doi:10.14753/SE.2013.1780

Proliferatív folyamatok vizsgálata humán és egér májban

Doktori értekezés

Dr. Turányi Eszter

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Nagy Péter egyetemi tanár, az orvostudományok doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Tóth Erika főorvos, Ph.D.
Dr. Békési Gábor egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kulka Janina egyetemi tanár, Ph.D.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Lengyel Gabriella, egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Simon Károly egyetemi magántanár, Ph.D.

Budapest
2012

doi:10.14753/SE.2013.1780

TARTALOMJEGYZÉK

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE ... 3
II. IRODALMI HÁTTÉR ... 5
II.1. Sejtproliferációval járó folyamatok a májszövetben ... 5
II.1.1. Kompenzatorikus hyperplázia (Parciális hepatectomiát követő regeneráció) ... 7
II.1.2. Pimer hepatocyta mitogének által kiváltott folyamatok ... 12
II.1.2.1. TCPOBOP ... 13
II.1.3. A kompenzatorikus hyperplázia és a primer mitogének okozta májsejt proliferáció összehasonlítása ... 14
II.2. TGFβ1 hatása a heptocyták proliferációjára ... 17
II.3. Regeneráció cirrhotikus májban ... 19
II.4. Ductularis reakciók humán májban ... 20
III. CÉLKITŰZÉSEK ... 22
IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK ... 23
IV.1. Kísérleti állatok ... 23
IV.2. Szövetminták ... 25
IV.3. DNS szintű vizsgálatok - A TGFβ1 hemizygota státusz ellenőrzése ... 25
IV.3.1. DNS izolálás egérfarokból ... 25
IV.3.2. A genotípus meghatározása polimeráz láncreakcióval ... 26
IV.3.3. Gélelekroforézis ... 26
IV.4. RNS szintű vizsgálatok ... 27
IV.4.1. RNS izolálás ... 27
IV.4.2. Reverz transzkripció ... 28
IV.4.3. Valós idejű kvantitatív PCR ... 28
IV.5. Immunhisztokémiai vizsgálatok ... 32
IV.5.1. A sejtproliferáció vizsgálata kísérleti állatok májában ... 32
IV.5.2. Immunhisztokémiai vizsgálatok human szövetmintán ... 32
V. EREDMÉNYEK ... 34
V.1. TGFβ1 hatása a primer mitogén okozta májsejt proliferációra ... 34
V.2. Primer mitogén hatása fibrotikus májra ... 39

doi:10.14753/SE.2013.1780

V.3. Ductularis reakciók csoportosítása ... 42
VI. MEGBESZÉLÉS ... 52
VI.1. TGFβ1 hatása a TCPOBOP okozta májsejt proliferációra ... 52
VI.2. Primer mitogén hatása fibrotikus májra ... 55
VI.3. Ductularis reakciók csoportosítása ... 56
VII. KÖVETKEZTETÉSEK ... 60
VIII. ÖSSZEFOGLALÁS ... 61
IX. SUMMARY ... 63
X. IRODALOMJEGYZÉK ... 64
XI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE ... 77
XI.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények ... 77
XI.2. Egyéb témában megjelent közlemények ... 77
XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS ... 78

doi:10.14753/SE.2013.1780

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC	avidin biotin complex
AFP	alfa fetoprotein
AR	amphiregulin
BrdU	bromodeoxyuridin
C3a, C5a-	complement3a, complement5a
CAR-	constitutive androstane receptor
CCl4	széntetraklorid
CD	cluster of differentiation
CDK	cyclin dependens kináz
CDKI	cyclin dependens kináz inhibitor
cDNS	ciklikus dezoxiribonuklein-sav
CEA	carcinoembrionalis antigén
CK	citokeratin
Cyp	cytochrome P 450
Cys	cisztein
DAB	diaminobenzidin
DEPC	dietil pirokarbonát
DLK1	delta- like kináz-1
DMBT-1	deleted in malignant brain tumor 1
DNS	dezoxiribonuklein-sav
dNTP	deoxinukleotid difoszfát
ECM	extracelluláris mátrix
EGF(R)	epidermal growth factor (receptor)
EpCam	epithelial cell adhesion molecule
EMA	epithelialis membrán antigén
ERK	extracellular signal regulated kinase
FHF	fulminant hepatic failure
FNH	fokális noduláris hyperplázia
g	nehézségi gyorsulás
Gadd45b	growth arrest and DNA damage induced gene-45b

GAPDH-,	glyceraldehyd 3-foszfát dehydrogenáz
HB-EGF	heparin binding epidermal growth faktor
HGF	hepatic growth factor
IL-6	interleukin-6
Ltα	lymphotoxin alpha
MGB	minor groove binding
Min	minute (perc)
mRNS	messenger (hírvivő) ribonuklein-sav
μ	micro
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NFQ	nem fluoreszcens quencher
ng	nanogramm
NIH	National Institutes of Health
P	polimeráz
PBC	primer biliáris cirrhosis
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PH	parciális hepatectomia
PPARα	peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PSC	primer szklerotizáló cholangitis
RAR	retinoic acid receptor
RXR	retinoid X receptor
RT-PCR	real time polimerase chain reaction
SBC	szekunder biliáris cirrhosis
STAT-3	signal transducer and activator of transcription 3
Sec	second (másodperc)
TAA	tioacetamid
TCPOBOP-,	1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzén
TGF	transforming growth factor
THR	thyroid hormon receptor
TNF(R)	tumor nekrózis faktor (receptor)

doi:10.14753/SE.2013.1780

II. IRODALMI HÁTTÉR

II.1. Sejtproliferációval járó folyamatok a májszövetben

A gerincesekben a máj igen sokrétű, bonyolult feladatokat ellátó létfontosságú szerv. A májnak óriási funkcionális tartalékai vannak, és igen hatékonyan tud regenerálódni, ha károsodás éri. A máj feladatainak ellátásában központi szerepet játszanak a hepatocyták/májsejtek, de az egyéb sejtes elemek is nélkülözhetetlenek a máj megfelelő funkcióinak fenntartásához. A májsejteket érintő betegségek, károsodások esetén a szervezet működésében számos területen zavar keletkezik. Ha a funkcionális tartalékok kimerülnek, a májműködés dekompenzációja, májelégtelenség léphet fel.

Egészséges felnőtt szervezetben a májsejtek stabil sejtek, G0 fázisban vannak, élettartamuk meglehetősen hosszú, DNS szintézisük minimális, nagyon ritkán osztódnak.

Előfordulnak illetve előidézhetők azonban olyan állapotok, amikor az érett hepatocyták intenzív proliferációt mutatnak.

A májsejtek proliferációját in vivo és in vitro is tudjuk vizsgálni.

Az egyedfejlődés során a szerv kialakulásakor intenzíven osztódnak a hepatoblastok majd a hepatocyták, amíg a máj el nem éri a megfelelő méretet. Ez az időszak alkalmas a fiziológiás májsejt proliferáció vizsgálatára. Kiterjedt parenchyma károsodás regeneratorikus vagy kompenzatorikus növekedési reakciót vált ki. Bizonyos anyagok, az úgynevezett primer hepatocyta mitogének hatására előzetes károsodás nélkül is osztódni kezdenek a májsejtek.

A hepatocyták proliferációját in vitro primer sejtkultúrákban vizsgálhatjuk.

Az egyedfejlődés során az endoderma eredetű májbimbóból fejlődik ki a máj. A májbimbó hepatoblastjai nagy proliferatív aktivitással rendelkeznek. A hepatoblastok legalább bipotenciális sejtek, két irányba tudnak differenciálódni, egyrészt hepatocytákká, másrészt biliáris epithelsejtekké. A periportális kötőszövettel kapcsolatban lévő sejtekből fejlődnek ki az epeutak a ductalis plate remodelling során [1, 2]. A hepatoblastok másik része fokozatosan érett hepatocytákká differenciálódik.

Felnőtt szervezetben szövetkárosodást követően, a megmaradt májsejtek G0 fázisból visszalépve a sejtciklusba osztódni kezdenek és így képesek pótolni a hiányzó szövetet. Kísérletes körülmények között leggyakrabban két módszert alkalmaznak a májkárosítás előidézésére. A máj egy részének sebészi eltávolítását parciális hepatectomiának nevezzük (PH) [3]. Ezt követően a maradék szövetben necrosis nem jön létre, a proliferációs folyamatok szinkronizáltan, jelentősebb gyulladás nélkül zajlanak. Különböző vegyszerekkel (például CCl4-dal) necrosis, vagy úgynevezett kémiai hepatectomia idézhető elő, ebben az esetben a necrosis miatt kezdetben a gyulladásos folyamatok dominálnak [4].

Ha a hepatocyták osztódása valamiért gátolt, például virus infekció vagy vegyszerek hatása miatt, akkor a májban található progenitor sejtek aktiválódása, proliferációja és differenciálódása teszi lehetővé a májsejtek pótlását [5-7]. Különböző kísérleti rendszerekben többféle májbeli sejtcsoportról is leírták, hogy progenitor sejtekként képesek viselkedni, leggyakrabban azonban a Hering-csatornákat felépítő kis, átmeneti fenotípusú sejtek képesek ilyen feladatot ellátni. Rágcsálókban a progenitor sejtekből származó, kis ovalis maggal rendelkező úgynevezett ovális sejtek alkotják a progenitor sejtek amplifikációs kompartmentjét. Az ovális sejtek intenzív proliferációt követően képesek májsejtekké differenciálódni [8, 9]. Sokáig kérdéses volt, hogy mik lehetnek az ovális sejtek megfelelői humán májban, mert pontosan ilyen morfológiájú és fenotípusú sejteket nem tudtak azonosítani. Mára azonban általánosan elfogadottnak tekinthető, hogy az emberi májban zajló ductularis reakciók, vagy legalábbis azok bizonyos formái tekinthetők ekvivalensnek a patkányok májában előforduló ovális sejtes proliferációval [10, 11].

Más kísérleti rendszerekben felmerült, hogy hemopoetikus vagy egyéb őssejtek is szerepet játszanak a máj regenerációban. Ezeknek a megfigyeléseknek egy részéről bebizonyosodott, hogy például sejtfúzió következtében kialakult műtermékek vezették félre a kutatókat. A ma legelfogadottabb álláspont szerint, ha képesek is egyáltalán a hemopoetikus őssejtek hepatocytákká differenciálódni, a folyamat hatékonysága olyan kisfokú, hogy nincs igazán biológiai jelentősége. [5, 12, 13].

Bizonyos anyagok a máj előzetes károsodása nélkül is hepatocyta proliferációt képesek előidézni in vivo, ezeket az anyagokat az irodalomban primer máj mitogéneknek nevezzük [14, 15]. Jelentőségüket többek között az adja, hogy a májsejtkárosodás

kapcsán beinduló szabályozott hepatocytaproliferációtól különböző szignálutakat aktiválnak és következményeik is különböznek a regeneratív növekedéstől.

Primer hepatocyta kultúrákban is átmenetileg szaporodásra bírhatók a májsejtek, azonban a folyamat előidézéséhez különböző szignálok szükségesek. A kultúrákban a májsejtek csak korlátozott számú osztódásra képesek [16, 17]. A leghatásosabb és leghasználhatóbb mitogénnek a hepatocyta növekedési factor (HGF), az epidermális növekedési factor (EGF) és a transzformáló növekedési factor alfa (TGFα) bizonyult [18]. Más vegyületek, például norepinefrin [19, 20], prosztaglandinok [20], tumornecrosis factor (TNF) [21], interleukin 6 (IL6), ösztrogének [22] és az insulin [23] önmagukban nem okoznak szignifikáns mitosis szám növekedést, de igen jelentősen növelik az előzőekben említett mitogének hatását.

Az önmagukban is mitogén hatású komplett mitogének mind a primer kultúrákban, mind az élő állatokban hatásosak, utóbbiakban a hepatocyták DNS szintézisét, proliferációját, a máj megnagyobbodását okozzák.Az önmagukban nem mitogén anyagok hatásához szükséges szignálutak gátlásával a máj regenerációját csak lassítani lehet, de meggátolni nem [24].

Az egyedfejlődés és kompenzatorikus regeneráció esetében nagyon sok a közös pont, részben ugyanazon szignálutak aktiválódnak. Ezen folyamatok egy része primer hepatocyta sejtkultúrákban is tanulmányozható.

A primer mitogének által előidézett proliferáció esetében más szignálutak aktiválódnak, ezek a folyamatok azonban csak in vivo vizsgálhatók, mivel a primer hepatocyta mitogének sejtkultúrákban nem váltanak ki mitotikus választ. Tanulmányozásuk azonban új lehetőségeket nyithat meg a károsodott máj működésének helyreállításában.

Munkánkban részletesen a kompenzatorikus hyperpláziával és a primer hepatocyta mitogének okozta májsejtproliferációval foglalkozunk.

II.1.1. Kompenzatorikus hyperplázia (Parciális hepatectomiát követő regeneráció)

A máj egy részének sebészi eltávolítását (PH) követően a máj tömeg gyors pótlódását tradícionálisan regenerációnak nevezik. Biológiai értelemben azonban ez a reakció kompenzatorikus hyperpláziának felel meg, mert az eltávolított lebenyek nem nőnek újra, hanem a rezekált májrészlet a visszamaradt lebenyek megnagyobbodása révén

pótlódik [25, 26]. Hasonló szöveti reakció előidézhető a májszövet egy részének vegyszerrel (például CCl4) előidézett necrosisával (kémiai PH) is. Ebben az esetben azonban az okozott necrosis intenzív gyulladásos reakciót vált ki, ezért sokkal gyakrabban vizsgálják a „tisztább" kísérleti rendszernek tekinthető sebészi parciális hepatectomiát követő regenerációt [27]. A kísérlet elterjedését elősegítette az is, hogy az egerek és patkányok mája jól tagolt lebenyekből áll, ami megkönnyíti a hepatectomia elvégzését.

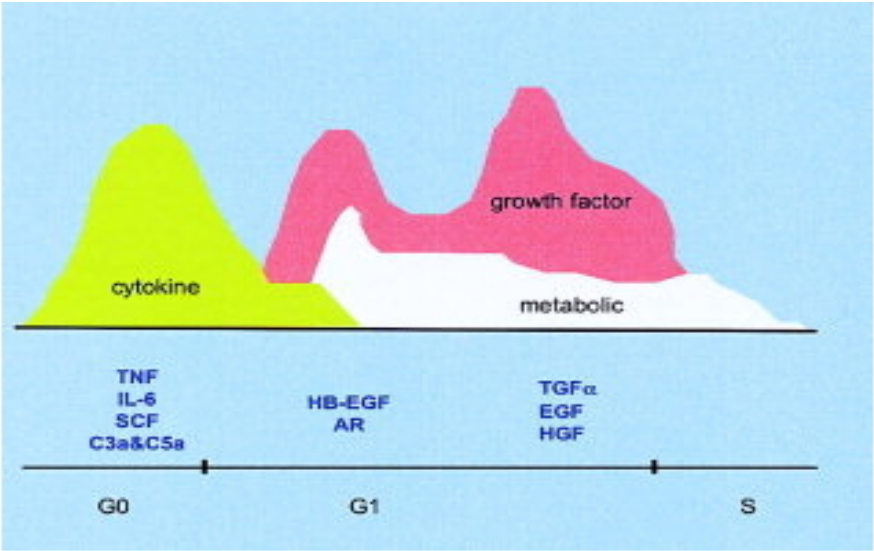
Egerekben és patkányokban leggyakrabban a máj kétharmadának eltávolítása utáni regenerációt vizsgálják. A folyamat meglehetősen gyors, a máj tömege 5-7 nap alatt áll helyre. Emberben a regeneráció valamelyest lassúbb, a máj felének eltávolítását követően körülbelül egy hónapra van szükség az eredeti tömeg helyreállításához [28].

Egészséges állatokon végzett parciális hepatectomiát követően az elveszett májszövet pótlása a hepatocyták osztódása révén történik. Strukturális értelemben a regeneratív növekedés jelentősen különbözik az egyedfejlődés során zajló gyarapodástól. Míg fiatal állatokban a máj növekedéséhez hozzájárul a májsejtek megnagyobbodása és új lebenykék (lobulusok) kialakulása is, a kompenzatorikus hyperplázia során az amúgy is meglévő lebenykék nagyobbodnak meg, újabbak nem képződnek[26]. Sokan elemezték a regeneráció beindításában és leállításában szerepet játszó molekuláris mechanizmusokat is [26, 28].

A kompenzatorikus hyperplaziában résztvevő molekulákról illetve szignálutakról
számos adat áll rendelkezésünkre.

A kompenzatorikus hyperplázia kapcsán három, egymással több ponton kapcsolódó molekuláris hálózat aktiválódik. A citokinek, növekedési faktorok és metabolikus szabályozó utak nem csak kapcsolatban vannak egymással, de több molekula mindhárom hálózat működésében részt vesz [24] (1. ábra).

doi:10.14753/SE.2013.1780



1. ábra: Citokinek, növekedési faktorok és metabolikus faktorok megjelenése a parciális hepatectomiát követő kompenzatorikus hyperplázia során [24]

Számos kísérlet bizonyítja, hogy a regenerációban résztvevő molekulák funkciójában nagyfokú az átfedés és az egyes szignálutak blokkolása nem hiúsítja meg a folyamatot, csak késlelteti.

Citokinek

A parciális hepatectomiát követő első 5 órában számos citokint kódoló gén expressziója megváltozik. Az eddigi vizsgálatok alapján fontos szerepe van a regeneráció ezen szakaszában a TNF és IL6 mRNS és szérum szint növekedésének [29], a STAT3 aktivációjának [30, 31]. A TNF a Kuppfer sejteken lévő TNFR1-en hatva aktiválja a NF-κB-t. Mind a TNF mind az IL6 az NF-κB célgénje, így aktiválódásakor a TNF és IL6 gének expressziója fokozódik, mennyiségük a szérumban megnő. A TNF saját receptorán hatva tovább növeli az NF-κB aktivitását, míg az IL6 a hepatocytákon lévő gp130 és gp80 alegységből álló receptorához kötődve aktiválja a STAT3 monomert. A STAT3 a sejtmagba jutva részben a Socs3 expressziójának növelésével csökkenti a saját foszforilációját, részben a regenerációban résztvevő kaszkád elemeit aktiválja [32]. A gp130 aktivációja egy másik szálon, az ERK1/2 aktivációján keresztül is a regenerációban szükséges gének aktivációjához vezet.

A citokinek fontos szerepét bizonyítja az a megfigyelés is, hogy bizonyos citokinek, növekedési faktorok jelenlétében képesek a normálisan nyugvó állapotban lévő májsejteket osztódásra bírni parciális hepatectomia nélkül is élő szervezetben. A normál májban G0 fázisban lévő sejtek minimálisan reagálnak az in vitro mitogénként működő

TGFα, EGF és HGF adagolására. Patkányban ezen mitogének mellett alkalmazott TNF injectió a májsejtek 40%-át osztódásra bírta [21].

Ugyanakkor önmagában TNF hiánya nem gátolja meg a regenerációt, hiszen egyéb ligandok, például a lymphotoxin alfa (Ltα) is képesek a TNFR1-hez kötődni és elindítani a signált [33].

Az IL6 szerepe a máj regenerációjában még nem tisztázott minden részletében, de kimutatták, hogy az azonnali korai gének körülbelül 40%-ának a működését befolyásolja [34, 35]. Az IL6-nak proliferatív hatása mellett antiapoptotikus hatást is tulajdonítanak [36, 37].

A citokinkaszkád parciális hepatectomiát követő beindításában a veleszületett immunrendszernek fontos szerepe van. A C3a, C5a és MyD88 szintén képes az NF-κB aktiválására [38].

A TGFβ1 szerepe a parciális hepatectomiát követő májsejt proliferációban, majd a regeneráció leállításában az egyik leginkább vizsgált jelenség. A TGFβ1 primer hepatocyta kultúrákban hatásos mitoinhibitorként működik. Parciális hepatectomiát követően szérumszintje 2-3 órán belül megemelkedik, maximális szintjét a 2-3. napon éri el [39, 40]. A proliferáló hepatocyták azonban rezisztensek a TGFβ1 mitoinhibitor hatására [40]. Felmerül a kérdés, hogy akkor mi a szerepe a korai TGFβ1 szint emelkedésnek a hepatectomiát követő regenerációban. Egyes kísérletek szerint az extracelluláris térben lévő TGFβ1 a májsejteket G0 fázisban tartja, innét felszabadulva és a szérumba jutva ezen a hatás alól a hepatocyták felszabadulnak és képesek osztódni [41, 42].

A TGFβ1-t tartják felelősnek a regeneráció befejezéséért is, bár kísérletekben ezt egyértelműen bizonyítani nem sikerült. A TGFβ1 szerepéről részletesebben egy későbbi fejezetben lesz szó.

Növekedési faktorok

A növekedési faktorok a G1-ből S fázisba való átmenet szabályozásában vesznek részt. A HGF és EGF receptoron ható ligandok fontos növekedési faktorok a májregeneráció során [43, 44]. A HGF-t a mesenchymalis sejtek termelik és a hepatocytákon hat, receptora a cMet. Parciális hepatectomiát követően az extracelluláris mátrixban kötött állapotban lévő HGF felszabadul, szérumszintje az első három órában 10-20szorosára növekszik, majd az új HGF szintézise is megindul. Kísérletesen bizonyították, hogy a

HGF/cMet szignálút szükséges a parciális hepatectomiát követően a sejtciklusba való belépéshez, ez az út szintén aktiválni tudja az ERK1/2-t [45]. Mind a c-met, mind az EGFR tirozin kinázok, aktiválódásuk számos intracelluláris signálutat befolyásol. A Ras-Raf-MEK szignálút kapcsolatot jelent a citokinek és növekedési faktorok működése között, és aktiválva az ERK1/2-t, in vitro hepatocyta proliferációt, in vivo DNS replikációt okoz.

Az EGF receptoron ható ligandok közé tartozik az EGF-en kívül a TGFα, a heparin-binding EGF-like növekedési faktor (HB-EGF) és az amphiregulin (AR).

A TGFα-t a májsejtek termelik és azokon is fejti ki hatását, a májsejtek proliferációját serkenti. TGFα-t overexpresszáló transzgén egerekben az állandó magas TGFα szint folyamatos hepatocyta proliferációt, daganatképződést idéz elő [46]. A TGFα hiánya nem gátolja a máj regenerációt PH után, feltehetően az egyéb EGFR-en ható ligandok kompenzálják a hiányát [47].

HB-EGF korábban expresszálódik PH után, mint a HGF és TGFα. Fontos szerepére utal, hogy míg 30%-os parciális hepatectomia nem vált ki a májban rendezett DNS replikációt, addig ez HB-EGF-ral kombinálva beindítja a koordinált DNS szintézist [48]. Ugyanakkor a HB-EGF hiánya csak csökkenti a 70%-os hepatectomia utáni regenerációt, feltehetően a korábban beinduló TGFα termelés kompenzálja részlegesen a hiányát.

Az amphiregulin is a regenerációt segítő növekedési faktor, hiányában jelentősen csökken a parciális hepatectomiát követő DNS replikáció [45].

Metabolikus utak

Parciális hepatectomia utáni állapotban a fehérje transzláció függ a szervezet tápláltsági és energiaállapotától. Aminosavak adagolásával egészséges patkányokban DNS replikációt értek el májban, míg aminosavak hiányában a PH utáni regeneráció zavart szenved [49, 50]. PH után p70 S6 kináz aktivitása megnő, míg a 4E-BP1 (transzláció represszor) aktivitása csökken. Mindkét fehérjére hat az mTOR, ami egy komplex részeként érzékeny a szervezet tápláltsági állapotára és energiaszintjére, valamint a növekedési faktorok szignáljait is fogadja, így koordinálva a fehérje transzlációt és sejtnövekedést [51, 52].

A citokinek és növekedési faktorok működésének összehangolásában jelentős szerepet tulajdonítanak az egyes citokinek például TNF által aktivált mátrix metalloproteázoknak is [53].

II.1.2. Pimer hepatocyta mitogének által kiváltott folyamatok

A primer hepatocita mitogének a májsejtek előzetes pusztulása nélkül okoznak hepatocita proliferációt. Igen sokféle anyag működhet primer májsejt mitogénként, az utóbbi évek vizsgálataival számuk folyamatosan növekszik. Primer májsejt mitogénként sikerült azonosítani például peroxysoma proliferátorokat, halogenizált szénhidrátokat (mint a TCPOBOP), retin savakat, thyroid hormonokat [54]. Ezen anyagok egy része jelen van a normál szervezetben és számos hatásuk van a hepatocita proliferációt serkentő hatásukon kívül is, például ismert a thyroid hormonok szerteágazó hatása vagy a peroxisoma proliferátorok hatása a lipidanyagcserére. A primer hepatocyta mitogének szerkezetileg meglehetősen sokszínűek, közös tulajdonságuk azonban, hogy transzkripciós faktorként működő nucleáris receptorokon hatnak. Ilyen receptorok a peroxisome proliferator aktivált receptor-alfa (PPARα), retinsav receptor (RAR), thyroid hormon receptor (THR), konstitutiv androsztén receptor (CAR) [54].

Egyszeri dózis primer hepatocyta mitogént alkalmazva a máj DNS tartalma 2-3 nap alatt megduplázódik, de az S fázis időbeni megjelenése és a mitogén stimulus erőssége függ az alkalmazott mitogéntől [55]. A primer mitogének hatása fajspecifikus és csak in vivo okoznak májsejt proliferációt, szövettenyészetben nem működnek mitogénként. Közös jellemzőjük, hogy adagolásukat megszüntetve szabályozott apoptotikus folyamatok eredményeképpen a máj mérete és DNS tartalma visszatér a kiindulási értékre [55].

A májsejt proliferációnak szerepet tulajdonítanak a hepatocarcinogenesisben, bár a pontos mechanizmus nem ismert. Ennek megfelelően egyes primer mitogének (TCPOBOP) mind promoter, mind önálló carcinogén hatással is rendelkeznek [56]. Ugyanakkor a szintén primer mitogénként viselkedő trijódthyroninról kimutatták, hogy kísérleti körülmények között patkány májban a mesterségesen létrehozott hyperplasticus nodulusok számát csökkentette. Egyidejűleg alkalmazott carcinogén és trijódthyronin esetében a hepatocelluláris carcinoma és tüdőmetasztázisok kialakulásának valószínűsége szintén jelentősen kisebb volt, mint a csak carcinogénnel kezelt állatok esetében [57].

doi:10.14753/SE.2013.1780

II.1.2.1. TCPOBOP

Számos hepatomitogénről mutatták ki, hogy a nukleáris receptorcsaládhoz tartozó receptorok, például peroxiszoma proliferátor aktivált receptor-alfa (PPARα), retinsav receptor (RAR), thyroid hormon receptor (THR), konstitutív androsztén receptor (CAR) ligandjaként működik. A primer mitogének közé tartozó a 1,4-bis[2-(3,5 dichloropyridyloxy)]benzén (TCPOBOP) (2. ábra) a CAR agonistája [58, 59].

A CAR a megfelelő endo vagy xenobiotikumok hatására a cytoplasmából a magba kerül és heterodimert alkot a retinoid X receptorral (RXR). Ez a transzkripciós faktor komplex felelős a cytochrom gének indukciójáért (például Cyp2b10), melyek igen fontos szereppel bírnak a máj méregtelenítő funkciója során. A CAR közvetítette hyperplázia tulajdonképpen egy adaptív, gyors válasz a toxicus xenobiotikumok jelenlétére. Így biztosítja a máj a toxicus ágensek gyors eliminációját.

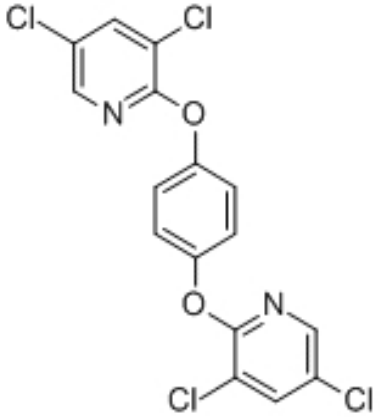
Érdekes módon a szervezetben természetesen is előforduló metabolitok is képesek kapcsolódni hozzá (például androsztén metabolitok) inaktiválva a receptort [60]. A CAR részt vesz a szteroid és lipid metabolizmus valamint az adipogenezist, differenciációt befolyásoló gének szabályozásában is [61].

Egerekben a TCPOBOP máj hyperpláziát hoz létre a máj előzetes károsodása nélkül. Ez a hatás nem érvényesül CAR-/- egereken, alátámasztva, hogy a TCPOBOP a CAR-on hatva hozza létre a májsejt proliferációt [62].

Mind a parciális hepatectomiát követően, mind TCPOBOP kezelés után a Gadd45b expressiója jelentősen megnő. Szerepe a májregenerációban igen ellentmondásos, antiapoptotikus és apoptózist serkentő tulajdonságot is tulajdonítanak neki, részt vesz a terminális differenciációban, növekedést gátló illetve proliferációt serkentő hatásáról is beszámoltak [63, 64]. A TCPOBOP a CAR-on keresztül aktiválja a Gadd45b-t [65].

A nuclearis receptorok egymás működésére is hatással vannak. Peroxisome Proliferator-Aktivált Receptor α -/- negativ egerekben csökkent CAR expressziót mutattak ki [66], valamint hasonló knock out állatok TCPOBOP kezelés után intenzívebb májsejt proliferációt mutattak, mint a kontroll állatok [67]. CAR -/- egerekben megnövekedett PPARα aktivitást sikerült kimutatni [68]. A TCPOBOP in vivo hepatomitogénként viselkedik, a máj hyperpláziáját eredményezve [69].

doi:10.14753/SE.2013.1780



2. ábra: 1,4-bis[2-(3,5 dichloropyridyloxy)]benzén (TCPOBOP)

II.1.3. A kompenzatorikus hyperplázia és a primer mitogének okozta májsejt proliferáció összehasonlítása

A sebészi és kémiai parciális hepatectomia valamint a primer mitogének okozta májsejt proliferáció közül a humán betegségek okozta májsejt pusztulást követő regenerációt talán a kémiai toxinokkal létrehozott máj necrosis modellezi a legjobban, de e rendkívül bonyolult és sokrétű folyamat egyes lépéseinek tanulmányozásához a PH illetve a primer mitogének indukálta májsejt proliferáció nagy segítséget jelent.

A két folyamat, bár mindkettő a hepatocyták proliferációját idézi elő, eltérő módon bírja rá a májsejteket a mitózisra, számos különbséget találhatunk a hatásmechanizmusuk között.

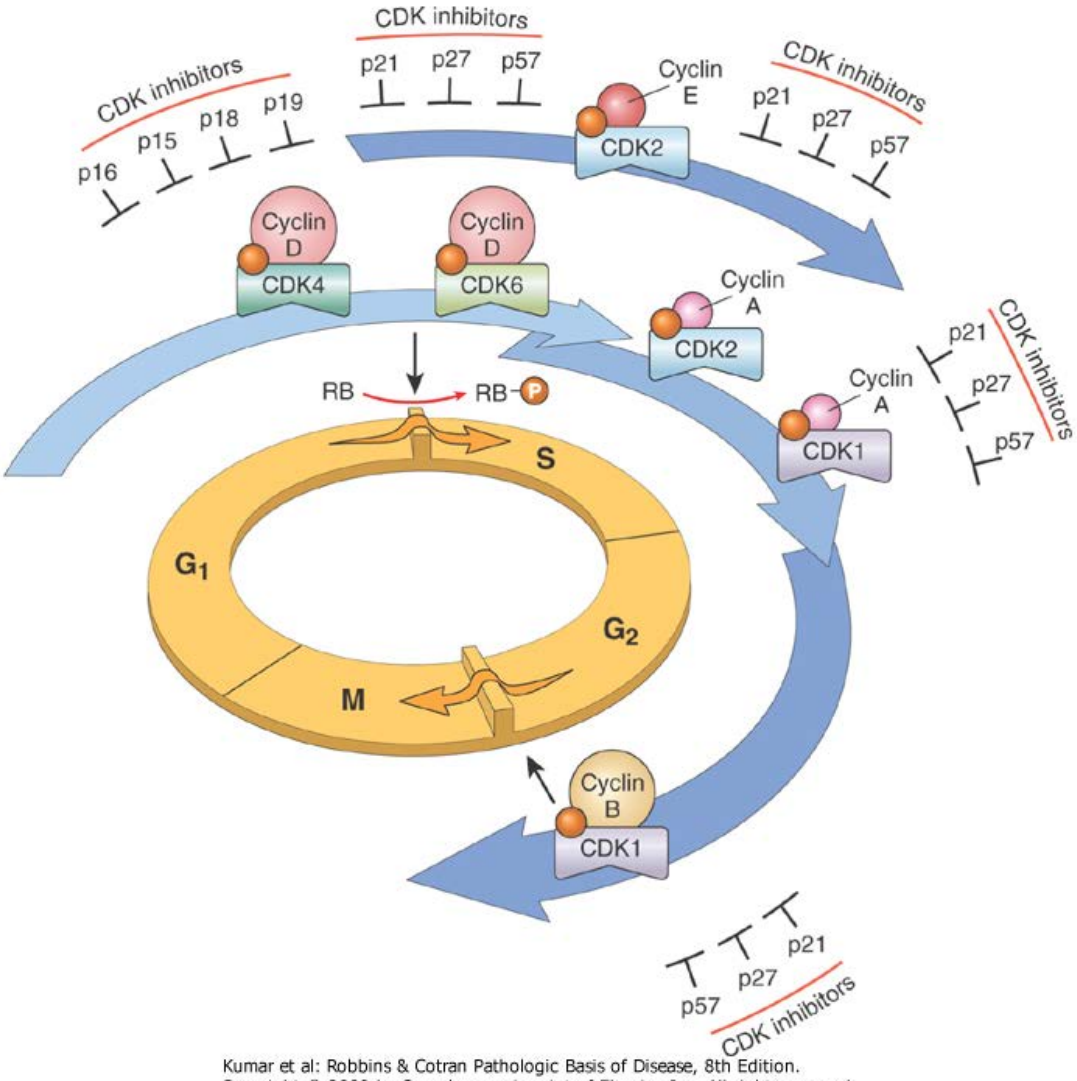
A primer mitogének közös tulajdonsága, hogy a regeneratív hyperpláziában fontos szerepet játszó membrán receptorok helyett transzkripciós faktorként viselkedő nuclearis receptorok szteroid/thyroid családján hatnak (például peroxisome proliferator aktivált receptor-alfa (PPARα), retinsav receptor(RAR), thyroid hormon receptor(THR), konstitutiv androsztén receptor(CAR).

A primer mitogének hatása független számos, a kompenzatorikus hyperpláziában kulcsfontosságú molekulától. A különböző citokinek (IL-6, TNF) [15], növekedési faktorok (HGF, TGFα), transzkripciós faktorok (NF-κB, STAT-3) és az úgynevezett azonnali korai gének (c-fos, c-jun, c-myc) [70] fontos szerepet játszanak a kompenzatorikus májregenerációban, ugyanakkor nem szükségesek a primer mitogének okozta direkt hyperpláziához.

doi:10.14753/SE.2013.1780

A sejtciklust szabályozó gének működésében is vannak különbségek a kétféle sejtproliferáció között.

A sejtosztódás során a sejtproliferációs jelek a különböző jelátviteli pályákon érnek el a sejtmagba, ahol számos gén működését befolyásolják, közöttük a sejtciklust szabályozó génekét is. A sejtciklus egyszerűsített rajza az alábbi 3. ábrán látható.



Kumar et al: Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease, 8th Edition.
Copyright © 2009 by Saunders, an imprint of Elsevier, Inc. All rights reserved.

3. ábra: Egyszerűsített ábra a ciklinek, ciklin dependens kinázok és ciklin dependens kináz inhibitorok szerepéről a sejtciklus szabályozásában [71]. A cyclin D-CDK4, cyclin D-CDK6 és cyclin E-CDK2 szabályozza a G1 fázisból való átmenetet az S fázisba. Cyclin B -CDK1 szabályozza a G2-M fázis átmenetet. A szelektív hatású CDK inhibitorok (p15, p16, p18 és p19) a cyclin D-CDK4 és cyclin D-CDK6 komplexeket gátolják, míg a széles spektrumú CDK inhibitorok (p21, p27 és p57) számos CDK-t képesek gátolni.

A sejtek áthaladását a sejtciklus fázisain keresztül ciklinek által aktivált ciklin dependens kinázok teszik lehetővé. A ciklin A, B, D és E szintje a sejtciklus során periodikusan változik és kötődik különböző ciklin dependens kinázokhoz. Ezen komplexek fehérjéket foszforilálnak, melyek nélkülözhetetlenek a sejtciklusban a tovább haladáshoz. A különböző ciklin-ciklin dependens kinázoknak különböző szerepet tulajdonítanak a ciklus során, például a CDK4 a G1 fázisban, míg a CDK2 az S1 fázisban játszik fontos szerepet.

Úgy a parciális hepatectomiát követően, mint primer mitogének okozta folyamatok során a cyclin-D1 expressziója jelentősen megemelkedik, így fontos szerepet tulajdonítottak neki mindkét folyamat kezdeti lépéseiben [69]. Korábbi tanulmányok szerint önmagában is képes elősegíteni a sejtek G1-ből S fázisba jutását in vivo [72]. A TCPOBOP indukálta hepatocytaproliferáció folyamán a cyclin-D1 szintje jelentősen és sokkal hamarabb megjelenik, mint a PH után, ezért azt gondolták, hogy a cyclin-D1 lehet a felelős a TCPOBOP alkalmazása utáni igen gyors DNS szintézisért [69]. Később ugyanez a munkacsoport kimutatta cyclin D1-/- egereket használva, hogy a cyclin D1 hiánya esetén a TCPOBOP indukálta májsejt proliferáció során csak átmenetileg késik a sejtek G1-ből az S fázisba jutása, a mitogén hatáshoz nem szükséges a jelenléte [14], de az igen gyors válasz elmarad hiányában.

A cyclin dependens kinázokat a cyclin dependens kináz inhibitorok gátolják, így a sejtet akadályozzák a sejtcikluson való végighaladásban. Vannak széles spektrumú ciklin dependens kináz inhibitorok (pl: p21, p27, p57) és szelektív hatásúak (pl. p15, p16, p18, p19). A cyclin D1-gyel ellentétben a G1 fázisban a p27 a cyclin E-CDK2 inhibitoraként akadályozza a sejt továbbjutását a következő fázisba. A mitogén jelek ezen inhibitorok szintjét csökkentik, ezzel is segítve a sejt sejtcikluson való áthaladását.

A kompenzatorikus hyperplasia és a primer mitogének okozta májsejt proliferáció során a sejtciklus szabályozó fehérjék szintjében is mutatkoznak különbségek. A TCPOBOP hatása során a cyclin D1 és az S fázishoz kötődő cyclin A szintje sokkal hamarabb megemelkedett, mint a PH-t követően [69]. A CDK2 expressziója a TCPOBOP indukálta májsejt proliferáció során sokkal kifejezettebben emelkedett mint PH-t követően. Érdekes módon a p21, p27 CDK inhibitorok szintje a PH-t követően különböző mértékben emelkedett, míg a TCPOBOP indukálta proliferáció során nem tapasztaltak változást [69].

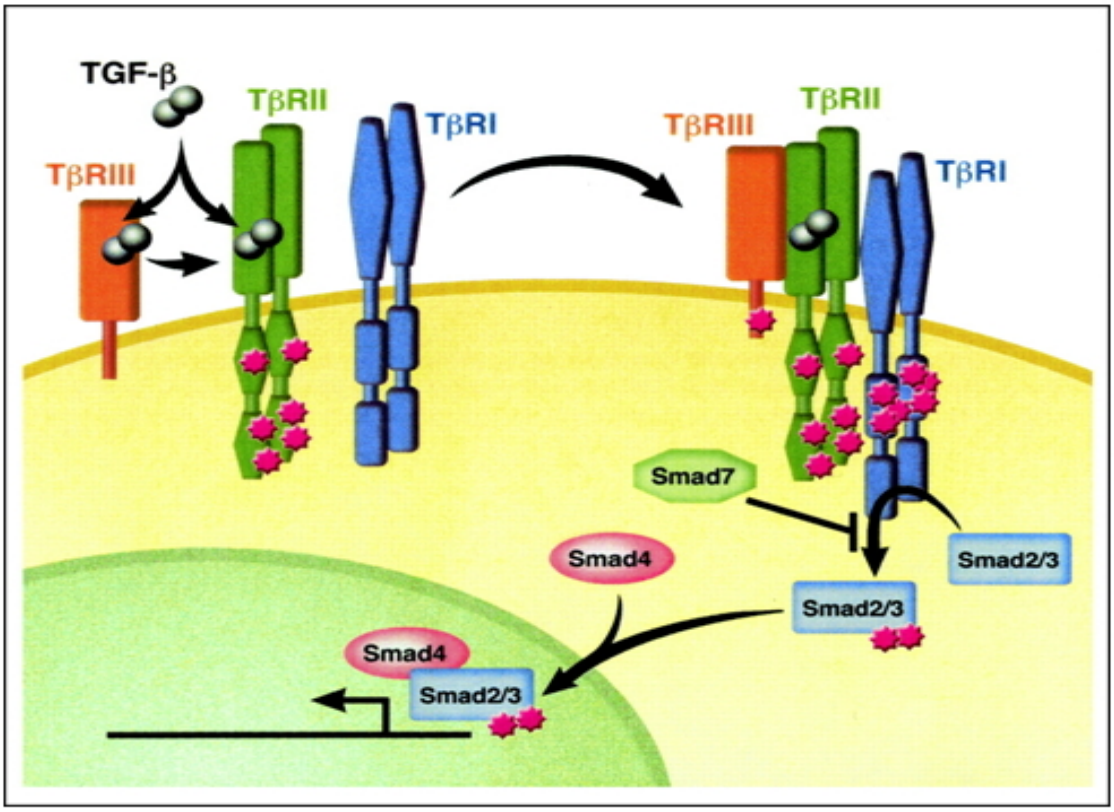
Ismert a parciális hepatectomia promoter hatása a máj carcinogenesis során. A primer mitogének ebből a szempontból is heterogén csoportot alkotnak. Míg a TCPOBOP önmagában is carcinogén, más carcinogénnel együtt pedig promoterként viselkedik, a trijód thyronin kísérletes körülmények között dysplasticus nodulusok visszafejlődését okozta és csökkentette a hepatocelluláris carcinoma kialakulásának valószínűségét mitózist serkentő hatása ellenére [57, 73].

A kompenzatorikus hyperplasia és a primer mitogének okozta májsejt proliferáció során látható egyezések és különbségek feltárása segíthet mind a carcinogenesis mind a regeneráció folyamatának pontosabb megértésében.

II.2. TGFβ1 hatása a heptocyták proliferációjára

A TGFβ1 a TGFβ családba tartozó fehérje (kisebb jelentőségű TGFβ2 és TGFβ3 isoformája is ismert), a szervezetben szinte mindenütt jelen van, igen sokrétű és szerteágazó szereppel bír, például apoptózist indukál különböző szövetekben különböző módon [74] már az embriogenesis során, és ez a tulajdonsága fontos a neki tulajdonított tumorsupressor szerep szempontjából is. A TGFβ1 TGFβ receptorokhoz kötődve Smad közvetített jelúton juttatja az információt a sejtmagba, a célgének transzlációját okozva (4. ábra). Az ép és patológiás májban is számos folyamatban részt vesz [75], jelenlegi tudásunk szerint többek között a májregeneráció végső stádiumában, a növekedés leállításában és a máj fibrosis kialakulásában van igen fontos szerepe. A hepatoblast illetve hepatocyta eredetű daganatsejtekben is kimutatható a termelődése [76]. A TGFβ1 a normál májban döntően a stellat sejtekben és Kupffer sejtekben termelődik [39, 74], inaktív állapotban az extracelluláris mátrixban tárolódik, aktiv állapotában homodimert képez. A parciális hepatectomiát követően igen gyorsan megemelkedik a TGFβ1 szérumszintje [77], majd a döntően a stellat-sejtek és Kupffer-sejtek által termelt új TGFβ1 szintézise is megindul a 2-3. órában és a 72. óráig fokozott marad [39].

doi:10.14753/SE.2013.1780



Elliott R L , Blobe G C JCO 2005;23:2078-2093

4. ábra: A TGFβ jelút vázlatos ábrázolása. TGF-β közvetlenül vagy TβRIII keresztül kötődik II típusú TGFβ receptorhoz (TβRII). Komplexet alkotva a TGFβI (TβRI) receptorral a TβRII foszforilálja és aktiválja a TβRI-et, ami foszforilálja a Smad2-t vagy Smad3-t. A foszforilált Smad2 vagy Smad3 komplexet képez a Smad4-gyel és a sejtmagba kerülnek a célgének transzlációját okozva.

A TGFβ1 igen hatásosan gátolja a májsejtek osztódását sejttenyészetekben [40], apoptózist is indukál. In vivo parciális hepatectomiát követően a regenerálódó májsejtek immunisak a TGFβ1 mitoinhibitor hatására és a TGFβ1 receptorai csökkent expressziót mutatnak a PH-t követő első 48 órában [40, 78].

Immunhisztokémiai vizsgálatokkal kimutatták, hogy a regeneráció során a TGFβ1 fokozatosan, hullámszerűen szabadul fel a parenchymából a periportális területek felől a pericentralis régiók felé haladva. A „hullám” frontja mögött proliferáló hepatocyták jelennek meg. Ez az eredmény azt sugallja, hogy a TGFβ1 felszabadulása és eliminációja a máj parenchymából (és egyidejű megjelenése a plazmában) szükséges a hepatocyták proliferációjához [79]. Más kísérleti rendszerekben a TGFβ1 és activin receptorok blokkolásával bizonyították, hogy a TGFβ1 fontos szerepet játszik abban,

hogy a normál májban a hepatocyták G0 fázisban vannak és képesek ellátni sokirányú feladatukat [41, 42].

Feltételezik, hogy a szabályozott regeneráció leállításában is van szerepe, de ezt kevés kísérleti eredmény támasztja alá. TGFβ1-et túltermelő transzgén egerekben az állandó magas aktív TGFβ1 szérum szint ellenére is lezajlik a regeneráció [80] és TGFβ1 receptor knockout egerek esetében sem volt zavart a regeneráció leállítása [81].

Bizonyosnak tűnik, hogy a regenerálódó szövetek extracelluláris mátrix és ér újdonképződésében fontos szerepe van a TGFβ1-nek. Ezt támasztja alá az is, hogy PH-t követően az új erek és ECM képződése a 3. nap körül kezdődik és ekkor a legmagasabb a TGFβ1 szintje is [82]. A TGFβ1 elősegíti az extracellulásris mátrix újdonképződését és az újdonképződött mátrix képes megkötni és inaktív állapotban tartani mind a TGFβ1-t mind a hepatocyta növekedési faktort (HGF) hozzájárulva a regenerációs folyamat leállításához [82].

A TGFβ1 hatását a primer mitogének okozta májsejtproliferációra még nem vizsgálták.

II.3. Regeneráció cirrhotikus májban

A cirrhosis a máj diffúz megbetegedése, amire a szerv egészének állebenykés átépülése és hegesedése jellemző. Fő humán etiológiai tényezők az alkohol, hepatitis C és B vírus fertőzés, epeúti megbetegedések és a haemochromatosis. Az esetek körülbelül 10 %-ban az ok ismeretlen. A cirrhosis hosszan tartó, májsejteket károsító folyamatot feltételez, melynek során a hepatocyták és a máj kötőszövetes váza folyamatosan pusztulnak, hegesedés alakul ki, de ezzel egy időben regenerációs folyamatok is zajlanak, a májsejtek osztódnak. A májfunkció romlik, hiszen a pótlódó májsejtek nem tudják ellátni feladatukat a strukturális változások miatt. Míg az ép májban a sinusoidok fenestrációja szabad áramlást biztosít az érpálya és a májsejtek között, addig az I. és III. típusú kollagén lerakódása és a sinusoidok fenestrációjának megszűnése, capillarizálódása elzárja egymástól a vért és a hepatocytákat, így az utóbbiak nem tudják ellátni szűrő, átalakító funkciójukat. A szerkezet átépülésével söntök is kialakulnak az artéria hepatica-véna centralis-véna portae között, ami tovább rontja a máj működésének hatásfokát. Klinikailag a cirrhosis sokáig tünetmentes lehet, gyakran fokozott májműködést igénylő állapotokban derül rá fény. Hosszú távú következményei a fokozódó májelégtelenség, a fibrosis, nagyobb érellenállás miatt kialakuló portalis

hypertensióval kapcsolatos elváltozások valamint a hepatocelluláris carcinoma kialakulásának megnövekedett esélye. Emberben a folyamat irreversibilisnek tekinthető. A cirrhotikus máj regenerációjában is fontos szerepet játszik a májsejtek proliferációja. Sajnos azonban a cirrhotikus máj regeneratív kapacitása meglehetősen korlátozott [83-85] és ez a klinikumban is súlyos problémát jelent. A hepatocelluláris carcinoma leghatásosabb kezelése a sebészi eltávolítás [86], ugyanakkor, mivel a hepatocelluláris carcinoma többnyire cirrhotikus májban fejlődik ki, a betegek életkilátásai romlanak a limitált regenerációs képesség miatt. Vizsgálatok szerint a csökkent növekedési képességnek multifaktoriális háttere van, szerepet játszik benne úgy a telomer rövidülés, következményes p53 gátlás fokozódás, mint a DNS károsodás ellenőrző pontjainak aktiválása [87].

Az idős egerek májának regeneratív aktivitása is csökkent a fiatalabb egyedek májaihoz képest, ugyanakkor kísérletesen kimutatták, hogy a primer mitogének ugyanúgy hatnak az idős, mint fiatal állatok májban, az általuk okozott májsejtproliferációban nincs különbség a két csoport között [88, 89]. Ezek alapján felmerül, hogy érdemes megvizsgálni a primer mitogének hatását a szintén csökkent regenerációs képességű cirrhotikus májban is.

II.4. Ductularis reakciók humán májban

Egyes kísérletek alapján rágcsálókban, ha a májsejtek gátoltak az osztódásban, az úgynevezett ovális sejtek szaporodásával és hepatocyta irányú differenciálódásával képes a máj pótolni sejtjeit. Az ovális sejtek eredete tisztázatlan, felmerül, hogy egyfajta máj őssejtről van szó, mely mind biliáris, mind hepatocyta irányba tud differenciálódni. Más munkák szerint mind a májsejtek, mind a biliáris sejtek adott körülmények között képesek egymás őssejtjévé válni. Humán májban hasonló fenotípusú sejteket nem sikerült találni, de számos májat károsító folyamat, amely primeren a biliáris rendszert, a májsejteket vagy mindkettőt érinti, úgynevezett ductularis reakciót vált ki [90]. Míg ezen képletek progenitor/őssejt eredete fel nem merült, meglehetősen elhanyagolták a jelenséget a májpatológiában [91]. Azóta megnövekedett a témával kapcsolatos közlemények száma és kiderült, hogy számos májbetegségben jelen vannak a ductularis reakciók [92-96]. A reakció azonban morfológiailag igen sokféle formában jelenhet meg, ebből fakad a sokféle és sokszor következetlen elnevezések sora is (metaplasztikus ductusok, pszeudotubulusok, stb.). Jelenleg leggyakrabban a típusos és atipusos

ductularis proliferáció megkülönböztetéssel találkozunk. A két csoport között morfológiai különbségek vannak. Az előbbi csoportba az interlobularis ductusokhoz hasonló, lumennel rendelkező képletek tartoznak, melyeket gyakran látunk epeút elzáródás kapcsán. Az utóbbi csoportban a ductulusok hosszú, elongált képletek, melyeket ellapult sejtek bélelnek.

2004-ben a témában járatos szakemberek konszenzusként az összes elváltozásra a ductularis reakció elnevezést javasolták [97].

Időközben azonban kiderült, hogy a ductularis reakciók nem csak morfológiailag [98] különböznek, hanem különböző károsodások esetén különböző ductularis reakciók vannak túlsúlyban, így elemzésükkel esetlegesen a reakciót kiváltó folyamatra is lehet következtetni [98, 99], ezért indokolt lenne mégis egy olyan klasszifikáció, amely reprodukálható, megfelelően objektív módszer segítségével a morfológiai, etiológiai és funkcionális különbségeket is tükrözve képes csoportokat alkotni. A mindennapi gyakorlatban széles körben alkalmazott immunhisztokémiai vizsgálatok technikailag alkalmasak lehetnének az elkülönítésre.

doi:10.14753/SE.2013.1780

III. CÉLKITŰZÉSEK

1. Hogyan befolyásolja a TGFβ1 a TCPOBOP által kiváltott proliferatív választ egér májban?

2. Előidézhető-e hyperplázia fibrotikus májban TCPOBOP-pal?

3. Osztályozhatóak-e a humán májban kialakult ductularis reakciók immunfenotípusuk alapján?

doi:10.14753/SE.2013.1780

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

IV.1. Kísérleti állatok

Az általunk használt transzgén egérvonalat az Egyesült Államok Nemzeti Rákkutató Intézetében (NCI, NIH Bethesda MD) állították elő. Az egerek Snorri Thorgeirsson ajándékaként kerültek Intézetünkbe 2005-ben. Azóta saját állatházunkban standard körülmények között tartjuk külön az egereket. Röviden a genetikai háttérről, a transzgén egerekben sertés TGFβ1 gén található egy egér albumin promoter/enchancer regulátor génszakasz mögé klónozva. Ez az elrendezés biztosítja a transzgén hepatocytákra korlátozódó magas szintű expresszióját. A transzgénben a Cys223és Cys225 kodont szerin kodonra cserélték ki. Ennek eredményeképpen aktív TGFβ1 termelődik a májsejtekben, ami nem igényel további proteolitikus átalakítást. Intézetünkbe a #25 egérvonal került, melyben a transzgén az Y kromoszómába épülve található. Ennek megfelelően a hím egerek hemizigótának tekinthetőek, a nőstényekben pedig nincs jelen a transzgén. Ez megkönnyíti az egérvonal fenntartását. Az egerek szérumában magas a TGFβ1 szint, ami számos extrahepatikus hatással is jár (glomerulonephritis, vasculitis, hasnyálmirigy és hereatrófia). A kísérleteinkben felhasznált egerek szérum TGFβ1 szintjét nem vizsgáltuk, a transzgén jelenlétét PCR vizsgálattal ellenőriztük az állatok farkából izolált DNS-ben.

TCPOBOP hatása TGFβ1 transzgén egerekre

Nyolc hetes hím transzgén és azonos korú és nemű kontroll egereknek (C57BL) gyomorszondán át 10% dimetil szulfoxid és 90% napraforgóolaj keverékében feloldva 3 mg/kg TCPOBOP-ot (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) adtunk. Az állatokat a kezelés után az táblázatban szereplő időpontokban öltük le. (1. táblázat)

doi:10.14753/SE.2013.1780

1. táblázat: Az kísérletben vizsgált transzgén és vad típusú egerek száma a TCPOBOP kezelést követő különböző időpontokban és a kumulatív mérés alkalmával óra

	0.	24.	30.	34.	38.	42.	72.	KUMULATÍV
	ÓRA							
Transzgén egerek (db)	6	8	9	4	10	10	7	10
Vad típusú egerek (db)	13	11	10	5	6	8	10	12

Rögzítettük az állatok és a májak súlyát. A májakat kettéosztottuk, egy részét formalin/alkohol keverékében fixáltuk, másik részét folyékony nitrogénben fagyasztottuk és -80 ˚C-on tároltuk.

TCPOBOP hatása fibrotikus májakra

Máj fibrosist kétféle módszerrel idéztünk elő. Az első csoportba tartozó egerek (C57BL) esetében hat hetes koruktól kezdődően tizenöt héten át tioacetamidot oldottunk az ivóvizükben 200 mg/ml koncentrációban. A második csoportba tartozó állatok esetében 1 ml/ kg koncentrációjú széntetrakloridot napraforgó olajba keverve juttattunk 15 héten át az állatok gyomrába heti két alkalommal szonda segítségével. Kontrollként azonos korú és nemű kezeletlen (C57BL) állatokat használtunk.

A fibrosist előidéző vegyületek adagolásának leállítása után két héttel egyszeri 3mg/kg TCPOBOP-pal kezeltük a fibrotikus májú és a megegyező korú kontroll egereket. A fibrosis mértékét TCPOBOP kezelés időpontjában leölt állatok májából készült picrosiriussal festett metszeteken ellenőriztük. (9. ábra) Az állatokat a kezelés után a 2. táblázatban szereplő időpontokban öltük le, majd ugyanúgy jártunk el, mint az előző kísérletben.

doi:10.14753/SE.2013.1780

2. táblázat: A kontroll, a TAA és CCl4 kezelt állatok száma a TCPOBOP kezelés időpontjában, 36 óra múlva és a kumulatív mérés esetén

	0.	36.	KUMULATÍV
	ÓRA		
Kontroll (db)	4	4	5
CCl4 (db)	4	3	16
TAA (db)	4	3	14

Az állatkísérletek során a NIH előírásai szerint jártunk el, kísérletünket a Budapesti Állatorvosi Bizottság engedélyével (399/003/2005) végeztük.

IV.2. Szövetminták

Vizsgálatainkhoz a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet archivumából négy normál és 69 ductularis reakciót tartalmazó máj biopsziás szövetmintát használtunk. A klinikai adatokat az 3. táblázat tartalmazza.

IV.3. DNS szintű vizsgálatok - A TGFβ1 hemizygota státusz ellenőrzése

IV.3.1. DNS izolálás egérfarokból

A 0.5-1 cm-es mintákat szikével feldaraboltuk. A hozzáadott 400 µl lízis pufferrel (20 mM NaCl, 2 mM EDTA, 40 mM TRIS pH=7,9 , 5% SDS), 20 µl Proteináz K-val (Roche) és 2-3 µl βmerkaptenollal egy éjszakán át 37 ˚C fokon inkubáltuk, miközben 300 rpm-mel rázattuk, majd 94˚C-on 10 percig forraltuk. Ezután 15 percig jégen hűtöttük, majd 15 percig 13000 rpm-mel centrifugáltuk. A felülúszót leszívtuk és hozzáadtunk 50 µl 5M-os NaCl-ot. Ismét 15 percig hűtöttük jégen, majd 10 percig centrifugáltuk 13000 rpm-mel. A felülúszót ismét leszívtuk és a DNS-t 1 ml hideg abszolút etanolban -20˚C fokon inkubáltuk egy éjszakán át. Másnap ismét 13000 rpm-mel 10 percig centrifugáltuk, a felülúszót leöntöttük a csapadékot kiszárítottuk, majd 50 µl TE pufferben feloldottuk. A DNS koncentrációt 260 nm-en Nanodrop spectrofotométerrel ellenőriztük.

doi:10.14753/SE.2013.1780

IV.3.2. A genotípus meghatározása polimeráz láncreakcióval

A templát 5 µl, ebben 100 ng DNS van. Pozitív kontrollként ismert TGFβ1 transzgén mintát használtunk, negatív kontrollként templát helyett vizet adtunk az elegyhez (3. táblázat). A reació 35 cikluson keresztül zajlott, a reakció hőprofilja az 4. táblázatban látható.

A primer szekvenciák a következők voltak:

Forward: Albu: GGCAAACATACGCAAGGGA

Reverz: Új TGFβ1: AGAATCTGGCCGCGAATGG

3. táblázat: TGFβ1 PCR elegy összetétele

KOMPONENS		MENNYISÉG
RedTaq Mix (Invitrogen)		12,5 µl/reakció
Primerek (Sigma)	TGFβ1	0,2 µl/reakció
	Albumin	0,2 µl/reakció
H_2O		7,1 µl/reakció
Templát		5 µl/reakció
Összesen		25 µl/reakció

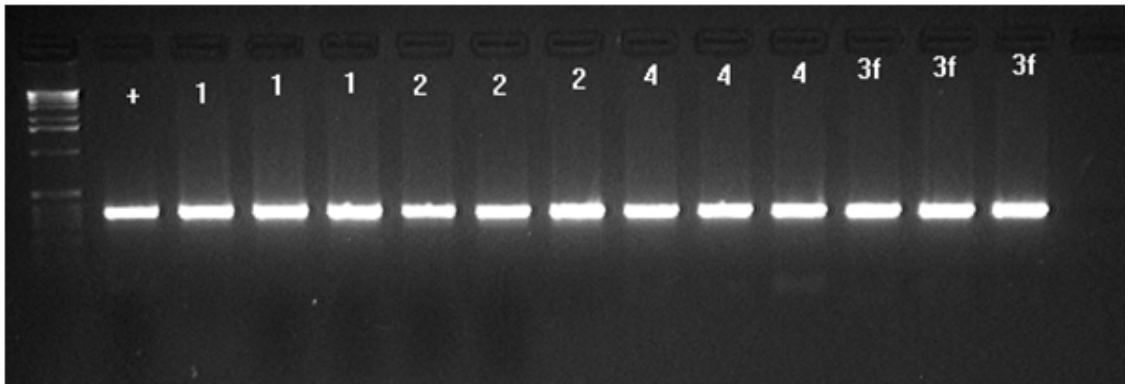
4. táblázat: A PCR reakció hőprofilja

HŐMÉRSÉKLET	IDŐ	
95°C	5 perc	
95°C	30 mp	35 ciklus
60°C	1 perc	
72°C	1 perc	
72°C	3 perc	

IV.3.3. Gélelekroforézis

2%-os agarózban futtattunk mind a négy mintából 3-3-at 100V konstans feszültség mellett 30 percig. 370 bp magasságban megjelent a TGFβ1 transzgén (5. ábra).

doi:10.14753/SE.2013.1780



5. ábra: TGFβ gélelektroforézis. 370 bp-nál a kontroll mintával megegyezően láthatóvá váltak a termékek

IV.4. RNS szintű vizsgálatok

Kísérleteink során a cyclinA, TGFβ-1, TGFβ-2, TGFβ-3, Cytochrom 2b10, p27, PPARα, Gadd45b és a cyclinD mRNS expressziójának meghatározásához teljes RNS izolálást követően valós idejű kvantitatív PCR-rel végeztük a mennyiségi meghatározást.

IV.4.1. RNS izolálás

Az állatkísérletekben a -80 ˚C tárolt májmintákból teljes RNS izolálást végeztünk. Az izoláláshoz Trizol reagenst használtunk. A mintákból körülbelül 1mm³-t 1 ml Trizolban (Invitrogen, Cat.No.:15596-018) homogenizáltunk. Az elegyhez 200 µl kloroformot mértünk, majd vortexelés után 10000 g-vel 15 percig centrifugáltuk. Ezután az óvatosan eltávolított felső fázishoz 0.5 ml isopropanolt adagoltunk, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. További 10 perces 10000 g-vel történő centrifugálás után a felülúszót leöntöttük, 1 ml etanolt adtunk az üledékhez és ismét 10 percig 10000 g-vel centrifugáltuk. A centrifugálás után képződött felülúszót ismét leöntöttük, az RNS-t tartalmazó üledéket, a kémcsövet jégbe állítva, beszárítottuk. Az anyagot 50 µl DEPC-es (dietil pirocarbonát) vízben vettük fel, majd 37 ˚C-on inkubáltuk. Az RNS koncentrációt fotométerrel (Gene Quant II, Cambridge, UK) ellenőriztük 260 nm hullámhosszon, majd a további felhasználásig -80 fokon tároltuk.

doi:10.14753/SE.2013.1780

IV.4.2. Reverz transzkripció

Az RNS átírását cDNS-re, azaz a reverz transzkripciót a gyártó által ajánlott nagy kapacitású cDNS High Capacity Archive kittel (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) végeztük. Minden esetben 2.5 μg RNS-t írtunk át. Az elegy végtérfogata a reagensek bemérése után 100 μl volt. A keverék összetétele a 5. táblázatban látható.

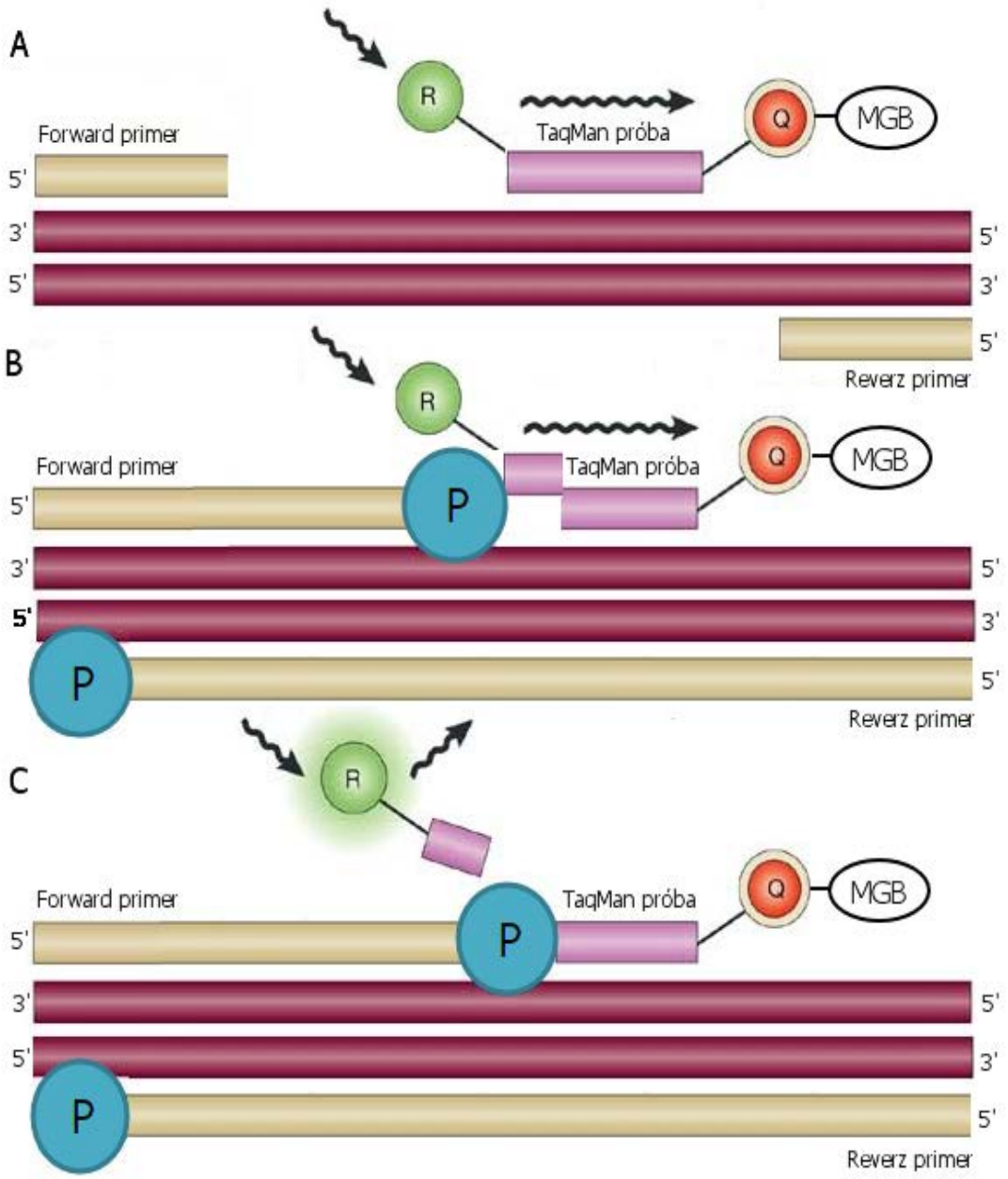
5. táblázat: A revers transzkripciós keverék összetétele

KOMPONENS	MENNYISÉG
RT puffer (10x)	10 μl
dNTP mix (100mM)	4 μl
Random hexamer (10x)	10 μl
Reverz transzkriptáz (50 U/ μl)	5 μl
RNS templát	2.5 μl
Nukleáz mentes víz	100 μl-re kiegészítve

IV.4.3. Valós idejű kvantitatív PCR

A PCR-t ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Biosystems, Weiterstadt, Germany) alkalmazásával végeztük **Cyclin A** (Assay ID: Mm01289636_m1), **Cyclin D1** (Assay ID: 00432357_m1), **TGFβ-1** (Assay ID: Mm01178819), **TGFβ-2** (Assay ID: Mm00436955-m1), **TGFβ-3** (Assay ID. Mm00436960-m1), **PPARα** (Assay ID: Mm00627559_m1), **Gadd45b** (Assay ID: Mm00435123-m1) és **Cytochrom2b10** (Assay ID: Mm00456592_m1) ABI TaqMan gén expressziós próbákkal a gyártó utasításai szerint. Belső kontrollként Glyceraldehid-3-foszfatáz dehidrogenázt (GAPDH) használtunk. Az eredményeket három független mérés átlagaként definiáltuk. A GAPDH expresszióját TaqMan Control Reagent (Applied Biosystems) segítségével határoztuk meg. A TaqMan rendszerű próbák megfelelően specifikusak, hiszen 3 oligonukleotid egyidejű bekötődése szükséges az amplifikáció létrejöttéhez, valamint mivel a próbákat exon-exon határra tervezték, megakadályozza a genomiális DNS amplifikációjának lehetőségét. A TaqMan próba működését a 6. ábra mutatja.

doi:10.14753/SE.2013.1780



6. ábra:

A, A TaqMan próba 5’ végén lévő fluoreszcens reporter molekula fluoreszcenciáját a 3’ végén lévő quencher molekula kioltja a térbeli közelség miatt.

B, A DNS polimeráz 5’-exonucleáz aktivitása miatt az amplifikáció során a próbát hasítja.

C, A hasítás miatt a reporter molekula eltávolodik a quencher molekulától, így az már nem nyeli el a fluoreszcenciát, mérhetővé válik.

doi:10.14753/SE.2013.1780

A TaqMan próbák 20-30 bázispár hosszú oligonukleotidok, melyek az amplifikálandó régió középső szakaszával komplementerek. Az oligonucleotidok 5' végét fluoreszcens festékkel jelölték, ezt hívják reporternek. A próba 3' vége a reporter fluoreszcenciáját kioltó úgynevezett nem fluoreszcens quencher (NFQ) molekulát tartalmazza. A próbák NFQ molekulához kapcsolva hordozza az úgynevezett „minor groove binding" (MGB) molekulát, ami a próba olvadáspontjának emelkedését eredményezi annak hossznövekedése nélkül. A próba intakt állapotában a kioltó molekula (NFQ) a reporter molekula fluoreszcenciáját elnyeli. A két molekula közelsége teszi lehetővé az energia átadást, ami fluoreszcens rezonancia energia transzferrel (FRET) történik. Az amplifikáció során a DNS polimeráz 5'-exonukleáz aktivitásának köszönhetően hasítja a próbát, így a reporter távolabb kerül az NFQ molekulától, amely így már nem nyeli el a reporter által kibocsájtott fluoreszcenciát. A reakció folyamán egy detektor érzékeli az exponenciálisan növekvő fluoreszcenciát, ami arányos az adott minta kiindulási RNS tartalmával, a vizsgált gén expressziós mennyiségével.

A PCR amplifikációhoz 100 ng cDNS templátot használtunk. A reakció 50 cikluson keresztül 20 µl végtérfogatban zajlott (6. táblázat), a GAPDH esetében AssayOnDemand helyett GAPDH TaqMan Control Reagent-et használtunk.

6. táblázat: A reakcióelegy összetétele

KOMPONENS	**MENNYISÉG**
TaqMan Master Mix (2x)	10 µl
AssayOnDemand (20x)	1 µl
cDNS templát	100 mg
Nukleáz mentes víz	20 µl-ig

Az ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Weiterstadt, Németország) valós idejű PCR készülékben zajló reakció hőprofilja a 7. táblázatban látható. Ez az úgynevezett kétlépcsős PCR-nek felel meg, ahol az anelláció és az extenzió azonos hőmérsékleten megy végbe.

doi:10.14753/SE.2013.1780

7. táblázat: A PCR reakció hőprofilja

LÉPÉS	HŐMÉRSÉKLET	IDŐ
Aktiváció	50˚C	2 min
Kezdeti denaturáció	94˚C	10 min
Denaturáció	94˚C	15 sec
Anelláció/Extenzió	60˚C	1 min

A cyclinA, TGFβ1, Cytochrom 2b10, p27, cyclinD, TGFβ2, TGFβ3, PPARα, GADD45b és GAPDH amplifikálása azonos feltételek mellett történt. Minden esetben három párhuzamos reakciót futattunk.

Az adatokat az SDS 1.3 (Sequence Detection Softver) programmal értékeltük.

A valós-idejű PCR eredményeit Ct értékek formájában kaptuk. Ct érték (cycle treshold) azt a ciklusszámot jelöli, ahol a relatív fluoreszcencia érték eléri a beállított küszöbértéket a reakció exponenciális fázisában. Az expressziós szintek számolása a ΔCt módszerrel történt. Ennek során a vizsgált (cyclinA, TGFβ1, Cytochrom 2b10, p27, cyclinD, TGFβ2, TGFβ3, PPARα, GADD45b) és belső standardként (GAPDH) használt gén Ct értékeit meghatároztuk. Valamennyi érték a három párhuzamosan futtatott minta átlagát mutatja.

Képlet: ΔCt(vizsgált gén)- ΔCt(GAPDH)= ΔCt

Relatív expresszió (vizsgált gén/GAPDH) = $2^{\Delta Ct}$

A GAPDH-hoz való normalizálással kiküszöböljük, hogy a templát bemérési különbségek illetve az RNS degradáció miatt jelentkező különbségeket valós eltéréseknek tekintsük.

doi:10.14753/SE.2013.1780

IV.5. Immunhisztokémiai vizsgálatok

IV.5.1. A sejtproliferáció vizsgálata kísérleti állatok májában

A sejtproliferációt a BrdU (Sigma-Aldrich, St Louis MO) beépülés meghatározásával vizsgáltuk. A BrdU egy bázis analóg, ami beépül az S fázisban lévő sejtek DNS-ébe és ott stabilan megmarad. Jelenléte immunhisztokémiai módszerrel mutatható ki.

„Pulse" jelölés

A „pulse" jelölés során az állatok leölése előtt egy órával intraperitoneálisan 100mg/kg BrdU-t adtunk.

Kumulatív jelölés

A kumulatív kezelés során a TCPOBOP kezelés után 5 napig, a leölésig, az állatok ivóvizéhez 1mg/ml BrdU-t adagoltunk, ami így a kezelés után valamennyi sejtcikluson áthaladó sejt DNS-ébe beépült. A beépült BrdU-t a fixált és beágyazott májakból készült standard 4-5 μm vastag szövettani metszeteken immunhisztokémiai reakcióval mutattuk ki.

Deparaffinálást követően a metszeteket 2N HCl oldatban denaturáltuk egy órán keresztül, majd 0.1%-os tripszinnel emésztettük 20 percig. Primer antitestként egér monoclonális anti-BrdU antitestet használtunk (1:100, Becton Dickinson, San Jose, CA). Az antitest kötődését VECTASTAIN Elite ABC kittel (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) DAB chromogénnel tettük láthatóvá. A jelölési indexet 100 sejtmagra jutó BrdU pozitív magok számával adtuk meg. Mintánként 5000 sejtmagot számoltunk le.

Apoptózis vizsgálata

Az apoptotikus rátát a gyártó utasítása szerint Click-iT TUNEL Alexa Fluor Imaging Assay-vel (Invitrogen #C10245) határoztuk meg. Mintánként 5000 sejtmagot számoltunk le.

IV.5.2. Immunhisztokémiai vizsgálatok human szövetmintán

A humán mintákon végzett vizsgálatok során a parafinba ágyazott anyagból szintén 5 μm vastag metszeteket készítettünk, majd deparafinálást követően **CK7** (Biogenex, San Ramon, CA, USA: MU255-UC, 1:50), epiteliális membrán antigén (**EMA**) (Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, UK: EMA-C-CE, 1:50), **CD10** (Novocastra, NCL-

CD10-270, 1:10) és **CD56** (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA: 559 043, 1:50). Az antitest kötődését VECTASTAIN Elite ABC kittel (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) DAB chromogénnel tettük láthatóvá.

Minden metszetet minden immunhisztokémiai vizsgálat esetén vakon vizsgáltunk anélkül, hogy tudtuk volna a többi reakcióval kapott eredményt. A reakciók heterogén volta miatt minden mintát kétfokozatú skálán értékeltünk, a reakciókat aszerint tartottuk pozitívnak illetve negatívnak, hogy pozitív vagy negatív sejtek voltak-e túlsúlyban a mintában.

Betegek

4 normál és 69 ductularis reakciót tartalmazó mintát vizsgáltunk a Semmelweis Egyetem I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet archivumából. A vizsgálat a Helsinki Egyezményben foglaltakkal és a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottsága állásfoglalásával összhangban történt.

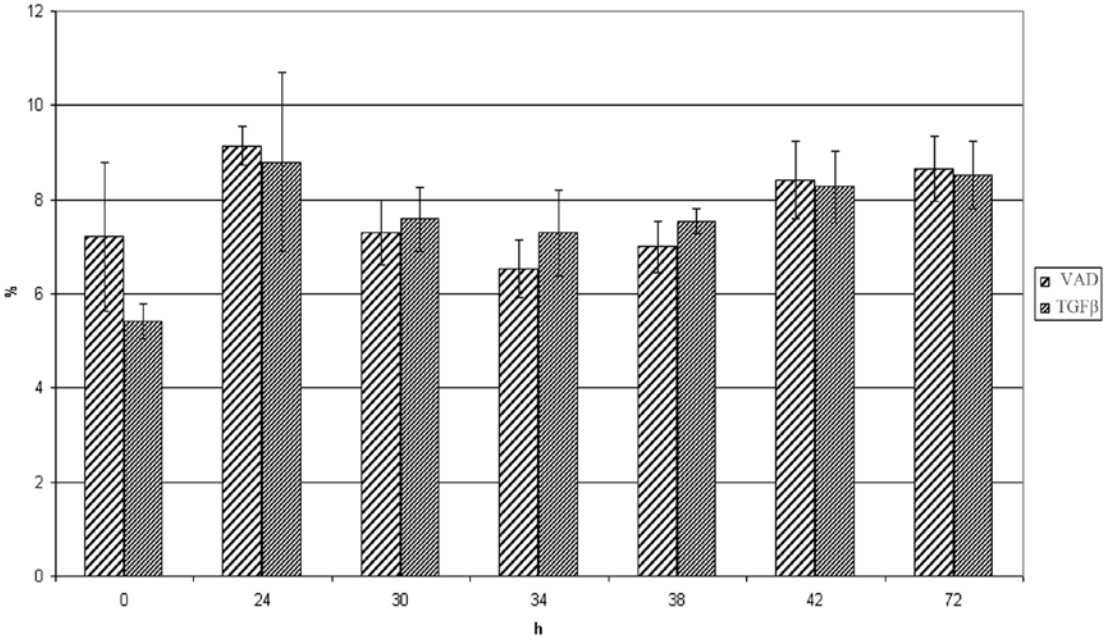
A statisztikai analízist Fisher teszttel végeztük.

doi:10.14753/SE.2013.1780

V. EREDMÉNYEK

V.1. TGFβ1 hatása a primer mitogén okozta májsejt proliferációra

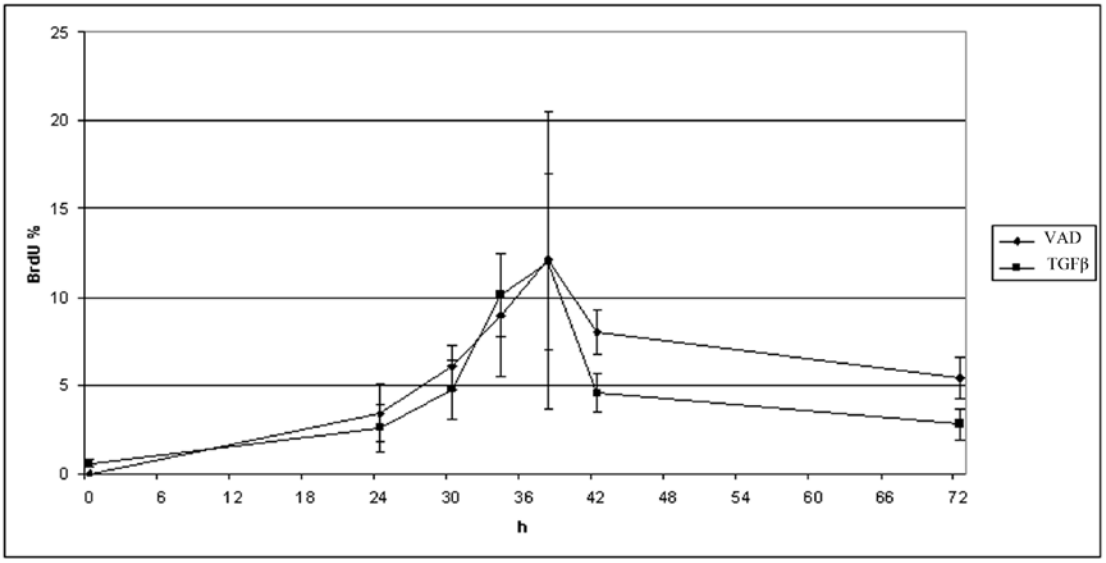
A TCPOBOP egyszeri adagja mind a TGFβ1-t túlexpresszáló transzgén egerekben, mind a vad típusban májsejt proliferációt idézett elő. A kezeletlen állatokban a vad típusú állatok mája kissé, de nem szignifikáns mértékben nagyobb volt. A kezelés hatására az állatok testsúlyához viszonyított májsúlya kismértékű emelkedést mutatott, a két csoport között nem volt különbség egyik vizsgált időpontban sem (7. ábra).



7. ábra: A relatív májsúlyok (a testsúlyhoz viszonyított májsúly százalékban kifejezve) a transzgén illetve vad típusú állatokban TCPOBOP kezelést követően

A sejtproliferáció mértékét a DNS-be beépült BrdU immunhisztokémiai vizsgálatával tanulmányoztuk mikroszkóppal leszámolva a pozitív hepatocyta magok arányát. A DNS szintézist kétféle megközelítéssel vizsgáltuk. Egyetlen, úgynevezett „pulse” jelölést követően az éppen aktuálisan S fázisban lévő sejtek jelölődtek. A több időpontban elvégzett vizsgálat felvilágosítást nyújtott a proliferáció dinamikájáról. Az állatok egy másik csoportja a TCPOBOP kezelést követő 5 napban BrdU tartalmú vizet ivott. Ezekben az állatokban a BrdU pozitív magok leszámolásával meg tudtuk határozni a sejtciklusban részvevő sejtek arányát, vagy másként a „proliferációs pool”-t.

doi:10.14753/SE.2013.1780

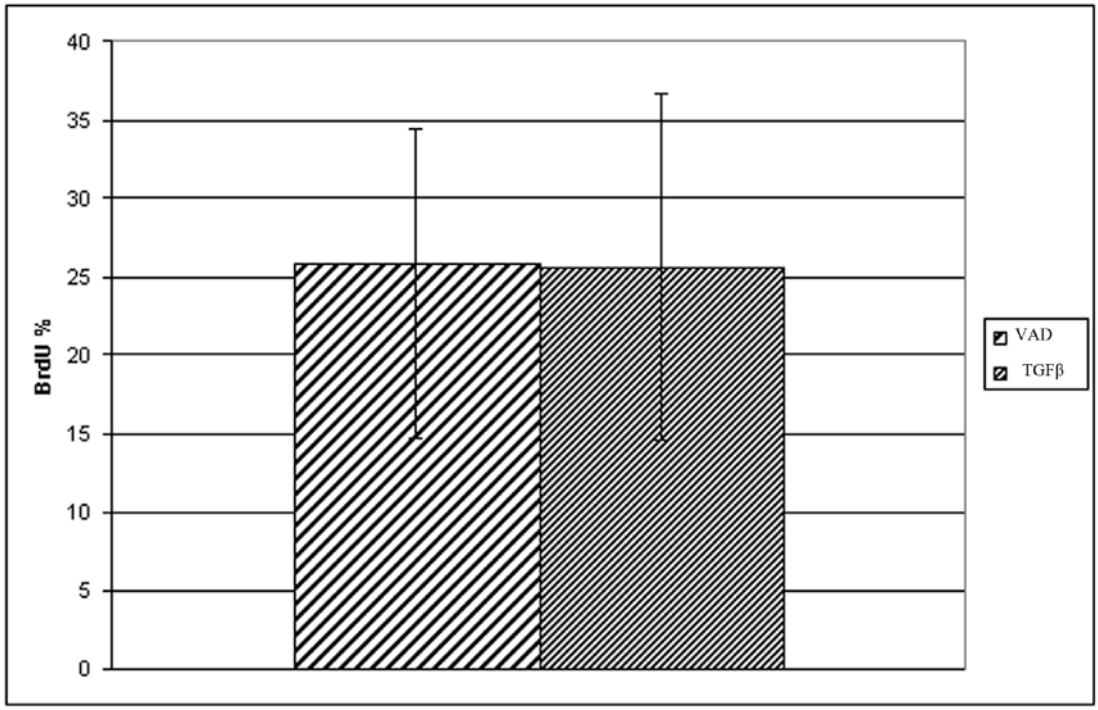


8. ábra: Bromodeoxyuridin (BrdU) jelölődés a transzgén és vad típusú állatokban TCPOBOP kezelést követően. A BrdU-t az állatok leölése előtt 1 órával alkalmaztuk

A proliferatív válasz az egerek mindkét csoportjában igen hasonló volt. A proliferációs aktivitás az expozíciót követő 38. órában volt a legmagasabb és egyik időpontban sem volt szignifikáns különbség a transzgén és vad típusú állatok között (8. ábra).

A folyamatos 5 napos BrdU adagolást követően az összes, sejtciklusan áthaladt hepatocyták arányában sem tapasztaltunk különbséget a csoportok között (9. ábra).

doi:10.14753/SE.2013.1780

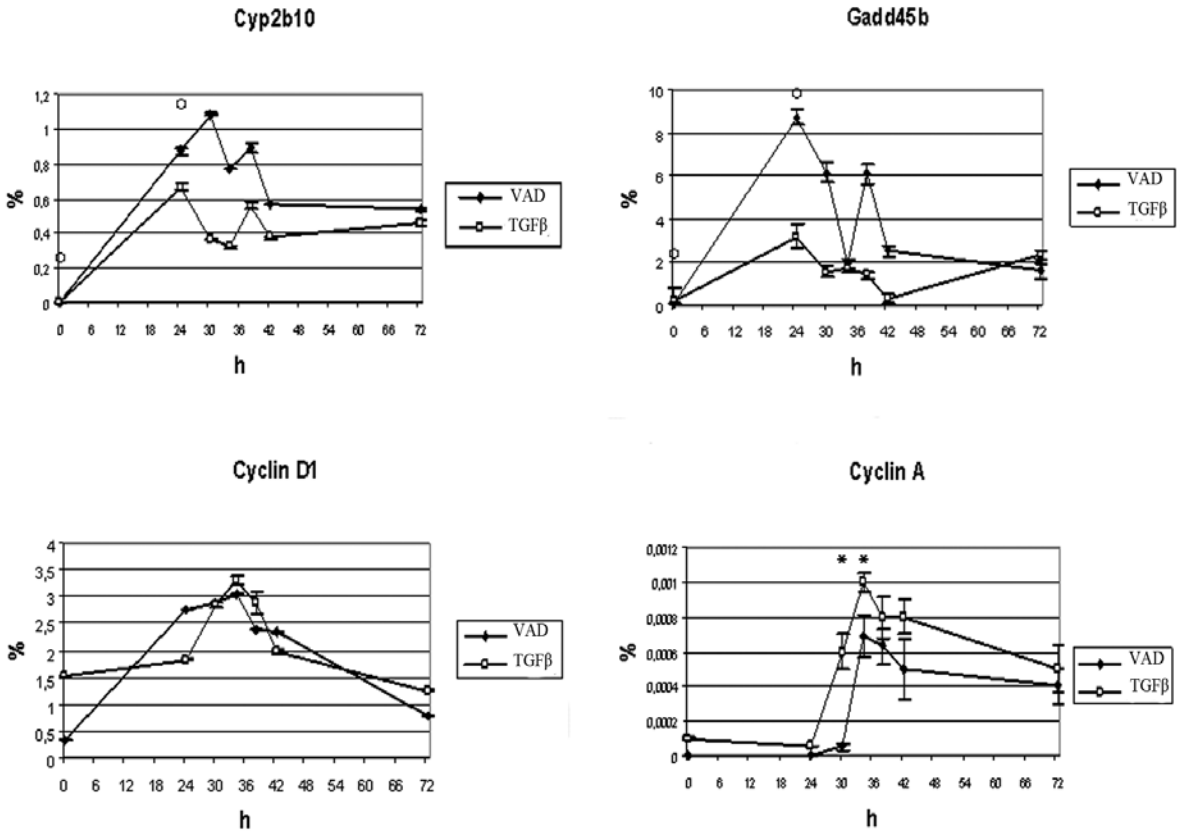


9. ábra: Kumulatív bromodeoxyuridin (BrdU) jelölődés a transzgén és vad típusú állatokban. A BrdU-t 5 napon keresztül adagoltuk az állatok ivóvizébe a TCPOBOP kezelést követően

Az TUNEL assay-vel meghatározott apoptotikus ráta igen alacsony volt a kezeletlen állatokban (1.66±1.15 vs. 2±1/5000 májsejt a vad típusú és transzgén egerekben) és a kísérlet utolsó időpontjában sem változott az értéke (1±1.15 vs. 2.33±1.52/5000 májsejt 72 órával a TCPOBOP kezelést követően).

A valósidejű PCR-ral végzett génexpressziós vizsgálatokban a TCPOBOP receptoraként működő CAR célgénjeinek a Cyp2b10-nek és Gadd45b-nek hirtelen expresszió-növekedését tapasztaltuk mindkét kísérleti csoportban (10a. ábra), de az emelkedés mértéke jelentősen alacsonyabb volt a transzgén egerekben. Két proliferációs aktivitást tükröző gén mRNS expresszióját is vizsgáltunk, a cyclin A-t és cyclin D1-et. A cyclin D1 expresszió hamarabb megemelkedett, mint a cyclin A, de mindkét cyclin expressziójának csúcspontja 34 óránál volt (10a. ábra). A cyclin A expressziója valamivel magasabb volt a transzgén egerekben, két időpontban a különbség szignifikánsnak is bizonyult.

doi:10.14753/SE.2013.1780

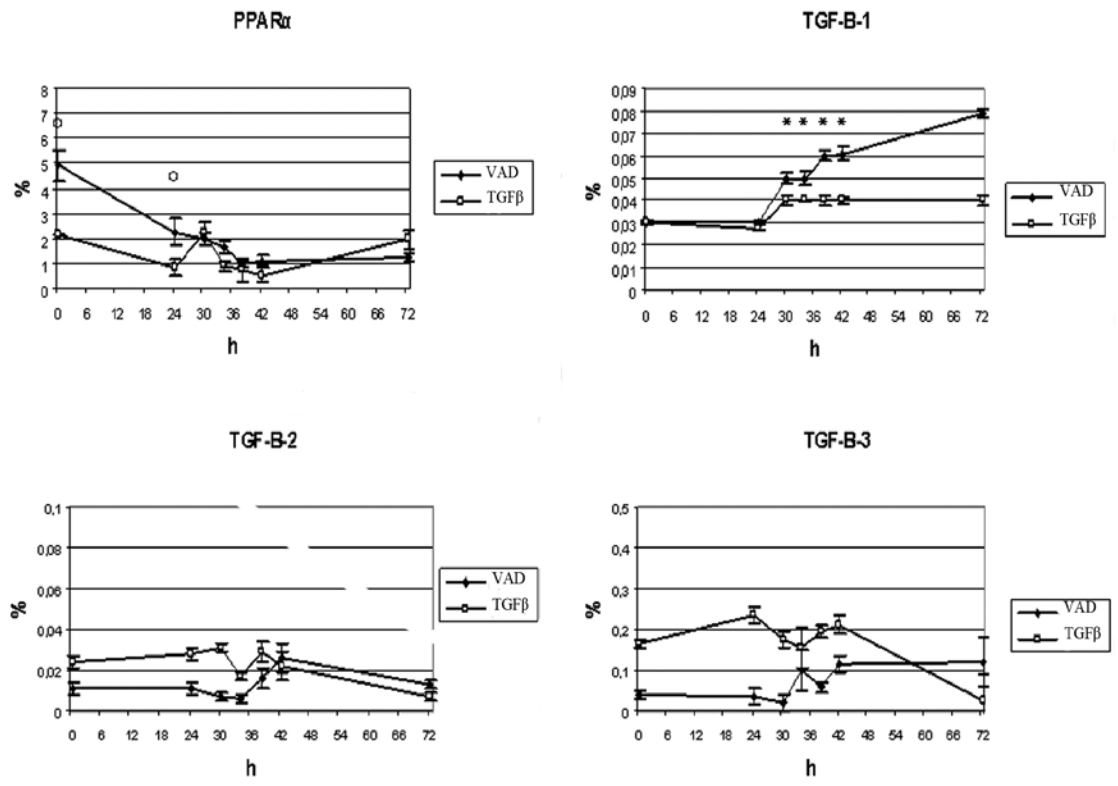


10a. ábra: Különböző gének gén expressziós vizsgálata (a GAPDH-hoz viszonyítva) valós idejű reverz transzkripciós polimeráz láncreakció segítségével transzgén és vad típusú állatokban a TCPOBOP kezelést követő különböző időpontokban. P <0.05 esetében a különbséget statisztikailag szignifikánsnak tekintettük

(* A gén expresszió statisztikailag különböző volt a vad típusú és transzgén állatokban.

○ A gén expressziók statisztikailg különbözőek a megjelölt időpontokban mind a transzgén, mind a vad típusú állatokban.)

doi:10.14753/SE.2013.1780



10b. ábra: Különböző gének gén expressziós vizsgálata (a GAPDH-hoz viszonyítva) valós idejű reverz transzkripciós polimeráz láncreakció segítségével transzgén és vad típusú állatokban a TCPOBOP kezelést követő különböző időpontokban. P <0.05 esetében a különbséget statisztikailag szignifikánsnak tekintettük

(* A gén expresszió statisztikailag különböző volt a vad típusú és transzgén állatokban.

○ A gén expressziók statisztikailg különbözőek a megjelölt időpontokban mind a transzgén, mind a vad típusú állatokban.)

Vannak jól ismert kölcsönhatások a különböző nucleáris receptorok között, ezért vizsgáltuk a PPARα expresszióját. Eredményeink szerint mindkét állatcsoportban csökkent az expressziója TCPOBOP kezelést követően (10b. ábra).

Megvizsgáltuk a TGFβ1 valamint a TGFβ2 és TGFβ3 gén expresszióját is.

Az alap TGFβ1 expresszió mindkét csoportban azonos volt. Ez azért nem meglepő, mert az alkalmazott primerek nem ismerik fel a transzgén produktumait. Érdekes, hogy a TGFβ1 expresszió a 30. órától megnőtt, a változás a vad típusú állatokban kifejezettebb volt.

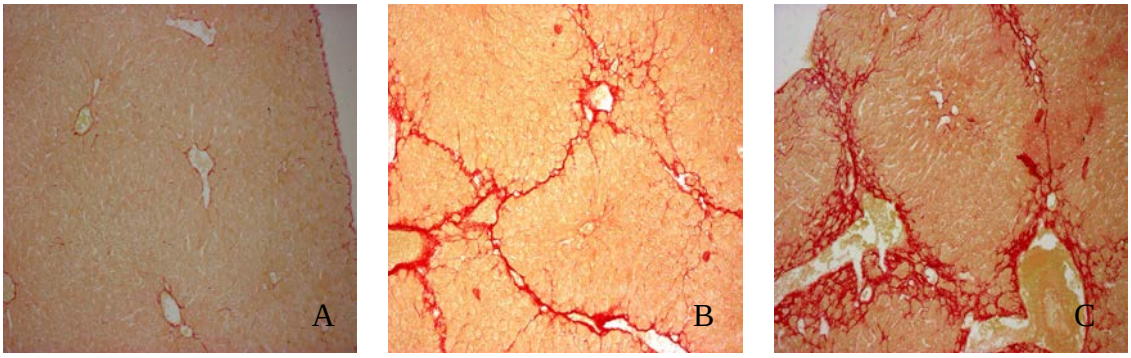
A TGFβ2 és és TGFβ3 esetében szignifikáns változást nem tapasztaltunk a kísérlet során (10b. ábra).

Statisztikai elemzés:

Az eredményeket Student teszttel értékeltük.

V.2. Primer mitogén hatása fibrotikus májra

A máj fibrózisát két különböző állatcsoportban tioacetamid illetve széntetraklorid krónikus adagolásával értük el az egerekben. A fibrosist okozó vegyületek megvonását követően az állatokat normál tápon és ivóvízen tartottuk két hétig. Ezekben a kísérleti modellekben meglehetősen gyors a fibrosis regressziója, de a TCPOBOP kezelés időpontjában leölt kontroll állatok májában picro-sirius kötőszöveti festéssel jelentős fibrosis volt kimutatható. (11. ábra).



11. ábra: Picro-syrius kötőszöveti festés a kontroll (A) CCl_4 (B) and thioacetamid (C) kezelt egerekben a TCPOBOP kezelés idejében. Méret skála 100μm

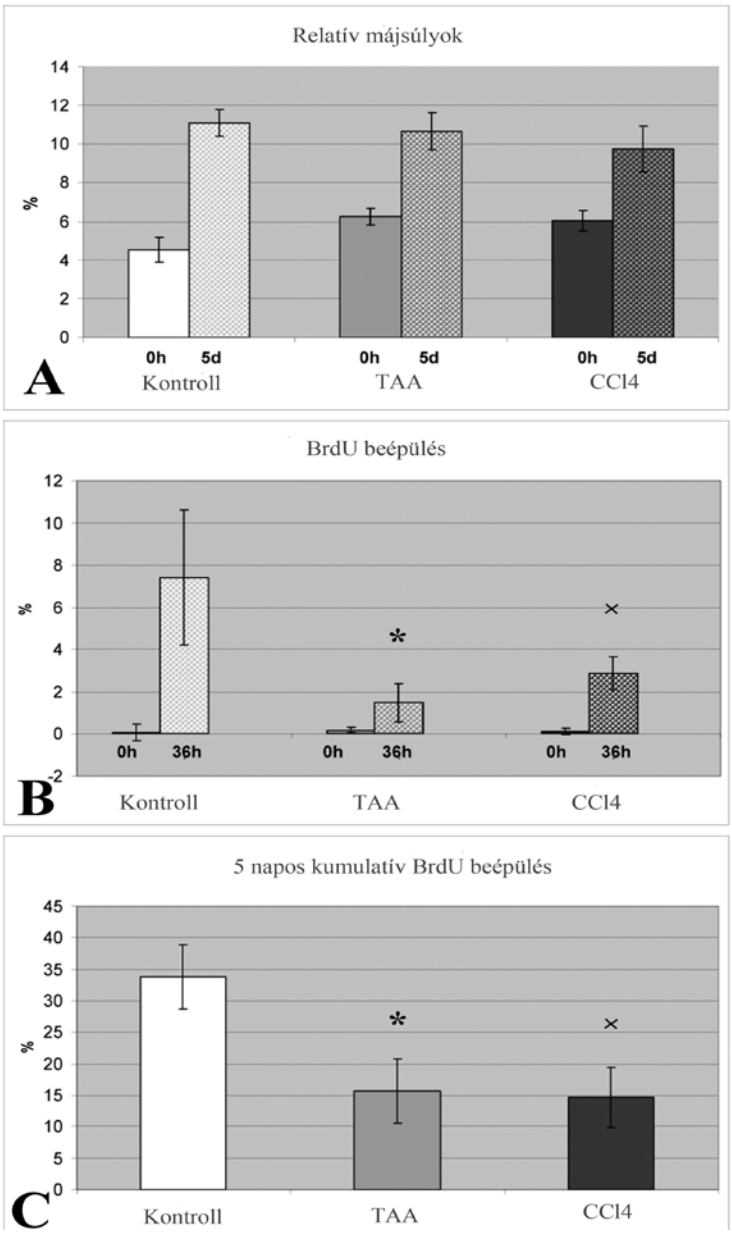
A TCPOBOP hatására a testsúlyhoz viszonyított májsúlyok jelentősen megemelkedtek, a növekedés enyhén nagyobb volt a kontroll állatokban a fibrotikus állatokhoz képest, de a különbség nem volt szigninfikáns (12A ábra).

A DNS szintézist ebben a kísérletben is kétféle módon vizsgáltuk.

Irodalmai adatok és saját korábbi eredményeink szerint is a TCPOBOP előidézte hepatocyta proliferáció 36 órával a kezelést követően a legintenzívebb. Ezért ebben az időpontban „pulse” jelöléssel néztük ennek mértékét, valamint 5 napig tartó BrdU itatással ezekben az állatokban is megjelöltük az összes sejtciklusba belépő hepatocytát.

Mindkét módszerrel mind a három kísérleti csoportban jelentős mértékű sejtproliferációt sikerült kimutatni, de annak mértéke a fibrotikus májakban szignifikánsan elmaradt a kontroll állatokban tapasztalt mértéktől (12B, C).

doi:10.14753/SE.2013.1780



12. ábra:

A, Relatív májsúlyok (a testsúlyhoz viszonyított májsúly arány %-ban kifejezve) a három kísérleti csoportban a TCPOBOP kezelés időpontjában és 5 nappal később.

B, A BrdU jelölt májsejtek százalékos aránya a TCPOBOP kezelés idejében és 36 órával később. A BrdU-t az állatok leölése előtt 1 órával alkalmaztuk.

C, A BrdU jelölt májsejtek százalékos aránya. A BrdU-t 5 napon át adagoltuk az állatok ivóvizében. Az * és ^{x} jelölésnél a $p < 0,01$ a kontroll és fibrotikus állatok között.

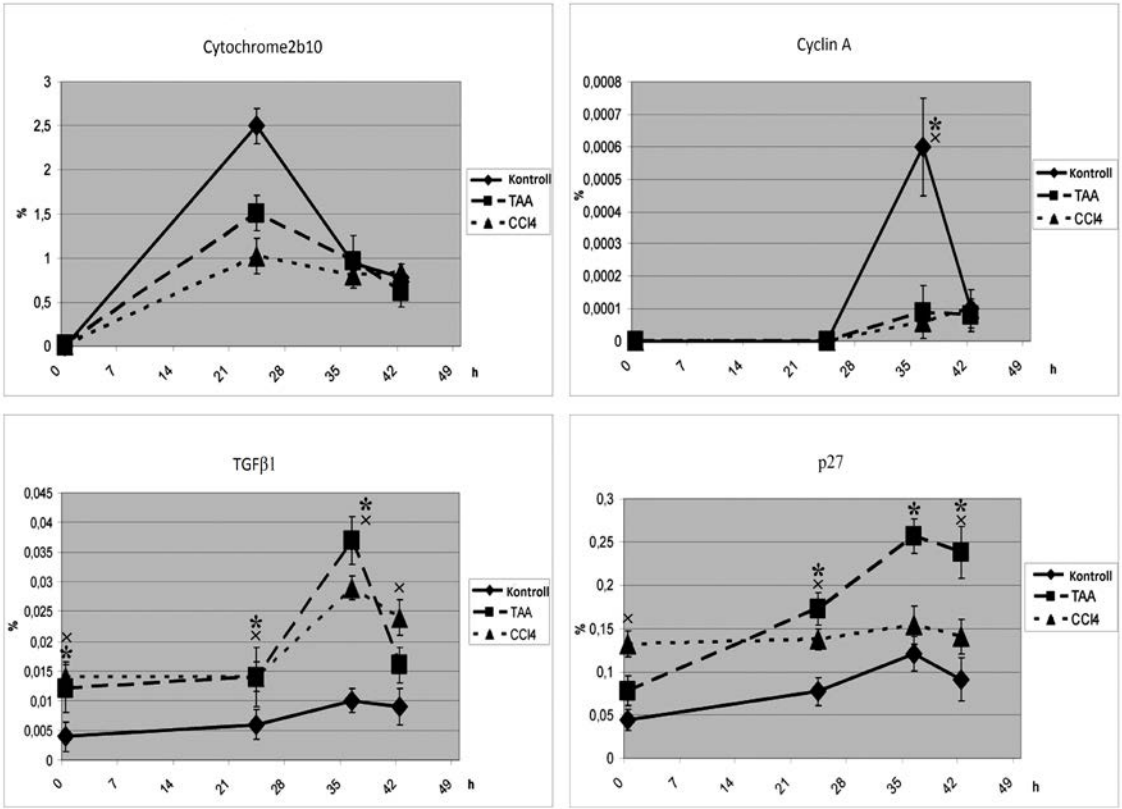
doi:10.14753/SE.2013.1780

Gén expresszió analízis valós idejű PCR vizsgálattal

Valós idejű PCR vizsgálattal mindkét csoportban a Cyp2b10 hirtelen jelentős expressziónövekedését tapasztaltuk. A Cyp2b10 a célgénje a TCPOBOP receptorának a CAR-nak. A proliferációt jelző cyclin A mRNS szintje kissé magasabb volt a TCPOBOP kezelés nélküli fibrotikus májakban.

A TCPOBOP hatására a kezelést követő 36. órában a nem fibrotikus állatok esetében éles csúcs mutatkozott a proliferációs görbén és a cyclin A expresszió is szignifikánasan magasabb volt ebben az időpontban a fibrotikus egerekhez képest.

A TGFβ1 expresszió a kísérlet ideje alatt mindvégig magasabbnak mutatkozott a fibrotikus májakban és ráadásul átmeneti növekedést is tapasztaltunk minden csoportban a vizsgálat ideje alatt (13.ábra).



13. ábra: Különböző gének relatív mRNS expressziója valós idejű RT-PCR-rel

*: $p < 0,01$ a kontroll és TAA csoprt között;

x :$p < 0,01$ a kontroll és CCl4 csoport között.

Statisztikai elemzés

Az eredményeket Student teszttel értékeltük.

doi:10.14753/SE.2013.1780

V.3. Ductularis reakciók csoportosítása

Munkánk célja a máj különböző állapotaiban, betegségeiben megjelenő ductularis reakciók csoportosítása volt immunhisztokémiai profiljuk alapján (8.táblázat). Számos olyan antitest, amelyekről leírták, hogy különböző esetekben reagálnak a ductulusokkal (alfa fetoprotein (AFP), chromogranin, carcinoembrionalis antigén (CEA), delta- like kináz-1(DLK1), deleted in malignant brain tumor 1 (DMBT-1) a mi vizsgálataink során nem bizonyultak pozitívnak. Ezzel ellentétben az EpCam, CK 19, E-cadherin és claudin 2 ellen termelt antitestek szinte minden ductulust és epeutat megfestettek, tehát ezek az antitestek sem alkalmasak a ductularis reakciók csoportosítására. A CK7 szintén minden ductulusban pozitív volt, sőt gyenge festődése egyértelműen jelölte a differenciálódó átmeneti hepatobilliáris sejteket is, így segítségünkre volt a ductularis reakciók azonosításában, jellemzésében.

doi:10.14753/SE.2013.1780

8. táblázat: Klinikai adatok és az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei

	Kor/Nem	Diagnózis	CD 10	CD 56	EMA	Típus
1	17 N	FHF	+	+	+	D
2	66 N	FHF	+	+	+	D
3	53 N	FHF	+	-	+	
4	38 N	FHF	+	-	+	
5	39 N	FHF	+	+	+	D
6	27 F	FHF	+	+	+	D
7	32 F	FHF	+	+	+	D
8	32 N	FHF	+	+	+	D
9	14 F	FHF	+	+	+	D
10	4 N	FHF	-	+	+	D
11	14 N	FHF	+	+	+	D
12	8 N	FHF	+	+	+	D
13	30 N	FHF	-	+	+	
14	41 N	FHF	+	+	+	D
15	61 N	FHF	+	+	+	D
16	33 N	FNH	-	+	-	P
17	44 N	FNH	-	+	-	P
18	39 N	FNH	-	+	-	P
19	31 N	FNH	-	+	-	P
20	43 N	FNH	-	+	-	P
21	42 N	FNH	-	+	-	P
22	28 N	FNH	-	+	-	P
23	61 N	FNH	-	+	-	P
24	53 N	FNH	-	+	-	P
25	38 N	FNH	-	+	-	P
26	46 N	FNH	-	+	-	P
27	27 N	FNH	-	+	-	P
28	45 N	FNH	-	+	-	P
29	40N	FNH	-	+	-	P
30	16 F	Wilson cirr	+	+	+	D
31	57 F	HBV cirr	+	+	+	D
32	58 N	HCV cirr	+	-	+	
33	23 F	Wilson cirr	+	+	+	D
34	48 F	HCV cirr	+	+	+	D
35	49 N	HCV cirr	+	+	+	D
36	23 F	Wilson cirr	+	+	+	D
37	73 F	Alc cirr	+	-	+	
38	52 F	Alc cirr	+	+	+	D
39	63 N	HCV cirr	+	+	+	D
40	47 F	HCV cirr	+	+	-	
41	59 N	HCV cirr	+	+	+	D
42	42 F	HCV cirr	+	+	+	D
43	46 N	HCV cirr	+	+	+	D
44	50 N	PBC	-	+	-	P

doi:10.14753/SE.2013.1780

45	30 N	PBC	-	+	-	P
46	71 N	PBC	-	+	-	P
47	50 N	PBC	-	+	-	P
48	74 N	PBC	-	+	-	P
49	75 N	PBC	-	+	-	P
50	42 N	PBC	-	+	-	P
51	50 N	PBC	-	+	-	P
52	55 N	PBC	-	+	-	P
53	52 N	Bil obstr	-	-	+	O
54	1m F	Bil atr	-	-	+	O
55	59 N	SBC	-	-	+	O
56	34 N	Bil obstr	-	-	+	O
57	36 N	SBC	-	-	+	O
58	45 N	Bil obstr	-	-	+	O
59	2m N	Bil atr	-	-	+	O
60	26 N	Bil obstr	-	-	+	O
61	32 N	PSC	-	+	+	
62	32 N	PSC	-	+	-	P
63	33 N	PSC	-	+	-	P
64	52 N	PSC	-	+	+	
65	25 N	PSC	-	+	+	
66	28 N	B-Ch	-	+	-	P
67	63 F	Peritumoral react.	-	+	-	P
68	34 N	Autoim. cholang.	-	+	-	P
69	57 F	Májsérülés	-	-	+	

doi:10.14753/SE.2013.1780

Három antitest (CD 56, EMA, CD 10) viszont változatos pozitivitást mutatott a különböző elváltozásokban. Az általunk vizsgált minták nagy részét három különböző festődési kombinációt mutató csoportba tudtuk sorolni (9. és 10. táblázat). Ezeket (P)rimitív (CD56+, EMA-, CD10-), (D)ifferenciálódó (CD56+, EMA+, CD10+) és (O)bstruktív (CD56-, EMA+, CD10-) típusú ductularis reakciónak neveztük el.

9.táblázat: Kontingencia táblázat a diagnózisok és immunfenotípus összehasonlítására

Diagnózis	**Ductularis reakció típusa**			
	P	**D**	**O**	**Egyéb**
FHF	0	12	0	3
Cirrhosis	0	11	0	3
FNH	14	0	0	0
PBC	9	0	0	0
Obstruktív	0	0	8	0
PSC	2	0	0	

FHF, Fulminant hepatic failure; FNH, focalis nodularis hyperplasia; PBC, primer biliáris cirrhosis; PSC, primer sclerotizáló cholangitis.

10.táblázat: Kontinencia táblázat a diagnózisok és az immunhisztokémiai pozitivítás összehasonlítására

Diagnózis	**Immunhisztokémiai pozitivítás**		
	CD56^{+}	**EMA^{+}**	**CD10^{+}**
FHF	13	15	13
Cirrhosis	12	13	14
FNH	14	0	0
PBC	9	0	0
Obstruktív	0	8	0

FHF, Fulminant hepatic failure; FNH, focalis nodularis hyperplasia; PBC, primer biliaris cirrhosis; PSC, primer sclerotizáló cholangitis.

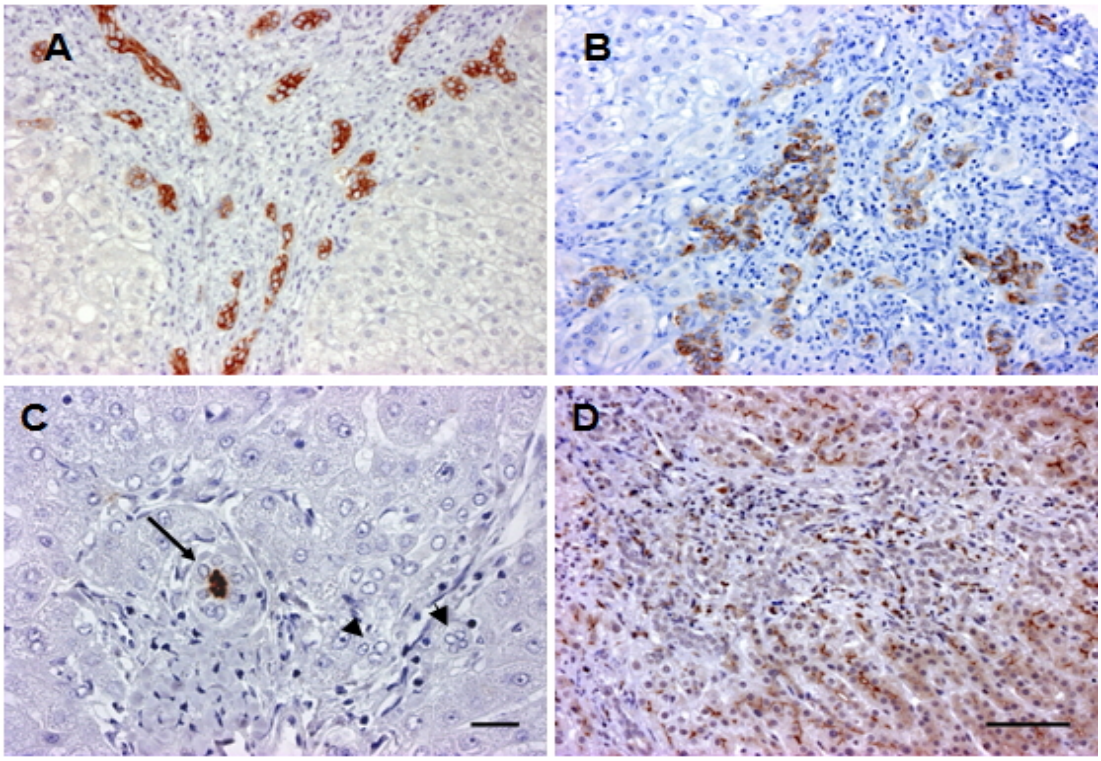
Normál humán máj

A négy ép szerkezetű májminta immunhisztokémiai profilja megegyezett. A CD56 kizárólag a kevés idegelemet festette. A CD10 antitest az interlobuláris epeutakkal nem mutatott reakciót, de a máj állományában a májsejtek jellegzetes canalikuláris festődést mutattak[100, 101]. Az EMA kizárólag az interlobuláris epeutak sejtjeinek apikális részét jelölte.

(P)rimitív típusú reakció (CD 56+, EMA-, CD 10-)

A CD 56 pozitív és EMA illetve CD 10 negatív immunfenotípusú minták fordultak elő leggyakrabban vizsgált anyagban. A hematoxilin-eozin festett metszeteken a ductulusok morphológiailag az úgynevezett atípusos ductularis proliferáció képét mutatták, azaz lapos ductularis sejtek alkotta kötegek nyilvánvaló lumenképződés nélkül (14. ábra). Ezekben a ductulusokban átmeneti hepatobiliáris sejteket nem lehetett megfigyelni. Az összes fokális noduláris hyperplázia (14 eset) és primer billiáris cirrhosis (9 eset) ehhez a csoporthoz tartozott. Néhány egyéb betegségben, mint primer sclerotizáló cholangitisben, Budd-Chiari szindrómában, peritumorális reakcióhoz és autoimmun cholangitishez társuló ductularis reakcióban is ilyen immunfenotípusú ductulusok voltak megfigyelhetőek.

doi:10.14753/SE.2013.1780



14. ábra: A P típusú ductularis reakció

A, CK7 antitest pozitív a keskeny, lumen nélküli, lapos biliáris sejtekkel bélelt ductulusokban [primer biliáris cirrhosis (PBC)].

B, A CD56 membranosus és halvány citoplazmatikus festődést mutat [focalis noduláris hyperplasia (FNH)].

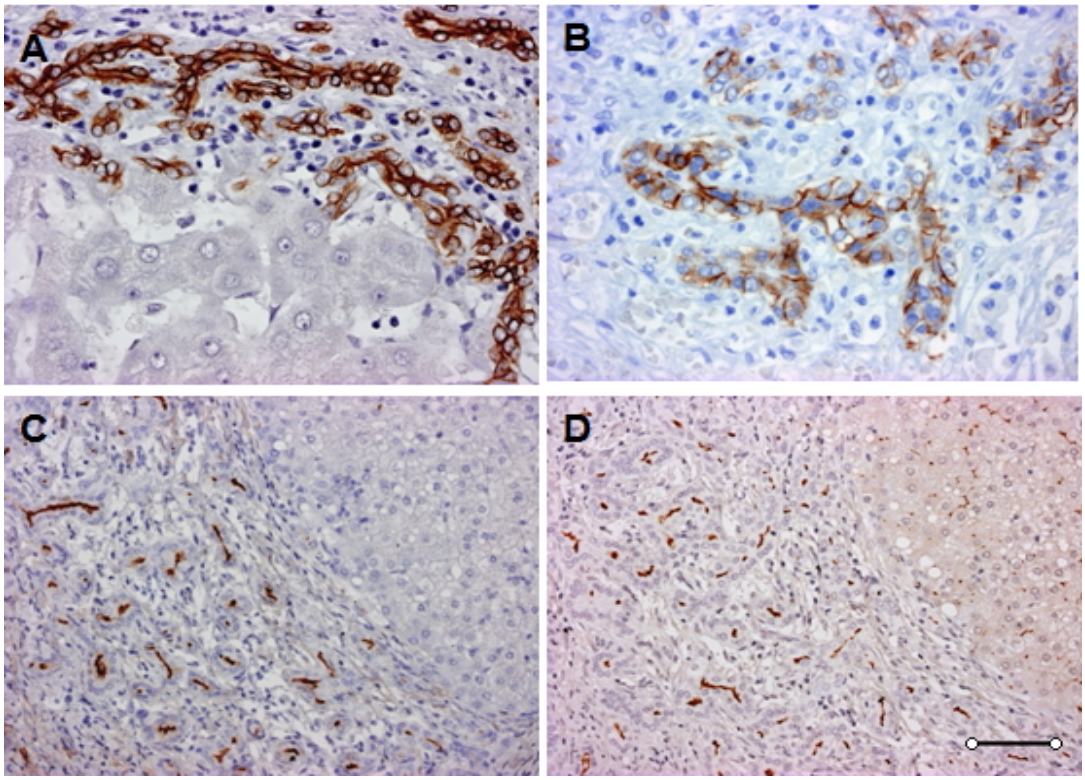
C, Apicalis epitheliális membrán antigén (EMA) festődés az interlobuláris epeutakban (nyíl); a ductulusok (nyílhegyek) negatívak (PBC).

D, CD10 canaliculáris pozitivítást mutat a máj állományában, a ductulusok negatívak (FNH). Méret skála A, B és D: 100 μm; C: 20 μm.

doi:10.14753/SE.2013.1780

(D)ifferenciálódó típusú reakció (CD 56+, EMA+, CD 10+)

A vizsgált minták jelentős részében a ductularis struktúrák többsége mindhárom antitesttel pozitívnak bizonyult. A CD10 és EMA pozitivitás apikális, míg a CD56 reakció, hasonlóan a P típusú ductulusokhoz, membranosus jellegű volt (15., 16. ábra).



15. ábra: A D típusú ductularis reakció cirrhotikus májban

A, Proliferáló CK7-pozitív biliáris ductulusok a cirrhotikus göb szélén ; a sejtek semmilyen jelét nem mutatják a májsejt irányú differenciációnak.

B, Döntően membranosus CD56 pozitivítás a cirrhotikus szeptumok epeútjaiban.

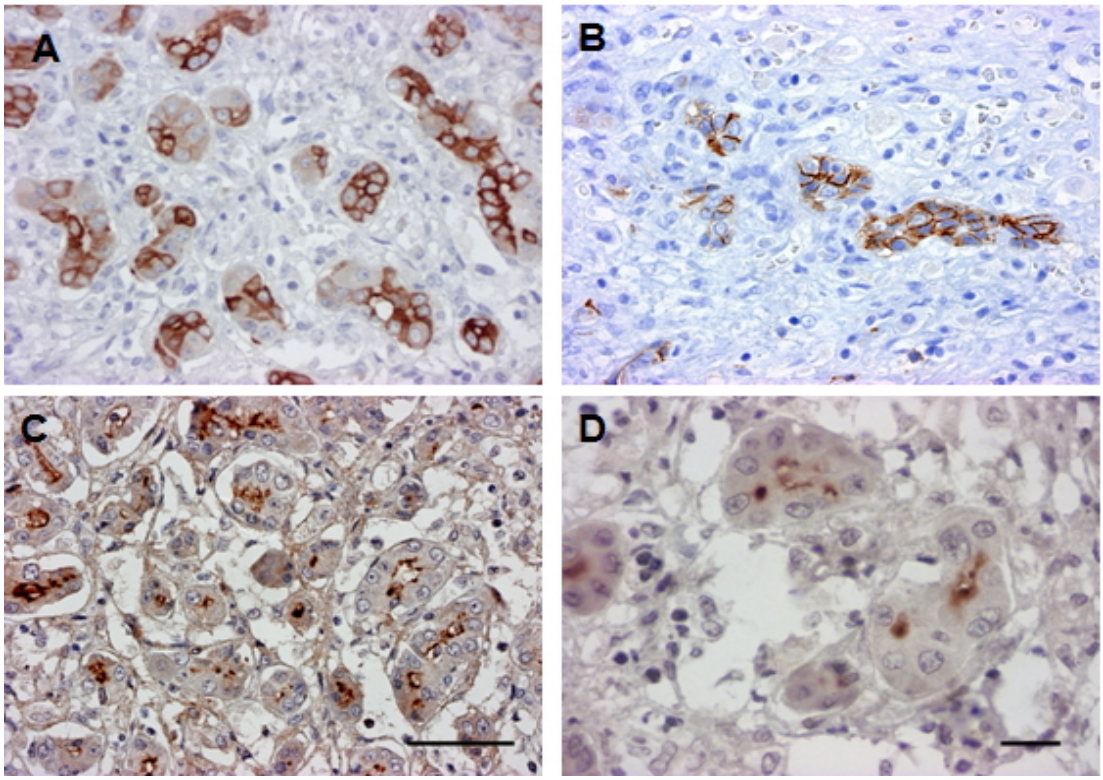
C, Epitheliális membrán antigén (EMA) pozitivítás a ductulusokban; a cirrhotikus máj negatív.

D, A canaliculáris májsejt CD10 pozitivítás mellett apikális CD10 pozitivítás is megjelenik a cirrhotikus szeptum ductulusainak többségében. Méret skála: A and B: 50 μm; C és D: 100 μm.

Az ebbe a típusba (D) tartozó két nagy betegségcsoportban a fulmináns májelégtelenségben és a cirrhotikus májakban a ductulusok hematoxilin-eozin festett metszeten való megjelenése különböző volt. A fulmináns májelégtelenség mintáinak

doi:10.14753/SE.2013.1780

jelentős részében (12/15 eset) sok nagyméretű átmeneti hepatobiliáris sejtet tudtunk azonosítani (16D ábra). A cirrhotikus májakból vett mintában a ductulusok hasonlóan az atypusos ductularis reakcióhoz, lapos sejtek alkotta látható lumen nélküli kötegek voltak (15D ábra). Kevés átmeneti hepatobiliáris sejtet láttunk, azonban ezek mind a három vizsgált antitesttel pozitívnak bizonyultak.



16. ábra: D típusú ductularis reakció fulmináns májelégtelenség esetén(FHF)

A, Proliferáló ductulusok FHF-ban; a nagy átmeneti hepatobiliáris sejtek halvány CK7 pozitivítást mutatnak (×40).

B, Membranosus CD56 pozitivítás a ductulusokban FHF-ban.

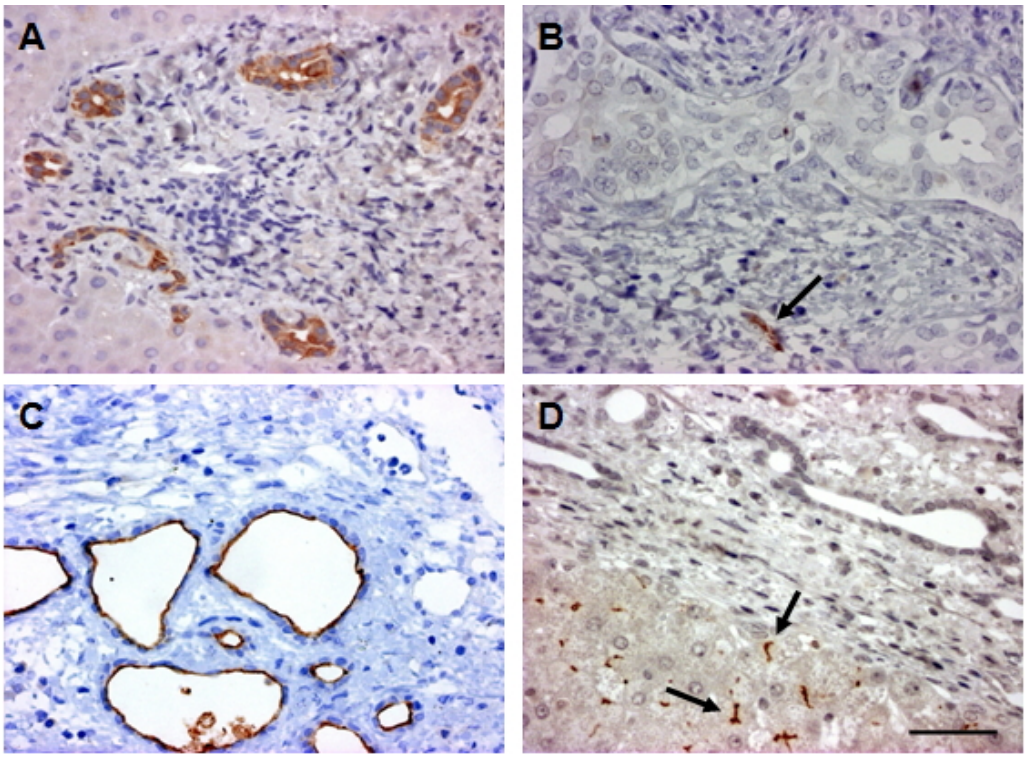
C, Apikális epiteliális membrán antigén (EMA) pozitivítás a ductulusokban FHF-ban.

D, Apikális CD10 festődés a ductulusok átmeneti hepatobiliáris sejtjeiben. Méret skála: A, B és C: 50 μm; D: 20 μm.

doi:10.14753/SE.2013.1780

(O)bstruktív típusú reakció (CD 56-, EMA+, CD 10-)

Az O típusú reakciónál az erős EMA pozitivitás mellett a CD56 és CD10 reakciók negatívak voltak (17. ábra). Ez az immunfenotípus a normál interlobuláris epeutakra jellemző és morfológiailag is az érett, lumennel rendelkező epeutakra hasonlítanak, de nagyobb számban jelennek meg. Az O típusú ductularis reakcióhoz vezető betegségek (acut epeút elzáródás, biliáris atrézia, secunder biliáris cirrhosis) közös jellemzője az epeút elzáródás volt.



17. ábra: Az O típusú ductularis reakció

A, Proliferáló CK7 pozitív epeutak többnyire jól látható lumennel biliáris obstrukcióban.

B, CD56 pozitív kis perifériás idegköteg (nyíl), a biliáris ductulusok negatívak (SBC).

C, Kifejezett apikális epiteliális membrán antigén pozitivítás a dilatált biliáris ductulusokban (biliáris obstrukció).

D, A CD10 canalikuláris pozitivítást mutat a máj állományában (nyilak), a ductulusok negatívak (SBC. Méret skála: 50 μm).

A 69 ductularis reakcióból 10 mintát (14%) nem tudtunk besorolni a fenti kategóriákba.

doi:10.14753/SE.2013.1780

Statisztikai elemzés

Az eredmények kiértékelését Fischer teszttel végeztük a ductularis reakciók (P,D,O) és vizsgált antitestek (CD56, EMA, CD10) expressziója szerint. A korreláció szignifikáns volt ($P<0.001$).

doi:10.14753/SE.2013.1780

VI. MEGBESZÉLÉS

VI.1. TGFβ1 hatása a TCPOBOP okozta májsejt proliferációra

A TGFβ1 talán a legsokoldalúbb növekedési faktor, mely igen változatos biológiai hatásokkal rendelkezik. Sokat elemezték a máj/májsejtek működésére kifejtett hatását is [102]. Számos kísérleti rendszerben nagyon hatékony gátolja a májsejtek osztódását. Hepatocyta proliferációt gátló hatását leírták parciális hepatectomiát [103, 104] és CCl4 mérgezés kiváltotta kiterjedt necrosist követő regeneráció kapcsán [105]. In vitro már 0.5 ng/ ml koncentrációban gátolja a primer hepatocyta tenyészetek proliferatív válaszát [106]. Tudomásunk szerint eddig in vivo kísérleti rendszerben még nem vizsgálták, hogy milyen hatással van a TGFβ1 primer hepatocyta mitogének által előidézett proliferatív válaszra.

Munkánkban a jól ismert primer májsejt mitogén, a TCPOBOP okozta máj növekedést hasonlítottuk össze aktív TGFβ1-t a májukban fokozottan termelő transzgén és vad típusú egerek között.

A TCPOBOP kiváltotta növekedési választ több módszerrel is elemeztük. A kezelés után követtük az állatok májának súlybéli gyarapodását, a DNS szintézis időfüggő mértékét, kumulatív BrdU beépüléssel megvizsgáltuk a mitogén válaszban részt vevő hepatocyták arányát (proliferatív pool), RT PCR módszerrel pedig elemeztük két a sejtproliferációs aktivitást tükröző gén (cyclin A és D1)expresszióját. Az alkalmazott módszerek egyikével sem sikerült szignifikáns proliferációgátlást megfigyelni a transzgén állatokban.

A beadott TCPOBOP hatékonyságát bizonyítja, hogy a mitogén receptorként szolgáló CAR két célgénjének (Cyp2b10 és Gadd45b) az expressziója fokozódott az irodalomban leírt mértékben. Igaz, a két gén expressziójának mértéke kisebb mértékben fokozódott a transzgén állatokban felvetve azt a lehetőséget, hogy a CAR aktivitásának más (nem proliferatív) aspektusait gátolhatja a TGFβ1. A TCPOBOP által kiváltott proliferatív válasz mértéke és dinamikája is megegyezett az irodalmi tapasztalatokkal [69]. Az általunk is használt transzgén egérvonalon végzett PH-t követően csökkent, elhúzódó regeneratív választ regisztráltak, igazolva, hogy a transzgén terméke az irodalom alapján várhatóan gátolja a májszövet regeneratív válaszát [107]. A fenti

eredményeket megfontolva megállapíthatjuk, hogy a TGFβ1 nem gátolja in vivo a TCPOBOP okozta mitogén válaszreakciót.

A TGFβ1 különböző kísérleti modellekben befolyásolta az apoptotikus folyamatokat [102]. Vizsgálataink során nem tudtunk hasonló jelenséget megfigyelni, de kísérleteink a máj proliferatív válaszának idejében zajlottak, a későbbi kompenzatorikus regresszív fázisra már nem terjedtek ki.

Egy másik primer mitogén a cyproteron acetát okozta PCNA expresszió gátlásához 3-5-szörös TGFβ1 koncentráció szükséges, mint az EGF okozta válaszhoz patkány májsejt-tenyészetben [108] . Ez is arra utal, hogy a TGFβ1 kevésbé hatékonyan gátolja a primer hepatocyta mitogének hatását. Ez a TGFβ1 okozta mitózisgátlás elleni nagyobb fokú rezisztenciát jelez [69]. Kísérletünkben a Cyp2b10 felülszabályozása mutatja, hogy a CAR transzkripciós aktivitása megtartott maradt, a proliferatív válaszok dinamikája és a csúcspontok egyezést mutatnak a korábbi eredményekkel.

A Cyp2b10 és Gadd45b expressziójának növekedése világosan mutatja a CAR transzkripciós aktivitását, a növekedés alacsonyabb volt a transzgén egerekben. Ezen gátlás oka nem teljesen tisztázott. Leírták, hogy a TGFβ1 gátolja bizonyos Cyp isoenzimek expresszióját [109], de nem az általunk vizsgált 2b10-ét. Ezzel ellentétben más kísérletek szerint [110, 111] a TGFβ1 a Gadd45b expresszióját növeli. Nem kizárható, hogy a TGFβ1 megnövekedett koncentrációja negatívan befolyásolja a CAR aktivitását, de a májsejtek proliferatív aktivitása nem támasztja alá ezt a felvetést.

A TGFβ potenciális mitózisgátlója az epitheliális sejteknek. A tumorképződés során a TGFβ szignálút hibái miatt a sejtek resistensek lesznek a TGFβ1 cytostatikus hatására, elősegítve a daganat növekedését, terjedését. Ezt a jelenséget, mint TGFβ paradoxont ismeri az irodalom [112]. A különböző szervek, köztük a máj daganatos sejtjeiben gyakori a TGFβ szignálút hibája, gyakran a TGFβR II. hiányzik [113, 114]. Ezen sejtek az egészségesekkel ellentétben rezisztensek a TGFβ1 mitoinhibitor hatására, így növekedési előnyük van a TGFβ jelenlétében. A primer mitogének okozta proliferáció ellenáll a TGFβ1 mitoinhibitor hatásának, így csökkenti az egészséges sejtek növekedési hátrányát, nem érvényesül maradéktalanul a TGFβ paradoxon. Ez egy lehetséges magyarázat egyes primer mitogének kísérleti rendszerekben tapasztalt hepatocarcinogenesist gátló tulajdonságára [57, 73].

Ismert a cirrhotikus máj fokozott TGFβ1 termelése [115] és csökkent regenerációs kapacitása [116]. Ha a megfigyelt jelenségek ok okozati összefüggésben állnak egymással, felmerül, hogy megfelelő human primer mitogének ellensúlyozhatják a cirrhotikus máj csökkent regenerációs képességét.

A TGFβ1 expresszió növekszik partalis hepatectomia [104] és CCl4 okozta pericentralis necrosis során [105]. A növekedés funkciója ismeretlen [81]. Az expresszió növekedés dinamikája nem egyezik a proliferatív válasz leállításának egyszerű szerepével [104]. Érdekes, hogy a TCPOBOP kezelést követően is megemelkedik a TGFβ1 mRNS szint. Továbbá az endogén TGFβ1 gén gátlódik a transzgén egerekben a vad típussal összehasonlítva. Ezen megfigyelések következményei még további vizsgálatokat igényelnek.

A másik két TGFβ isoforma a TGFβ-2 és TGFβ-3 expressziójában. a TCPOBOP kezelés során nem tapasztaltunk változást.

Összefoglalva, ezen kísérletünk alapján, ellentétben a kompenzatorikus májsejtregeneráció során tapasztaltaktól, a primer mitogén TCPOBOP okozta proliferativ válasz a májsejtekben ellenáll a TGFβ1 mitoinhibitor hatásának.

Megfigyelésünk a hepatocyták kompenzatorikus és primer mitogének által kiváltott növekedési reakciói eltérő szabályozásának egy új aspektusára hívja fel a figyelmet.

Eddig is ismert volt, hogy a kompenzatorikus válasz létrejöttében szerepet játszó tényezők (pl: TNF, IL6, NF-κB, STAT3, c-fos, c-jun, c-myc) nem szükségesek a primer mitogének által kiváltott reakcióhoz. Eredményünk arra utal, hogy a reakciók gátlása is eltérő szabályozás alatt áll.

Parciális hepatectomiát követően is és TCPOBOP kezelés után is egyaránt megfigyelhető a TGFβ1 termelés fokozódása, ennek jelentősége egyelőre nem ismert. További új megfigyelésünk, hogy a transzgén egerekben alacsonyabb az endogén TGFβ1 expressziója, mint a vad típusúakban. Ez az eredmény egy a TGFβ1 vonatkozásában működö feed back mechanizmusra hívhatja fel a figyelmet.

Közismert tény, hogy a TGFβ1 termelés fokozott cirrhotikus májakban. Részben ez is felelős lehet a cirrhotikus májak rossz regenerációs képességéért. Ha ez így van, viszont a primer mitogének válasza nem érzékeny a TGFβ1 mitoinhibitor hatása iránt, akkor a cirrhotikus májak növekedése látványosan serkenthető lenne ilyen vegyületekkel. Ezt vizsgáltuk meg következő kísérletünkben.

doi:10.14753/SE.2013.1780

VI.2. Primer mitogén hatása fibrotikus májra

Két különböző vegyülettel (szén tetra-kloriddal és tioacetamiddal) fibrosist idéztünk elő egerekben. Az előrehaladott fibrosis/cirrhosis kialakulását szövettani vizsgálattal ellenőriztük, majd egyetlen dózis TCPOBOP után elemeztük a kiváltott proliferatív választ ugyanazokkal a módszerekkel, mint az előző kísérletben. Eredményeinket a pontosan azonos korú ép májú egerekben tapasztalt proliferatív válasszal hasonlítottuk össze.

A TCPOBOP kezelés relatív májsúlygyarapodást idézett elő mindhárom kísérleti csoportban. A súlynövekedés valamelyest, de nem szignifikáns mértékben nagyobb volt a kontroll állatokban. A TCPOBOP hatékonyan fokozta mind a BrdU beépülést mind a cyclin A/D1 expresszióját a fibrotikus májakban, igaz, a proliferációs válasz mértéke ezen paraméterek vonatkozásában szignifikánsan magasabb volt a kontroll egerekben.

Ebben a kísérletben is megvizsgáltuk a TCPOBOP receptor CAR célgénjének expresszióját és az igazolta a TCPOBOP-CAR szignál hatékonyságát. A fibrotikus májakban várakozásunknak megfelelően magasabb volt a TGFβ1 expresszió, korábbi eredményeink alapján azonban ez nem lehet felelős a csökkent proliferációs válaszért. A cirrhotikus májak csökkent regenerációs válaszának pontos oka máig sem ismert [83, 84, 117], de többek között feltételezik, hogy a fokozott CDKI p27 is fontos szerepet játszik benne [117, 118]. Ezért vizsgáltuk a p27 expresszió alakulását is, és azt találtuk, hogy valóban, ennek a génnek az expressziója emelkedett volt a fibrotikus májakban és legalábbis részben ez lehet felelős a TCPOBOP kezelés csökkent hatékonyságáért. Érdemes megemlíteni, hogy idős állatokban a parciális hepatectomia által kiváltott regeneratív válasz is jelentősen szupprimált, amiért ugyancsak a fokozott p27 expressziót teszik felelőssé [88, 89]. Idős állatokban a TCPOBOP a p27 expresszió csökkenését és a fiatal állatokban tapasztalthoz hasonló mértékű proliferációs választ idéz elő. Nem tudjuk, hogy a fibrotikus májakban a TCPOBOP miért nem idéz elő p27 csökkenést.

Összefoglalva azonban elmondhatjuk, hogy a TCPOBOP a két különböző módon előidézett fibrotikus/cirrhotikus májakban is, bár a kontroll állatokhoz képest kisebb, de jelentős proliferációt volt képes előidézni, ezért érdemes próbálkozni ezzel a módszerrel, mert megfelelő primer hepatocyta mitogén alkalmazásával esetleg

cirrhotikus betegekben is fokozható lenne a máj proliferatív aktivitása , javítva regeneratív képességüket.

VI.3. Ductularis reakciók csoportosítása

Harmadik kísérletünkben emberi májban zajló proliferációs folyamatot, nevezetesen a ductularis reakciókat vizsgáltuk. Számos májbetegségben, elváltozásban figyelhetőek meg a humán májban szűk lumennel, egyetlen sejtvastagságú fallal rendelkező tubuláris képletek, melyeket ma már egységesen ductularis reakcióknak neveznek [92-96]. Ezen az elnevezésen túl azonban szinte semmi másban nincs egyetértés az irodalomban. A ductularis reakciók igen változatos megjelenésűek HE festett metszeteken is, eredetük és funkciójuk vonatkozásában egyaránt sokféle lehetőség merült fel. Ezt a heterogenitást jól tükrözte változatos elnevezésük is, ami azonban egyáltalán nem volt következetes. Ezért a ductularis reakciókról megjelenő közlemények nehezen összehasonlíthatók, nehéz közöttük a tájékozódás. Legáltalánosabban elfogadott az atipusos és tipusos ductularis reakciók megkülönböztetése [93]. Az atipusos ductularis reakciókban a ductusok szűkek, a sejtek ellapultak, a lumen gyakorlatilag nem is látszik. Ezzel szemben a tipusos ductularis reakcióban a ductusok az interlobuláris epeutakra emlékeztetően köbös hámsejtekkel és definitív lumennel rendelkeznek. A legutóbb megjelent konszenzus közlemény azonban nem ajánlja ezt a megkülönböztetést rossz reprodukálhatósága miatt [97], pedig ahogy a morphológiai heterogenitás is bizonyítja, ezek a változatos képletek nehezen szoríthatók be egyetlen kategóriába. Nagyon jól megvilágítja a helyzetet a kísérleti modellekben patkányokban megkülönböztetett ovális sejtes reakció és epeút lekötéssel előidézett „epeút proliferáció”[119]. Az ovális sejtek képesek hepatocytákká differenciálódni, míg a proliferáló epeutak nem. E kétféle ductularis reakciót hiba lenne együtt vizsgálni, mert természetesen ellentmondó eredményeket kapnánk. Ez a kétféle reakció ráadásul elkülöníthető egyetlen immunmarkerrel, az ovális sejtek AFP pozitívak, míg az epeutak nem [119]. Ezek a megfontolások vezettek bennünket a különböző májelváltozásokban található ductularis reakciók immunhisztokémiai vizsgálatához. Ez a módszer talán elvezethet a ductularis reakciók racionális, reprodukálható osztályozásához. Az irodalomban fellelhető ductularis reakciókban leírt immunmarkerek többsége nem volt alkalmas az osztályozásra. Három antitest, CD56, CD10, EMA megoszlása alapján a vizsgált minták nagy többsége három kategóriába volt soroható.

Eredményeink normál máj esetében megegyeztek a korábban közöltekkel. A CD56-ot, általában mint a neuroendocrin differenciációt jelző antitestet tartják számon. A máj őssejtek potenciális forrásának tartott Hering csatornák CD56 pozitívak [120, 121]. Immunfluoreszcens vizsgálattal ki tudtunk mutatni a normál májban fagyasztott metszeten CD56 pozitív ductulusokat, de paraffinba ágyazott anyagon ez a módszer nem volt megfelelően érzékeny.

A CD10 sokféle sejtet illetve tumort megfest. Ez az antigén bizonyított markere a májsejteknek [100, 101], csakúgy, mint az EMA az interlobuláris epeutaknak [122].

A P típusú reakció során a CD56 pozitivitás azt jelezheti, hogy a ductulusok esetleg Hering-csatorna eredetűek. A duculusok ebben a csoportban nem mutatnak morphológiai differenciációt és az EMA és CD10 negatívítás is az elkötelezettség hiányát jelzi. Ez meglepő az FNH esetében, mert hematoxilin-eozin festett FNH mintában úgy tűnik, mintha a ductulusok és a tubuláris elrendeződésű májsejtek között folyamatos lenne az átmenet, bár átmeneti hepatobiliáris sejtek soha nem tűnnek fel a FNH ductulusaiban.

A D típusú reakció összetettebb. A Hering csatorna eredetet sejtető CD56 pozitivítás mellett megjelenik mind a hepatocyta irányú differenciációt jelző CD10, mind a cholangiocyta irányú differenciációt mutató EMA pozitivítás is. A két nagy betegségcsoport, ami ehhez a típushoz tartozik a fulmináns májelégtelenséget követő regeneráció és a cirrhosis. A hepatobiliáris átmeneti sejtek gyakori kimutathatósága a FHF esetén világosan mutatja a májsejt irányú differenciációt. Bár cirrhosis esetén ezen sejtek jelenléte jóval ritkább, a ductulusok májsejt irányú differenciációját többször leírták. Ezekben az esetekben egy speciális morphológiájú képlet úgynevezett májsejt ”bimbó” jelenik meg [123]. Ehhez a jelenséghez hasonlót tapasztalhatunk patkányokban, ahol az ovális sejtek májsejtekké differenciálódása a kísérleti körülményektől függően különböző térbeli eloszlást mutat [124]. Tehát az ehhez a csoporthoz tartozó ductulusok immunfenotípusa a májsejt irányú differenciáció képességét mutatja, annak ellenére, hogy ez morphologiailag nem mindig nyilvánvaló. Patkányban a progenitor/őssejt hepatocyta irányú differenciációját az egyébként biliáris marker CK7 megjelenése jelzi [125]. Az EMA pozitivitás megjelenése a humán ductulusokban ugyanezt a folyamatot jelezheti.

Az O típusú reakció ductulusainak immunfenotípusa a normál interlobuláris epeutaknak felel meg és morphológiailag is igen hasonló megjelenésűek. Ezen reakciótípus kísérletes megfelelője patkányokban a közös epevezeték lekötését követő epeút proliferáció.

Az immunfenotípus alapján elkülönített három ductularis reakció típus nagyon hasonlít a Desmet és társai által több, mint 15 évvel ezelőtt leírt klasszifikációhoz [93]. A legfontosabb különbség a két osztályozás között, hogy az immunfenotípuson alapuló osztályozás világosan különbséget tud tenni a D és P típusok között, míg a korábbi klasszifikáció a D típusú ductularis reakciót az atípusos ductularis reakció egyik alcsoportjaként „submasszív májnecrosist követő ductularis reakció”-ként írja le [93]. Nem egyértelmű, hogy a különböző immunfenotípusú reakciókba sorolt ductulusok hisztogenezise és funkciója különbözik-e, erre vonatkozóan vizsgálatunk nem nyújt semmiféle támpontot.

A ductularis reakciók meglehetősen heterogének. Részletes elemzésükkel sokféle immunfenotípusú ductulus azonosítható akár egyetlen májban is [126]. Ilyen részletes vizsgálatot végezni és elemezni meglehetősen nehéz lenne nagy esetszámon. Ezért munkánk során a mintában domináló fenotípust vettük alapul. Ez a megközelítés nyilván túlzott leegyszerűsítéssel és az adatok egy részének elvesztésével járt, de ez tette lehetővé a viszonylag egyszerű osztályozást. Valamivel több, mint 10%-a az eseteknek egyik csoportba sem illett. Előfordulhat, hogy nem elég a három kategória az összes ductularis reakció jellemzéséhez és a figyelmen kívül hagyott adatok segíthetnének a besorolhatatlan esetek osztályozásában. Egy másik lehetséges megközelítés, hogy nem minden esetben lehet meghatározni a domináns reakció típust. Megfigyeléseink szerint az „egyszerű” májbetegségek, mint primer biliáris cirrhosis, fokális noduláris hyperplázia esetében a ductulusok meglehetősen homogén immunfenotípust mutattak. Ezzel ellentétben a „komplex” májbetegségeknél, mint primer sclerotizáló cholangitis, cirrhosis, ahol különböző eltérések, például epeútelzáródás és májsejt pusztulás, kombinálódtak, az egy mintában jelenlévő ductulusok immunfenotípusa is nagy variabilitást mutatott. Ilyenkor sokszor nehéz objektíven kiválasztani a legjellemzőbb reakciót és ez lehet az oka, hogy a primer sclerotizáló cholangitis és a cirrhosis esetek nem kerültek mindig azonos kategóriába.

doi:10.14753/SE.2013.1780

A munkánk alapján való osztályozás nyilvánvalóan nem végleges, tökéletes klasszifikáció. Nem lehet az már csak a kis esetszám és a korlátozott metodikai megközelítés miatt sem. Kísérleti eredményeink azonban előmozdíthatnak olyan nemzetközi nagy mintaszámon végzett vizsgálatokat, melyek végül elvezethetnek a ductularis reakciók racionális, általánosan elfogadott osztályozásához.

Összetett betegségcsoportok, például lymphomák, lágyrész daganatok jobb megértésének alapfeltétele volt a megfelelő klasszifikációk kidolgozása. Úgy gondoljuk, hogy ez a lépés nem kerülhető meg a szintén igen változatos ductularis reakciók jelentőségének, osztályozásának megértéséhez sem.

doi:10.14753/SE.2013.1780

VII. KÖVETKEZTETÉSEK

1. A primer hepatocyta mitogén, TCPOBOP a vad típusú egerekéhez hasonló mértékű májsejt proliferációt idézett elő májukban fokozott mértékben TGFβ1-et termelő transzgén egerekben, jelezve, hogy a májsejtek így előidézett osztódása nem érzékeny a TGFβ1 mitoinhibitor hatása iránt.

2. A TCPOBOP fibrotikus/cirrhotikus májakban is jelentős proliferációt volt képes előidézni, bár ennek mértéke elmaradt a kontroll állatokban tapasztalttól.

3. Humán májakban kialakult ductularis reakciók jelentős része immunfenotípusuk alapján három csoportba volt sorolható, az azonos betegségekben kialakult reakciók többsége ugyanazon csoportba került, jelezve, hogy felosztásunk tükrözi a ductulusok eredetét, patogenetikai szerepét. Osztályozásunk alapul szolgálhat további, kiterjedtebb, hasonló próbálkozásoknak.

doi:10.14753/SE.2013.1780

VIII. ÖSSZEFOGLALÁS

A TGFβ számos szerteágazó hatással bíró növekedési faktor, többek között hatékonyan gátolja a májsejtek osztódását és kötőszövet lerakódást serkentő hatása révén fontos szerepe van a májcirrhosis előidézésében. Munkánkban az ismert primer hepatocyta mitogén TCPOBOP hatását vizsgáltuk in vivo TGFβ1 transzgén és fibrotikus májú egereken. A transzgén egerek hepatocytái nagy mennyiségben termelnek aktiv TGFβ1-et. Ezekben az állatokban irodalmi adatok szerint parciális hepatectomia csökkentett, elhúzódó válaszrekaciót idéz elő. Ezzel szemben kísérleteink alapján a TCPOBOP előidézte proliferativ válaszban nem volt lényeges eltérés a transzgén és a vad típusú kontroll egerek között. Számos különbség ismert a regenerativ és a primer mitogének által előidézett hepatocyta proliferáció szabályozásában, eredményünk szerint eltérő a két folyamat TGFβ1 iránti érzékenysége is.

A cirrhotikus májak közismerten rossz regeneratív képességében szerepet játszhat fokozott TGβ1 termelésük. Ha viszont a TCPOBOP mitogén hatása nem érzékeny a TGFβ1 gátló hatásával szemben, akkor várhatóan a cirrhotikus májak növekedése serkenthető primer hepatocyta mitogénekkel. Ezért megvizsgáltuk TCPOBOP hatását két különböző módszerrel előidézett fibrotikus/cirrhotikus májakon. TCPOBOP hatása a cirrhotikus májakon ugyan elmaradt az ép májon tapasztalttól, de mindkét fibrotikus csoportban jelentős mértékű proliferatív válasz volt előidézhető. Ez az eredmény arra utal, hogy primer mitogén vegyületek serkenthetik a humán cirrhotikus májak regenerációját is műtéti beavatkozások után.

Számos emberi májbetegségben fordulnak elő változatos morfológiai megjelenésű és kiterjedésű epeút szerű képleteket tartalmazó szöveti elváltozások, amiket leegyszerűsítve ductularis reactioknak neveznek. Ezeknek az igen eltérő reakcióknak sem az eredete sem a biológiai/klinikai jelentősége nem ismert. Tanulmányozásukat megnehezíti, hogy máig nem alakult ki egységes osztályozásuk, terminológiájuk. Kísérletünkben három antitest (EMA, CD10, CD56) segítségével a vizsgált reakciók 86%-a három eltérő immunfenotípusú csoportba volt sorolható. Az egyes csoportokba többnyire hasonló eredetű májelváltozások kerültek. Ezért feltételezhetjük, hogy osztályozásunk jó kiindulópontja lehet hasonló kiterjedtebb próbálkozásoknak, amik

doi:10.14753/SE.2013.1780

végül elvezethetnek a ductularis reakciók racionális, reprodukálható és általánosan elfogadott osztályozásához, ami hozzájárulhat biológiai szerepük megértéséhez.

doi:10.14753/SE.2013.1780

IX. SUMMARY

TGFβ is a multifunctional growth factor with diverse effects. Among such effects, it is a potent inhibitor of hepatocyte proliferáción and plays an important role in the development of cirrhosis, facilitating of deposition of connecting tissue.

In our study we investigated the effect of the well known primary hepatocyte mitogen TCPOBOP on TGFβ1 transgenic mice and on mice with fibrotic livers. Hepatocytes of transgenic mice produce high serum level of active TGFβ1.

Based on the data found in literature, the PH induced proliferative response is decreased and delayed in these animals. Contrarily, in our experimence there was no significant difference in TCPOBOP induced proliferative response between the groups of transgenic and wild type mice. Numerous discrepancies are known in regulation of regenerative and primary mitogen induced hepatocyte proliferáción. According to our results the sensitivity of these two processes for the effect of TGFβ1 is also different.

Increased TGFβ1 production can play a role in the well-known suppressed regenerative capacity of cirrhotic livers. If mitogenic effect of TCPOBOP is not sensitive for inhibition of TGFβ1, then expectedly primary hepatocyte mitogens can stimulate regeneration of cirrhotic livers. We investigated the effect of TCPOBOP on livers made cirrhotic by two different methods. The effect of TCPOBOP decreased on cirrhotic livers, but significant proliferative response was detectable in both cirrhotic groups. Based on this result, primary mitogens may stimulate regeneration of human cirrhotic liver after surgical resection.

We can observe tissue changes containing bileduct-like structures with various morphological appearances and extensions in a wide variety of human liver diseases. They are called ductular reactions and their origine and function is still debated. There is no consistent classification and terminology to allow of standard analysis of them. In our study, the majority (86%) of the samples could be classified immunohistochemicaly into three categories with three antibodies (EMA, CD10, CD56). All groups contain similar liver diseases, so we can assume our classification may initiate further similar more extended studies resulting in a generally accepted rational classification elucidating biological significance.

X. IRODALOMJEGYZÉK

1. Sergi, C., Adam, S., Kahl, P., Otto, H.F., *The remodeling of the primitive human biliary system.* Early Hum Dev, 2000. **58**(3): p. 167-78.
2. Lemaigre, F.P., *Development of the biliary tract.* Mech Dev, 2003. **120**(1): p. 81-7.
3. Greene, A.K., Puder, M., Partial hepatectomy in the mouse: technique and perioperative management. J Invest Surg, 2003. **16**(2): p. 99-102.
4. Farber, J.L., Gerson, R.J., *Mechanisms of cell injury with hepatotoxic chemicals.* Pharmacol Rev, 1984. **36**(2 Suppl): p. 71S-75S.
5. Fausto, N., Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. Hepatology, 2004. **39**(6): p. 1477-87.
6. Nagy, P., Bisgaard, H.C., Thorgeirsson, S.S., Expression of hepatic transcription factors during liver development and oval cell differentiation. J Cell Biol, 1994. **126**(1): p. 223-33.
7. Lemire, J.M., Shiojiri, N., Fausto, N., Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine. Am J Pathol, 1991. **139**(3): p. 535-52.
8. Paku, S., Schnur, J., Nagy, P., Thorgeirsson, S.S., Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver. Am J Pathol, 2001. **158**(4): p. 1313-23.
9. Petersen, B.E., Zajac, V.F., Michalopoulos, G.K., *Bile ductular damage induced by methylene dianiline inhibits oval cell activation.* Am J Pathol, 1997. **151**(4): p. 905-9.
10. Roskams, T., De Vos, R., Van Eyken, P., Myazaki, H., Van Damme, B., Desmet, V., Hepatic OV-6 expression in human liver disease and rat experiments: evidence for hepatic progenitor cells in man. J Hepatol, 1998. **29**(3): p. 455-63.
11. Theise, N.D., Saxena, R., Portmann, B.C., Thung, S.N., Yee, H., Chiriboga, L., Kumar, A., Crawford, J.M.., *The canals of Hering and hepatic stem cells in humans.* Hepatology, 1999. **30**(6): p. 1425-33.

12. Fujii, H., Hirose, T., Oe, S., Yasuchika, K., Azuma, H., Fujikawa, T., Nagao, M., Yamaoka, Y., Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. J Hepatol, 2002. **36**(5): p. 653-9.
13. Rhim, J.A., Sandgren, E.P., Degen, J.L., Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. Science, 1994. **263**(5150): p. 1149-52.
14. Ledda-Columbano, G.M., Pibiri, M., Concas, D., Cossu, C., Tripodi, M., Columbano, A., Loss of cyclin D1 does not inhibit the proliferative response of mouse liver to mitogenic stimuli. Hepatology, 2002. **36**(5): p. 1098-105.
15. Ledda-Columbano, G.M., Curto, M., Piga, R., Zedda, A.I., Menegazzi, M., Sartori, C., Shinozuka, H., Bluethmann, H., Poli, V., Ciliberto, G., Columbano A., In vivo hepatocyte proliferation is inducible through a TNF and IL-6-independent pathway. Oncogene, 1998. **17**(8): p. 1039-44.
16. Seglen, P.O., *Preparation of isolated rat liver cells.* Methods Cell Biol, 1976. **13**: p. 29-83.
17. Strom, S.C., Jirtle, R.L., Jones, R.S., Novicki, D.L., Rosenberg, M.R., Novotny, A., Irons, G., McLain, J.R., Michalopoulos, G., *Isolation, culture, and transplantation of human hepatocytes.* J Natl Cancer Inst, 1982. **68**(5): p. 771-8.
18. Block, G.D., Locker, J., Bowen, W.C., Petersen, B.E., Katyal, S., Strom, S.C., Riley, T., Howard, T.A., Michalopoulos, G.K.., Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium. J Cell Biol, 1996. **132**(6): p. 1133-49.
19. Cruise, J.L., Knechtle, S.J., Bollinger, R.R., Kuhn, C., Michalopoulos, G., *Alpha 1-adrenergic effects and liver regeneration.* Hepatology, 1987. **7**(6): p. 1189-94.
20. Kimura, M., S. Osumi, and M. Ogihara, Stimulation of DNA synthesis and proliferation by prostaglandins in primary cultures of adult rat hepatocytes. Eur J Pharmacol, 2000. **404**(3): p. 259-71.
21. Webber, E.M., Bruix, J., Pierce, R.H., Fausto, N., Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. Hepatology, 1998. **28**(5): p. 1226-34.

22. Ni, N., Yager J.D., Comitogenic effects of estrogens on DNA synthesis induced by various growth factors in cultured female rat hepatocytes. Hepatology, 1994. **19**(1): p. 183-92.
23. McGowan, J.A., Strain, A.J., Bucher, N.L., DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes in a defined medium: effects of epidermal growth factor, insulin, glucagon, and cyclic-AMP. J Cell Physiol, 1981. **108**(3): p. 353-63.
24. Fausto, N., Campbell, J.S., Riehle, K.J., *Liver regeneration.* Hepatology, 2006. **43**(2 Suppl 1): p. S45-53.
25. Tanaka, E.M., *Regeneration: if they can do it, why can't we?* Cell, 2003. **113**(5): p. 559-62.
26. Papp, V., Dezsö, K., László, V., Nagy, P., Paku, S., Architectural changes during regenerative and ontogenic liver growth in the rat. Liver Transpl, 2009. **15**(2): p. 177-83.
27. Michalopoulos, G.K., *Liver regeneration.* J Cell Physiol, 2007. **213**(2): p. 286-300.
28. Michalopoulos, G.K., DeFrances, M.C., *Liver regeneration.* Science, 1997. **276**(5309): p. 60-6.
29. Akerman, P., Cote, P., Yang, S.Q., McClain, C., Nelson, S., Bagby, G.J., Diehl, A.M., Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. Am J Physiol, 1992. **263**(4 Pt 1): p. G579-85.
30. FitzGerald, M.J., Webber, E.M., Donovan, J.R., Fausto, N., Rapid DNA binding by nuclear factor kappa B in hepatocytes at the start of liver regeneration. Cell Growth Differ, 1995. **6**(4): p. 417-27.
31. Cressman, D.E., Diamond, R.H., Taub, R., *Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration.* Hepatology, 1995. **21**(5): p. 1443-9.
32. Campbell, J.S., Prichard, L., Schaper, F., Schmitz, J., Stephenson-Famy, A., Rosenfeld, M.E. Argast, G.M., Heinrich, P.C., Fausto, N., Expression of suppressors of cytokine signaling during liver regeneration. J Clin Invest, 2001. **107**(10): p. 1285-92.
33. Hayashi, H., Nagaki, M., Imose, M., Osawa, Y., Kimura, K., Takai, S., Imao, M., Naiki, T., Kato, T., Moriwaki, H., Normal liver regeneration and liver cell

apoptosis after partial hepatectomy in tumor necrosis factor-alpha-deficient mice. Liver Int, 2005. **25**(1): p. 162-70.

34. Su, A.I., Guidotti, L.G., Pezacki, J.P., Chisari, F.V., Schultz, P.G., Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(17): p. 11181-6.
35. White, P., Brestelli, J.E., Kaestner, K.H., Greenbaum, L.E., Identification of transcriptional networks during liver regeneration. J Biol Chem, 2005. **280**(5): p. 3715-22.
36. Blindenbacher, A., Wang, X., Langer, I., Savino, R., Terracciano, L., Heim, M.H., Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice. Hepatology, 2003. **38**(3): p. 674-82.
37. Sakamoto, T., Liu, Z., Murase, N., Ezure, T., Yokomuro, S., Poli, V., Demetris, A.J., Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. Hepatology, 1999. **29**(2): p. 403-11.
38. Strey, C.W., Markiewski, M., Mastellos, D., Tudoran, R., Spruce, L.A., Greenbaum, L.E., Lambris, J.D., The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. J Exp Med, 2003. **198**(6): p. 913-23.
39. Jakowlew, S.B., Mead, J.E., Danielpour, D., Wu, J., Roberts, A.B., Fausto, N., Transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms in rat liver regeneration: messenger RNA expression and activation of latent TGF-beta. Cell Regul, 1991. **2**(7): p. 535-48.
40. Houck, K.A., Michalopoulos, G.K., Altered responses of regenerating hepatocytes to norepinephrine and transforming growth factor type beta. J Cell Physiol, 1989. **141**(3): p. 503-9.
41. Kogure, K., Zhang, Y.Q., Maeshima, A., Suzuki, K., Kuwano, H., Kojima, I., The role of activin and transforming growth factor-beta in the regulation of organ mass in the rat liver. Hepatology, 2000. **31**(4): p. 916-21.
42. Ichikawa, T., Zhang, Y.Q., Kogure, K., Hasegawa, Y., Takagi, H., Mor,i M, Kojima, I., Transforming growth factor beta and activin tonically inhibit DNA synthesis in the rat liver. Hepatology, 2001. **34**(5): p. 918-25.

43. Matsumoto, K., Nakamura, T., Hepatocyte growth factor: molecular structure, roles in liver regeneration, and other biological functions. Crit Rev Oncog, 1992. **3**(1-2): p. 27-54.
44. Michalopoulos, G.K., Khan, Z., *Liver regeneration, growth factors, and amphiregulin.* Gastroenterology, 2005. **128**(2): p. 503-6.
45. Borowiak, M., Garratt, A.N., Wüstefeld, T., Strehle, M., Trautwein, C., Birchmeier, C., *Met provides essential signals for liver regeneration.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(29): p. 10608-13.
46. Webber, E.M., Wu, J.C., Wang, L., Merlino, G., Fausto, N.,Overexpression of transforming growth factor-alpha causes liver enlargement and increased hepatocyte proliferation in transgenic mice. Am J Pathol, 1994. **145**(2): p. 398-408.
47. Russell, W.E., Kaufmann, W.K., Sitaric, S, Luetteke, N.C., Lee, D.C., Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor-alpha-targeted mice. Mol Carcinog, 1996. **15**(3): p. 183-9.
48. Mitchell, C., Nivison, M., Jackson, L.F., Fox, R., Lee, D.C., Campbell, J.S., Fausto, N., Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration. J Biol Chem, 2005. **280**(4): p. 2562-8.
49. Mead, J.E., Braun, L., Martin, D.A., Fausto, N., Induction of replicative competence ("priming") in normal liver. Cancer Res, 1990. **50**(21): p. 7023-30.
50. McGowan, J., Atryzek, V., Fausto, N., Effects of protein-deprivation on the regeneration of rat liver after partial hepatectomy. Biochem J, 1979. **180**(1): p. 25-35.
51. Jiang, Y.P., Ballou, L.M., Lin, R.Z., *Rapamycin-insensitive regulation of 4e-BP1 in regenerating rat liver.* J Biol Chem, 2001. **276**(14): p. 10943-51.
52. Goggin, M.M., Nelsen, C.J., Kimball, S.R., Jefferson, L.S., Morley, S.J., Albrecht, J.H., Rapamycin-sensitive induction of eukaryotic initiation factor 4F in regenerating mouse liver. Hepatology, 2004. **40**(3): p. 537-44.
53. Argast, G.M., Campbell, J.S., Brooling, J.T., Fausto, N., Epidermal growth factor receptor transactivation mediates tumor necrosis factor-induced hepatocyte replication. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34530-6.

54. Columbano, A., Shinozuka, H., *Liver regeneration versus direct hyperplasia.* Faseb J, 1996. **10**(10): p. 1118-28.

55. Columbano, A., Ledda-Columbano, G.M., Coni, P.P., Faa, G., Liguori, C., Santa Cruz, G., Pani, P., Occurrence of cell death (apoptosis) during the involution of liver hyperplasia. Lab Invest, 1985. **52**(6): p. 670-5.

56. Diwan, B.A., Lubet, R.A., Ward, J.M., Hrabie, J.A., Rice, J.M., Tumor-promoting and hepatocarcinogenic effects of 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene (TCPOBOP) in DBA/2NCr and C57BL/6NCr mice and an apparent promoting effect on nasal cavity tumors but not on hepatocellular tumors in F344/NCr rats initiated with N-nitrosodiethylamine. Carcinogenesis, 1992. **13**(10): p. 1893-901.

57. Ledda-Columbano, G.M., Perra, A., Loi, R., Shinozuka, H., Columbano, A., Cell proliferation induced by triiodothyronine in rat liver is associated with nodule regression and reduction of hepatocellular carcinomas. Cancer Res, 2000. **60**(3): p. 603-9.

58. Honkakoski, P., Zelko, I., Sueyoshi, T., Negishi, M., The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene. Mol Cell Biol, 1998. **18**(10): p. 5652-8.

59. Tzameli, I., Pissios, P., Schuetz, E.G., Moore, D.D., The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR. Mol Cell Biol, 2000. **20**(9): p. 2951-8.

60. Forman, B.M., Tzameli, I., Choi, H.S., Chen, J., Simha, D., Seol, W., Evans, R.M., Moore, D.D., Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta. Nature, 1998. **395**(6702): p. 612-5.

61. Režen, T., Tamasi, V., Lövgren-Sandblom, A., Björkhem, I., Meyer, U.A., Rozman, D., Effect of CAR activation on selected metabolic pathways in normal and hyperlipidemic mouse livers. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 384.

62. Wei, P., Zhang, J., Egan-Hafley, M., Liang, S., Moore, D.D., The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. Nature, 2000. **407**(6806): p. 920-3.

63. Liebermann, D.A., Hoffman, B., *Gadd45 in the response of hematopoietic cells to genotoxic stress.* Blood Cells Mol Dis, 2007. **39**(3): p. 329-35.

64. Lu, B., Ferrandino, A.F., Flavell, R.A., Gadd45beta is important for perpetuating cognate and inflammatory signals in T cells. Nat Immunol, 2004. **5**(1): p. 38-44.
65. Tian, J., Huang, H., Hoffman, B., Liebermann, D.A., Ledda-Columbano, G.M., Columbano, A., Locker, J., Gadd45beta is an inducible coactivator of transcription that facilitates rapid liver growth in mice. J Clin Invest, 2011. **121**(11): p. 4491-502.
66. Martin, P.G., Guillou, H., Lasserre, F., Déjean, S., Lan, A., Pascussi, J.M., Sancristobal, M., Legrand, P., Besse, P., Pineau, T., Novel aspects of PPARalpha-mediated regulation of lipid and xenobiotic metabolism revealed through a nutrigenomic study. Hepatology, 2007. **45**(3): p. 767-77.
67. Columbano, A., Ledda-Columbano, G.M., Pibiri, M., Concas, D., Reddy, J.K., Rao, M.S., Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha mice show enhanced hepatocyte proliferation in response to the hepatomitogen 1,4-bis [2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzene, a ligand of constitutive androstane receptor. Hepatology, 2001. **34**(2): p. 262-6.
68. Maglich, J.M., Lobe, D.C., Moore, J.T., The nuclear receptor CAR (NR1I3) regulates serum triglyceride levels under conditions of metabolic stress. J Lipid Res, 2009. **50**(3): p. 439-45.
69. Ledda-Columbano, G.M., Pibiri, M., Loi, R., Perra, A., Shinozuka, H., Columbano, A., Early increase in cyclin-D1 expression and accelerated entry of mouse hepatocytes into S phase after administration of the mitogen 1, 4-Bis[2-(3,5-Dichloropyridyloxy)] benzene. Am J Pathol, 2000. **156**(1): p. 91-7.
70. Pibiri, M., Ledda-Columbano, G.M., Cossu, C., Simbula, G., Menegazzi, M., Shinozuka, H., Columbano, A., Cyclin D1 is an early target in hepatocyte proliferation induced by thyroid hormone (T3). Faseb J, 2001. **15**(6): p. 1006-13.
71. Kumar, V., Robbins, S.L., *Robbins basic pathology*. 8th ed. 2007, Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier. xiv, 946 p.
72. Nelsen, C.J., Rickheim, D.G., Timchenko, N.A., Stanley, M.W., Albrecht, J.H., Transient expression of cyclin D1 is sufficient to promote hepatocyte replication and liver growth in vivo. Cancer Res, 2001. **61**(23): p. 8564-8.
73. Ledda-Columbano, G.M., Perra, A., Concas, D., Cossu, C., Molotzu, F., Sartori, C., Shinozuka, H., Columbano, A., Different effects of the liver mitogens triiodo-

thyronine and ciprofibrate on the development of rat hepatocellular carcinoma. Toxicol Pathol, 2003. **31**(1): p. 113-20.

74. Heldin, C.H., Landstrom, M., Moustakas, A., Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(2): p. 166-76.
75. Nguyen, L.N., Furuya, M.H., Wolfraim, L.A., Nguyen, A.P., Holdren, M.S., Campbell, J.S., Knight, B., Yeoh, G.C., Fausto, N., Parks, W.T., Transforming growth factor-beta differentially regulates oval cell and hepatocyte proliferation. Hepatology, 2007. **45**(1): p. 31-41.
76. Luo, J.H., Ren, B., Keryanov, S., Tseng, G.C., Rao, U.N., Monga, S.P., Strom, S., Demetris, A.J., Nalesnik, M., Yu, Y.P., Ranganathan, S., Michalopoulos, G.K., Transcriptomic and genomic analysis of human hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. Hepatology, 2006. **44**(4): p. 1012-24.
77. Michalopoulos, G.K., DeFrances, M., *Liver regeneration.* Adv Biochem Eng Biotechnol, 2005. **93**: p. 101-34.
78. Chari, R.S., Price, D.T., Sue, S.R., Meyers, W.C., Jirtle, R.L., Down-regulation of transforming growth factor beta receptor type I, II, and III during liver regeneration. Am J Surg, 1995. **169**(1): p. 126-31; discussion 131-2.
79. Jirtle, R.L., Carr, B.I., Scott, C.D., Modulation of insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptors and transforming growth factor-beta 1 during liver regeneration. J Biol Chem, 1991. **266**(33): p. 22444-50.
80. Sanderson, N., Factor, V., Nagy, P., Kopp, J., Kondaiah, P., Wakefield, L., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Thorgeirsson, S.S., Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(7): p. 2572-6.
81. Oe, S., Lemmer, E.R., Conner, E.A., Factor, V.M., Levéen, P., Larsson, J., Karlsson, S., Thorgeirsson, S.S., Intact signaling by transforming growth factor beta is not required for termination of liver regeneration in mice. Hepatology, 2004. **40**(5): p. 1098-105.
82. Murphy, M.O., Ghosh, J., Fulford, P., Khwaja, N., Halka, A.T., Carter, A., Turner, N.J., Walker, M.G., Expression of growth factors and growth factor

receptor in non-healing and healing ischaemic ulceration. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2006. **31**(5): p. 516-22.

83. Hashimoto, M., Watanabe, G., Functional capacity of the cirrhotic liver after partial hepatectomy in the rat. Surgery, 1999. **126**(3): p. 541-7.
84. Kato, A., Bamba, H., Shinohara, M., Yamauchi, A., Ota, S., Kawamoto, C., Yoshida, Y., Relationship between expression of cyclin D1 and impaired liver regeneration observed in fibrotic or cirrhotic rats. J Gastroenterol Hepatol, 2005. **20**(8): p. 1198-205.
85. Yang, Z.F., Lau, C.K., Ngai, P., Lam, S.P., Ho, D.W., Poon, R.T., Fan, S.T., Cardiotrophin-1 enhances regeneration of cirrhotic liver remnant after hepatectomy through promotion of angiogenesis and cell proliferation. Liver Int, 2008. **28**(5): p. 622-31.
86. El-Serag, H.B., Marrero, J.A., Rudolph, L., Reddy, K.R., *Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma.* Gastroenterology, 2008. **134**(6): p. 1752-63.
87. El-Serag, H.B., Rudolph, K.L., *Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis.* Gastroenterology, 2007. **132**(7): p. 2557-76.
88. Ledda-Columbano, G.M., Pibiri, M., Cossu, C., Molotzu, F., Locker, J., Columbano, A., Aging does not reduce the hepatocyte proliferative response of mice to the primary mitogen TCPOBOP. Hepatology, 2004. **40**(4): p. 981-8.
89. Columbano, A., Simbula, M., Pibiri, M., Perra, A., Pisanu, A., Uccheddu, A., Ledda-Columbano, G.M., Potential utility of xenobiotic mitogens in the context of liver regeneration in the elderly and living-related transplantation. Lab Invest, 2008. **88**(4): p. 408-15.
90. Popper, H., Kent, G., Stein, R., *Ductular cell reaction in the liver in hepatic injury.* J Mt Sinai Hosp N Y, 1957. **24**(5): p. 551-6.
91. Aterman, K., *The stem cells of the liver--a selective review.* J Cancer Res Clin Oncol, 1992. **118**(2): p. 87-115.
92. Vandersteenhoven, A.M., Burchette, J., Michalopoulos, G., *Characterization of ductular hepatocytes in end-stage cirrhosis.* Arch Pathol Lab Med, 1990. **114**(4): p. 403-6.
93. Desmet, V., Roskams, T., Van Eyken, P., *Ductular reaction in the liver.* Pathol Res Pract, 1995. **191**(6): p. 513-24.

94. Burt, A.D., MacSween, R.N., *Bile duct proliferation--its true significance?* Histopathology, 1993. **23**(6): p. 599-602.

95. Demetris, A.J., Seaberg, E.C., Wennerberg, A., Ionellie, J., Michalopoulos, G., Ductular reaction after submassive necrosis in humans. Special emphasis on analysis of ductular hepatocytes. Am J Pathol, 1996. **149**(2): p. 439-48.

96. Fiel, M.I., Antonio, L.B., Nalesnik, M.A., Thung, S.N., Gerber, M.A., Characterization of ductular hepatocytes in primary liver allograft failure. Mod Pathol, 1997. **10**(4): p. 348-53.

97. Roskams, T.A., Theise, N.D., Balabaud, C., Bhagat, G., Bhathal, P.S., Bioulac-Sage, P., Brunt, E.M., Crawford, J.M., Crosby, H.A., Desmet, V., Finegold, M.J., Geller, S.A., Gouw, A.S., Hytiroglou, P., Knisely, A.S., Kojiro, M., Lefkowitch, J.H., Nakanuma, Y., Olynyk, J.K., Park, Y.N., Portmann, B., Saxena, R., Scheuer, P.J., Strain, A.J., Thung, S.N., Wanless, I.R., West, A.B., Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. Hepatology, 2004. **39**(6): p. 1739-45.

98. Fujita, M., Furukawa, H., Hattori, M., Todo, S., Ishida, Y., Nagashima, K., Sequential observation of liver cell regeneration after massive hepatic necrosis in auxiliary partial orthotopic liver transplantation. Mod Pathol, 2000. **13**(2): p. 152-7.

99. Clouston, A.D., Powell, E.E., Walsh, M.J., Richardson, M.M., Demetris, A.J., Jonsson, J.R., Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis. Hepatology, 2005. **41**(4): p. 809-18.

100. Xiao, S.Y., Wang, H.L., Hart, J., Fleming, D., Beard, M.R., cDNA arrays and immunohistochemistry identification of CD10/CALLA expression in hepatocellular carcinoma. Am J Pathol, 2001. **159**(4): p. 1415-21.

101. Shousha, S., Gadir, F., Peston, D., Bansi, D., Thillainaygam, A.V., Murray-Lyon, I.M., CD10 immunostaining of bile canaliculi in liver biopsies: change of staining pattern with the development of cirrhosis. Histopathology, 2004. **45**(4): p. 335-42.

102. Bissell, D.M., Roulot, D., George, J., *Transforming growth factor beta and the liver*. Hepatology, 2001. **34**(5): p. 859-67.

103. Russell, W.E., Coffey, R.J., Jr. Ouellette, A.J., Moses, H.L., Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(14): p. 5126-30.
104. Braun, L., Mead, J.E., Panzica, M., Mikumo, R., Bell, G.I., Fausto, N., Transforming growth factor beta mRNA increases during liver regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(5): p. 1539-43.
105. Armendariz-Borunda, J., Katai, H., Jones, C.M., Seyer, J.M., Kang, A.H., Raghow, R., Transforming growth factor beta gene expression is transiently enhanced at a critical stage during liver regeneration after CCl4 treatment. Lab Invest, 1993. **69**(3): p. 283-94.
106. Nakamura, T., Tomita, Y., Hirai, R., Yamaoka, K., Kaji, K., Ichihara, A., Inhibitory effect of transforming growth factor-beta on DNA synthesis of adult rat hepatocytes in primary culture. Biochem Biophys Res Commun, 1985. **133**(3): p. 1042-50.
107. Bouzahzah, B., Fu, M., Iavarone, A., Factor, V.M., Thorgeirsson, S.S., Pestell, R.G., Transforming growth factor-beta1 recruits histone deacetylase 1 to a p130 repressor complex in transgenic mice in vivo. Cancer Res, 2000. **60**(16): p. 4531-7.
108. Fasciati, R., Maier, P., EGF- and CPA-induced mitogenic stimuli are differentially down-regulated by TGF-beta1 in cultured rat hepatocytes. Carcinogenesis, 1997. **18**(5): p. 911-7.
109. Müller, G.F., Döhr, O., El-Bahay, C., Kahl, R., Abel, J., Effect of transforming growth factor-beta1 on cytochrome P450 expression: inhibition of CYP1 mRNA and protein expression in primary rat hepatocytes. Arch Toxicol, 2000. **74**(3): p. 145-52.
110. Yoo, J., Ghiassi, M., Jirmanova, L., Balliet, A.G., Hoffman, B., Fornace, A.J., Jr Liebermann, D.A., Bottinger, E.P., Roberts, A.B., Transforming growth factor-beta-induced apoptosis is mediated by Smad-dependent expression of GADD45b through p38 activation. J Biol Chem, 2003. **278**(44): p. 43001-7.

111. Major, M.B., Jones, D.A., Identification of a gadd45beta 3' enhancer that mediates SMAD3- and SMAD4-dependent transcriptional induction by transforming growth factor beta. J Biol Chem, 2004. **279**(7): p. 5278-87.
112. Tian, M., Schiemann, W.P., *The TGF-beta paradox in human cancer: an update.* Future Oncol, 2009. **5**(2): p. 259-71.
113. Nakatsukasa, H., Evarts, R.P., Hsia, C.C., Marsden, E., Thorgeirsson, S.S., Expression of transforming growth factor-beta 1 during chemical hepatocarcinogenesis in the rat. Lab Invest, 1991. **65**(5): p. 511-7.
114. Kiss, A., Wang, N.J., Xie, J.P., Thorgeirsson, S.S., Analysis of transforming growth factor (TGF)-alpha/epidermal growth factor receptor, hepatocyte growth Factor/c-met,TGF-beta receptor type II, and p53 expression in human hepatocellular carcinomas. Clin Cancer Res, 1997. **3**(7): p. 1059-66.
115. Bedossa, P., Peltier, E., Terris, B., Franco, D., Poynard, T., Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and TGF-beta 1 receptors in normal, cirrhotic, and neoplastic human livers. Hepatology, 1995. **21**(3): p. 760-6.
116. Clavien, P.A., Petrowsky, H., DeOliveira, M.L., Graf, R., *Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation.* N Engl J Med, 2007. **356**(15): p. 1545-59.
117. Yang, S., Leow, C.K., Tan, T.M., Expression patterns of cytokine, growth factor and cell cycle-related genes after partial hepatectomy in rats with thioacetamide-induced cirrhosis. World J Gastroenterol, 2006. **12**(7): p. 1063-70.
118. Albrecht, J.H., Meyer, A.H., Hu M.Y., Regulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/Cip1/Sdi1) gene expression in hepatic regeneration. Hepatology, 1997. **25**(3): p. 557-63.
119. Santoni-Rugiu, E., Jelnes, P., Thorgeirsson, S.S., Bisgaard, H.C., Progenitor cells in liver regeneration: molecular responses controlling their activation and expansion. Apmis, 2005. **113**(11-12): p. 876-902.
120. Van Den Heuvel, M.C., Slooff, M.J., Visser, L., Muller, M., De Jong, K.P., Poppema, S., Gouw, A.S., Expression of anti-OV6 antibody and anti-N-CAM antibody along the biliary line of normal and diseased human livers. Hepatology, 2001. **33**(6): p. 1387-93.

121. Strain, A.J., Crosby, H.A., Nijjar, S., Kelly, D.A., Hubscher, S.G., *Human liver-derived stem cells.* Semin Liver Dis, 2003. **23**(4): p. 373-84.
122. Sonzogni, A., Colloredo, G., Fabris, L., Cadamuro, M., Paris, B., Roffi, L., Pozzi, M., Bovo, G., Del Poggio, P., Portmann, B.C., Strazzabosco, M., Isolated idiopathic bile ductular hyperplasia in patients with persistently abnormal liver function tests. J Hepatol, 2004. **40**(4): p. 592-8.
123. Falkowski, O., et al., Regeneration of hepatocyte 'buds' in cirrhosis from intrabiliary stem cells. J Hepatol, 2003. **39**(3): p. 357-64.
124. Paku, S., Nagy, P., Kopper, L., Thorgeirsson, S.S., 2-acetylaminofluorene dose-dependent differentiation of rat oval cells into hepatocytes: confocal and electron microscopic studies. Hepatology, 2004. **39**(5): p. 1353-61.
125. Paku, S., Dezso, K., Kopper, L., Nagy, P., Immunohistochemical analysis of cytokeratin 7 expression in resting and proliferating biliary structures of rat liver. Hepatology, 2005. **42**(4): p. 863-70.
126. Zhou, H., Rogler, L.E., Teperman, L., Morgan, G., Rogler, C.E., Identification of hepatocytic and bile ductular cell lineages and candidate stem cells in bipolar ductular reactions in cirrhotic human liver. Hepatology, 2007. **45**(3): p. 716-24.

doi:10.14753/SE.2013.1780

XI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

XI.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. Bugyik, E., Dezső, K., Turányi, E., Szurián, K., Paku, S., Nagy, P. 1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene induces substantial hyperplasia in fibrotic mouse liver. Int J Exp Pathol. 2012 Apr; **93(2)**: p. 125-129
2. Turányi, E., Dezso, K., Bugyik, E., Szurián, K., Paku, S., Nagy, P., The primary mitogen (TCPOBOP)-induced hepatocyte proliferáción is resistant to transforming growth factor- β-1 inhibition.Liver Int. 2010 Nov; **30(10)**: p. 1505-10.
3. Turányi, E., Dezsö, K., Csomor, J., Schaff, Z., Paku, S., Nagy, P. Architectural and immunohistochemical characterization of biliary ductules in normal human liver. Histopathology. 2010 Oct; **57(4)**: p. 607-14.

XI.2. Egyéb témában megjelent közlemények

1. Schiefer, A.I., Vastagh, I., Molnar MJ, Bereczki D, Varallyai G, Deak B, Csomor J, Turanyi E, Kovacs GG, Müllauer L. Extranodal marginal zone lymphoma of the CNS arising after a long-standing history of atypical white matter disease. Leuk Res. 2012 Apr 18.
2. Simon M, Vastagh I, Várallyay G, Turányi E, Sréter L, Czirják S, Bereczki D. Intracranial propagation of invasive aspergilloma in an immuncompromised patient.Ideggyogy Sz. 2010 May 30; 63(5-6): p. 193-6. Hungarian.
3. Dezso K, Paku S, Papp V, Turányi E, Nagy P. Immunohistochemical classification of ductular reactions in human liver. Stem Cells Dev. 2009 Dec; **18(10)**: p. 1417-22.
4. Turányi, E., Dezso, K., Paku, S., Nagy, P. DLK is a novel immunohistochemical marker for adrenal gland tumors.Virchows Arch. 2009 Sep; 455(3): p. 295-9. Epub 2009 Aug 14.
5. Dezso, K., Halász, J., Bisgaard, H.C., Paku, S., Turányi, E., Schaff, Z., Nagy P. Delta-like protein (DLK) is a novel immunohistochemical marker for human hepatoblastomas. Virchows Arch. 2008 Apr; 452(4): p. 443-8. Epub 2008 Jan 31.
6. Járay, B., Turányi, E., Szalay, K., Winternitz, T. [Ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy of focal liver lesions].Orv Hetil. 1997 Jul 6; 138(27): p. 1731-6. Hungarian.

doi:10.14753/SE.2013.1780

XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm családomnak a végtelen türelmet és sok bátorítást amit a munkám során tapasztaltam.

Köszönöm Prof Dr Kopper Lászlónak és Prof Dr Matolcsy Andrásnak, hogy az általuk vezetett Intézetben végezhettem a PhD munkámat.

Köszönöm témavezetőmnek, Prof Dr Nagy Péternek rengeteg segítségét, bátorítását, bizalmát és türelmét az általa vezetett laborban végzett munkám során.

Dr Dezső Katalinnak köszönhetem, hogy megtaláltam a helyem a labor életében és folyamatosan jelen volt, ha munkámban tanácsra volt szükségem.

Köszönöm Dr Szurján Kingának, Bugyik Edinának és dr Paku Sándornak a munkámban nyújtott segítségüket.

Köszönettel tartozom Prof Dr Kovalszky Ilonának, hogy a laborjában végezhettem méréseimet, valamint a labor dolgozóinak, hogy bármikor fordulhattam hozzájuk problémámmal. Külön köszönöm Dr Baghy Kornélia szakmai segítségét.

Köszönöm a haematológiai labor munkatársainak Bárányné Pallagh Adriennek és Lengyel Anikónak technikai segítségüket.

Köszönettel tartozom Dr Molnár Andrásnak számítástechnikai téren nyújtott segítségéért, Glyn T. Williams-nek és Dr Csernus Balázsnak az angol szövegek lektorálásáért.

Köszönöm Dr Bálint Katalinnak, hogy lehetővé tette, hogy munkámat végezhessem.

Laczik Cecíliának köszönettel tartozom, hogy ügyes-bajos dolgaimmal bármikor fordulhattam hozzá.