

Általános és betegség-specifikus terápiás mechanizmusok a máj átültetés optimalizálására

PhD Értekezés

Dr. Christian Dominik Fingas

Semmelweis Egyetem
Doktori Iskola Patológiai Tudományok



Témavezető: Dr. Máthé Zoltán PhD

Hivatalos bírálók:

Dr. Igaz Péter Ph.D., egyetemi docens

Dr. Gáspár Róbert Ph.D., egyetemi docens

Bíráló bizottság elnöke:

Dr. Tihanyi Tibor Ph.D., egyetemi tanár

Bíráló bizottság tagjai:

Dr. Werling Klára Ph.D., egyetemi docens

Dr. Monostory Katalin Ph.D.

Budapest
2016

1. BEVEZETÉS

A májátültetés (LTx) elfogadott eljárás az akut májelégtelenség, és egyéb végállapotú májbetegségek, többek között a malignus hepatocelluláris (HCC) és szelektált esetekben a cholangiocelluláris carcinoma (CCA) kezelésére. Jelen tanulmány célja olyan, különböző mechanizmusú kísérőterápiák kidolgozása és bemutatása, melyek hozzásegíthetnek a májátültetés további fejlődéséhez. Tanulmányaim két csoportra oszthatók. Egy részük a májátültetés adott faktorainak optimalizálásával foglalkozik, míg másik felük betegség-specifikus terápiás mechanizmusok lehetőségeit kutatja, további megoldásokat keresve az irreszekábilis CCA-s betegek kezelésére májtranszplantációval.

A májátültetés feltételeinél optimalizálásával foglalkozó kutatásaim fő célja a prezervációs károsodás minimalizálása és a mikrocirkuláció elősegítése a beültetett máj graftokban a „histidine-tryptophan-ketoglutarate” (HTK) alapú prezervációs oldat módosításával. Különösképpen vizsgáltuk a klorid szerepét, mert hatásai az in vitro vizsgálatokban ellentmondásosak. Hűtött rágcsáló hepatocitákon az extracelluláris klorid ártalmas, míg az endotél sejteken jótékony hatást fejt ki. Az in vivo környezetben kifejtett fő hatásának vizsgálatára a szervátültetést modellező állatkísérletekben, kloridban gazdag és szegény HTK oldatokban patkány májakat prezerváltunk. Ezen felül tanulmányoztuk az eritropoetin (EPO) hatását a máj regenerációra és a hepatocita apoptózisra (programozott sejthalál) szegment májátültetés (pLTx) során.

A betegség specifikus kísérleteink során legfőképp a CCA-ra koncentráltunk. Irreszekábilis CCA miatt végzett májátültetés után gyakran tapasztalható a betegség korai

visszatérése és metastasisok kialakulása. Mindezek ellenére a betegek kis százalékában az átültetést követően a túlélés elfogadható, mely összefüggésbe hozható a modern (neo)adjuváns, kombinált kezelések hatásosságával. Azon szelektált betegeknél, akiknél a malignus elváltozás (CCA) irreszekábilis, nincs extrahepatikus áttétük és az elváltozás az epehólyag fölött helyezkedik el, speciális multimodális terápiás protokoll került kidolgozásra és bevezetésre a Mayo Klinikán (Rochester, Minnesota, USA). Ez magában foglalja a tumor pre-transzplantációs irradiációját, irídium brachyterápiáját és kemoterápiáját. A pre-transzplantációs kezelések után, de az átültetés előtt a beteg exploratív laparotómián esik át az esetleges áttétek kizárására. A Mayo-protokoll mérsékelt sikeresnek bizonyult a korai irreszekábilis CCA kezelésében jól szelektált esetekben. Mindemellett a protokoll által előírt kemoterápia kizárólag a hagyományos ágenseket alkalmazza (fluorouacil, capecitabine). Célzott kemoterápia alkalmazásával, új mechanizmusú szerek kipróbálásával és bevezetésével a lehetőségek bővíthetnek. A CCA-specifikus májátültetés optimalizálására végzett kísérleteink fő célja a CCA sejtek apoptózis rezisztencia mögött meghúzódó mechanizmusok azonosítása. Különös figyelmet fordítottunk a „platelet-derived growth factor BB” (PDGF-BB)/”Hedgehog” (Hh) által közvetített apoptózis rezisztenciára a CCA sejtekben, mely előtérbe helyezi a „serine/threonine polo like kinase 2 (PLK2)” fontosságát a sejt a regulációban. Ezen eredmények alapján új mechanizmusú terápiás lehetőségeket vizsgáltunk, a CCA miatt végzett májtranszplantáció eredményeinek javítása érdekében.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Jelen tanulmányaink célkitűzései az alábbiak voltak:

1. A klorid hatásainak optimalizálása a módosított HTK alapú prezervációs oldat alkalmazásával a máj prezervációs károsodásának minimalizálására és a mikrocirkuláció serkentésére az átültetését követően.
2. Az EPO hatásának vizsgálata az átültetett májgraft regenerációjára és a hepatocita sejthalálra májszegment átültetés során.
3. A myofibroblast (MFB) sejtek parakrin jelátvitelének hatásának tanulmányozása a CCA apoptózis rezisztenciára a PDGF-BB/Hh ko-aktivációs hálózat tükrében.
4. A Hh/PLK által közvetített anti-apoptikus hatások vizsgálata.
5. A 3. és 4. pont megfigyelései alapján elemezzük, hogy a „platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)- β ”, a Hh vagy a PLK jelátvitel célzott terápiája alkalmazható lenne-e a CCA (neo)adjuváns kezelésében illetve a Mayo-protokoll optimalizálásában.

3. MÓDSZEREK

Prezervációs oldat/klorid tanulmány: A vizsgálatokat két részre osztottuk, a csoportok 7/8 patkányt tartalmaztak. A vizsgálat első részében az állatok túlélését elemeztük 3 egymást követő kísérletben, eltérő feltételek mellett (különböző patkány törzs, hideg és meleg ischaemiás idő). A vizsgálat második felében a beültetést követően kloridban gazdag és szegény HTK alapú prezervációs oldat használatától függően a mikrocirkulációt (30-90 perccel a reperfüziót követően), a labor paramétereket, az epetermelést és a szövettani változásokat elemeztük.

Eritropoetin tanulmány: A patkányokat EPO-val és hőhatásra inaktiválódott kontroll EPO-val kezeltük. Az kísérleti egyedek ezt követően 30%-os szegment májátültetésen estek át, majd szérum, máj és epe mintákat vettük a májfunkció, máj/testsúly arány (LBWR), hepatocytá-proliferáció (Ki-67) és az apoptózis („terminal deoxynucleotide tranferase-mediated dUTP nick-end labeling assay”) vizsgálatára. A gén-expressziót cDNA array-vel és kvantitatív valós-idejű PCI-vel elemeztük. A vizsgálatokat követően értékeltük a túlélést.

MFB-irányított PDGF-BB/Hh jelátvitel tanulmány: A vizsgálatához humán KMCH-1, KMBC, HuCCT-1, TFK-1 és Mz-ChA-1 CCA sejteket alkalmaztunk humán hepatikus „stellate” és „myofibroblastic” LX-2 sejtek mellett. Ezt követően in vivo kísérleteket végeztünk állatkísérletes patkány modellben.

Hh signaling/PLK 2 study: 50 humán CCA minta (25 intrahepatikus, 25 extrahepatikus), továbbá KMCH-1, Mz-CHA-1 és HUCCT-1 CCA sejtek alkalmazásával végeztük vizsgálatainak. Ezt követően ismételt in vivo kísérleteket végeztünk szingeneikus patkány májtranszplantációs modellben.

4. EREDMÉNYEK

4.1 A májtranszplantáció optimalizálásával foglalkozó kutatásaink eredményei

4.1.1 Prezervációs oldat/klorid tanulmány:

Az új klorid-tartalmú oldat az összes túlélési analízisünkben kedvezőbb eredményeket mutatott (50% versus 12,5%, 75% versus 37,5%, illetve 100% versus 71,4% [klorid-tartalmú vs. klorid-szegény], $P < 0.05$). Továbbá a sinusoid perfúziós ráta (83,9% +/- 4,0% versus 69,2% +/-10,8%, $P < 0.01$) és a vörösvértestek sebessége a sinusoidokban (147,7+/-26,7 versus 115,5+/-26,0 $\mu\text{m}/\text{másodperc}$; $P < 0.05$) és a post-sinusoid venulákban (332,4 +/-87,3 versus 205,5 +/- 53,5 $\mu\text{m}/\text{másodperc}$) egyértelműen magasabb volt a klorid tartalmú oldattal konzervált májakban. Emellett a májenzimek szérum aktivitása jelzetten (nem szignifikánsan) alacsonyabb volt, és az epe-termelés viszont szignifikánsan magasabb.

4.1.2. Eritropoetin tanulmány:

Az LBWR és a Ki-67 index alapján, az EPO kezelés hatására a kezelt patkányok májregenerációja javult, beleértve a szegment transzplantáción átesett egyedeket is. Az EPO kezelés indukálta a c-jun pro-regenerációs mediátort és a Bcl-X_L anti-apoptikus gént, ami csökkent sejthalál rátához vezethet. Emellett, az EPO kezelésben részesült, szegment átültetésen átesett egyedek 28 napos túlélése szignifikánsan javult (88% vs. 38%).

4.2 Cholangiocarcinoma miatt végzett májátültetés optimalizálására végzett kísérleteink eredményei

4.2.1. MFB-irányított PDGF-BB/Hh jelátvitel tanulmány:

Az egyesített CCA és humán „myofibroblastic hepatic stellate” vagy CCA és LX-2 sejt kultúrák szignifikánsan csökkentették a „tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand” (TRAIL) által indukált sejthalált a CCA sejtekben. A sejtvédő hatás megszüntethető volt a PDGF-BB anti-szérum semlegesítésével. A PDGF-BB sejtvédő hatását befolyásolta a Hh jelátvitel is, mert a cyclopamine, ami a smoothened (SMO; Hh jelátvitel része) G-protein receptor antagonistája, megszüntette a citoprotektív hatást. A mechanizmus része, hogy az SMO a „PDGF-BB-induced cyclec adenosine monophosphate-dependent protein kinase-dependent trafficking” segítségével a plasma membránba jut, ami „glioma-associated oncogene” (GLI)2 nukleáris transzlokációjához és „GLI reporter gene-based luciferase assay” aktivációjához vezet. Egy teljes genomot érintő messenger RNS expresszió alapuló eljárással 67 különböző gént azonosítottunk, melyek közül 50 serkentő és 17 fékező hatással bír mind a „sonic hedgehog” (SHH) mind a PDGF-BB jelátvitelre a CCA sejtekben cyclopaminetól függően. Továbbá in vivo rágcsáló CCA sejteken végzett vizsgálatokban a cyclopamin és az imatinib fokozta a CCA sejthalált, ezzel apoptózist és tumorszuppressziót előidézve.

4.2.2. Hh jelátvitel/PLK study

A humán PLK1/2/3-immunoreaktív rák sejtek nagyobb számban szerepeltek az intra- és extrahepatikus CCA mintákban. A Hh jelátvitel gátlása cyclopamine-val csökkentette a PLK2 szintjét, de nem befolyásolta a PLK1, 2, messenger RNS és fehérje expressziót a kontrol és az SHH-kezelt CCA sejtekben, igazolva korábbi microarray vizsgálatunkat. Hh jelátvitel feltételezhetően közvetlenül szabályozza a PLK2-t, mert a Hh transzkripciós faktorai, GLI1 és 2, kapcsolódnak a PLK2 promoter régiójához. Továbbá a PLK2 gátlása BI6727-vel (volasertib), vagy PLK2 knockdown mutáns használata pro-apoptikus hatással bír a CCA sejtekben. BI6727 vagy PLK2 knockdown mutáns alkalmazása csökkentette a sejtben az anti-apoptikus „myeloid cell leukemia 1” (Mcl-1) fehérje szintjét, mely hatás visszafordítható az MG-132 proteoszoma inhibitorral. Ezen felül, BI6727 használata csökkentette az Mcl-1 expresszióját a CCA sejtekben, ezzel apoptózis és tumorszupressziót előidézve.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A megfigyeléseinket a következő módon összegezhetjük:

1. In vivo: a klorid-tartalmú prezervációs oldat jótékony hatással van az az endotéliumra és a májsejtek mikrocirkulációjára, jelentősen csökkentve a májsejtek klorid-dependens károsodását a hideg-tárolás ideje alatt. Ennek alapján a klorid tartalom fontosságára felhívjuk a figyelmet, hangsúlyozva nélkülözhetetlen szerepét a májgraftok megőrzésére készült prezervációs oldatokban.
2. Az eritropoetin kezelés szignifikánsan javította a máj regenerációját és túlélését szegment átültetést követően, részben a pro-regeneratív c-jun mediátor, részben a Bcl-X_L anti-apoptikus gén serkentése révén. Ezek alapján az EPO alkalmazása ígéretes kiegészítő lehetőségként mutatkozik szegment és élő donoros májátültetés esetén.
3. MFB-irányított PDGF-BB, egy Hh jelátvitel-dependens folyamat révén, megóvja a CCA sejteket a TRAIL citotoxicitástól. A célzott PDGFR-Beta és/vagy Hh jelátvitel kezelés előserkentheti a tumor-sejtek apoptózisát. Ezen eredmények terápiás alkalmazása CCA-ban szenvedő betegeknél megfontolandó a májátültetést megelőzően.
4. PLK2-nek kiemelkedő szerepe lehet a CCA sejtekben Hh túlélésért felelős jelátvitelében. A Hh/PLK ko-aktivációs hálózat jelátvitelét célzó kezelések szintén elősegíthetik a tumor sejtek apoptózisát. Ennél fogva, a Hh inhibitorok mellett, a PLK gátlók is fontos szerepet játszhatnak a CCA multimodális kezelésében, beleértve a májtranszplantációt is.

6.A JELÖLT SAJÁT KÖZLEMÉNYEI

6.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. Bockhorn M, **Fingas CD***, Rauen U, Canbay A, Sotiropoulos GC, Frey U, Sheu SY, Wohlschläger J, Broelsch CE, Schlaak JF. Erythropoietin treatment improves liver regeneration and survival in rat models of extended liver resection and living donor liver transplantation. *Transplantation*. 2008 Dec 15;86(11):1578-85

*(Impact-factor 2006: 4.0; * joint 1st authorship)*

2. **Fingas CD**, Wu S, Gu Y, Wohlschlaeger J, Scherag A, Dahmen U, Paul A, de Groot H, Rauen U. Assessment of a chloride-poor versus a chloride-containing version of a modified histidine-tryptophan-ketoglutarate solution in a rat liver transplantation model. *Liver Transpl*. 2011 Jun;17(6):650-60

(Impact factor 2009: 3.7)

3. **Fingas CD**, Bronk SF, Werneburg NW, Mott JL, Guicciardi ME, Cazanave SC, Mertens JC, Sirica AE, Gores GJ. Myofibroblast-derived PDGF-BB promotes Hedgehog survival signaling in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology*. 2011 Dec;54(6):2076-88

(Impact factor 2009: 10.8)

4. **Fingas CD**, Mertens JC, Razumilava N, Bronk SF, Sirica AE, Gores GJ. Targeting PDGFR- β in Cholangiocarcinoma. *Liver Int*. 2012 Mar;32(3):400-9

(Impact factor 2010: 3.8; Cover-Picture)

5. **Fingas CD**, Mertens JC, Razumilava N, Sydor S, Bronk SF, Christensen JD, Rizvi SH, Canbay A, Treckmann JW, Paul A, Sirica AE, Gores GJ. Polo-like kinase 2 is a mediator of hedgehog survival signaling in cholangiocarcinoma. *Hepatology*. 2013 Oct;58(4):1362-7

(*Impact factor 2012:*

12.0)

6. Juntermanns B, Sydor S, Kaiser GM, Jaradat D, Mertens JC, Sotiropoulos GC, Swoboda S, Neuhaus JP, Meng W, Máthé Z, Baba HA, Canbay A, Paul A, **Fingas CD**. Polo-like kinase 3 is associated with improved overall survival in cholangiocarcinoma. *Liver Int*. 2015 (doi: 10.1111/liv.1283)

(*Impact-Faktor 2014:*

4.9)

6.2. Az értekezés témájától független közlemények

1. Juntermanns B, Grabellus F, Zhang H, Radunz S, Bernheim J, **Fingas CD**, Sauerwein W, Paul A, Kaiser GM. Vascular and nerval damage after intraoperative radiation therapy of the liver hilum in a large animal model. *J Invest Surg*. 2014 Jun;27(3):163-8

2. Dechêne A, Jochum C, **Fingas CD**, Paul A, Heider D, Syn WK, Gerken G, Canbay A, Zöpfl T. Endoscopic management is the treatment of choice for bile leaks after liver resection. *Gastrointest Endosc*. 2014 May 2. pii: S0016-5107(14)01198-5

3. Mertens JC, **Fingas CD**, Christensen JD, Smoot RL, Bronk SF, Werneburg NW, Gustafson MP, Dietz AB, Roberts LR, Sirica AE, Gores GJ. Therapeutic effects of deleting cancer-associated fibroblasts in cholangiocarcinoma. *Cancer Res.* 2013 Jan 15;73(2):897-907
4. **Fingas CD**, Altinbas A, Schlattjan M, Beilfuss A, Sowa JP, Sydor S, Bechmann LP, Ertle J, Akkiz H, Herzer K, Paul A, Gerken G, Baba HA, Canbay A. Expression of apoptosis- and vitamin D pathway-related genes in hepatocellular carcinoma. *Digestion.* 2013;87(3):176-81
5. Heuer M, Dreger NM, Cicinnati VR, **Fingas CD**, Juntermanns B, Paul A, Kaiser GM. Tumor growth effects of rapamycin on human biliary tract cancer cells. *Eur J Med Res.* 2012 Jun 21;17:20
6. Kahraman A, **Fingas CD**, Syn WK, Gerken G, Canbay A. Role of stress-induced NKG2D ligands in liver diseases. *Liver Int.* 2012 Mar;32(3):370-82
7. Razumilava N, Bronk SF, Smoot RL, **Fingas CD**, Werneburg NW, Roberts LR, Mott JL. miR-25 targets TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) death receptor-4 and promotes apoptosis resistance in cholangiocarcinoma. *Hepatology.* 2012 Feb;55(2):465-75
8. Kakisaka K, Cazanave SC, **Fingas CD**, Guicciardi ME, Bronk SF, Werneburg NW, Mott JL, Gores GJ. Mechanisms

of lysophosphatidylcholine-induced hepatocyte lipoapoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012 Jan 1;302(1):G77-84

9. Herzer K, **Fingas CD**, Canbay A. Does ursodeoxycholic acid exert a protective effect on liver grafts in orthotopic liver transplantation? *Digestion*. 2012;86(3):206-7

10. Cazanave SC, Mott JL, Bronk SF, Werneburg NW, **Fingas CD**, Meng XW, Finnberg N, El-Deiry WS, Kaufmann SH, Gores GJ. Death receptor 5 signaling promotes hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem*. 2011 Nov 11;286(45):39336-48

11. Kurita S, Mott JL, Cazanave SC, **Fingas CD**, Guicciardi ME, Bronk SF, Roberts LR, Fernandez-Zapico ME, Gores GJ. Hedgehog inhibition promotes a switch from Type II to Type I cell death receptor signaling in cancer cells. *PLoS One*. 2011 Mar 31;6(3):e18330

12. Guicciardi ME, Mott JL, Bronk SF, Kurita S, **Fingas CD**, Gores GJ. Cellular inhibitor of apoptosis 1 (cIAP-1) degradation by caspase 8 during TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis. *Exp Cell Res*. 2011 Jan 1;317(1):107-16

13. **Fingas CD**, Blechacz BR, Smoot RL, Guicciardi ME, Mott J, Bronk SF, Werneburg NW, Sirica AE, Gores GJ. A smac mimetic reduces TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL)-induced invasion and metastasis of cholangiocarcinoma cells. *Hepatology*. 2010 Aug;52(2):550-61 (*Impact-Faktor 2008: 11,4*)

14. **Fingas CD**, Katsounas A, Kahraman A, Siffert W, Jochum C, Gerken G, Nüchel H, Canbay A. Prognostic assessment of three single-nucleotide polymorphisms (GNB3 825C>T, BCL2-938C>A, MCL1-386C>G) in extrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Invest.* 2010 Jun;28(5):472-8
15. Kahraman A, Schlattjan M, Kocabayoglu P, Yildiz-Meziletoglu S, Schlensak M, **Fingas CD**, Wedemeyer I, Marquitan G, Gieseler RK, Baba HA, Gerken G, Canbay A. Major histocompatibility complex class I-related chains A and B (MIC A/B): a novel role in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2010 Jan;51(1):92-102
16. Kiliçarslan A, Kahraman A, Akkiz H, Yildiz Menziletoğlu S, **Fingas CD**, Gerken G, Canbay A. Apoptosis in selected liver diseases. *Turk J Gastroenterol.* 2009 Sep;20(3):171-9
17. Bockhorn M, Sotiropoulos G, Neuhaus J, Sgourakis G, Sheu SY, Molmenti E, **Fingas CD**, Trarbach T, Frilling A, Broelsch CE. Prognostic impact of intrahepatic lymphatic and microvascular involvement in cases of colorectal liver metastases. *Int J Colorectal Dis.* 2009 Jul;24(7):845-50
18. Bechmann LP, Zahn D, Gieseler RK, **Fingas CD**, Marquitan G, Jochum C, Gerken G, Friedman SL, Canbay A. Resveratrol amplifies profibrogenic effects of free fatty acids on human hepatic stellate cells. *Hepatol Res.* 2009 Jun;39(6):601-8

19. Flögel U, Laussmann T, Gödecke A, Abanador N, Schäfers M, **Fingas CD**, Metzger S, Levkau B, Jacoby C, Schrader J. Lack of myoglobin causes a switch in cardiac substrate selection. *Circ Res*. 2005 Apr 29;96(8):e68-75
20. Decking UK, Pai VM, Bennett E, Taylor JL, **Fingas CD**, Zanger K, Wen H, Balaban RS. High-resolution imaging reveals a limit in spatial resolution of blood flow measurements by microspheres. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Sep; 287(3):H1132-40. Epub 2004 Apr 29. PubMed PMID: 15117718.
21. Laussmann T, Janosi RA, **Fingas CD**, Schlieper GR, Schlack W, Schrader J, Decking UK. Myocardial proteome analysis reveals reduced NOS inhibition and enhanced glycolytic capacity in areas of low local blood flow. *FASEB J*. 2002 Apr;16(6):628-30. PubMed PMID: 11919176