

**SEMMELWEIS EGYETEM  
DOKTORI ISKOLA**

**Ph.D. értekezések**

**2398.**

**RÓKUSZ ANDRÁS ARTUR**

**Onkológia**  
című program

Programvezető: Dr. Kopper László, professor emeritus

Témavezető: Dr. Dezső Katalin, egyetemi docens

# A fibrogenezis és duktuláris reakció kapcsolatának vizsgálata humán cirrotikus májakban és kísérletes modellekben

Doktori értekezés

**dr. Rókus András Artur**

Semmelweis Egyetem

Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Dezső Katalin, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Patonai Attila, Ph.D., klinikai szakorvos

Dr. Péterfi Zoltán, Ph.D., med. habil., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kiss András, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Simon Károly, Ph.D., főorvos

Dr. Hagymási Krisztina, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest

2020

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke .....	5
I. Bevezetés és irodalmi háttér.....	8
I.1. A májcirrózis – rövid áttekintés .....	8
I.2. A máj mikroszkópos anatómiája .....	9
I.3. A cirrotikus máj szerkezete .....	11
I.3.1. A májban kórosan képződött kötőszövet jellemzői.....	12
I.3.1.1. A májfibrózis stádiumának megítélésére használt pontrendszerek.....	13
I.3.1.2. A májfibrózis morфомetriai jellemzése .....	14
I.3.1.3. A májfibrózis non-invazív jellemzése.....	15
I.3.2. Duktuláris reakció .....	16
I.3.2.1. Duktuláris reakció állatkísérletes modellekben.....	17
I.3.2.2. Duktuláris reakció humán májban .....	19
I.4. A fibrogenézis molekuláris háttere .....	22
I.5. A cirrózis tanulmányozására használt állatmodellek .....	24
I.6. Célzott terápiás szerek alkalmazása cirrotikus állatmodelleken .....	27
I.7. A cirrózis klinikai jellemzése.....	30
I.7.1. Kísérletek a cirrózis osztályozására .....	32
I.8. A cirrózis regressziója.....	33
II. Célkitűzések.....	35
III. Módszerek .....	36
III.1. Humán minták .....	36
III.2. Állatkísérletek.....	36
III.3. Szövettani feldolgozás.....	39
III.4. Morфомetriai vizsgálatok .....	40
III.4.1. A kötőszövet morфомetriai vizsgálata.....	40
III.4.2. A duktuláris reakció és az aktivált miofibroblasztok morфомetriai vizsgálata ..	41
III.4.3. A proliferációs aktivitás értékelése.....	42
III.5. Statisztikai módszerek .....	43
IV. Eredmények.....	44
IV.1. Korrelációs vizsgálatok a cirrotikus májak morфомetriai paraméterei és a betegek klinikai adatai között .....	44

IV.2. Állatkísérletes vizsgálatok eredményei .....	51
IV.2.1. Kontroll cirrotikus modellek .....	51
IV.2.2. Imatinib és erlotinib kezelés hatása a TAA-indukált cirrózis kialakulására .....	55
IV.2.3. Imatinib és erlotinib kezelés hatása a már kialakult TAA-indukált cirrózisra (terápiás modellek) .....	64
IV.2.4. A cirrotikus modellekben mért paraméterek korrelációs analízise .....	67
V. Megbeszélés.....	<b>Hiba! A könyvjelző nem létezik.</b>
VI. Következtetések.....	80
VII. Összefoglalás .....	81
VIII. Summary.....	82
IX. Irodalomjegyzék.....	83
X. Saját publikációk jegyzéke .....	102
XI. Köszönetnyilvánítás .....	104

## Rövidítések jegyzéke

AAF	2-acetilaminofluorén
AFP	alfa-fetoprotein
AIH	autoimmun hepatitisz
ALD	alkoholos májbetegség
ALL	akut limfoid leukémia
ALP	alkalikus foszfatáz
ALT	alanin-aminotranszferáz
ANIT	alpha-naphthylisothiocyanate
AST	aszpartát-aminotranszferáz
BDL	epeút lekötés
CCl <sub>3</sub> <sup>-</sup>	triklórmetil
CCl <sub>4</sub>	szén-tetraklorid
CCO	citokróm c oxidáz
CDA	kolín deficiens, L-aminosavakat tartalmazó diéta
CDE	kolín deficiens, etioninnal kiegészített diéta
CK	citokeratin
CML	krónikus mieloid leukémia
CPA	collagen proportionate area
CYP2E1	citokróm p450 2E1
DDC	3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidin
DEN	dietilnitrózamin
DLK	delta like protein
DMN	dimetilnitrózamin
ECM	extracelluláris mátrix
EGF	epidermális növekedési faktor
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor
FGF	fibroblaszt növekedési faktor
GGT	gamma-glutamil transzferáz

GIST	gasztrointesztinális stromális tumor
Hb	hemoglobin
Hb-EGF	heparin kötő növekedési faktor
HBV	hepatitisz B vírus
HCC	hepatocelluláris karcinóma
HCV	hepatitisz C vírus
HE	hematoxin-eozin
HFD	magas zsírtartalmú diéta
HGF	hepatocita növekedési faktor
HVPG	hepatic vein pressure gradient
IL	interleukin
INR	International Normalized Ratio
KO	knockout
LSM	liver stiffness measurement
MCD	metionin és kolin deficiens diéta
Mdm2	mouse double minute 2 homolog
Mdr2	multidrug resistance associated protein 2
MELD	Model for End-Stage Liver Disease
MMP	mátrix metalloproteináz
mTOR	mammalian target of rapamycin
NASH	nem alkoholos eredetű szteatohepatitisz
NF2	neurofibromatózis 2
NF- $\kappa$ B	nukleáris faktor kappa B
PBC	primer biliáris kolangitisz
PDGFR	vérlemezké eredetű növekedési faktor receptor
PH	parciális hepatektómia
PhB	fenobarbitál
PSC	primer szklerotizáló kolangitisz
seBi	szérum bilirubin
SMA	simaizom aktin
STAT-3	signal transducer and activator of transcription 3

TAA	tioacetamid
TE	tranziens elasztográfia
TGF $\beta$	transzformáló növekedési faktor $\beta$
Thr	thrombocytaszám
TIMP-1	tissue inhibitor of metalloproteinase-I
TNF	tumor nekrosis faktor
TP	szérum összfehérje
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
WBC	fehérvérsejt szám

## I. Bevezetés és irodalmi háttér

### I.1. A májcirrózis – rövid áttekintés

A májcirrózis (magyarul májzsugor) diffúz folyamat, melyre a klasszikus WHO-definíció szerint fokozott kötőszövet-felhalmozódás (fibrózis) és a normális májszerkezet állebenyítés, göbös átépülése jellemző (Anthony és mtsai 1978). A betegség elnevezése a görög kirros szóból származik, ami sárgát jelent. A szót Laennec alkotta meg 1819-ben, a cirrotikus göbök színére utalva (Laennec 1819, Desmet és Roskams 2004). Leggyakoribb kiváltó okai az alkoholos májbetegség (ALD), különböző vírusfertőzések (főként hepatitisz B (HBV) és C (HCV) vírus), nem alkoholos eredetű szteatohepatitisz (NASH), autoimmun hepatitisz (AIH), primer biliáris kolangitisz (PBC), primer szklerotizáló kolangitisz (PSC), Wilson-kór, hemokromatózis, valamint különböző tárolási betegségek. Az esetek egy részében (5-30 %) nem derül fény az etiológiai tényezőre, ekkor kriptogén cirrózistról beszélünk, de a legújabb elképzelések szerint ezek jelentős részét „kiégett” NASH okozhatja (Caldwell 2010).

Klinikailag a cirrózist két jól elkülöníthető stádiumra oszthatjuk. Az első szakaszban a beteg akár évtizedekig is tünetmentes lehet, ezt kompenzált cirrózisnak nevezzük. A klinikai tünetek megjelenése jelzi a cirrózis dekompenzációját; a betegség természetes lefolyása során kialakuló májelégtelenség, ill. portális hipertenzió tünetei lehetnek pl. sárgaság, aszcitesz, nyelőcső varix vérzés, hepatikus encefalopátia, hepatorenális, portopulmonáris és hepatopulmonáris szindróma, szplenomegália, caput Medusae, spontán bakteriális peritonitisz. A kompenzált szakaszból a dekompenzáció évi 5%-os rátával következik be (D’Amico 2014). A dekompenzáció jelentősen rontja a túlélést, a kompenzált cirrózis diagnózisa utáni 1 és 2 éves medián túlélés 95 és 90%, míg a dekompenzáció után már csak 60 és 45% (D’Amico és mtsai 2006). A májcirrózis – különösen egyes etiológiai tényezők esetén (NASH, HBV, HCV, hemokromatózis, ALD) – jelentősen növeli a hepatocelluláris karcinóma (HCC) kialakulásának esélyét. A HCC-k 70-90%-a cirrózis talaján alakul ki (D’Amico 2014).

A betegség a súlyos, gyakori kezelést igénylő szövödmények, és a krónikus lefolyás miatt hatalmas terhet ró a társadalomra. Egy becslés szerint a kompenzált esetekkel együtt a világ lakosságának 1%-a szenvedhet cirrózisban (Schuppan és Afdhal

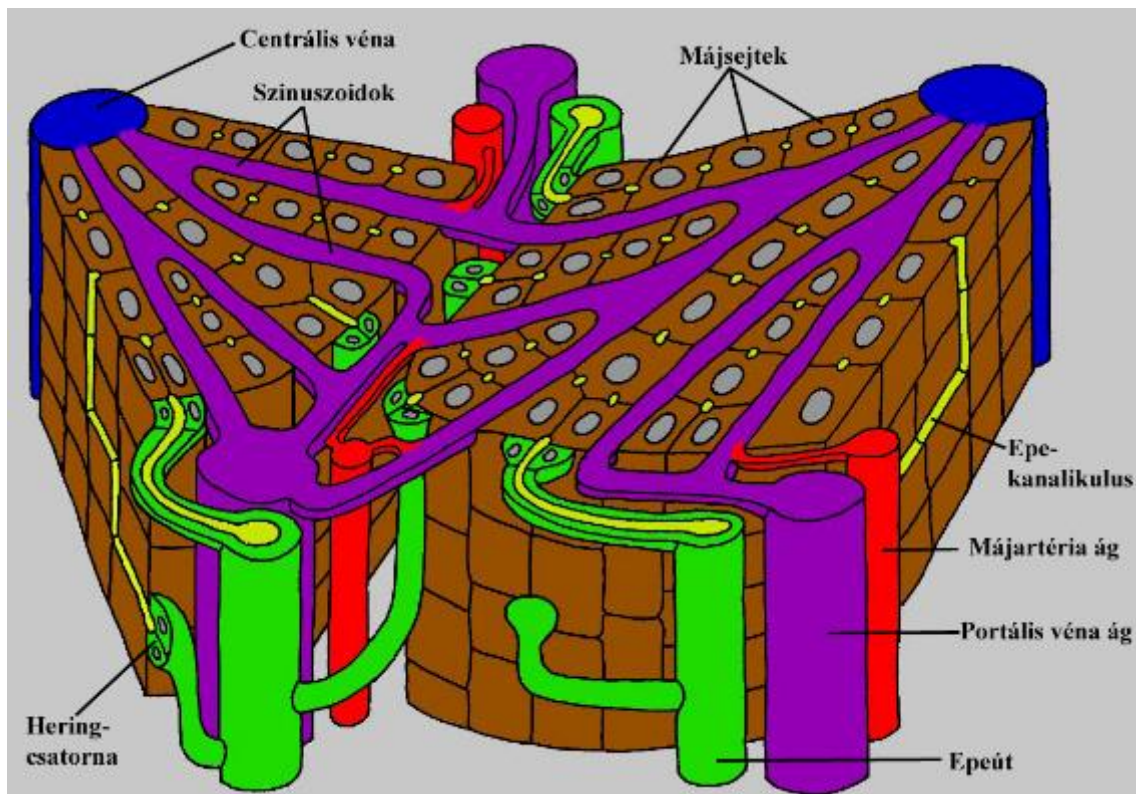


2008). A Központi Statisztikai Hivatal adatai szerint Magyarországon a májbetegségek okozta halálozás a 2000-es évek eleje óta csökkenő tendenciát mutat, azonban 2017-ben még mindig 3243 haláleset történt májbetegség következtében, amely döntő többségben cirrózisban szenvedő betegeket jelenthet. A májátültetések száma ezzel szemben fokozatosan növekszik, de így is a halálozáshoz képest elenyésző számú, 80 betegen végeztek májtranszplantációt 2018-ban (Nemzeti Szervdonációs Regiszter adata). A májátültetés az egyetlen tartós gyógyulással kecsegtető terápiás lehetőség, azonban a donorok alacsony száma, a nagy költség és a hozzá szükséges magas szintű szakmai háttér miatt Magyarországon, de más országokban sem érhető el elég széles körben.

## I.2. A máj mikroszkópos anatómiája

A máj legismertebb és leggyakrabban használt morfológiai alapegységeinek a lobulus (első leírás: Weppeler, 1665) és az acinus (első leírás: Rappaport, 1958) tekinthető. A klasszikus lobulus (májlebenyke) nagyjából hatszög alakú, kb. 1 mm átmérőjű. Az acinus ovális alakú, tengelyében terminális portális vénaággal. Az acinus hepatocitái a tápanyag- és oxigénellátottság alapján három zónára oszthatóak. A máj sejteinek kb. 60%-át, ill. a máj tömegének 80%-át hepatociták alkotják. A májsejtek egy sejtrétegből álló gerendákba rendeződnek, melyeket módosult kapillárisok, a kb. 10 µm átmérőjű szinuszoidok határolnak (1. ábra). A szinuszoidok nem rendelkeznek strukturált bazális membránnal. Endotélsejtjeik fenesztráltak, 100-200 nm átmérőjű nyílásokkal, ill. az endotélsejtek között is intercelluláris rések találhatóak, így a májsejtek folyamatosan érintkeznek a filtrálódó plazmával. Az endotélsejtek és a hepatociták között található a Disse-tér vagy periszinuszoidális tér, melyben a szinuszoidokból kiáramló plazma érintkezésbe kerül a májsejtek bazolaterális felszínének mikrobolyhaival. A vér a portális terek felől a szinuszoidokba kerül, ahol a májartéria irányából érkező artériás és a portális véna felől érkező vénás vér keveredik. A szinuszoidok vérét a vena centralis gyűjti össze, végül a májvénák a vena cava inferiorba ömölve vezetik el a vért. A Disse-térben található a csillag- vagy régebbi nevükön Ito-sejtek, amelyek nyugvó állapotban A-vitamint tárolnak, valamint részt

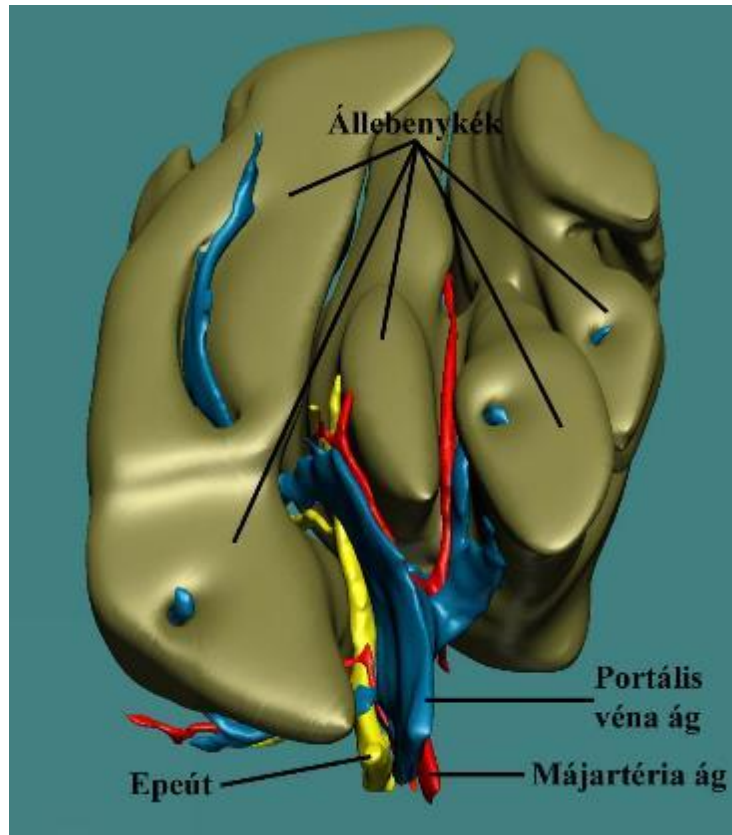
vesznek a máj periportális tereiben található kötőszöveti rosthálózat szintézisében. A májsejtek által termelt epe a hepatociták közt saját fallal nem rendelkező kanalikulusokban gyűlik össze. Az epe áramlása ellentétes irányú a vér áramlásával, a lebenyke belseje felől a portális tér felé történik. Az epeútrendszer első bazális membránnal és saját hámbéléssel rendelkező szakaszai a májsejtekhez U-alakban kapcsolódó Hering-csatornák (1. ábra), amelyek mai tudásunk szerint tartalmazzák a máj saját őssejtjeit. A Hering-csatornák a májartéria és portális véna terminális ágaival együtt egy kezdetleges vaszkuláris szeptumban, a májlebenyke területén kívül helyezkednek el (Dezső és mtsai 2009). A Hering-csatornák az epét a már csak kolangiociták által határolt duktulusokba vezetik, melyek aztán a portális terekben található interlobuláris duktulusokba futnak. Az interlobuláris epeutak a ductus hepaticus communisban végződnek, amely kivezeti az epét a májból (Arias és mtsai 2020).



**1. ábra** A szabályos májszövet mikroszkópos felépítése. Két klasszikus májlebenyke részlete látható, portális triászokkal, centrális vénával és a vaszkuláris szeptumban elhelyezkedő képletekkel (Hering-csatorna, portális véna és májartéria ágai). (Forrás: Arias és mtsai, 2020)

### I.3. A cirrotikus máj szerkezete

Szövetteni metszeteken a cirrotikus máj májsejtekből álló allebenyékéből, valamint az ezeket teljesen körbezáró kötőszövetes szeptumokból épül fel, a szeptumok állományában epeutakkal, gyulladásos sejtekkel, érkepletekkel (2. ábra).



**2. ábra** A cirrotikus máj szerkezetének három dimenziós rekonstrukciója. Az allebenyék, a kötőszövetes szeptumokban futó vénás és artériás ágak, valamint epeutak kerültek ábrázolásra. A portális véna ágai belépnek az allebenyékbe; azok centrumában helyezkednek el. Az áttekinthetőség kedvéért az allebenyékét körülvevő kötőszövetes szeptumok és a duktuláris reakció képletei nincsenek feltüntetve. (Forrás: Dezső és mtsai, 2017)

### I.3.1. A májban kórosan képződött kötőszövet jellemzői

A cirrotikus máj makro- és mikroszkóposan is legszembeötlőbb elváltozása a fokozott mértékű hegszövet képződés, fibrózis. A fibrózis fokozott mennyiségű kollagén lerakódását jelenti új kötőszövet képződése során, amelyet a fibrogenézis folyamata során aktiválódó miofibroblasztok termelnek. (Anthony és mtsai 1978). Gyakorlatilag egyfajta sebgyógyulási folyamatnak fogható fel, amelyet különböző májkárosító hatások váltanak ki (Tsukada és mtsai 2006, Friedman 2008). Fontos hangsúlyozni, hogy a májfibrózis nem jelent egyet a májcirrózissal, a cirrózis fogalmába beletartozik a májparenchima átépülése, valamint a WHO-definícióban nem említett vaszkuláris eltérések (porto- és arterioszisztémás, ill. intrahepatikus shuntok) kialakulása is (Desmet és Roskams 2004). Májfibrózis önállóan, cirrózis nélkül is előfordulhat, pl. tuberkulózisban, szarkoidózisban, besugárzás hatására, kongenitális fibrózisban vagy veno-okkluzív betegségben (Anthony és mtsai 1978). A májfibrózisnak a kötőszövet lerakódásának lokalizációja szerint több megjelenési formája létezik. A Disse-térben, a májsejtek között lerakódó kötőszövetet pericelluláris vagy periszinusoidális fibrózisnak nevezzük. Ez a folyamat, melyet szinusoidális kapillarizációnak is neveznek, a szinuszoidok fenesztrációjának megszűnéséhez, folytonos bazális membrán kialakulásához, és így a máj anyagcseréjének romlásához vezet, ami cirrózisban hozzájárul a májfunkció romlásához (Schuppan és Afdhal 2008). Emellett beszélhetünk periportális vagy pericentrális fibrózisról, annak megfelelően, hogy jellemzően melyik ér körül rakódik le a kötőszövet. A kialakult cirrotikus májra jellemző az ún. áthidaló, „bridging” fibrózis, ilyenkor a kötőszövet két vaszkuláris képletet köt össze (porto-portális, porto-centrális szeptumok). Ezeket a parenchima folytonosságát megszakító kötőszövetes nyálábokat szeptumoknak nevezzük (Desmet 2005). A fibrózis egy különleges formája a parenchima kipusztulás (parenchymal extinction), amely során a feltehetőleg vaszkuláris okok miatt kipusztult májparenchimát egy nagy, egybefüggő területen helyettesíti a kötőszövet (Wanless és mtsai 1995).

A kiváltó októl függően jelentős különbségek lehetnek a kötőszövet-lerakódás morfológiájában. A fibrózis virális, biliáris vagy autoimmun eredetű cirrózisnál jellemzően a portális, míg NASH vagy alkoholos májbetegség esetén a pericentrális régióból indul ki (Bedossa és mtsai 2003). PBC és PSC-re porto-portális, krónikus vírus

hepatitiszre porto-centrális, míg alkoholos cirrózisra és NASH-re a pericelluláris és pericentrális fibrózis jellemző (Rosselli és mtsai 2013). Szemben a virális és autoimmun eredetű cirrózissal alkoholos májbetegség és NASH esetén a fibrózis mellé nem társul jelentős gyulladás (Schuppan és Pinzani 2012).

#### I.3.1.1. A májfibrózis stádiumának megítélésére használt pontrendszerek

Elsőként Knodell és mtsai (1981) dolgoztak ki pontrendszert az akkor még krónikus aktív hepatitisz kategóriába tartozó virális hepatitiszek aktivitásának számszerűsítésére (Hepatic Activity Index – HAI). Ezzel a rendszerrel a fő probléma az volt, hogy a nekroinflammatorikus paraméterek mellett a fibrózisra adott pontszám is az aktivitást jellemezte, így előfordulhatott, hogy ugyanabba a kategóriába került egy kevésbé aktív gyulladásos státuszú („kiégett”) cirrotikus máj egy magas gyulladásos aktivitású, de csak kevésbé fibrotikus májjal (Germani és mtsai 2010). Az azóta kifejlesztett különböző score-rendszerek (pl. Scheuer-, Ishak-, Batts-Ludwig-, METAVIR-score) már különválasztják a nekroinflammatorikus aktivitás és a fibrózis mértékének értékelését; előbbi adja a „grade”-et, vagyis az aktivitás fokát, utóbbi a „stage”-et, vagyis a betegség stádiumát (Scheuer 1991, Ishak és mtsai 1995, Batts és Ludwig 1995, Bedossa és mtsai 1996). A fibrózis kiterjedtségét az Ishak-score-ban 0-6-ig, míg a többi említett rendszerben 0-4-ig terjedő szemikvantitatív skálán lehet értékelni. A legmagasabb érték mindegyik rendszerben a cirrotikus májat jelöli.

Fontos kiemelni, hogy ezek a rendszerek krónikus vírushepatitiszre lettek kidolgozva, nem szerencsés más etiológiájú cirrózisra alkalmazni őket, mert a gyulladásos folyamatok és a fibrózis mintázata nagyban különbözhet az etiológiától függően (Standish és mtsai 2006). Emellett a score-rendszerek egyik legfontosabb problémája a patológus által adott pontszám jelentős mértékű inter- és intraobszerver variabilitása (Standish és mtsai 2006). Ezen kívül azonos stádiumon belül hatalmas különbségek lehetnek a fibrózis mértékében, mivel a pontszám nem csak a kötőszövet mennyiségétől, hanem a máj szerkezeti eltéréseitől (szeptumok kiterjedtsége, lokalizációja, biopszia pontos helye) is függ (Standish és mtsai 2006).

### I.3.1.2. A májfibrózis morfológiai jellemzése

A szemikvantitatív pontrendszereken kívül napjainkban igény van objektíven és reprodukálhatóan mérhető szövettani paraméterekre a fibrózis mértékének pontosabb meghatározására, valamint a cirrózis progressziójának, ill. az esetleges regresszió dinamikájának monitorozására. Számos szerző a máj kötőszövet tartalmának digitális meghatározását ajánlja a pontrendszerek alkalmazása mellett (Standish és mtsai 2006, Calvaruso és mtsai 2009, Germani és mtsai 2010, Hytiroglu és mtsai 2012). Ennek során a valamilyen festékkal, általában pikroszíriusz vörössel megjelölt kollagének által elfoglalt terület százalékos arányát mérik meg az egész májminta összterületéhez viszonyítva (collagen proportionate area – CPA). Így lehetségessé válik a máj kötőszövet-tartalmának folytonos változóval való jellemzése, ami azért is előnyös, mert ezt a mérőszámot statisztikailag is korrekt módon lehet különböző klinikai vagy hisztológiai paraméterekkel összehasonlítani. Számos tanulmány vetett össze azonos mintákon digitális analízissel meghatározott CPA értékeket a különböző score-rendszerekkel meghatározott fibrózis stádiumokkal. A legtöbb esetben a két paraméter jól korrelált, bár ez az összehasonlítás az előbb leírtak alapján statisztikailag nem korrekt (Germani és mtsai 2010). Több tanulmány is rámutatott arra, hogy a fibrózis progressziójának követésére alkalmasabb a CPA meghatározás, mint a különböző score-rendszerek (Goodman és mtsai 2007, Roselli és mtsai 2013)

A fibrózis kiterjedtségének jellemzésére más, morfológiai analízissel meghatározható paramétereket is használnak, ilyenek pl. a kötőszövetes szeptumok vastagsága, ill. a cirrotikus göbök átmérője (Nagula és mtsai 2006, Kumar és mtsai 2008, Sethasine és mtsai 2012).

A cirrotikus máj szövettani vizsgálata májbiopszia során nyert mintából történik, melyet leggyakrabban perkután, ritkábban transzjuguláris úton vesznek. Az átlagos méretű májbiopszia az egész máj csak mintegy 1/50000 részét tartalmazza (Afdhal és Nunes 2004), kis mérete számos diagnosztikus hibára ad lehetőséget. Egyszeri mintavétel során a cirrózis 10-30%-ban nem kerül felismerésre (Afdhal és Nunes 2004). Colloredo és mtsai (2003) felhívták a figyelmet a biopszia mérete és a fibrózis grade, ill. stádium összefüggéseire. Eredményeik alapján legalább 11 portális tér jelenléte szükséges a mintában ahhoz, hogy a grade és stage ne legyen alulértékelve. Standish és

mtsai (2006) szerint ehhez transzjugulárisan négy, perkután pedig két minta vétele javasolt egy alkalommal. Hall és mtsai (2013) szerint etiológiától függően 22-28 mm<sup>2</sup>-es mintaméret szükséges, ahhoz, hogy az általuk vizsgált 100 mm<sup>2</sup>-es teljes blokkokból mért CPA-hoz képest 90%-os biztossággal csak 5%-os eltérés legyen. Ez (a Semmelweis Egyetem Transzplantációs Klinikáján is használt) 16 G-s tűnél 28-34 mm-es mintahosszt jelent a formalin fixálás által okozott zsugorodást is beleszámolva.

### I.3.1.3. A májfibrózis non-invazív jellemzése

Az új típusú antivirális szerekkel kezelt, és vírusmentességet elérő betegek esetén etikai okokból nem végeznek ismételt májbiopsziákat (Serfaty 2016). Ezen kívül a májbiopszia fent részletezett hiányosságai is indokolják, hogy igény van a májfibrózis mértékének non-invazív vizsgálatokkal való követésére. Többek között azért is lenne fontos olyan non-invazív markerek validálása, melyek előre jelzik a fibrózis mennyiségi változásait, mert így le lehetne rövidíteni az antifibrotikus szerek klinikai vizsgálatait, ill. érzékenyen és gyakran lehetne vizsgálni a terápiás hatékonyságot (Trautwein és mtsai 2015). Erre egyszerű és olcsó módszer lenne egy vérből mérhető biomarker. Az ideális szérumban fibrózis marker májspecifikus, nem befolyásolja a szintjét a máj- vagy vesefunkció, és információt ad a fibrózis stádiumáról, a mátrix depozíció vagy felszívódás aktivitásáról (Afdhal és Nunes 2004). Az elmúlt évtizedekben számos vérben mérhető szintű markert vagy ezekből számított paramétert vizsgáltak, azonban egyelőre nem áll rendelkezésre validált szérumban mérhető biomarker a májfibrózis mértékének vizsgálatára (Thuluvath és Krok 2005, Germani és mtsai 2010).

Egy újabb non-invazív, a májfibrózis mértékét becsülő módszer a tranziens elasztográfia (TE) (Sandrin és mtsai 2003). Előnyei közé tartozik, hogy fájdalommentes, nincsenek mellékhatásai, valamint hogy a biopsziához képest jóval nagyobb térfogatot, a máj kb. 1/500-ad részét képes vizsgálni (Schuppan és Afdhal 2008). Hátránya, hogy nem végezhető aszciteszes, extrém elhízott vagy nagyon szűk interkosztális résekkel rendelkező betegen (Ziol és mtsai 2005), valamint a mérést befolyásolja a májgyulladás, az extrahepatikus kolesztázis, pangásos szívelégtelenség fennállása vagy ha

a beteg közvetlenül a vizsgálatot megelőzően étkezett (Tapper és mtsai 2015). A TE-vel mért máj merevség érték (Liver Stiffness Measurement – LSM) jól korrelált a METAVIR score-ral (Ziol és mtsai 2005), az Ishak-score-ral és a CPA-val is, utóbbival az Ishak-score-hoz képest erősebb mértékben (Isgro és mtsai 2013). A TE-t Európában és hazánkban is használják a klinikai gyakorlatban, főként HCV-s betegek követésére (Tapper és mtsai 2015, Egyedi és mtsai 2015).

### I.3.2. Duktuláris reakció

Szövetteni metszeten a fokozott kötőszövet felhalmozódás mellett a cirrotikus máj egyik legszembeötlőbb eltérése az epeúthoz hasonló képletek megjelenése a kötőszövetes szeptumokban, amelyeket gyűjtőnéven duktuláris reakciónak nevezünk. A duktuláris reakció elnevezést hagyományosan Popperhez kötik (1957), aki etionin tartalmú diétán tartott patkányok májában megfigyelt epeutak leírására használta először a kifejezést, valamint leírta, hogy emberben is megfigyelhető hasonló jelenség a cirrotikus májban. A reakció elnevezés arra utal, hogy a jelenség szerves részét képezik az epeúti hámsejtekhez hasonló epiteliális elemek mellett a gyulladással és mezenhimális sejtek, erek, ill. az ECM elemei (Roskams és mtsai 2004, Gouw és mtsai 2011). A duktuláris sejtek jellemzően pozitívak az epeúti marker citokeratin (CK) 7-re és 19-re, és mai tudásunk alapján ősz-/progenitor sejteket tartalmaznak (Turányi és mtsai 2010).

Egy 2004-es konszenzus közlemény a duktuláris reakciót duktuláris fenotípusú, de nem feltétlenül duktuláris eredetű jelenségként definiálja és egységesen duktuláris reakció elnevezést javasol (Roskams és mtsai 2004).

Ha sikerülne a máj progenitor sejtjeinek regenerációban betöltött szerepét pontosan megismerni, úgy lehetőség nyílna akár a cirrózis lefolyását is befolyásolni, akár a regeneratív folyamatok elősegítésével, akár a progenitor sejtek aktivációjával összefüggésbe hozott káros folyamatok (fibrózis, karcinogenezis) gátlásával (Köhn-Gaone és mtsai 2016a).



### I.3.2.1. Duktuláris reakció állatkísérletes modellekben

A máj kitűnő regenerációs képességgel rendelkezik. Ha a patkány vagy egér máj 2/3-át sebészi úton eltávolítják (sebészi parciális hepatektómia – PH), a májtömeg az érett májsejtek osztódása révén 5-7 nap alatt helyreáll mindkét fajban (Michalopoulos és DeFrances 1997, Santoni-Rugiu és mtsai 2005). Azonban ha a májsejtek osztódási aktivitása károsodott vagy gátolt, úgy különböző májkárosító hatásokra a máj ún. fakultatív őssejtjei aktiválódnak (Nagy 1995). Az elnevezés arra utal, hogy ezeknek a sejteknek nem állandó feladata az elpusztult májsejtek pótlása, csak szükség esetén lépnek működésbe. A legelfogadottabb elképzelés szerint a progenitor sejtek a Heringcsatornában elhelyezkedő őssejtekből származnak (Verhulst és mtsai 2015). Ezzel szemben áll az a régóta fennálló, és új eredmények által is alátámasztott elmélet, miszerint hepatociták dedifferenciációja révén jönnek létre (Grompe 2014). Korábban fölmerült, hogy a progenitor sejtek hemopoetikus őssejtekből is származhatnak (Petersen és mtsai 1999), de ha létezik is ilyen jelenség, az csak nagyon csekély mértékben járul hozzá a májregenerációhoz (Thorgeirsson és Grisham 2006). Hasonlóan érdekes és ellentmondásos kérdés az, hogy a progenitor sejtek származhatnak-e a máj csillagsejteiből. Ezt megerősítő (Yang és mtsai 2008) és cáfoló (Scholten és mtsai 2010) közlemények is jelentek meg az elmúlt évtizedben, a kérdés egyelőre eldöntetlen (Riehle és mtsai 2014).

A progenitor sejtek részvételével lezajló májregeneráció klasszikus kísérleti modellje patkányon a 2-acetilaminofluorén (AAF) kezelés és sebészi parciális hepatektómia (PH) kombinációja (AAF/PH) (Tetamatsu és mtsai 1984). Az AAF a hepatociták DNS-ével adduktokat képezve meggátolja azok osztódását (Michalopoulos 2014). A sebészi PH keltette regenerációs stimulusra az AAF-el kezelt máj a Heringcsatornákból kiinduló ovális sejtes reakcióval válaszol (Paku és mtsai 2001), amelynek sejtjei hepatocitákká differenciálódva pótolják az elvesztett májtömeget (Everts és mtsai 1987, Dezső és mtsai 2012). Az ovális sejtek, melyek nevüket magjuk alakjáról kapták kolangiocitákra (CK 19), és hepatocitákra (albumin) jellemző markereket is kifejeznek (Farber 1956, Duncan és mtsai 2009). Ezek alapján elfogadott, hogy a patkány májban az AAF/PH kísérleti modellben az őssejt-mediált regeneráció epeút eredetű progenitor sejtek részvételével zajlik le.

A 2000-es évekre a máj őssejt-kutatás súlypontja egér kísérletekre tevődött át, nagyrészt a genetikailag módosított egértörzsek elterjedése miatt (Grompe 2014). Mivel az AAF egérben nem képes gátolni a hepatocita osztódást (Michalopoulos és Khan 2015), így az AAF/PH-tól eltérő kísérleti rendszereket alkalmaznak a progenitor sejtek vizsgálatára. Gyakran használt modellek, amelyekben a patkány ovális sejtekhez hasonló fenotípusú sejtek jelennek meg például a kolin deficiens, etioninnal kiegészített diéta (CDE) vagy a 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidin (DDC) kezelés (Miyajima és mtsai 2014). Fontos kiemelni, hogy bár ezekben a modellekben megjelennek az ovális sejtekhez hasonló morfológiájú epiteliális sejtek, mégis jelentős különbségek állnak fenn a patkányban és egérben megfigyelt reakciók között, pl. az egér progenitor sejtek a patkány ovális sejtektől eltérően nem pozitívak alfa-fetoproteinre (AFP) és delta like proteinre (DLK) (Jelnes és mtsai 2007). Az elmúlt években heves vita alakult ki arról, hogy az egér májban honnan származnak a progenitor sejtek, ill. hogy egyáltalán bírnak-e regeneratív funkcióval. A kérdést számos kutatócsoport az ún. lineage tracing módszerrel vizsgálta (Lemaigre 2015), melynek segítségével adott sejtpopulációkat permanensen meg lehet jelölni (pl. egy fluoreszcens jellel), és a jelölés az adott sejtek utódaiban is megmarad. Így lehetővé válik a különböző májkárosító modellekben megjelenő duktuláris reakció, ill. új májsejtek eredetének vizsgálata.

Schaub és mtsai (2014), Tarlow és mtsai (2014a), ill. Yanger és mtsai (2014) egerekben különböző májkárosító hatások alkalmazását követően sem tudták igazolni, hogy a duktuláris reakció jelentősen hozzájárulna új májsejtek képzéséhez. Ezzel szemben Tarlow és mtsai (2014b), Sekiya és Suzuki (2014), valamint Yanger és mtsai (2013) DDC-kezelt, ill. epeút lekötésen (bile duct ligation, BDL) átesett egerekben, Michalopoulos és mtsai (2005) patkányon végzett BDL-t követően írtak le májsejt eredetű duktuláris sejteket. Español-Suñer és mtsai (2012), valamint Shin és mtsai (2015) nem találtak progenitor sejt eredetű hepatocitákat a DDC modellben, azonban a CDE modellben sikerült igazolniuk progenitor sejt eredetű májsejtek létét. Rodrigo-Torres és mtsai (2014) hasonló eredményre jutottak, és a CDE modellben az új hepatocitákat képző progenitor sejtek biliáris eredetét írták le. Fontos kiemelni, hogy a fentebb idézett, a progenitor sejtek regeneratív funkcióját cáfoló tanulmányokban a károsító hatás nem elég súlyos ahhoz, hogy a májsejtek proliferációját teljes mértékben gátolja (Miyajima és mtsai 2014, Kaur és mtsai 2015, Huch és Dollé 2016). Lu és mtsai

(2015) mouse double minute 2 homolog (Mdm2) knockout (KO) egereken írták le a májparenhima progenitor sejtekből történő regenerációját. Ezekben az egerekben az Mdm2 kiütését követően a májsejtek csaknem 100%-a szeneszscens, osztódásra képtelen állapotba kerül (p53 és p21 pozitív lesz), hasonlóan a patkány AAF/PH patkány modellhez, melyben az AAF kezelés szintén a hepatociták p21-pozitivitását okozza (Trautwein és mtsai 1999).

A fenti, sokszor egymásnak ellent mondó eredményekből is kitűnik, hogy koránt sincs egyetértés az egér progenitor sejtek eredetét és funkcióját illetően. A progenitor sejt elnevezés így ma a sejtek morfológiai tulajdonságain (a portális térből a parenhimába terjedés, epeúti hámsejt markerek kifejezése), és nem eredetén alapszik (Itoh 2016).

### I.3.2.2. Duktuláris reakció humán májban

Az előbb említett állatmodellekhez hasonlóan az emberi máj esetében is régóta kérdés, hogy a legkülönbözőbb akut és krónikus májbetegségek során megjelenő duktuláris reakciók tartalmazznak-e progenitor sejteket, és van-e szerepük a májregenerációban. A kiterjedt májnekrózis során megjelenő duktuláris proliferáció tekintetében erre erős bizonyítékok ismertek. Fulmináns májelégtelenség miatt ún. „auxiliary” (kiegészítő) májtranszplantáción átesett betegekben vizsgálták a natív máj regenerációját, amely a duktuláris sejtek májsejtté differenciálódásával valósult meg (Fujita és mtsai 2000, Quaglia és mtsai 2008). Ezekben a májakban nagy számban figyelhetők meg olyan, magas proliferációs aktivitással bíró, duktuláris képletekbe rendeződő sejtek, amelyek mérete az epeúti és májsejtek között van, és egyszerre fejeznek ki kolangiocita (CK19, CK7) és hepatocita (albumin, HepPar1) markereket. Ezeket a sejteket intermedier hepatobiliáris sejteknek nevezik, mert bár biológiai szerepük valószínűleg azonos a patkány ovális sejtekével, azonban fontos különbségek is fennállnak köztük, pl. az intermedier sejtek nem AFP pozitívak (Roskams és mtsai 2004).

A legtöbb krónikus májbetegségben is megfigyelhető duktuláris reakció, de ennek biológiai funkciója a mai napig ellentmondásos. Számos eredmény utal arra,

hogy a már említett állatmodellekhez és a fulmináns májelégtelenséghez hasonlóan a cirrotikus májakban is lehet regeneratív szerepe a duktuláris reakciónak. Wanless és mtsai (2000) kisméretű májsejt csoportokat, ún. kis göböket írtak le cirrotikus májakban, a már említett parenhima kipusztulás területén. Falkowski és mtsai (2003) eredményei szerint a legtöbb ilyen kis göb közvetlen kapcsolatban áll duktuláris sejtekkel, ami arra utalhat, hogy a kis göbök májsejtjei duktuláris eredetűek. Stueck és Wanless (2015) megerősítették ezt az elképzelést, és leírták a kis göbök „érésének” folyamatát. Lin és mtsai (2010) változatos etiológiájú cirrotikus májakban vizsgálták a citokróm c oxidáz (CCO) expresszió mintázatát. Eredményeik alapján a cirrotikus göbök döntő többségében a májsejtek egységesen vagy CCO-negatívak vagy CCO-pozitívak, ami erősen a cirrotikus göbök összejtes eredetére utal. Ezen felül a szerzők a göbök egy részéről kimutatták, hogy klonális eredetű.

Az elmúlt évtizedben teret nyert az az elképzelés, hogy a krónikus májbetegségekben a duktuláris reakció akkor kezd el regeneratív funkcióval bírni, vagyis hepatocitákká differenciálódni, amikor a májsejtek nagy része már szeneszscens állapotba került, vagyis képtelen az osztódásra. Erre utaló adatokat először Falkowski és mtsai (2003) közöltek, akik azt találták, hogy HCV-s betegekben a májsejtek proliferációs aktivitása egészen a METAVIR F3-as stádiumig nő, majd F4-es, tehát cirrózisnak megfelelő stádiumban csökken, míg a duktuláris sejtek proliferációs aktivitása folyamatosan nő, legnagyobb mértékben épp az F3 és F4 stádium között. Clouston és mtsai (2005) szintén az F3 stádiumig növekvő, majd ott lecsökkenő májsejt proliferációs aktivitást írtak le 115 HCV-s beteg vizsgálata során, bár az F3 és F4 stádium közti csökkenés statisztikailag nem volt szignifikáns. A duktuláris sejtek proliferációs rátája szignifikáns korrelációt mutatott a májsejtek p21-indexével (a p21-pozitív májsejtek aránya az összes májsejthez képest). A p21 (ciklin dependens kináz inhibitor 1) a szeneszscens sejtek egyik leggyakrabban használt markere.

Mindemellett a fentiekől eltérő megfigyelések is ismertek. Eleazar és mtsai (2004) eredményei alapján a duktuláris reakció proliferációs aktivitása nem függ össze a fibrózis stádiummal. Stueck és Wanless (2015) eredményei alapján sem a májsejtek, sem a duktuláris sejtek proliferációjának mértéke nem változott a stádiumok előrehaladtával. HCV-s betegekben Prakoso és mtsai (2014) nem találtak emelkedő p21 expressziót a fibrózis stádium előrehaladtával, Crary és Albrecht (1998) pedig a fibrózis

stádiummal párhuzamosan emelkedő hepatocita proliferációs aktivitásról is beszámoltak.

A duktuláris reakciónak nem csak jótékony (regeneráció), hanem ártalmas (fibrózis, cirrózis) hatásai is lehetnek. Számos különböző etiológiájú krónikus májbetegségben leírták, hogy a duktuláris reakció kiterjedtsége összefügg a fibrózis progressziójával (HCV – Clouston és mtsai 2005, Svegliati-Baroni és mtsai 2011, Prakoso és mtsai 2014; NASH – Richardson és mtsai 2007; hemokromatózis – Wood és mtsai 2014; ALD - Roskams és mtsai 2003). A duktuláris sejtek szoros kapcsolatban állnak az ún. aktivált miofibroblasztokkal (Kiss és mtsai 2001, Lorenzini és mtsai 2010), melyek a differenciációhoz szükséges mikrokörnyezetet biztosítják (Kordes és Häussinger 2013). Ezek a simaizom aktin (SMA) pozitív sejtek a májcirrózis során felhalmozódó kötőszövet fő forrásai (Lee és mtsai 2015), így nem meglepő, hogy a duktuláris reakció és a kötőszövet felhalmozódása szoros összefüggést mutat. Az azonban koránt sem egyértelmű, hogy milyen irányú a kapcsolat a két jelenség között. Van Hul és mtsai (2009) CDE diétán tartott egereken kimutatták, hogy az ECM lerakódás időben megelőzi a progenitor sejtek megjelenését, valamint irányítja a progenitor sejteket terjedését a portális térből a környező lebenyke belseje felé. Köhn-Gaone és mtsai (2016a) egérben leírták, hogy tioacetamid (TAA) kezelés hatására a duktuláris reakció periportálisan jelenik meg, azonban a fibrogenézis centrálisan indul, és a párhuzamosan kialakuló gyulladással környezet hatására „vándorolnak” a duktuláris sejtek a centrális vénák környékére és a szeptumokba. Kallis és mtsai (2011) eredményei szerint az ECM átépülés kulcsfontosságú a progenitor sejtek aktivációjában szén-tetraklorid (CCl<sub>4</sub>), ill. CDE diétán tartott egerekben. Ezzel szemben olyan kísérletes adatok is ismertek, melyek alapján a duktuláris reakció kiterjedése is megelőzheti, ill. elősegítheti a kötőszövet lerakódását a májban. Clouston és mtsai (2005) duktuláris reakció jelenlétét írták le F0 fibrózis stádiumú HCV-s betegekben. Chobert és mtsai (2012) kísérletében AAF adása CCl<sub>4</sub>-el kezelt patkányoknak kiterjedt ovális sejtreakciót eredményezett, mely súlyosbította a fibrózist.

Ezekből az eredményekből is látszik, hogy a duktuláris reakció és fibrózis közti kapcsolat részletei egyelőre nem tisztázottak. A duktuláris sejtek maguk is termelnek a csillagsejteket aktiváló, és így a fibrózis kialakulását elősegítő faktorokat (pl. vérlemezke eredetű növekedési faktor  $\beta$  (PDGFR $\beta$ ), transzformáló növekedési faktor  $\beta$

(TGF $\beta$ ) (Williams és mtsai 2014, Kaur és mtsai 2015), így valószínűsíthető, hogy a két sejttípus kölcsönösen hat egymásra, és interakciójuk segíti mind a fibrózis, mind a duktuláris reakció kialakulását (Köhn-Gaone és mtsai 2016b).

#### I.4. A fibrogenézis molekuláris háttere

A cirrotikus májban felhalmozódó kötőszövet fő forrásai az aktivált miofibroblasztok (Tsukada és mtsai 2006). Egyes elképzelések szerint ezek a sejtek az ún. portális fibroblasztokból is származhatnak, de a ma legelfogadottabb álláspont szerint döntő részben a máj csillagsejtjeiből (stellate cell) differenciálódnak (Lee és mtsai 2015). A csillagsejtek többek között a különböző májkárosító hatásokra felszabaduló reaktív oxigénradikálok, lipopoliszacharid, interleukin-1 béta (IL-1 $\beta$ ), tumor nekrosis faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) hatására aktiválódnak, és  $\alpha$ -SMA-t kezdenek el expresszálni (Kaur és mtsai 2015). Az aktiváció kezdetén a csillagsejtek iniciációja zajlik, melynek során a sejt fibrogén és kontraktilis fenotípust vesz föl, és érzékenyebbé válik különböző növekedési faktorokra (Friedman 2008). Az aktivált sejtek különböző ECM komponenseket (kollagén I és III, laminin, fibronektin, hialuronsav, vitronektin, szindekán, dekorin, stb.), valamint metalloproteinázokat (MMP-2, MMP-9) és metalloproteináz inhibitorokat (TIMP-1) is szintetizálnak (Tsukada és mtsai 2006).

Az aktivált miofibroblasztok proliferációjának fő stimulálóját a PDGF (Friedman 2000), melynek  $\beta$ -típusú receptorát (PDGFR $\beta$ ) az iniciáció során fokozott mértékben kezdik el expresszálni a csillagsejtek (Lee és mtsai 2015). A normál humán és patkány máj csillagsejtjei nem fejezik ki a PDGFR $\beta$ -t (Pinzani és mtsai 1996, Wong és mtsai 1994). Patkányban azonban mind CCl<sub>4</sub>-mérgezést, mind BDL-t követően néhány órán belül megjelenik a csillagsejteken (Wong és mtsai 1994), míg humán HBV és HCV fertőzött májakban a fibrózis előrehaladtával emelkedő szintű expresszióját írták le (Pinzani és mtsai 1996). A PDGF többek között az egyik fő kemotaktikus inger a sérülés helyére vándorló miofibroblasztok számára (Friedman 2008). PDGFR $\beta$  kiütött egéren csökkent, míg autoaktivált PDGFR $\beta$ -t kifejező egereken fokozott mértékű májfibrózist írtak le krónikus CCl<sub>4</sub> kezelést követően (Kocabayoglu és mtsai 2015).

Egy másik csillagsejt-mitogén növekedési faktor az epidermális növekedési faktor (EGF) (Friedman 2008). Az EGF az EGF receptoron (EGFR) keresztül hat, hasonlóan más növekedési faktorokhoz, pl. a TGF $\alpha$ -hoz, amphiregulinhoz, heparin kötő EGF-hez (Hb-EGF) (Komposch és Sibia 2015). A humán cirrotikus májban emelkedett EGF mRNA szintet írtak le, míg az egészséges májban nem detektálható az EGF mRNA (Kömüves és mtsai 2000). Érdekes a módon különböző EGFR-ligandoknak különböző hatása lehet a májfibrózis progressziójára: amphiregulin KO egérben csökkent (Perugorria és mtsai 2008), míg Hb-EGF KO egéren fokozott mértékű (Takemura és mtsai 2013) kötőszövet-lerakódást írtak le krónikus CCl<sub>4</sub> kezelés, ill. BDL hatására.

A májfibrózis kialakulásában kulcsszerepet tölt be a TGF $\beta$ , mely különböző májkárosító hatásokra többek között májsejtekből, Kupffer-sejtekből, granulocitákból, endotélsejtekből és miofibroblasztokból szabadul fel (Dooley és ten Dijke 2012). A TGF $\beta$ -nak három izoformája ismert ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3), ezek közül a  $\beta$ 1 a legjobban jellemzett. Sejttenyészetben gátolja a hepatociták osztódását, valamint apoptózist indukál a májsejtekben, míg az aktivált miofibroblasztokat proliferációra, valamint kollagén és egyéb ECM komponensek termelésére serkenti (Dooley és mtsai 2012, Nakatsukasa és mtsai 1990). In vivo a TGF $\beta$  a miofibroblasztok kollagéntermelésének legfőbb stimulátora (Tsukada és mtsai 2006, Friedman 2008). Mind humán mintákban, mind kísérletes körülmények között emelkedett TGF $\beta$ 1 expressziót írtak le cirrotikus májakban (Nagy és mtsai 1991, Nakatsukasa és mtsai 1990). A májsejtjeiben folyamatosan aktív TGF $\beta$ 1-et termelő transzgen egérben magas TGF $\beta$ 1 szérumszint mellett spontán diffúz májfibrózis fejlődik ki (Sanderson és mtsai 1995).

Természetesen a miofibroblasztokra számos egyéb jelátvivő molekula is hatással van (pl. fibroblaszt növekedési faktor (FGF), endothelin-1, nitrogén-monoxid, adenzin, TNF $\alpha$ ). A miofibroblasztok májcirrózis kialakulásában játszott szerepe valószínűleg sokrétűbb a fokozott ECM termelésnél, pl. elősegítik különböző gyulladásosejtek infiltrációját a májba, melyek szintén hatással lehetnek a fibrogenézisre (Friedman 2008).

A duktuláris reakció szabályozásában is számos citokin, ill. növekedési faktor vesz részt, melyek egy része közös a miofibroblasztokra hatókkal. A TNF és az IL-6 központi szerepét támasztja alá, hogy IL-6, ill. TNF- $\alpha$  receptor KO egerekben csökkent

progenitor sejtes válasz alakul ki CDE diéta hatására (Knight és mtsai 2000). Az ovális sejtek proliferációja során emelkedett nukleáris faktor kapp B (NF- $\kappa$ B) és signal transducer and activator of transcription 3 (STAT-3) aktivitás figyelhető meg, előbbi a TNF, míg utóbbi az IL-6 által aktivált jelátviteli út fontos tagja (Sanchez és mtsai 2004). Az IL-6 fontos szerepet játszik a duktuláris sejtek különböző növekedési faktorok iránti érzékenyítésében is (Santoni-Rugiu és mtsai 2005). Ilyen növekedési faktor pl. a hepatocita növekedési faktor (HGF), TGF $\alpha$  és az a FGF, melyek fő forrásai a csillagsejtek, és szerepet játszanak az ovális sejtek proliferációjában és differenciációjában (Santoni-Rugiu és mtsai 2005). Ezt többek között az is alátámasztja, HGF, ill. EGF infúziója az AAF/PH modellben fokozta az ovális sejtek proliferációját (Nagy és mtsai 1996). Érdekes módon míg az EGF csak az ovális sejtekben váltott ki megnövekedett proliferációt, addig a HGF adása egyenlő mértékben növelte a csillagsejtek proliferációját is. Ez a jelenség megerősíti az EGF szerepét a duktuláris reakció kiterjedésében.

Humán májban, masszív májnekrózisban megjelenő duktuláris reakció sejtjein is leírták a TGF $\alpha$ , EGFR, HGF, c-met, TGF $\beta$ , TGF $\beta$  receptor expresszióját (Kiss és mtsai 2001).

#### I.5. A cirrózis tanulmányozására használt állatmodellek

A cirrózis *in vivo* vizsgálatára számos állatfajt alkalmaztak (pl. csimpánz, pávián, kutya, nyúl), de leggyakrabban rágcsálókat, általában patkányokat vagy egereket használnak (Starkel és Leclercq 2011). Előnyös tulajdonságaik többek között a kis méret, a relatíve rövid élettartam, a könnyű tarthatóság és tenyésztethetőség (Liu és mtsai 2013). Emberben gyakorlatilag lehetetlen a cirrózis kialakulásának, lefolyásának pontos időbeli követése, különösen igaz ez a kompenzált, tünetmentes szakaszra. A cirrózis kísérletes állatmodellei viszont lehetővé teszik a betegség lefolyásának dinamikus, több időpontban végzett vizsgálatát, valamint a korai szakasz tanulmányozását is (Smith 2013). A genetikailag módosított egérmodellek lehetővé teszik specifikus molekulák szerepének vizsgálatát a cirrózis patogenezisében (Iredale 2007).



Természetesen minden kísérleti állatmodellnek vannak hátrányai. Egy állatfajban hatalmas különbségek lehetnek a génextpresszióban, az immunológiai, metabolikus, ill. farmakológiai folyamatokban mind az emberhez, mind más állatfajokhoz képest (Starkel és Leclercq 2011). Emellett nem minden humán etiológiai tényezőre van megfelelő állatmodell, pl. a rágcslókat nem lehet HBV-vel, HCV-vel fertőzni (Smith 2013). Ezen kívül emberben a májcirrózis általában évtizedek alatt alakul ki, míg rágcslókban sokszor még az állat élettartamához viszonyítva is jóval rövidebb idő szükséges a májfibrózis/cirrózis kifejlődéséhez (Smith 2013). A kötőszövetes átépülés mintázata is különbözhet; míg emberben a legtöbb etiológiai tényező periportálisan kezdődő fibrózist vált ki, addig számos állatmodellben pericentrálisan indul a kötőszövet felhalmozódása (Starkel és Leclercq 2011). Mindezek miatt jelenleg nem ismert olyan rendszer, ami a humán cirrózist minden aspektusában modellezni tudná (Liu és mtsai 2013). Egereken végzett kísérletek során azt is figyelembe kell venni, hogy különböző egértörzsekben ugyanaz a kiváltó hatás nagymértékben eltérő súlyosságú fibrózist okozhat (Liu és mtsai 2013).

A cirrózis gyakran alkalmazott állatmodelljei a következő csoportokba oszthatók a kiváltó hatás szerint (Crespo Yanguas és mtsai 2016, Wu és Norton 1996):

kémiai vegyületek	ethanol tioacetamid (TAA) széntetraklorid (CCl <sub>4</sub> ) dimetilnitrózamin (DMN) dietilnitrózamin (DEN)
módosított összetételű tápok	metionin és kolin deficiens diéta (MCD) kolin deficiens, etioninnal kiegészített diéta (CDE) kolin deficiens, L-aminosavakat tartalmazó diéta (CDAA) magas zsírtartalmú diéta (HFD)
epeút lekötés	BDL
immunológiai mechanizmus	heterológ szérum kezelés concanavalin A Schistosoma-fertőzés

genetikailag módosított állatmodellek	multidrug resistance associated protein 2 (Mdr2) KO egér
--	---

A továbbiakban két, patkányon és egéren is elterjedten használt vegyület, a CCl<sub>4</sub> és TAA hatása kerül részletes bemutatásra.

A CCl<sub>4</sub> az egyik legszélesebb körben és legrégebb óta használt anyag a májkutatásban. A 20. század elején számos ipari célra használták, sőt, még emberen is igen elterjedten alkalmazták féreghajtóként (Lamson és mtsai 1928). A 30-as években már használták patkány modellekben cirrózis kiváltására (Laquet 1932, Cameron és Karunaratne 1936). A CCl<sub>4</sub>-et a citokróm p450 2E1 (CYP2E1) enzim metabolizálja, amelyet a pericentrális és midzonális hepatociták fejeznek ki. Ennek során triklórmetil (CCl<sub>3</sub><sup>•</sup>) gyök keletkezik, ami centrilobuláris nekrozist okoz (Crespo Yanguas és mtsai 2016). Mivel a CYP2E1 enzim más szervekben csak alacsony szinten fejeződik ki, így a CCl<sub>4</sub> csak enyhe extrahepatikus hatással rendelkezik (Liu és mtsai 2013). A CYP2E1 enzimet indukáló szerekkel a májkárosító hatás potenciózása, és így a fibrózis/cirrózis kialakulásának felgyorsítása érhető el. Ilyen szer pl. a fenobarbitál (PhB), melyet az állatok ivóvizében oldva hosszú ideje használnak a CCl<sub>4</sub>-el kombinálva állatkísérletekben (McLean és mtsai 1969). A CCl<sub>4</sub> számos különböző módon juttatható be az állat szervezetébe, pl. gyomorszondán át, intraperitoneálisan, szubkután vagy inhaláció útján. A cirrózis kiváltásához ismételt adagolásra van szükség, a kezelések között nem szabad hosszú időnek eltelnie, mert a parenhima regenerálódhat az eltelt idő alatt (Pérez Tamayo 1983). A legtöbb protokoll heti két-három dózist alkalmaz. A kísérleti állatok terminálását célszerű két-három nappal az utolsó dózis beadását követően időzíteni, ennél korábban az akut hatások (nekrozis, gyulladás), később pedig a parenhima helyreállítását célzó folyamatok dominálhatják a szövettani képet (Starkel és Leclercq 2011).

A CCl<sub>4</sub>-hez hasonlóan a TAA-nak is volt humán alkalmazási területe, az előző század 40-es éveiben narancsvédő szerként használták (Childs és Siegler 1945). Májtoxicus hatása hamar kiderült, Fitzhugh és Nelson (1948) már 1948-ban cirrózist váltott ki patkányokban TAA tartalmú táp etetésével. Metabolizmusa során a flavin tartalmú monooxigenáz és a citokróm p450 enzimek tioacetamid-S-oxidot képeznek, a

reakció során képződő szabadgyökök okozzák a sejtkárosító hatást (Low és mtsai 2004). A májon kívül a vesére (tubuláris nekrozis) és a thymusra is toxikus (Barker és Smuckler 1973). Ismételten intraperitoneálisan adagolva vagy ivóvízben oldva alkalmazzák cirrózis kiváltására (Delire és mtsai 2015). A májban akutan centrilobuláris nekrozist okoz (Gupta 1956a), de emellett a periportális hepatocitákat is károsítja (Starkel és Leclercq 2011).

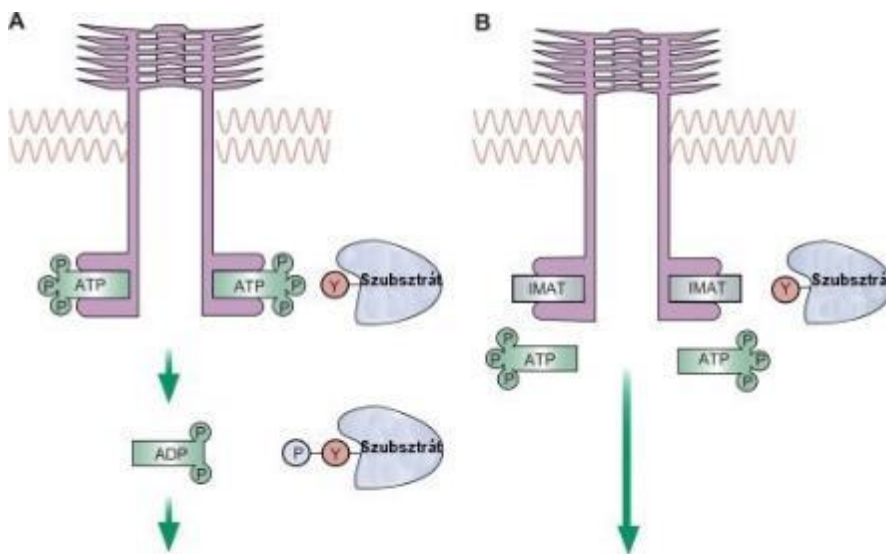
Rövidebb idejű adagolás esetén mind a CCl<sub>4</sub>, mind a TAA kiváltotta májfibrózis reverzibilis lehet a kezelés megszüntetése után (Schuppan és Pinzani 2012), de mindkét vegyület használatával leírtak irreverzibilis cirrózist is (Cameron és Karunatre (1936), Maros és mtsai (1975), Fischer-Nielsen és mtsai (1991), ill. Kobayashi és mtsai (2000) CCl<sub>4</sub>-kezelt patkányokon; Gupta (1956b), ill. Popov és mtsai (2006) TAA-kezelt patkányokon; Quinn és Higginson (1965), ill. Popov és mtsai (2011) CCl<sub>4</sub> és TAA-kezelt egereken).

#### I.6. Célzott terápiás szerek alkalmazása cirrotikus állatmodelleken

Az onkológiát az elmúlt évtizedben forradalmasította az ún. kis molekulású gyátlószeres elterjedése, melyek célzottan egyes daganattípusok növekedését segítő molekulákat képesek gátolni (Huang és mtsai 2014). Ezeknek a gyógyszereknek egy nagy csoportja az ún. tirozin kináz inhibitorok, melyek tirozin kináz aktivitással rendelkező receptorok, ill. fúziós fehérjék működését gátolják. Mivel a fibrogenézisben, ill. a duktuláris reakció kialakulásában szerepet játszó receptorok egy része a receptor tirozin kinázok családjába tartozik, (pl. EGFR, PDGFR, c-met, vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) receptor, FGF receptor, c-kit), így nem meglepő, hogy számos tirozin kináz gátló hatását vizsgálták meg a májfibrózis és májregeneráció különféle állatmodellein (Qu és mtsai 2016).

Az elsőként kifejlesztett és a klinikai gyakorlatban elterjedt tirozin kináz gátló az imatinib (STI-571, Glivec, Gleevec) volt (Druker és mtsai 2001) (3. ábra). Eredetileg a krónikus mieloid leukémiában (CML) kórosan működő Bcr-abl fúziós fehérje gátlására fejlesztették ki, de a c-kit és PDGFR tirozin kinázokat is hatékonyan gátolja, ennek köszönhetően több más daganat terápiájára is használják (pl. gasztrointesztinális

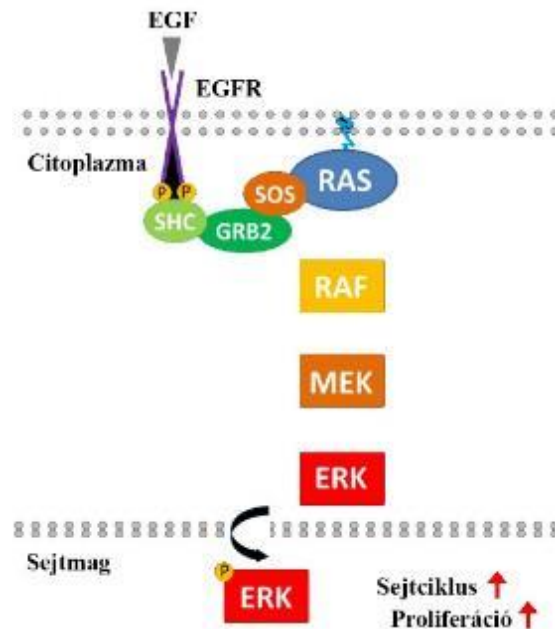
stromális tumor (GIST), dermatofibrosarcoma protuberans, Philadelphia-kromoszóma pozitív akut limfoid leukémia (ALL)) (Iqbal és Iqbal 2014). Főként a PDGFR fibrogenézisben betöltött központi szerepe indokolja, hogy állatkísérletes modellekben számos szervben vizsgálták az imatinib kötőszövet felhalmozódásra gyakorolt hatását. Tüdőben (Li és mtsai 2009), szívben (Liu és mtsai 2014), vesében (Wang és mtsai 2005), bőrben (Distler és mtsai 2007) is leírták antifibrotikus hatását, de a legtöbb erről beszámoló tanulmány a májat vizsgálta, ahol több különböző kísérleti modellben is hatékony fibrózist gátló szernek bizonyult (Yoshiji és mtsai 2005, Yoshiji és mtsai 2006, Neef és mtsai 2006, Knight és mtsai 2008, El-Agamy és mtsai 2011, Kim és mtsai 2012, Kuo és mtsai 2012). Emellett hosszú távon CDE diétán tartott egereken az imatinib kezelés csökkentette a progenitor sejtek számát és a tumorincidenciát (Knight és mtsai 2012), míg TAA-kezelt patkányokban a duktuláris reakció kiterjedtségét is (Kim és mtsai 2012).



**3. ábra** Az imatinib a c-kit receptor ATP-kötő helyéhez kötődve inaktív állapotban stabilizálja a receptort, így gátolja a jelátvitelt (Forrás: Rubin és mtsai, The Lancet, 2007;369:1731-40).

Egy második generációs Bcr-abl gátlószerről, a nilotinibról is leírták, hogy TAA-val kezelt patkányokon (Shaker és mtsai 2011), valamint CCl<sub>4</sub>-kezelt, ill. epeút lekötésen átesett egereken (Liu és mtsai 2011) képes csökkenteni a fibrózist.

Az elsősorban nem kissejtes tüdőrák terápiájában használt, EGFR-gátló erlotinibet (4. ábra) is sikeresen alkalmazták különböző állatkísérletes modellekben a kötőszövet felhalmozódás gátlására; DEN-kezelt patkányokon, CCl<sub>4</sub>-kezelt, ill. BDL-en átesett egereken is antifibrotikus hatást fejtett ki, valamint jelentősen csökkentette a tumorincidenciát a DEN-kezelt állatokban (Fuchs és mtsai 2014). Emellett neurofibromatózis 2 (NF2) gén kiütött egereken képes volt gátolni a progenitor sejtek osztódását (Benhamouche és mtsai 2010).



**4. ábra** Az erlotinib az EGFR gátlása révén az ábrázolt jelátviteli út felfüggesztésével csökkenti a sejtek proliferációs aktivitását (Forrás: Bowman B: FADD and its phosphorylation mediate mitogenic signaling in mutant Kras tumors, Thesis, 2015).

A többek között PDGFR $\beta$  és VEGFR elleni hatással rendelkező sorafenibet előrehaladott HCC első vonalbeli terápiájában alkalmazzák (Qu és mtsai 2016). Ezért is bír nagy jelentőséggel, hogy számos állatkísérletes modellben gátolja a fibrózis progresszióját, pl. TAA-kezelt (Hong és mtsai 2013), epeút lekötött, valamint DMN-kezelt patkányokban (Wang és mtsai 2010), ill. CCl<sub>4</sub>-kezelt egereken (Deng és mtsai 2013).

Az eddig felsoroltak mellett még több kis molekulású gátlószer (brivanib, vatalanib) (Qu és mtsai 2016), ill. az immunszuppresszáns, mammalian target of rapamycin (mTOR) gátló rapamycin (Bridle és mtsai 2009, Wang és mtsai 2014) antifibrotikus hatásáról is beszámoltak különböző állatkísérletes modellekben.

Az említett gyógyszerek által gátolt receptor tirozin-kinázok a duktuláris reakció szabályozásában is fontos szerepet játszanak, ennek ellenére a legtöbb idézett tanulmány nem vizsgálta a duktuláris reakcióra kifejtett hatást. Emellett a megfigyelések döntő többsége csupán egy kísérleti időpontra vonatkozik, így az antifibrotikus hatás dinamikájáról sem áll rendelkezésre részletes ismeretanyag.

## I.7. A cirrózis klinikai jellemzése

A cirrotikus betegek klinikai állapotának jellemzésére hagyományosan a Child-Pugh stádiumokat használják. Child és Turcotte (1964) eredetileg a portoszisztémás shunt operáción átesett cirrotikus betegek posztoperatív halálozási kockázatát becslésére alakította ki a rendszert, melyet Pugh és mtsai (1973) 1973-ban módosítottak, így alakult ki a ma is használatos rendszer, melyben az albumin, bilirubin, protrombin idő (ill. International Normalized Ratio - INR) értékekre, valamint az aszcitesz és hepaticus enkefalopátia meglétére, ill. súlyosságára adott pontszámok alapján sorolják a betegeket A, B vagy C stádiumba. Napjainkban a transzplantációs várólisták rangsorolására a MELD score (Model for End-Stage Liver Disease) használatos (Kamath és mtsai 2001). A pontszámot az aktuális bilirubin, kreatinin, INR, valamint a legújabb ajánlások szerint a szérum-nátrium értékekből lehet kiszámolni egy interneten elérhető kalkulátor segítségével (<https://optn.transplant.hrsa.gov/resources/allocation-calculators/meld-calculator/>). A fő különbséget a Child-Pugh stádiumokhoz képest a szubjektív elemek hiánya és a vesefunkció figyelembe vétele adja.

A cirrózis jellemzésére gyakran használt klinikai paraméter a portális nyomás becslésére használt HVPG (hepatic vein pressure gradient). A HVPG normálisan 3-5 Hgmm, 6 Hgmm fölötti érték portális hipertenziót, 10 Hgmm fölötti HVPG klinikailag szignifikáns portális hipertenziót jelez; e fölött az érték fölött számíthatunk nyelőcső

varixok kifejlődésére (Garcia-Tsao és mtsai 2010), a varixok vérzése pedig 12 Hgmm fölött várható (D'Amico 2014). Több tanulmány eredményei szerint a HVPG korrelál a szövettani mintán mért CPA-val, ill. más szövettani paraméterekkel (szeptumvastagság, göbök mérete) (Nagula és mtsai 2006, Kumar és mtsai 2008, Calvaruso és mtsai 2009, Sethasine és mtsai 2012). A HVPG használatának hátránya, hogy nem állandó, számos tényezőtől függ, mértékét befolyásolja a gyulladás, a csillagsejt aktiváció mértéke, az esetleges gyógyszeres terápia (Calvaruso és mtsai 2009). Ezen kívül mérése drága, és jól képzett operátort igényel, így elérhetősége korlátozott (Lemoine és mtsai 2008).

### I.7.1. Kísérletek a cirrózis osztályozására

Az első kísérlet a cirrózis kompenzált-dekompenzált szakaszra osztásánál részletesebb klinikai osztályozására a IV. Baveno konszenzus konferencián történt, ahol a betegség lefolyását négy stádiumra osztották (De Franchis 2005). Ezt finomította tovább egy 2014-es felosztás, mely öt stádiumot különböztet meg (D'Amico 2014): I. stádium – kompenzált cirrózis oesophagus varixok nélkül; II. stádium – kompenzált cirrózis oesophagus varixok megjelenésével; III. stádium – felső gasztrointesztinális vérzés más dekompenzáló esemény nélkül; IV. stádium – aszcitesz, sárgaság vagy hepatikus encefalopátia megléte; V. stádium – több mint egy dekompenzáló tényező jelenléte. A mortalitás a stádiumok előrehaladtával nő, az V. stádiumba tartozó betegek 87%-a meghal öt éven belül. Garcia-Tsao és mtsai (2010) a kompenzált cirrózist a HVPG érték alapján osztanak további alcsoportokba (6 Hgmm alatt – nincs portális hipertenzió; 6-10 Hgmm között – klinikailag nem szignifikáns portális hipertenzió; 10 Hgmm fölött – klinikailag szignifikáns portális hipertenzió).

A jelenleg használt score-rendszerek a cirrotikus mintákat egyetlen kategóriába sorolják, így a cirrózis szövettani diagnózisa magában nem hordoz semmilyen klinikailag releváns információt a dekompenzáció vagy a HCC kialakulásának kockázatára, ill. a terápiás válaszra. Ezt a hiányosságot próbálja orvosolni a Laennec-osztályozás, mely a METAVIR rendszeren alapul, azonban a legmagasabb, 4-es stádiumot három alcsoportra osztja a szeptumvastagság és a cirrotikus göbök mérete alapján (Kutami és mtsai 2000): 4A - vékony szeptumok, 4B - legalább két széles szeptum és a minta kevesebb mint felében kis göbök, 4C - legalább egy nagyon széles szeptum vagy a minta nagy részében kis göbök jelenléte. Ez az osztályozás (a 4-es stádium további felosztása) egy 215, főként alkoholos cirrózisban szenvedő betegből álló csoportban jól korrelált a HVPG értékkel, a Child-Pugh stádiummal és a MELD score-ral (Kim és mtsai 2011).



## I.8. A cirrózis regressziója

A cirrózist egészen a közelmúltig különböző etiológiájú krónikus májbetegségek közös, irreverzibilis végállapotának tekintették. Először Pérez-Tamayo (1979) vetette föl, hogy a cirrózis reverzibilis lehet. A következő évtizedekben számos tanulmány írta le a májfibrózis regresszióját a kiváltó hatás megszüntetését követően (Desmet és Roskams 2004). Végül a krónikus virális hepatitiszek kezelésében az elmúlt években lezajló robbanásszerű fejlődés vezetett ahhoz, hogy napjainkban már reális alternatíva lehet a betegség regressziójának elérése, és ennek köszönhetően a cirrózis szemlélete átalakulóban van (Bedossa 2015). Az etiológiától függetlenül egységes, egyféle kimenetelű állapot helyett azonban ma már nagyon is heterogén, dinamikusan változó betegségnek tekintik (Bruno és mtsai 2016), amelyben bizonyos etiológiák (vírushepatitiszek, ALD) esetén a kiváltó hatás megszüntetését követően lehetséges a regresszió. Egy nemzetközi munkacsoport (Hytiroglu és mtsai 2012) – nem teljesen meglepően – a cirrózis elnevezés elvetését javasolja, többek között azért, mert az orvosi köztudatban a cirrózishoz nagyon szervesen hozzátartozik az irreverzibilitás fogalma. A cirrózis helyett az előrehaladott állapotú krónikus májbetegség kifejezés használatát javasolják, ebbe a csoportba sorolandók azok az esetek is, ahol van szerkezeti torzulás és jelentős fibrózis, de a hagyományos score-rendszerekben még nem tartoznának a cirrózis kategóriába. A stádiumok megállapítása etiológia specifikus kellene, hogy legyen (Hytiroglu és mtsai 2012). Ezzel együtt a májfibrózis stádiumának megítélésére használt score-rendszerek hiányosságai is előtérbe kerültek. Mivel ezekben a beosztásokban a cirrózist végstádiumnak tekintik, és minden cirrotikus máj egy stádiumba tartozik, így nem különíthető el, hogy melyik esetben van még esély regresszióra, és melyik az, amely valóban végállapotnak felel meg (Rosselli és mtsai 2013). A fibrózis esetleges reverzibilitását befolyásoló szerkezeti változások meghatározása az esetleges antifibrotikus terápiák szempontjából is fontos lenne. Az irreverzibilitással leginkább a kollagének közti keresztkötések kialakulását hozzák összefüggésbe (Garcia-Tsao és mtsai 2010), melyeket a lizil-oxidáz enzimek alakítják ki. Gátlásuk a kiváltó ágens megszüntetését követően segítette a fibrózis regresszióját (Liu és mtsai 2016). A klinikai lefolyás szempontjából a porto-centrális szeptumoknak van nagy jelentősége, mert lehetővé teszik az intrahepatikus porto-szisztémás és arterio-

szisztémás shuntök kialakulását. Ezeken keresztül a vér egy része elkerüli a májsejteket, ami fontos szerepet játszik a májműködés dekompenzációjában. A shuntok kialakulását fontos határvonalnak tartják a még visszafordítható, és a már irreverzibilis cirrózis között (Desmet és Roskams 2004).

Napjainkra szükségessé vált a cirrózis osztályzása a különböző prognózisú betegek elkülönítéséhez. Igény van olyan objektívan, reprodukálhatóan mérhető paraméterekre, melyek segíthetnek az osztályozásban, ill. annak előrejelzésében, hogy melyik esetek reagálnak jól gyógyszeres terápiára, és melyik esetekben nincs reális esély a regresszióra (Garcia-Tsao és mtsai 2010). Ezzel párhuzamosan felértékelődött az etiológiai tényezők szerepe, így olyan paraméterek is nagy jelentőséggel bírhatnak, melyek különböznek egyes etiológiájú cirrotikus betegekben.

## II. Célkitűzések

- I. A cirrotikus máj szövettani metszeten mérhető morfológiai paraméterei (kötőszövet, duktuláris reakció, ill. aktivált miofibroblasztok által elfoglalt terület, kötőszövetes szeptumok vastagsága, májsejtek és duktuláris sejtek proliferációs aktivitása) közötti összefüggések keresése humán mintákon.
- II. A humán mintákon elemzett morfológiai paraméterek és a betegség etiológiai tényezői, a betegek laboratóriumi értékei, valamint a cirrózis szövődményeinek fennállása közti összefüggések keresése, a cirrózis esetleges osztályozása céljából.
- III. A kötőszövet felhalmozódásának és a duktuláris reakció kiterjedtségének, valamint a májsejt és duktuláris sejt osztódás dinamikájának részletes tanulmányozása egér májfibrózis modellekben.
- IV. A tirozin-kináz gátló imatinib és erlotinib hatásának vizsgálata a fibrózis és duktuláris reakció progressiójára egér májfibrózis modellekben.

### III. Módszerek

#### III.1. Humán minták

Vizsgálatainkat 56, a Semmelweis Egyetem Transzplantációs és Sebészeti Klinikáján 2010 és 2012 között transzplantáció során eltávolított cirrotikus májon végeztük. A cirrózis etiológiai tényezőinek megoszlása a következő volt: 30 HCV, 4 HBV, 11 ALD, 5 AIH, 4 PSC, 1 PBC, 1 kriptogén eredetű. 13 májban (10 HCV, 1-1-1 ALD, AIH, PBC) HCC is kialakult. A kutatásban három normál májat használtunk kontrollnak. Minden, a kutatásban felhasznált májból nagyméretű, legalább 1 cm<sup>2</sup> területű kimetszés került beágyazásra a VII. szegmentumból, ahonnan élő betegekből a májbiopszis mintákat is veszik. A humán mintákon végzett kísérleteket a Semmelweis Egyetem Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága 125/2010 sz. határozatában engedélyezte.

Minden beteg esetén adatokat gyűjtöttünk a transzplantációt megelőző utolsó laborvizsgálat eredményeiből. A máj- és vesefunkció fő paraméterei (szérum bilirubin (SeBi), aszpartát-aminotranszferáz (AST), alanin-aminotranszferáz (ALT), alkalikus foszfatáz (ALP), albumin, szérum összfehérje (TP), gamma-glutamil transzferáz (GGT), INR, kreatinin), valamint kvalitatív vérkép adatok (hemoglobin szint (Hb), fehérvérsejtszám (WBC), thrombocytaszám (Thr)) kerültek feljegyzésre. A szérum bilirubin, INR és kreatinin értékekből kiszámoltuk a MELD pontszámot. Ezen kívül azt is ellenőriztük, hogy a betegek kórtörténetében szerepel-e nyelőcső varikozitás, varix vérzés, ill. bármilyen fokú aszcitesz vagy enkefalopátia.

#### III.2. Állatkísérletek

Kísérleteinket az Intézet Állatházában 8 hetes hím egereken végeztük, amelyeket standard körülmények között tartottunk. Az állatkísérleteket az Amerikai Egyesült Államok Nemzeti Egészségkutató Intézetének (NIH) állatkísérletekre vonatkozó protokolljai szerint végeztük, betartva a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának irányelveit.

Tíz kísérleti csoportot alakítottunk ki (5. ábra):

Kontroll modellek:

**I.** Vad típusú, C57Bl/6 egereket széntetraklorid (CCl<sub>4</sub>) (0,2 ml/kg napraforgóolajban oldva, gyomorszondán át heti 2x) és fenobarbitál (PhB) (0,5 g/l, ivóvízben oldva) kombinációjával kezeltünk (I. VT+CCl<sub>4</sub>, n=49).

**II.** Vad típusú, C57Bl/6 egereket TAA-val (300 mg/l, ivóvízben oldva) kezeltünk (II. VT+TAA, n=50).

**III.** Májukban aktív TGFβ-t kifejező transzgén egereket kezeltünk TAA-val (300 mg/l, ivóvízben oldva) (III. TGFβ+TAA, n=61). Ezekbe az állatokba albumin promóterhez kötött sertés TGFβ1 cDNS-t transzfektálnak, így az egér májsejtjei a transzgénről folyamatosan termelik a TGFβ-át, melynek szérumszintje a vad típusú egerekben mérhető szint többszöröse (Sanderson és mtsai 1995).

A CCl<sub>4</sub> kezelést megkíséreltük TGFβ transzgén egereken is, azonban a vad típusú egereken alkalmazott dózist nem tolerálták az állatok.

Gyógyszerrel kezelt modellek:

**IV.** Vad típusú, C57Bl/6 egereknek TAA kezelés (300 mg/l, ivóvízben oldva) mellé naponta 25 mg/kg dózisban szájon át vízben oldott imatinibet (Glivec, Novartis, Basel) is adtunk (IV. VT+TAA+imatinib, n=54).

**V.** TGFβ transzgén egereknek TAA kezelés (300 mg/l, ivóvízben oldva) mellé naponta 25 mg/kg dózisban szájon át vízben oldott imatinibet is adtunk (V. TGFβ+TAA+imatinib, n=38).

**VI.** Vad típusú, C57Bl/6 egereknek TAA kezelés (300 mg/l, ivóvízben oldva) mellé naponta 5 mg/kg dózisban szájon át erlotinibet (Tarceva, Roche, Basel) is adtunk, melyet először dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottunk fel, amit vízzel hígítottunk tovább (VI. VT+TAA+erlotinib, n=48).

**VII.** TGFβ transzgén egereknek TAA kezelés (300 mg/l, ivóvízben oldva) mellé naponta 5 mg/kg dózisban szájon át vízben oldott erlotinibet is adtunk, melyet először DMSO-ban, majd vízben oldottunk föl (VII. TGFβ+TAA+erlotinib, n=38).

Az I-VII. modellben a kezeléseket 18 hétig folytattuk, a kísérlet kezdetétől számított 3., 6., 9., 12., 15. és 18. héten termináltunk csoportonként 5-16 állatot. A '0' időpont adatait 5-5 egészséges vad típusú, ill. transzgén egér májából mért értékek adják. A VI. és VII. modellben az erlotinib kezelést eleinte megkíséreltük 10 mg/kg/nap dózisban alkalmazni, de ezt az állatok nem tolerálták, így felére csökkentettük a dózist.

Terápiás modellek:

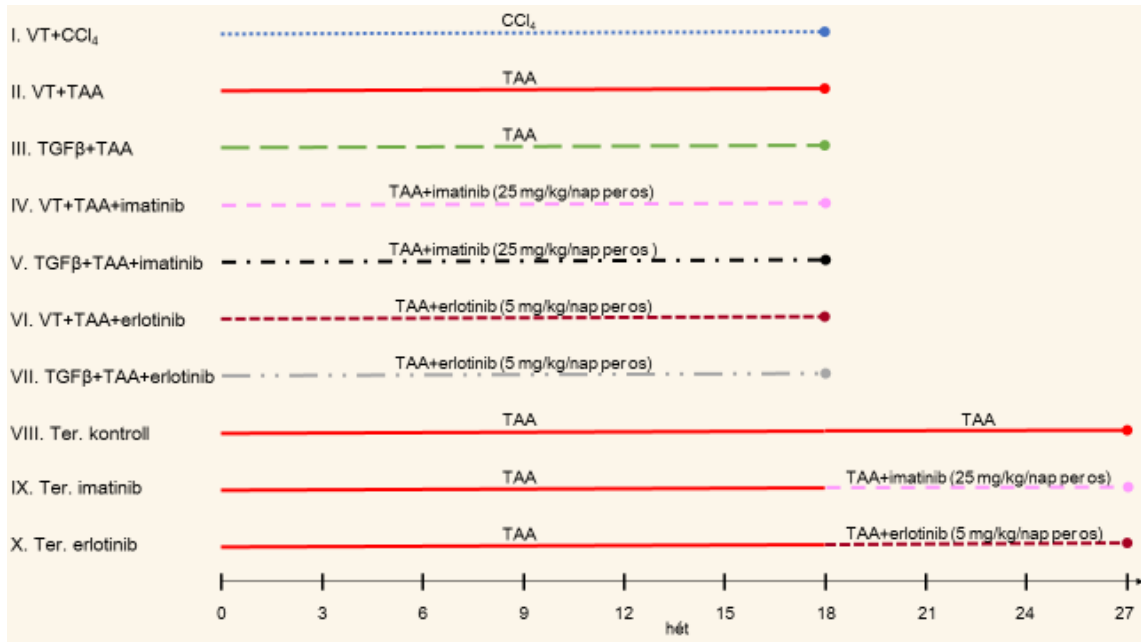
A fenti gyógyszerrel kezelt modellek mellett, ahol a májfibrózist kiváltó ágens adásával egy időben kezdtük meg a gyógyszerek alkalmazását, az imatinib és erlotinib hatását megvizsgáltuk már kialakult májfibrózisra is egy terápiás kísérletben. Ehhez a következő három kísérleti modellt állítottuk föl:

**VIII.** Vad típusú, C57Bl/6 egereket 27 hétig kezeltünk TAA-val (300 mg/l, ivóvízben oldva) (VIII. Ter. kontroll, n=18).

**IX.** Vad típusú, C57Bl/6 egereket 27 hétig kezeltünk TAA-val (300 mg/l, ivóvízben oldva). A TAA adásának 19. hetétől az állatok naponta 25 mg/kg dózisban per os imatinib (a fent leírt módon feloldva) kezelésben is részesültek (IX. Ter. imatinib, n=18).

**X.** Vad típusú, C57Bl/6 egereket 27 hétig kezeltünk TAA-val (300 mg/l, ivóvízben oldva). A TAA adásának 19. hetétől az állatok naponta 5 mg/kg dózisban per os erlotinib (a fent leírt módon feloldva) kezelésben is részesültek (X. Ter. erlotinib, n=17).

A terápiás kísérlet 21., 24. és 27. hetén (vagyis a gyógyszeres kezelés kezdetétől számított 3., 6. és 9. héten) csoportonként 5-7 állatot termináltunk.



5. *ábra* A különböző kísérleti modellek sémás ábrán

Minden állat a terminálást megelőzően 20, 2, ill. 1 órával 500 mg/kg dózisu intraperitoneális brómdeoxiuridin (BrdU) kezelésben részesült.

### III.3. Szövettani feldolgozás

A humán májakkól rutin szövettani feldolgozás során formalin-fixált, paraffinba ágyazott blokkok készültek. Az állatok terminálását követően a májak egy részét BrdU-fixálóban (96%-os alkohol, desztillált víz és 35%-os formaldehid 6:3:1 arányú elegye) fixáltuk, majd paraffinba ágyasztuk. A májak más részeit folyékony nitrogénben lehűtött izopentánban lefagyasztottuk, és  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

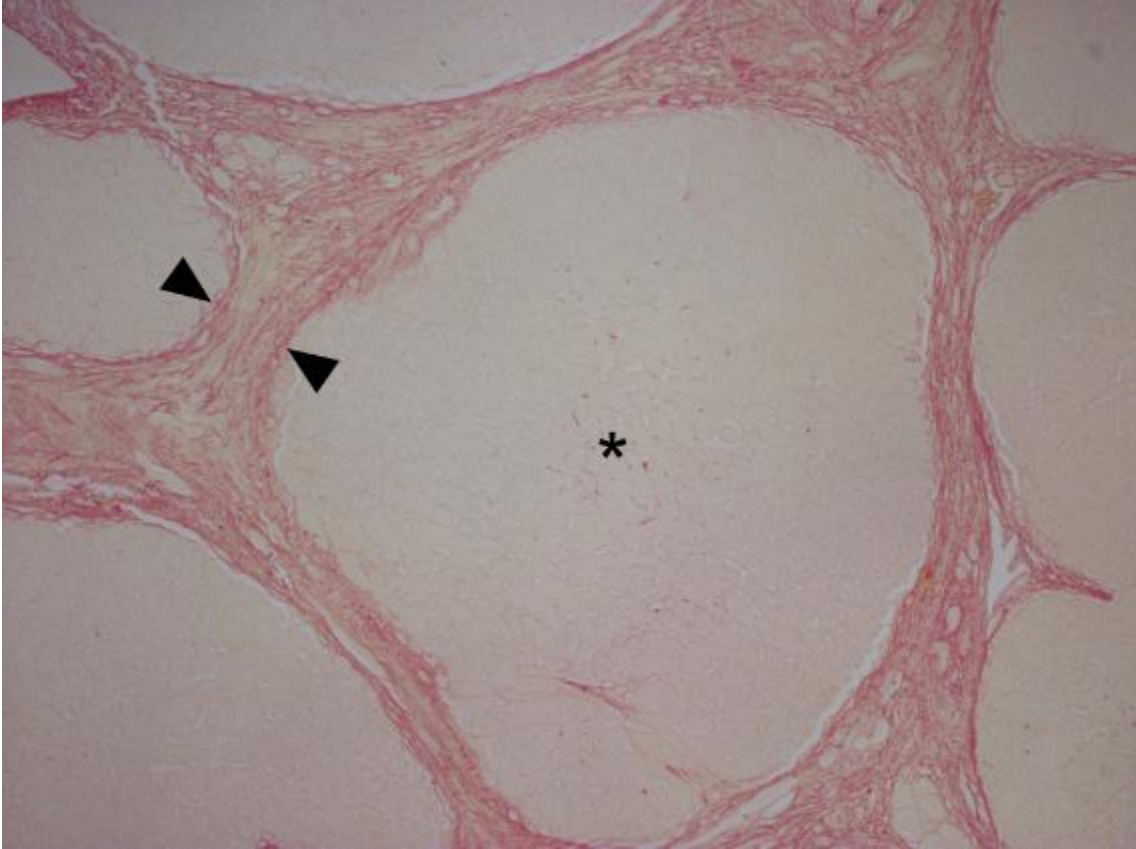
A paraffinba ágyazott blokkokból készült metszeteket xilolal és leszálló alkoholsorral rehidráltuk, majd a speciális festések és immunhisztokémiai reakciók elvégzése mellett minden humán és egér mintából hematoxin-eozin (HE) festés készült. Az elvégzett festéseket követően a metszeteket felszálló alkoholsorral dehidráltuk, majd a humán minták esetén Pertex-szel, az egér minták esetén Dako Fluorescent Mounting Mediummal (Dako, Glostrup, Dánia, kat. szám: S3023) fedtük.

### III.4. Morfometriai vizsgálatok

#### III.4.1. A kötőszövet morfometriai vizsgálata

A kötőszövet által elfoglalt terület nagyságát a humán és egér mintákon egyaránt pikroszíriusz vörössel festett, paraffinba ágyazott blokkokból készült metszeteken elemeztük. A pikroszíriusz vörös többek között az I-es és III-as kollagénhez kötődik (Szendrői és mtsai 1984, Standish és mtsai 2006), más, gyakran alkalmazott kötőszövet-jelölésekkel szemben (pl. retikulin, trikróm) alkalmas a máj kollagéntartalmának kvantitatív meghatározására (Germani és mtsai 2010). A festéshez a deparaffinált metszeteket 30 percig pikroszíriusz oldatban (0,2 g Szíriuszvörös festék feloldva 100 ml telített pikrinsav oldatban), majd 2 percig Tercier-butil akoholban tartottuk. Mind a humán, mind az egér minták esetén digitális módon határoztuk meg a kötőszövet által elfoglalt terület arányát (vagyis a már említett CPA-t mértük le). A mérés a humán mintákról négy, 4x nagyítású random látótéren történt, az egér metszetekről pedig az erre a célra egy Zeiss Axioskop 2 plus fotómikroszkóppal (Zeiss, Oberkochen, Németország) 5x nagyítású objektív használatával három, random helyzetű felvételt készítettünk. A humán mintákat a Cue-2 (Olympus, Tokió, Japán), míg az egér mintákat a Quick PhotoMicro 2.2 (Promicra, Prága, Csehország) programmal elemeztük. A humán metszeteken ezen kívül lemértük a három legvastagabb szeptum vastagságát is. A vastagság mérése a szeptumok 6. ábrán jelzett részén történt; a három mérés átlaga adta meg az egy mintára jellemző szeptumvastagság értéket.





**6. ábra** A kötőszövetes szeptumok vastagságának mérését kötőszövettel teljesen körbezárt állebenykéket (\*) tartalmazó mintákon végeztük. A nyílhegyek által közrefogott terület vastagságát mértük; minden mintában a három legmagasabb érték átlaga adta a szeptumvastagság értéket.

#### III.4.2. A duktuláris reakció és az aktivált miofibroblasztok morfometriai vizsgálata

A humán mintákon az aktivált miofibroblasztok, valamint a duktuláris reakció által elfoglalt területet SMA (egér monoklonális, kat. szám: M0851; Dako, Glostrup, Dánia; hígítás: 1:200), illetve CK7 elleni antitesttel (egér monoklonális, kat. szám: MU-255-UC; Biogenex, Fremont, CA; hígítás: 1:100) jelölt paraffinos metszeten mértük le a Cue-2 programmal, négy random 4x nagyítású látótérben. A humán mintákon a CK7 elleni antitest használatát a CK19-el szemben az indokolta, hogy a gyenge CK7 festődés segítségével azonosíthatók voltak az esetlegesen előforduló intermedier hepatobiliáris sejtek a májban. A humán májából az immunhisztokémiai festések egy Leica Bond

immunfestő automata használatával készültek. Az immunhisztokémiai reakciók előhívása diaminobenzidin (DAB) kromogén alkalmazásával történt.

Az egér májakon a duktuláris reakció által elfoglalt terület meghatározása céljából fagyasztott metszeten végeztünk CK19 elleni immunfluoreszcens jelölést. A 12 µm vastag metszeteket -20°C-os metanolban fixáltuk 10 percen át, majd 3x5 perces phosphate buffer saline-el (PBS) történő mosást követően 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a CK19 elleni primer ellenanyaggal (patkány monoklonális anti-CK 19 antitest; kat. szám: TROMA-III; Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA; hígítás:1:200). Újabb 3x5 perc PBS-es mosás után a metszeteket fél óráig inkubáltuk fluorokrómmal konjugált, patkány ellen termeltetett szekunder antitesttel (donkey anti-rat IgG secondary antibody, Alexa Fluor 488 conjugate; kat. szám: A-21208; Invitrogen, Carlsbad, CA; hígítás: 1:400). A metszeteket egy Bio-Rad MRC 1024 konfokális mikroszkóppal (Bio-Rad, Richmond, CA) vizsgáltuk, majd fotóztuk le. Minden metszetről három, random helyzetű területről készült felvétel 10x nagyítású objektív használatával, majd a képeken az ImageJ 1.49 (NIH, Bethesda, MD) programmal mértük le a duktuláris reakció által elfoglalt terület százalékos arányát.

#### III.4.3. A proliferációs aktivitás értékelése

A hepatociták, és a duktuláris reakció proliferációs aktivitásának jellemzése céljából a humán metszeten Ki-67 immunhisztokémiai reakció elvégzését követően (egér monoklonális anti-Ki-67 antitest; kat. szám: M7240; Dako, Glostrup, Dánia; hígítás: 1:400) 5000 májsejtet és 500 duktuláris sejtet számoltunk le. Ugyanebből a célból az egerek BrdU kezelésben részesültek. A BrdU egy timidin analóg, mely az éppen S-fázisban lévő sejtek DNS-ébe épül be, így ellene termelt antitest használatával, immunhisztokémiai módszerrel láthatóvá tehetők az osztódó sejtek. A CCl<sub>4</sub>-kezelt csoportban megfigyelt rendkívül alacsony osztódási aktivitás tette indokolttá három dózis BrdU adását. Az egerek májából készült paraffinos metszeten a BrdU elleni immunreakció elvégzéséhez szükséges DNS denaturációt 15 percen át tartó 3N sósavban való inkubálással értük el. Az endogen peroxidázokat 30%-os metanol-hidrogén peroxid keverékkel blokkoltuk, valamint 3%-os tejpor/PBS oldattal általános

blokkolást végeztünk. A primer antitest (egér monoklonális anti-BrdU antitest, kat. szám: 347580; BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ; hígítás: 1:20) alkalmazását követően biotinnal konjugált anti-egér szekunder antitestet (Vector Laboratories, Burlingame, CA; kat. szám: BA-2000) alkalmaztunk, majd a metszeteket ABC-kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA; kat. szám: PK-6100) használatával hívtuk elő, amelyet használat előtt fél órával bekevertünk. Az előhíváshoz DAB-ot használtunk kromogénként. Ezeken a metszeten 2500 májsejtet és 500 duktuláris sejtet számoltunk le.

### III.5. Statisztikai módszerek

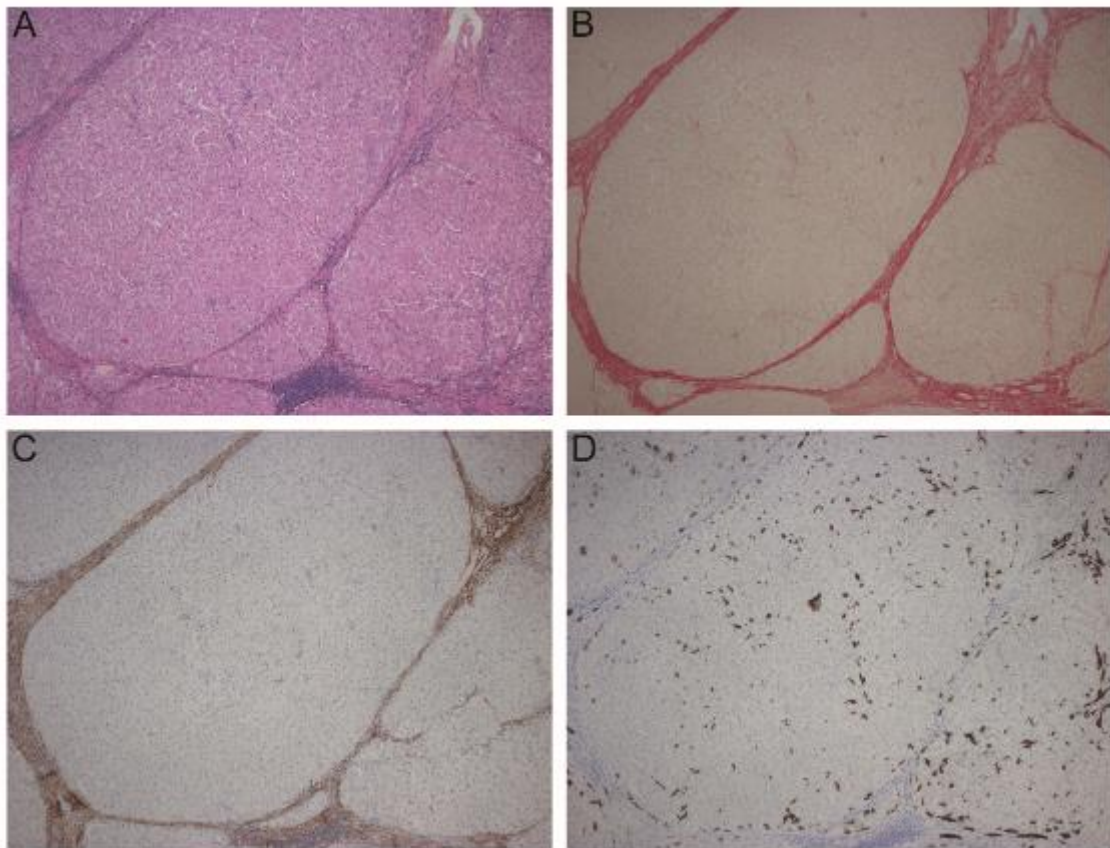
A statisztikai elemzés a Statistica 8.0 (StatSoft Inc, Tulsa, OK) szoftver használatával történt. A változók normális (Gauss-) eloszlástól való eltérését Kolmogorov Szmirnov-, ill. Lillefor-próbával ellenőriztük. A humán mintákon mért szövettani paraméterek, ill. a laborértékek közti összefüggéseket Spearman-féle rangkorrelációval vizsgáltuk. A különböző szempontok (virális/nem virális, HCC/nem HCC) szerint csoportosított adatokat nem paraméteres, Mann-Whitney U teszttel hasonlítottuk össze, mivel nem minden változó bizonyult normál eloszlásúnak.

Az állatkísérletekben az egyes kísérleti csoportok különböző időpontokban mért értékei közötti különbség vizsgálatára két utas ANOVA (two-way analysis of variance) próbát végeztünk (a változók normál eloszlásúak voltak; a két változó a kísérleti csoport, ill. az időpont). Az egyes csoportokon belül a változók közti összefüggést Spearman-féle rangkorrelációval vizsgáltuk. Az eredményeket mindenhol  $p \leq 0,05$  esetén tekintettük szignifikánsnak.

#### IV. Eredmények

##### IV.1. Korrelációs vizsgálatok a cirrotikus májak morfológiai paramétereiről és a betegek klinikai adatai között

A cirrotikus májakból vett mintákban mind a HE-, mind a pikroszíriusz festéssel lekerkedett kötőszövetes szeptumokkal teljesen körbezárt állebenykék voltak megfigyelhetők. Az állebenykék az SMA immunhisztokémiai jelöléssel ellátott metszeteken is kirajzolódtak, az aktivált miofibroblasztok szeptális elhelyezkedésének köszönhetően. A CK7 immunhisztokémiai reakció élénken jelölte a duktuláris reakció és a normál epeutak hámsejtjeit, emellett a kolesztázis hatására több mintában is megfigyelhetők voltak halvány CK7-pozitivitást mutató hepatocyták az állebenykékben, amelyek azonban a halvány jelölődés miatt a morfológiai vizsgálat során kiszűrhetőek voltak. A morfológiai vizsgálatok céljából készült festéseket a 7. ábra reprezentálja.



**7. ábra** Reprezentatív ábrák a cirrotikus májakból készült festésekről. Hematoxilin-eozin festés (A), pikroszíriusz vörös festés (B), SMA immunhisztokémiai reakció (C), CK7 immunhisztokémiai reakció (D).

A morfometriai vizsgálatok során mért adatok átlagait az 1. táblázat, míg a betegek klinikai adatainak átlagát a 2. táblázat mutatja be. A részletesebb klinikai és morfometriai adatokat a 3. táblázat tartalmazza.

**1. táblázat** A morfometriai vizsgálatok során mért paramétereinek átlagai. Azok a paraméterek szerepelnek félkövéren szedett betűtípussal, melyek között szignifikáns különbség volt a virális, ill. nem virális csoport között. Három normál májon mért morfológiai paraméterek átlagértékei is feltüntetésre kerültek. Pikroszíriusz – kötőszövet által elfoglalt terület aránya, hep. prol. – májsejt proliferációs aktivitás, dukt. prol. – duktuláris sejt proliferációs aktivitás

	<b>átlag (tartomány) (n=56)</b>	<b>virális csoport átlag (n=34)</b>	<b>nem virális csoport átlag (n=22)</b>	<b>normál májak (n=3)</b>
<b>pikroszíriusz (%)</b>	<b>17,74 (7,82-29,65)</b>	<b>16,59</b>	<b>19,5</b>	4,71
SMA (%)	16,08 (7,85-26,27)	15,73	16,63	2,54
CK7 (%)	4,64 (0,75-16,58)	5,06	4	0,56
szeptumvastagság (µm)	202,76 (78,66-309)	291,5	270,5	-
hep. prol. (Ki-67 %)	0,403 (0-1,64)	0,37	0,43	0,41
dukt. prol. (Ki-67 %)	0,632 (0-2,8)	0,58	0,74	0,27

2. *táblázat* A betegek laborértékeinek átlagai, valamint a cirrózis szövődményeinek előfordulása. Azok a paraméterek szerepelnek félkövéren szedett betűtípussal, amelyek között szignifikáns különbség volt a virális, ill. nem virális csoport között.

	átlag (tartomány) (n=56)	virális csoport átlag (n=34)	nem virális csoport átlag (n=22)	referencia értékek
életkor (év)	49,38 (20-67)	51,88	45,5	-
SeBi (μmol/L)	52,79 (8,6-270)	44,7	65,3	0-21
INR	1,48 (1,05-4-74)	1,37	1,65	0,85-1,25
kreatinin (μmol/L)	87,89 (30,9-605)	78,24	102,81	62-106
AST (IU/L)	80,27 (24-236)	85,57	72,07	1-46
ALT (IU/L)	59,06 (12-204)	64,34	50,92	1-49
<b>ALP (IU/L)</b>	<b>319,33 (48-1037,7)</b>	<b>266,65</b>	<b>400,76</b>	<b>50-136</b>
GGT (IU/L)	119,11 (20-575)	113,26	128,13	9-52
TP (g/L)	73,78 (59,5-96,5)	72,93	75,08	60-80
Alb (g/L)	34,3 (19-45)	35,46	32,55	30-50
<b>Hb (g/L)</b>	<b>122,98 (84-172)</b>	<b>128,77</b>	<b>114,05</b>	<b>125-160</b>
WBC (G/L)	5,44 (1,43-23)	4,88	6,3	4-10
Thr (G/L)	91,49 (31-259)	80,53	108,43	150-400
<b>MELD</b>	<b>14,57 (7-30)</b>	<b>13,26</b>	<b>16,59</b>	-
aszцитesz	58,9% (33 beteg)	58,8% (20 beteg)	59,1% (13 beteg)	
enkefalopátia	42,9% (24 beteg)	38,2% (13 beteg)	50% (11 beteg)	
nyelőcső varixok	87,5% (49 beteg)	85,3% (29 beteg)	90,9% (20 beteg)	
varix vérzés	39,2% (22 beteg)	32,4% (11 beteg)	50% (11 beteg)	

**3. táblázat** A főbb klinikai adatok és morfológiai paraméterek bemutatása, az egyes esetek etiológiai tényezőivel együtt. Az esetleges HCC fennállása szintén feltüntetésre került. Pikro. – kötőszövet által elfoglalt terület aránya, hep. prol. – májsejt proliferációs aktivitás, duk. prol. – duktoláris sejt proliferációs aktivitás, szeptumvastags. – szeptumvastagság.

Beteg sorszám	Nem, életkor (év)	Etiológia	AST (IU/l)	ALP (IU/l)	pikro. (%)	CK7 (%)	SMA (%)	hep. prol. (%)	dukt. prol. (%)	szeptum vastags. (µm)
1	Ffi, 54	HCV	99	211	14,48	8,86	24,53	0,04	0	221,66
2	Ffi, 55	HBV	41	111	14,24	5,52	21,22	0	0	195,66
3	Ffi, 54	HCV	115	277	27,99	6,13	26,27	0	0,2	274
4	Ffi, 65	HCV/HCC	43	96	12,1	1,25	10,79	0,16	0,2	128,33
5	Ffi, 57	HCV/HCC	77	93	22,93	3,41	17,58	0,12	0,4	228,66
6	Nő, 45	ALD	39	360	23,45	7,79	20,56	0,28	0,4	211,33
7	Ffi, 58	HBV	90	399	12,95	8,61	11,75	0	0,2	226
8	Ffi, 57	ALD	187	48	7,82	0,75	7,85	0,24	0,2	176
9	Ffi, 46	HCV/HCC	184	207	12,92	4,44	15,44	0,08	0,2	179
10	Ffi, 49	HCV	52	248	11,65	6,77	16,73	0,12	0,2	214
11	Ffi, 53	HCV	81	102	11,63	4,02	11,15	0,16	0,2	147
12	Ffi, 44	PSC	72	729	22,47	2,73	18,6	0,4	0,4	241,66
13	Nő, 47	HCV/HCC	83	119	19,15	3,55	17,8	0,6	0,4	253,33
14	Ffi, 67	ALD	67	437	14,5	5,08	13,69	0,24	0,4	184,33
15	Ffi, 61	kriptogén	74	360	18,46	1,76	13,62	0,12	0,6	193,66
16	Ffi, 53	PSC	54	294	9,3	2,41	8,73	0,16	0	125
17	Nő, 58	HCV	116	198	13,91	4,73	21,51	0,48	1,2	211
18	Ffi, 53	HBV	59	473	25,82	3,34	17,86	0	0,2	240
19	Ffi, 39	ALD	38	450	19,67	3,74	16,22	0,36	0,6	221,66
20	Nő, 54	HCV/HCC	124	531	14,19	5,65	14,79	0,96	1,2	120,66
21	Ffi, 55	HCV	64	294	19,94	2,7	16,5	0,8	0,8	235
22	Ffi, 50	HCV/HCC	110	321	18,76	4,26	17,83	0,32	0,6	267,66
23	Ffi, 37	HCV	58	181	9,06	3,4	13,66	0,68	0,8	135,66
24	Ffi, 46	HCV/HCC	166	288	24,64	6,3	24,53	0,48	1,6	218,66
25	Ffi, 44	ALD	38	220	18,97	6,51	16,1	0,48	1,2	168
26	Ffi, 56	HCV	50	179	19,9	4,39	16,28	1,64	1	168
27	Ffi, 47	ALD	73	655	25,33	4,31	18,43	0,8	0,8	154,66
28	Nő, 35	HCV	68	617	21,07	5,65	14,94	0,6	0,8	168,3
29	Ffi, 52	HCV	83	383	12,45	3,58	14,56	0	1	263
30	Ffi, 57	HCV/HCC	59	223	29,65	4,54	14,01	0,08	0,6	263,66
31	Nő, 50	AIH	53	515	28,86	2,69	18,9	0,4	0	242

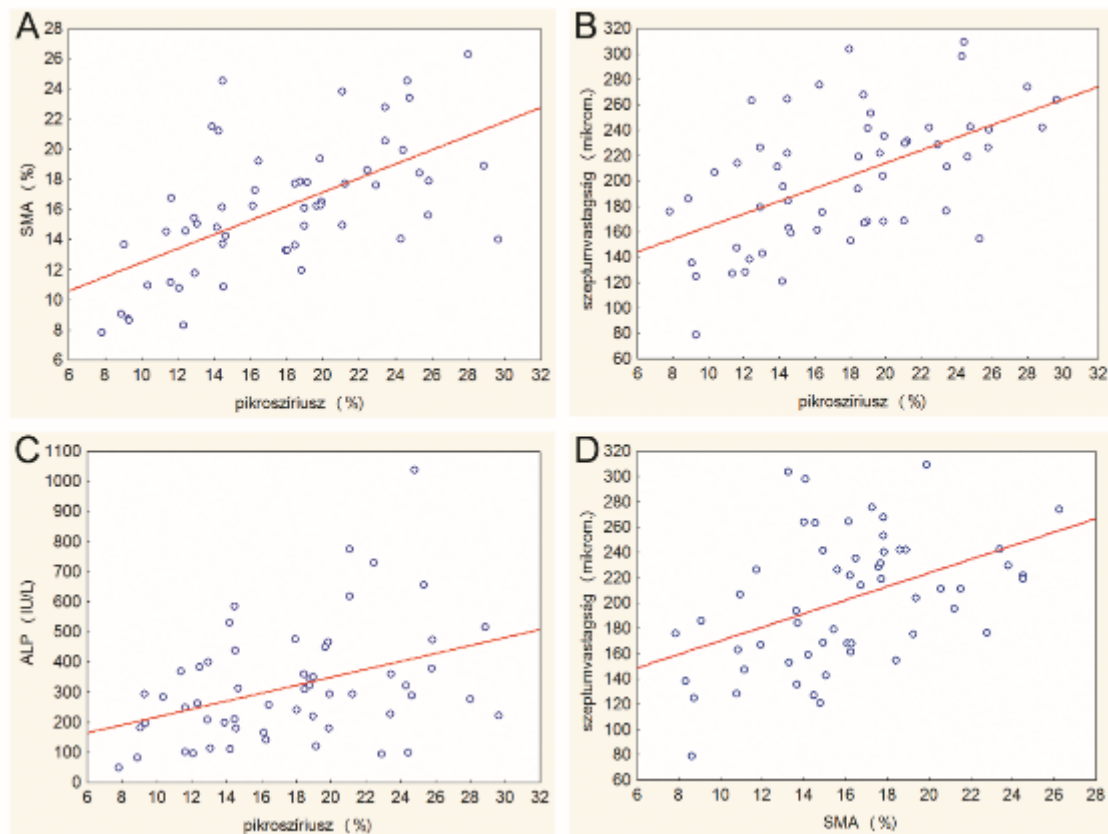
32	Ffi, 51	ALD	24	99	24,42	3,66	19,9	0,08	0,2	309
33	Ffi, 55	HBV	43	82	8,88	1,23	9,09	0,2	0,6	186
34	Ffi, 56	HCV	83	585	14,46	6,8	16,14	0,52	1,2	264,33
35	Ffi, 57	ALD	53	466	19,85	6,69	19,38	0,64	1,6	204
36	Nő, 20	AIH	56	141	16,26	2,49	17,27	0,12	1,4	275,66
37	Ffi, 53	HCV	62	166	16,13	3,13	16,24	0,32	1,4	161,33
38	Nő, 27	AIH	39	179	14,54	2,11	10,86	0,28	2,8	162,66
39	Ffi, 54	ALD/HCC	236	475	17,94	7,14	13,27	0,2	0,6	303,66
40	Ffi, 28	PSC	52	378	25,79	4,7	15,61	0,36	0,2	226
41	Ffi, 55	ALD/HCV	25	263	12,34	1	8,33	0,16	0,4	138
42	Ffi, 50	HCV	45	197	9,32	2,65	8,62	0,44	0,4	78,66
43	Ffi, 45	HCV	42	322	24,31	3,61	14,06	0,2	0,4	297,66
44	Ffi, 42	HCV/HCC	75	292	21,23	6,15	17,68	0,36	0,6	231,33
45	Ffi, 43	HCV	231	343	18,81	3,79	11,95	0,36	0,4	167
46	Ffi, 57	HCV/HCC	107	284	10,35	4,08	10,95	0,16	0,6	206,33
47	Nő, 57	AIH/HCC	74	349	18,99	5,3	14,92	0,32	0,2	241,33
48	Ffi, 51	HCV	88,3	258	16,44	10,39	19,23	0,32	0,4	175,33
49	Ffi, 50	HCV	127	369	11,38	16,58	14,5	0,48	0,4	127,33
50	Nő, 55	HCV	58	240	18,03	5,7	13,3	0,28	0	152,66
51	Ffi, 21	PSC	136,6	1037,7	24,79	1,25	23,4	0,48	0,4	242,66
52	Ffi, 46	ALD	86	313	14,67	5,68	14,21	0,68	0,8	159
53	Nő, 35	AIH	76	310	18,48	3,3	17,7	0,68	1	218,66
54	Nő, 42	PBC/HCC	29	774	21,08	4,35	23,81	1,56	1	229,33
55	Ffi, 56	ALD	29	227	23,43	3,53	22,77	0,64	1,4	176,33
56	Nő, 61	HCV	101	114	13,06	5,93	15,05	1,6	0,6	142,66

Az 1. táblázatban látható, hogy a cirrotikus betegek esetén a májsejt proliferációs aktivitáson kívül a mért morfológiai paraméterek jelentősen emelkedettek voltak a normál májakhoz képest.

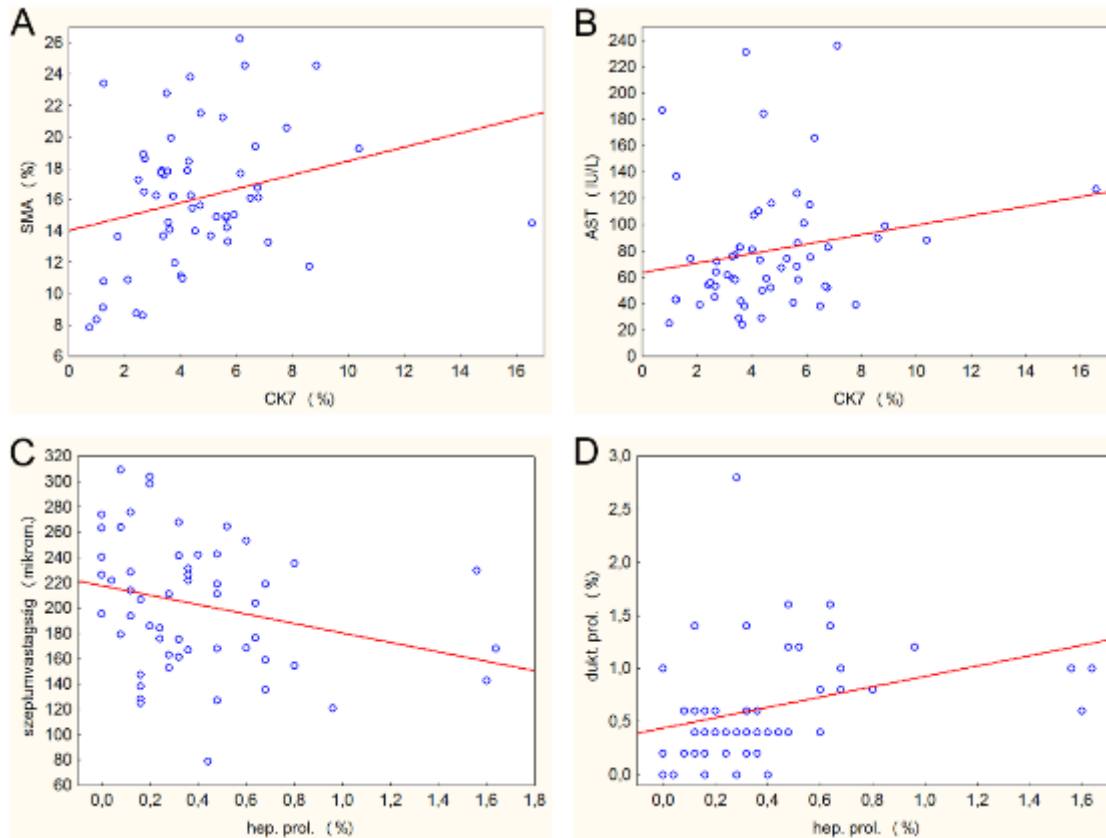
A kötőszövet által elfoglalt terület nagysága (pikroszíriusz) szignifikáns korrelációt mutatott az aktivált miofibroblasztok által elfoglalt területtel (SMA), a szeptumvastagsággal, valamint az ALP értékkel is (8. ábra). Az SMA értéke szignifikánsan összefüggött a szeptumvastagsággal és a duktuláris reakció által elfoglalt területtel (CK7) (9. ábra). A CK7 ezen kívül az AST értékkel is szignifikánsan korrelált (9. ábra). A legtöbb mintában igen alacsony, 1% alatti Ki-67 indexet határoztunk meg a hepatocitákban és duktuláris sejtekben is. Szignifikáns, negatív összefüggés állt fent a májsejtek proliferációs aktivitása (hep. prol.) és a szeptumvastagság között (9. ábra). A májsejtek és duktuláris sejtek proliferációs aktivitása (dukt. prol.) is korrelált, azonban a várttal ellentétben pozitív összefüggést találtunk a két paraméter között (9. ábra). A



duktuláris sejtek proliferációja szignifikánsan összefüggött a SeBi ( $r=0,33$ ), INR ( $r=0,34$ ), kreatinin ( $r=-0,32$ ), valamint ezek alapján nem megfelelő módon a MELD pontszámmal is ( $r=0,29$ ). A kreatinin értékkel a májsejtek proliferációs aktivitása is korrelált ( $r=-0,42$ ). A cirrózis különböző szövödményeinek (aszцитез, nyelőcső varikozitás, varixvérzés, hepatikus enkefalopátia) megjelenése és a szövettani paraméterek között nem találtunk szignifikáns összefüggést. A duktuláris reakció által elfoglalt terület közel szignifikáns szinten nagyobb volt a hepatikus enkefalopátia diagnózissal rendelkező betegekben ( $p=0,057$ ). A különböző szövödmények és a klinikai paraméterek közül az aszцитез jelenléte szignifikánsan alacsonyabb hemoglobinszinttel ( $p=0,027$ ), a varixvérzés szignifikánsan alacsonyabb AST ( $p=0,0443$ ) és magasabb albuminértékekkel ( $p=0,0164$ ) függött össze.

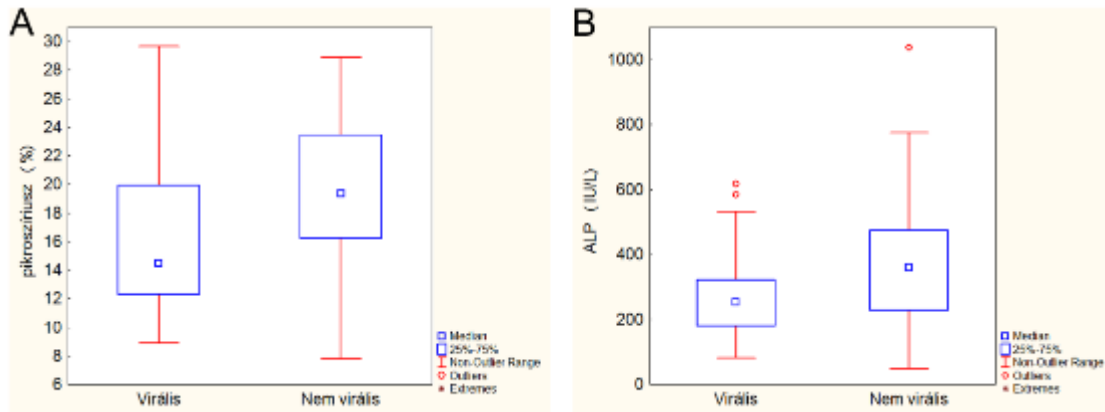


**8. ábra** Szignifikáns összefüggés a kötőszövet által elfoglalt terület (pikroszíriusz) és a miofibroblasztok által elfoglalt terület (SMA) (**A**) ( $r=0,54$ ), a szeplumvastagság (**B**) ( $r=0,61$ ) ill. az ALP érték (**C**) ( $r=0,38$ ) között, valamint a miofibroblasztok által elfoglalt terület (SMA) és a szeplumvastagság között (**D**) ( $r=0,45$ ).



**9. ábra** Szignifikáns összefüggés a duktuláris reakció által elfoglalt terület (CK7) és a miofibroblasztok által elfoglalt terület (SMA) (A) ( $r=0,29$ ), valamint az AST-érték között (B) ( $r=0,28$ ), ill. a májsejtek proliferációs aktivitása (hep. prol.) és a szeplumvastagság (C) ( $r=-0,28$ ), valamint a duktuláris reakció proliferációs aktivitása között (D) (dukt prol.;  $r=0,55$ ).

A HCC diagnózisú, ill. nem tumoros betegek adatait összehasonlítva a HCC-s cirrotikus betegekben szignifikánsan magasabb AST és ALT értékeket találtunk, a morfológiai paraméterek között nem volt jelentős különbség. A virális, ill. nem virális eredetű mintákat összehasonlítva szignifikáns eltérés mutatkozott a kötőszövet által elfoglalt terület nagyságában és az ALP értékben, mindkét esetben a nem virális csoport javára (10. ábra). Emellett a HCV/HBV etiológiájú betegek hemoglobin szintje szignifikánsan magasabb, míg MELD pontszáma szignifikánsan alacsonyabb volt.

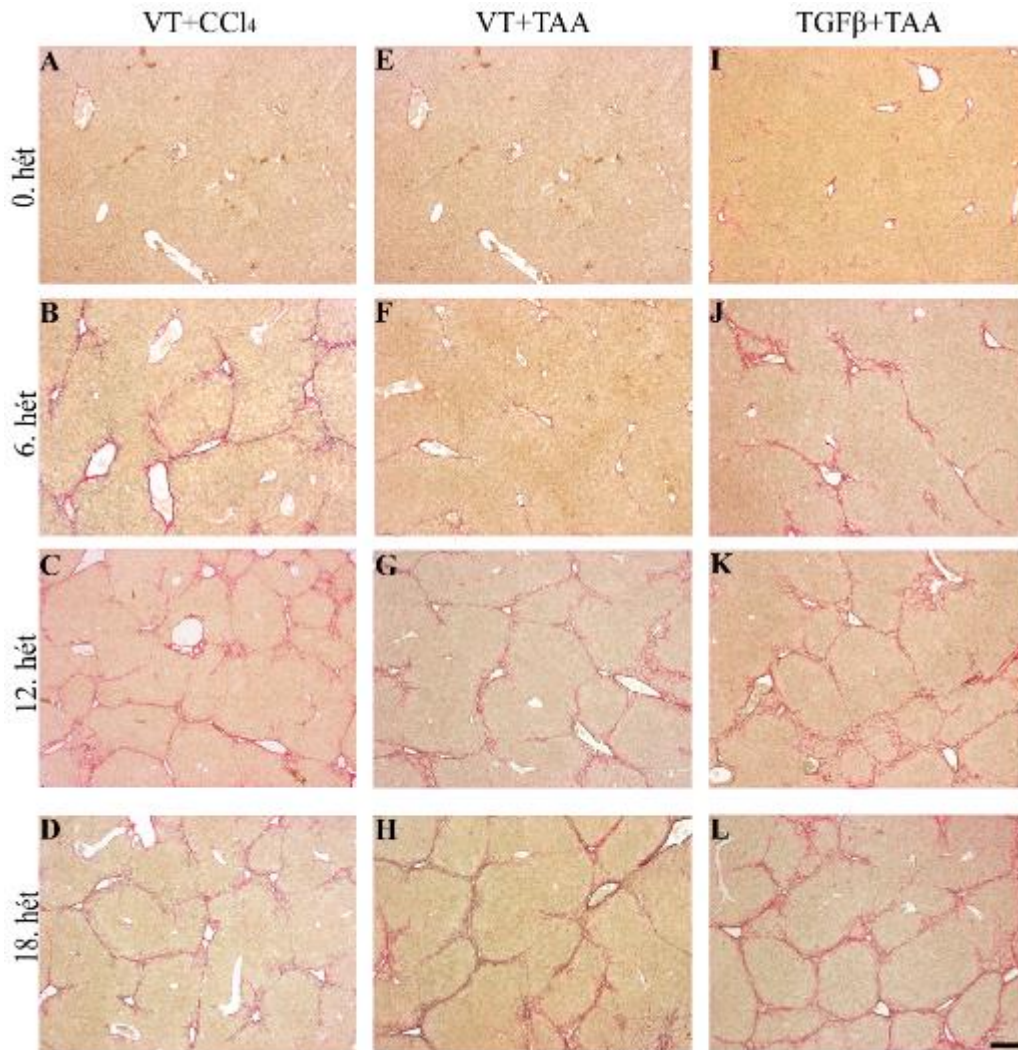


**10. ábra** A virális csoporthoz képest a nem virális csoportban a kötőszövet nagyobb területet foglalt el (**A**), ill. magasabb ALP-értékek álltak fönt (**B**).

## IV.2. Állatkísérletes vizsgálatok eredményei

### IV.2.1. Kontroll cirrotikus modellek

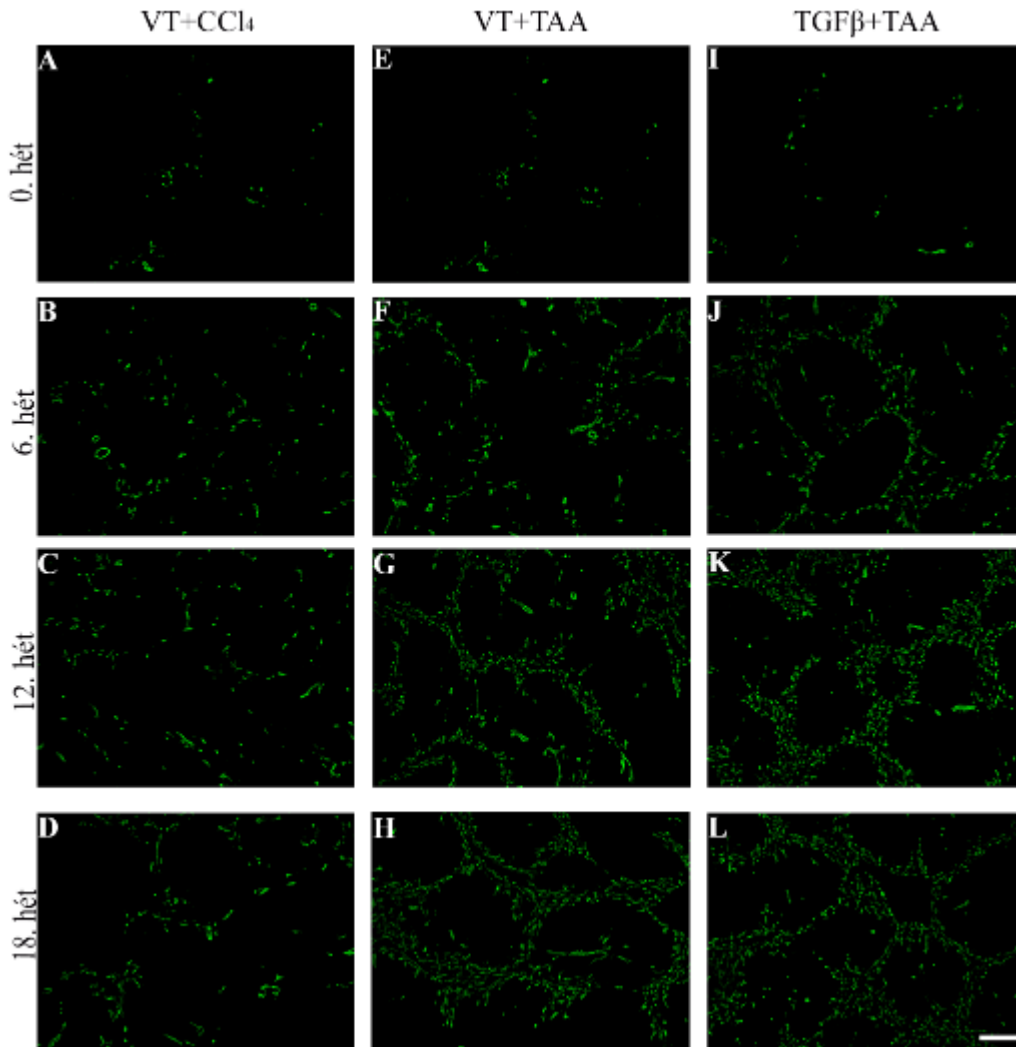
Mind a CCl<sub>4</sub>, mind a TAA kezelt egerek májában teljesen körbezárt allebenyek alakultak ki a kísérlet végére, azonban a károsító hatástól függően a kötőszövet-felhalmozódás dinamikája eltérő volt (11. ábra). Az irodalmi adatoknak megfelelően a VT+TAA csoportban a fibrogenézis eleinte csekély mértékű volt, majd hirtelen indult növekedésnek, míg a CCl<sub>4</sub> kezelés már a kísérlet kezdetén is jelentős mértékű kötőszövet-felhalmozódást okozott. A VT+CCl<sub>4</sub> csoportban már a kezelés 3. hetén kialakultak a centrális vénákat összekötő kötőszövetes szeptumok, míg a VT+TAA csoportban csak a 6. héttől voltak megfigyelhetőek. A kísérlet 6. hetén a VT+CCl<sub>4</sub> csoportban szignifikánsan nagyobb mértékű fibrózist mértünk a VT+TAA csoporthoz képest. A 9. hétre a VT+TAA csoport beérte a CCl<sub>4</sub> kezelt csoportot, innentől párhuzamosan alakult a fibrózis mértéke a két modellben. A TGFβ+TAA csoportban minden időpontban nagyobb mértékű kötőszövet-felhalmozódás volt megfigyelhető a VT+TAA csoporthoz képest (13. ábra A).



**11. ábra** Reprezentatív képek a három kontroll cirrotikus modellből, pikroszíriusz vörössel festett metszetekből készült fotók. Egység: 200  $\mu\text{m}$ . (**A-D**: VT+CCl<sub>4</sub>; **E-H**: VT+TAA; **I-L**: TGF $\beta$ +TAA). A vad típusú egerekben a CCl<sub>4</sub> kezelés eleinte szignifikánsan nagyobb mértékű kötőszövet felhalmozódást váltott ki a TAA kezeléshez képest, de a későbbi időpontokra a különbség eltűnt, a fibrózis mértéke hasonló volt a két modellben. A TGF $\beta$  transzgén egerekben a kötőszövet-lerakódás az összes időpontban kifejezettebb volt a vad típusú egerekhez képest.

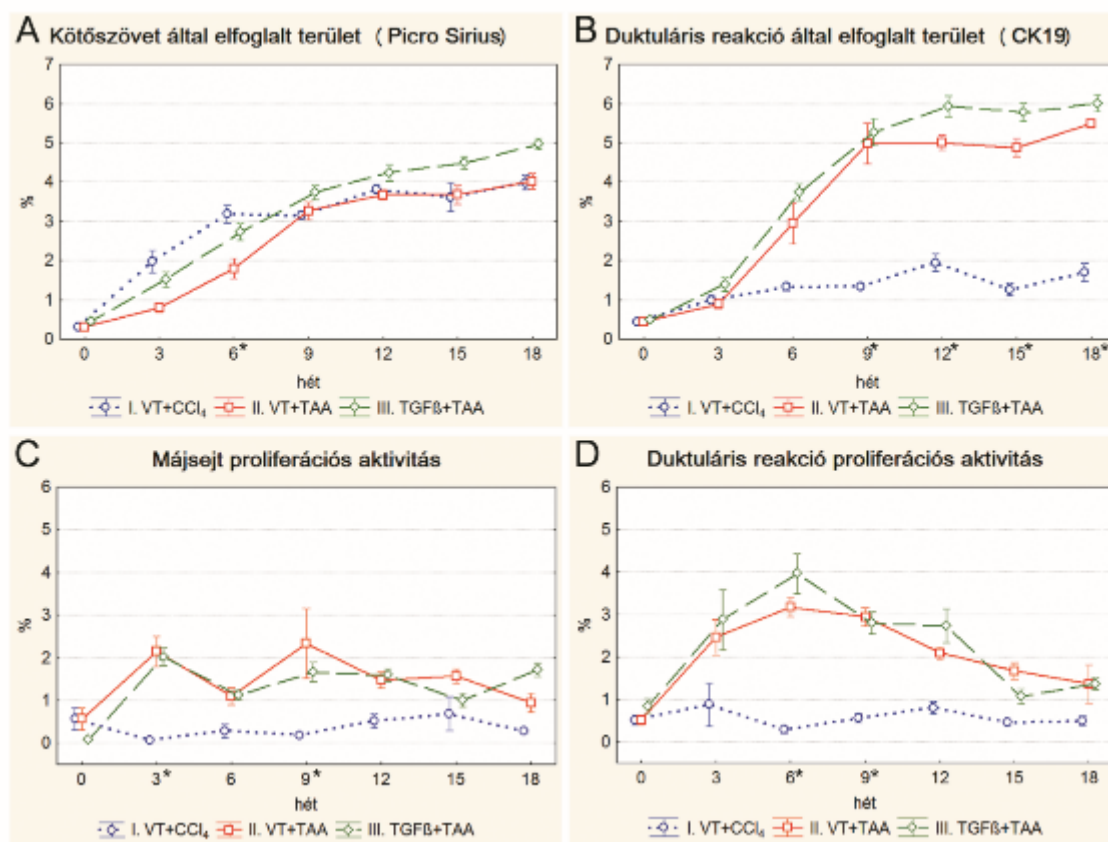
Érdekes módon a duktuláris reakció által elfoglalt terület nagysága a 3. héten azonos volt a VT+CCl<sub>4</sub> és a VT+TAA csoportokban, az eltérő mértékű fibrózis ellenére. Ezután viszont élesen elváltak a két modell értékei (12. ábra). A TAA modellben a kísérlet teljes időtartama alatt jóval kifejezettebb duktuláris reakció alakult ki, a

különbség a 9. héttől volt szignifikáns. A fibrózis mértékéhez hasonlóan a TAA kezelés a TGF $\beta$  transzgén egerekben emelkedett mértékű duktuláris reakciót váltott ki a vad típusú állatokhoz képest (13. ábra B).



**12. ábra** Reprezentatív képek a három kontroll modellből, CK19 elleni immunfluoreszcens jelöléssel (zöld) ellátott metszetekből készült képek. Egység: 200  $\mu$ m (A-D: VT+CCl<sub>4</sub>; E-H: VT+TAA; I-L: TGF $\beta$ +TAA). A vad típusú egerekben a TAA kezelés eleinte a CCl<sub>4</sub> kezelés által kiváltotthoz hasonló mértékű duktuláris reakció kialakulását eredményezte, de a későbbi időpontokban szignifikánsan nagyobb mennyiségű duktuláris reakció volt megfigyelhető a TAA-kezelt állatokban. A TGF $\beta$  transzgén egerekben a fibrózishoz hasonlóan a duktuláris reakció mértéke is emelkedett volt a vad típusú egerekhez képest.

A májsejtek és a duktuláris reakció osztódási aktivitására is különböző hatást fejtett ki a két fibrogén vegyület. A  $\text{CCl}_4$  igen alacsony mértékű osztódási aktivitást váltott ki, amely a kísérlet előrehaladtával nem változott jelentősen. Ezzel szemben mindkét TAA kezelt csoportban átmeneti emelkedést követően folyamatos csökkenés volt megfigyelhető a hepatociták és a duktuláris reakció osztódásában, ez főként a duktuláris reakció esetén volt kifejezett (13. ábra C, D). Az emelkedett TGF $\beta$  expresszió nem volt jelentős hatással az osztódási aktivitásra a TAA kezelt állatokban.

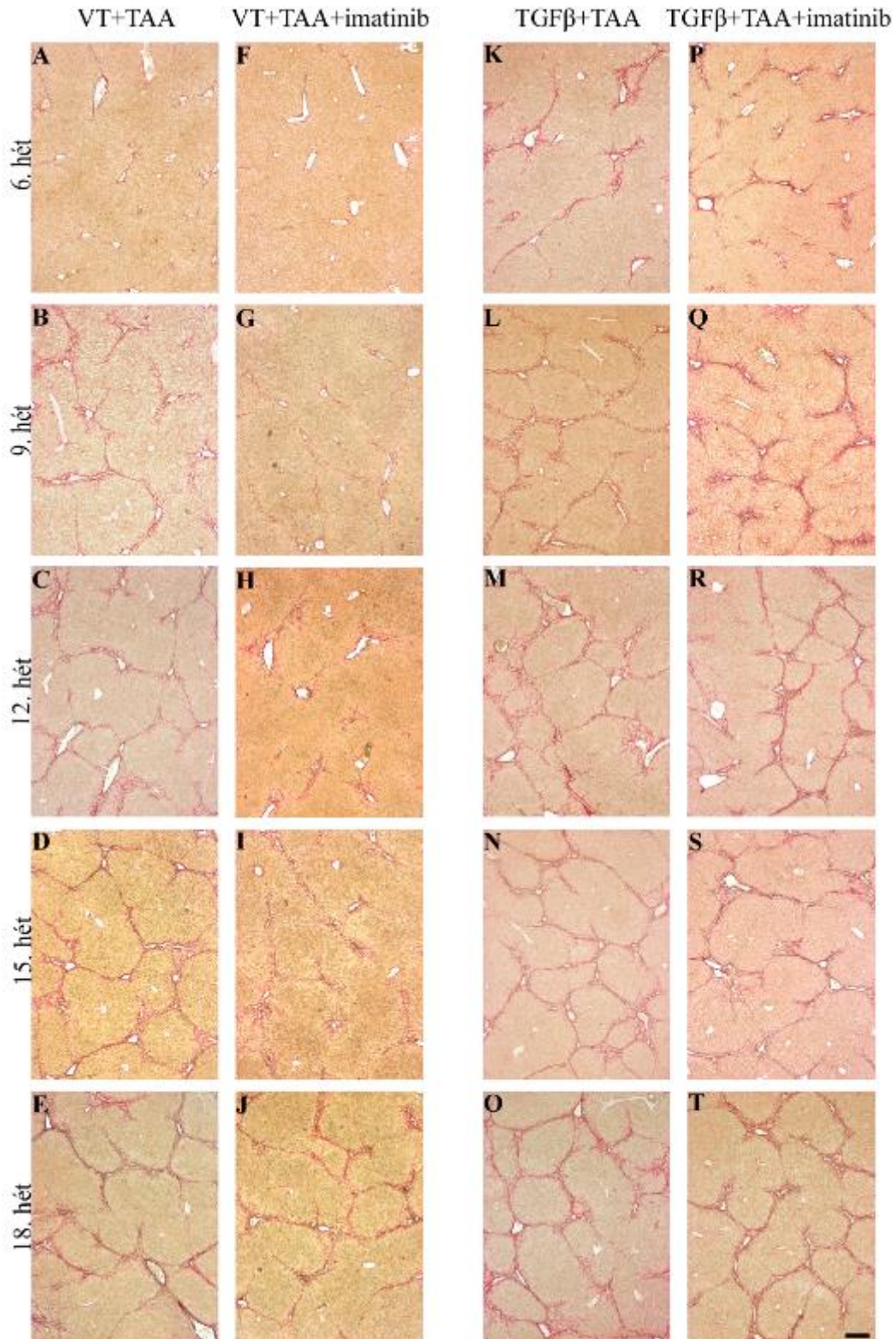


**13. ábra** A kontroll modellek (I. VT+CCl<sub>4</sub>, II. VT+TAA, III. TGF $\beta$ +TAA) eredményei. A \*-al jelölt időpontokban szignifikáns különbség volt a VT+CCl<sub>4</sub>, ill. a VT+TAA csoportok között. A kötőszövet által elfoglalt terület szignifikánsan nagyobb volt 6 hét kezelés után a VT+CCl<sub>4</sub> csoportban (A), míg a duktuláris reakció által elfoglalt terület szignifikánsan alacsonyabb volt a 9. héttől kezdve a kísérlet végéig (B). A májsejtek (3. és 9. hét) és a duktuláris reakció (6. és 9. hét) osztódási aktivitása (BrDU-index) is szignifikánsan alacsonyabb volt a VT+CCl<sub>4</sub> csoportban (C, D) Az ábrán az egyes időpontokhoz tartozó átlagértékek, valamint a standard hiba (SEM) szerepel.



## IV.2.2. Imatinib és erlotinib kezelés hatása a TAA-indukált cirrózis kialakulására

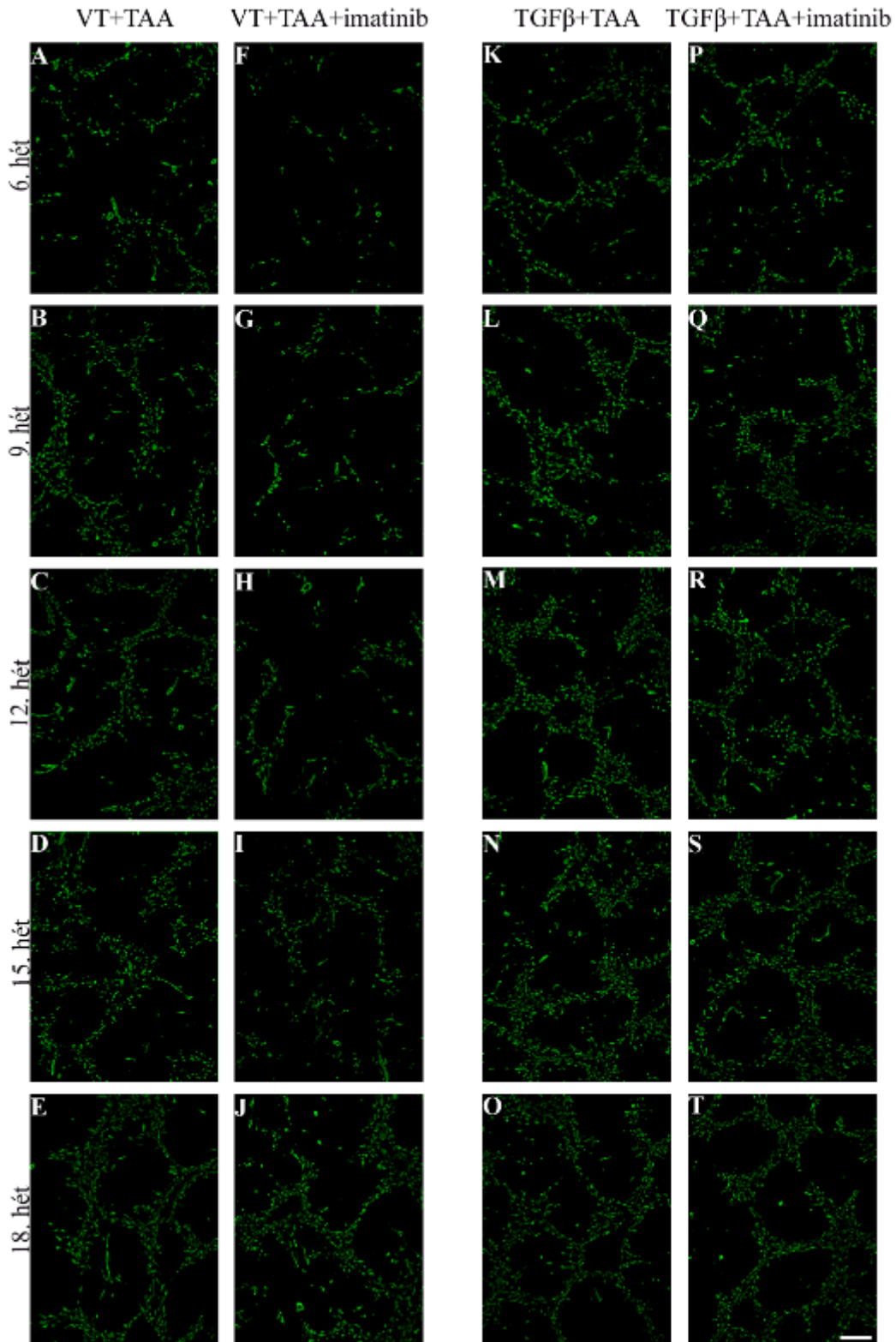
Az imatinib kezelés hatására feltűnően csökkent a fibrózis és a duktuláris reakció által elfoglalt terület a TAA kezelt vad típusú egerekben. A kötőszövet mennyisége a 9., 12., és 15. héten, míg a duktuláris reakció kiterjedtsége a 9. és a 12. héten szignifikánsan alacsonyabb volt az imatinib-kezelt állatokban (14., 15., ábra, 16. ábra A, B). Hasonló tendencia volt megfigyelhető az erlotinibbel kezelt vad típusú egerekben a vad típusú kontroll állatokhoz képest, azonban ez a különbség nem bizonyult szignifikánsnak egyik időpontban sem (17., 18. ábra, 19. ábra A, B). A gátló hatás mindkét gyógyszer esetén csak átmenetinek bizonyult, a 18. hétre mind a fibrózis, mind a duktuláris reakció mennyisége elérte a kontroll állatok szintjét (16. és 19. ábra A, B). A transzgén egerekben egyik gyógyszer sem volt képes átmenetileg sem gátolni sem a kötőszövet-lerakódás, sem a duktuláris reakció progresszióját.



**14. ábra** Reprezentatív képek az imatinib kezelt csoportokból és kontroll modelljeikből, pikoszíriusz vörössel festett metszetekből készült fotók. Egység: 200  $\mu$ m. (A-E: VT+TAA; F-J: VT+TAA+imatinib; K-O: TGF $\beta$ +TAA, P-T: TGF $\beta$ +TAA+imatinib). Az imatinib kezelés a vad típusú egerekben a kezdeti időpontokban látványosan

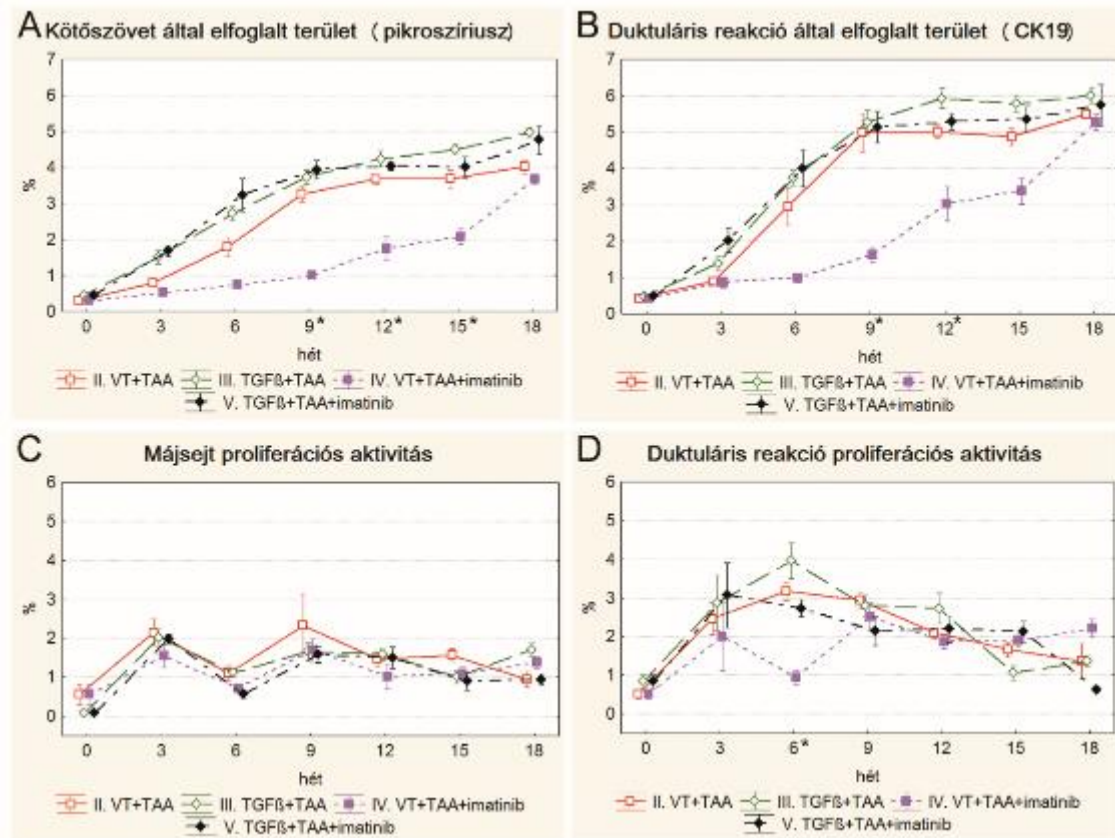


csökkentette a kötőszövet kialakulás mértékét, azonban a későbbi időpontokra ez a hatás elmúlt. A TGF $\beta$  transzgen egerekben az imatinib kezelés nem okozott jelenős különbséget a kötőszövet-lerakódás dinamikájában a kontroll csoporthoz képest.

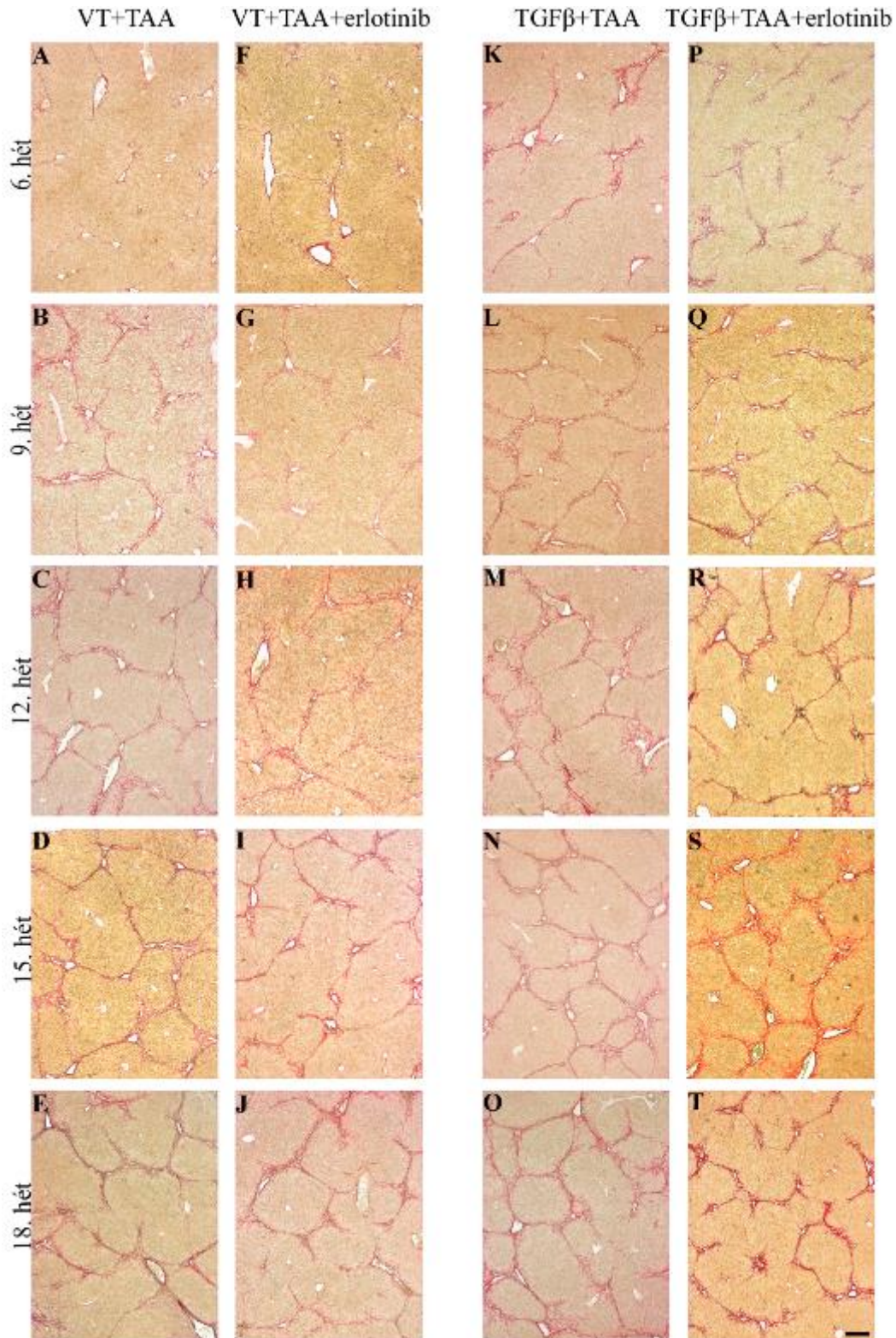


**15. ábra** Reprezentatív képek az imatinib kezelt csoportokból és kontroll modelljeikből, CK19 elleni immunfluoreszcens jelöléssel (zöld) ellátott metszetekből készült fotók. Egység: 200  $\mu$ m. (A-E: VT+TAA; F-J: VT+TAA+imatinib; K-O: TGF $\beta$ +TAA, P-T: TGF $\beta$ +TAA+imatinib). Az imatinib kezelés a vad típusú egerekben a kezdeti

időpontokban jelentősen csökkentette a duktuláris reakció kiterjedtségét, de a kísérlet végén ez a hatás már nem volt megfigyelhető. A TGF $\beta$  transzgén egerekben az imatinib kezelés nem okozott változást a duktuláris reakció kialakulásának dinamikájában a kontroll csoporthoz képest.



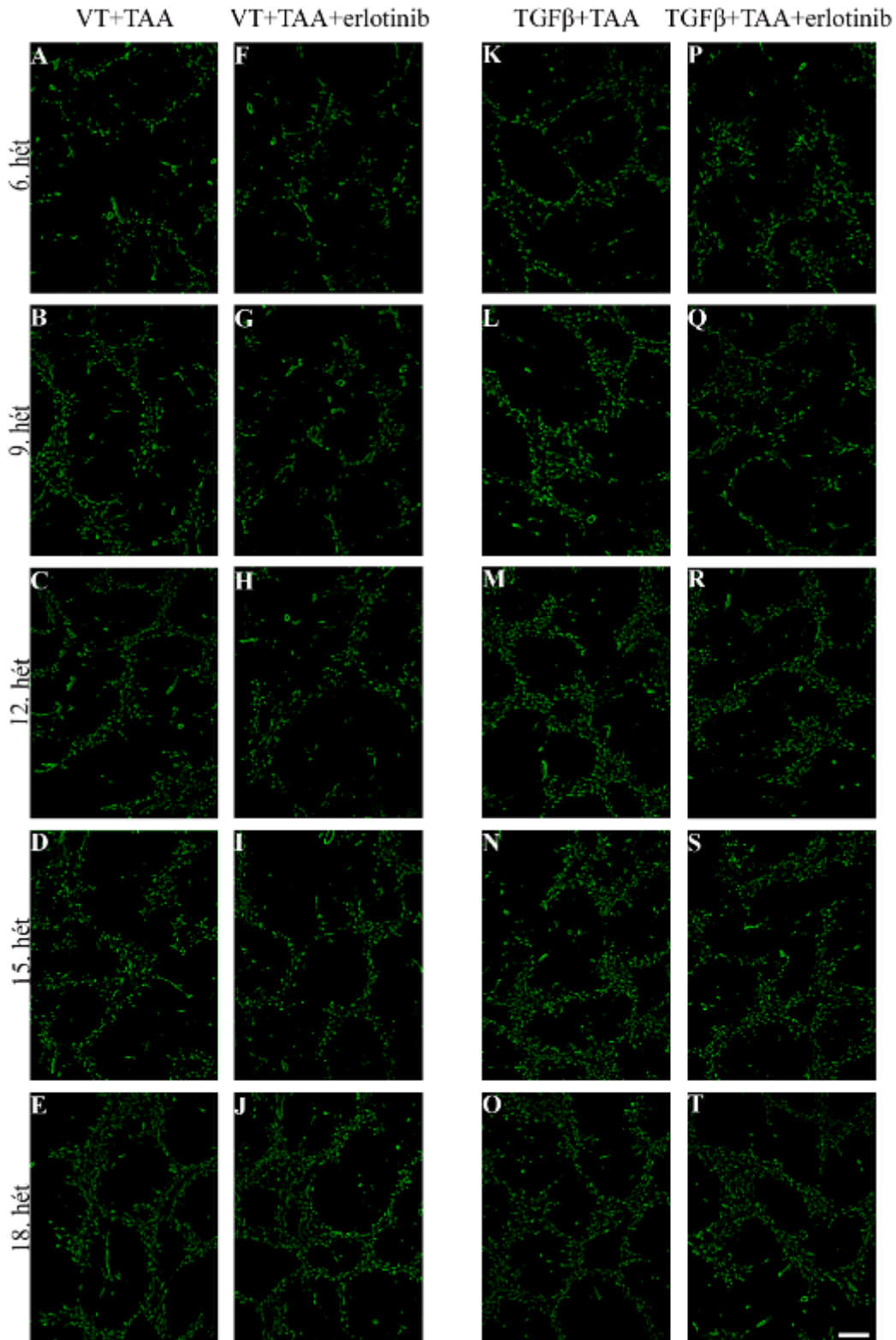
**16. ábra** Az imatinib-kezelt csoportok (IV. VT+TAA+imatinib, V. TGF $\beta$ +TAA+imatinib) és ezek kontroll csoportjainak (II. VT+TAA, III. TGF $\beta$ +TAA) eredményei. A \*-al jelölt időpontokban szignifikáns különbség volt a VT+TAA+imatinib, ill. a VT+TAA csoportok között. Az imatinib-kezelés átmenetileg szignifikánsan csökkentette a kötőszövet (A), valamint a duktuláris reakció által elfoglalt terület (B). A duktuláris reakció osztódási aktivitása (BrDU-index) a 6. héten szignifikánsan alacsonyabb volt a VT+TAA+imatinib csoportban a VT+TAA csoporthoz képest (D). Az ábrán az egyes időpontokhoz tartozó átlagértékek, valamint a standard hiba (SEM) szerepel.



**17. ábra** Reprezentatív képek az erlotinib kezelt csoportokból és kontroll modelljeikből, pikroszíriusz vörössel festett metszetekből készült fotók. Egység: 200  $\mu$ m. (**A-E**: VT+TAA; **F-J**: VT+TAA+erlotinib; **K-O**: TGF $\beta$ +TAA, **P-T**: TGF $\beta$ +TAA+erlotinib). Az erlotinib kezelés a vad típusú egerekben csökkentette a kötőszövet-lerakódás

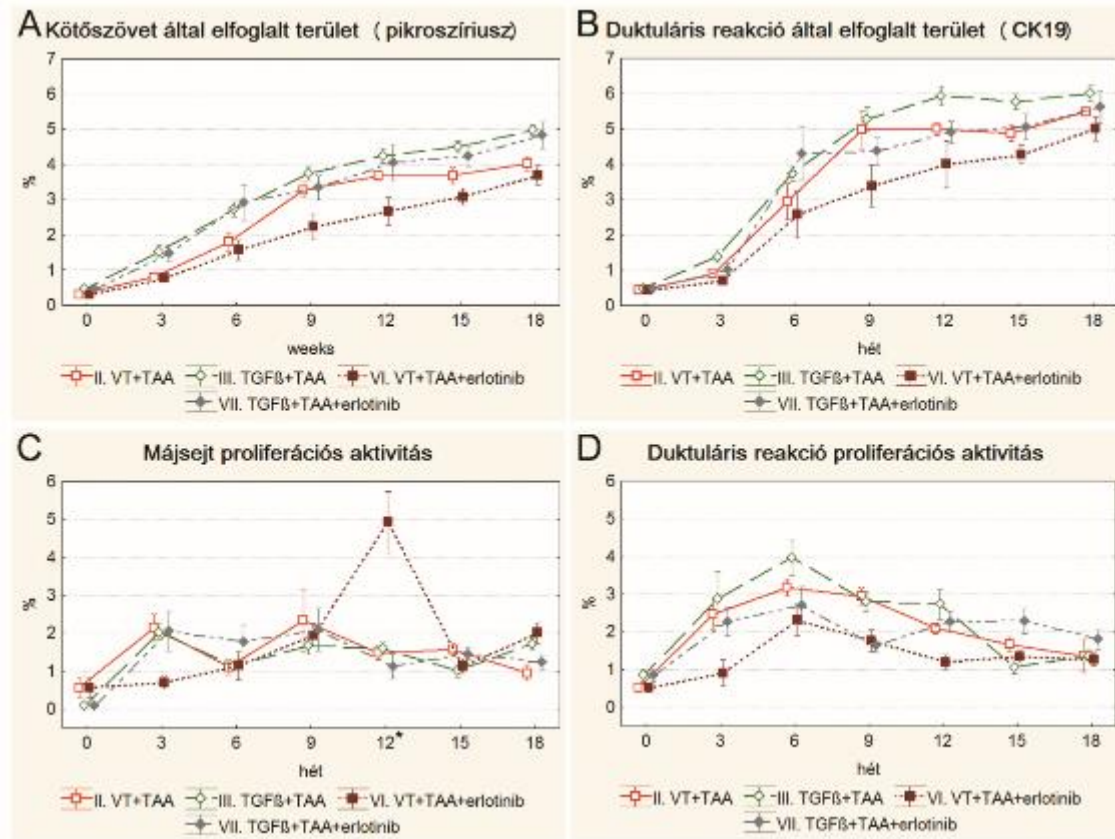
mértékét, de az imatinib kezeléssel ellentétben a hatás nem volt szignifikáns mértékű egyik időpontban sem. A TGF $\beta$  transzgen egerekben nem volt megfigyelhető különbség az erlotinib kezelés hatására.





**18. ábra** Reprezentatív képek az erlotinib kezelt csoportokból és kontroll modelljeikből CK19 elleni immunfluoreszcens jelöléssel (zöld) ellátott metszetekből készült fotók. Egység: 200  $\mu\text{m}$ . (A-E: VT+TAA; F-J: VT+TAA+erlotinib; K-O: TGF $\beta$ +TAA, P-T: TGF $\beta$ +TAA+erlotinib). A duktuláris reakció kialakulását a vad típusú egerekben

szintén mérsékelte az erlotinib kezelés, de szignifikáns különbség itt sem mutatkozott. A TGF $\beta$  transzgén egerekben nem volt megfigyelhető különbség a duktuláris reakció mértékében az erlotinib kezelés hatására.



**19. ábra** Az erlotinib-kezelt csoportok (VI. VT+TAA+erlotinib, VII. TGF $\beta$ +TAA+erlotinib) és ezek kontroll csoportjainak (II. VT+TAA, III. TGF $\beta$ +TAA) eredményei. A \*-al jelölt időpontban szignifikáns különbség volt a VT+TAA+erlotinib, ill. a VT+TAA csoportok között. A májsejtek osztódási aktivitása (BrDU-index) a 12. héten szignifikánsan magasabb volt a VT+TAA+erlotinib csoportban a VT+TAA csoporthoz képest (**D**). Az ábrán az egyes időpontokhoz tartozó átlagértékek, valamint a standard hiba (SEM) szerepel.

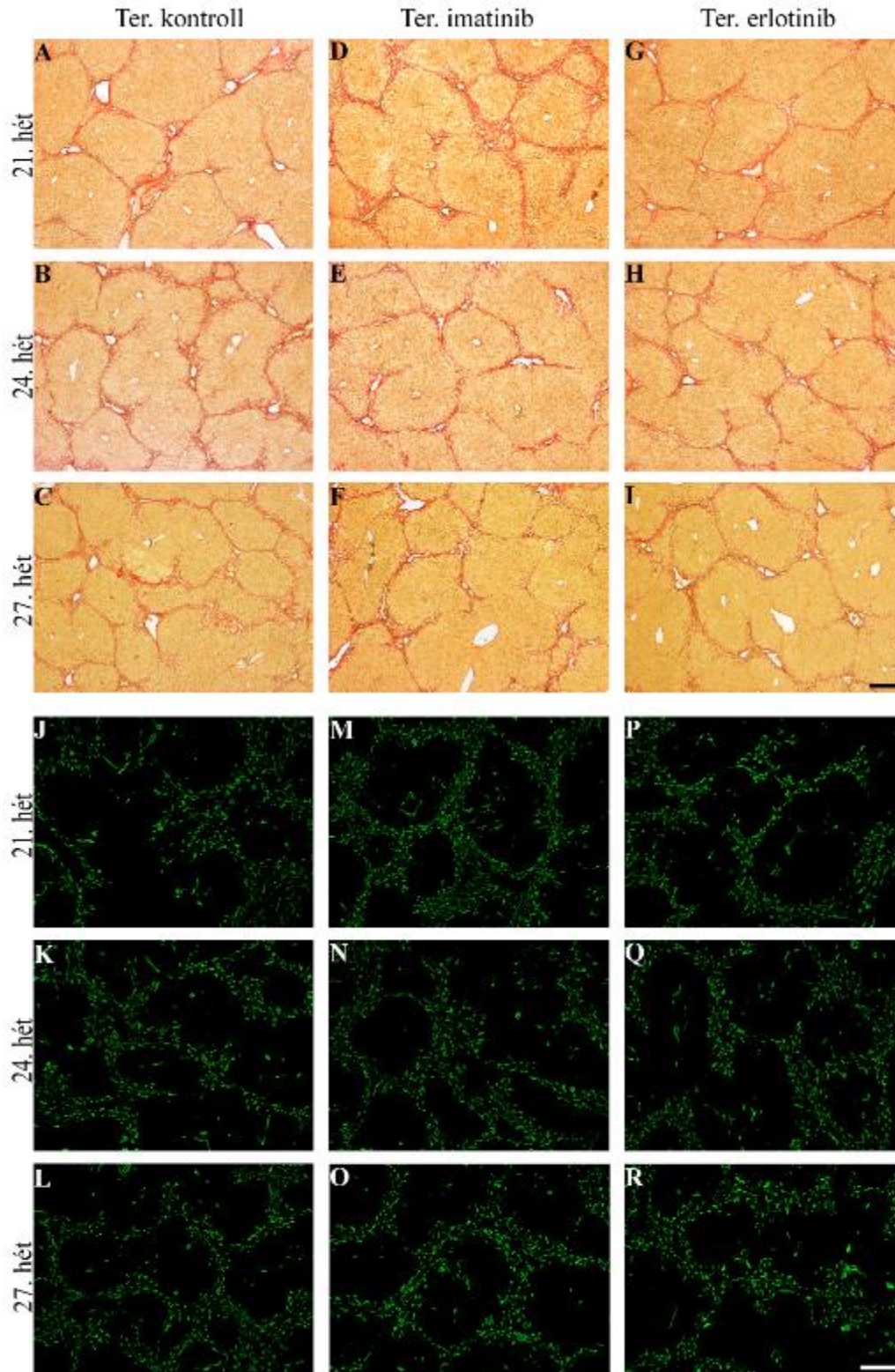
A májsejtek és a duktuláris reakció osztódási aktivitására mindkét gyógyszer csak egy-egy időpontban fejtett ki szignifikáns hatást a vad típusú egereken. Az imatinib-kezelt csoportban a 6. héten a duktuláris reakció (16. ábra D), míg az erlotinib-kezelt csoportban a májsejtek osztódása volt szignifikánsan alacsonyabb a kontroll

TAA-csoporthoz képest (19. ábra C). A TGF $\beta$  transzgen egereken egyik szer sem volt képes szignifikánsan befolyásolni az osztódási aktivitást (16. és 19. ábra C és D).

#### IV.2.3. Imatinib és erlotinib kezelés hatása a már kialakult TAA-indukált cirrózisra (terápiás modellek)

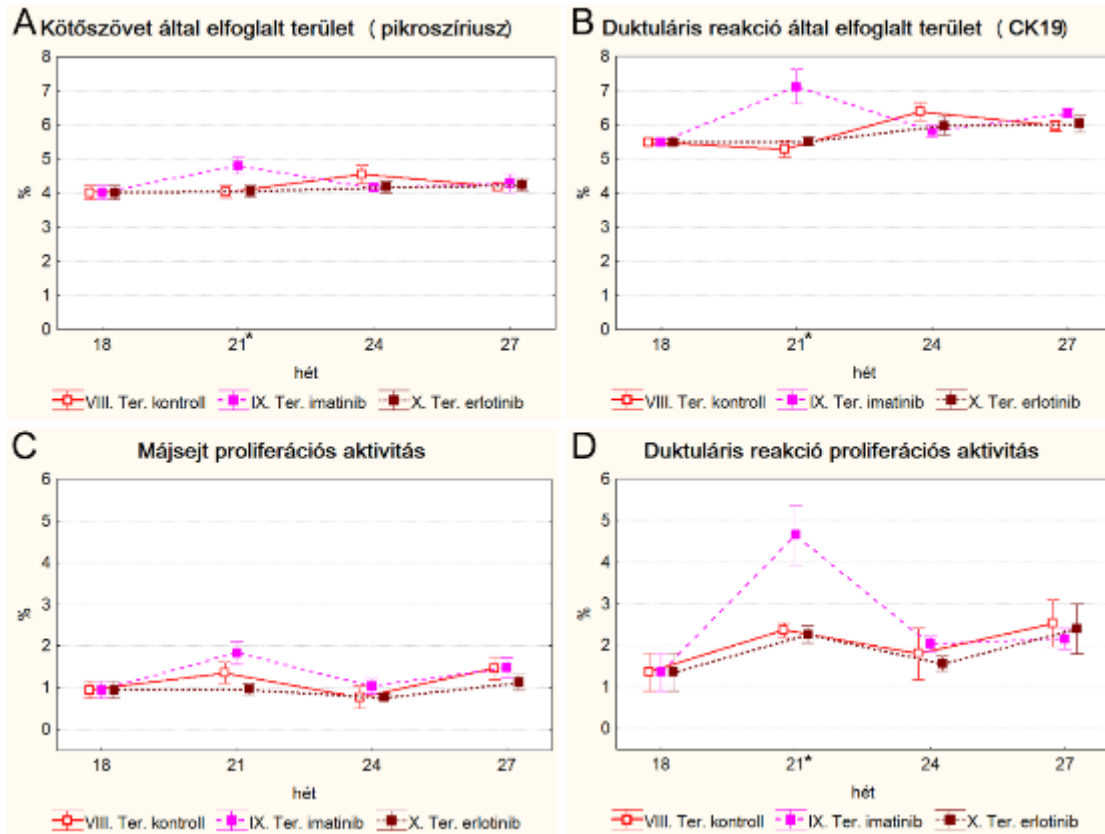
Az imatinib és erlotinib hatását megvizsgáltuk vad típusú egerekben TAA kezeléssel kiváltott, már kialakult májcirrózisra is. A kezelések során egyik gyógyszer sem volt képes megállítani a fibrózis és a duktuláris reakció progresszióját (20. ábra). Az erlotinib kezelés hatására az általunk vizsgálat paramétereiben nem volt szignifikáns különbség. Ezzel szemben az imatinib kezelés megkezdése után 3 héttel (a TAA kezelés 21. hetén) szignifikánsan kiterjedt fibrózist, duktuláris reakciót, ill. duktuláris sejt osztódási aktivitást tapasztaltunk (21. ábra). Ez a hatás átmenetinek bizonyult, a további időpontokban szignifikáns eltérés egyik paraméterben sem volt megfigyelhető.





**20. ábra** Reprezentatív képek a terápiás modellekből (A-C, J-L: Ter. kontroll; D-F, M-O: Ter. imatinib; G-I, P-R: Ter. erlotinib). A-I: Pikroszíriusz vörössel festett metszetekből készült fotók. J-R: CK19 elleni immunfluoreszcens jelöléssel (zöld) ellátott metszetekből készült képek. Egység: 200  $\mu$ m. Az imatinib adása a 21. héten (3

hét imatinib kezelés után) szignifikánsan emelkedett mértékű fibrózissal és duktuláris reakcióval járt, később ez a különbség eltűnt. Az erlotinib kezelés nem okozott szignifikáns különbséget egyik időpontban sem.



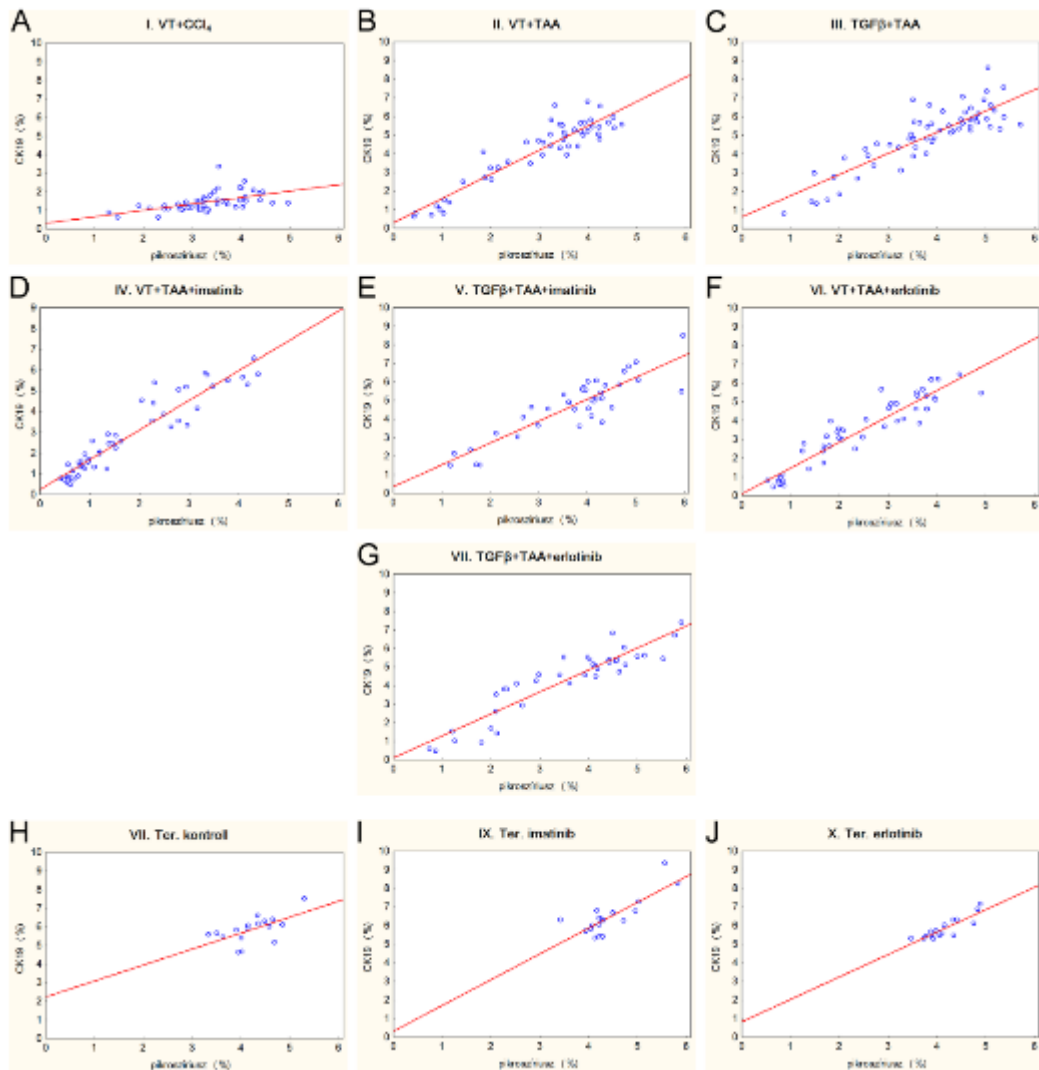
**21. ábra** A terápiás kísérlet modelljeinek (VIII. Ter. kontroll, IX. Ter. imatinib, X. Ter. erlotinib). A \*-al jelölt időpontokban szignifikáns különbség volt a Ter. imatinib, ill. a Ter. kontroll csoportok között. Az imatinib kezelés átmenetileg szignifikánsan nagyobb mértékű fibrózist, duktuláris reakciót, valamint duktuláris sejt osztódást (BrDU-index) váltott ki (**A**, **B**, **D**). Az ábrán az egyes időpontokhoz tartozó átlagértékek, valamint a standard hiba (SEM) szerepel.

## IV.2.4. A cirrotikus modellekben mért paraméterek korrelációs analízise

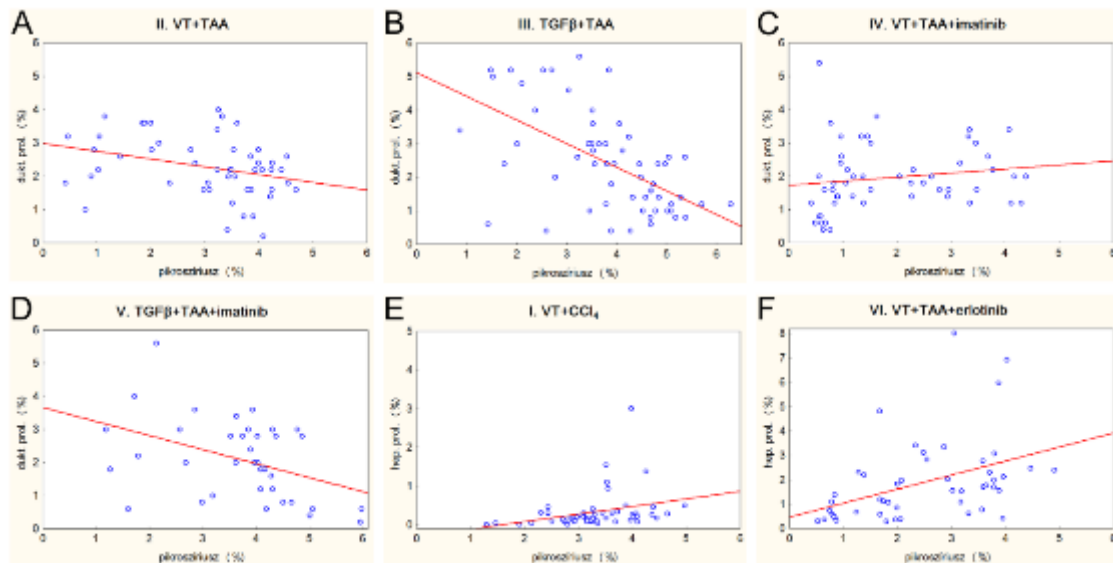
Az egyes kísérleti csoportokban mért különböző paraméterek közti összefüggést Spearman-féle rangkorrelációs analízissel vizsgáltuk. Az elemzés során minden paraméter esetén egy-egy kísérleti csoportból az összes adatot felhasználtuk, tekintet nélkül a kísérleti időpontra. A szignifikáns összefüggések a 4. táblázatban láthatók. A kötőszövet és a duktuláris reakció által elfoglalt terület aránya szoros, szignifikáns korrelációt mutatott mindegyik kísérleti csoportban (22. ábra). A fibrózis mértéke és a májsejtek osztódási aktivitása két modellben szignifikánsan függött össze (VT+CCl<sub>4</sub>, VT+TA+erlotinib), mindkét esetben pozitív módon (23. ábra E, F). Ugyanebben a két modellben a duktuláris reakció kiterjedtsége is szignifikáns, pozitív módon korrelált a hepatociták osztódásával (24. ábra C, D). Ezzel szemben a fibrózis és a duktuláris reakció osztódási aktivitása három modellben is szignifikáns, negatív korrelációt mutatott (VT+TAA, TGFβ+TAA, TGFβ+TAA+imatinib; 23. ábra A, B, D) az egy modellben megfigyelt szignifikáns, pozitív korreláció mellett (VT+TAA+imatinib; 23. ábra C). A duktuláris reakció kiterjedtsége és osztódási aktivitása között két csoportban állt főt szignifikáns korreláció, egy esetben pozitív (VT+TAA+imatinib 24. ábra B) egy esetben pedig negatív (TGFβ+TAA; 24. ábra C). A májsejtek és a duktuláris reakció osztódási aktivitása között egyik modellben sem sikerült szignifikáns, negatív összefüggést találnunk, ezzel szemben két modellben (VT+TAA+imatinib, Ter. imatinib) pozitívan korrelált a két paraméter (24. ábra E, F).

**4. táblázat** A mért paraméterek közti korrelációk a különböző kísérleti csoportokban. Az adatok Spearman-féle korrelációs együtthatóknak felelnek meg. pikro. – kötőszövet által elfoglalt terület; CK19 – duktuláris reakció által elfoglalt terület; hep. prol. – májsejt proliferációs aktivitás, dukt. prol. – duktuláris reakció proliferációs aktivitás.

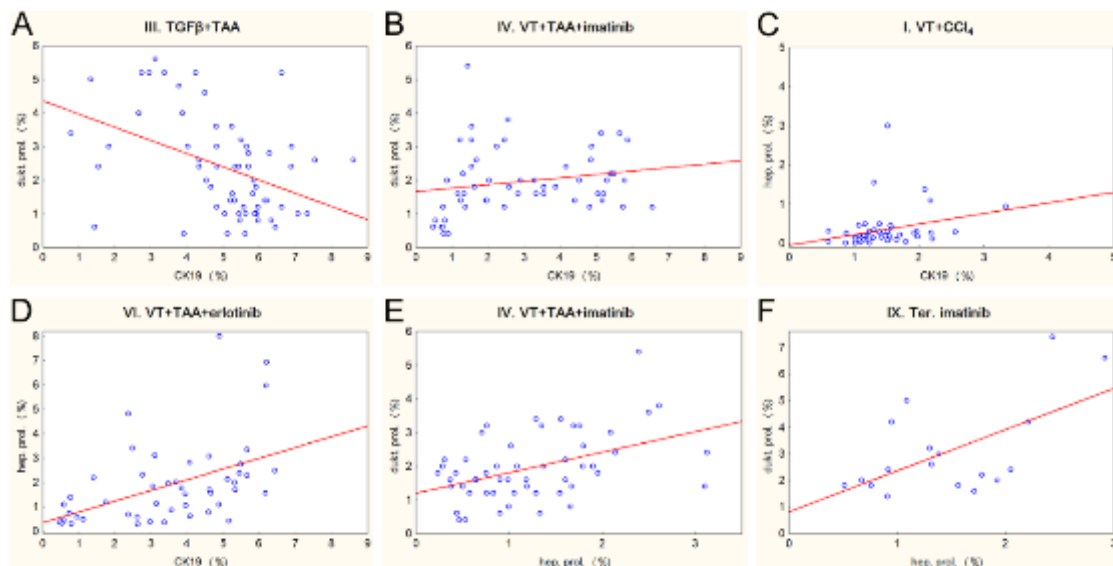
	pikro.- CK19	pikro.- hep. prol.	pikro.- dukt. prol.	CK19- hep. prol.	CK19- dukt. prol.	hep. prol.- dukt. prol.
I. VT+CCl <sub>4</sub> (n=49)	<b>0,66</b>	<b>0,48</b>	n. sz.	<b>0,37</b>	n. sz.	n. sz.
II. VT+TAA (n=50)	<b>0,83</b>	n. sz.	<b>-0,33</b>	n. sz.	n. sz.	n. sz.
III. TGFβ+TAA (n=61)	<b>0,81</b>	n. sz.	<b>-0,56</b>	n. sz.	<b>-0,41</b>	n. sz.
IV. VT+TAA+imatinib (n=54)	<b>0,94</b>	n. sz.	<b>0,31</b>	n. sz.	<b>0,33</b>	<b>0,32</b>
V. TGFβ+TAA+imatinib (n=38)	<b>0,81</b>	n. sz.	<b>-0,46</b>	n. sz.	n. sz.	n. sz.
VI. VT+TAA+erlotinib (n=48)	<b>0,92</b>	<b>0,53</b>	n. sz.	<b>0,55</b>	n. sz.	n. sz.
VII. TGFβ+TAA+erlotinib (n=38)	<b>0,89</b>	n. sz.	n. sz.	n. sz.	n. sz.	n. sz.
VIII. Ter. kontroll (n=18)	<b>0,61</b>	n. sz.	n. sz.	n. sz.	n. sz.	n. sz.
IX. Ter. imatinib (n=18)	<b>0,63</b>	n. sz.	n. sz.	n. sz.	n. sz.	<b>0,47</b>
X. Ter. erlotinib (n=17)	<b>0,81</b>	n. sz.	n. sz.	n. sz.	n. sz.	n. sz.



**22. ábra** A kötőszövet és a duktuláris reakció által elfoglalt terület közti összefüggés a különböző egér kísérleti csoportokban. Picroszíriusz – kötőszövet által elfoglalt terület; CK19 – duktuláris reakció által elfoglalt terület



**23. ábra** A kötőszövet által elfoglalt terület, valamint a duktuláris reakció (A-D) vagy a májsejtek proliferációs aktivitása (E, F) közti összefüggés különböző kísérleti csoportokban. Pikroszírusz – kötőszövet által elfoglalt terület; CK19 – duktuláris reakció által elfoglalt terület; hep. prol. – májsejt proliferációs aktivitás, duct. prol. – duktuláris reakció proliferációs aktivitás.



**24. ábra** A duktuláris reakció által elfoglalt terület, valamint a duktuláris reakció (A, B) vagy a májsejtek proliferációs aktivitása (C, D), ill. a májsejtek és a duktuláris reakció proliferációs aktivitása (E, F) közti összefüggés különböző kísérleti csoportokban. Pikroszírusz – kötőszövet által elfoglalt terület; CK19 – duktuláris reakció által

elfoglalt terület; hep. prol. – májsejt proliferációs aktivitás, dukt. prol. – duktuláris reakció proliferációs aktivitás.

## V. Megbeszélés

Annak ellenére, hogy a cirrózis széles körben kutatott, világszerte súlyos problémát okozó betegség, egészen a közelmúltig kevesen vizsgálták a patogenezisben fontos szerepet játszó folyamatok, pl. a fibrogenesis, májsejt szenescencia, duktuláris reakció, miofibroblaszt aktiváció kapcsolatát. Még napjainkban is több kérdés, különösen a duktuláris reakció biológiai funkciója erősen vitatott. Kutatásaink során humán és egér májakat vizsgáltunk. A humán minták végstádiumú, átültetés során eltávolított májából származtak, míg az egér kísérletek a máj kóros elváltozásainak megjelenésétől a cirrózis kialakulásáig tartottak, így a két vizsgálat együtt lefedi a betegség természetes lefolyását. A cirrózis gyógyszeres befolyásolása is aktuális és nagy jelentőségű téma; egér kísérleteinkben két tirozin-kináz gátló gyógyszer hatását vizsgáltuk a betegség lefolyására, valamint a már kialakult májcirrózisra.

Humán vizsgálataink erőssége, hogy májbiopsziás minták helyett nagyméretű szövettani blokkokat elemeztünk, így nem kellett számolnunk a biopsziás minta kis méretéből adódó mintavételi hibákkal. Ezen kívül a kötőszövet, duktuláris reakció, ill. aktivált miofibroblasztok által elfoglalt területet digitális képanalízis segítségével mértük le, így értékeink nagyobb információtartalommal bírnak a gyakran használt szemikvantitatív értékelésekhez képest.

A hegszövet által elfoglalt terület aránya digitális morfometriai analízissel (CPA) mérve módszertől függően általában 1-7% a normál, ill. 12-36% a cirrotikus májakban (Germani és mtsai 2010); eredményeink megfelelnek ezeknek az értékeknek. A nem virális eredetű cirrotikus mintákban szignifikánsan magasabb mértékű fibrózist találtunk a virális eredetű csoporthoz képest. Hall és mtsai (2013) hasonló eredményre jutottak etiológiánként 10 esetet vizsgálva; mind az ALD-s, PBC-s, PSC-s és AIH-s betegek májaiban magasabb CPA értékeket mértek, mint HCV vagy HBV eredetű cirrózisban. Az alkohol jelentősebb fibrózist kiváltó potenciálját jelzi, hogy Lemoine és mtsai (2008) ALD-s és HCV-s betegeket összehasonlítva mind magasabb fibrózis-pontszámot, mind magasabb HVPG és Fibroscan mérte LSM értékeket találtak az alkoholos eredetű cirrózisban. Emellett Nagula és mtsai (2006) is szignifikánsan magasabb HVPG értékeket mértek ALD-s betegekből más etiológiájú esetekhez képest. Eredményeink szerint az ALP érték a fibrózis mértékéhez hasonlóan szignifikánsan



magasabb volt a nem virális csoportban, emellett szignifikáns korrelációt találtunk a CPA és az ALP-értékek között. A némileg meglepő eredmény háttérében a fokozott mennyiségű kötőszövet epeelfolyást gátló hatása állhat.

A kötőszövet mennyisége szignifikánsan összefüggött a szeptumok vastagságával. A szeptumvastagság meghatározásának fontosságát jelzi, hogy több tanulmány (Nagula és mtsai 2006, Kumar és mtsai 2008) eredményei szerint is szignifikánsan összefügg a portális hipertenzió mértékével, igaz, a szeptumvastagságot mindkét kutatásban csak szemikvantitatív módon elemezték. Viola és mtsai (2009) a dekompenzált cirrózisban szenvedő betegek májában vastagabb szeptumokat mértek (medián: 212,6  $\mu\text{m}$ ), mint a kompenzált betegekben (medián: 159,6  $\mu\text{m}$ ); 169,01  $\mu\text{m}$  szeptumvastagság fölött a betegeknek szignifikánsan nagyobb esélye volt a dekompenzációra. A mi mintáink medián szeptumvastagsága 208,7  $\mu\text{m}$  volt, ami annak tükrében, hogy transzplantáción átesett betegekből származnak, teljes összhangban van Viola és mtsai adataival. A már említett Laennec-osztályzás a szeptumok vastagsága és a kis göbök mérete alapján osztályozná a cirrózist (Kutami és mtsai 2000). Az általunk a fibrózis és szeptumvastagság között leírt erős korreláció megerősíti, hogy a szeptumvastagság mérése a CPA értékhez hasonlóan alkalmas lehet a fibrózis mértékének jellemzésére.

Az általunk mért CPA és szeptumvastagság értékek szignifikáns összefüggést mutatattak az aktivált miofibroblasztok által elfoglalt területet jellemző SMA értékkel, ami azt jelzi, hogy még az előrehaladott, transzplantációt igénylő esetekben is aktív fibrogenézis folyik a májban. A magas SMA értékek arra mutatnak rá, hogy az aktivált miofibroblasztokok ígéretes terápiás célpontként szerepelhetnek előrehaladott cirrózisban is, mivel a miofibroblasztok által a szinuszoidokra, erekre kifejtett kontrakciós hatás hozzájárul a portális hipertenzió fokozódásához (Friedman 2008). A duktuláris reakció és az SMA-pozitív miofibroblasztok száma, ill. az általuk elfoglalt terület között Svegliati-Baroni és mtsai (2011), ill. Prakoso és mtsai (2014) is szignifikáns korrelációt mutattak ki HCV-s betegpopulációkban, melyekben minden fibrózis stádium reprezentálva volt.

A humán májokban a kötőszövet és a duktuláris reakció kiterjedtsége között nem találtunk szignifikáns korrelációt. Ezzel ellentétben a miofibroblasztok által elfoglalt terület szignifikánsan korrelált a CK7-pozitív területtel. Ennek háttérében az állhat,

hogyan az aktivált miofibroblasztok a duktuláris sejtekkel szoros térbeli kapcsolatban állva követik a duktuláris reakció kiterjedését (Dezső és mtsai 2007). Bár a fibrózis és duktuláris reakció közti korrelációt számos tanulmány leírta, mindegyik a fibrózis stádiumokkal vetette össze a duktuláris reakció mértékét, így ezek az eredmények a mi kutatásunkkal szemben nem csak cirrózis stádiumot elérő májakkól származnak; ez állhat annak háttérében, hogy a mi mintáinkban nem találtunk ilyen összefüggést. Eger kísérleteinkben, ahol az említett humán tanulmányokhoz hasonlóan több különböző fibrózis stádiumból származnak az adatok minden kísérleti csoportban erős korrelációt találtunk a fibrózis és a duktuláris reakció mértéke között. A humán májokban meghatározott CK7-pozitív terület az AST értékekkel is korrelált. Ez utalhat arra, hogy rosszabb májfunkció mellett kifejezettebb duktuláris reakció alakul ki, de természetesen arra is, hogy a duktuláris reakció rontja a májfunkciót. Hasonló eredményt Eleazar és mtsai (2004), ill. Prakoso és mtsai (2014) is közöltek. Eleazar és mtsai szemikvantitatíven értékelték a duktuláris reakciót, mely összefüggést mutatott az AST/ALT aránnyal és a direkt bilirubin értékekkel. Prakoso és mtsai beteganyagában igen gyenge statisztikai erősségű volt a morfometriával mért duktuláris reakció terület és az AST-érték közti korreláció ( $r=0,167$ ), azonban a betegek csupán 5,7%-a tartozott a METAVIR szerinti F4, vagyis cirrózis stádiumba. Az általunk mért CK7 és a rendelkezésre álló AST értékek között valamivel erősebb korreláció állt fent ( $r=0,28$ ), vagyis ez az összefüggés erősebb a cirrózis stádiumban. Érdeemes megemlíteni, hogy a betegségük lefolyása alatt valamikor hepatikus encefalopátiában szenvedő betegekben nagyobb területet foglalt el a duktuláris reakció, de a különbség mértéke nem érte el a szignifikanciaszintet. Ezen kívül a duktuláris sejtek proliferációs aktivitása szignifikánsan összefüggött a MELD pontszámmal. Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy a klinikailag rosszabb állapotú betegekben kifejezettebb és aktívabb a duktuláris reakció.

A májsejtek és duktuláris sejtek proliferációs aktivitása szignifikáns, pozitív módon korrelált a vizsgált humán mintákban. Yoon és mtsai (2011), valamint Stueck és Wanless (2015) adataihoz hasonlóan a duktuláris sejtek magasabb proliferációs aktivitással rendelkeztek a májsejtekénél, de mindkét sejttípus proliferációja igen alacsony mértékű volt. Elképzelhető, hogy ezek az explantált májak már a cirrózis egy végső, ún. „burned out” fázisában vannak, ahol már mindkét sejtpopuláció jelentős

hányada szeneszcens állapotban lehet. Erre utal az is, hogy a cirrotikus mintákban a májsejt proliferációs aktivitás gyakorlatilag megegyezett az egészséges, kontroll májakban mérttel. Eredményeink nem támasztják alá azt az elképzelést, hogy az osztódásra képtelenné vált májsejtek helyett a duktuláris sejtek fokozott proliferációja által regenerálódik a májparenchyma (Falkowski és mtsai 2003), mert ebben az esetben fordított összefüggést várnánk a két paraméter között. Ennek ellenére Stueck és Wanless megfigyeléséhez (2015) hasonlóan ALD, HCV, ill. PSC etiológiájú mintáinkban is megfigyeltünk a duktuláris reakcióval közvetlen kapcsolatban álló kis göböket, amelyek a parenhima kipusztulás területein megmaradt portális vénaágak mentén alakultak ki. Ez alapján a duktuláris sejtek bírhatnak regeneratív funkcióval a cirrotikus májban, azonban a duktuláris reakció sejtjeinek csak kis hányada differenciálódik májsejteké, így elképzelhető, hogy a nagy területű mintáinkon számolt proliferációs aktivitásban nem reprezentáltak a regeneratív szerepet játszó duktuláris sejtek. A duktuláris sejtekből kialakuló kis göbök szerkezete eltér a normális parenhimától: a portális vénaág centrálisan helyezkedik el, azonban az epeutak a göb felszínén, a centrális vénaág, valamint az artériák pedig a göböket körülvevő kötőszövetben helyezkednek el. Érdekes módon az, hogy a regeneratív funkciójú kis göbök kialakulását a portális vénaágak „szervezik”, nagyon hasonlít a patkány AAF/PH modellben az ovális sejtekből kialakuló fókuszok szerkezetéhez, azonban mivel a patkány modellben az általuk végbemenő regeneráció egyébként ép szerkezetű májban zajlik, a fókuszok képesek visszaállítani az eredeti szerkezetet. Ezzel szemben a humán cirrotikus májban és fulmináns májelégtelenségben is a kis göbök a parenhima kipusztulás területein, tehát már károsodott szerkezetű májban jönnek létre, valamint felépítésük is eltér a normál parenhimától, így nem képesek visszaállítani a máj ép szerkezetét. Ez alapján a parenhima kipusztulás jelezheti a cirrózis irreverzibilis stádiumának kezdetét (Dezső és mtsai 2017, 2020).

A szeptumvastagság szignifikáns, negatív módon korrelált a májsejt proliferációs aktivitással, tehát a cirrózis stádiumát elérő májakon belül is az előrehaladottabb fibrózissal rendelkezőkben sérült jobban a májsejtek replikatív potenciálja.

Míg a humán mintáink mind cirrotikus májából származnak – így segítségükkel leginkább keresztmetszeti képet tudunk alkotni a betegségről – addig egér

kísérleteinkben hosszsmetszeti nézetben vizsgáltuk a fibrózis és a duktuláris reakció progresszióját. Két gyakran használt vegyülettel, CCl<sub>4</sub>-el és TAA-val váltottunk ki májfibrózist vad típusú egereken. Utóbbi kezelést májukban aktív TGFβ-t termelő transzgen egereken is elvégeztük. A kísérletek kezdetétől egyenlő időközönként (3 hetente) termináltunk állatokat, így a kezdődő fibrózistól egészen a cirrózisig stádiumig a betegség stádiumainak teljes skálája reprezentálva volt. Minden állat májából készült metszeten négy paramétert mértünk: a fibrózis, ill. a duktuláris reakció által elfoglalt területet, valamint a májsejtek és duktuláris sejtek osztódási aktivitását. Az aktivált miofibroblasztok által elfoglalt terület mérését megbízhatóan működő egér ellenes SMA antitest hiányában nem tudtuk elvégezni.

Mind a CCl<sub>4</sub>, mind a TAA kezelés progresszív fibrózist váltott ki a vad típusú egerekben, azonban a kötőszövet-lerakódás dinamikája különböző volt. Az irodalmi adatoknak (Salguero és mtsai 2008) megfelelően a TAA kiváltotta fibrózis kezdetben jelentősen kisebb mértékű volt a CCl<sub>4</sub>-kezelt csoporthoz képest, majd a 9. héttől gyakorlatilag egyforma mennyiségű fibrózist mértünk a két csoportban. A CCl<sub>4</sub>- és TAA-kezelt csoportokban az első, 3. heti kísérleti időpontban még azonos mennyiségű duktuláris reakció volt jelen, ezután viszont a CCl<sub>4</sub> kezelés kiváltotta duktuláris reakció végig jóval csekélyebb mértékű maradt. A fibrózis adatokal összevetve ez azt jelenti, hogy a kiváltó hatástól függően változó lehet a fibrózis és duktuláris reakció aránya; a CCl<sub>4</sub>-kezelt vad típusú egerekben egy „egységnyi” duktuláris reakcióra több kötőszövet jut. Hasonló jelenség figyelhető meg humán mintáinkban is: a nem virális csoport szignifikánsan magasabb mértékű fibrózisához jelentősen kisebb kiterjedtségű duktuláris reakció társult. A két vegyület eltérő duktuláris reakció indukáló képessége mögött a hatásmechanizmus különbözősége állhat: míg a CCl<sub>4</sub> tisztán centrilobuláris nekrozist okoz, addig a TAA a periportális hepatocytákat is károsítja, ami kiválthatja a duktuláris sejtek élénkebb proliferációját. A duktuláris reakció alacsony mértéke ellenére a CCl<sub>4</sub>-kezelt csoportban is szignifikáns, erős módon korrelált a fibrózis kiterjedtségével.

A vártaknak megfelelően (Schnur és mtsai 2004) a TGFβ transzgen egerekben a TAA minden időpontban kifejezettebb fibrózist okozott, mint a vad típusú állatokban. A fokozott kötőszövet-lerakódás mellé hasonló mértékben emelkedett kiterjedtségű

duktuláris reakció is társult, a májsejtek és duktuláris sejtek osztódási aktivitása azonban nem tért el jelentős módon a vad típusú egerektől.

Ha a májfibrózis előrehaladtával a duktuláris sejtek vennék át a szeneszcenssé váló májsejtek szerepét a parenhima regenerációjában, úgy fordított irányú összefüggést várhatnánk a két sejttípus osztódási aktivitása között. Ilyet egy kísérleti csoportban sem sikerült megfigyelni, sőt, két modellben szignifikáns, pozitív korrelációt találtunk. Ez természetesen nem zárja ki, hogy duktuláris sejtek átalakulhatnak májsejtté, de ellentmond annak, hogy jelentős számban pótolnák a hepatocytákat. Stueck és Wanless (2015), valamint munkacsoportunk (Dezső és mtsai 2017) is a parenhima kipusztulás területein írta le a duktuláris sejtekből kialakuló kis májsejtgöbök kialakulását. Egér kísérletei modelljeink közül egyik csoportban, még a hosszabb időtartamú terápiás modellekben sem figyeltünk meg parenhima kipusztulást, így elképzelhető, hogy az általunk vizsgált májak még nem voltak a cirrózis olyan előrehaladott állapotában, hogy a duktuláris sejtek májsejtté való differenciációja megtörténjen. A humán mintáinkban megfigyeltenél megegyező szerkezetű kis göböket 1 év időtartamú CCl<sub>4</sub>, valamint TAA-kezelésben részesülő patkányok májában is megfigyeltünk a parenhima kipusztulás területein, ez alapján valószínűsíthető, hogy krónikus májártalmak esetén a duktuláris reakciónak csak a cirrózis legvégső fázisában van regeneratív szerepe (Dezső és mtsai 2017). Mindazonáltal eredményeink nem támasztják alá, hogy egérben a cirrózis kialakulásának folyamata során a duktuláris reakciónak jelentős regeneratív szerepe volna.

Az imatinib és erlotinib antifibrotikus tulajdonságát számos rágcsláló modellben leírták, de a duktuláris reakcióra kifejtett hatást ezek közül csak kevésben vizsgálták. Ezen kívül gyakorlatilag az összes tanulmány csak egy kísérleti időpontot elemzett, így kísérleteinkben az eddigi ismerteknél bővebb információt tudtunk kapni a két gyógyszer hatásának dinamikájáról.

Az imatinib-kezelés átmenetileg szignifikánsan csökkentette a fibrózis és duktuláris reakció által elfoglalt területet a TAA-kezelt vad típusú egerekben, de a kísérlet végére a gátló hatás megszűnt. Ez rámutat arra, hogy egy kísérleti időpont eredményei alapján nem lehet hosszútávú következtetést levonni egy szer antifibrotikus hatásáról. Az imatinib antifibrotikus hatását feltehetően a miofibroblasztok PDGFR $\beta$ -expressziójának down-regulációja által fejt ki (Kim és mtsai 2012b). Ezt

munkacsoportunk korábbi, patkányokon elvégzett kísérleteinek nem publikált eredményei is alátámasztják. A klasszikus AAF/PH kísérleti protokoll során a hepatektómia után adott egy heti imatinib kezelés jelentősen csökkentette a dezmin-pozitív miofibroblasztok által elfoglalt területet, azonban az ovális sejtes válasz mértéke nem csökkent (sőt, a sejtek mérete megnövekedett). Egy másik kísérletünkben CDE diétán tartott egereket 6 hétig kezeltünk párhuzamosan imatinibbel is. A kezelés a PDGFR $\beta$  expresszió, ill. mRNS-szint szignifikáns csökkenését okozta, emellett pedig a fibrózis, a duktuláris reakció és a csillagsejtek kiterjedését is szignifikánsan gátolta a kontroll (csak CDE) egerekhez képest. A PDGFR $\beta$  expresszió csökkenése nagyobb mértékű volt, mint a dezmin- vagy SMA-expresszióé, ebből arra lehet következtetni, hogy az imatinib elsődlegesen a miofibroblasztok PDGFR $\beta$ -t kifejező csoportjára hat, és ezeknek a sejteknek a gátlása vezet a duktuláris reakció és a fibrózis csökkent mértékű kifejlődéséhez (Rókusz és mtsai 2016). Borkham-Kamphorst és mtsai (2008) CCl<sub>4</sub>-kezelt patkányokban vizsgálták a különböző PDGF izoformák (PDGF-A, -B, -C, -D) és PDGF receptorok ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) expresszióját. Eredményeik szerint mind a PDGF izoformák, mind a receptorok expressziójának csúcsa a kezelés kezdte után 4 héttel volt, míg a 8. hétre a kezelés nélküli állapotra csökkent vissza. Ez azt mutatja, hogy az emelkedett PDGF és PDGFR expresszió a májfibrózis kialakulásának kezdeti szakaszára jellemző, ami magyarázhatja az imatinib kezelés átmeneti hatását, ill. a terápás kísérletben mutatott hatástalanságát is. A vad típusú egerekkel szemben a transzgén egereken teljesen hatástalannak bizonyult az imatinib kezelés. Több tanulmány is leírta különböző CML sejtvonalakon a TGF $\beta$  jelátviteli út potenciális szerepét az imatinib-rezisztencia kialakulásában (Tipping és mtsai 2003, Chung és mtsai 2008, Smith és mtsai 2012). Ez alapján valószínűsíthető, hogy a transzgén egerekben a magas TGF $\beta$  szérumszint miatt hatástalan az imatinib.

Az imatinibról korábban leírták, hogy fibrotikus egér és patkány májokban is képes csökkenteni a kötőszövet mennyiségét (El-Agamy és mtsai 2011, Kim és mtsai 2012). Az, hogy a mi kísérletünkben nem sikerült ilyen hatást kimutatni valószínűleg annak is köszönhető, hogy a gyógyszeres kezelést már régóta fennálló, előrehaladottabb állapotú cirrotikus májakon kezdtük meg, mint az említett tanulmányok. A cirrotikus májokban leírt magas TGF $\beta$ -expresszió (Nagy és mtsai 1991, Nakatsukasa és mtsai 1990) szerepe lehet az imatinib terápás kísérletben mutatott hatástalanságában is.

Az erlotinib az imatinibhez hasonlóan átmenetileg gátolta a fibrózis és a duktuláris reakció progresszióját a TAA-kezelt vad típusú egereken, de ez a hatás egyik időpontban sem érte el a szignifikanciaszintet. Mivel az EGFR-nek feltehetően antifibrotikus (Hb-EGF; Takemura és mtsai 2013) és profibrotikus (amphiregulin; Perugorria és mtsai 2008) hatású ligandjai is vannak, így elképzelhető, hogy az EGFR gátlása során az antifibrotikus hatás kiesése miatt nem következik be szignifikáns változás a fibrózis mértékében a TAA-kezelt állatokban. A transzgén egerekben még a vad típusú csoportban megfigyelt mértékű hatást sem tudta kiváltani az erlotinib kezelés. Az imatinibhez hasonlóan az erlotinibról is leírták, hogy egér és patkány májban előidézett májfibrózisban is mérsékli a lerakódott kötőszövet mennyiségét (Fuchs és mtsai 2014). A TGF $\beta$ -t az erlotinib rezisztenciával is összefüggésbe hozták, ami indokolhatja a terápiás kísérletben mutatott hatástalanságát. Erlotinib-rezisztens tüdőrák sejtvonalon alkalmazott TGF $\beta$ -gátlás csökkentette a rezisztenciáért felelős protein kináz C $\alpha$ -expressziót (Abera és Kazanietz 2015). Egy erlotinib-rezisztens tüdő adenokarcinóma sejtvonalon, valamint érdekes módon különböző, EGFR-gátlószerrel kezelt tumorsejtvonalakon (fej-nyaki laphámrák, hólyagrák, nem kissejtes tüdőrák) is fokozott TGF $\beta$ 1 expressziót írtak le (Yao és mtsai 2010, Kumai és mtsai 2014). Utóbbi megfigyelés felveti annak a lehetőségét, hogy a TAA-kezelt vad típusú egereken megfigyelt kezdeti antifibrotikus hatást a kezelés hatására a duktuláris sejtek megnövekvő TGF $\beta$ -expressziója ellensúlyozza a későbbi időpontokban.

## VI. Következtetések

- I. Humán cirrotikus májakban a kötőszövet által elfoglalt terület az aktivált miofibroblasztok által elfoglalt területtel és a szeptumvastagsággal, míg az aktivált miofibroblasztok által elfoglalt terület a szeptumvastagsággal és a duktuláris reakció kiterjedtségével mutatott szignifikáns összefüggést. A májsejtek és duktuláris sejtek proliferációs aktivitása pozitív korrelációt mutatott. Eredményeink alapján a duktuláris sejteknek a májcirrózis előrehaladott szakaszában lehet regeneratív szerepe, fokális jelleggel.
- II. A humán cirrotikus májakban a kötőszövet által elfoglalt terület aránya az ALP értékkel, a duktuláris reakció kiterjedtsége az AST értékkel függött össze szignifikánsan. A morfológiai paraméterek és a cirrózis klinikai szövődményei között nem találtunk szignifikáns összefüggést.
- III. A kötőszövet és duktuláris reakció által elfoglalt terület valamennyi általunk vizsgált egér kísérleti modellben erős, szignifikáns korrelációt mutatott, a károsító hatástól függetlenül. A májsejtek és duktuláris sejtek osztódási aktivitása között nem találtunk fordított összefüggést. Eredményeink alapján a különböző modellekben a duktuláris sejtek nem járulnak hozzá jelentősen a májregenerációhoz.
- IV. A TAA-kezelt vad típusú egerekben az imatinib és erlotinib-kezelés is átmenetileg csökkentette a fibrózis és duktuláris reakció kiterjedtségét, azonban a gátló hatás a kísérlet végére megszűnt. Egyik szer sem volt hatással a fibrózis és duktuláris reakció mértékére a TGF $\beta$  transzgen egerekben.



## VII. Összefoglalás

A májcirrózis világszerte és hazánkban is népbetegség, ennek ellenére a patogenezisben szerepet játszó különböző folyamatok – pl. fibrogenézis, duktuláris reakció kialakulása, miofibroblasztok aktivációja, májsejtek és duktuláris sejtek proliferációs aktivitása –, egymáshoz való viszonya, dinamikája kevésbé ismert. Ezek pontosabb megismerése, illetve a duktuláris reakció biológiai szerepének megértése hozzásegíthetne a betegség prognózisának pontosabb meghatározásához. A fibrogenézis gyógyszeres gátlása a jövőben a májátültetés alternatíváját jelenthetné.

Kutatásaink során humán és egér májokban vizsgáltuk a fent felsorolt folyamatok dinamikáját, egymáshoz való viszonyát. A kötőszövet, duktuláris reakció, ill. aktivált miofibroblasztok által elfoglalt területet digitális képanalízis segítségével mértük le. Humán mintáink 56 db, transzplantáció során eltávolított, változatos etiológiájú cirrotikus májból származtak. Kísérleteinkben cirrózis vizsgálatára alkalmas szén-tetraklorid és tioacetamid egér-modelleket használtunk. A tioacetamid kezelés mellett antifibrotikus hatású tirozin-kináz gátlókkal, imatinibbel és erlotinibbel kezelt kísérleti csoportokat is kialakítottunk.

Humán mintáinkban szignifikáns, pozitív irányú összefüggést találtunk a kötőszövet és aktivált miofibroblasztok által elfoglalt terület, valamint a legvastagabb kötőszövetes szeptumok átmérője között. A májsejtek és a duktuláris sejtek proliferációs aktivitása között szignifikáns, negatív irányú korreláció állt fent. Eredményeink alapján a duktuláris sejteknek humán májban a májfibrózis előrehaladott szakaszában lehet regeneratív szerepe, fokális jelleggel. Valamennyi egér modellünkben erős, szignifikáns összefüggést találtunk a kötőszövet és duktuláris reakció mennyisége között, azonban a májsejtek és duktuláris sejtek proliferációs aktivitása között nem találtunk fordított irányú összefüggést. A tioacetamid kezelés mellett adott imatinib és erlotinib átmenetileg csökkentette a fibrózis és duktuláris reakció kiterjedtségét, de a gátló hatás a kísérlet végére megszűnt. Kialakult cirrózisban mindkét gyógyszer hatástalannak bizonyult. Eredményeink alapján a cirrózis kialakulása során szoros kapcsolat igazolható a fibrogenézis és duktuláris reakció között, de a duktuláris reakció sem a humán májokban, sem az egér modellekben nem járult hozzá jelentős mértékben a máj regenerációjához.

## VIII. Summary

Although liver cirrhosis is a common disease both worldwide and in Hungary, little is known about the relation and dynamics of the different pathogenetic processes, e. g. fibrogenesis, ductular reaction, activation of myofibroblasts, proliferative activity of hepatocytes and ductular cells. Studying the details of these processes and understanding the biological function of ductular reaction could help in determining the prognosis of the disease. Inhibition of fibrogenesis with drugs could provide an alternative for liver transplantation in the future.

We studied the relation and dynamics of the processes above in cirrhotic human and mouse livers. The area occupied by fibrosis, ductular reaction and activated myofibroblasts was measured by digital image analysis. Human liver samples were taken from 56 explanted livers with diverse etiology. Mouse liver fibrosis was induced by carbon-tetrachloride and thioacetamide. The thioacetamide induced liver fibrosis was treated with the antifibrotic tyrosin-kinase inhibitors imatinib and erlotinib

Analysis of human samples showed a significant, positive correlation between the area occupied by fibrosis, activated myofibroblasts and the diameter of the thickest fibrotic septa. There was significant, negative correlation between the proliferative activity of hepatocytes and ductular cells. According to our results in human liver the ductular cells only focally play a regenerative role, in the late phase of cirrhosis. We found strong, positive correlation between the extent of fibrosis and ductular reaction in all mouse models, but there was no negative correlation between the proliferative activity of hepatocytes and ductular cells. Imatinib and erlotinib treatment temporarily decreased the amount of fibrosis and ductular reaction in thioacetamide induced liver fibrosis, but this effect disappeared by the end of the experiments. Both drugs were ineffective when applied in established liver cirrhosis. In conclusion there is a strong connection between fibrogenesis and ductular reaction during the development of cirrhosis, but ductular reaction does not play a significant regenerative role neither in human, nor in mouse liver.

## IX. Irodalomjegyzék

1. Abera MB, Kazanietz MG. (2015) Protein kinase Ca mediates erlotinib resistance in lung cancer cells. *Mol Pharmacol*, 87:832-841.
2. Afdhal NH, Nunes D. (2004) Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am J Gastroenterol*, 99:1160-1174.
3. Anthony PP, Ishak GK, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH. (1978) The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature and classification by a working group sponsored by the World Health Organisation. *J Clin Pathol*, 31:395-414.
4. Arias IM, Alter HJ, Boyer JL, Cohen DE, Shafritz DA, Thorgeirsson SS, Wolkoff AW. (ed.) (2020) *The Liver: Biology and Pathobiology*, John Wiley & Sons, New York, New York.
5. Barker EA, Smuckler EA. (1973) Nonhepatic thioacetamide injury. I. Thymic cortical necrosis. *Am J Pathol*, 71:409-418.
6. Batts KP, Ludwig J. (1995) Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting. *Am J Surg Pathol*, 19:1409-1417.
7. Bedossa P, Poynard T for the METAVIR Cooperative Study Group. (1996) An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. *Hepatology*, 24:289-293.
8. Bedossa P, Dargère D, Paradis V. (2003) Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*, 38:1449-1457.
9. Bedossa P. (2015) Reversibility of hepatitis B virus cirrhosis after therapy: who and why? *Liver Int*, 35 (Suppl 1):78-81.
10. Benhamouche S, Curto M, Saotome I, Gladden AB, Liu CH, Giovannini M, McClatchey AI. (2010) Nf2/Merlin controls progenitor homeostasis and tumorigenesis in the liver. *Genes Dev*, 24:1718-1730.
11. Borkham-Kamphorst E, Kovalenko E, van Roeyen CR, Gassler N, Bomble M, Ostendorf T, Floege J, Gressner AM, Weiskirchen R. (2008) Platelet-derived growth factor isoform expression in carbon tetrachloride-induced liver injury. *Lab Invest*, 88:1090-1100.

12. Bridle KR, Popa C, Morgan ML, Sobbe AL, Clouston AD, Fletcher LM, Crawford DH. (2009) Rapamycin inhibits hepatic fibrosis in rats by attenuating multiple profibrogenic pathways. *Liver Transpl*, 15: 1315-1324.
13. Bruno S, Boccaccio V, Russo ML, Maisonneuve P. (2016) Is the benefit of treating patients with cirrhosis proven? *Liver Int*, 36 (Suppl S1):21-27.
14. Caldwell S. (2010) Cryptogenic cirrhosis: what are we missing? *Curr Gastroenterol Rep*, 12:40-48.
15. Calvaruso V, Burroughs AK, Standish R, Manousou P, Grillo F, Leandro G, Maimone S, Pleguezuelo M, Xirouchakis I, Guerrini GP, Patch D, Yu D, O'Beirne J, Dhillon AP. (2009) Computer-assisted image analysis of liver collagen: relationship to Ishak-scoring and hepatic venous pressure gradient. *Hepatology*, 49:1236-1244.
16. Cameron GR, Karunaratne WAE. (1936) Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration. *J Pathol Bacteriol*, 42:1-21.
17. Child CG 3rd, Turcotte JG. (1964) Surgery and portal hypertension. In: Child CG 3rd, ed. *The liver and portal hypertension*. Philadelphia, W. B. Saunders Co., 50-64.
18. Childs JFL, Siegler EA. (1945) Compounds for control of orange decays. *Science*, 102:68.
19. Chobert MN, Couchie D, Fourcot A, Zafrani ES, Laperche Y, Mavier P, Brouillet A. (2012) Liver precursor cells increase hepatic fibrosis induced by chronic carbon-tetrachloride intoxication in rats. *Lab Invest*, 92:135-150.
20. Chung YJ, Kim TM, Kim DW, Namkoong H, Kim HK, Ha SA, Kim S, Shin SM, Kim JH, Lee YJ, Kang HM, Kim JW. (2006) Gene expression signatures associated with the resistance to imatinib. *Leukemia*, 20:1542-50.
21. Clouston AD, Powell EE, Walsh MJ, Richardson MM, Demetris AJ, Jonsson JR. (2005) Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis. *Hepatology*, 41:809-818.
22. Colloredo G, Guido M, Sonzogni A, Leandro G. (2003) Impact of liver biopsy size on histological evaluation of chronic viral hepatitis: the smaller the sample the milder the disease. *J Hepatol*, 39:239-244.

23. Crary GS, Albrecht JH. (1998) Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in human liver. *Hepatology*, 28:738-743.
24. Crespo Yanguas S, Cogliati B, Willebrords J, Maes M, Colle I, van den Bossche B, de Oliveira CP, Andraus W, Alves VA, Leclercq I, Vinken M. (2016) Experimental models of liver fibrosis. *Arch Toxicol*, 90:1025-1048.
25. D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. (2006) Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: A systematic review of 118 studies. *J Hepatol*, 44:217-231.
26. D'Amico G. (2014) Natural history and progression of cirrhosis. In: de Franchis R, Dell'Era A (eds.): *Variceal Hemorrhage*. Springer Science+Business Media, New York, 15-28.
27. de Franchis R. (2005) Evolving consensus in portal hypertension. Report of the Baveno IV consensus workshop on methodology of diagnosis and therapy in portal hypertension. *J Hepatol*, 43:167-176.
28. Delire B, Stärkel P, Leclercq I. (2015) Animal models for fibrotic liver disease: what we have, what we need, and what is under development. *J Clin Transl Hepatol*, 3:53-66.
29. Deng YR, Ma HD, Tsuneyama K, Yang W, Wang YH, Lu FT, Liu CH, Liu P, He XS, Diehl AM, Gershwin ME, Lian ZX. (2013) STAT3-mediated attenuation of CCl<sub>4</sub>-induced mouse liver fibrosis by the protein kinase inhibitor sorafenib. *J Autoimmun*, 46:25-34.
30. Desmet VJ, Roskams T. (2004) Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth. *J Hepatol*, 40:860-867.
31. Desmet VJ. (2005) Comments on cirrhosis reversal. *Dig Liv Dis*, 37:909-916.
32. Dezsó 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*, 171:1529-1537.
33. Dezsó 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.

34. Dezsó K, Papp V, Bugyik E, Hegyesi H, Sáfrány G, Bödör Cs, Nagy P, Paku S. (2012) Structural analysis of oval cell-mediated liver regeneration in rats. *Hepatology*, 56:1457-1467.
35. Dezsó K, Rókus A, Bugyik E, Szücs A, Szuák A, Dorogi B, Kiss M, Nemeskéri Á, Nagy P, Paku S. (2017) Human liver regeneration in advanced cirrhosis is organized by the portal tree. *J Hepatol*, 67:430-436.
36. Dezsó K, Nagy P, Paku S. (2020) Human liver regeneration following massive hepatic necrosis: Two distinct patterns. *J Gastroenterol Hepatol*, 35:124-134.
37. Distler JH, Jünger A, Huber LC, Schulze-Horsel U, Zwerina J, Gay RE, Michel BA, Hauser T, Schett G, Gay S, Distler O. (2007) Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis. *Arthritis Reum*, 56:311-322.
38. Dooley S, ten Dijke P. (2012) TGF- $\beta$  in progression of liver disease. *Cell Tissue Res*, 347:245-256.
39. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. (2001) Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 344:1031-1037.
40. Duncan AW, Dorrell C, Grompe M. (2009) Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology*, 137:466-481.
41. Egresi A, Lengyel G, Hagymási K. (2015) Options of non-invasive assessment of liver fibrosis based on the clinical data. *Orv Hetil*, 156:43-52.
42. El-Agamy DS, Shebl AM, Said SA. (2011) Prevention and treatment of *Schistosoma mansoni*-induced liver fibrosis in mice. *Inflammopharmacology*, 19:307-316.
43. Eleazar JA, Memeo L, Jhang JS, Mansukhani MM, Chin S, Park SM, Lefkowitz JH, Bhagat G. (2004) Progenitor cell expansion: an important source of hepatocyte regeneration in chronic hepatitis. *J Hepatol*, 41:983-991.
44. Español-Suñer R, Carpentier R, Van Hul N, Legry V, Achouri Y, Cordi S, Jacquemin P, Lemaigre F, Leclercq IA. (2012) Liver progenitor cells yield functional hepatocytes in response to chronic liver injury in mice. *Gastroenterology*, 143:1564-1575.

45. Evarts RP, Nagy P, Marsden E, Thorgeirsson SS. (1987) A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. *Carcinogenesis*, 8:1737-1740.
46. Falkowski O, An HJ, Ianus IA, Chiriboga L, Yee H, West AB, Theise ND. (2003) Regeneration of hepatocyte 'buds' in cirrhosis from intrabiliary stem cells. *J Hepatol*, 39:357-364.
47. Farber E. (1956) Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene.
48. Fischer-Nielsen A, Poulsen HE, Hansen BA, Hage E, Keiding S. (1991) CCl<sub>4</sub> cirrhosis in rats: irreversible histological changes and differentiated functional impairment. *J Hepatol*, 12:110-117.
49. Fitzhugh OG, Nelson AA. (1948) Liver tumors in rats fed thiourea or thioacetamide. *Science*, 108:626-628.
50. Friedman SL. (2000) Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem*, 275:2247-2250.
51. Friedman SL. (2008) Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*, 134:1655-1669.
52. Fuchs BC, Hoshida Y, Fujii T, Wei L, Yamada S, Lauwers GY, McGinn CM, DePeralta DK, Chen X, Kuroda T, Lanuti M, Scmitt AD, Gupta S, Crenshaw A, Onofrio R, Taylor B, Winckler W, Bardeesy N, Caravan P, Golub TR, Tanabe KK. (2014) Epidermal growth factor receptor inhibition attenuates liver fibrosis and development of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 59:1577-1590.
53. Fujita M, Furukawa H, Hattori M, Todo S, Ishida Y, Nagashima K. (2000) Sequential observation of liver cell regeneration after massive hepatic necrosis in auxiliary partial orthotopic liver transplantation. *Mod Pathol*, 13:152-157.
54. Garcia-Tsao G, Friedman S, Iredale J, Pinzani M. (2010) Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis. *Hepatology*, 51:1445-1449.
55. Germani G, Burroughs AK, Dhillon AP. (2010) The relationship between liver disease stage and liver fibrosis: a tangled web. *Histopathology*, 57:773-784.

56. Goodman ZD, Becker RL Jr., Pockros PJ, Afdhal NH. (2007) Progression of fibrosis in advanced chronic hepatitis C: evaluation by morphometric image analysis. *Hepatology*, 45:886-894.
57. Gouw AS, Clouston AD, Theise ND. (2011) Ductular reactions in human liver: diversity at the interface. *Hepatology*, 54:1853-1863.
58. Grompe M. (2014) Liver stem cells, where art thou? *Cell Stem Cell*, 15:257-258.
59. Gupta DN. (1956a) Acute changes in the liver after administration of thioacetamide. *J Pathol Bacteriol*, 72:183-192.
60. Gupta DN. (1956b) Nodular cirrhosis and metastasising tumours produced in the liver of rats by prolonged feeding with thioacetamide. *J pathol Bacteriol*, 72:415-426.
61. Hall AR, Tsochatzis E, Morris R, Burroughs AK, Dhillon AP. (2013) Sample size requirement for digital image analysis of collagen proportionate area in cirrhotic livers. *Histopathology*, 62:421-430.
62. Hong F, Chou H, Fiel MI, Friedman SL - Antifibrotic activity of sorafenib in experimental hepatic fibrosis: refinement of inhibitory targets, dosing and window of efficacy in vivo. *Dig Dis Sci*, 58:257-264.
63. Huang M, Shen A, Ding J, Geng M. (2014) Molecularly targeted cancer therapy: some lessons from the past decade. *Trends Pharmacol Sci*, 35:41-50.
64. Huch M, Dollé L. (2016) The plastic cellular state of liver cells: Are EpCAM and Lgr5 fit for purpose? *Hepatology*, 64:652-662.
65. Hytioglou P, Snover DC, Alves V, Balabaud C, Bhathal PS, Bioulac-Sage P, Crawford JM, Dhillon AP, Ferrell L, Guido M, Nakanuma Y, Paradis V, Quaglia A, Theise ND, Thung SN, Tsui WMS, van Leeuwen DJ. (2012) Beyond “cirrhosis”. A proposal from the International Liver Pathology Study Group. *Am J Clin Pathol*, 137:5–9.
66. Iqbal N, Iqbal N. (2014) Imatinib: a breakthrough of targeted therapy in cancer. *Chemother Res Pract*, 2014:357027.
67. Iredale JP. (2007) Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest*, 117:539-548.



68. Isgro G, Calvaruso V, Andreana L, Luong TV, Garcovich M, Manousou P, Alibrandi A, Maimone S, Marelli L, Davies N, Patch D, Dhillon AP, Burroughs AK. (2013) The relationship between transient elastography and histological collagen proportionate area for assessing fibrosis in chronic viral hepatitis. *J Gastroenterol*, 48:921-929.
69. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RNM, Phillips MJ, Portmann BG, Poulsen H, Scheuer PJ, Schmid M, Thaler H. (1995) Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol*, 22:696–699.
70. Itoh T. (2016) Stem/progenitor cells in liver regeneration. *Hepatology*, 64:663-668.
71. Jelnes P, Santoni-Rugiu E, Rasmussen M, Friis SL, Nielsen JH, Tygstrup N, Bisgaard HC. (2007) Remarkable heterogeneity displayed by oval cells in rat and mouse models of stem cell-mediated liver regeneration. *Hepatology*, 45:1462-1470.
72. Kallis YN, Robson AJ, Fallowfield JA, Thomas HC, Alison MR, Wright NA, Goldin RD, Iredale JP, Forbes SJ. (2011) Remodelling of extracellular matrix is a requirement for the hepatic progenitor cell response. *Gut*, 60:525-533.
73. Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, D'Amico G, Dickson ER, Kim WR. (2001) A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology*, 33:464–470.
74. Kaur S, Siddiqui H, Bhat MH. (2015) Liver progenitor cells in action: liver regeneration or fibrosis? *Am J Pathol*, 185:2342-2350.
75. Kim MY, Cho MY, Baik SK, Park HJ, Jeon HK, Im CK, Won CS, Kim JW, Kim HS, Kwon SO, Eom MS, Cha SH, Kim YJ, Chang SJ, Lee SS. (2011) Histological subclassification of cirrhosis using the Laennec fibrosis scoring system correlates with clinical stage and grade of portal hypertension. *J Hepatol*, 55:1004-1009.
76. Kim Y, Fiel MI, Albanis E, Chou HI, Zhang W, Khitrov G, Friedman SL. (2012) Anti-fibrotic activity and enhanced interleukin-6 production by hepatic stellate cells in response to imatinib mesylate. *Liver Int*, 32:1008-1017.

77. Kiss A, Schnur J, Szabó Zs, Nagy P. (2001) Immunohistochemical analysis of atypical ductular reaction in the liver, with special emphasis on the presence of growth factors and their receptors. *Liver*, 21:237-246.
78. Knight B, Tirnitz-Parker JE, Olynyk JK. (2008) C-kit inhibition by imatinib mesylate attenuates progenitor cell expansion and inhibits liver tumor formation in mice. *Gastroenterology*, 135:969-979.
79. 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*, 192:1809-1818.
80. Knodell RG, Ishak GK, Black WC, Chen TS, Craig T, Kaplowitz N, Kiernan TW, Wollmann J. (1981) Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology*, 1:431-435.
81. Kobayashi N, Ito M, Nakamura J, Cai J, Gao C, Hammel JM, Fox IJ. (2000) Hepatocyte transplantation in rats with decompensated cirrhosis. *Hepatology*, 31:851-857.
82. Kocabayoglu P, Lade A, Lee YA, Dragomir AC, Sun X, Fiel MI, Thung S, Aloman C, Soriano P, Hoshida Y, Friedman SL. (2015)  $\beta$ -PDGF receptor expressed by hepatic stellate cells regulates fibrosis in murine liver injury, but not carcinogenesis. *J Hepatol*, 63:141-147.
83. Komposch K, Sibilica M. (2015) EGFR signaling in liver diseases. *Int J Mol Sci*, 17:30.
84. Kordes C, Häussinger D. (2013) Hepatic stem cell niches. *J Clin Invest*, 123:1874-1880.
85. Köhn-Gaone J, Dwyer BJ, Grzelak CA, Miller G, Shackel NA, Ramm GA, McCaughan GW, Elsegood CL, Olynyk JK, Tirnitz-Parker JE. (2016a) Divergent inflammatory, fibrogenic, and liver progenitor cell dynamics in two common mouse models of chronic liver injury. *Am J Pathol*, 186:1762-1774.
86. Köhn-Gaone J, Gogoi-Tiwari J, Ramm GA, Olynyk JK, Tirnitz-Parker JE. (2016b) The role of liver progenitor cells during liver regeneration, fibrogenesis and carcinogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 310:G143-153.

87. Kömüves LG, Feren A, Jones AL, Fodor E. (2000) Expression of epidermal growth factor and its receptor in cirrhotic liver disease. *J Histochem Cytochem*, 48:821-830.
88. Kumai T, Oikawa K, Aoki N, Kimura S, Harabuchi Y, Celis E, Kobayashi H. (2014) Tumor-derived TGF- $\beta$  and prostaglandin E2 attenuate anti-tumor immune responses in head and neck squamous carcinoma treated with EGFR inhibitor. *J Transl Med*, 12:265.
89. Kumar M, Sakhuja P, Kumar A, Manglik N, Choudhury A, Hissar S, Rastogi A, Sarin SK. (2008) Histological subclassification of cirrhosis based on histological-haemodynamic correlation. *Aliment Pharmacol Ther*, 27:771-779.
90. Kuo WL, Yu MC, Lee JF, Tsai CN, Chen TC, Chen MF. (2012) Imatinib mesylate improves liver regeneration and attenuates liver fibrogenesis in CCl<sub>4</sub>-treated mice. *J Gastrointest Surg*, 16:361-369.
91. Kutami R, Girgrah N, Wanless IR, Sniderman K, Wong F, Sherman M. (2000) The Laennec grading system for assessment of hepatic fibrosis: validation by correlation with wedged hepatic vein pressure and clinical features. *Hepatology*, 32:407A
92. Laennec RTH. (1819) *Traité de l'Auscultation Médiante, et des Maladies des Poumons et du Coeur*. Paris: Chaude; 1819.
93. Lamson PD, Minot AS, Robbins MS. (1928) The prevention and treatment of carbon tetrachloride intoxication. *JAMA*, 90:345-349.
94. Laquet AM. (1932) Experimental pathology of the liver. VIII. Effects of carbon tetrachloride on the normal and on the restored liver after partial hepatectomy. *Arch Path*, 14:164.
95. Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. (2015) Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut*, 64:830-841.
96. Lemaigre FP. (2015) Determining the fate of hepatic cells by lineage tracing: facts and pitfalls. *Hepatology*, 61:2100-2103.
97. Lemoine M, Katsahian S, Ziol M, Nahon P, Ganne-Carrie N, Kazemi F, Grando-Lemaire V, Trinchet JC, Beaugrand M. (2008) Liver stiffness measurement as a predictive tool of clinically significant portal hypertension in

- patients with compensated hepatitis C virus or alcohol-related cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther*, 28:1102-1110.
98. Li M, Abdollahi A, Gröne HJ, Lipson KE, Belka C, Huber PE. (2009) Late treatment with imatinib mesylate ameliorates radiation-induced lung fibrosis in a mouse model. *Radiat Oncol*, 4:66.
  99. Lin WR, Lim SN, McDonald SA, Graham T, Wright VL, Peplow CL, Humphries A, Kocher HM, Wright NA, Dhillon AP, Alison MR. (2010) The histogenesis of regenerative nodules in human liver cirrhosis. *Hepatology*, 51:1017-1026.
  100. Liu C, Zhao W, Meng W, Zhao T, Chen Y, Ahokas RA, Liu H, Sun Y. (2014) Platelet derived growth factor blockade on cardiac remodeling following infarction. *Mol Cell Biochem*, 397:295-304.
  101. Liu SB, Ikenaga N, Peng ZW, Sverdlov DY, Greenstein A, Smith V, Schuppan D, Popov Y. (2016) Lysyl oxidase activity contributes to collagen stabilization during liver fibrosis progression and limits spontaneous fibrosis reversal in mice. *FASEB J*, 30:1599-1609.
  102. Liu Y, Wang Z, Kwong SQ, Lui EL, Friedman SL, Li FR, Lam RW, Zhang GC, Zhang H, Ye T. (2011) Inhibition of PDGF, TGF- $\beta$ , and Abl signaling and reduction of liver fibrosis by the small molecule Bcr-Abl tyrosine kinase antagonist Nilotinib. *J Hepatol*, 55:612-625.
  103. Liu Y, Meyer C, Xu C, Weng H, Hellerbrand C, ten Dijke P, Dooley S. (2013) Animal models of chronic liver diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 304:G449-468.
  104. Lorenzini S, Bird TG, Boulter L, Bellamy C, Samuel K, Aucott R, Clayton E, Andreone P, Bernardi M, Golding M, Alison MR, Iredale JP, Forbes SJ. (2010) Characterisation of a stereotypical cellular and extracellular adult liver progenitor cell niche in rodents and diseased human liver. *Gut*, 59:645-654.
  105. Low TY, Leow CK, Salto-Tellez M, Chung MC. (2004) A proteomic analysis of thioacetamide-induced hepatotoxicity and cirrhosis in rats. *Proteomics*, 4:3960-3974.

106. Maros T, Seres-Sturm L, Lakatos O, Seres-Sturm MT, Blazsek V. (1975) Spontaneous reversibility of advanced toxic liver cirrhosis. *Acta Morphol Acad Sci Hung*, 23:293-302.
107. McLean EK, McLean AE, Sutton PM. (1969) Instant cirrhosis. An improved method for producing cirrhosis of the liver in rats by simultaneous administration of carbon tetrachloride and phenobarbitone. *Br J Exp Pathol*, 50:502-506.
108. Michalopoulos GK, DeFrances MC. (1997) Liver regeneration. *Science*, 276:60-66.
109. Michalopoulos GK, Barua L, Bowen WC. (2005) Transdifferentiation of rat hepatocytes into biliary cells after bile duct ligation and toxic biliary injury. *Hepatology*, 41:535-544.
110. Michalopoulos GK. (2014) Liver is a peculiar organ when it comes to stem cells. *Am J Pathol*, 184:1263-1267.
111. Michalopoulos GK, Khan Z. (2015) Liver stem cells: experimental findings and implications for human disease. *Gastroenterology*, 149:876-882.
112. Miyajima A, Tanaka M, Itoh T. (2014) Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming. *Cell Stem Cell*, 14:561-574.
113. Nagula S, Jain D, Groszmann RJ, Garcia-Tsao G. (2006) Histological-hemodynamic correlation in cirrhosis: a histological classification of the severity of cirrhosis. *J Hepatol*, 44:111-117.
114. Nagy P, Schaff Zs, Lapis K. (1991) Immunohistochemical detection of transforming growth factor-beta 1 in fibrotic liver diseases. *Hepatology*, 14:269-273.
115. Nagy P. (1995) The facultative stem cell: A new star in liver pathology. *Pathol Oncol Res*, 1:23-26.
116. Nagy P, Bisgaard HC, Santoni-Rugiu E, Thorgeirsson SS. (1996) In vivo infusion of growth factors enhances the mitogenic response of rat hepatic ductal (oval) cells after administration of 2-acetylaminofluorene. *Hepatology*, 23:71-79.

117. Nakatsukasa H, Nagy P, Evarts RP, Hsia CC, Marsden E, Thorgeirsson SS. (1990) Cellular distribution of transforming growth factor-beta 1 and procollagen types I, III and IV transcripts in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *J Clin Invest*, 85:1833-1843.
118. Neef M, Ledermann M, Saegesser H, Schneider V, Widmer N, Decosterd LA, Rochat B, Reichen J. (2006) Oral imatinib treatment reduces early fibrogenesis but does not prevent progression in the long term. *J Hepatol*, 44:167-175.
119. Paku S, Schnur J, Nagy P, Thorgeirsson SS. (2001) Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver. *Am J Pathol*, 158:1313-1323.
120. Pérez-Tamayo R. (1979) Cirrhosis of the liver: a reversible disease? *Pathol Annu*, 14:183-213.
121. Pérez Tamayo R. (1983) Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl<sub>4</sub> an adequate model of human cirrhosis? *Hepatology*, 3:112-120.
122. Perugorria MJ, Latasa MU, Nicou A, Cartagena-Lirola H, Castillo J, Goñi S, Vespasiani-Gentilucci U, Zagami MG, Lotersztajn S, Prieto J, Berasain C, Alvila MA. (2008) The epidermal growth factor receptor ligand amphiregulin participates in the development of mouse liver fibrosis. *Hepatology*, 48:1251-1261.
123. Petersen BE, Bowen WC, Patrane KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. (1999) Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 284:1168-1170.
124. Pinzani M, Milani S, Herbst H, DeFranco R, Grappone C, Gentilini A, Caligiuri A, Pellegrini G, Ngo DV, Romanelli RG, Gentilini P. (1996) Expression of platelet-derived growth factor and its receptor in normal human liver and during active hepatic fibrogenesis. *Am J Pathol*, 148:785-800.
125. Popov Y, Patsenker E, Bauer M, Niedobitek E, Schulze-Krebs A, Schuppan D. (2006) Halofuginone induces matrix metalloproteinases in rat hepatic stellate cells via activation of p38 and NFkappaB. *J Biol Chem*, 281:15090-15098.
126. Popov Y, Sverdlov DY, Sharma AK, Bhaskar KR, Li S, Freitag TL, Lee J, Dieterich W, Melino G, Schuppan D. (2011) Tissue transglutaminase does not

- affect fibrotic matrix stability or regression of fibrosis in mice. *Gastroenterology*, 140:1642-1652.
127. Popper H, Kent G, Stein R. (1957) Ductular cell reaction in the liver in hepatic injury. *J Mt Sinai Hosp Ny*, 24:551-556.
  128. Prakoso E, Tirnitz-Parker JE, Clouston AD, Kayali Z, Lee A, Gan EK, Ramm GA, Kench JG, Bowen DG, Olynyk JK, McCaughan GW, Shackel NA. (2014) Analysis of the intrahepatic ductular reaction and progenitor cell responses in hepatitis C virus recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl*, 20:1508-1519.
  129. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. (1973) Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg*, 60:646-649.
  130. Qu K, Huang Z, Lin T, Liu S, Chang H, Yan Z, Zhang H, Liu C. (2016) New insight into the anti-liver fibrosis effect of multitargeted tyrosine kinase inhibitors: from molecular target to clinical trials. *Front Pharmacol*, 6:300.
  131. Quaglia A, Portmann BC, Knisely AS, Srinivasan P, Muiesan P, Wendon J, Heneghan MA, O'Grady JG, Samyn M, Hadzic D, Dhawan A, Milei-Vergani G, Heaton N, Rela M. (2008) Auxiliary transplantation for acute liver failure: Histopathological study of native liver regeneration. *Liver Transpl*, 14:1437-1448.
  132. Quinn PS, Higginson J. (1965) Reversible and irreversible changes in experimental cirrhosis. *Am J Pathol*, 47:353-369.
  133. Richardson MM, Jonsson JR, Powell EE, Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA, Bhathal PS, Dixon JB, Weltman MD, Tilg H, Moschen AR, Purdie DM, Demetris AJ, Clouston AD. (2007) Progressive fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: association with altered regeneration and a ductular reaction. *Gastroenterology*, 133:80-90.
  134. Riehle KJ, Dan YY, Cambell JS, Fausto N. (2011) New concepts in liver regeneration. *Gastroenterol Hepatol*, 26 (Suppl 1):203-212.
  135. Rodrigo-Torres D, Affò S, Coll M, Morales-Ibanez O, Millán C, Blaya D, Alvarez-Guaita A, Rentero C, Lozano JJ, Maestro MA, Solar M, Arroyo V, Caballería J, van Grunsven LA, Enrich C, Ginès P, Bataller R, Sancho-Bru P.

- (2014) The biliary epithelium gives rise to liver progenitor cells. *Hepatology*, 60:1367-1377.
136. Rókusz A, Bugyik E, Szabó V, Szücs A, Paku S, Nagy P, Dezső K. (2016) Imatinib accelerates progenitor cell-mediated liver regeneration in choline-deficient ethionine-supplemented diet-fed mice. *Int J Exp Pathol* 97:389-396.
137. Rosselli M, MacNaughtan J, Jalan R, Pinzani M. (2013) Beyond scoring: a modern interpretation of disease progression in chronic liver disease. *Gut*, 62:1234-1241.
138. Roskams T, Yang SQ, Koteish A, Durnez A, DeVos R, Huang X, Achten R, Verslype C, Diehl AM. (2003) Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Pathol*, 163:1301-1311.
139. 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, Hytiroglu P, Knisely AS, Kojiro M, Lefkowitz 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*, 39:1739-1745.
140. Salguero PR, Roderfeld M, Hemmann S, Rath T, Atanasova S, Tschuschner A, Gressner OA, Weiskirchen R, Graf J, Roeb E. (2008) Activation of hepatic stellate cells is associated with cytokine expression in thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. *Lab Invest*, 88:1192–1203.
141. Sánchez A, Factor VM, Schroeder IS, Nagy P, Thorgeirsson SS. (2004) Activation of NF-kappaB and STAT3 in rat oval cells during 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy induced liver regeneration. *Hepatology*, 39:376-385.
142. Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgeirsson SS. (1995) Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Nat Acad Sci USA*, 92:2572-2576.



143. Sandrin L, Forquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, Christidis C, Ziol M, Poulet B, Kazemi F, Beaugrand M, Palau R. (2003) Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol*, 29:1705-13.
144. Santoni-Rugiu E, Jelnes P, Thorgeirsson SS, Bisgaard HC. (2005) Progenitor cells in liver regeneration: molecular responses controlling their activation and expansion. *APMIS*, 113:876-902.
145. Schaub JR, Malato Y, Gormond C, Willenbring H. (2014) Evidence against a stem cell origin of new hepatocytes in a common mouse model of chronic liver injury. *Cell Rep*, 8:933-939.
146. Scheuer PJ. (1991) Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol*, 13:372-374.
147. Schnur J, Oláh J, Szepesi Á, Nagy P, Thorgeirsson SS. (2004) Thioacetamide-induced hepatic fibrosis in transforming growth factor beta-1 transgenic mice. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 16:127-133.
148. Scholten D, Osterreicher CH, Scholten A, Iwaisako K, Gu G, Brenner DA, Kisseleva T. (2010) Genetic labeling does not detect epithelial-to-mesenchymal transition of cholangiocytes in liver fibrosis in mice. *Gastroenterology*, 139:987-998.
149. Schuppan D, Afdhal NH. (2008) Liver cirrhosis. *Lancet*, 371:838-851.
150. Schuppan D, Pinzani M. (2012) Anti-fibrotic therapy: Lost in translation? *J Hepatol*, 56:S66-74.
151. Sekiya S, Suzuki A. (2014) Hepatocytes, rather than cholangiocytes, can be the major source of primitive ductules in the chronically injured mouse liver. *Am J Pathol*, 184:1468-1478.
152. Serfaty L. (2016) Follow-up of patients with chronic hepatitis C and a sustained viral response. *Liver Int*, 36 (Suppl 1):67-71.
153. Sethasine S, Jain D, Groszmann RJ, Garcia-Tsao G. (2012) Quantitative histological-hemodynamic correlations in cirrhosis. *Hepatology*, 55:1146-1153.

154. Shaker ME, Salem HA, Shiha GE, Ibrahim TM. (2011) Nilotinib counteracts thioacetamide-induced hepatic oxidative stress and attenuates liver fibrosis progression. *Fundam Clin Pharmacol*, 25:248-257.
155. Shin S, Upadhyay N, Greenbaum LE, Kaestner KH. (2015) Ablation of Foxl1-Cre-labeled hepatic progenitor cells and their descendants impairs recovery of mice from liver injury. *Gastroenterology*, 148:192-202.
156. Smith PG, Tanaka H, Chantry A. (2012) A novel co-operative mechanism linking TGF $\beta$  and Lyn kinase activation to imatinib resistance in chronic myeloid leukaemia cells. *Oncotarget*, 3:518-24.
157. Smith GP. (2013) Animal models of fibrosis in human disease. In: Conn MP (ed.): *Animal models for the study of human disease*. Elsevier, China, 435-458.
158. Standish RA, Cholongitas E, Dhillon A, Burroughs AK, Dhillon AP. (2006) An appraisal of the histopathological assessment of liver fibrosis. *Gut*, 55:569-578.
159. Starkel P, Leclercq IA. (2011) Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 25:319-333.
160. Stueck AE, Wanless IR. (2015) Hepatocyte buds derived from progenitor cells repopulate regions of parenchymal extinction in human cirrhosis. *Hepatology*, 61:1696-1707.
161. Svegliati-Baroni G, Faraci G, Fabris L, Saccomanno S, Cadamuro M, Pierantonelli I, Trozzi L, Bugianesi E, Guido M, Strazzabosco M, Benedetti A, Marchesini G. (2011) Insulin resistance and necroinflammation drives ductular reaction and epithelial-mesenchymal transition in chronic hepatitis C. *Gut*, 60:108-115.
162. Szendrői M, Vajta G, Kovács L, Schaff Z, Lapis K. (1984) Polarization colours of collagen fibers: a sign of collagen production activity in fibrotic processes. *Acta Morphol Hung*, 32:47-55.
163. Takemura T, Yoshida Y, Kiso S, Kizu T, Furuta K, Ezaki H, Hamano M, Egawa M, Chatani N, Kamada Y, Imai Y, Higashiyama S, Iwamoto R, Mekada E, Takehara T. (2013) Conditional loss of heparin-binding EGF-like growth factor results in enhanced liver fibrosis after bile duct ligation in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 437:185-191.

164. Tapper EB, Castera L, Afdhal NH. (2015) FibroScan (vibration-controlled transient elastography): where does it stand in the United States practice. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 13:27-36.
165. Tarlow BD, Finegold MJ, Grompe M. (2014a) Clonal tracing of Sox9+ liver progenitors in mouse oval cell injury. *Hepatology*, 60:278-289.
166. Tarlow BD, Pelz C, Naugler WE, Wakefield L, Wilson EM, Finegold MJ, Grompe M. (2014b) Bipotential adult liver progenitors are derived from chronically injured mature hepatocytes. *Cell Stem Cell*, 15:605-618.
167. Tetamatsu M, Ho RH, Tohru K, Ekem JK, Farber E. (1984) Studies on the proliferation and fate of oval cells in the liver of rats treated with 2-acetylaminofluorene and partial hepatectomy. *Am J Pathol*, 114:418-430.
168. Thorgeirsson SS, Grisham JW. (2006) Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence. *Hepatology*, 43:2-8.
169. Thuluvath PJ, Krok KL. (2005) Noninvasive markers of fibrosis for longitudinal assessment of fibrosis in chronic liver disease: are they ready for prime time? *Am J Gastroenterol*, 100:1981-1983.
170. Tipping AJ, Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. (2003) Comparative gene expression profile of chronic myeloid leukemia cells innately resistant to imatinib mesylate. *Exp Hematol*, 31:1073-1080.
171. Trautwein C, Will M, Kubicka S, Rakemann T, Flemming P, Manns MP. (1999) 2-acetaminofluorene blocks cell cycle progression after hepatectomy by p21 induction and lack of cyclin E expression. *Oncogene*, 18:6443-6453.
172. Trautwein C, Friedman SL, Schuppan D, Pinzani M (2015) Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *J Hepatol*, 62:S15-S24.
173. Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. (2006) Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta*, 364:33-60.
174. Turányi E, Dezső K, Csomor J, Schaff Zs, Paku S, Nagy P. (2010) Immunohistochemical classification of ductular reactions in human liver. *Histopathology*, 57:607-614.
175. Van Hul NK, Abarca-Quinones J, Sempoux C, Horsmans Y, Leclercq IA. (2009) Relation between liver progenitor cell expansion and extracellular

- matrix deposition in a CDE-induced murine model of chronic liver injury. *Hepatology*, 49:1625-1635.
176. Verhulst S, Best J, van Grunsven LA, Dollé L. (2015) Advances in hepatic stem/progenitor cell biology. *EXCLI J*, 14:33-47.
  177. Viola A, Jain D, Garcia-Tsao G. (2009) Quantitative histological assessment in cirrhosis: septal thickness predicts clinical decompensation. *J Hepatol*, 50:S94.
  178. Wang S, Wilkes MC, Leof EB, Hirschberg R. (2005) Imatinib mesylate blocks a non-Smad TGF-beta pathway and reduces renal fibrogenesis in vivo. *FASEB J*, 19:1-11.
  179. Wang Y, Gao J, Zhang D, Zhang J, Ma J, Jiang H. (2010) New insights into the antifibrotic effects of sorafenib on hepatic stellate cells and liver fibrosis. *J Hepatol*, 53:132-144.
  180. Wang W, Yan J, Wang H, Shi M, Zhang M, Yang W, Peng C, Li H. (2014) Rapamycin ameliorates inflammation and fibrosis in the early phase of cirrhotic portal hypertension in rats through inhibition of mTORC1 but not mTORC2. *PLoS One*, 9:e83908.
  181. Wanless IR, Wong F, Blendis LM, Greig P, Heathcote EJ, Levy G. (1995) Hepatic and portal vein thrombosis in cirrhosis: possible role in development of parenchymal extinction and portal hypertension. *Hepatology*, 21:1238-1247.
  182. Wanless IR, Nakashima E, Sherman M. (2000) Regression of human cirrhosis. Morphological features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. *Arch Pathol Lab Med*, 124:1599-1607.
  183. Williams MJ, Clouston AD, Forbes SJ. (2014) Links between hepatic fibrosis, ductular reaction, and progenitor cell expansion. *Gastroenterology*, 146:349-356.
  184. Wong L, Yamasaki G, Johnson RJ, Friedman SL. (1994) Induction of beta-platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture. *J Clin Invest*, 94:1563-1569.
  185. Wood MJ, Gadd VL, Powell WL, Ramm GA, AD. (2014) Ductular reaction in hereditary hemochromatosis: the link between hepatocyte senescence and fibrosis progression. *Hepatology*, 59:848-857.

186. Wu J, Norton PA. (1996) Animal models of liver fibrosis. *Scand J Gastroenterol*, 31:1137-1143.
187. Yang L, Jung Y, Omenetti A, Witek RP, Choi S, Vandongen HM, Huang J, Alpini GD, Diehl AM. (2008) Fate-mapping evidence that hepatic stellate cells are epithelial progenitors in adult mouse livers. *Stem Cells*, 26:2104-2113.
188. Yanger K, Zong Y, Maggs LR, Shapira SN, Maddipati R, Aiello NM, Thung SN, Wells RG, Greenbaum LE, Stanger BZ. (2013) Robust cellular reprogramming occurs spontaneously during liver regeneration. *Genes Dev*, 27:719-724.
189. Yanger K, Knigin D, Zong Y, Maggs L, Gu G, Akiyama H, Pikarsky E, Stanger BZ. (2014) Adult hepatocytes are generated by self-duplication rather than stem cell differentiation. *Cell Stem Cell*, 15:340-349.
190. Yao Z, Fenoglio S, Gao DC, Camiolo M, Stiles B, Lindsted T, Schleder M, Johns C, Altorki N, Mittal V, Kenner L, Sordella R. (2010) TGF-beta IL-6 axis mediates selective and adaptive mechanisms of resistance to molecular targeted therapy in lung cancer. *Proc Nat Acad Sci USA*, 107:15535-15540.
191. Yoshiji H, Noguchi R, Kuriyama S, Ikenaka Y, Yoshii J, Yanase K, Namisaki T, Kitade M, Masaki T, Fukui H. (2005) Imatinib mesylate (STI-571) attenuates liver fibrosis development in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 288:G907-913.
192. Yoshiji H, Kuriyama S, Noguchi R, Ikenaka Y, Yoshii J, Yanase K, Namisaki T, Kitade M, Yamazaki M, Asada K, Akahane T, Tsujimoto T, Uemura M, Fukui H. (2006) Amelioration of liver fibrogenesis by dual inhibition of PDGF and TGF-beta with a combination of imatinib mesylate and ACE inhibitor in rats. *Int J Mol Med*, 17:899-904.
193. Ziol M, Handra-Luca A, Kettaneh A, Christidis C, Mal F, Kazemi F, de Lédinghen V, Marcellin P, Dhumeaux D, Trinchet JC, Beaugrand M. (2005) Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 41:48-54.

X. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

1. **Rókus A**, Nagy E, Gerlei Zs, Veres D, Dezső K, Paku S, Szücs A, Hajósi-Kalcakosz Sz, Pávai Z, Görög D, Kóbori L, Fehérvari I, Nemes B, Nagy P. (2016) Quantitative morphometric and immunohistochemical analysis and their correlates in cirrhosis - A study on explant livers. *Scand J Gastroenterol* 51:86-94. IF: 2,526

2. **Rókus A**, Bugyik E, Szabó V, Szücs A, Paku S, Nagy P, Dezső K. (2016) Imatinib accelerates progenitor cell-mediated liver regeneration in choline-deficient ethionine-supplemented diet-fed mice. *Int J Exp Pathol* 97:389-396. IF: 1,780

3. Dezső K, **Rókus A**, Bugyik E, Szücs A, Szuák A, Dorogi B, Kiss M, Nemeskéri Á, Nagy P, Paku S. (2017) Human liver regeneration in advanced cirrhosis is organized by the portal tree. *J Hepatol*, 67:430-436. IF: 15,040

4. **Rókus A**, Veres D, Szücs A, Bugyik E, Mózes M, Paku S, Nagy P, Dezső K (2017) Ductular reaction correlates with fibrogenesis but does not contribute to liver regeneration in experimental liver fibrosis models. *PLoS One*, 12:e0176518. IF: 2,766

Egyéb témában megjelent közlemények:

1. Papp V, **Rókus A**, Dezső K, Bugyik E, Szabó V, Pávai Z, Paku S, Nagy P. (2014) Expansion of Hepatic Stem Cell Compartment Boosts Liver Regeneration. *Stem Cells Dev*23:56-65. IF: 3,727

2. Hajósi-Kalcakosz Sz, Vincze E, Dezső K, Paku S, **Rókus A**, Sági Z, Tóth E, Nagy P. (2015) EZH2 is a sensitive marker of malignancy in salivary gland tumors. *Diagn Pathol* 10:163. IF: 1,895

3. Bugyik E, Rényi-Vamos F, Szabó V, Dezső K, Ecker N, **Rókus** A, Nagy P, Döme B, Paku S. (2016) Mechanisms of vascularization in murine models of primary and metastatic tumor growth. *Chin J Canc* 35:19. IF: 4,111
4. Bugyik E, Szabó V, Dezső K, **Rókus** A, Szücs A, Nagy P, Tóvári J, László V, Döme B, Paku S. (2018) Role of (myo)fibroblasts in the development of vascular and connective tissue structure of the C38 colorectal cancer in mice. *Cancer Commun (Lond)*, 38:46. IF: -

## XI. Köszönetnyilvánítás

Abban a szerencsés helyzetben lehettem, hogy három olyan ember egyengette utamat a tudományos, majd a patológiai munkában, akire példaképként tekinthetek. Köszönöm Dr. Dezső Katalinnak, Dr. Paku Sándornak és Dr. Nagy Péternek a mérhetetlen mennyiségű segítséget, köszönöm, hogy mindenben számíthattam rájuk, és nem utolsósorban köszönöm a gyakorlatilag végtelen türelmet is.

Köszönöm Dr. Matolesy András Professzor Úrnak, hogy az Intézetben végezhettem TDK- és PhD-munkámat, majd rezidensként is számított rám.

Köszönöm Dr. Kovalszky Ilona Professzor Asszonynak, a Patológiai Tudományok Doktori Iskola korábbi vezetőjének PhD-tanulmányaimban nyújtott segítségét.

Köszönöm házi opponensemnek, Dr. Zalatnai Attila Docens Úrnak értekezésem alapos, körültekintő bírálatát.

Köszönöm Sztodola Andrásnak és Borza Mónikának az állatkísérletek kivitelezését. Köszönöm Kaminszky Zsuzsának a technikai segítséget.

Köszönöm Dr. Bugyik Edinának, Dr. Szabó Vanesszának és Dr. Szücs Armandának a laborban együtt töltött években a társaságot, segítséget.

Köszönöm az intézeti kollégáimnak, Dr. Scheich Bálintnak, Dr. Regős Eszternek, Dr. Sági Zoltánnak, Dr. Arató Gabriellának és Dr. Hajdu Melindának, hogy támogattak, mind emberileg, mind szakmailag.

Végül köszönettel tartozom családomnak, nélkülük – főként édesapám lelkes támogatása nélkül – ez a munka nem készülhetett volna el.