

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

I. Bevezetés.....	3
I.1. A májban kórosan képződött kötőszövet jellemzése.....	3
I.2. Duktuláris reakció állatkísérletes modellekben és humán májban.....	4
I.3. A cirrózis tanulmányozására használt állatmodellek	5
I.4. Célzott terápiás szerek alkalmazása cirrotikus állatmodelleken	6
I.5. A cirrózis regressziója	7
II. Célkitűzés.....	8
III. Módszerek	9
III.1. Humán minták	9
III.2. Állatkísérletek.....	9
III.3. Szövettani feldolgozás, morfometriai vizsgálatok.....	11
III.4. Statisztikai módszerek	12
IV. Eredmények.....	14
IV.1. Korrelációs vizsgálatok a cirrotikus májak morfometriai paramétereit és a betegek klinikai adatai között	14
IV.2. Állatkísérletes vizsgálatok eredményei	15
IV.2.1. Kontroll cirrotikus modellek	15
IV.2.2. Imatinib és erlotinib kezelés hatása a TAA-indukált cirrózis kialakulására	16
IV.2.3. Imatinib és erlotinib kezelés hatása a már kialakult TAA-indukált cirrózisra (terápiás modellek)	16
IV.2.4. A cirrotikus modellekben mért paraméterek korrelációs analízise	17
V. Következtetések.....	18
VI. Saját publikációk jegyzéke.....	19

I. Bevezetés

A májcirrózis különböző krónikus májkárosodással járó betegségek által okozott diffúz folyamat, melyre a klasszikus WHO-definíció szerint fokozott kötőszövet-felhalmozódás (fibrózis) és a normális májszerkezet állebenyítés, göbös átépülése jellemző. Leggyakoribb kiváltó okai az alkoholos májbetegség (ALD), 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.

I.1. A májban kórosan képződött kötőszövet jellemzése

Szövetteni metszeteken a cirrotikus máj májsejtekből álló állebenyítékből, valamint az ezeket teljesen körbezáró kötőszövetes szeptumokból épül fel, a szeptumok állományában epeutakkal, gyulladásozó sejtekkel, érképletekkel.

A fokozott mértékű hegszövet képződés, fibrózis a cirrotikus máj mikro- és makroszkóposan is legjellegzetesebb elváltozása. A parenhima folytonosságát megszakító kötőszövetes nyalábokat szeptumoknak nevezzük. A májfibrózisnak a kötőszövet lerakódásának lokalizációja szerint több megjelenési formája létezik. A fibrózis térbeli lokalizációja szerint beszélhetünk periszinuszoidális, periportális vagy pericentrális fibrózisról. A kialakult cirrotikus májra jellemző az ún. áthidaló, „bridging” fibrózis, ilyenkor a kötőszövet két vaszkuláris képletet köt össze (portoportális, porto-centrális szeptumok). A fibrózis egy különleges formája a parenhima kipusztulás (parenchymal extinction), amely során a kipusztult májparenhimát egy nagy, egybefüggő területen helyettesíti kötőszövet. A cirrózist kiváltó októl függően jelentős különbségek lehetnek a kötőszövet-lerakódás morfológiájában.

A cirrotikus máj patológiai értékelése során különböző szemikvantitatív score-rendszereket (pl. Scheuer-, Ishak-, Batts-Ludwig-, METAVIR-score) használnak, amelyekkel megadható a nekroinflammatorikus aktivitás (grade) és a fibrózis mértéke (stage). A legmagasabb stage mindegyik rendszerben a cirrotikus májat jelöli. A score-rendszerek egyik legfontosabb problémája a patológus által adott pontszám jelentős mértékű inter- és intraobszerver variabilitása. 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.

A szemikvantitatív pontrendszeren 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. Ennek során a kötőszövet 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 eredményei alapján a digitális analízissel meghatározott CPA értékek jól korrelálnak a különböző score-rendszerekkel meghatározott fibrózis stádiumokkal.

I.2. Duktuláris reakció állatkísérletes modellekben és humán májban

Szövettani metszeten a fokozott kötőszövet felhalmozódás mellett a cirrotikus máj másik legszembeötlőbb eltérése az epeúthoz hasonló képletek megjelenése a kötőszövetes szeptumokban, amelyeket gyűjtőnéven duktuláris reakciónak nevezünk. A duktuláris reakció sejtjei között mai tudásunk alapján ősz-/progenitor sejt tulajdonságú sejtek is előfordulnak, így feltételezhető, a duktuláris reakció regeneratív szerepe. 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.

A máj kitűnő regenerációs képességgel rendelkezik. Ha a patkány vagy egér máj 2/3-át sebészi úton eltávolítják a májtömeg az érett májsejtek osztódása révén 5-7 nap alatt helyreáll mindkét fajban. Azonban ha a májsejtek osztódási aktivitása károsodott vagy gátolt, úgy különböző májkárosító hatásokra a máj progenitor sejtjei aktiválódnak.

A legelfogadottabb elképzelés szerint a progenitor sejtek a Hering-csatornákban elhelyezkedő őssejtekből származnak.

A progenitor sejtek részvételével lezajló májregeneráció klasszikus kísérleti modellje patkányon a 2-acetilaminofluorén kezelés és sebészi parciális hepatektómia (PH) kombinációja (AAF/PH). Ebben a modellben bizonyított, hogy az őssejt-mediált regeneráció epeút eredetű progenitor sejtek részvételével zajlik le.

Napjainkra a máj őssejt-kutatás súlypontja egér kísérletekre tevődött át, így az AAF/PH-tól eltérő kísérleti rendszereket alkalmaznak a progenitor sejtek vizsgálatára. A patkány májjal ellentétben az egér májban vitatott, hogy honnan származnak a progenitor sejtek, ill. hogy egyáltalán bírnak-e regeneratív funkcióval.

Az állatkísérletes modellekhez 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. 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 duktuláris reakciónak a cirrotikus májokban is lehet regeneratív szerepe. 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 szeneszencs állapotba került, vagyis képtelen az osztódásra.

I.3. A cirrózis tanulmányozására használt állatmodellek

A májcirrózis állatkísérletes tanulmányozására leggyakrabban széntetraklorid (CCl_4) vagy tioacetamid (TAA) kezelést alkalmaznak.

A CCl_4 az egyik legszélesebb körben és legrégebb óta használt anyag a máj kutatásban. A CCl_4 -et a citokróm p450 2E1 (CYP2E1) enzim metabolizálja, amelyet a pericentrális és midzonális hepatociták fejeznek ki. Ennek során triklórmetil ($\text{CCl}_3\cdot$) gyök keletkezik, ami centrilobuláris nekrozist okoz. 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 CCl₄-el kombinálva állatkísérletekben.

A TAA metabolizmusa során a flavin tartalmú monooxigenáz és a citokróm p450 enzimek tioacetamid-S-oxidot képeznek, a reakció során képződő szabadgyökök okozzák a sejtkárosító hatást. Ismételten intraperitoneálisan adagolva vagy ivóvizben oldva alkalmazzák cirrózis kiváltására. A májban akutan centrilobuláris nekrozist okoz, de emellett a periportális hepatocitákat is károsítja.

I.4. Célzott terápiás szerek alkalmazása cirrotikus állatmodelleken

Mivel a fibrogenézisben, ill. a duktuláris reakció kialakulásában szerepet játszó receptorok egy része a receptor tirozin kinázok családjába tartozik, (pl. EGFR, PDGFR, c-met), így nem meglepő, hogy számos tirozin kináz gátló hatását vizsgálták meg a májfibrózis és májregeneráció különféle állatmodelleiben.

Az elsőként kifejlesztett és a klinikai gyakorlatban elterjedt tirozin kináz gátló a c-kit és PDGFR gátló imatinib (Glivec) volt. Főként a PDGFR fibrogenézisben betöltött központi szerepe indokolja, hogy állatkísérletes modellekben számos szervben vizsgálták az imatinib kötőszövet felhalmozódásra gyakorolt hatását. Tüdőben, szívben, vesében, bőrben is leírták antifibrotikus hatását, de a legtöbb erről beszámoló tanulmány a májat vizsgálta, ahol számos különböző kísérleti modellben is hatékony fibrózist gátló szernek bizonyult.

Az EGFR-gátló erlotinibet is sikeresen alkalmazták különböző állatkísérletes modellekben a kötőszövet felhalmozódás gátlásának céljából.

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.5. A cirrózis regressziója

A cirrózist egészen a közelmúltig különböző etiológiájú krónikus májbetegségek közös, irreverzibilis végállapotának tekintették, azonban napjainkra már reális alternatíva lehet a betegség regressziójának elérése, és ennek köszönhetően a cirrózis szemlélete átalakulóban van. Az etiológiától függetlenül egységes, egyféle kimenetelű állapot helyett azonban ma már nagyon is heterogén, dinamikusan változó betegségnek tekintik, amelyben bizonyos etiológiák (vírushepatitiszek, ALD) esetén a kiváltó hatás megszüntetését követően lehetséges a regresszió. 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. Napjainkra szükségessé vált a cirrózis osztályozása 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. Ezzel párhuzamosan felértékelődött az etiológiai tényezők szerepe, így olyan paraméterek is nagy jelentőséggel bírhatnak, melyek különböznek egyes etiológiájú cirrotikus betegekben.

II. Célkitűzés

- 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 cm² 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 ascitesz vagy enkefalopátia.

III.2. Állatkísérletek

Egér 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 Állatkísérleti Bizottságának irányelveit.

Tíz kísérleti csoportot alakítottunk ki:

Kontroll modellek:

I. Vad típusú, C57Bl/6 egereket széntetraklorid (CCl₄) (0,2 ml/kg napraforgóolajban oldva, gyomorszondán át heti 2x) és fenobarbitál (PhB) (0,5 g/l, ivóvízben oldva) kombinációjával kezeltünk (I. VT+CCl₄, 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.

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.

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.

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

III.3. Szövettani feldolgozás, morfometriai vizsgálatok

A humán májából és az egér májak egy részéből rutin szövettani feldolgozás során formalin-fixált, paraffinba ágyazott blokkok készültek. Az egér májak más részeit folyékony nitrogénben lehűtött izopentánban lefagyasztottuk, és -80°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. A humán májából az immunhisztokémiai festések egy Leica Bond immunfestő automata

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

A kötőszövet által elfoglalt terület nagyságát a humán és egér mintákon egyaránt pikroszíriusz vörössel festett, paraffinba ágyazott blokkokból készült metszeteken elemeztük. Mind a humán, mind az egér minták esetén digitális módon határoztuk meg a kötőszövet által elfoglalt terület arányát. A humán metszeteken ezen kívül lemértük a három legvastagabb szeptum vastagságát is, és három mérés átlaga adta meg az egy mintára jellemző szeptumvastagság értéket.

A humán mintákon az aktivált miofibroblasztok, valamint a duktuláris reakció által elfoglalt területet SMA (kat. szám: M0851; Dako), illetve CK7 (kat. szám: MU-255-UC; Biogenex) elleni antitesttel jelölt paraffinos metszeten mértük le. Az egér májakon a duktuláris reakció által elfoglalt terület meghatározása céljából fagyasztott metszeten végeztünk CK19 (kat. szám: TROMA-III; Developmental Studies Hybridoma Bank) elleni immunfluoreszcens jelölést.

A hepatociták, és a duktuláris reakció proliferációs aktivitásának jellemzése céljából a humán metszeteken Ki-67 immunhisztokémiai reakció (kat. szám: M7240; Dako) elvégzését követően 5000 májsejtet és 500 duktuláris sejtet számoltunk le. Ugyanebből a célból az egerek BrdU kezelésben részesültek. Paraffinos metszeteken BrdU ellenes immunhisztokémiai reakció (kat. szám: 347580; BD Pharmingen) elvégzése után 2500 májsejtet és 500 duktuláris sejtet számoltunk le.

III.4. 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 paraméterei és a betegek klinikai adatai között

A cirrotikus májakból vett mintákban mind a HE-, mind a pikroszíriusz festéssel lekerekedett kötőszövetes szeptomokkal 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 hámszejteit.

A kötőszövet által elfoglalt terület nagysága (pikroszíriusz) szignifikáns korrelációt mutatott az aktivált miofibroblasztok által elfoglalt területtel (SMA), a szeptumvastagsággal, valamint az ALP értékkel is. Az SMA értéke szignifikánsan összefüggött a szeptumvastagsággal és a duktuláris reakció által elfoglalt területtel (CK7). A CK7 ezen kívül az AST értékkel is szignifikánsan korrelált. 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. A májsejtek és duktuláris sejtek proliferációs aktivitása (dukt. prol.) is korrelált, azonban a várttal ellentétben pozitív összefüggést találtunk a két paraméter között. A cirrózis különböző szövődményeinek (aszцитез, nyelvőcső varikozitás, varixvérzés, hepatikus enkefalopátia) megjelenése és a szövettani paraméterek között nem találtunk szignifikáns összefüggést.

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. Emellett a HCV/HBV etiológiájú betegek hemoglobin szintje szignifikánsan magasabb, míg MELD pontszáma szignifikánsan alacsonyabb volt.

IV.2. Állatkísérletes vizsgálatok eredményei

IV.2.1. Kontroll cirrotikus modellek

Mind a CCl₄, mind a TAA kezelt egerek májában teljesen körbezárt állebenyek alakultak ki a kísérlet végére, azonban a károsító hatástól függően a kötőszövet-felhalmozódás dinamikája eltérő volt. A VT+TAA csoportban a fibrogenézis eleinte csekély mértékű volt, majd hirtelen indult növekedésnek, míg a CCl₄ kezelés már a kísérlet kezdetén is jelentős mértékű kötőszövet-felhalmozódást okozott. A VT+CCl₄ 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+CCl₄ csoportban szignifikánsan nagyobb mértékű fibrózist mértünk a VT+TAA csoporthoz képest. A 9. hétre a VT+TAA csoport beírta a CCl₄ 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.

Érdekes módon a duktuláris reakció által elfoglalt terület nagysága a 3. héten azonos volt a VT+CCl₄ és a VT+TAA csoportokban, az eltérő mértékű fibrózis ellenére. Ezután viszont 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 TGFβ transzgen egerekben emelkedett mértékű duktuláris reakciót váltott ki a vad típusú állatokhoz képest.

A májsejtek és a duktuláris reakció osztódási aktivitására is különböző hatást fejtett ki a két fibrogén vegyület. A CCl₄ 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. Az emelkedett TGFβ expresszió nem volt jelentős hatással az osztódási aktivitásra a TAA kezelt állatokban.

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. 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. 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. A transzgén egerekben egyik gyógyszer sem volt képes átmenetileg sem gátolni sem a kötőszövet-lerakódás, sem a duktuláris reakció progresszióját.

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, míg az erlotinib-kezelt csoportban a májsejtek osztódása volt szignifikánsan alacsonyabb a kontroll TAA-csoporthoz képest. A TGF β transzgén egereken egyik szer sem volt képes szignifikánsan befolyásolni az osztódási aktivitást.

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 kezeléseket során egyik gyógyszer sem volt képes megállítani a fibrózis és a duktuláris reakció progresszióját. Az erlotinib kezelés hatására az általunk vizsgált paraméterekben 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. Ez a hatás átmenetinek bizonyult, a további időpontokban szignifikáns eltérés egyik paraméterben sem volt megfigyelhető.

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 kötőszövet és a duktuláris reakció által elfoglalt terület aránya szoros, szignifikáns korrelációt mutatott mindegyik kísérleti csoportban. A fibrózis mértéke és a májsejtek osztódási aktivitása két modellben szignifikánsan függött össze (VT+CCl₄, VT+TA+erlotinib), mindkét esetben pozitív módon. Ugyanebben a két modellben a duktuláris reakció kiterjedtsége is szignifikáns, pozitív módon korrelált a hepatociták osztódásával. Ezzel szemben a fibrózis és a duktuláris reakció osztódási aktivitása három modellben is szignifikáns, negatív korrelációt mutatott (VT+TAA, TGFβ+TAA, TGFβ+TAA+imatinib) az egy modellben megfigyelt szignifikáns, pozitív korreláció mellett (VT+TAA+imatinib). A duktuláris reakció kiterjedtsége és osztódási aktivitása között két csoportban állt főt szignifikáns korreláció, egy esetben pozitív (VT+TAA+imatinib) egy esetben pedig negatív (TGFβ+TAA). 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.

V. 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 β transzgen egerekben.

VI. 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: -