtek képesek hepatocitákká differenciálódni (Evarts és mtsai 1987). Mára elegendő bizonyíték áll a rendelkezésünkre ahhoz, hogy kijelenthessük, az ovális sejtek a májőssejtek leszármazottjai, és azok amplifikációs kompartmentjeként viselkednek.

A következő kérdés tehát, hogy honnan származnak az ovális sejtek, hol találhatóak az őssejtek a májszövetben.

Az ovális sejtek alkotta csövek kivétel nélkül, minden kísérleti rendszerben a periportális területéről indulnak ki, így az őssejtek eredetére vonatkozó kutatások többsége, ebben a régióban elhelyezkedő képleteket jelölt meg. Egyesek szerint valamennyi epeút-hámsejt képes őssejtként viselkedni, de legalábbis az epeutakban találhatóak ezek a nagyon primitív sejtek (Kuwahara és mtsai, 2008). Mások szerint az epeutak bazális membránján kívül elhelyezkedő ún. „null sejtek” vagy akár a peribiliáris, epeutak szomszédságában található májsejtek is lehetnek az őssejtek (Sell 2001).

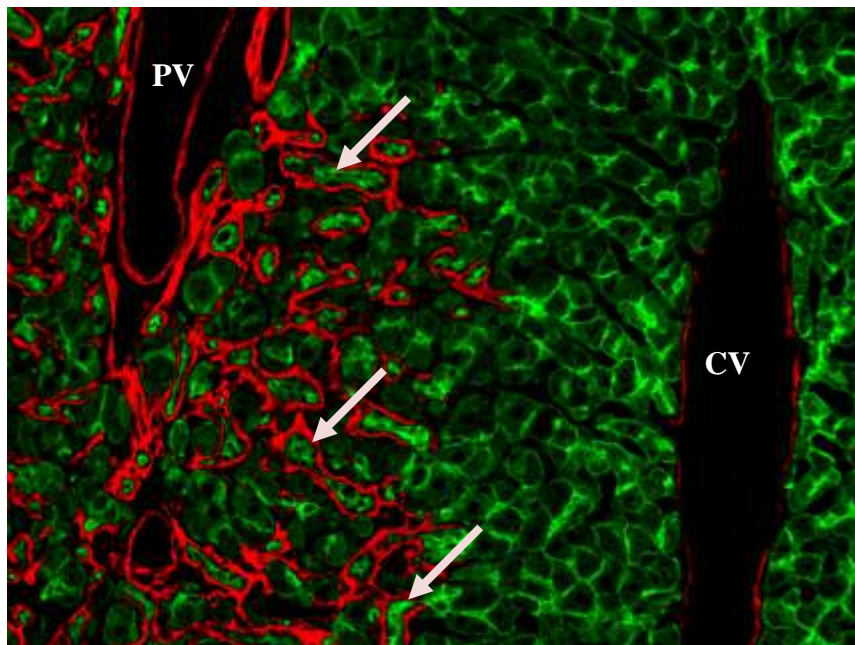
Az ezredforduló táján merült fel az a lehetőség, hogy egyéb szövetekhez hasonlóan a májsejtek pótlásáról is a keringés útján a májba kerülő hemopoetikus/mezenchimális vagy egyéb multipotens őssejtek gondoskodnának. Az ilyen irányú vizsgálatok végül arra a konszenzusra vezettek, hogy bár nem zárható ki a más szövetekből származó őssejtek részvétele a hepatociták pótlásában, ennek gyakorisága igen csekély és valószínűleg nincsen gyakorlati jelentősége (Thorgeirsson és Grisham 2006). A figyelem ismét a májbeli őssejtekre összpontosult. Funkcionális vizsgálatok nem zárják ki annak lehetőségét, hogy a májban különböző sejtpopulációk is képesek őssejtként viselkedni (Theise és Kuwahara 2007, Kuwahara és mtsai 2008), de a Hering csatornákat felépítő sejtek szinte minden vizsgálatban szerepelnek a potenciális őssejtek között. Bár egészen pontosan nem sikerült igazolni a Hering csatornát felépítő sejtekben az őssejtekkel szemben támasztott elvi kritériumok meglétét (önmegújulás, aszimmetrikus osztódás), különböző funkcionális vizsgálatok alapján ma általánosan elfogadott nézet, hogy ezek a sejtek felelnek meg a máj szomatikus (szöveti/adult) őssejtjeinek. Differenciálódási potenciáljuk beszűkült, de egyértelműen bizonyított, hogy legalább két irányba, hepatocitákká és epeút hámsejteké képesek átalakulni. A máj őssejtjeiből származó progenitor sejtek (patkánymájban az ovális sejtek, humán májokban az intermedier hepatobiliáris sejtek) osztódási aktivitása magas, ezért szokták őket az őssejtek amplifikációs kompartmentjének is hívni. Kóros differenciálódásuk eredményeként a májban gyakran megfigyelhetők intesztinális típusú mirigyek is.

A legtöbb egyéb tanulmányozott őssejttől eltérően a májbeli őssejtek fakultatív őssejtek: nem vesznek részt a máj mindennapi megújulásában, sőt olykor a regenerációban sem.

A máj őssejtrendszer csak akkor aktiválódik, ha a májsejtek olyan károsodást szenvednek, hogy nem képesek hatékonyan részt venni a regenerációban.

II.2.1.1. Az ovális sejtek aktivációjának főbb jellegzetességei –az AAF/PHx modell

Az egyik leggyakrabban alkalmazott és széles körben elfogadott, ovális sejtek proliferációjával járó vizsgálati modell patkányban a 2-acetilaminofluorén kezelés 70 %-os parciális hepatektómiával kombinálva (AAF/PHx) (Tatematsu és mtsai 1987). Az AAF a hepatocitákban N-hidroxi-2-acetilaminofluorénné metabolizálódik, és a DNS-hez kötődve megakadályozza a májsejtek osztódását, emiatt ezek képtelenek reagálni a parciális hepatektómia által indukált proliferatív stimulusra. Így aktiválódnak a Hering csatornákat felépítő őssejtek és a máj az ovális sejtek részvételével regenerálódik. A parciális hepatektómia után BrdU beépüléssel az első DNS-t szintetizáló – osztódó sejtek a Hering csatornában figyelhetőek meg (Paku és mtsai 2001). Két-három nappal a műtét után az ovális sejtek már hagyományos, HE festett metszeteken is felismerhetőek, csőszerű képleteket hoznak létre, amelyek folytonos laminin pozitív alaphártyával rendelkeznek. A periportális területről indulnak ki, fokozatosan terjednek a májlebenyke belseje felé (5.ábra), tulajdonképpen a Hering csatornák meghosszabbításának felfogható képletek. Kialakulásuk során tehát az epe elvezetése az epekanalikulusokból az interlobuláris epeutak felé folyamatosan biztosított.



5.Ábra Patkánymáj pancytokeratin (zöld) laminin (piros) festése AAF/PHx kísérlet során, PHx után 10 nappal. A periportális terektől a pancytokeratinnal élénken festődő, folytonos laminin pozitív bazális membránnal rendelkező, ovális sejtek alkotta csövek (nyílak) fokozatosan terjednek a májlebenyke belseje felé. A májlebenyket alkotó hepatociták szintén pancytokeratin pozitívak. PV – portális véna; CV – centrális véna

Az ovális sejtek alkotta duktusok szoros kapcsolatban állnak egy különleges sejtpopulációval, ezeket a sejteket szokták alakjukról „stellate” sejteknek is nevezni. (Paku és mtsai 2001, Kiss és mtsai 2001, Thorgeirsson és Grisham 2002). Ép májban a periszinuszoidális Disse térben elhelyezkedő „stellate” sejtek a regeneráció során felszaporodnak és az ovális sejtek alkotta csövek körül fonatszerű hálózatot formálnak. A „stellate sejtek” pontos szerepéről megoszlanak a vélemények, az azonban bizonyosnak látszik, hogy számos, a regenerációhoz szükséges növekedési faktort termelnek (Everts és mtsai 1990).

Az AAF/PHx kísérleti modell későbbi fázisában az ovális sejtek egy része vagy hepatocitává vagy epeút hámsejtté differenciálódik, a többiek nagy valószínűséggel apoptózissal pusztulnak el, a kísérlet kezdetétől számított 4-6 hét alatt pedig a máj eredeti tömege és szerkezete csaknem tökéletesen regenerálódik (Fausto és mtsai 2006).

II.2.1.2. Az ovális sejtek markerei

Felnőtt egészséges állatok májában az őssejteknek otthont adó Hering csatornák bizonyossággal csak elektronmikroszkóppal azonosíthatóak. Felismerésüket, vizsgálatukat jelentősen megkönnyítené egy specifikus antigén jelenléte. A belőlük származó ovális sejteket sokkal jobban jellemezték, és felmerül az a lehetőség, hogy valamelyik ovális sejt marker alkalmas lehet az ép Hering csatornák azonosítására is. Az ovális sejtek az embrionális és felnőtt májsejtekre, az epeút hámsejtekre, csontvelői őssejtekre és neuroendokrin sejtekre jellemző markerek széles skáláját expresszálják. Immunfenotípusukat tekintve azonban bizonyos heterogenitás figyelhető meg közöttük (Jelnes 2007, Bisgaard és mtsai 2002). Az ovális sejteket legrészletesebben patkányokban jellemezték, a leggyakrabban alkalmazott markereket az 1.táblázat foglalja össze. Az ovális sejtek azonosítására patkányok májában legelterjedtebben különböző epeút hámsejtekre jellemző markereket használnak, mint például a citokeratin 7 és 19 altípusok. Az igen széleskörűen használt ovális sejt marker, az OV-6 működése szintén citokeratin altípusok (14 és 19) felismerésén alapul (Dunsford és Sell, 1989). Hasonló sejteket jelölnek a sejtfelszíni EpCAM molekulát felismerő antitestek (Yovchev és mtsai 2007). Mindezeknek a markereknek közös hátránya, hogy az ovális sejteken kívül az ép és ovális sejt proliferációval járó májakban is valamennyi epeút

hámsejttel reagálnak éppen ezért nem alkalmasak az ovális sejtek és epeutak, valamint a Hering csatornák és nagyobb epeutak elkülönítésére.

1.Táblázat Az állatkísérletek során általánosan használt progenitor (ovális) sejt markerek (Dollé és mtsai 2010)

| | |
|--|---|
| Epeút hámsejtekkel közös markerek | Citokeratin (CK) 19, CK14, CK7 OV-6 (CK14 és CK19 elleni antitest) Izom piruvát kináz (MPK), Glutation-S transzferáz P (GST-P) γ -glutamil-transzpeptidáz (γ -GT) A6; OC(2, 3, 4, 5,10) egérben használt marker OV-1 (EpCAM); MUC-1(EMA) c-met CD133 (prominin-1); CD117 (ckit) Connexin 43 CD24; CD26; CD49f |
| Fetális májsejtekkel közös markerek | alfa-fetoprotein (AFP) Izom piruvát kináz (MPK) Glutation-S transzferáz P (GST P) Delta-like protein (DLK) γ -glutamil-transzpeptidáz (γ -GT) c-Met, Aldolase A és C |
| Felnőtt májsejtekkel közös markerek | Albumin α 1-antitripszin CK8 és CK18 ABCG2 és E-cadherin |
| Hemopoetikus sejtekkel közös markerek | CD90, Sca-1 c-kit CXCR4 CD34 Flt-3 |
| Neuroendokrin sejtekkel közös markerek | CD90 (Thy-1) Chromogranin A PTHrP CD56 és Neurotrophin receptor |
| Más progenitor sejtekkel közös markerek | TROP2 és a Connexin 32 |

Patkányban jelenleg két olyan fehérje ismert, ami felnőtt májban az epeutak hámsejtjeiben nincs jelen és csak az ovális sejtekben termelődik. Az egyik az AFP, ami patkánymájban a leginkább elfogadott ovális sejt marker. A különböző kísérleti modellekben leírt aktiválódott őssejtek AFP-t termelnek (Smith és mtsai 1996, Evarts és mtsai 1989, Bisgaard és mtsai 1994). Az AFP mRNS-e az AAF/PHx kísérleti rendszerben nagyon korán, már néhány AAF kezelést követően kimutatható az aktiválódott kis epeutakban, az ép májszövetben azonban nem detektálható, tehát nem alkalmas a Hering csatornák azonosítására (Bisgaard és mtsai 1996, Knight és mtsai 2000, Paku és mtsai 2004).

A másik, ovális sejteken azonosított fehérje a „delta-like protein” (DLK) (Tanimizu és mtsai 2004, Jensen és mtsai 2004). A DLK a Notch receptorok ligandjával szolgáló, delta fehérjéhez hasonló szerkezetű I-es típusú transzmembrán molekula, mely számos szövetben expresszálódik, emellett más szervek progenitor sejtjeinek szabályozásában is részt vesz (pl. adipogenezis, hemopoézis, mellékvesekéreg zonális differenciációja) (Smas és Sul 1993, Bauer és mtsai 1998, Moore és mtsai 1997, Halder és mtsai 1998).

Az ovális sejtek mediálta regeneráció során a DLK, az AFP-hez hasonlóan, heterogén megoszlást mutat az ovális sejtekben. A két fehérje megoszlásában további hasonlatosság, hogy gyakrabban vannak jelen a portális területektől távolabbi, perifériás ovális sejtekben. A DLK fehérje azonban szintén nem mutatható ki az ép májszövetben, tehát alkalmatlan a Hering csatornák azonosítására (Tanimizu és mtsai 2003, 2004, Jensen és mtsai 2004).

II.2.2. Intrahepatikus progenitor sejtek előfordulása humán májakban

Az ovális sejteket már részletesen jellemezték rágcsálók májában, amikor az ezeknek megfelelő sejtek immunfenotípusa az emberi májban még teljesen ismeretlen volt.

A duktuláris reakciót humán májakban Popper írta le először 1957-ben (Popper 1957). Aztán Poulsen és Christoffersen 1969-ben, vírus hepatitiszben (Poulsen és Christoffersen 1969), különös, a normális epeút-hámsejtektől némileg eltérő szerkezetű epiteliális sejtek periportális proliferációját figyelte meg. Később számos májváltozásban figyeltek meg hasonló szöveti reakciót: az extrahepatikus epevezeték akut vagy krónikus elzáródása, primer biliáris cirrózis, kolesztázis, alkoholos májbetegség, májnekrózis utáni regeneráció, α -1-antitripszin hiány és Wilson-kór stb. „epeút proliferációval”, duktuláris képletek megjelenésével jár, amit konszenzus alapján, újabban egységesen duktuláris reakciónak neveznek az emberi májszövetben.

A duktuláris reakciót alkotó, epeduktulusokhoz hasonló fenotípusú, de nem feltétlenül duktulus eredetű elváltozások igen színes, heterogén csoportot alkotnak, osztályozásuk, osztályozhatóságuk napjainkban is megoldatlan (Turányi és mtsai 2010, Nagy és Schaff 2004, Sell 1998, Roskams és mtsai 2004).

Az ovális sejtes proliferációval teljesen megegyező szöveti reakciót emberi májban még nem sikerült megfigyelni, éppen ezért az „ovális sejt” vagy „ovális sejtekhez hasonló” kifejezés használata humán máj esetében kerülendő, helyette az intermedier hepatobiliáris sejt elnevezés ajánlott (Roskams és mtsai 2004). Azonban számos megfigyelés támasztja alá, hogy például az úgynevezett atípusos duktuláris reakció sejtjei, ha morfológiailag eltérőek is az ovális sejtektől, biológiailag azokkal ekvivalensnek tekinthető (Sell 1998, Roskams és mtsai 2003, Kiss és mtsai 2001, Roskams és Desmet 1998). Az atípusos duktuláris reakció számos májbetegségben megfigyelhető, legjellemzőbb formája a májnekrózist követő regeneráció során fordul elő. Ez a típusú duktuláris reakció periportálisan elhelyezkedő, jól körülhatárolható, szűk lumenű csövecskékből áll. A duktusokban olykor előfordulnak hepatocitákra emlékeztető sejtek is, melyek miközben bizonyos májsejtekre jellemző markereket kezdenek expresszálni, fokozatosan elveszítik az epeút hámsejtekre jellemző

tulajdonságaikat, a differenciáció köztes fázisát képviselve (Haque és mtsai 1996, Fiel és mtsai 1997). A ductusok kapcsolata Hering csatornákkal gyakran megfigyelhető, (Roskams és mtsai 2004, Falkowski és mtsai 2003) ami arra enged következtetni, hogy a Hering csatornákat felépítő sejtek humán májokban is képesek összejtéként viselkedni és bizonyos körülmények között pótolni az elpusztult májparenchimát.

A rágcslók ovális sejtjeihez hasonlóan az intermedier hepatobiliáris sejtek is expresszálnak májsejtekre, epeút háms sejtekre, neuroendokrin sejtekre és hemopoetikus őssejtekre jellemző markereket, de azoktól eltérően nem termelnek AFP-t (Roskams és mtsai 2003, 2004) és Dlk-1 sem mutatható ki bennük (Jensen és mtsai 2004). A ductuláris reakciók regeneratív értékéről kevés információval rendelkezünk. Jelezve a májfunkciók helyreállításához szükséges regenerációs folyamatok elégtelenségét, ez a típusú szöveti reakció legtöbbször boncoláskor vagy transzplantáció során eltávolított májokban figyelhető meg. Éppen ezért az őssejtek közvetítésével zajló regeneráció hatékonyságáról és a májműködés helyreállításáról kevés közlemény számol be, de néhány jól dokumentált esetben egyértelműen megfigyelhető volt a máj regenerációja a ductuláris reakció segítségével, azaz, a hepatikus progenitor sejtekből (Fujita és mtsai 2000). Érdemes tehát ezzel a rendszerrel foglalkozni, mert hatékonyságának fokozásával klinikailag is hasznosítható eredményekhez lehet esetleg jutni.

II.2.3. Thy-1, mint ovális sejt marker

A transzdifferentiáció tanulmányozása során a különböző csontvelői őssejtmarkerek jelenlétét fokozott érdeklődéssel vizsgálták az őssejtmediált májregeneráció kapcsán megjelenő ovális sejtek felszínén. Ezek egyike a Thy-1 (Thymus cell antigen-1 vagy CD 90), mely 110 aminosavból álló, a sejt felszínén található glikoprotein, a sejtmembránhoz foszfatidilinozitol által kötődik. Pontos funkciója nem ismert, szerepet tulajdonítanak neki többek között a szignál transzdukcióban, sejtadhézióban, sejtproliferációban és a T sejt aktivációban, befolyásolja a sebgyógyulást és a fibrózist is.

Expresszióját számos sejt típuson leírták. Az irodalomban számos cikket lehet találni Thy-1 pozitív endotél sejtekről, de leírtak már Thy-1 pozitív fibroblasztokat és dendritikus sejteket is. Ligandját a legtöbb sejt típus esetében még nem ismerik, az endotél sejteken a Thy-1 receptor ligandja a melanóma sejtek $\alpha v \beta 3$ integrinje, illetve a leukocitákon jelen levő $\alpha X \beta 2$ és $\alpha M \beta 2$ integrin (Rege és Haggood 2006). Szolubilis formában való előfordulása a szérumban, illetve az ízületi folyadékban jól ismert, azonban a „vedlési” (shedding) folyamatáról nem sokat tudunk (Bradley és mtsai 2009). Szerepet van a neuronok érésében, ezen kívül a Thy-1 széles körben használt mezenchimalis (Timper és mtsai 2006, Boiret és mtsai 2003) és nem utolsósorban hemopoetikus őssejt marker is.

Petersen és munkatársai 1998-ban írták le, hogy a hemopoetikus sejteken jelenlevő Thy-1 antigén kimutatható az ovális sejteken is, ezzel is alátámasztva a májőssejt csontvelői eredetét. Kísérleteikben az ép patkánymáj Thy-1 negatívnak bizonyult, az ovális sejtek azonban Thy-1 és CK19 pozitívak voltak (Petersen és mtsai 1998). A vizsgált ép patkánymáj epeút-hámsejtjei nem jelölődtek a Thy-1 ellen termelt antitestekkel, ráadásul az összes eddig leírt „ovális sejt markerrel” szemben a Thy-1 sejt felszíni antigén, ezért immunsavóval történő jelölés után lehetőség nyílik az expresszáló sejtek áramlási citometriás módszerrel történő izolálására. Ezen tulajdonságok miatt a Thy-1 rövid idő alatt nagyon népszerű és széleskörűen alkalmazott ovális sejt markerré vált. (Petersen és mtsai 1999, Oh és mtsai 2007). Többek között leírták májból izolált Thy-1 pozitív sejtek hepatocita irányú

differenciálódását, továbbá humán és patkány fetális májban is kimutatható volt az antigén (Fiegel és mtsai 2003).

Később azonban megjelentek olyan közlemények is, melyek ellentmondásban voltak a fentebb vázolt eredményekkel.

Hoppo és munkacsoportja leírja, hogy *in vitro*, a progenitor sejtek érését egérmájából izolált Thy-1 pozitív mezenchimális sejtek segítik. Kísérleteikben a Thy-1 pozitív sejtek dezmint, vimentint és alfa simaizom aktint is expresszáltak (Hoppo és mtsai 2004). Kamo és munkatársai szintén Thy-1 pozitív mezenchimális sejtekről számolnak be és a progenitor sejtek érésében betöltött szerepüket vizsgálták (Kamo és mtsai 2007). Masson és munkatársai 2006-ban Thy-1-et és CD45-öt expresszáló sejteket izoláltak fetális májból (Masson és mtsai 2006), ez pedig megkérdőjelezi a Thy-1 pozitív sejtek epiteliális természetét.

Az ellentmondó eredmények az ovális sejtek Thy-1 pozitivitásáról további vizsgálatokat tesznek szükségessé a Thy-1 pozitív sejtek pontosabb azonosítása érdekében.

III. CÉLKITŰZÉSEK

A Hering csatornák azonosítását megkönnyítő, jellegzetes immunfenotípust sem patkány, sem humán májban nem ismerünk, így célul tűztük ki:

I. A máj saját őssejtkompartimentjének legvalószínűbb forrásául („stem cell niche”) szolgáló Hering csatornák jellemzését ép humán és patkány májban

I.1. A Hering csatornák mikroanatómiája, megoszlása a májszövetben;

I.2. A Hering csatornák immunfenotípusának jellemzése;

II. A Thy-1 antigén expressziójának vizsgálata nagy feloldóképességű morfológiai módszerekkel májszövetben, a Thy-1 pozitív sejtek pontos azonosítása:

II.1 A Thy-1 expresszió vizsgálata ép humán és patkány májban;

II.2 A Thy-1 expresszió vizsgálata a regeneráció során;

II.2a. A Thy-1 expresszió vizsgálata ovális sejtek részvételével zajló regeneráció során patkánymájban;

II.2b. A Thy-1 expresszió vizsgálata regenerálódó humán májban;

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

IV.1. Állatkísérletek

A kísérletekhez standard körülmények között tartott F-344 törzsből származó hím patkányokat használtunk, melyek súlya a kísérlet kezdetekor 160 és 180 g között volt. Az állatok a kísérlet során szükségletüknek megfelelően fogyasztottak rágcsáló tápot (Charles River) és csapvizet. A sötét-világos ciklusok 12 óránként váltakoztak. A tenyésztés és a kísérletek során a Semmelweis Egyetem kísérleti állatok gondozására kidolgozott ajánlásait követtük.

IV.1.1. Állatkísérleti modellek – az AAF/PHx modell

Az állatokat négy egymást követő napon, gyomorszondán át 5 mg/kg dózisu 1 %-os metil-cellulózban oldott 2-acetaminofluorénnel (AAF) kezeltük. Az ötödik napon hagyományos 70 %-os parciális hepatektómiát hajtottunk végre (Higgins és Anderson 1931), amelyet további négy, naponkénti AAF kezelés követett. A parciális hepatektómia után különböző időpontokban leölt (időpontonként és kísérletenként legalább 3-3 állat) állatok máját eltávolítás után folyékony nitrogénnel lehűtött izopentánban fagyasztottuk, majd a mintákat felhasználásig -70 °C tároltuk.

IV.1.2. Az osztódó sejtek jelölése BrdU (brómdeoxiuridin)-val

Az állatokat BrdU (100 mg/kg, fiziológiás sóoldatban) intraperitoneális adása után 1 órával öltük le. Ez idő alatt a timidin-analóg beépült az éppen S-fázisban lévő sejtek újonnan szintetizálódó DNS-ébe. Anti-BrdU ellenanyaggal elvégzett immunhisztokémiai reakcióval láthatóvá tettük az S fázisban levő sejteket.

Proliferációs index számítása: pancitokeratin, BrdU és DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol) festett sorozatmetszeteken azonosítottuk a portális tereket. A CK7 negatív és CK7 pozitív epeutak proliferációs indexét 2AAF kezelés után határoztuk meg

a következőképpen: 4 különböző állat májából származó sorozatmetszeteken 217-555 CK7 negatív és 170-396 CK7 pozitív sejtet számoltunk meg. A proliferációs indexet az összsejtszám és BrdU jelzett sejtek arányából határoztuk meg.

IV.2. Humán minták

A felnőtt humán májminták balesetben elhunyt személyekből származtak, a SE Igazságügyi Orvostani Intézetéből. A betegek fellelhető anamnézisében májbetegségre utaló adat nem volt. A májakon végzett részletes szövettani vizsgálattal (PAS-, diasztáz PAS-, pikroszíriusz-, berlini-kék-, orcein festések) kóros szövettani elváltozás, kötőszövetsszaporulat nem volt megfigyelhető.

A kora/újszülött májminták a SE, I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján született és meghalt újszülöttekből származtak.

Csak olyan elhunytak májmintáit használtuk fel, akikben fejlődési rendellenesség klinikai illetve patológiai vizsgálattal nem volt kimutatható.

Valamennyi felhasznált minta (2.táblázat) esetében a boncolásra a haláltól számított 24 órán belül került sor.

2.Táblázat A vizsgálatainkhoz használt ép humán májminták adatai

| Kor | Nem | Esetszám |
|---------------|----------|----------|
| 23. geszt.hét | Férfi/Nő | 3/4 |
| 39. geszt.hét | Férfi | 1 |
| 3év | Férfi/Nő | 2/1 |
| 13év | Nő | 1 |
| 20év | Férfi | 1 |
| 26év | Férfi | 1 |

A duktuláris proliferációt tartalmazó májminták (3 éves kislány, 55 éves nő) fulmináns májelégtelenség miatt májtranszplantáción átesett betegek eltávolított májából származtak.

A mintákat folyékony nitrogénnel lehűtött izopentánban fagyasztottuk le, és felhasználásig -70°C-on tároltuk.

A humán mintákon végzett kísérleteket a Semmelweis Egyetem Tudományos és Kutatás-Értékelési Bizottsága 141/2005 számú határozatában engedélyezte.

IV.3. Morfológiai vizsgálatok

IV.3.1. Immunhisztokémia

A 10-20 µm vastag fagyasztott metszeteket -20°C-os metanolban fixáltuk (10 perc), majd PBS-el (Phosphate Buffered Saline) történő mosás (3x10 perc) után 1 órán át, szobahőmérsékleten inkubáltuk őket a különböző elsődleges ellenanyagok megfelelő hígításaival (3.táblázat).

3.Táblázat Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz használt elsődleges ellenanyagok

| Ellenanyag | Faj | Gyártó | Katalógusszám | Hígítás |
|----------------|-------------------|-----------------|----------------|---------|
| BrdU | Egér monoklonális | BD Pharmingen | 347580 | 1:50 |
| CD133 | Egér monoklonális | Miltenyi Biotec | 120-000-967 | 1:50 |
| CD45 | Egér monoklonális | BD Pharmingen | 550566 | 1:100 |
| CD56 | Egér monoklonális | BD Pharmingen | 559043 | 1:50 |
| Citokróm P450 | Nyúl poliklonális | MBL | BV-3084-3 | 1:100 |
| CK (pan)-FITC | Egér monoklonális | Dako | F0859 | 1:20 |
| CK19 | Egér monoklonális | Novocastra | NCL-CK19 | 1:50 |
| CK19 | Egér monoklonális | BioGenex | MU246-UC | 1:50 |
| CK7 | Egér monoklonális | Biogenex | MU 255-UC | 1:50 |
| CK7-FITC | Egér monoklonális | Dako | F7232 | 1:50 |
| Dezmin | Nyúl poliklonális | Neomarkers | RB-9014 | 1:100 |
| EMA | Egér monoklonális | Novocastra | EMA-L-CE | 1:50 |
| GFAP | Egér monoklonális | BD Pharmingen | 556330 | 1:100 |
| Kollagen I | Nyúl poliklonális | Calbiochem | 234167 | 1:50 |
| Laminin | Nyúl poliklonális | Dako | Z0097 | 1:200 |
| Lyve-1 | Nyúl poliklonális | Reliatech | 102-PA05 | 1:100 |
| NG – 2 | Egér monoklonális | R&D | MAB2585 | 1:20 |
| OV-6 | Egér monoklonális | R&D Systems | MAB 2020 | 1:100 |
| Simaizom aktin | Egér monoklonális | Dako | M0851 | 1:100 |
| Thy-1 | Egér monoklonális | BD Pharmingen | 554895; 550402 | 1:100 |
| Thy-1 FITC | Egér monoklonális | BD Pharmingen | 554897; 555595 | 1:50 |

Újabb mosás (PBS; 3x10 perc) után szobahőmérsékleten történő inkubálás (30 perc) következett a megfelelő fluorokrómmal konjugált másodlagos antitestek (4. táblázat; 5. táblázat) PBS-ben hígított oldatával.

Magfestéshez a metszeteket további mosások után TOTO[®]-3 (PBS-ben hígítva, 1:500, Invitrogen; T3604) illetve DAPI (PBS-ben hígítva, 1:50, Sigma Aldrich; 32670) oldatával inkubáltuk szobahőmérsékleten 10 percig.

A különböző monoklonális citokeratinok összehasonlító vizsgálatát sorozatmetszeteken végeztük el, a BioVis3D nevű program segítségével a sorozatmetszetekből 3 dimenziós képeket is készítettünk.

FITC (fluoreszcein izotiocianát) konjugált pancitokeratin- és Thy-1 ellenanyag alkalmazásával lehetőségünk volt két monoklonális ellenanyag ugyanazon metszeten történő együttes vizsgálatára is. Az egyik monoklonális ellenanyaggal elvégzett indirekt immunhisztokémiai reakció után a primér monoklonális ellenanyag másodszori alkalmazásával blokkoltuk a fluoreszcens szekundért, ezek után alkalmaztuk a fluorokrómmal konjugált monoklonális ellenanyagot.

4.Táblázat Az immunhisztokémiai reakciókhoz használt szekundér ellenanyagok

| Ellenanyag | Faj | Gyártó | Katalógusszám | Hígítás |
|-----------------|---------------------|------------------------|----------------------------|---------|
| FITC konjugált | Számár poliklonális | Jackson Immunoresearch | 715-095-150 711-095-152 | 1:200 |
| TRITC konjugált | Számár poliklonális | Jackson Immunoresearch | 715-025-150 711-025-152 | 1:200 |
| Cy5 konjugált | Számár poliklonális | Jackson Immunoresearch | 711-175-152 | 1:200 |

5.Táblázat Az immunhisztokémiai reakciókhoz használt fluorokrómok tulajdonságai

| Fluorokróm | Excitációs max | Detektáló szűrők |
|----------------------|----------------|------------------|
| FITC | 494 | 522/32 |
| TRITC | 554 | 580/32 |
| Cy5 | 650 | 680/32 |
| TOTO [®] -3 | 642 | 680/32 |
| DAPI | 359 | 455/30 |

A BrdU-festéshez a metszeteket fixálás és mosás után 2N sósavval inkubáltuk 10 percen át, szobahőmérsékleten (DNS denaturálás). PBS-ben történő mosást követően az immunreakciót a fentiek szerint végeztük el.

A metszeteket Bio-Rad MRC1024 konfokális mikroszkóppal (Bio-Rad, Richmond CA) vizsgáltuk.

IV.3.1.1. Kolokalizációs vizsgálatok

A kolokalizációs vizsgálatokat a NIH Image J nevű programjával végeztük el. A piros és zöld színeket külön felvéve, a program lehetőséget nyújt ezek területének meghatározására a kolokalizációs plugin pedig fehér színnel jelöli azon pixeleket, amelyek elemzéskor a két képből a program által összeillesztett harmadik képen fedik egymást. Ismerve a piros (P%) és zöld (Z%) színek által elfoglalt összterületet (ezt 100%-nak tekintve) valamint a kolokalizáló pixelek mennyiségét (KP%) könnyen meghatározható a kolokalizációs index (KI).

$$KI = KP\% \times 100 / (P\% + Z\%) - KP\%$$

IV.3.2 Elektronmikroszkópos vizsgálatok

A kísérleti állatokat az érrendszer PBS-sel történő átmosása után, transzkardiálisan 4% paraformaldehidet (PFA) és 1% glutáraldehidet tartalmazó PBS oldattal perfundáltuk. A máj eltávolítása után 1-2 mm vastagságú szeleteket készítettünk és ezeket még 2-3 órát a perfundáló oldatban fixáltuk majd 1 éjszakán át PBS oldatban hagytuk. A májszeleteket 1% ozmium-tetroxid oldattal utófixáltuk, majd a szövetmintákat felszálló acetonsoron dehidráltuk. A SPURR műgyantába (Sigma-Aldrich, SPRLV) való beágyazás előtt a szövetdarabokat még egy órán át inkubáltuk acetone és műgyanta keverékében. A félvékony metszeteket 1% toluidin kézzel festettük meg. Az ultravékony metszeteket RMC MT-7 ultramikrotómmal készítettük, majd transzmissziós elektronmikroszkóp (Philips CM10) segítségével vizsgáltuk.

IV.3.2.1. Immunelektronmikroszkópia

A kísérleti állatokat a keringés PBS – el történő átmosása után, transzkardiálisan 4%-os PFA oldattal perfundáltuk. A máj eltávolítása után 2-3 óra fixálás következett szintén 4 %-os PFA oldatban, majd a májdarabkákat 1 éjszakán át PBS oldatban hagytuk. Ezután a mintákat éjszakán át tartó 15% illetve 30% szacharóz oldatban

inkubáltuk. A mintákat a fölösleges szacharóz oldat letörlése után folyékony nitrogénnel lehűtött izopentánban fagyasztottuk le, és felhasználásig -70°C -on tároltuk.

Az 1% kollodionnal (TAAB Laboratory Equipments Ltd, C171) bevont tárgylemezekre felvett $30\ \mu\text{m}$ vastag fagyasztott metszeteket PBS-sel történő mosás és 3%-os tejporos blokkolás után 2-4 órát inkubáltuk a megfelelő elsődleges antitest (Thy-1; BD Pharmingen 554895) oldatában. Az inkubációt követően a metszeteket 1:1000 hígítású, specifikus peroxidáz-kapcsolt másodlagos antiszérummal (Jackson Immunoresearch 715-035-150) inkubáltuk (1 óra, szobahőmérséklet). Ezt követően az antitest reakciót peroxidáz enzim reakcióval tettük láthatóvá DAB tartalmú (Vector Laboratories SK-4100) hívó oldat használatával, ami barna színű csapadékot eredményezett.

Az immunreakciót követően a metszeteket ozmifikáltuk (2% ozmium-tetroxid oldat PBS-ben, 1 óra szobahőmérsékleten), majd felszálló alkoholsorban dehidráltuk és SPURR műgyantába (Sigma, SPRLV) ágyasztuk. A félvékony metszeteket 1% toluidin kék oldattal festettük meg. Az ultravékony metszeteket (RMC MT-7) transzmissziós elektronmikroszkóp (Philips CM10) segítségével vizsgáltuk.

IV.4. Génexpressziós vizsgálatok

IV.4. 1. Lézer mikrodisszekció, RNS izolálás

A ribonukleázmentes tárgylemezre felvett, $10\ \mu\text{m}$ vastag fagyasztott metszeteket acetonban fixáltuk (-20°C , 2 perc), szobahőmérsékleten megszáritottuk, majd ribonukleázmentes hematoxilinnel megfestettük. PALM MicroBeam lézer mikrodisszektor segítségével 500-1000 sejtet gyűjtöttünk össze lízis pufferben. A vizsgálatainkhoz használt minden májmintából a totál RNS izolálását a gyártó előírásainak megfelelően RNAqueous Micro Kittel (Ambion, AM 1931) végeztük el. Az RNS mintákat felhasználásig -70°C -on tároltuk.

IV.4. 2. Reverz transzkripció

A cDNS szintéziséhez a cDNA High Capacity Archive kitet (Applied Biosystems, 4368813) használtuk a gyártó ajánlása szerint. $1\ \mu\text{g}$ RNS (lézer mikrodisszekcióval

nyert minták esetén a teljes kiizolált RNS mennyiség) kvantitatív konverzióját hajtottuk végre 100 µl végtérfogatban (6. táblázat). A reakció a PE 2400 Gene Amp PCR készülékben zajlott – 10 perces 25 °C-on történő inkubációt követően – 120 percen keresztül, 37 °C-on. A cDNS mintákat további felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

6.Táblázat A reverz transzkripció reakcióelegy összetétele

| Komponens | Bemérés |
|--------------------------------|----------------|
| Random hexamer | 10 µl |
| RNS templát | 1000 ng |
| dNTP mix (100 mM) | 4 µl |
| RT Puffer (10x) | 10 µl |
| Reverz transzkriptáz(50U/ µl) | 5 µl |
| RN-áz mentes H ₂ O | 100 µl-ig |

IV.4. 3. Valós idejű kvantitatív PCR

A tanulmányozott markerek szöveti expresszióját a vizsgálni kívánt sejtek (ovális sejtek alkotta csövek) mikrodisszekcióját, RNS-izolálást és reverz transzkripciót követően valós idejű kvantitatív PCR (QRT-PCR) technikával határoztuk meg. A QRT-PCR segítségével a polimeráz láncreakció minden egyes ciklusában meghatározzuk az addig keletkezett termék mennyiségét. Az Applied Biosystems TaqMan Gene Expression AssayTM rendszerét használtuk. A kiértékeléshez szükség van egy belső standard génre, amihez a vizsgált markereink expressziójának változásait viszonyítjuk. Mi a GAPDH (Applied Biosystems 4352338E) háztartási gént választottuk referenciaként.

A TaqMan[®] detektálás során a *forward* és a *reverse* primer mellett egy harmadik oligonukleotid, egy próba is található a reakcióelegyben. Ennek szekvenciáját úgy tervezik meg, hogy a PCR anellációs lépése során a két primer közé tudjon kötődni. A próba 5' végéhez egy fluoreszcens festékekkel jelölt *riporter* molekula kapcsolódik, 3' végéhez pedig egy ún. *quencher* (kioltó) molekula. Az intakt próbán a *quencher* molekula fizikai közelsége miatt kioltja a *riporter* festék fluoreszcenciáját. A polimeráz láncreakció során a polimeráz enzim az elongáció szakaszában az 5' exonukleáz aktivitásának köszönhetően lebontja a DNS-szálon elé kerülő próbát. A *quencher*

molekula így eltávolodik a *riporter* molekulától, aminek fluoreszcenciája felszabadul a gátlás alól, detektálható lesz. Az egyes ciklusokban mért fluoreszcencia értéke arányos a keletkezett termék mennyiségével. Megrajzolható a reakció kinetikai görbéje, így meghatározhatjuk a vizsgált termék kiindulási mennyiségét.

A görbék analizésénél először meghatároztunk egy, a reakciók exponenciális fázisába eső fluoreszcencia küszöbértéket. A program ezután automatikusan táblázatba foglalja azokat a ciklusszámokat, melyekben az adott reakció eléri a küszöbértéket. Ezeket a ciklusszám értékeket nevezzük C_T értéknek. A különböző próbákat ugyanahhoz a belső standardhoz (GAPDH) viszonyítva, ΔC_T módszerrel határoztuk meg a génexpressziós szinteket.

Az általunk használt TaqMan Gene Expression AssayTM segítségével, az AFP (Rn00560661_m1), az SMA (Rn01759928_g1) és a Thy-1 (Rn00562048_m1) génexpresszióját vizsgáltuk. A reakcióelegy összetételét a 7. táblázat, a polimeráz láncreakció hőmérsékleti profilját pedig a 8. táblázat mutatja.

7.Táblázat A valós idejű kvantitatív PCR reakcióelegy összetétele

| Komponens | Bemérés |
|-------------------------------------|----------|
| TaqMan [®] Master Mix (2×) | 10 µl |
| Assay (primer és próba; 20x) | 1 µl |
| cDNS templát | 70 ng |
| Desztillált víz | 20 µl-ig |

8.Táblázat A valós idejű kvantitatív PCR hőmérsékleti profilja

| Lépés | Hőmérséklet | Idő |
|---------------------|-------------|----------|
| Aktiváció | 50 °C | 2 perc |
| Kezdeti denaturáció | 95 °C | 10 perc |
| Denaturáció | 95 °C | 15 mperc |
| Anelláció-Extenzió | 60 °C | 1 perc |

} 50 ciklus

IV.5. Statisztikai analízis

A kísérleti adatok elemzése kétmintás t-próbával történt.

Szignifikancia szint: eredményeinket $p < 0,05$ értékek esetén tartottuk szignifikánsnak.

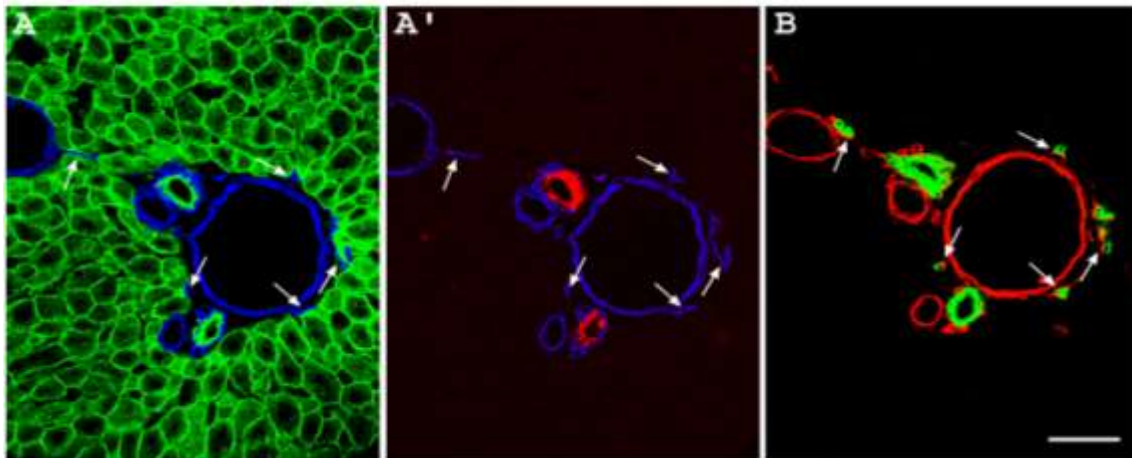
V. EREDMÉNYEK

V.1. Az epeutak elrendeződése és immunfenotípusa ép patkány és humán májokban

V.1.1. Az epeutak elrendeződése és citokeratin immunfenotípusa patkánymájban

V.1.1.1. Az epeutak elrendeződése és citokeratin immunfenotípusa ép felnőtt patkány májában

A citokeratinok (CK) az intermedier filamentumok legnépesebb családját alkotják, döntően hámsejtekben fejeződnek ki. A különböző hámsejtípusok nagyon jellegzetes citokeratin profillal rendelkeznek, ami a sejtek fenotípusának igen stabil jellemzője, többnyire még malignus transzformáció során sem változik meg. Ezért az eltérő citokeratinokat expresszáló sejtek megbízhatóan elkülöníthetők egymástól a rájuk jellegzetes citokeratin mintázat immunhisztokémiai kimutatásával. Míg a hepatociták CK8/18-at expresszálnak, addig az epeutakban a CK8/18 mellett CK7/19 is jelen van (Moll és mtsai, 1982). Az úgynevezett pancitokeratin (panCK) ellenanyag (MNF116) a CK5/6/8/17 és a CK19-et egyaránt felismeri. A kereskedelmi forgalomban levő citokeratin ellenanyagok többsége monoklonális, ezért összehasonlító immunhisztokémiai vizsgálatuk csak sorozatmetszeteken lehetséges.



6. Ábra Az ábrán ép patkánymájából származó metszeten egy portális tér látható; Az **A** (az A és A' ábrán pancitokeratin (zöld) CK7 (piros) és laminin (kék)) és **B** ábra (CK19 (zöld) és laminin (piros)) egymást követő metszeteken készültek. Míg a pancitokeratin és a CK19 a portális térben található összes epeútban pozitív, addig a CK7 csupán a nagyobb epeutakban expresszálódik, a kis epeutak CK7 negatívak. Az „U” alakú bazális membránnal rendelkező Hering csatornák (nyilak) szintén CK19+/CK7–nak bizonyultak. Egység: 50µm

Kísérleteinkben a fentebb részletezett citokeratin antitesteket általában kombináltuk laminin immunfestéssel, ami a bazális membránok feltüntetésével segítette a májszövetben való tájékozódást.

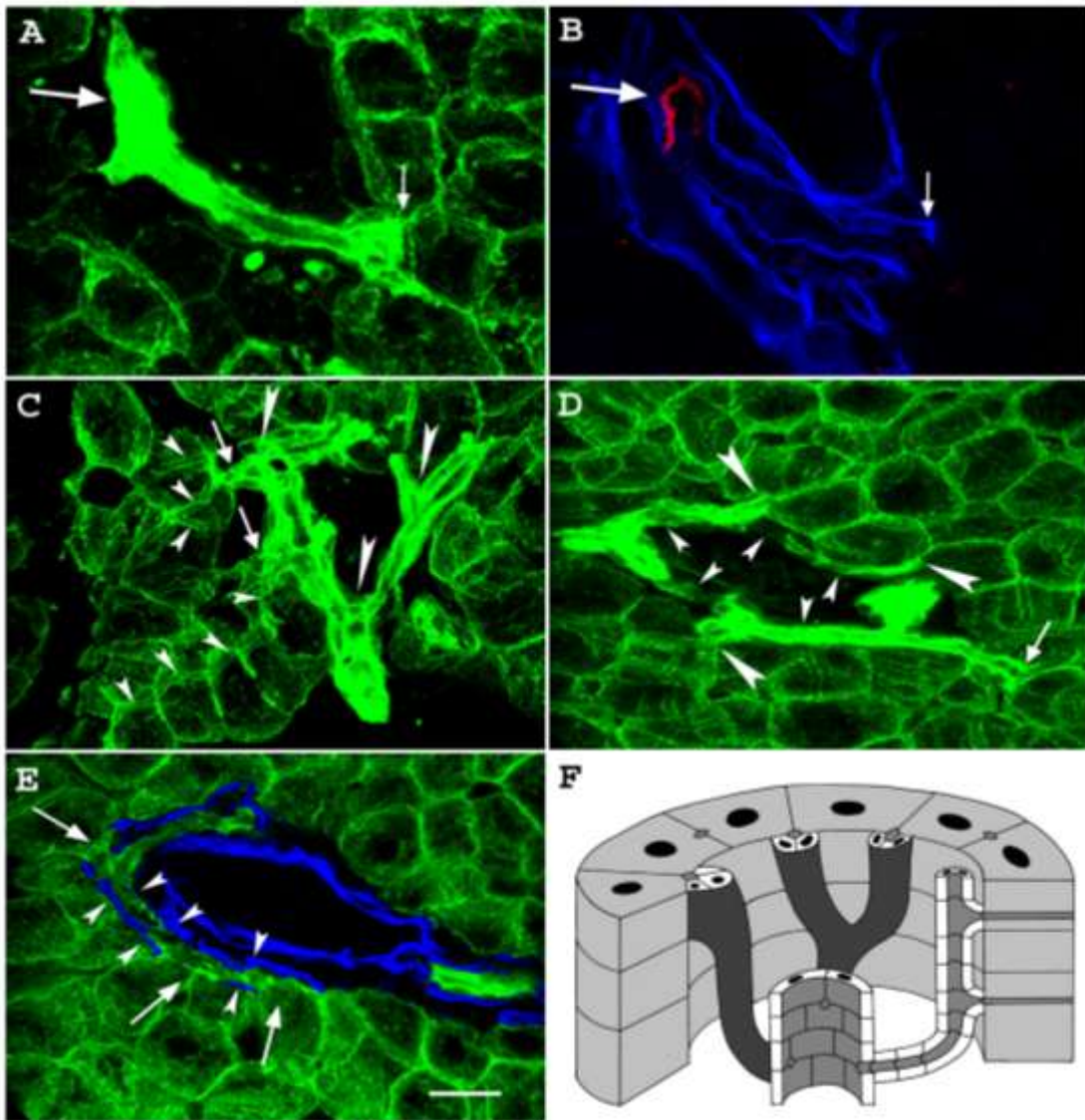
Ép patkánymájából készített fagyasztott metszeten a laminin pozitív bazális membránnal határolt interlobuláris epeutak erős citoplazmatikus pozitivitást mutattak mind a pancitokeratin (6.ábra A), mind pedig a CK7 (6.ábra A') és CK19 (6.ábra B) festéssel. Részletesen elemezve az immunhisztokémiai reakciókat, a portális mezők szélén olyan kis epeutak voltak megfigyelhetőek, melyek bár festődtek CK19 antitesttel (6.ábra B), de CK7 (6.ábra A') expresszió nem volt bennük kimutatható. Ezek körül a kis epeutak körül is mindig megfigyelhető volt bazális membrán, ami a Hering csatornákra jellemző, parenchima felé nyitott, „U” alakú (6.ábra A') elrendeződést mutatott. Ez a különleges CK19+/CK7– citokeratin mintázat tehát lehetővé teszi a Hering csatornáknak a nagy epeutaktól való elkülönítését ép májszövetben.

Részletesen elemezve, sorozatmetszeteken végigkövetve a CK7 negatív epeutak lefutását, 3 fő duktulus-típust sikerült elkülöníteni (7.ábra):

- A. Egyszerű, elágazás nélküli duktulus - egyetlen ponton kapcsolódik a májlebenyke szélén, a lebenyke felületével párhuzamos, egy sorban elhelyezkedő májsejtsorhoz, a határoló lemezkéhez (7.ábra A és B);
- B. Két vagy több elágazást tartalmazó duktulus, az elágazások külön-külön kapcsolódnak a határoló lemezke májsejtjeihez (7.ábra C és D);
- C. A duktulus a határoló lemezke 2-4 májsejtjéhez is kapcsolódik (7.ábra E);

A három duktulus típus előfordulási aránya a vizsgált metszeteken nagyjából azonos volt, az epeduktulusok nem lépték át a határoló lemezke hepatocitasorát, a májlebenyke belsejében nem találtunk sem CK7, sem CK19 pozitív epeutakat. A kapcsolódási pontok közötti duktulus-szakaszokat mindvégig laminin pozitív bazális membrán határolta.

A CK19+/CK7– duktulusok CK19+/CK7+ duktusba vezetnek, ilyenkor éles immunfenotípus váltás figyelhető meg, az átmenet nem fokozatosan történik (7.ábra B; 8.ábra; 9.ábra).



7. Ábra A különböző duktusok és ezek kapcsolódási típusainak bemutatása

A-B képeken pancitokeratin (zöld) CK7 (piros) és laminin (kék) hármas immunhisztokémia

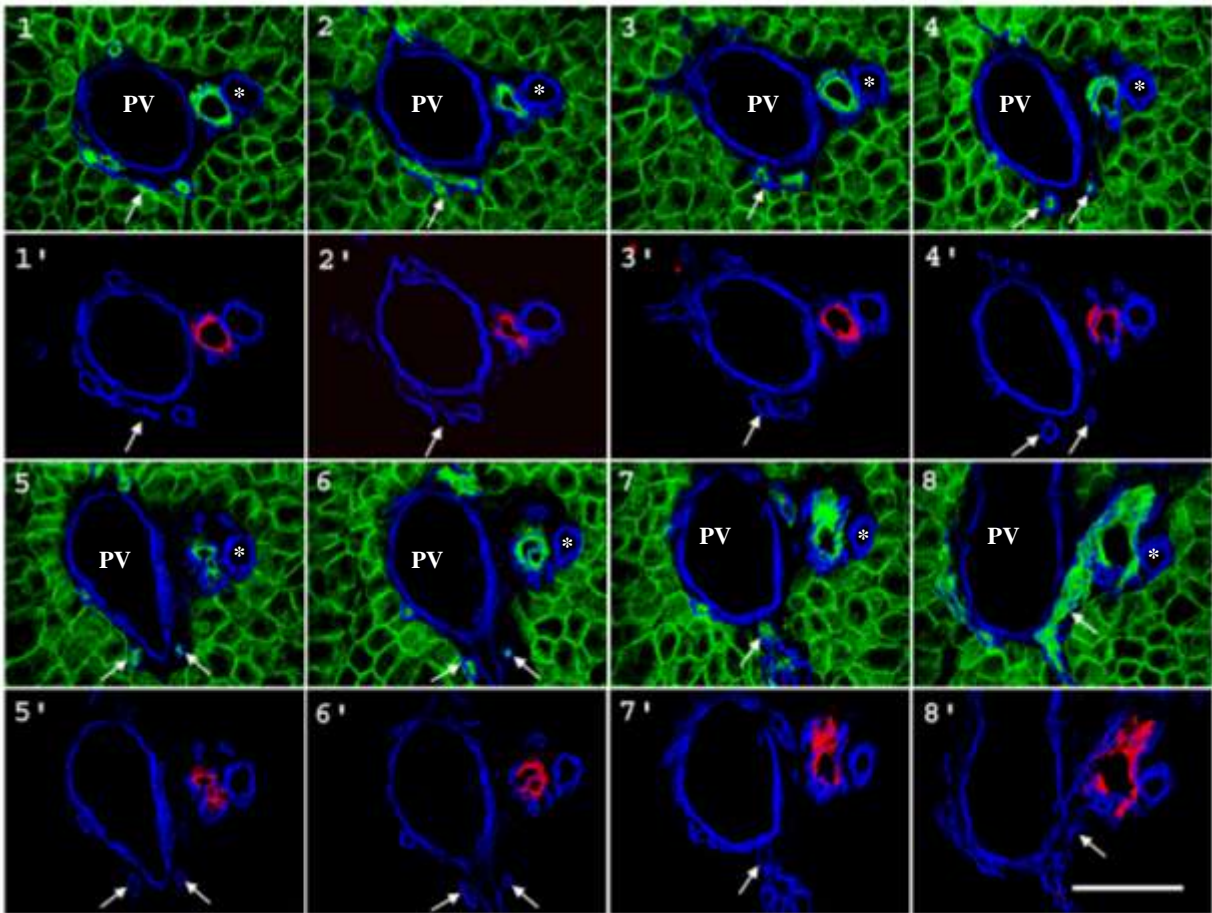
A. 0,4 μm -ként 37 optikai szeletből készült kép rövid epeduktulust (A típusú duktulus) ábrázol egyetlen csatlakozási ponttal (kis nyíl) a határoló lemezkéhez. **B.** Egyetlen optikai metszet képe, CK7 (piros) és laminin (kék) festéssel. Jól látható, hogy a duktulus CK7 negatív (kis nyíl), de a parenchimával ellentétes végén egy CK7 pozitív duktusba (nagy nyíl) vezet.

C-D. Pancitokeratin (zöld) immunhisztokémiai reakciója optikai (0,4 μm -ként 40 darab) szeletek sorozatából összeillesztett képeken. **C.** Elágazó epeduktulus (B típusú) képe figyelhető meg, az egyes elágazásokat nagy nyílhegyek jelölik. Jól láthatóak az epanalikusok (kis nyílhegyek), amelyek a Hering csatornába (nyílak) vezetnek. **D.** A határoló lemezke mentén elhelyezkedő C típusú duktulus (kis nyílhegyek) három különböző csatlakozási ponttal rendelkezik (nagy nyílhegyek).

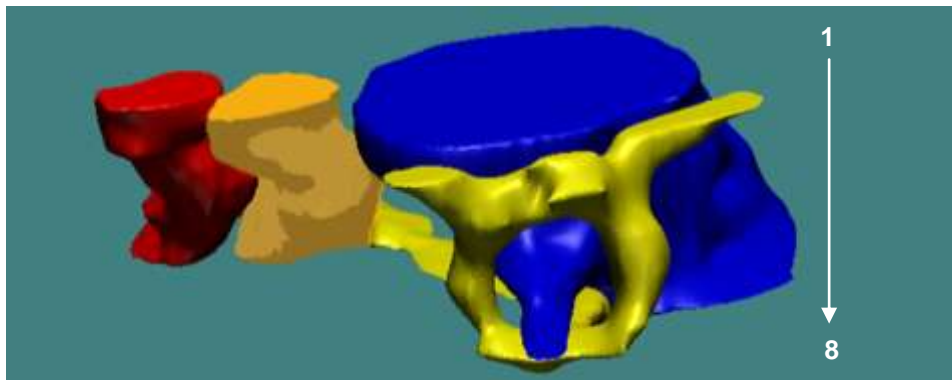
E. Pancitokeratin (zöld) pozitív C típusú duktulus a határoló lemezkéhez három különböző kapcsolódási ponton (nyíl) csatlakozik. A kapcsolódási pontok közötti duktulus szakasz (nyílhegyek) mindkét oldalán laminin pozitív (kék) bazális membrán által határolt. A kapcsolódási pontokon a duktulusnak csak a portális kötőszövet felé néző oldala határolt bazális membrán által.

Egység: 20 μm

F. A CK7 negatív duktulusok kapcsolódási típusainak sémás ábrázolása. Bal oldalon az A típusú duktulus látható egyetlen kapcsolódási ponttal, középen egy elágazó B típusú duktulus két csatlakozási ponttal, jobb oldalon pedig a C típusú duktulus látható szelvényes csatlakozási pontokkal.



8.Ábra Az ábrán szereplő 15 μm vastagságú sorozatmetszeteken CK7 negatív duktulust (nyilak) követhetünk végig, valamint ennek CK7 pozitív duktusba való vezetését is láthatjuk. Az 1-8 metszeteken a pancitokeratin (CK5/6/8/17/19; zöld szín) illetve laminin (kék) festés-, a 1'-8' metszeteken a CK7 (piros) és laminin (kék) immunhisztokémiai reakciót láthatjuk. A duktulus teljes lefutása során a periportális térben található, a határoló lemezkét nem lépi át. Kezdetben (1-2 kép) részlegesen határolt laminin pozitív bazális membrán által (Hering csatorna), a további képeken egy ugyancsak CK7 negatív duktulusba (2 kép) vezet, majd megfigyelhetjük ezek elágazódását a portális véna ága mellett (4-6 képek). A 7-es képen jól látható, hogy a portális véna ága alatt a duktulusok egyesülnek, majd a továbbiakban lefutásukat megváltoztatva egy CK7 pozitív duktusba vezetnek. PV-portális véna, a májartéria ágát csillag jelöli. Egység: 100 μm

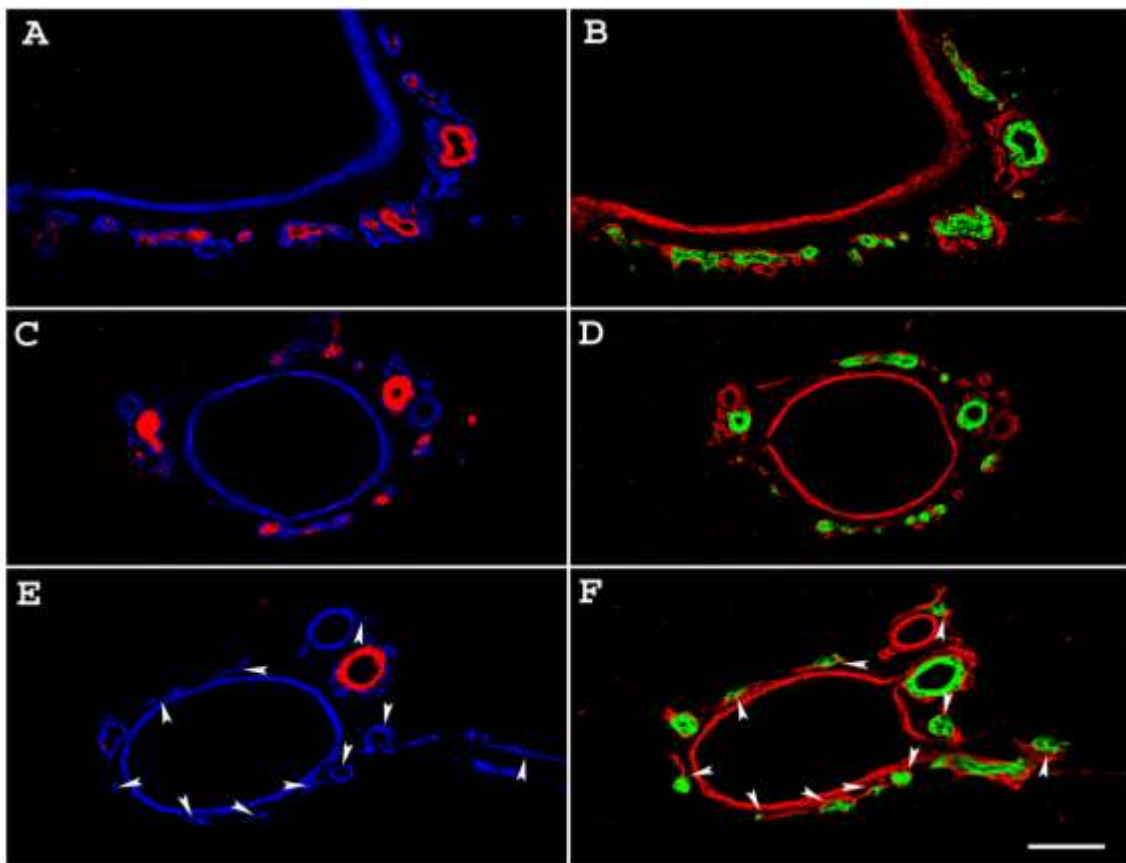


9.Ábra A 8.ábrán látott sorozatmetszetek 3D képe. A portális vénaág kék, a CK7- duktulus sárga, a CK7+ epiduktus narancs, a májartéria ága piros színnel jelzett.

V.1.1.2 Az epeutak citokeratin immunfenotípusa különböző korú patkányok ép májában

Újszülött patkány májában a laminin pozitív bazális membrán által határolt epeutak a portális tér szélén találhatóak, és CK19/7 kettős pozitivitást mutatnak, CK7 negatív epeutakat nem sikerült kimutatnunk (10.ábra A és B).

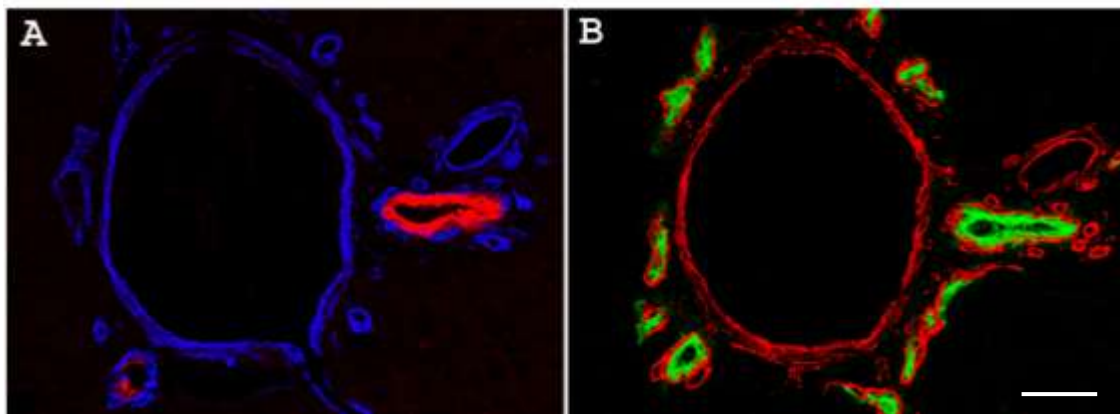
Az intrahepatikus epeutak fejlődése és elongációja születés után is folytatódik, ennek a folyamatnak részeként az epeutak száma is csökken (Roskams és Desmet 2008). Patkányban az epeutak számában némi csökkenés mutatkozott a születés utáni 14. napon, de CK expressziójuk változatlan maradt (10.ábra C és D). A CK7 negatív duktulusok születéskor és a születés utáni 14. napon még nincsenek jelen, az ilyen immunfenotípusú epeutak posztnatálisan a 28 napos ép patkány májában jelennek meg (10. ábra E és F).



10.Ábra Az ábrán egy újszülött (A-B), 14 napos (C-D) illetve 28 napos (E-F) patkány májából készült sorozatmetszetek CK7 (piros)/laminin (kék) (A,C,E) és CK19 (zöld)/laminin (piros) (B,D,F) festése látható. Az újszülött patkány májában (A, B) valamint a 14 napos patkány májában (C,D) található epeutak és epeduktulusok egyaránt CK19/7 kettős pozitívnak bizonyultak. A 28 napos patkány májában (E, F) található duktulusok (nyílhegyek) csak CK19-et (F) expresszálnak, a CK7 (E) nem található meg bennük. Egység: 50 μ m

V.1.1.3. Proliferáló epeút-hámsejtek citokeratin expressziója

Patkányban az AAF/PHx kísérlet során aktiválódnak a májban található őssejtek. Ezek leszármazottjai, az ovális sejtek, szűk lumennel rendelkező csöveket alkotva fokozatosan terjednek a periportális tértől a májlebenszék belseje felé. Az ovális sejtek alkotta csövek a Hering csatorna meghosszabításaként felfogható képletek. Önmagában két AAF kezelés, hepatektómia nélkül is az epeút-hámsejtek proliferációját váltja ki, ezek a proliferáló struktúrák azonban a periportális térben maradnak. Az alkalmazott két AAF kezelés nem változtatta meg az epeutak immunfenotípusát (11.ábra), azaz citokeratin expressziójuk változatlan maradt, azonban CK19+/CK7+ epeutakhoz képest a CK19+/CK7– duktulusokban a kezelés hatására háromszor nagyobb BrdU beépülést tudtunk kimutatni (9.táblázat).



11.Ábra Epeutak citokeratin expressziója AAF kezelés után. A sorozatmetszeteken CK7 (piros)/laminin (kék) (A) és CK19 (zöld)/laminin (piros) (B) festés látható. A duktulusok CK expresszióját nem változtatta meg az alkalmazott AAF kezelés. A CK19+/CK7– duktulusok a kezelés után is CK7 negatívak maradtak. Egység: 50µm

9.Táblázat CK7 negatív és CK7 pozitív epeutak proliferációs indexe az AAF kezelés után

| | CK7 negatív epeút-hámsejtek | CK7 pozitív epeút-hámsejtek |
|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Összessejtszám | 1384 | 1050 |
| Proliferációs index (%) | 6,9±1,8 | 2,1±0,7* |

*p< 0,05

V.1.2. A Hering csatornák mikroanatómiája, immunfenotípusa és megoszlása humán májszövetben

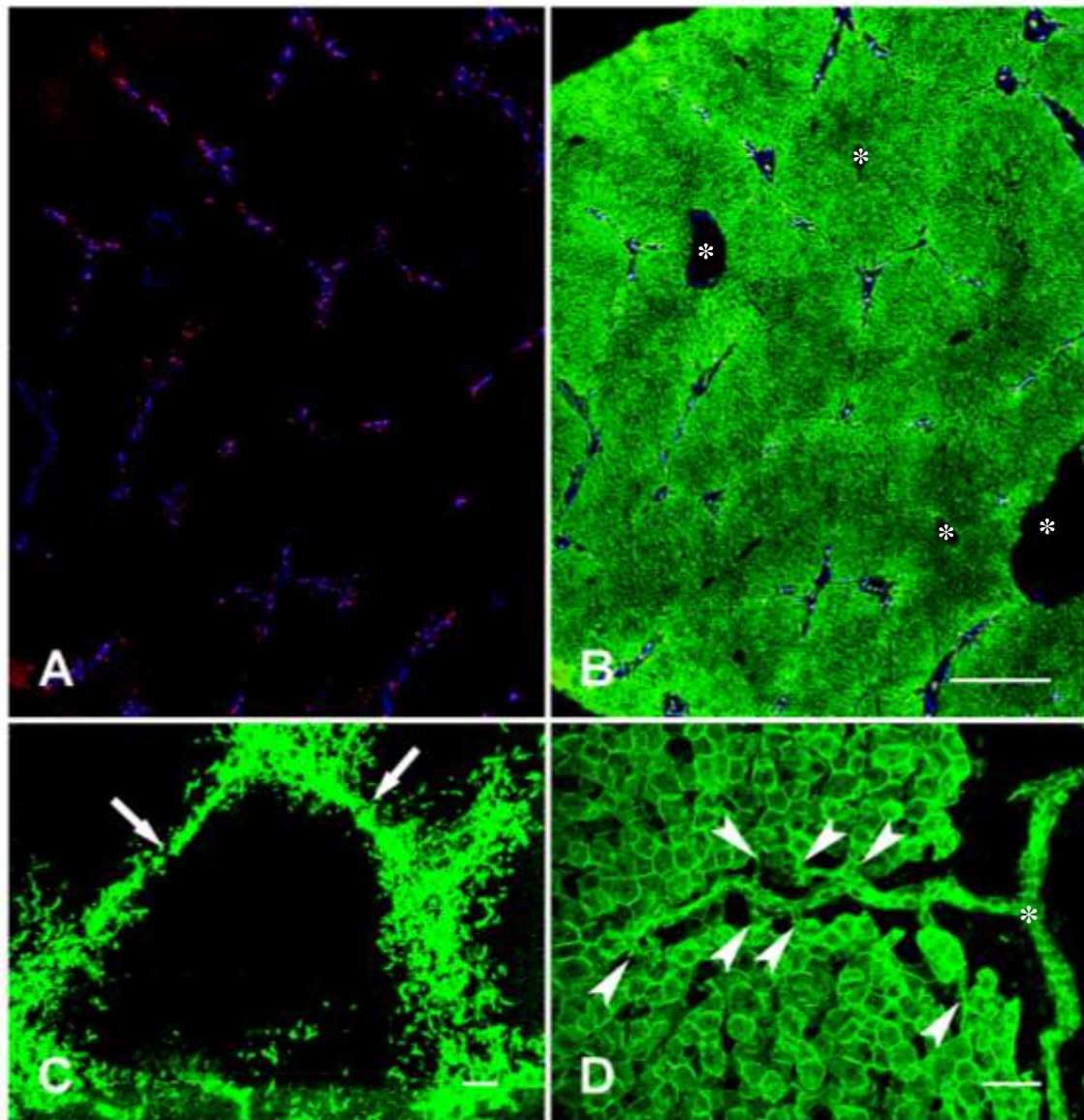
V.1.2.1 A Hering csatornák mikroanatómiája ép humán májban

Vizsgálataink során az ép humán májakban minden epeút CK19+/CK7+ kettős pozitívnak bizonyult, tehát a CK19+/CK7– immunfenotípus humán májban nem alkalmazható a Hering-csatornák azonosítására.

Ép humán májmintákban a pancitokeratin, citokeratin-7, laminin expresszió immunhisztológiai vizsgálata során a periportális terekben, és látszólag a májparenchimában is bazális membránnal határolt epeutak voltak megfigyelhetőek. Ezek az epeutak nem random módon helyezkedtek el, hanem jól meghatározott poligonális területeket, a tulajdonképpeni májlebenyék határait rajzolták ki (12.ábra A), melyek központi részén a centrális véna (12.ábra B), a szögleteikben pedig a portális terek helyezkedtek el.

Negyven darab CK7-tel megfestetett, egymást követő metszet digitális összeillesztése egyértelműen láthatóvá tette, hogy az epeutak a szomszédos portális terektől indulva egy képzeletbeli porto-portális vonal mentén (vaszkuláris szeptum), perilobulárisan haladnak, a porto-portális szakasz feléig terjednek be, szabadon hagyva egy központi rést (12.ábra C). Az epeutak soha nem lépték át a zárólemezkét alkotó májsejtek vonalát, mindig perilobulárisan, a májlebenyék között haladtak. Itt számos helyen megfigyelhető a duktusok csatlakozása a zárólemezke hepatocitáihoz (12.ábra D), ekkor a Hering csatornákra jellemző, nyitott, „U” alakú bazális membrán vette körül őket (13.ábra B). Ezeken a csatlakozási pontokon kívül az epeduktusok alkotásában a májsejtek nem vettek részt.

Mind a portális térben, mind pedig a vaszkuláris szeptumban elhelyezkedő epeutakat immunhisztokémiai reakcióval jól látható kevés I-es típusú kollagént tartalmazó mátrix (13.ábra A) veszi körül, mely azonban speciális szövettani festéssel (pikroszíriusz) sem volt kimutatható. Perilobuláris lefutásuk során az epeutakat a vaszkuláris szeptumban erek kísérik (13.ábra B). A CD31 pozitív vaszkuláris képletek közül a közvetlenül az epeutak mellett haladó erek az NG2 artéria markerrel (13.ábra C) is festődést mutattak.



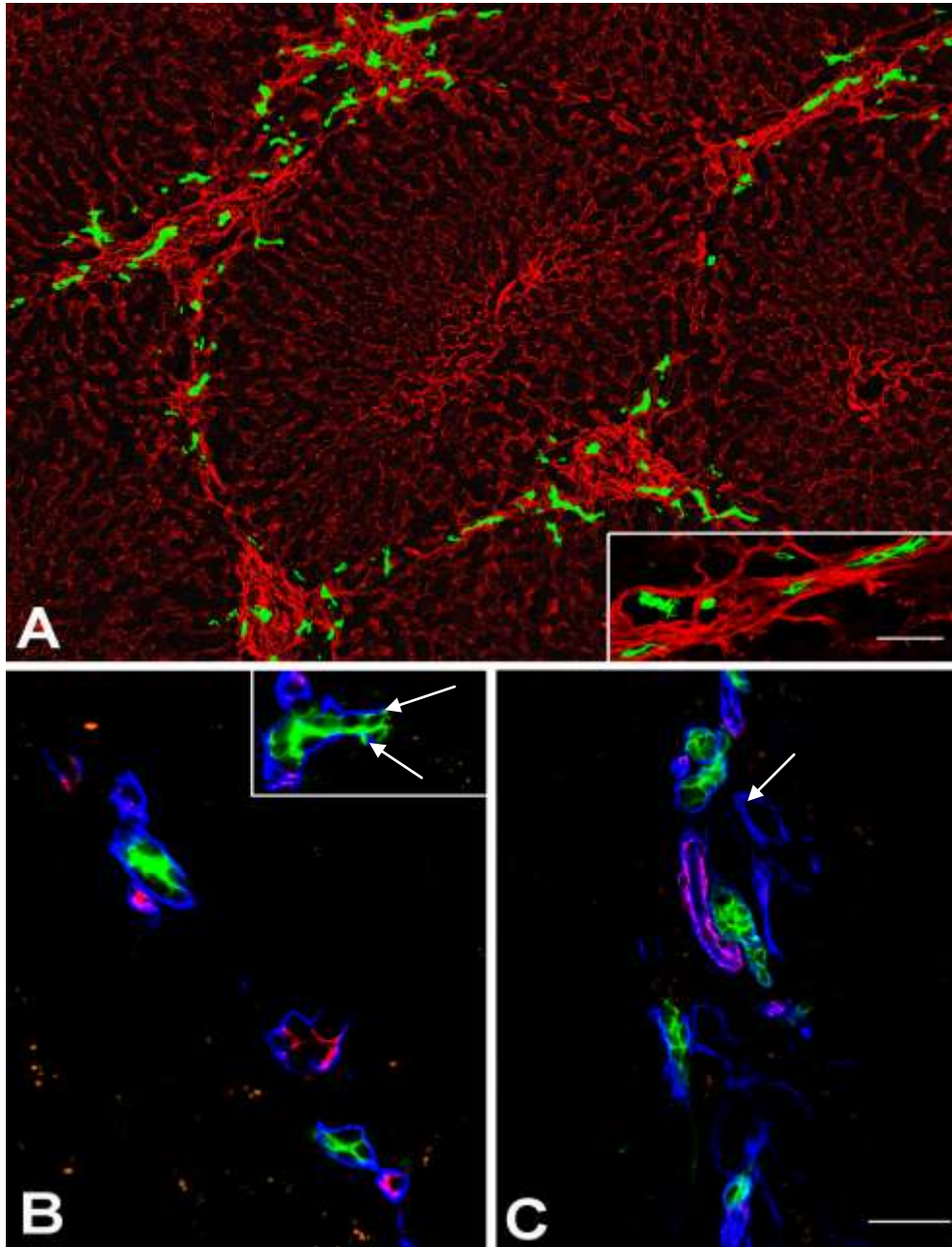
12.Ábra 3 éves gyerekből származó májminta immunhisztokémiai vizsgálata, konfokális mikroszkóppal
A, B. CK7(piros), laminin(kék) és panCK(zöld) hármas festés látható, az **A** képen külön látható a CK7 és laminin festés; megfigyelhető a laminin pozitív bazális membrán által határolt epeutak perilobuláris elrendeződése.

A **B** képen a három különböző festés együttes képe látható, itt az epeutak a CK7 és panCK kettős pozitivitásuk miatt sárgának tűnnek. Jól láthatóak a lobulusok közepén elhelyezkedő centrális vénák (*).

C. 40 darab CK7-el festett metszet összeillesztése után az epeutak jól kirajzolják a tulajdonképpeni májlebenyke határait. Ezek az epeutak egymással szemben a porto-portális tengelyek mentén nagyjából középvonalig haladnak szabadon hagyva azonban egy központi rést (nyilak).

D. 42 darab optikai szelet összeillesztése után készült kép, panCK(zöld) festéssel. A Hering csatornák több ponton is kapcsolódnak a hepatocitákhoz (nyílhegyek), majd egy nagyobb epeduktulusba vezetnek, ez pedig már a hepatociták által határolt „üres” térben halad, majd a portális térben található interlobuláris epeutba (*) vezet.

Egység: A;B=500µm, a C=100µm és a D=50µm



13.Ábra Ép humán máj konfokális mikroszkópos vizsgálata 3 éves (A-B) illetve 13 éves korban (C)

A. CK7 (zöld) és I-es típusú kollagén (piros) festéssel jól látható, hogy a CK7 pozitív epeutak mind a portális terekben, mind pedig perilobulárisan kis mennyiségű kollagénben gazdag szeptumba ágyazva haladnak.

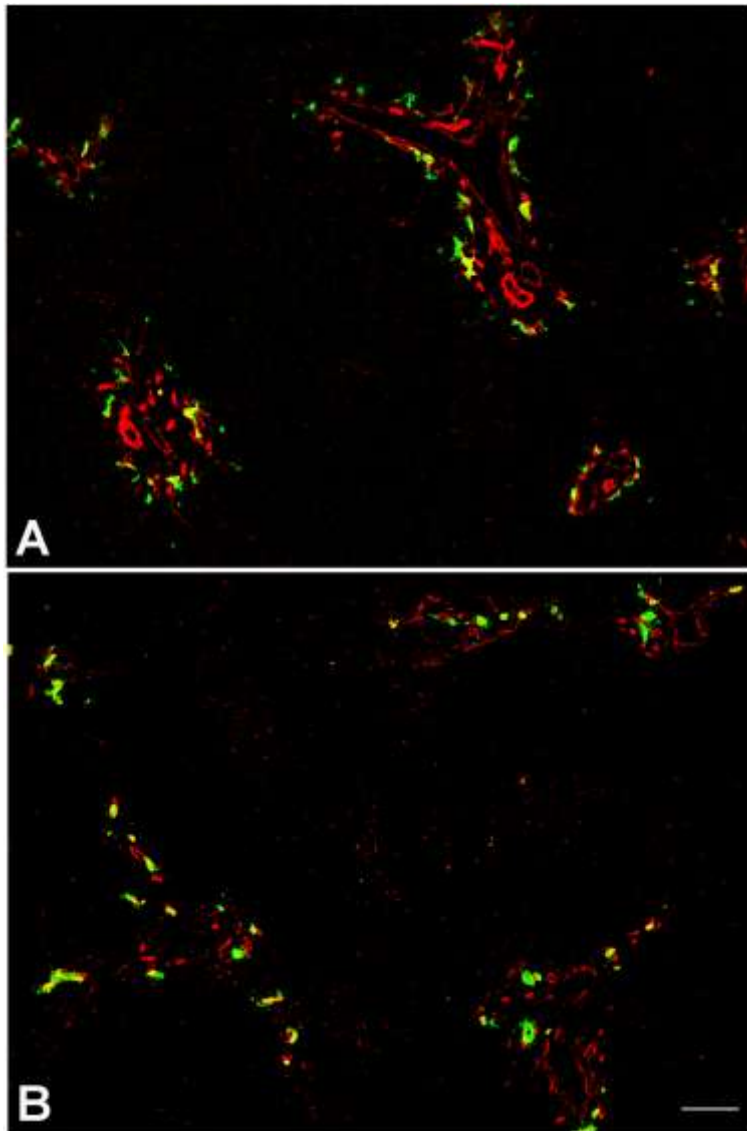
B. A vaszkuláris szeptum szerkezete 13 éves korban. Lamininnel (kék) határolt CK7 (zöld) epeutakat CD31 (piros) pozitív erek kísérik, a nyíllal jelölt nagyobb ér, amelynek közvetlen szomszédságában nem található epeút, legnagyobb valószínűséggel a portális véna egy terminális ága. A kis, beillesztett képen egy duktulus kapcsolódása látható a zárólemezkehez (a zárólemezke májsejtjei ezzel a festéssel nem láthatóak); jól látható a nyitott, „U” alakú laminin pozitív bazális membrán (az U betű szárait nyílak jelölik) az epeduktus körül. A duktulust szorosan kísérő CD31 pozitív (piros) erek itt is megfigyelhetők.

C. A vaszkuláris szeptum szerkezete 13 éves korban. Lamininnel (kék) határolt CK7 (zöld) pozitív epeutak szorosan együtt haladnak az NG2 (piros) pozitív artériákkal, a nyíllal jelölt nagyobb átmérőjű, NG2 pozitivitást nem mutató, laminin pozitív bazális membránnal rendelkező érkeplet egy terminális portális vénaágnak felelhet meg.

Egység: A=100µm; B, C =50µm

V.1.2.2. Az epeutak változása a korrall

Az intrahepatikus epeutak a gesztáció 6-7. hetében megjelenő köbhámsejtekből felépülő, az úgynevezett „ductal plate” – ből alakulnak ki. A „ductal plate” kezdetben egy-, majd két sejtrétegből felépülő, a portális véna ágait hüvelyszerűen körülvevő anatómiai képlet. Az intrauterin fejlődés során a két sejtréteg között megjelenő tubuláris, csőszerű struktúrák már a tulajdonképpeni primordiális intrahepatikus epeutak (Van Eyken és mtsai 1988).



14.Ábra Az epeutak elrendeződése a gesztáció 23. hetében levő magzat (A) és 26 éves felnőtt (B) májában

A. Zárt szerkezetű portális terek láthatóak, citokeratin7 (zöld) pozitív epeutak szorosan a portális térben található laminin (piros) pozitív bazális membránnal rendelkező erek körül helyezkednek el, a vaszkuláris szeptumnak még egyetlen eleme sem figyelhető meg.

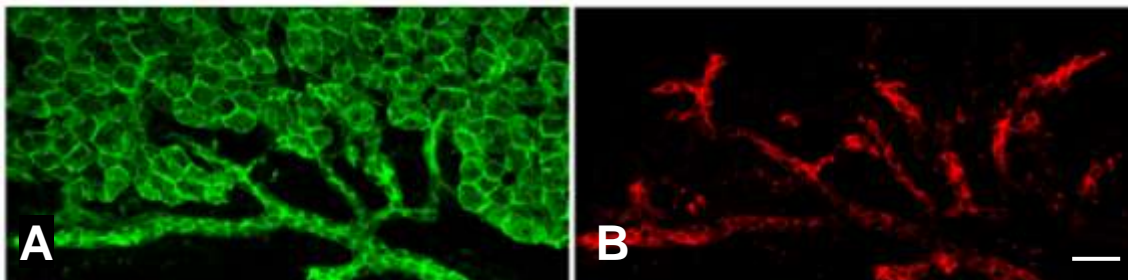
B. A májlebenyékét 26 éves korban is citokeratin7 (zöld) pozitív, laminin (piros) pozitív bazális membránnal körülvett epeutak határolják, de a szeptum szerkezete ritkásabb, mint a fiatalabb korú (lásd 12.ábra A) egyedekből származó májminták esetén. Egység: A, B=100µm

Az intrahepatikus epeutak hálózatának végső szerkezete csak a korai felnőttkorban alakul ki (Roskams és Desmet 2008), így vizsgálatainkat különböző korú egyedekből származó májmintákra is kiterjesztettük. A gesztáció 23. hetében a portális tereket még szorosan körülveszik a „ductal plate” – ből származó epeutak. A vaszkuláris szeptum még nem alakult ki, a portális terektől távolabb elhelyezkedő epeutak nem figyelhetőek meg (14.ábra A). A vaszkuláris szeptum kezdeménye kevés Thy-1 pozitív sejttel és citokeratin pozitív epeutakkal már a gesztáció 39. hetében megjelenik (lásd V.2.2. fejezet; 21.ábra), de szerkezete csak 3 éves korra válik teljessé (13.ábra B). Az egyetlen 13 éves korú egyed májmintájának elemzése során a vaszkuláris szeptum szerkezete némi regressziót mutat, és bár a szeptum alkotásában a fentebb részletezett epeút és vaszkuláris képletek is részt vesznek, ezek regressziója, vagyis a képletek közötti távolság növekedése megfigyelhető a fiatal felnőttek (20 és 26 éves) (14.ábra B) esetében is.

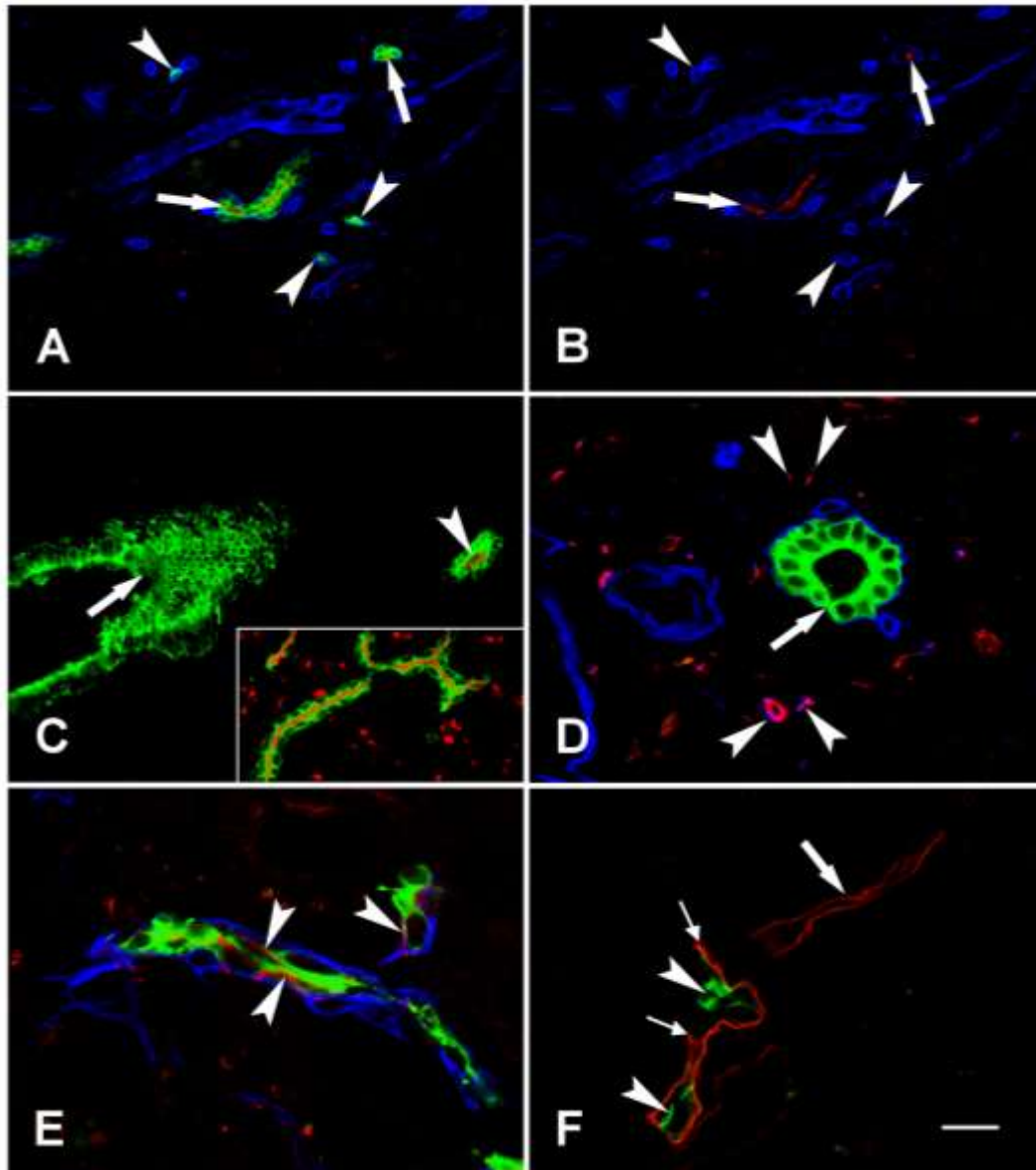
V.1.2.3. A Hering csatornák immunfenotípusának jellemzése

Humán májakban a CK19+/CK7– immunfenotípus nem alkalmazható a Hering-csatornák detektálására.

Vizsgálataink során számos, kísérletekben gyakran alkalmazott progenitor sejt marker (lásd 1.Táblázat – AFP, kromogranin, szinaptofizin, DMBT, DLK, CEA, CK20 és CK14) jelenlétét nem sikerült detektálnunk az epeutakban, mások pedig nem különítették el a vaszkuláris szeptumban található kis epeutakat a portális terekben elhelyezkedő nagyobb interlobuláris epeutaktól (CK7 – 15.ábra; EpCAM, E-cadherin).



15.Ábra Vaszkuláris szeptum és a környezetében található májparenchima (A) PanCK (CK5/6/8/17/19; zöld szín) és (B) CK7 (piros) festése. Az ábrán látható, hogy PanCK-t expresszáló CK19 pozitív epeútszakaszok minden szegmense CK7 pozitivitást is mutat. Egység: A;B=50µm



16.Ábra Az epeutak immunfenotípusának vizsgálata felnőtt (A-C) és 3 éves korban (D-F)

Az **A-B** ábrán EMA (piros), CK7 (zöld) és laminin (kék) immunfestése látható. Míg a portális térben elhelyezkedő laminin pozitív bazális membránnal körülvevett CK7 pozitív epeutak esetében (nyilak) élénk apikális EMA pozitívítás figyelhető meg, addig a kis epeutak (nyílhegyek) EMA negatívnak bizonyultak. Az **A.** ábrán mindhárom, a konfokális mikroszkóp által felvett csatorna együttes képe látható, de az áttekinthetőség érdekében a **B** képen csak a piros és kék csatornákat ábrázoljuk.

C. Apikális CD133 (piros) pozitívítást mutató kis epeutat (nyílhegy) láthatunk, a mellette elhelyezkedő nagyobb interlobuláris epeút CK7 (zöld)+/CD133– (nyíl). A beillesztett kis képen a vaszkuláris szeptumban található CK7–el (zöld) festődő epeduktulusok lineáris, apikális CD133 (piros) pozitívítása látható.

D. A portális terekben a CD56 (piros), csupán az itt található képletek körül elhelyezkedő kis idegeket jelöli (nyílhegyek), a laminin pozitív (kék) bazális membránnal határolt CK7 pozitív (zöld) epeut (nyíl) CD56 negatív.

E. A vaszkuláris szeptumban elhelyezkedő CK7 (zöld) és laminin (kék) festéssel megjelenített epeutak CD56 (piros) pozitívak (nyílhegyek).

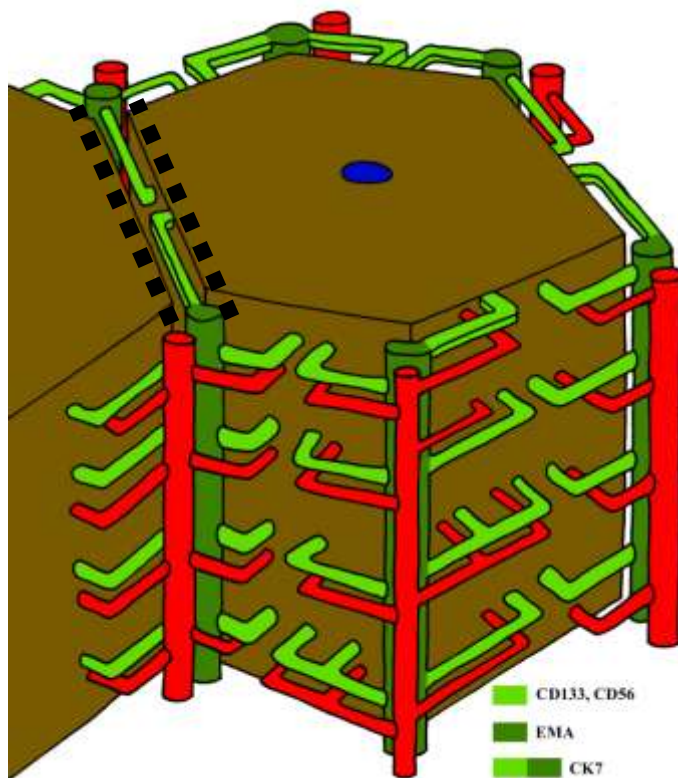
F. Jellegzetes „U” alakú (kis nyilak) laminin pozitív (piros) bazális membránnal határolt CD56 (zöld) pozitív epeút (nyílhegyek) kapcsolódik a zárólemezes hepatocita sorához, mely ezzel a festéssel nem látható. Az epeút mellett laminin pozitív bazális membránnal rendelkező érképlet (nagy nyíl) figyelhető meg.

Egység: A, B, C, D, E, F= 50µm

A kis és nagyobb epeutak fluoreszcens immunhisztokémiai vizsgálata során csupán három marker expressziójában mutatkozott különbség: EMA, CD133 és a CD56.

Az EMA (epiteliális membrán antigén) jellegzetes lineáris membrán lokalizációjú reakciót adott az interlobuláris epeút-hámsejtek apikális pólusán, a vaszkuláris szeptumban található epeutak azonban EMA negatívnak bizonyultak (16.ábra A és B). Ettől eltérően a CD133 (transzmembrán glikoprotein, hemopoetikus- és daganatössejt marker) és CD56 (neurális sejtadhéziós molekula) főként a vaszkuláris szeptum kis epeútjaiban expresszálódtak (16.ábra C). Míg három éves korban minden epeút CD133 pozitivitást mutatott, addig a fiatal felnőttek májában csupán a vaszkuláris szeptumban található epeutak bizonyultak CD133 pozitívnak. Hasonló eloszlást mutatott az epeutak CD56 expressziója: csupán a kis, vaszkuláris szeptumban elhelyezkedő epeutak festődtek CD56-tal (16.ábra D, E és F).

Az epeutak különböző szakaszainak immunfenotípus szerinti megoszlását, az epeutak, a májartéria ágainak elrendeződését a májlebenyke körül a 17. ábra szemlélteti:

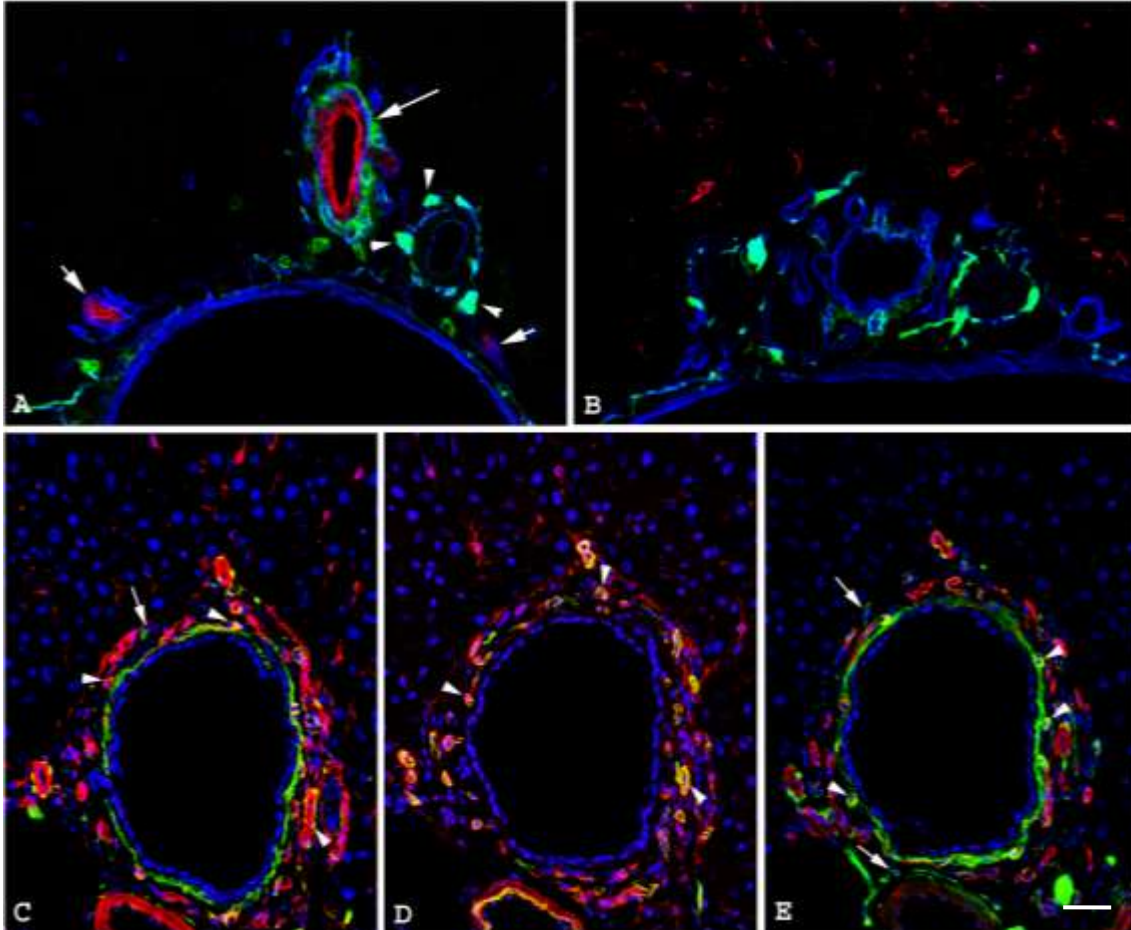


17.Ábra A klasszikus májlebenyke és a hozzátartozó epeutak, valamint a májartéria ágainak sémás ábrázolása (az átláthatóság kedvéért a portális ágak ábrázolásától eltekintettünk). A kis epeutak (világoszöld) és az őket kísérő artériák, a lebenyke szögleteiben elhelyezkedő portális terektől indulnak el. Egy képzeletbeli porto-portális vonal mentén, annak közepéig, egymással szemben haladva csatlakoznak a hepatocitákhoz, így biztosítják az epe elvezetését a lebenyke területéről. A Hering csatornák a világoszölddel feltüntetett epeutaszegmensek legdisztálisabb szakaszai, így a májparenchymához közel, de szintén a vaszkuláris szeptumban helyezkednek el. A két szomszédos lebenyke által határolt vaszkuláris szeptumnak megfelelő területet szagatott vonalak jelölik. A vaszkuláris szeptumban található kis epeutak és a Hering csatornák immunfenotípusa azonos.

V.2. Thy-1 expresszió a májban

V.2.1. Ép patkánymáj Thy-1 expressziója

Fluoreszcens immunhisztokémiai vizsgálataink azt mutatták, hogy ép patkánymájban a Thy-1 expressziója a periportális területekre korlátozódik (18.ábra).



18.Ábra Thy-1 expresszió konfokális mikroszkópos vizsgálata ép patkánymájban. **A.** A képen egy portális tér és a közvetlen környezetében található májparenchima CK19 (piros), Thy-1 (zöld) és laminin (kék) festése látható. A portális térben található képletek, a portális véna, a májartéria, és a CK19 pozitív epeutak laminin pozitív bazális membránnal rendelkeznek. Élénken festődő Thy-1 és laminin pozitív idegrostokat lehet látni az érkepletek körül, legintenzívebben a májartéria ága körül (nyílhegyek). A nagy epeutak körül, azok bazális membránján kívül detektálható Thy-1 pozitívítás (nagy nyíl) teljesen hiányzik a kis epeutak körül (kis nyilak). **B.** A képen a GFAP (piros) Thy-1 (zöld) és laminin (kék) immunhisztokémiai reakciója látható. A GFAP a májparenchimában található „stellate” sejteket jelöli, ettől eltérően a Thy-1 festődés a portális térben található képletek körül van jelen. **C,D,E.** Sorozatmetszeteken készült Thy-1(zöld)/dezmin (piros) (C), SMA (zöld)/dezmin(piros) (D), illetve Thy-1(zöld)/SMA(piros) (E) és TOTO-3 (kék) festés látható. Dezmin (Des) pozitív sejtek (C, D) láthatóak a májparenchimában, az érkepletek valamint a peribiliáris kapilláris plexus (nyílhegyek) dezmin pozitívítása is jól látható. Az SMA expressziója (D, E) főleg a nagyobb érkepletekre illetve a peribiliáris kapilláris plexus szintjére (nyílhegyek) korlátozódik. Elszórtan lehet azonosítani néhány Thy-1 pozitív sejtet (C, E, nyilak), jól látható a nagyobb epeút körül található Thy-1 pozitív felhőszerű képlet, illetve a peribiliáris kapilláris plexus is Thy-1 pozitív. A peribiliáris kapilláris plexus szintjén a Thy-1/Des illetve SMA/Des és SMA/Thy-1 kolokalizációja figyelhető meg. Egység = 50µm

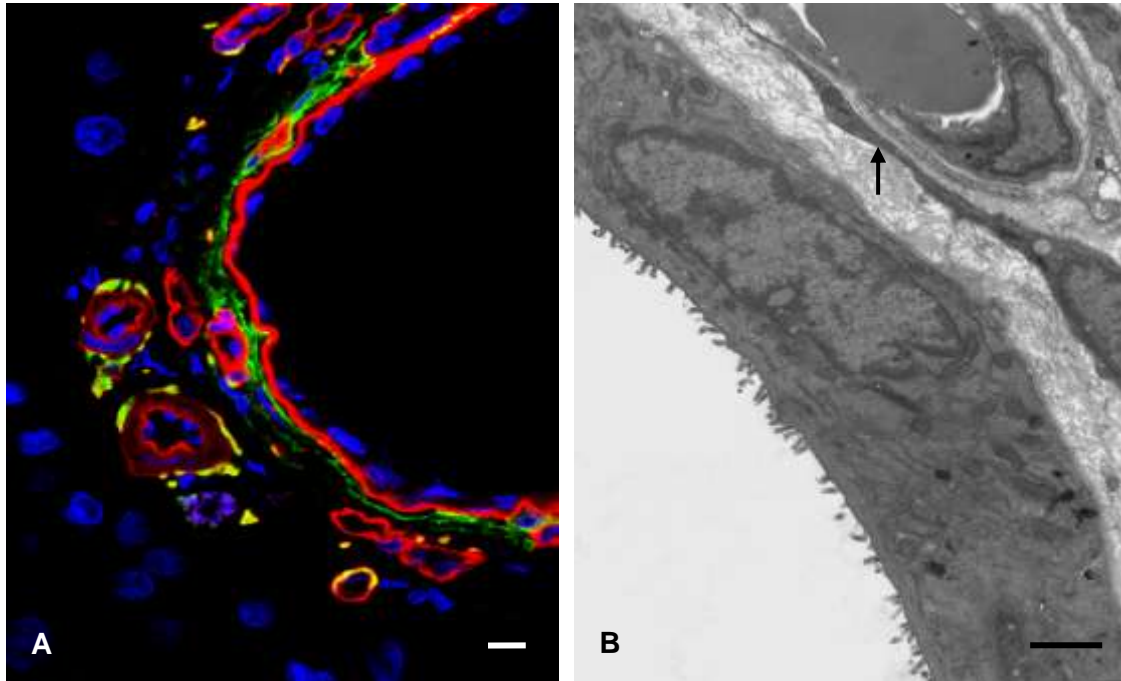
Thy-1 pozitív idegrostok találhatóak a periportális tér képletei körül, ezek közül a legélénkebb festődést a májartéria ágai körül elhelyezkedő idegrostok (18.ábra A) mutatták. A GFAP (glial fibrillary acidic protein) a májparenchimában található nyugalmi állapotban levő csillag alakú, „stellate” sejtek elfogadott markere, kolokalizációt azonban nem mutatott a Thy-1 pozitív struktúrákkal (18.ábra B).

Az ép patkánymáj dezmin Thy-1 és simaizom aktin (SMA) expressziójának összehasonlítását sorozatmetszeteken a fenti markerek immunhisztokémiai kombinálásával végeztük el. A dezmin a májparenchimában található „stellate” sejteket a portális térben a vaszkuláris képleteket jelöli, és jelzi a nagyobb epeutak körül található peribiliáris kapilláris plexust is (18.ábra C és D). A Thy-1-et a már előbbieken leírt képleteken kívül a peribiliáris kapilláris plexus is expresszálja és ezen kívül a periportális kötőszövetben is megfigyelhető néhány Thy-1 pozitív sejt (18.ábra C és E). Az SMA csak a portális véna-, a májartéria-, valamint a peribiliáris kapilláris plexus falában expresszálódik, periportálisan elhelyezkedő SMA pozitív sejteket nem találtunk (18.ábra D és E). Ép patkánymájban tehát a peribiliáris kapilláris plexus szintjén a Thy-1, simaizom aktin és dezmin kolokalizációja figyelhető meg.

Az idegrostokon és a peribiliáris kapilláris plexuson kívül a Thy-1 egy, a nagy epeutakat körülvevő felhőszerű struktúrát is jelöl (18.ábra A és E).

Az epeút hosszanti tengelyére merőleges síkban készített metszeteken jól látható, hogy a ferde metszési síkok miatt felhőszerűnek tűnő struktúrát, tulajdonképpen az epeutak körül egy rétegben elhelyezkedő Thy-1 pozitív sejtek alkotják (19.ábra A). Elektromikroszkópos felvételen a Thy-1 pozitív sejtek az epeút-hámsejtek bazális membránján kívül, attól bizonyos távolságra helyezkednek el, az epeút-hámsejt és a peribiliáris kapilláris plexus között elhelyezkedő hosszú citoplazmatikus nyúlványuk is jól látható (19.ábra B).

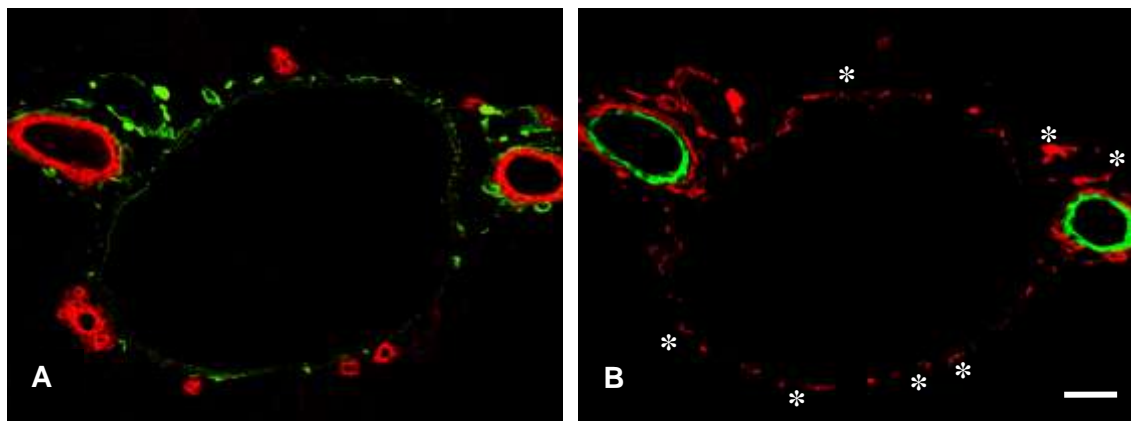
A nagy epeutak körüli Thy-1 expressziót és az epeutak citokeratin immunfenotípusát együtt elemezve kimutattuk, hogy Thy-1 csak a CK19/7 kettős pozitív nagy epeutak körül van jelen, a kis, CK19+/CK7– epeutak körül nem találhatóak Thy-1 pozitív sejtek (20.ábra A és B).



19.Ábra Ép patkánymájban található, nagy epeút körül elhelyezkedő Thy-1 pozitív sejtek konfokális mikroszkópos (A) és elektronmikroszkópos (B) képe

A. Egy nagy epeút és a környezetében található képletek Thy-1 (zöld), laminin (piros) és TOTO-3 (kék) festése látható. Az epeút laminin pozitív bazális membránján kívül egy rétegben elhelyezkedő Thy-1 pozitív sejtek láthatóak, néhol a magjuk (TOTO-3) is jól azonosítható. **B.** Az elektronmikroszkópos felvételen egy epeút-hámsejt, annak bazális membránja, a bazális membránon kívül elhelyezkedő hosszú nyúlvánnyal rendelkező sejt valamint egy peribiliáris kapilláris látható, lumenében egy vörösvértesttel. A sejt, melynek nyúlványa (nyíl) az epeút bazális membránja és a peribiliáris kapilláris között helyezkedik el, megfelelhet Thy-1 pozitív sejtnak.

Egység: A = 10 μ m; B=2 μ m



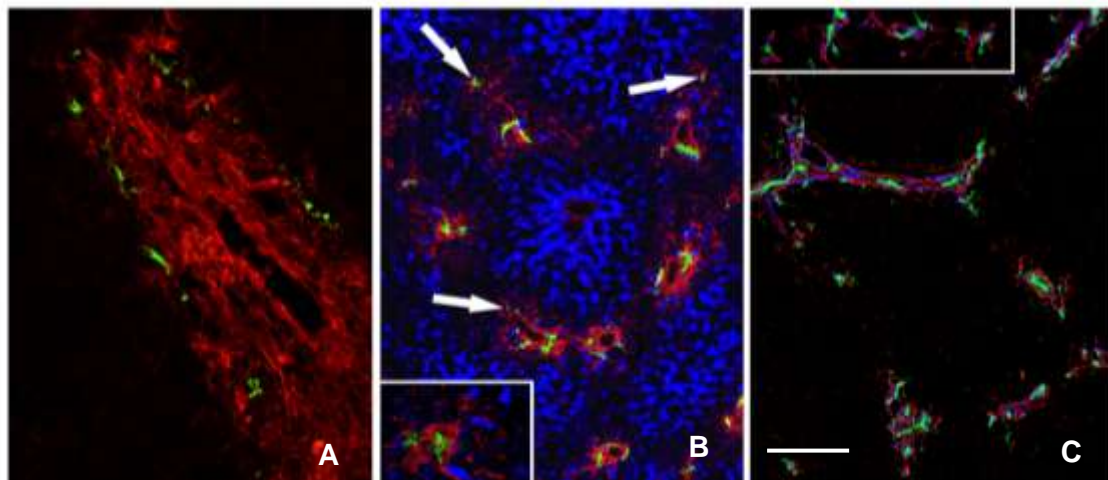
20.Ábra A Thy-1 és a különböző citokeratinok expressziójának vizsgálata sorozatmetszeteken, kontroll patkánymájban

A. Thy-1 (zöld) és CK19 (piros) immunhisztokémiai reakciója; CK19 a periportális térben található összes epeutat jelöli, látható a nagyobb epeutak körüli Thy-1 pozitív sejtréteg, a portális véna ága és májartéria ága körüli Thy-1 pozitív idegek szintén jól láthatóak. **B.** Thy-1 (piros) és CK7 (zöld) immunhisztokémiai reakciója; Az epeutak körüli Thy-1 pozitív sejtréteg csupán a nagy interlobuláris CK19/CK7 kettős pozitív epeutak körül figyelhető meg. Az **A** ábrán szereplő CK19+/CK7- epeutak helyét csillaggal jelöltük meg.

Egység: 20 μ m

V.2.2. Ép humán máj Thy-1 expressziója

A Thy-1 expressziót megvizsgáltuk ép humán máj különböző fejlődési stádiumaiban és felnőtt korban egyaránt. Az epeutak hámsejtjei minden vizsgált időpontban Thy-1 negatívnak bizonyultak. 23 hetes fetusz májából származó minta fluoreszcens immunhisztokémiai elemzése során Thy-1 pozitív sejtekben gazdag portális teret és ennek szélén pedig a már felszakadozott „ductal plate”-ből kialakult Thy-1 negatív epeutakat találtunk (21.ábra A). A fejlődés további stádiumában, a gesztáció 39. hetében a Thy-1 pozitív sejtek által körülvevett epeutak a portális terek felől a lebenyke széle mentén haladva elkezdik kialakítani a lebenykét határoló vaszkuláris/interlobuláris szeptumot (21.ábra B). Felnőtt korban a portális terek és a már kialakult vaszkuláris szeptum Thy-1 pozitív sejtekkel gazdagon körülvevett CK7 pozitív epeutakat tartalmaz (21.ábra C).



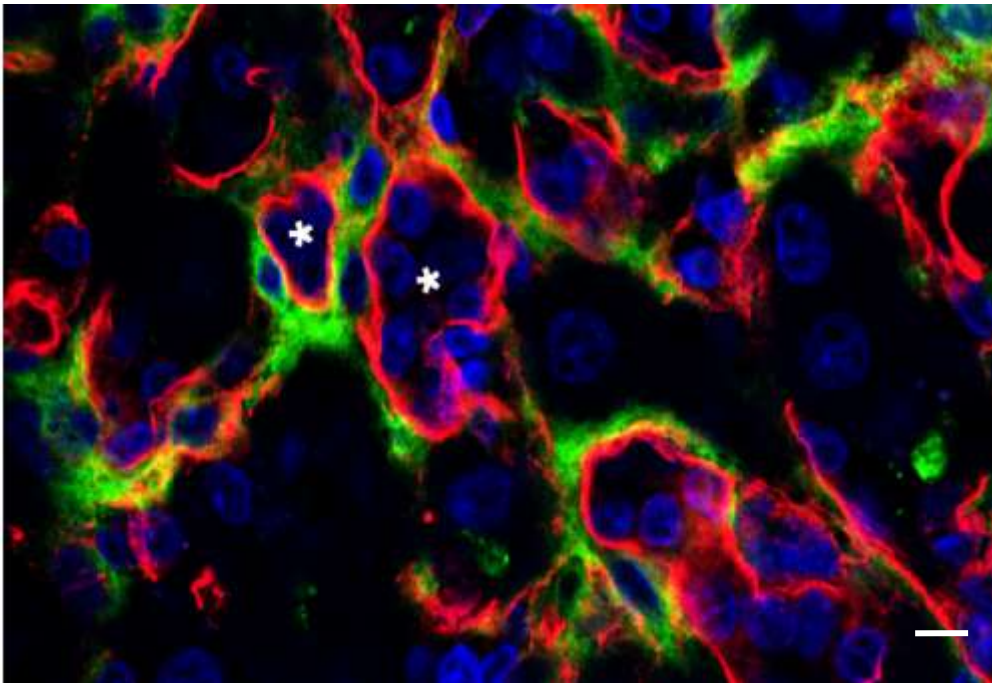
21.Ábra A Thy-1 expresszió vizsgálata 23-, 39 hetes fetuszok illetve 26 éves felnőtt ép májából származó mintákon

A. A fejlődés 23. hetében a portális tér Thy-1 pozitív (piros) sejtekben gazdag kötőszövetébe ágyazott CK7 pozitív (zöld) epeutakat láthatunk. **B.** A fejlődés 39. hetében a CK7 pozitív (zöld) epeutak az őket körülvevő Thy-1 pozitív sejtekkel (piros) kialakítandó a lebenykét határoló vaszkuláris szeptumot már benyúlnak ennek területére (nyilak). A lebenyke területén található májsejteket a midzonálisan és pericentrálisan expresszálódó enzim, a citokróm p450 (kék) által tettük láthatóvá. **C.** 26 éves felnőtt ép májából származó mintán egy teljes májlebenyke képét láthatjuk. A lamininnel (kék) határolt CK7 pozitív epeutak (zöld) mind a portális terekben mind pedig a vaszkuláris szeptum mentén megtalálhatóak, körülöttük számos Thy-1 (piros) pozitív sejt helyezkedik el.
Egység: A, B, C =200µm

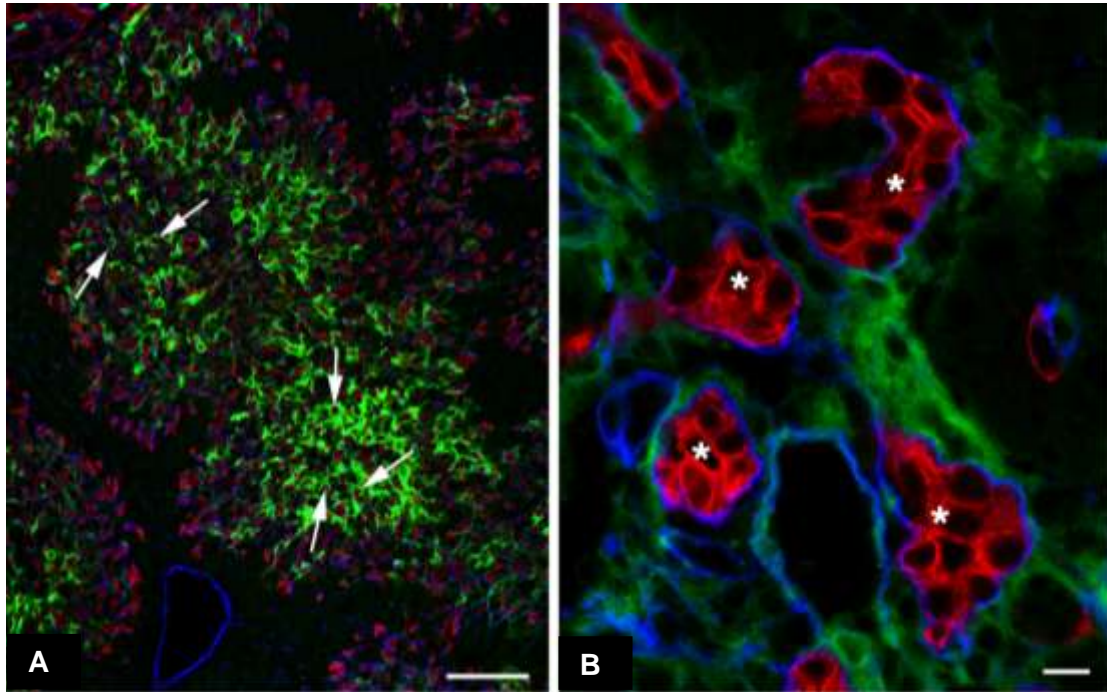
V.2.3. Ovális sejteket tartalmazó patkánymáj Thy-1 expressziója

Az AAF/PHx kísérleti rendszer alkalmas intenzív ovális sejtes proliferáció előidézésére. Ebben a kísérletben 2-3 nappal a műtét után megjelenő ovális sejtek, folytonos laminin pozitív alaphártyával rendelkeznek, körülöttük számos, hosszú citoplazmatikus nyúlványokkal rendelkező „stellate” sejt és/vagy miofibroblaszt található. Parciális hepatektómia után különböző időpontokban fluoreszcens immunhisztokémiai módszerekkel vizsgált májminták Thy-1 festése hasonló mintázatot mutatott. A laminin pozitív bazális membránnal határolt OV6 pozitív ovális sejtek alkotta duktusok mindvégig Thy-1 negatívnak bizonyultak (22.ábra és 23.ábra A és B). A néhol hosszú citoplazmatikus nyúlványokkal rendelkező Thy-1 pozitív sejtek az ovális sejtek alkotta csövek közvetlen közelében, de mindig azok bazális membránján kívül helyezkedtek el (23.ábra B).

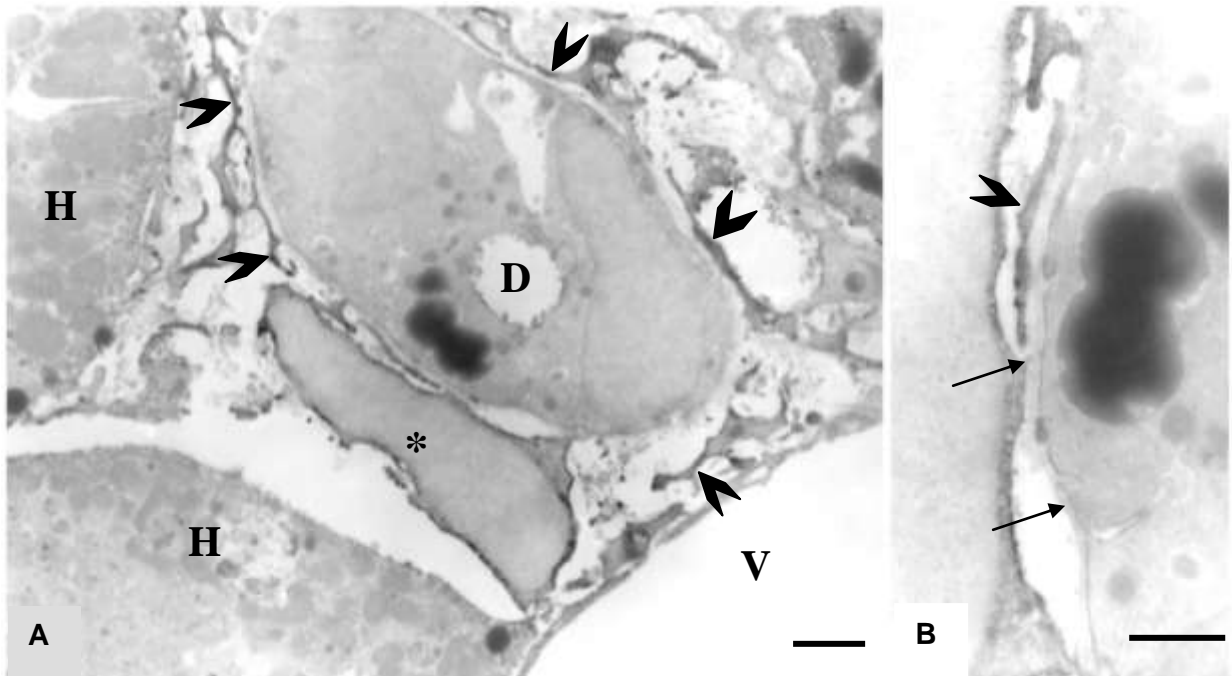
Az immunelektronmikroszkópos vizsgálatok megerősítették a fluoreszcens immunhisztokémiai eljárás során kapott eredményeket. A Thy-1 pozitív sejtek az ovális sejtek által alkotott csövek mellett, de kizárólag a bazális a membránon kívül helyezkedtek el (24.ábra).



22.Ábra AAF/PHx kísérletben parciális hepatektómia után 9 nappal a TOTO-3 (kék) magfestés mellett, az ovális sejtek alkotta duktusok (csillag) folytonos bazális membránját a piros színnel jelzett laminin mutatja. A zöld Thy-1 pozitív sejtek kizárólag a duktusok bazális membránján kívül helyezkednek el. Egység =10 μ m



23.Ábra Parciális hepatektómia után 9 nappal az OV6 (piros) az ovális sejtek alkotta duktusokat, ezek folytonos bazális membránját pedig a kék színű laminin jelzi. A kis nagyítású képen (A) a Thy-1 (zöld) pozitív sejtek (nyilak) az OV6 pozitív duktusok által elfoglalt területen, a duktusok körül helyezkednek el. A nagy nagyítású képen (B) jól látható, hogy a Thy1 (zöld) pozitív sejtek bár a lamininnel körülvelt OV6 pozitív duktusok (*) körül, de ezek bazális membránján kívül találhatók. Egység: A=200 μ m; B=10 μ m



24.Ábra A. Parciális hepatektómia után 9 nappal egy az ovális sejtek alkotta duktus (D), a közvetlen környezetében található májsejtek (H) és egy portális véna fal (V) elektronmikroszkópos képe látható. Az immunelektronmikroszkópos eljárás során keletkezett, Thy-1 pozitív reakciónak megfelelő fekete csapadék csak a csillaggal jelzett periduktális sejteken és a (B) duktusokat körülvevő, a bazális membránhoz (nyilak) ugyan közel, de ezen kívül elhelyezkedő, hosszú citoplazmatikus nyúlványokon (nyílhegyek A és B ábrán) figyelhető meg. Egység: A=2 μ m; B=1 μ m

Miután a Thy-1-et nem sikerült kimutatni az ovális sejteken, a Thy-1 pozitív sejtek azonosítása érdekében kolokalizációs vizsgálatokat végeztünk. Az irodalmi adatok sokasága és sokszínűsége miatt rengeteg lehetőséggel kellett számolnunk.

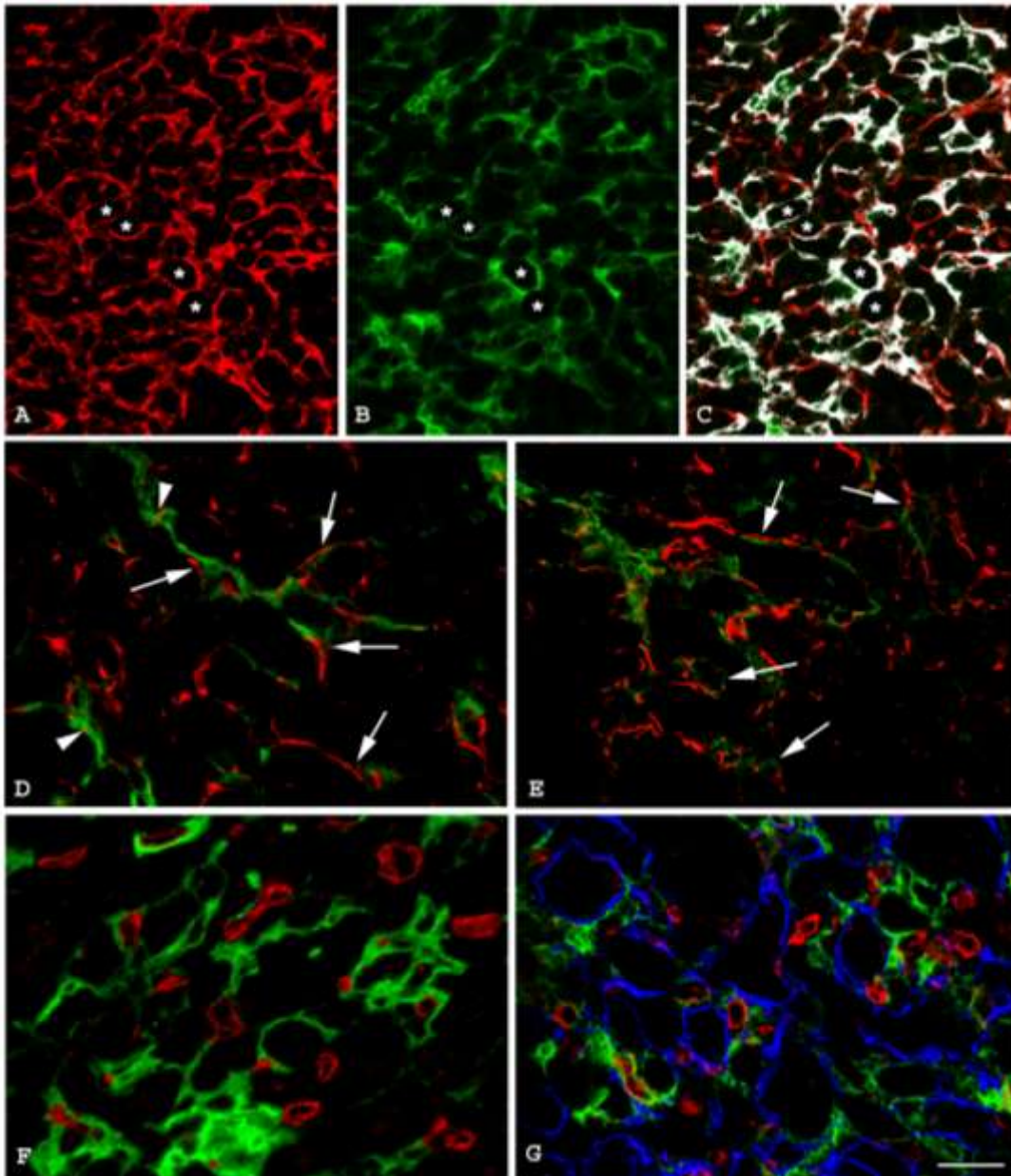
A különböző immunhisztokémiai kombinációkban elvégzett vizsgálatok Lyve-1 (25. ábra F) és CD45 ellenanyagokkal (25. ábra G) kizárták, hogy a Thy-1 endotélsejteket vagy leukocitákat jelölne.

Elhelyezkedésük és morfológiájuk alapján a Thy-1 pozitív sejtek leginkább miofibroblasztra, vagy „stellate” sejtre emlékeztettek, így ezek legismertebb markerével az SMA-val és dezminnel is kombináltuk a Thy-1-et.

A kolokalizációs vizsgálatok során, az egy metszeten különböző fluorokrómmal kapcsolt antitesteket egyenként a megfelelő hullámhosszon gerjesztettük és az így készült felvételeken határoztuk meg a jel által elfoglalt terület nagyságát. A képeket ezek után egyesítettük (merge) és meghatároztuk a kolokalizáló pixelek arányát is. A kolokalizáló pixeleket a program egy harmadik képen, fehér színben jelenítette meg.

A vizsgálatok elvégzése során a Thy-1 pozitív sejtek $80,3 \pm 9,6\%$ bizonyult SMA pozitívnak is, az SMA sejtek csupán $58 \pm 9,3\%$ volt Thy-1 pozitív is (25. ábra A, B és C). Megismételve a fentieket dezminnel is a Thy-1 pozitív sejtek csupán $6,8 \pm 2,3\%$ bizonyult dezmin pozitívnak is. A dezmin pozitív sejtek és a Thy-1 pozitív sejtek nyúlványai jól elkülönülten haladnak egymás mellett, ritkán keresztezik is egymást, ennek eredménye a kis, szinte jelentéktelen kolokalizációs index (25. ábra D).

A dezmin SMA-val kombinálva szintén elhanyagolható, kis kolokalizációs indexet ($7,16 \pm 1,2\%$) kaptunk eredményként (25. ábra E).



25.Ábra Thy-1 és egyéb sejtmakerek kolokalizációs vizsgálatának konfokális mikroszkópos képe AAF/PHx protokoll szerint kezelt állatokban, 9 nappal PHx után.

A, B. SMA (piros) és Thy-1 (zöld) kettős immunfestés látható. Az ovális sejtek alkotta csövek (csillag) körül mind az SMA, mind a Thy-1 pozitív sejtek megtalálhatóak.

C. Az összeillesztett képen az SMA és Thy-1 pozitív sejtek által elfoglalt területek kolokalizációját a fehér szín jeleníti meg.

D. A dezmin (piros) és Thy-1 (zöld) immunfestés legtöbb esetben eltérő struktúrákat jelöl (nyilak), csupán néhány ponton figyelhetünk meg a kolokalizációt jelző sárga színt (nyílhegyek).

E. Az ovális sejtek alkotta csövek körül elhelyezkedő sejtek SMA (zöld) és dezmin (piros) festése szintén eltérő képleteket jelöl (nyilak).

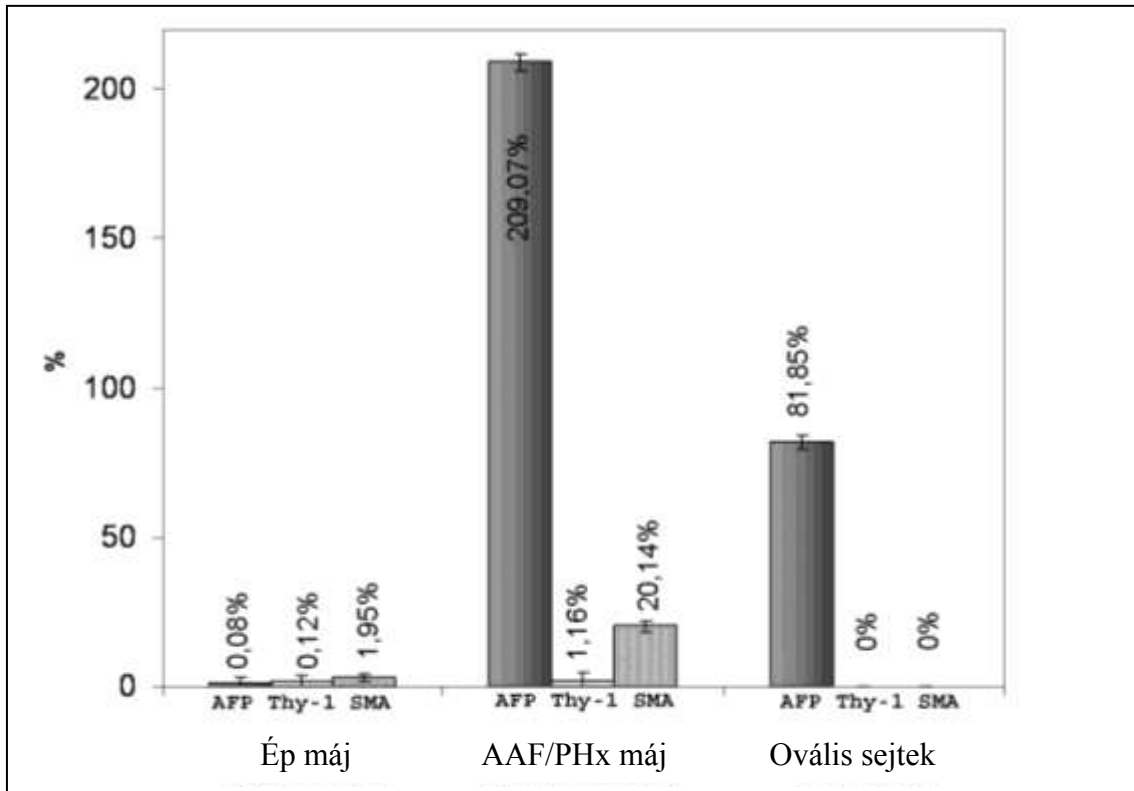
F. A proliferáló ovális sejtek alkotta csövek által elfoglalt területen a Lyve (piros) pozitív endotélsejtek nem expresszálnak Thy-1 –et (zöld).

G. Az ovális sejtek alkotta csövek bazális membránját kék színű laminin jelzi, a bazális membránokon kívül két, jól elkülönülő sejtpopuláció látható: CD45 (piros) pozitív sejtek és Thy-1 (zöld) pozitív sejtek is megfigyelhetők.

Egység= 50µm

V.2.4. A Thy-1 expresszió vizsgálata mRNS szinten

Az AAF/PHx kísérlet során elvégzett immunhisztokémiai vizsgálatokban a Thy-1 fehérjét nem sikerült kimutatnunk az ovális sejtekben, az ovális sejtek esetleges Thy-1 mRNS expressziójának detektálására QRT-PCR vizsgálatokat végeztünk.



26.Ábra Az AFP, Thy-1 és SMA expressziós mintázatának vizsgálata teljes májszövetből (ép- és AAF/PHx protokoll szerint kezelt patkánymáj) illetve lézermikrodisszekció során elkülönített ovális sejtpopulációban. A százalékban kifejezett relatív génexpressziós szinteket a GAPDH-hoz viszonyítva határoztuk meg.

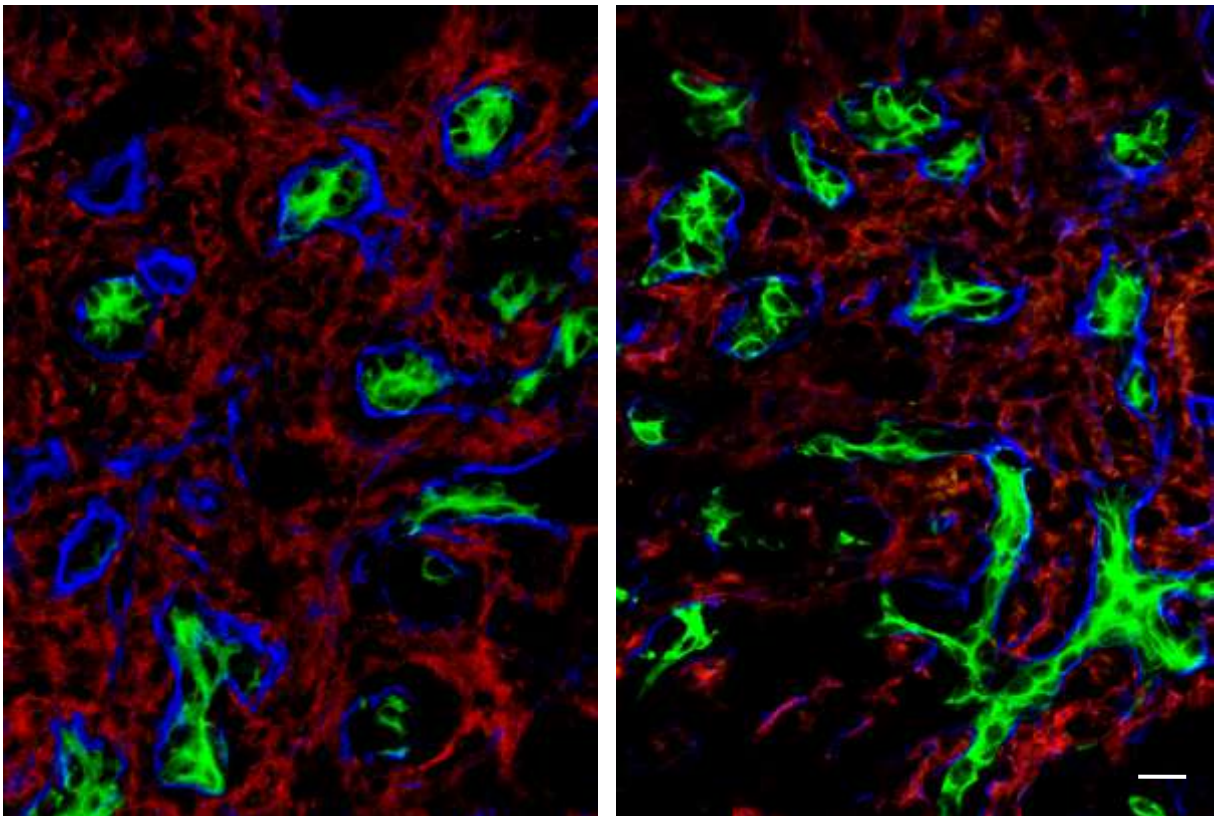
A morfológiai vizsgálatoknak megfelelően a teljes májszövetből származó minta QRT-PCR vizsgálata során azt találtuk, hogy a kontroll patkánymáj Thy-1 mRNS expressziója igen alacsony. Hasonlóan alacsony SMA és AFP mRNS expressziós szintet sikerült detektálni (26.ábra).

Az AAF/PHx protokoll szerint kezelt, a PHx után 9. napon leölt patkányok májából izolált RNS-ben jelentősen emelkedett AFP mRNS szintet találtunk, de az SMA és Thy-1 expresszió is magasabb volt, mint az ép májban (26.ábra).

A lézermikrodisszekcióval nyert ovális sejt populációban az ezekre jellemző magas AFP expressziót találtunk, SMA és Thy-1 mRNS-t nem sikerült detektálnunk (26.ábra).

V.2.5. Thy-1 expressziója humán májban, atípusos duktuláris reakció esetén

Az ovális sejtes proliferációval teljesen megegyező reakciót emberi májban még nem sikerült megfigyelni, azonban fulmináns májelégtelenség során kialakuló úgynevezett atípusos duktuláris reakció, ha morfológiai szempontból nem is teljesen, de biológiailag szinte ekvivalensnek tekinthető. Az úgynevezett atípusos duktuláris reakció során, periportálisan, az ovális sejtek alkotta csövekhez hasonló, szűk lumennel és folytonos bazális membránnal rendelkező, intermedier hepatobiliáris sejtek által felépített duktusok figyelhetők meg. A duktusok között hosszú citoplazmatikus nyúlványokkal rendelkező Thy-1 pozitív sejtek helyezkednek el, az intermedier hepatobiliáris sejtek nem festődtek a Thy-1 ellenanyaggal (27.ábra).



27.Ábra Humán májban, fulmináns májelégtelenség során a periportális térben elhelyezkedő CK19 (zöld) pozitív csövek körül folytonos laminin (kék) pozitív bazális membrán található. A bazális membránon kívül, Thy-1 (piros) pozitív sejtek és hosszú nyúlványaik láthatóak.
Egység = 10µm

VI. MEGBESZÉLÉS

Ma már általánosan elfogadott nézet, hogy a felnőtt kísérleti állatok, de humán májban is létezik egy olyan primitív, sem a terminálisan differenciált hepatociták, sem pedig az epeút-hámsejtek tulajdonságaival nem rendelkező sejtpopuláció, amely súlyos károsodás esetén képes a parenchima pótlására, azaz „őssejtként” viselkedik. Különböző kísérleti rendszerekben, több sejtpopuláció is képesnek mutatkozott erre a funkcióra, de napjainkra, abban is konszenzus van kialakulóban, hogy, ha nem is kizárólagosan, de a legnagyobb „őssejt-potenciállal” az úgynevezett Hering csatornákat felépítő sejtek rendelkeznek. Amennyiben az őssejtek valóban az epeutak legdisztálisabb szakaszában helyezkednek el, akkor a Hering csatornák immunfenotípusának, felépítésének és pontos elhelyezkedésének megismerése kulcsfontosságú lehet a szomatikus őssejtek megismerésében. Annak ellenére, hogy a májbeli őssejtkutatások kapcsán jelentősen felértékelődött ezeknek a képleteknek az azonosítása, nem volt ismert sem pontos szerkezetük és megbízható, egyedi felismerésüket elősegítő immunfenotípusuk sem. Ezért kísérleteink fő célkitűzése volt annak a megvizsgálása, hogy, patkány és humán májban immunhisztokémiai módszerekkel elkülöníthetőek-e az „őssejtként” viselkedő epeút hámsejtek az egyéb epeút hámsejtektől, és ha felismerünk ilyen sajátos immunprofil, annak segítségével szeretnénk volna feltérképezni a Hering csatornák pontosabb szerkezetét.

Eredményeink szerint ezek a képletek immunhisztokémiai módszerekkel azonosíthatóak, de mind immunfenotípusukban, mind májszövetbeli elhelyezkedésükben nagy különbségek vannak a patkány és a humán májban található Hering csatornák között. A Hering csatornák patkánymájban CK19+/CK7-, humán májakban pedig CD56+/CD133+/EMA- sajátos immunfenotípussal rendelkeznek.

A hepatikus őssejtek potenciális csontvelői eredetét a belőlük származó progenitor sejtek Thy-1 pozitívításával próbálták alátámasztani (Petersen és mtsai 1998, 1999). Immunhisztokémiai- és molekuláris biológiai vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a Thy-1 antigén sem patkány-, sem pedig humán májakban nem a progenitor sejtek, hanem a velük szoros kölcsönhatásban levő miofibroblasztok markere.

Az epeutak morfológiai és funkcionális heterogenitása jól ismert (Alpini és mtsai 1996; 1998). A Hering csatornák a saját bazális membránnal rendelkező epeutak

legdisztálisabb szakaszát képviselik, nincs olyan specifikus immunhisztokémiai vagy egyéb morfológiai markerük, amely megkönnyítené felismerésüket: csupán speciális elhelyezkedésük alapján ismerhetők fel, a májlebenyke zárólemeze mentén találhatóak, alkotásukban epeút-hámsejtek és hepatociták egyaránt részt vesznek (Paku és mtsai 2001; Grisham és mtsai 1964).

Kísérleteink során az ép patkánymájak periportális kötőszövetébe ágyazva, jellegzetes CK19+/7– immunfenotípusú kis epeutak voltak megfigyelhetőek, melyek magukba foglalták a konfokális mikroszkóppal, biztonsággal azonosítható, bazális membránnal körülvett, hepatocitákon végződő Hering csatornákat is. Ez a fenotípus különbözik a nagyobb epeutak CK19+/7+ citokeratin profiljától.

Vizsgálataink azt mutatták, hogy ez a jellegzetes fenotípus születéskor még nincs jelen a patkánymájban, posztnatálisan, de novo alakul ki vagyis a máj őssejtek nem az egyedfejlődés során visszamaradt primitív sejtek, hanem aktív folyamat eredményeként jönnek létre.

A CK7 negatív epeutak lefutását sorozatmetszeteken követve, azt találtuk, hogy meglepően hosszú, olykor elágazódó duktusokat formálnak. Sohasem lépik át a portális tereket határoló zárólemezeket, nem terjednek be a hepatociták közé, de a parenchima felé mindig sajátos, Hering csatornáknak megfelelő képletekben végződnek. Tehát ha definíciószerűen szeretnénk alkalmazni ezekre az epeút-szakaszokra a Hering csatorna meghatározását (Roskams és mtsai 2004), láthatjuk, hogy ez, nem minden CK7 negatív epeút-szakaszra érvényes. Eredményeink alapján azonban, ez a periportális térben található sajátos citokeratin mintázattal rendelkező kis epeutakból felépülő hálózat, amely magába foglalja a klasszikus definíciónak megfelelő Hering csatornákat is különleges morfo-funkcionális egységet alkot az ép, kontrol patkánymájban.

Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy az AAF kezelés alkalmas a hepatikus őssejtek aktivizálására (Paku és mtsai 2001). Ennek eredményeként az őssejtekből, a nagyobb számban előforduló és ezért könnyen azonosítható, magjuk alakjáról oválisnak nevezett sejtek alakulnak ki. Kísérleteinkben az AAF kezelés a CK19+/7– fenotípusú epeút-hámsejtek szignifikánsan magasabb proliferációját váltotta ki; gyakrabban léptek be a sejtciklusba, mint a CK19+/7+ sejtek. Egyelőre nem áll rendelkezésre ennél megbízhatóbb funkcionális vizsgálat, így eredményünket úgy értelmezzük, hogy a patkányok májában jelenlevő CK19+/7– fenotípusú kis epeutak hámsejtjei, melyek

magukban foglalják a Hering csatornákat alkotó sejteket is, felelnek meg a máj saját őssejt kompartmentjének.

A májban található szomatikus őssejtek potenciális csontvelői eredetét mind humán májokban, mind pedig kísérleti állatok májában a belőlük származó progenitor sejtek Thy-1 pozitivitásával próbálták alátámasztani (Petersen és mtsai 1998, Petersen és mtsai 2003)

A Thy-1 többféle, többek között hemopoetikus és mezenchimális őssejteken is jelen levő antigén, amit immunhisztokémiai vizsgálattal kimutattak patkánymájban az ovális sejteken, az AAF/PHx kísérletes regenerációs modellben (Petersen és mtsai 1998). Sejtfelszíni molekula lévén, a Thy-1-et kiterjedten alkalmazzák az őssejt mediált májregenerációban részt vevő ovális sejtek (szomatikus őssejtek leszármazottjai patkánymájban) azonosítására illetve áramlási citometriás és mágneses sejtszeparálás módszerekkel történő elkülönítésére (Petersen és mtsai 1998, Shupe és mtsai 2009).

A májban levő őssejtekből származó progenitor sejtek Thy-1 expresszióját kísérleti állatokban, az AAF/PHx kísérleti rendszerben vizsgáltuk. Immunhisztokémiai és mikrodisszekcióval elkülönített sejtekből végzett QRT-PCR vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a Thy-1 mRNS és fehérje nem az ovális sejtekben, hanem a velük szoros közelségben elhelyezkedő periduktális sejteken van jelen. Az ovális sejtes reakció során a Thy-1 és simaizom aktin összehasonlító immunhisztokémiai vizsgálata során emelkedett kolokalizációs indexet találtunk. A „stellate” sejtek másik elfogadott markere a dezmin, viszont nem mutatott kolokalizációt a Thy-1 festéssel. Ezt azért találtuk meglepőnek, mert a simaizom aktin és dezmin, egyaránt és széles körben elfogadott „stellate”sejt/miofibroblaszt marker, vizsgálatainkban azonban ez a két marker, különböző sejtpopulációkat jelölt. A Thy-1 pozitív sejtek tehát az általunk alkalmazott kísérleti rendszerben, leginkább a miofibroblaszt populációhoz tartoznak.

A „stellate” sejtek és/vagy miofibroblasztok eredete és immunfenotípusa a máj pato-biológiájának legellentmondásosabb kérdésköre. Számos kutató szerint ezen sejtek esetében csupán eltérő aktivációs állapotról beszélhetünk, mások szerint két teljesen eltérő sejtpopulációról van szó. Thy-1 pozitív miofibroblasztokról tüdőben (Sanders és mtsai 2010) és szívben (Hudon-David és mtsai 2007) is beszámoltak, a miofibroblasztok Thy-1 pozitivitása szoros összefüggést mutatott a sejtek aktivációs

állapotával; a fibrózis megjelenésekor a Thy-1 pozitív sejtek száma csökkent (Hagood és mtsai 2005).

Eredményeinket mások megfigyelései is alátámasztják. Számos szerző (Kamo és mtsai 2007, Hoppo és mtsai 2004, Dudás és mtsai 2007, 2009) kísérleteiben Thy-1 pozitív mezenchimális sejtekről számol be és a progenitor sejtek érésében betöltött szerepüket vizsgálja. 2009-ben Yovchev és munkatársai QRT-PCR, áramlási citometria és immunhisztokémiai vizsgálatokkal megállapították, hogy az ovális sejtes reakcióban a Thy-1 pozitív sejtek egy, a miofibroblasztoktól, „stellate” sejtektől és ovális sejtektől különböző, aktivált mezenchimális-epiteliális sejt.

A Thy-1 molekula foszfatidilinozitol segítségével kötődik a sejtfelszínhez (Rege és Hagood 2006). Kísérleteinkben a fagyasztott metszetek Triton-X oldattal való előkezelése után nem sikerült Thy-1 pozitív immunfestést végrehajtani. A Thy-1 „vedlési” képessége jól ismert, a szérumban leírták szolubilis formáját is (Saalbach és mtsai 1999), így könnyen elképzelhető hogy a sejtizoláció folyamata során használt enzimatis emésztési, majd mosási lépések alkalmával, a gazdasejt felszínéről leváló Thy-1 molekula egy másik sejt felszínéhez kapcsolódik, ezáltal vezetve téves eredményekhez a Thy-1 alapú sejtizolálás során.

Az ép patkány májokban megfigyelt, epeutak körül elhelyezkedő Thy-1 pozitív sejtek, nem expresszáltak sem simaizom aktint, és dezmin festéssel sem bizonyultak pozitívnak, így ezek a sejtek legnagyobb valószínűséggel „portális fibroblaszt”-nak (Dranoff és Wells 2010) felelnek meg. Könnyen elképzelhető, hogy az ovális sejtek proliferációja során ezek a sejtek aktiválódnak, és ennek a folyamatnak egyik jele lehet a simaizom aktin expresszió megjelenése.

A Thy-1 pozitív sejtek pontos eredetének és funkciójuknak meghatározása további kísérleteket igényel, de eredményeink szerint a májban a Thy-1 molekula őssejt vagy progenitor sejt markerként való használata nem ajánlott.

A CK19+/CK7– fenotípus humán májban nem alkalmazható az őssejtek azonosítására, ép emberi májban nem sikerült CK7– duktulusokat azonosítanunk, de a Hering csatornák humán májokban is a többi epeút szakasztól eltérő sajátos immunfenotípussal (CD56+/CD133+/EMA–) rendelkeznek, ami lehetővé teszi ezeknek a képleteknek az egyértelmű azonosítását.

A Hering csatornákat humán májban is eredetileg rövid epeút-szakaszokként írták le (Hering 1867), melyek a határoló lemezke hepatocitasoránál helyezkednek el, összeköttetést biztosítva az epekanalikulusok és az interlobuláris epeutak között. Theise és munkatársai (1999) kimutatták, hogy ez az epeút-szegmens átnyúlhat a határoló lemezke májsejtsorán. Kísérleteinkben azt találtuk, hogy a panCK antitesttel könnyen azonosítható szűk lumenű epeutak, a patkány májában talált epeutak megoszlástól eltérően, humán májakban valóban elhagyják a periportális kötőszövetet és megjelennek a hepatociták között a parenchimában, de itt az elrendeződésük nem véletlenszerű, hanem szigorú szabályokat követ. Az emberi májban hagyományos szövettani metszeteken nem ismerhető fel a porto-portális tengelyek mentén levő, úgynevezett vaszkuláris szeptum, számos állatfajban azonban jól fejlett kötőszövetes sővények formájában jelenik meg (Ekataksin és Wake 1997).

Vizsgálatainkban azt találtuk, hogy a parenchimába terjedő kis epeutak mindig ennek a porto-portális tengelynek megfelelően helyezkednek el, sőt immunhisztokémiai módszerrel a környezetükben I-es típusú kollagén is kimutatható volt, jelezve, hogy „csökevényes” formában, az emberi májban is jelen vannak ezek a vaszkuláris szeptumok. Az epeuktulusok tehát, ezekben a szeptumokban találhatóak és a szeptumok mentén levő hepatocitákkal alkotnak a Hering csatornáknak megfelelő kapcsolatot, a májsejtek közé azonban sohasem terjednek be. Ép emberi májban a kisebb epeút-szakaszok a portális tereken kívül, tehát a parenchimában is fellelhetőek, de mégis mindig a májlebenyke területén kívül a vaszkuláris szeptumokban maradnak. Természetesen ez a fajta elrendeződés a hagyományos szövettani metszeteken nem ismerhető fel.

A leírt kis epeutakat mindig kísérték érkepletek is. Korábbi megfigyelések (Gouw és mtsai 2006, Teutsch 2005) a vaszkuláris szeptumban található CD31 pozitív ereket a portális véna terminális ágainak gondolták. Számos kísérlet próbálta bizonyítani az epeutakat kísérő artériák jelenlétét a vaszkuláris szeptumban, megbízható artéria marker hiányában azonban ezek a feltételezések sosem nyertek bizonyítást (Matsumoto és mtsai 1979, Yamamoto és mtsai 1985, Saxena és mtsai 1999).

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a vaszkuláris szeptumban NG2 (Murfee és mtsai 2005) pozitív artériák is találhatóak. Kísérleti állatokban (patkány, egér) a máj artériás vérrellátása a gazdag arterio-portális anasztomózisokon keresztül valósul meg

(Haratake és mtsai 1990). A májartéria terminális ágai az arterio-portális anasztomózisokon kívül, részt vesznek a peribiliáris kapilláris plexus alkotásában, direkt artériás ellátása csupán egyetlen, a lebenyke alapi részén elhelyezkedő HMS –nek van. Ezzel szemben humán májban nincsenek arterio-portális anasztomózisok, a májartéria terminális ágainak lefutása alapján, minden, a májlebenyke alkotásában résztvevő HMS direkt artériás vérellátású.

Az epeutak posztnatális fejlődése és érése mind patkányban (Van Eyken és mtsai 1988) mind pedig humán májban (Lemaigre 2003) jól ismert. Az intrahepatikus epeutak a „ductal plate”-ből alakulnak ki, fejlődésük, elongációjuk születés után is folytatódik (Roskams és Desmet 2008).

Az úgynevezett „kolangiogenezis”, ahogy ezt humán májban a gesztáció 39. hetében történt vizsgálatainkban kimutattuk, a primitív vaszkuláris szeptumok mentén zajlik le. Az általunk vizsgált korlátozott számú minta alapján úgy tűnik, hogy humán májakban az epeutak és az őket kísérő erek elrendeződése a vaszkuláris szeptumban 3 éves kor körül válik teljessé, és bár felnőtt korban is megfigyelhető, az interlobuláris epeduktulusok száma a korrallal csökken. Az epeduktulusok számának csökkenése történhet abszolút módon az epeút-hámsejtek apoptózisa miatt, de ugyanakkor a fejlődés során a májlebenyekék méretének növekedése miatt (Papp és mtsai 2009) ez a csökkenés lehet relatív is.

A patkánymájtól eltérően, humán májakban a kis- és a nagyobb interlobuláris epeutakat nem sikerült megkülönböztetni a bennük jelen levő citokeratin altípusok alapján. További kísérleteinkben, számos az epeutakban heterogén módon expresszálódó antigén illetve őssejt markerként leírt molekula expresszióját vizsgáltuk meg immunhisztokémiai módszerrel. A különböző epeút-szegmensek három antitesttel konzekvensen eltérően reagáltak. Vizsgálatainkban a nagyobb, interlobuláris epeutak CD56–/CD133–/EMA+ immunfenotípusúnak bizonyultak szemben a kis epeutak CD56+/CD133+/EMA– expressziójával. Korábban már mindhárom markert leírták és használták az ős/progenitor sejt kompartment jellemzése kapcsán. Az atípusos duktuláris reakciók CD56+/EMA–, míg a típusos duktuláris reakciók CD56–/EMA+ festődésűek (Sonzogni és mtsai 2004). A CD56 protein és a mRNS a proliferáló duktusokon kívül az ép, egészséges humán máj duktulusaiban is megtalálható (Schmelzer és mtsai 2006, Zhang és mtsai 2008). A CD133 hemopoetikus őssejtmarker,

humán májban mRNS szinten először Miraglia és munkatársai (1997) írták le. Később a proteint kimutatták a Hering csatornában (Karbanová és mtsai 2008), de atípusos duktuláris reakciókban (Craig és mtsai 2004) is leírták expresszióját.

Kísérleteinkben az epeutak CD133 expressziója változik a korról. Míg gyerekkorban minden epeút-szakasz CD133 pozitív, addig felnőttkorban csupán a kisebb epeút-szakaszok (beleértve a Hering csatornát is) mutatnak festődést ezzel a markerrel. Tehát az epeutak végleges immunfenotípusa ép humán májban is születés után alakul ki.

Humán májokban a Thy-1 antigén expressziója megegyezett a patkánymájban tapasztaltakkal. Ép humán májokban az epeutak minden vizsgált időpontban Thy-1 negatívnak bizonyultak. Fulmináns májelégtelenség során kialakuló regeneratív folyamatok eredményeként humán májokban megjelenő intermedier hepatobiliáris sejtek (szomatikus őssejtek leszármazottjai humán májokban) vizsgálatainkban szintén Thy-1 negatívnak bizonyultak.

Eredményeink alapján tehát megállapítható, hogy bár megoszlásában és immunfenotípusában különböznek egymástól, de ép patkány és humán májokban egyaránt kimutathatóak, olyan hosszú, szűk lumenű az interlobuláris epeutaktól jól elkülöníthető kisebb epeút-szakaszok, melyek magukba foglalják a tradicionális Hering csatornákat is. Ezeknek az epeút szakaszoknak a morfológiai, immunfenotípusbeli homogenitása alapján feltételezhetjük, hogy morfo-funkcionális egészet alkotnak és az őket felépítő sejtek képesek őssejtként viselkedni különböző szöveti reakciókban.

VII. KÖVETKEZTETÉSEK

I. A máj szomatikus őssejtjei számára speciális mikrokörnyezetet biztosító Hering csatornákra patkány és humán májakban egyaránt speciális elrendeződés és egyedi, az azonosításukat lehetővé tevő immunfenotípus jellemző:

I.1. Patkánymájban ezek az epeutak periportálisan helyezkednek el, itt csatlakoznak a zárólemezkét alkotó hepatocitákhoz és CK19+/CK7– fenotípusúak.

I.2. Humán májmintákban ezek az epeút-szakaszok intraparenchimálisan ugyan, de a májlebenykék területén kívül, rudimenter vaszkuláris szeptumban a májartéria és portális véna terminális ágaival együtt haladnak és CD56+/CD133+/EMA– immunfenotípus jellemzi őket.

II. A Thy-1 mRNS és fehérje egyaránt jelen van az ép és regeneráló májszövetben:

II.1. Ép humán és patkány májban a peribiliárisan elhelyezkedő Thy-1 pozitív sejtek, SMA és dezmin negativitásuk miatt leginkább „portális fibroblaszt”-nak felelnek meg. A Thy-1 antitesttel festődést mutattak a portális térben található idegrostok is.

II.2. A regeneráció során:

II.2.a. Patkánymájban az ovális sejtek nem expresszálják Thy-1-et, tehát a Thy-1, mint hemopoetikus őssejtmarker nem alkalmas az ovális sejtek csontvelői eredetének vizsgálatára és bizonyítására. Kimutattuk, hogy a Thy-1 mRNS és fehérje nem az ovális sejtekben, hanem a velük szoros közelségben, bazális membránon kívül elhelyezkedő miofibroblasztokon van jelen.

II.2.b. Humán májakban a regeneráció során az intermedier hepatobiliáris sejtek szintén Thy-1 negatívnak bizonyultak; a Thy-1 fehérje az intermedier hepatobiliáris sejtek alkotta csövek körül elhelyezkedő miofibroblasztokat jelöli.

VIII. ÖSSZEFOGLALÁS

A legtöbb kísérleti adat és humán mintákon tett megfigyelés szerint a májban a Hering csatornákat felépítő sejtek képesek összejtéként viselkedni, tehát a Hering csatornák pontos jellemzése a szomatikus összejtek azonosításának elengedhetetlen feltétele.

Fluoreszcens immunhisztokémiai módszereket alkalmazva jellemeztük az intrahepatikus epeutakat, ép humán és patkány májokban. A patkánymájban posztnatálisan alakulnak ki a CK19+/CK7– fenotípusú epeutak, melyek a periportális kötőszövetbe ágyazva hosszú, olykor elágazódó duktusokat formálnak. Funkcionális tesztekben ezen epeutak hámsejtjei összejtéként viselkednek. A CK19+/CK7– fenotípus humán májban nem alkalmazható az összejtek azonosítására, de a Hering csatornák ép humán májban is a többi epeút szakasztól eltérő sajátos immunfenotípussal (CD56+/CD133+/EMA–) rendelkeznek, ami lehetővé teszi ezeknek a képleteknek az egyértelmű azonosítását. A patkánymájban található epeutak lefutásától eltérően, humán májokban ezek az epeutak a májartéria és portális véna terminális ágainak kíséretében belépnek a parenchima területére, de mindvégig két szomszédos májlebenyke közötti határvonalban, az interlobuláris/vaszkuláris szeptumban haladnak.

Az összejtek részvételével járó májregeneráció során a Hering csatornákból származó ovális sejtek (patkánymájban) illetve az intermedier hepatobiliáris sejtek (humánban) számos vizsgálatban Thy-1 (CD90) pozitívnak bizonyultak. Mivel a Thy-1 csontvelői összejtek markereként is szolgál, jelenléte a progenitor sejteken felveti azok potenciális csontvelői eredetét. Immunhisztokémiai és mikrodisszekált sejt mintákból végzett QRT-PCR vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a Thy-1 mRNS és fehérje nem az ovális sejtekben, hanem a velük szoros közelségben elhelyezkedő miofibroblasztokon van jelen. Fulmináns májelégtelenségből származó humán májmintákban a Thy-1 pozitív sejtek szintén az intermedier hepatobiliáris sejtek (szomatikus összejtek leszármazottjai humán májokban) alkotta csövek körül, azok bazális membránján kívül találhatóak. Ép humán és patkány májokban a Thy-1 pozitív fibroblasztok az epeutak körül, de azok bazális membránján kívül helyezkedtek el, így a Thy-1 nem használható sem a Hering csatornában található szomatikus összejtek, sem pedig a belőlük származó progenitor sejtek azonosítására.

IX. SUMMARY

The canals of Hering are transitional structures between the hepatocytes and bile ducts. These structures are the primary candidates for the liver residing adult hepatic stem cell compartment. We have studied by immunohistochemistry and confocal microscopy the distribution and the immunophenotype of the biliary system in rat and human livers. In rats a CK19+/7- cholangiocyte population is present in the smaller branches of the biliary tree including the canals of Hering. These CK7 negative cells are the precursors of the oval cells. They are not present in the liver at birth but are generated „*de novo*” in the postnatal period. The canals of Hering are strictly confined to the periportal space. In human livers the canals of Hering have been reported to spread beyond the limiting plate. We have observed a rudimentary interlobular collagen containing septa in healthy livers outlining the hepatic lobules. The canals of Hering run in these septa in line with the terminal branches of the portal vein and hepatic arteries. This arrangement develops in the postnatal period but regresses after early childhood. The canals of Hering can be identified by the unique CD56+/CD133+/EMA- immunophenotype. The distinct immunophenotype supports their unique biological function.

Thy-1, a marker of hematopoietic stem cells has been reported to be expressed by oval cells proliferating during stem cell-mediated regeneration in rat liver suggesting a precursor-product relationship between the two cell populations. We have characterized the Thy-1 expression in normal and regenerating livers using immunofluorescence confocal microscopy, immunoelectronmicroscopy and QRT - PCR analysis. In rat livers Thy-1 protein and mRNA is consistently present on a myofibroblast subpopulation surrounding the oval cells, outside the basement membrane. A similar distribution of the Thy-1 protein was found on human liver specimens with ductular reactions from patients with fulminant liver failure. We conclude, that Thy-1 is not a marker of hepatic stem or progenitor cells but decorates a subpopulation of myofibroblasts.

X.IRODALOMJEGYZÉK

1. Alpini G, Glaser SS, Ueno Y, Pham L, Podila PV, Caligiuri A, LeSage G, LaRusso NF.(1998) Heterogeneity of the proliferative capacity of rat cholangiocytes after bile duct ligation. *Am J Physiol*, 274:G767-75.
2. Alpini G, Roberts S, Kuntz SM, Ueno Y, Gubba S, Podila PV, LeSage G, LaRusso NF. (1996) Morphological, molecular, and functional heterogeneity of cholangiocytes from normal rat liver. *Gastroenterology*, 110:1636-43.
3. Bauer SR, Ruiz-Hidalgo MJ, Rudikoff EK, Goldstein J, Laborda J. (1998) Modulated expression of the epidermal growth factor-like homeotic protein *dlx* influences stromal-cell-pre-B-cell interactions, stromal cell adipogenesis, and pre-B-cell interleukin-7 requirements. *Mol Cell Biol*, 18: 5247-55.
4. Bisgaard HC, Holmskov U, Santoni-Rugiu E, Nagy P, Nielsen O, Ott P, Hage E, Dalhoff K, Rasmussen LJ, Tygstrup N. (2002) Heterogeneity of ductular reactions in adult rat and human liver revealed by novel expression of deleted in malignant brain tumor 1. *Am J Pathol*,161:1187-98.
5. Bisgaard HC, Nagy P, Santoni-Rugiu E, Thorgeirsson SS. (1996) Proliferation, apoptosis, and induction of hepatic transcription factors are characteristics of the early response of biliary epithelial (oval) cells to chemical carcinogens. *Hepatology*, 23: 62-70.
6. 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: 475-84.

7. Boiret N, Rapatel C, Boisgard S, Charrier S, Tchirkov A, Bresson C, Camilleri L, Berger J, Guillouard L, Guérin JJ, Pigeon P, Chassagne J, Berger MG. (2003) CD34+CDw90(Thy-1)+ subset colocalized with mesenchymal progenitors in human normal bone marrow hematopoietic units is enriched in colony-forming unit megakaryocytes and long-term culture-initiating cells. *Exp Hematol*, 31:1275-83.
8. Bradley JE, Ramirez G, Hagood JS. (2009) Roles and regulation of Thy-1, a context-dependent modulator of cell phenotype. *Biofactors*, 35:258-65.
9. Clara M. (1930) Untersuchungen an der menschlichen Leber. Leber. I. Teil Über den Übergang der Gallenkapillare in die Gallengänge. *Z Mikrosk Anat Forsch*, 584-607.
10. Craig CE, Quaglia A, Selden C, Lowdell M, Hodgson H, Dhillon AP. (2004) The histopathology of regeneration in massive hepatic necrosis. *Semin Liver Dis*, 24:49-64.
11. Dempo K, Chisaka N, Kaneko A, Horikawa M., Onoe T (1973) Cytological study of azo-dye hepatocarcinogenesis in relation to fluctuation of α -fetoprotein-producing cells. *Proc. Japan. Cancer Assoc*, 32: 149.
12. Dollé L, Best J, Mei J, Al Battah F, Reynaert H, van Grunsven LA, Geerts A. (2010) The quest for liver progenitor cells: A practical point of view. *J Hepatol*, 52:117-29 Review.
13. Dranoff JA, Wells RG.(2010) Portal fibroblasts: Underappreciated mediators of biliary fibrosis. *Hepatology*,51:1438-44.
14. Dudas J, Mansuroglu T, Batusic D, Ramadori G. (2009) Thy-1 is expressed in myofibroblasts but not found in hepatic stellate cells following liver injury. *Histochem Cell Biol*, 131:115-27.

15. Dudas J, Mansuroglu T, Batusic D, Saile B, Ramadori G.(2007) Thy-1 is an in vivo and in vitro marker of liver myofibroblasts. *Cell Tissue Res*, 329:503-14.
16. Dunsford HA, Sell S. (1989) Production of monoclonal antibodies to preneoplastic liver cell populations induced by chemical carcinogens in rats and to transplantable Morris hepatomas. *Cancer Res*, 49:4887-4893.
17. Ekataksin W and Wake K. (1997). New concepts in biliary and vascular anatomy of the liver. *Prog Liver Dis*, 15:1–30.
18. Ekataksin W, Wake K. (1991) Liver units in three dimensions: I. Organization of argyrophilic connective tissue skeleton in porcine liver with particular reference to the "compound hepatic lobule". *Am J Anat*, 191:113-53.
19. Elias H. (1949) A re-examination of the structure of the mammalian liver; the hepatic lobule and its relation to the vascular and biliary systems. *Am J Anat*, 85:379-456.
20. Evarts RP, Nagy P, Marsden E, Thorgeirsson SS. (1987) A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. *Carcinogenesis*, 8:1737-40.
21. Evarts RP, Nagy P, Nakatsukasa H, Marsden E, Thorgeirsson SS. (1989) In vivo differentiation of rat liver oval cells into hepatocytes. *Cancer Res*, 49:1541-7.
22. Evarts RP, Nakatsukasa H, Marsden ER, Hsia CC, Dunsford HA, Thorgeirsson SS. (1990) Cellular and molecular changes in the early stages of chemical hepatocarcinogenesis in the rat. *Cancer Res*, 50:3439-44.

23. 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: 357-64.
24. Farber E. (1956) Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylamino-fluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res*, 16: 142-8.
25. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. (2006) Liver regeneration. *Hepatology*, 43:S45-53. Review
26. Fiegel HC, Park JJ, Lioznov MV, Martin A, Jaeschke-Melli S, Kaufmann PM, Fehse B, Zander AR, Kluth D. (2003) Characterization of cell types during rat liver development. *Hepatology*, 37:148-54.
27. Fiel MI, Antonio LB, Nalesnik MA, Thung SN, Gerber MA. (1997) Characterization of ductular hepatocytes in primary liver allograft failure. *Mod Pathol*, 10: 348-53.
28. Forbes SJ, Vig P, Poulsom R, Wright NA, Alison MR. (2002) Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible. *Clin Sci (Lond)*, 103:355-69.
29. Fujita M, H Furukawa, M Hattori, S Todo, Y Ishida and K Nagashima. (2000). Sequential observation of liver cell regeneration after massive hepatic necrosis in auxiliary partial orthotopic liver transplantation. *Mod Pathol*, 13:152–157.
30. Gouw AS, van den Heuvel MC, Boot M, Slooff MJ, Poppema S, de Jong KP. (2006) Dynamics of the vascular profile of the finer branches of the biliary tree in normal and diseased human livers. *J Hepatol*, 45:393-400.

31. Grisham JW, Porta EA. (1964) Origin and fate of proliferated hepatic ductal cells in the rat: Electron microscopic and autoradiographic studies *Exp Mol Pathol*, 86:242-61.
32. Grisham JW. (1980) Cell types in long-term propagable cultures of rat liver. *Ann N Y Acad Sci*, 349: 128-37. Review.
33. Hagood JS, Prabhakaran P, Kumbla P, Salazar L, MacEwen MW, Barker TH, Ortiz LA, Schoeb T, Siegal GP, Alexander CB, Pardo A, Selman M. (2005) Loss of fibroblast Thy-1 expression correlates with lung fibrogenesis *Am J Pathol*, 167:365-79.
34. Halder SK, Takemori H, Hatano O, Nonaka Y, Wada A, Okamoto M. (1998) Cloning of a membrane-spanning protein with epidermal growth factor-like repeat motifs from adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology*, 139: 3316-28.
35. Hankowski KE, Hamazaki T, Umezawa A, Terada N. (2011) Induced pluripotent stem cells as a next-generation biomedical interface. *Lab Invest*, 91:972-7. Review
36. Haque S, Haruna Y, Saito K, Nalesnik MA, Atillasoy E, Thung SN, Gerber MA. (1996) Identification of bipotential progenitor cells in human liver regeneration. *Lab Invest*, 75: 699-705.
37. Haratake J, Yamamoto O, Hisaoka M, Horie A. (1990) Scanning electron microscopic examinations of microvascular casts of the rat liver and bile duct. *J UOEH*, 12:19-28.
38. Hering E. (1867) Ueber den Bau der Wirbelthierleber. *Arch Mikrosk Anat*, 3: 88-114.

39. Higgins GM, Anderson RM. (1931) Experimental pathology of the liver: restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Exp Pathol*, 12: 186-202.
40. Hoppo T, Fujii H, Hirose T, Yasuchika K, Azuma H, Baba S, Naito M, Machimoto T, Ikai I. (2004) Thy1-positive mesenchymal cells promote the maturation of CD49f-positive hepatic progenitor cells in the mouse fetal liver. *Hepatology*, 39:1362-70.
41. Hudon-David F, Bouzeghrane F, Couture P, Thibault G. (2007) Thy-1 expression by cardiac fibroblasts: lack of association with myofibroblast contractile markers. *J Mol Cell Cardiol*, 42:991-1000.
42. Inaoka Y. (1967) Significance of the so-called oval cell proliferation during azo-dye hepatocarcinogenesis. *Gann*, 58: 355-66.
43. 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*, 45:1462-70.
44. Jensen CH, Jauho EI, Santoni-Rugiu E, Holmskov U, Teisner B, Tygstrup N, Bisgaard HC. (2004) Transit-amplifying ductular (oval) cells and their hepatocytic progeny are characterized by a novel and distinctive expression of delta-like protein/preadipocyte factor 1/fetal antigen 1. *Am J Pathol*, 164: 1347-59.
45. Kamo N, Yasuchika K, Fujii H, Hoppo T, Machimoto T, Ishii T, Fujita N, Tsuruo T, Yamashita JK, Kubo H, Ikai I. (2007) Two populations of Thy1-positive mesenchymal cells regulate in vitro maturation of hepatic progenitor cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292:G526-34

46. Karbanová J, Missol-Kolka E, Fonseca AV, Lorra C, Janich P, Hollerová H, Jászai J, Ehrmann J, Kolár Z, Liebers C, Arl S, Subrtová D, Freund D, Mokry J, Huttner WB, Corbeil D. (2008) The stem cell marker CD133 (Prominin-1) is expressed in various human glandular epithelia. *J Histochem Cytochem*, 56:977-93.
47. Kinoshita R (1937) Studies on the cancerogenic chemical substances. *Trans Soc Pathol Jpn*, 27:665-727.
48. Kiss A, Schnur J, Szabó Z, Nagy P. (2001) Immunohistochemical analysis of atypical ductular reaction in the human liver, with special emphasis on the presence of growth factors and their receptors. *Liver*, 21: 237-46.
49. Knight B, Yeoh GC, Husk KL, Ly T, Abraham LJ, Yu C, Rhim JA, Fausto N. (2000) Impaired preneoplastic changes and liver tumor formation in tumor necrosis factor receptor type 1 knockout mice. *J Exp Med*, 192: 1809-18.
50. Kuwahara R, AV Kofman, CS Landis, ES Swenson, E Barendswaard ND Theise. (2008). The hepatic stem cell niche: identification by label-retaining cell assay. *Hepatology*, 47:1994–2002.
51. Lemaigre FP. (2003) Development of the biliary tract. *Mech Dev*, 120:81-7
Review
52. Letulle M. (1915) Les capillicules biliaires du foie humain, leur repartition a l'intérieur du lobule hépatique, leurs modes d'abouchement dans les canaux perilobulaires. *J Physiol Pathol Gen*, 16: 789-801.
53. Masson NM, Currie IS, Terrace JD, Garden OJ, Parks RW, Ross JA. (2006) Hepatic progenitor cells in human fetal liver express the oval cell marker Thy-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 291:G45-54.

54. Matsumoto T, Komori R, Magara T, Ui T, Kawakami M, Tokusa T, Takasaki S, Hayashi H, Jo K, Hano H, Tanaka H (1979) A study on the normal structure of the human liver , with special reference to its angioarchitecture *Jikeikai Med J*, 26:1-40
55. McCuskey R. (1994) The hepatic microvascular system. In: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Schafritz DA *The liver: Biology and Pathobiology*, Raven press Ltd, New York p: 1089- 1093.
56. McIndoe A. (1928) The structure and arrangement of the bile canaliculi. *Arch Pathol*, 6: 598-614.
57. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW. (1997) A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*, 90:5013-21.
58. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31:11-24.
59. Moore KA, Pytowski B, Witte L, Hicklin D, Lemischka IR. (1997) Hematopoietic activity of a stromal cell transmembrane protein containing epidermal growth factor-like repeat motifs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 4011-6.
60. Murfee WL, Skalak TC, Peirce SM. (2005) Differential arterial/venous expression of NG2 proteoglycan in perivascular cells along microvessels: identifying a venule-specific phenotype. *Microcirculation*, 12:151-60.
61. Nagy P, Schaff Zs (2004) Diffúz májbetegségek patomechanizmusában szerepet játszó új tényezők: apoptózis és össejtek. *Orv.Hetilap*, 145:1787-1793.

62. Ogawa K, Minase T, Onoe T. (1974) Demonstration of glucose 6-phosphatase activity in the oval cells of rat liver and the significance of the oval cells in azo dye carcinogenesis. *Cancer Res*, 34: 3379-86.
63. Oh SH, Witek RP, Bae SH, Zheng D, Jung Y, Piscaglia AC, Petersen BE.(2007) Bone marrow-derived hepatic oval cells differentiate into hepatocytes in 2-acetylaminofluorene /partial hepatectomy-induced liver regeneration. *Gastroenterology*, 132:1077-87
64. 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: 1353-61.
65. 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*, 158:1313-23.
66. Papp V, Dezső K, László V, Nagy P, Paku S.(2009) Architectural changes during regenerative and ontogenic liver growth in the rat. *Liver Transpl*, 15:177-83.
67. 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*, 284:1168-70.
68. Petersen BE, Goff JP, Greenberger JS, Michalopoulos GK. (1998) Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. *Hepatology*, 27:433-45.
69. Petersen BE, Grossbard B, Hatch H, Pi L, Deng J, Scott EW (2003) Mouse A6-positive hepatic oval cells also express several hematopoietic stem cell markers. *Hepatology*, 37:632-40.

70. Philips MJ, Poucell S, Patterson J, Valencia P. (1987) The liver. In: An Atlas and Text of Ultrastructural Pathology. New York: Raven Press.
71. Poetten CS, Loeffler M (1990) Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. *Development*, 110: 1001-20.
72. Popper H, Kent G, Stein R. (1957) Ductular cell reaction in the liver in hepatic injury. *J Mt Sinai Hosp N Y.*, 24:551-6.
73. Poulsen H, Christoffersen P. (1969) Abnormal bile duct epithelium in liver biopsies with histological signs of viral hepatitis. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 76: 383-90.
74. Rappaport AM, Borowy ZJ, Loughheed WM, Lotto WM (1954) Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology *Anat Rec*, 119:11-33.
75. Rege TA, Hagood JS. (2006) Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J*, 20:1045-54. Review
76. Reyes M, Verfaillie CM. (2001) Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci*, 938:231-3; discussion 233-5.
77. Roskams T, Desmet V. (1998) Ductular reaction and its diagnostic significance. *Semin Diagn Pathol*, 15:259-69.
78. Roskams T, Desmet V. (2008) Embryology of extra- and intrahepatic bile ducts, the ductal plate. *Anat Rec (Hoboken)*, 291:628-35.

79. Roskams TA, Libbrecht L, Desmet VJ. (2003) Progenitor cells in diseased human liver. *Semin Liver Dis*, 23:385-96. Review.
80. Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, Bhagat G, Bhathal PS, Bioulac-Sage P, Brunt EM, Crawford JM, Crosby HA, Desmet V, Finegold MJ, Geller SA, Gouw AS, Hytioglou P, Knisely AS, Kojiro M, Lefkowitch JH, Nakanuma Y, Olynyk JK, Park YN, Portmann B, Saxena R, Scheuer PJ, Strain AJ, Thung SN, Wanless IR, West AB. (2004) Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology*, 39:1739-45. Review
81. Rossant J. (2007) Stem cells and lineage development in the mammalian blastocyst. *Reprod Fertil Dev*, 19 (1): 111-8. Review.
82. Saalbach A, Wetzig T, Haustein UF, Anderegg U. (1999) Detection of human soluble Thy-1 in serum by ELISA. Fibroblasts and activated endothelial cells are a possible source of soluble Thy-1 in serum. *Cell Tissue Res*, 298:307-15.
83. Sanders YY, Tollefsbol TO, Varisco BM, Hagood JS. (2010) Epigenetic Regulation of Thy-1 by Histone Deacetylase Inhibitor in Rat Lung Fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010 Aug 19. [Epub ahead of print]
84. Saxena R, Theise N. (2004) Canals of Hering: recent insights and current knowledge. *Semin Liver Dis*, 24:43-8.
85. Saxena R, Theise ND, Crawford JM. (1999) Microanatomy of the human liver- exploring the hidden interfaces. *Hepatology*, 30:1339-46.
86. Schmelzer E, Wauthier E, Reid LM. (2006) The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. *Stem Cells*, 24:1852-8

87. Sell S. (1978) Distribution of alpha-fetoprotein- and albumin-containing cells in the livers of Fischer rats fed four cycles of N-2-fluorenylacetamide. *Cancer Res*, 38: 3107-13.
88. Sell S. (1998) Comparison of Liver Progenitor Cells in Human Atypical Ductular Reactions With Those Seen in Experimental Models of Liver Injury *Hepatology*, 27:317-331.
89. Sell S.(2001) The role of progenitor cells in repair of liver injury and in liver transplantation. *Wound Repair Regen*. 9:467-82. Review
90. Shupe TD, Piscaglia AC, Oh SH, Gasbarrini A, Petersen BE. (2009) Isolation and characterization of hepatic stem cells, or "oval cells," from rat livers. *Methods Mol Biol*, 482:387-405.
91. Smas CM, Sul HS. (1993) Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell*, 73: 725-34.
92. Smith PG, Tee LB, Yeoh GC. (1996) Appearance of oval cells in the liver of rats after long-term exposure to ethanol. *Hepatology*, 23: 145-54.
93. Sonzogni A, Colloredo G, Fabris L, Cadamuro M, Paris B, Roffi L, Pozzi M, Bovo G, Del Poggio P, Portmann BC, Strazzabosco M. (2004) Isolated idiopathic bile ductular hyperplasia in patients with persistently abnormal liver function tests. *J Hepatol*, 40:592-8.
94. Tanimizu N, Nishikawa M, Saito H, Tsujimura T, Miyajima A. (2003) Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1. *J Cell Sci*, 116: 1775-86.

95. 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: 209-18.
96. Tatematsu M, Ho RH, Kaku T, Ekem JK, Farber E. (1984) Studies on the proliferation and fate of oval cells in the liver of rats treated with 2-acetylaminofluorene and partial hepatectomy. *Am J Pathol*, 114:418-430.
97. Teutsch HF, Schuerfeld D, Groezinger E. (1999) Three-dimensional reconstruction of parenchymal units in the liver of the rat. *Hepatology*, 29:494-505.
98. Teutsch HF. (2005) The modular microarchitecture of human liver. *Hepatology*, 42:317-25.
99. Theise ND, Kuwahara R. (2007) The tissue biology of ductular reactions in human chronic liver disease. *Gastroenterology*, 133:350-2. Review
100. Theise ND, Saxena R, Portmann BC, Thung SN, Yee H, Chiriboga L, Kumar A, Crawford JM. (1999) The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology*, 30: 1425-33.
101. Thorgeirsson SS, Grisham JW. (2002) Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*, 31: 339-46.
102. Thorgeirsson SS, Grisham JW. (2006) Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence. *Hepatology*, 43:2-8. Review

103. Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U, Müller B, Zulewski H. (2006) Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 341:1135-40.
104. Turányi E, Dezső K, Csomor J, Schaff Zs, Paku S, Nagy P (2010) Immunohistochemical classification of ductular reactions in human liver *Histopathology*, 57:607-14.
105. Uriel J, Aussel C, Bouillon D, and Nechaud BD (1973). Localization of rat liver α -fetoprotein by cell affinity labelling with tritiated oestrogens. *Nature New Biol*, 244: 190-192.
106. Van Eyken P, Sciote R, Callea F, Van der Steen K, Moerman P, Desmet VJ. (1988) The development of the intrahepatic bile ducts in man: a keratin-immunohistochemical study *Hepatology*, 8:1586-95.
107. Watabe H. (1971) Early Appearance of Embryonic α -globulin in rat serum during carcinogenesis with 4-dimethylaminoazobenzene. *CancerRes*, 31: 1192-1194.
108. Wilson JW, Leduc EH. (1958) Role of cholangioles in restoration of the liver of the mouse after dietary injury. *J Pathol Bacteriol*, 76: 441-9.
109. Yamamoto K, Sherman I, Phillips MJ, Fisher MM. (1985) Three-dimensional observations of the hepatic arterial terminations in rat, hamster and human liver by scanning electron microscopy of microvascular casts. *Hepatology*, 5:452-6.

0

110. Yovchev MI, Grozdanov PN, Joseph B, Gupta S, Dabeva MD. (2007) Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver. *Hepatology*, 45:139-49.

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

XI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

XI.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények:

1. Paku S, Dezső 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.
2. Dezső K, Jelnes P, László V, Baghy K, Bödör Cs, 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*, 171:1529-37.
3. Dezső K, Halász J, Bisgaard HC, Paku S, Turányi E, Schaff Zs, Nagy P. (2008) Delta-like protein (DLK) is a novel immunohistochemical marker for human hepatoblastomas. *Virchows Arch*. 452:443-8.
4. 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: 1417-1422.
5. Dezső K, Bugyik E, Papp V, László V, Döme B, Tóvári J, Timár J, Nagy P, Paku S. (2009) Development of arterial blood supply in experimental liver metastases. *Am J Pathol*, 175:835-43.

XI.2. Egyéb témában megjelent közlemények:

1. 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.* 130:1005-14.
2. Kóbori L, Nagy P, Máthé Z, Hartmann E, Doros A, Paku S, Dezső K, Sági Z. (2008) Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor of the Liver: A Case Report. *Pathol Oncol Res*, 14:329-32.
3. Papp V, Dezső K, László V, Nagy P, Paku S. (2009). Architectural changes during regenerative and ontogenic liver growth in the rat. *Liver Transplant*, 15:177-183.
4. Turányi E, Dezső K, Paku S, Nagy P. (2009) DLK is a novel immunohistochemical marker for adrenal gland tumors. *Virchows Arch*, 455:295-9.
5. Moskovszky L, Dezső K, Athanasou N, Szendrői M, Kopper L, Kliskey K, Picci P, Sági Z. (2010)Centrosome Abnormalities in Giant Cell Tumour of Bone: Possible Association with Chromosomal Instability. *Modern Pathology*, 23:359-66.
6. Turányi E, Dezső K, Csomor J, Schaff Zs, Paku S, Nagy P. (2010) Immunohistochemical classification of ductular reactions in human liver. *Histopathology*, 57:607-14,

7. Turányi E, Dezső K, Bugyik E, Szurián K, Paku S, Nagy P. (2010) The primary mitogen (TCPOBOP)-induced hepatocyte proliferation is resistant to transforming growth factor- beta-1 inhibition. *Liver International*, 30:1505-10.
8. Baghy K, Dezső K, László V, Fullár A, Péterfia B, Paku S, Nagy P, Schaff Zs, Iozzo R, Kovalszky I. (2011) Ablation of the decorin gene enhances experimental hepatic fibrosis and impairs hepatic healing in mice. *Lab Invest*, 91:439-51.
9. Paku S, Dezső K, Bugyik E, Tóvári J, Tímár J, Nagy P, Laszlo V, Klepetko W, Döme B. (2011) A new mechanism for pillar formation during tumor-induced intussusceptive angiogenesis: Inverse sprouting. *Am J Pathol*, 179:1573-85.

XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani mindazoknak, akik segítettek PhD munkám elkészítését:

-A szakmai fejlődés izgalmas, de olykor krízisekkel tűzdelt útján mindig segítségemre voltak: témavezetőm Prof.Dr.Nagy Péter és Dr.Paku Sándor, akiknek, ezért hálás köszönettel tartozom; intellektuális eleganciájuk és szakmai nagyvonalúságuk, valamint társadalomkritikai látásmódjuk követendő példát állított, mint ahogy naprakész tudományos felkészültségük is. Dr.Paku Sándornak metodikai ismereteim jelentős részét is köszönhetem.

-Köszönöm Prof.Dr.Matolcsy András intézetigazgatónak lelkes támogatását, az általa vezetett citológiai diagnosztikai labor valamint a hematopatológiai labor munkaközösségének külön köszönöm a munkámban nyújtott segítséget.

-Tisztelettel köszönöm a Patológiai Doktori Iskola vezetőjének, Prof.Dr.Kopper Lászlónak a támogatását, nagyon hálás vagyok, hogy 2005-ben lehetővé tette, hogy elkezdhessem PhD tanulmányaimat.

-Hálás vagyok Dr.Tímár Ferencnek a TDK-s éveim alatt és a PhD tanulmányaim során nyújtott folyamatos szakmai segítségéért és baráti támogatásáért.

-Nagyon sok köszönet illeti Prof.Dr.Pávai Zoltán-t, aki kezdetektől szemtanúja illetve aktív alakítója volt a szakmai „küzdelseimnek”.

-A dolgozatommal kapcsolatban a rengeteg tanácsot, "helyjessirassy" hibáim kijavítását, a szakmai kérdéseket - amelyek alapján dolgozatom átszerkesztettem, hogy egyszerűbb, közérthetőbb és szakmai szempontok alapján mégis megfelelő munkát készíthessek -, házi opponensemnek, Prof.Dr.Kovalszky Ilonának köszönhetem.

-Köszönöm Bugyik Edinának baráti és szakmai támogatását, valamint az igen kellemes „laborhangulat” megteremtését.

Köszönöm Dr.Spisák Sándornak szakmai segítségét és hasznos tanácsait.

Hálás vagyok továbbá a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai Intézet munkatársainak, hogy munkám során segítettek és támogattak, név szerint Dr.Baghy Kornéliának, Dr. Bödör Csabának, Dr. Balogh Zsófiának, Dr.Moskovszky Lindának, Csizmadia Annamáriának, Deák Lindának.

Végül, de elsősorban köszönöm családomnak, hogy mindvégig támogattak, bíztattak, biztosították a munkámhoz szükséges nyugodt háttérrel, nélkülük ez a disszertáció nem készülhetett volna el.