

# A duktuláris reakciók vizsgálata állatkísérleti modellekben

Doktori tézisek

dr. Szücs Armanda

Semmelweis Egyetem

Patológiai Tudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Patonai Attila, Ph.D., klinikai szakorvos  
Dr. Horváth Gábor, Ph.D., centrumvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Lengyel Gabriella, Ph.D.  
med. habil., egyetemi docens

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Simon Károly, Ph.D.  
főorvos  
Dr. Szász Attila Marcell, Ph.D.  
tudományos munkatárs

Budapest  
2021

**Bevezetés**

## **A májregeneráció jellemzése**

A máj hatékony regenerációs mechanizmusokkal rendelkezik. A májsejtek vagy hepatocyták felnőtt állatokban a hosszú élettartamú, nagyon ritkán osztódó, hagyományos felosztás szerint ún. „stabil” sejtek közé tartoznak, de májkárosodás után gyorsan képesek belépni a sejtciklusba és a regenerációban részt venni. Rágcsálókban a leggyakrabban alkalmazott kísérleti modellben a máj 2/3-ának eltávolítását (ún. parciális hepatektómiát) követően 7-8 nap alatt helyreáll az eredeti tömeg, de az állatok akár 90%-os hepatektómiát is képesek túlélni. Ami viszont teljesen egyedi képessége a májszövetnek, hogy ha a hepatocyták is súlyosan károsodnak és nem képesek hatékony regenerációra, akkor aktiválódik egy „tartalék” sejt kompartment, mely lassabban, kevésbé hatékonyan, de többnyire képes a májtömeg pótlására. Kísérleteinkben ezt a „tartalék” regenerációs mechanizmust vizsgáltuk.

## **A duktuláris reakció májszövetben**

A duktuláris reakciót alkotó duktulusok nevüknek megfelelően vékony, szűk, gyakran csak virtuális lumennel rendelkező, többnyire kanyargós lefutású képletek, melyek a májszövet meglévő epeút rendszerét kötik össze a hepatocytákból felépülő parenchymával. Ez a fajta elrendeződés nem mindig nyilvánvaló, és hagyományos fénymikroszkópos metszeteken nehezen tanulmányozható, így az ovális sejtek duktuláris elrendeződését hosszú ideig nem ismerték fel.

Az epeút hálózattal összefüggő luminális kapcsolatukat bizonyítja, hogy retrográd módon feltölthetőek a choledochuson és intrahepaticus epeutakon keresztül. Ez a kapcsolat és az epeutakhoz hasonló szerkezeti elrendeződés egyaránt az epeutakkal való szerves kapcsolatukra utal.

## **A Hering csatornák jellemzése**

A duktuláris reakciót alkotó duktulusok tulajdonképpen az epeutak terminális, speciális szakaszának a Hering csatornáknak a meghosszabbításai. A Hering csatornák sajátos képződmények, melyek összeköttetést biztosítanak a máj parenchyma epe canaliculusai és a portális tractusokban található „elvezető” epeutak között. Az epeutakhoz hasonlóan bazális membránnal vannak körülvéve, de citoplazmájuk ultrastrukturális vizsgálata már hepatocytá szerű elemeket is feltárt. Elhelyezkedésük a májszövet hierarchiájában és fenotípusuk egyaránt predestinálja őket arra a feladatra, hogy epeutakat érintő károsodás esetén cholangiocytá, míg parenchyma károsodást követően hepatocytá irányába tudjanak differenciálódni. Számos, humán májakon tett és kísérleti megfigyelés támasztja alá ezt a szerepüket, mindezen eredmények alapján ma általánosan elfogadott nézet, hogy a Hering csatornákat alkotó sejtek képesek a májszövet szomatikus őssejteiként viselkedni. A duktuláris reakció vagy az azt alkotó ovális sejtek pedig a regenerációs hierarchiában az őssejtek amplifikációs kompartmentjének felelnek meg.

### **Az ovális sejtek aktivációja, differenciálódása**

A duktuláris/ovális sejtek hepatocytákká történő differenciálódásának előidézésében fontos szerepe van a HNF-4 transzkripciós faktornak; megjelenése a magokban funkcionális jelentősége mellett gyakran alkalmazott markere is a differenciálódó sejtek felismerésének. A differenciálódás során a sejtek jellegzetes morfológiai átalakuláson mennek keresztül, a cytoplasma aránya megnő, a sejtek hepatocytákhoz hasonló poligonális alakot vesznek fel, megjelennek közöttük az epecanaliculusok. Az átalakulás egyik fontos kezdeti, immunhisztokémiai vizsgálattal jól követhető lépése a bazális membrán eltűnése a sejtek körül, amivel együtt eltűnnek a környező myofibroblastok

is. A morfológiai változásokat fontos funkcionális érés is kíséri: jelentősen fokozódik az albumin, csökken illetve eltűnik az AFP termelés, a sejtek connexin és integrin mintázata a hepatocytákéhoz válik hasonlónvá, ami bizonyosan segíti a környező parenchymába való beolvadást.

### **A duktuláris reakció szabályozása**

Számos adat támasztja alá a TGF $\alpha$ , FGF rendszer és a CTGF szerepét a duktuláris reakció előidőzésében. A PDGF-nek bizonyított szerepe van a myofibroblastok aktivizálásában és ezen keresztül befolyásolhatja az ovális sejtek viselkedését és hozzájárul a fibrózis kialakulásához. Gyulladásos mechanizmusok szerepére utal az IFN  $\gamma$  hálózat aktivizálódása, a TNF és IL-6 citokinek részvétele, az NF- $\kappa$ B –STAT3 nukleáris faktorok megnövekedett aktivitása. Az említett növekedési faktorok, szignálutak hatékonyan gátolhatóak a molekulárisan célzott vagy újabban személyre szabottnak nevezett terápiás próbálkozások kapcsán kifejlesztett vegyületekkel. Ezek a szerek potenciálisan alkalmazhatóak a kísérletes, de akár az emberi májban kialakuló duktuláris reakciók vizsgálatára, befolyásolására.

### **Kísérleti modellek**

#### **Az AAF/Ph kísérleti modell**

Az AAF (2-acetilaminofluorén)/Ph (parciális hepatektómia) az egyik legtöbbet használt, legjobban jellemzett duktuláris reakció/ovális sejtes proliferációs kísérleti modell. Előnye, hogy könnyen reprodukálható, jól szinkronizáltan idézhető elő vele intenzív ovális sejtes proliferáció/differenciálódás, hátránya, hogy nem adaptálható egerekre. Bár a kísérletben használt AAF karcinogén hatású vegyület, a kísérletekben használt alacsony dózis miatt nem alakulnak ki daganatok az állatok májában. A modell lényege egy 10-14 napos AAF kezelés, ennek a periódusnak a

közepén 2/3-os sebészi hepatektómiát végeznek. Az AAF a hepatocytákban metabolizálódik, a képződött aktív molekula a DNS-hez kötődve megakadályozza a DNS replikációt, ezért a parciális hepatektómia által kiváltott proliferatív stimulusra a metabolikusan inaktív, az AAF-t feldolgozni nem képes őssejtek válaszolnak és ennek eredményeként alakul ki az ovális sejtes reakció. A parciális hepatektómiát követően jelentősen felgyorsul az ovális sejtek osztódása és hosszú, néha csaknem az egész lebenyékén átérő duktulusokat formálnak. A környező hepatocytákban celluláris szenescencia markerei mutathatóak ki és fokozódik az apoptotikus aktivitás is. Az ovális sejtek vagy legalábbis egy részük később hepatocytává differenciálódik.

#### **A CDE kísérleti modell**

A CDE (kolin deficiens, etioninnal kiegészített diéta) modellt kémiai hepatokarcinogenezis kísérletek kapcsán írták le. Az etionin régen vizsgált hepatokarcinogén hatású vegyület, a daganatok kialakulását főként metionin antagonistá hatásával magyarázták, ami akadályozza a kolin bioszintézisét. A kolin és egyéb lipotrop faktorok megvonása a karcinogén hatású vegyületek metabolizmusának befolyásolásával más szervekben is fokozta daganatok kialakulásának az esélyét. Nagyon fontos, hogy a CDE modellt sikerült adaptálni egerekre is. Ez lehetővé tette a duktuláris reakció vizsgálatát genetikailag módosított állatokon, a Cre-lox sejteredet követő rendszer alkalmazását, továbbá az állatok nagyságrenddel kisebb súlya miatt sokkal kisebb mennyiségben van szükség az alkalmazott vegyszerekre.

#### **A postnatalis egyedfejlődéssel kapcsolatos és a regeneratív májnövekedés összehasonlítása**

Parciális hepatektómiát követően a hepatocyták intenzív proliferációba kezdenek és kompenzatorikus hyperplasia, biológiai reakcióba

sorolható folyamat révén regenerálják a máj állományát. A hepatocyták azonban más növekedési reakciókban is részt vesznek. A perinatalis időszakban a hepatocyták intenzív proliferációja eredményezi a máj tömegének gyors növekedését.

A két folyamatot összevetve sok hasonlóságot, de jelentős eltéréseket is meg lehet figyelni. Parciális hepatektómiát követően a megmaradó lebenyek kizárólag az őket alkotó lebenyekék növekedése révén nagyobbodnak meg. A postnatalis máj növekedés fázisában viszont új lebenyekék is képződnek, számuk megnő, de növekszik méretük is, amihez hozzájárul a hepatocyták megnagyobbodása is.

Meglepő módon arra nincs adat, hogy az egyedfejlődés kapcsán tapasztalható májnövekedés gátlásával előidézhető-e a regeneratív növekedés elmaradását kompenzálni képes duktuláris reakció.

### **Az epesavak szerepe a májregenerációban**

Az epesavak a máj által termelt epeváladék egyik legfontosabb komponensét alkotják. A hepatocytákban termelődnek. Az epesavak két receptorcsaládon keresztül befolyásolják a máj metabolizmusát. A nukleáris receptorok közül elsőként a farnesoid X receptort (FXR) ismerték fel, a másik szignálút membrán G protein receptorokon keresztül vezet, amik közül valószínűleg legfontosabb a Takeda G protein kapcsolt receptor 5 (TGR5). Ezek a bonyolult összetett receptor rendszereken keresztül a májat érő jelek igen változatos metabolikus és egyéb biológiai funkciókat befolyásolnak, melyek közül csak a sejtproliferációval foglalkozunk.

Régi megfigyelés, hogy az epe kivezetése a szervezetből gátolja, míg a belső elterelés nem befolyásolja a máj regenerációt. Az epesavakat megkötő műgyanta szintén hatékonyan gátolta a májregenerációt. Ezek a megfigyelések egyértelművé tették, hogy az epének az epesav tartalma

befolyásolja a regenerációt. Az utóbbi évtizedben meggyőző bizonyítékok támasztották alá, hogy a Hippo-Yap szignálútnak meghatározó szerepe van több szerv, többek között a máj méretének meghatározásában.

## **Célkitűzések**

1. Gátolható-e a postnatalis, fiziológias máj növekedés AAF-fel patkányok májában?
2. Előidézhető-e duktuláris reakció patkányok májában a postnatalis növekedés gátlásával?
3. Lehet-e kólsavval befolyásolni a máj őssejtek részvételével zajló regenerációját?
4. Befolyásolható-e a máj duktuláris reakciója kis molekulásúlyú tirozin kináz gátló gyógyszerrel?

## **Módszerek**

### **Állatkísérletek**

Kísérleteinket Intézetünk állatházában tenyésztett hím F344 patkányokon és C57Bl/6 egereken végeztük, melyeket standard körülmények között tartottunk. A tenyésztés és a kísérletek során a Semmelweis Egyetem kísérleti állatok gondozására kidolgozott ajánlásait követtük (KA-1771), a terminálás cervikális diszlokációval történt.

### **Állatkísérleti modellek:**

#### **Kólsavban gazdag diéta alkalmazása F-344 patkányokon**

Négy hetes hím F-344 patkányokat random módon 4 csoportba osztottuk:

- I. Kontroll csoport (Co) (n=15): standard tápon tartott állatok
- II. Kólsav-csoport (CA) (n=15): 0,2%-os kólsav tartalmú diétán (C1129, Altromin, Lage, Németország) tartott csoport
- III. 2-Acetilaminofluorén (AAF) -kezelt csoport (n=15): 1%-os metilcellulózban oldott AAF (A7015, Sigma-Aldrich, 5mg/kg, naponta per os) kezelésben részesülő csoport
- IV. AAF/kólsav (AAF/CA) csoport (n=24): 0,2%-os kólsav tartalmú diétán tartott, és emellett AAF kezelésben is részesülő csoport

Az állatokat a kezelés és/vagy diéta 3., 7. és 10. napján termináltuk. Az eltávolított májak egy részét Bouin-féle fixálóba tettük majd paraffinba ágyasztuk, a másik részét folyékony nitrogénnel lehűtött izopentánban fagyasztottuk és felhasználásig -80°C fokon tároltuk.

#### **Kolin-deficiens, etioninnal kiegészített diéta alkalmazása C57Bl/6 egereken**



Az egereket két csoportba osztottuk:

I. Kontroll csoport (n=8): Nyolc hetes hím C57Bl/6 egerek kolin-deficiens, 0,5 %-os etioninnal kiegészített tápot kaptak 6 hétig (Altromin, Németország).

II. Kezelt csoport (n=9): Nyolc hetes hím C57Bl/6 egerek kolin-deficiens, 0,5 %-os etioninnal kiegészített tápot kaptak 6 hétig (Altromin, Németország), emellett naponta Imatinib kezelésben is részesültek (25mg/kg, per os, Glivec, Novartis, Basel, Svájc).

Az állatok terminálása után a májak egy részét formalinban rögzítettük és paraffinba ágyaztuk, más részeit pedig folyékony nitrogénen lehűtött izopentánban lefagyasztottuk, és -80°C-on tároltuk.

### **Szöveti és morfológiai vizsgálatok**

A fagyasztott metszeteken különböző immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk (BrdU, BD Pharmingen kat: 347580; CK (pan)-FITC, Dako kat: F0859; CK19, Novocastra kat: NCL-CK19; CK19, DS Hybridoma Bank kat: TROMAIII; Dezmin, Neomarkers kat: RB-9014; Beta-Katenin, Sigma; Laminin, Dako kat: Z0097; OV-6, R&D Systems kat: MAB 2020; SMA, Dako kat: M0851; AFP, Dako kat: A0008; DLK-1, R&D kat: AF1144; Cyp450IIE1, MBL).

A metszeteket a Panoramic Confocal Scanner (3D Histech, Budapest) segítségével scanneltük, majd a további morfológiai elemzéshez fotókat készítettünk.

A patkány májminták Bouin-féle fixálóban rögzített, paraffinba ágyazott mintáiból készült metszetein AFP (Dako) immunhisztokémiai reakciót végeztünk, a Novolink Polymer detektáló rendszert (RE7140-K, Leica Biosystems, Wetzlar, Németország) és DAB (SK-4105, Vector Laboratories, Burlingame, CA) kromogént használva. A metszeteket a

Pannoramic Confocal Scanner (3D Histech, Budapest) segítségével scanneltük, majd a további morfológiai elemzésekhez fotókat készítettünk (Pannoramic Viewer).

### **Kötőszövet által elfoglalt terület nagyságának meghatározása**

A kötőszövet által elfoglalt terület nagyságát az egér májmintákon Picro-sirius vörössel festett, paraffinba ágyazott blokkokból készült metszeteken elemeztük. A vizsgált terület nagyságához képest a kötőszövet által elfoglalt terület arányát digitális módon határoztuk meg. Zeiss Axioskop 2 plus fotómikroszkóppal (Zeiss, Oberkochen, Németország) 5x nagyítású objektív használatával három, random helyzetű felvételt készítettünk. A metszeteket a Quick PhotoMicro 2.2 (Promicra, Prága, Csehország) programmal elemeztük.

### **A májlebenykék zonalitásának meghatározása és a szteatózis vizsgálata**

A CDE- modellben a májlebenykék zonalitásának meghatározásához Cyp450IIE1 fluoreszcens immunhisztokémiai reakciót és Streptavidin-TRITC (016-020-084, Jackson Immunoresearch, Cambridge House, UK) festést végeztünk. A szteatózis mértékének vizsgálatához a Oil-red-O festést a CDE-modell egérmájain végeztük el.

### **A duktuláris reakció által elfoglalt terület meghatározása**

A duktuláris reakció kiterjedtségének vizsgálatára az egér májmintákon CK19 (TROMAIII), a patkánymáj mintákon a CK19 (Novocastra) antitesteket használtuk. A bescannelt metszetek területéről három, random helyzetű felvétel készült 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.

### **A BrdU-index meghatározása**

Az állatokat BrdU (200 mg/kg, fiziológiás sóoldatban, BrdU, B5002, Sigma-Aldrich) intraperitoneális adása után 1 órával termináltuk.

### **A proliferációs index számítása a kólsav-gazdag modellben**

Laminin, BrdU és DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) festett metszeteken azonosítottuk a portális tereket és az ovális sejteket. A hepatocyták magjukról könnyen felismerhetőek. Kísérleti csoportonként 10.000 májsejt és 500 ovális sejt került leszámolásra. A proliferációs indexet az össz-sejtszám és BrdU jelzett sejtek arányából határoztuk meg.

### **A proliferációs index számítása a kolin-deficiens, etioninnal kiegészített modellben**

A hepatocytákat béta-katenin fluoreszcens immunhisztokémiai reakcióval a magjukat DAPI festéssel tettük láthatóvá, melyet a BrdU immunhisztokémiai reakcióval kombináltunk. A portális tér 200 $\mu$ m-es környezetében a kis- (22 $\mu$ m átmérő alatti) és nagyméretű (22  $\mu$ m átmérő feletti) májsejteket a beta-katenin festés alapján különítettük el, a program segítségével (Pannoramic Viewer 1.15.4, 3DHistech, Budapest) az egyes májsejtek átmérőjét is meghatároztuk.

### **Génexpressziós vizsgálatok**

A vizsgálatainkhoz használt minden májmintából a totál RNS izolálását a gyártó előírásainak megfelelően RNAqueous Micro Kittel (Ambion, AM 1931) végeztük el. Az RNS mintákat felhasználásig -70 °C-on tároltuk.

Reverz transzkripció: A cDNS szintéziséhez a cDNA High Capacity Archive kitet (Applied Biosystems, 4368813) használtuk a gyártó ajánlása szerint. Valós idejű kvantitatív PCR: A különböző gének (TGR5, FXR, IL-6, HGF, SCF, CTGF, BIRC5, IFNG, TNFR1, HGF, Albumin, PPAR $\alpha$ , Cyclin D1, Desmin, CK19, SMA, PDGFR- $\beta$ ) szöveti expresszióját RNS-izolálást és

reverz transzkripciót követően valós idejű kvantitatív PCR (QRT-PCR) technikával vizsgáltuk. A QRT-PCR segítségével a polimeráz lánreakció minden egyes ciklusában meghatározzuk az addig keletkezett termék mennyiségét. Az Applied Biosystems TaqMan Gene Expression Assay™ rendszerét használtuk. A kiértékeléshez a GAPDH (Applied Biosystems 4352338E) háztartási gént választottuk referenciaként. A különböző próbákat ugyanahhoz a belső standardhoz (GAPDH) viszonyítva,  $\Delta C_T$  vagy a  $\Delta\Delta C_T$  módszerrel határoztuk meg a génexpressziós szinteket.

### **Statisztikai analízis**

A kísérleti adatok elemzése Student-féle t-tesztel, kétmintás Welch-féle t-próbával (egyvégű és két-végű) és egy szempontos varianciaanalízissel (Anova-teszt) történt. Szignifikancia szint: eredményeinket  $p < 0,05$  értékek esetén tartottuk szignifikánsnak.

## Eredmények

### **Az AAF kezeléssel kombinált kólsavas diéta hatására megjelenő ovális sejtes proliferáció jellemzése**

A kólsavas diétán tartott négy hetes F-344 patkányok májában rutin szövettani módszerekkel a kísérlet egyik időpontjában sem volt detektálható eltérés. Az AAF kezelésben részesülő patkányok májában a 3. napon nem, ellenben a 7. és különösen a 10. napon ovális maggal rendelkező sejtek alkotta, szűk lumenű duktulusok jelentek meg a periportális régióban, melyek a környező májparenchymába nem terjedtek be.

A kontrollhoz képest, az AAF/CA csoportba tartozó májak szövettani metszetein már a 3. napon kifejezett ovális sejtes proliferáció volt megfigyelhető. A 7. napon típusos ovális sejtek alkotta csövek penetráltak a periportális májparenchymába, ez a 10. napon vált igazán kifejezetté. Az ovális sejtek alkotta duktulusok környezetében, sokszor a duktulusok által körülvetten sorokban vagy kisebb csoportokban hepatocytákra emlékeztető sejtek jelentek meg.

Mivel az egyedfejlődés során a máj növekedése részben a májlebenszövet méretének növekedésével valósul meg, a kontroll és a kólsav-csoportban az általunk vizsgált mindhárom időpontban az OV-6 pozitív terület relatív aránya fokozatosan csökkent. Az AAF és különösen az AAF/CA csoportban az OV-6 pozitív területek relatív aránya a vizsgált időpontokban fokozatosan emelkedett. Mivel az AAF/CA csoportban megjelenő, ovális sejtekből differenciálódó kis hepatocyták az OV-6 antitesttel nem jelölődtek, így ebben a csoportban az immunhisztokémiai reakció által festődő terület relatív nagysága alulértékelt.

A kontroll csoportban az epeúthám/ovális sejt-kompartiment osztódási aktivitása emelkedett, a hepatocytáké pedig csökkent, de ezek a

változások statisztikailag nem bizonyultak szignifikánsnak. Az AAF-kezelés csökkentette a hepatocyták proliferációját, de ez a gátló hatás nem bizonyult tökéletesnek; és ebben a kísérleti csoportban az epeúthámsejtek/ovális sejtek emelkedett proliferációs aktivitása magyarázza ezen kompartment számottevő kiterjedtségét az AAF kezelés hatására. Míg a kólsavas diéta hatására a májsejtek osztódási aktivitása ugyan jelentősen, de csak átmenetileg emelkedett, addig az AAF/CA csoportban a hepatocyták osztódási aktivitása nem változott szignifikánsan. Összehasonlítva a kontroll csoporttal, az epeúthám/ovális sejtek proliferációs aktivitása minden vizsgált időpontban szignifikánsan magasabbnak bizonyult.

Az ovális sejtek az epeutakban elhelyezkedő szomatikus őssejtek leszármazottjainak tekinthetők, ennél fogva számos morfológia és immunhisztokémiai hasonlóságot mutatnak az epeúthámsejtekkel. A két sejttípus elsősorban az elhelyezkedésük és fenotípusuk alapján különíthető el. Az ovális sejtekre jellemző szövettani, immunhisztokémiai jellegzetességek azonosíthatóak voltak azokon a sejteken, melyek az AAF/CA kezelés hatására jelentek meg a patkánymájak parenchymájában. Az ovális sejtek, szűk lumenű csöveket vagy duktulusokat formáltak, a duktulusokat alkotó sejteken immunhisztokémiai vizsgálatokkal, az ovális sejtekre jellemző AFP és DLK1 expressziót tudtunk kimutatni. A duktulusok körül dezmin/sima izom aktin immunhisztokémiai reakcióval élénken jelölődő myofibroblastokat azonosítottunk.

A duktulusok környezetében elhelyezkedő bazofil citoplazmájú kis hepatocyták körül bazális membrán már nem volt azonosítható. Ezeknek a differenciálódó májsejteknek az alacsony endogén biotin tartalmát jelzi a halvány festődésük streptavidinnal, ugyanakkor ez a jelölődés elkülöníti őket a környező parenchyma érett májsejtjeitől is. Emellett a májsejtekre jellemző

HNF-4 élénk magi expressziója volt megfigyelhető, mely egyértelműen jelzi hepatocytá irányú differenciációjukat.

Az AAF illetve a kólsav kezelés májsejtekre és epeúthámsejtekre kifejtett hatásainak szeparált vizsgálatához a kísérleti csoportok 10 napos időpontjánál külön-külön lézermikrodisszekáltuk a hepatocytákat és a progenitor sejteket is tartalmazó epeúthámsejt/ovális sejt kompartmentet. A lézermikrodisszekált szövetből RNS-t izoláltunk majd meghatároztuk a két legfontosabb epesavreceptor, a TGR5 és az FXR relatív génexpressziós szintjét. Míg a TGR5 szintje mindkét sejtpopulációban és minden kísérleti csoportban csökkent a kontrollhoz képest, addig az AAF/CA csoportban az FXR szintje az epeúthám/ovális sejteken emelkedett és csökkent a májsejteken.

A teljes májból izolált RNS QRT-PCR vizsgálata azt mutatta, hogy AAF kezelés hatására a szeneszcencia-asszociált faktorok, mint a HGF, IL-6 és SCF relatív génexpressziós szintje szignifikánsan emelkedett, ugyanakkor a TNFR1, IFN-gamma, valamint a Yap célgénnek, a CTGF és survivin szintje nem változott szignifikánsan.

### **A kolin deficiens etioninnal kiegészített (CDE) - diéta hatására kialakuló duktuláris reakció befolyásolása Imatinibbel**

Az Imatinib-kezelt állatok májának relatív tömege valamivel magasabb volt, mint a kontrolloké, de a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns. A májparenchima „funkcionális térképének” meghatározásához két zonális paraméter eloszlását vizsgáltuk. A hepatocyták endogén biotintartalma magasabb a periportális sejtekben, míg a CYP2E1 preferenciális pericentrális expressziót mutat normál egérmájban. Ez a zonalitás szinte teljesen elveszett a CDE-diétán tartott állatok májában. Imatinib kezelés hatására a zonalitás megtartottsága figyelhető meg. Ettől

eltérően azonban a zsíros degeneratio súlyosabb volt az Imatinib-kezelésben részesülő állatok májában.

Mind a májsejtek méretében mind pedig a duktuláris reakció mértékében jelentős eltéréseket tapasztaltunk az Imatinib-kezelésben részesült CDE diétán tartott állatok májában.

A legszembetűnőbb különbség a kis májsejtek tömeges megjelenése volt a periportális zónában. A kontroll, csak CDE-diétában részesült állatok májában is megfigyelhetőek voltak periportálisan elhelyezkedő kis májsejtek, de ezek nem képeztek összefolyó mezőket.

A kontroll és az Imatinib-kezelt állatok májában azonosított hepatocyták méretbeli különbségének számszerűsítéséhez a sejtmembránt  $\beta$ -katenin immunfestéssel tettük láthatóvá. Morfometriai analízissel az egyes periportális hepatocyták becsült átmérőjét hisztogramon ábrázoltuk, és az I matinib-kezelést követően nyilvánvaló eltolódás volt megfigyelhető a kisebb sejtméret felé. Ha a kis- és nagy hepatocyták közötti határt  $22\ \mu\text{m}$  átmérőre állítottuk be, a kis hepatocyták aránya szignifikánsan magasabb volt az Imatinib-kezelt állatokban.

Morfometriai vizsgálatainkat CK-19 és dezmin immunfestés után a duktuláris reakció mértékének és a myofibroblastok által elfoglalt terület nagyságának a meghatározására végeztük. Az Imatinib-kezelt állatok májában mind a duktuláris reakció mértéke, mind pedig a myofibroblastok által elfoglalt terület szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult.

Morfológiai megfigyeléseinket teljes mértékben alátámasztotta a fagyasztott mintákból izolált mRNS QRT-PCR vizsgálata. A CK-19, a dezmin, a simaizom-aktin (SMA) és a PDGFR- $\beta$  relatív mRNS-expressziós szintje a kontroll csoporthoz képest szignifikánsan alacsonyabb volt az Imatinib-kezelt egerekben; mindközül a PDGFR- $\beta$  expresszió szintjének



csökkenése volt a legszembetűnőbb.

A kisméretű májsejtek élénk magi hepatocytá nukleáris faktor 4 (HNF-4) pozitivitása alátámasztotta hepatocytá-irányú elkötelezettségüket. A BrdU beépülési arány mindkét csoportban szignifikánsan magasabb volt a periportálisan elhelyezkedő kis hepatocytákban, mint a pericentralis nagyméretű májsejtekben. Ezen kívül a CDE diétán tartott állatokhoz képest az Imatinib-kezelt állatokban a kis hepatocyták proliferációs aktivitása magasabbnak bizonyult.

## Következtetések

1. Az AAF kezelés gátolta a postnatalis egyedfejlődés során a hepatocyták osztódását. Ez a gátlás nem volt olyan látványos, mint a parciális hepatektómiát követő regeneráció gátlása. Ezért elsősorban az lehet felelős, hogy az egyedfejlődés során sokkal kisebb mértékű a hepatocytá prolifерáció, ezért gátlása sem lehet olyan drasztikus. A mérsékelt gátlásban szerepet játszhatott a fiatal májsejtek alacsonyabb fokozatú metabolizmusa is. Mindenesetre ez a kisebb mértékű gátlás is funkcionális következményeiben megegyezik a PH során tapasztaltakkal.
2. Előídezhető duktuláris reakció fiatal patkányok májában az egyedfejlődés részét alkotó növekedés gátlásával. Ez a gátlás azonban önmagában nem volt elégséges, ki kellett egészíteni egy másik „prolifерációs” stimulussal, ami a mi esetünkben a kólsav volt.
3. A kólsav kezelésnek látványos hatása volt az egyedfejlődéssel kapcsolatos máj növekedés gátlására. A gátolt szeneszcens hepatocyták által termelt növekedési faktorok serkentették az őssejtek részvételével zajló regenerációt. A kólsav jól ismert növekedési hatását is inkább ezekre a sejtekre fejtette ki, mivel a károsodást követően a kólsav hatását közvetítő FXR receptor expressziója is a károsítás hatására a hepatocytákról átkerült az ovális sejtekre.
4. Imatinibbel igen eredményesen tudtuk befolyásolni a CDE kísérlettel előídezett duktuláris reakciót. Az Imatinib serkentette a regenerációt ugyanakkor mérsékelte a kísérő fibrózis progresszióját, sőt segített a túlélő májparenchyma integritásának a megőrzésében is.

## Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

1. **Szüics A**, Paku S, Sebestyén E, Nagy P, Dezső (2020) Postnatal, ontogenic liver growth accomplished by biliary/oval cell proliferation and differentiation. PLoS One, 15 : 5 p. e0233736 , 13 p. IF:3,240

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

Egyéb témában megjelent közlemények:

1. Rókus A, Veres D, **Szüics 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: 2,7662.

2. Rókus A, Nagy E, Gerlei Zs, Veres D, Dezső K, Paku S, **Szüics A**, Hajósi-Kalcakosz Sz, Pávai Z, Görög D, Kóbori L, Fehérvári 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

3. Dezső K, Rókus A, Bugyik E, **Szüics 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. 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: -