Proliferatív folyamatok vizsgálata humán és egér májban

Doktori tézisek

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

Irodalmi áttekintés

A máj létfontosságú, igen szerteágazó szereppel bíró szerv. Hatalmas rezervkapacitással rendelkezik, ugyanakkor károsodást követően igen hatékonyan tud regenerálódni.
Kísérletes körülmények között rágcsálók esetében a máj károsítására legtöbbször használt eljárás a sebészi parciális hepatectomia. Ekkor a májlebenyek egy részét eltávolítják, mely rágcsálók esetében könnyen kivitelezhető és nem okoz necrosist a hátramaradó szövetekben. A parciális hepatectomiát követő regeneráció során a máj 5-7 nap alatt pótolja elveszett tömegét. Emberben ez a folyamat valamivel lassúbb, a máj felének eltávolítása után körülbelül egy hónapra van szükség a regenerációhoz.
A hagyományosan regenerációnak nevezett folyamat szigorúan véve kompenzatorikus hyperplázia, hiszen az eltávolított lebenyek nem nőnek vissza, a megmaradt lebenyek növekedése által pótlódik a máj tömege.
A parciális hepatectomiát követő kompenzatorikus hyperplázia során számos cytokin (IL6, TNF), növekedési faktor (HGF, TGFα), transzkripciós faktor (STAT3, NF-κB) és azonnali korai gén (c-fos, c-jun. c-myc) aktiválódik.
A máj előzetes károsítása nélkül is elő lehet idézni májsejt proliferációt in vivo úgynevezett primer hepatocyta mitogénekkel. A primer hepatocyta mitogének csoportja igen heterogén, közös tulajdonságuk, hogy transzkripciós faktorként működő nukleáris receptorokon hatnak, egyszeri adagjuk is jelentős DNS szintézist idéz elő a májban, és adagolásukat megszüntetve a máj a májsejtek szabályozott apoptosisát követően visszanyeri eredeti DNS tartalmát és tömegét. Jelentőségüket többek között az adja, hogy a parciálishepatectomiát követő kompenzatorikus hyperpláziától eltérő szignálutakat aktiválnak. A primer mitogének okozta májsejt proliferációhoz nem szükségesek a kompenzatorikus

hyperplázia kapcsán kulcsszerepet játszó faktorok. A kétféle proliferáció következményei is eltérnek egymástól.
Az általunk primer mitogénként használt 1,4-bis[2-(3,5 dichloropyridyloxy)]benzén , a TCPOBOP egy halogénezett szénhidrát, a constitutiv androsztén receptoron (CAR) keresztül hat. Célgénje többek között a Cyp2b10, mely fontos szerepet játszik a máj méregtelenítő funkciójában.

A TGFβ családba tartozó TGFβ1 az egyik legtöbbet kutatott citokin a parciális hepatectomiát követő regeneráció során, pontos szerepét azonban még ma sem ismerjük. Primer sejtkultúrákban igen hatásos mitoinhibitorként működik, a kompenzatorikus hyperplázia során leginkább a regeneráció leállításában tulajdonítanak neki szerepet, de a pontos mechanizmust felderíteni eddig nem sikerült.
Az általunk is használt transzgén egér vonalon aktív TGFβ1-et a hepatocytákban túltermelő transzgén egerek esetében a regeneráció csökkent, elhúzódó voltáról számoltak be, igazolva, hogy a transzgén terméke lassítja a májszövet parciális hepatectomiát követő regeneratív válaszát.
A TGFβ1 hatásáról primer hepatocyta mitogén okozta májsejt proliferációra még nem számoltak be az irodalomban.

A cirrhotikus máj regenerációs képessége csökkent az egészséges májhoz viszonyítva, amiért részben a cirrhotikus máj megnövekedett TGFβ1 termelését teszik felelőssé. A cirrhotikus máj regenerációs képességének csökkenése a klinikai gyakorlatban is jelentős probléma, hiszen a hepatocelluláris karcinóma többnyire cirrhotikus májban fejlődik ki, a megmaradt cirrhotikus máj csökkent regenerációs képessége miatt azonban a megműtött beteg életkilátásai is rosszabbak.
Az idős állatok mája is csökkent regenerációs képességgel rendelkezik a fiatal állatok májához képest, azonban

TCPOBOP primer hepatocyta mitogén alkalmazásával az idős májak regenerációs képessége a fiatal állatokéhoz hasonló.
A fentiek alapján érdemes megvizsgálni, hogy a cirrhotikus máj regenerációs kapacitása javítható-e primer hepatocyta mitogén alkalmazásával.

Súlyos májkárosodás esetén mind rágcsálókban, mind humán májban gyakran jelennek meg epeutakra emlékeztető ductularis képletek. Ezt a szöveti reakciót hívják ductularis reakciónak.
A ductularis reakciók igen sokfélék eredetük és funkciójuk szerint, ugyanakkor a csoportosításukra tett kísérletek nem vezettek eredményre, nincs egységes nevezéktanuk sem.
Ennek hiányában a különböző megfigyelések és kísérletek eredményeit igen nehéz összevetni, felhasználni. A leginkább használt típusos és atípusos ductularis elnevezést sem ajánlják, mert kevéssé reprodukálható. Így jelenleg egy névvel illetjük például a patkány májban a májsejtek károsításával előidézett reakciót az epeút lekötés okozta reakcióval, holott míg az előbbi esetben a ductularis képleteket alkotó sejtek bizonyítottan mind hepatocyta, mind epeút irányú differenciációra képesek,azaz valamiféle őssejtként működnek, addig az utóbbi esetben a sejtek epeút irányban elkötelezettek. E kétféle jelenséget együtt vizsgálva hibás következtetésekre juthatunk.
Felmerült az igény a reakciók eredetét, morfológiáját és funkcióját is tükröző, reprodukálható és nagy anyagon is alkalmazható osztályozására, de ez ideig nem született a többség számára elfogadható eredmény.
Immunhisztokémiai fenotípus alapján történő osztályozásra még nem történt kísérlet az irodalomban.

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 humán májban kialakult ductularis reakciók immunfenotípusuk alapján?

Anyag és módszer

Állatkísérleteink során TGFβ1 transzgén egereket használtunk. Az egerekben a transzgén az albumin promoter szabályozása alatt áll, így a TGFβ1 csak a májban termelődik, ugyanakkor a szérumszintje állandóan magas. Két szerin kodon cisztein kodonra cserélése miatt közvetlenül aktív TGFβ1 termelődik, nincs szükség az aktiválódásra. Kontrollként azonos korú és nemű C57Bl egeret használtunk. A fibrotikus kísérletek során szintén C57Bl egereket használtunk.
A ductularis reakciókat intézetünk archívumában tárolt humán, paraffinba ágyazott mintákon vizsgáltuk.
A transzgén egerek genotípusát PCR vizsgálattal ellenőriztük.
A vizsgálni kívánt gének expresszióját real time RT-PCR vizsgálattal mértük, GAPDH-hoz viszonyítottuk.
Immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk a ductularis reakciók elemzésekor és a sejtproliferáció vizsgálatakor a BrdU jelölődés kimutatására.

Eredmények

Összehasonlítottuk a TCPOBOP által kiváltott proliferációt TGF β1 túltermelő transzgén egerekben és kontroll állatokban. Vizsgáltuk az állatok májsúlyát, testsúlyhoz viszonyított májsúlyát. A DNS szintézist kétféle megközelítéssel vizsgáltuk. Az úgynevezett pulse jelöléssel mértük az egyszeri TCPOBOP adása utáni különböző időpontokban az S fázisba lépő sejtek arányát, valamint a TCPOBOP kezelést követően 5 napig az állatok ivóvizébe adagolt BrdU segítségével az adott időszak alatt az összes s fázisba lépő sejt arányát, az úgynevezett proliferatív poolt. Eredményeink szerint sem a pulse jelöléssel sem a proliferatív pool mérésével nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni a két csoport között, a kísérletben a TGF β1 nem gátolta a TCPOBOP előidézte proliferációt.

A génexpressziós vizsgálatok alkalmával vizsgáltuk a Cyp2b10-et a CAR célgénjét és mindkét csoportban jelentős növekedést tapasztaltunk, bár a transzgén egerekben ez a növekedés szignifikánsan alacsonyabb volt. Két proliferációs aktivitást tükröző gént is vizsgáltunk a Cyclin A-t és D1-et, mindkét Cyclin expresszió csúcspontja 34 óránál volt, a Cyclin A expressziója valamivel magasabb volt a transzgén állatokban. A TGF β1 expresszió a 30. órától mindkét csoportban megnőtt, a változás a vad típusú egerekben kifejezettebb volt.

Következő kísérletünkben vizsgáltuk, hogy TCPOBOP-pal létre tudunk-e hozni proliferációt cirrhotikus májban. A cirrhosist kétféle vegyülettel hoztuk létre, széntetrakloriddal (CCl4) és tioacetamiddal (TAA). A kezelést követően két hétig az állatokat normál tápon tartottuk, majd szövettani vizsgálattal picrosyrius festéssel ellenőriztük a fibrosis/cirrhosis meglétét.

Hasonlóan előző kísérletünkhöz, ebben az esetben is ellenőriztük a relatív májsúlyokat a TCPOBOP kezelés időpontjában és 5 nappal később. A DNS szintézist 36 órával a kezelést követően illetve 5 napos BrdU itatást követően vizsgáltuk.
A TCPOBOP hatására a relatív májsúlyok jelentősen megemelkedtek, az emelkedés a kontroll állatokban enyhén magasabb volt, de szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk a csoportok között.
Mindhárom csoportban jelentős BrdU beépülést észleltünk, de a kontroll állatokban szignifikánsan magasabb volt a cirrhotikus állatokhoz képest. Mindhárom csoportban jelentős volt az 5 nap alatt S fázisba lépő sejtek aránya is, bár a kontroll állatok esetében magasabb értékeket kaptunk.

Génexpressziós vizsgálatokkal ellenőriztük a TCPOBOP CAR szignálút hatékonyságát a CAR célgénjének a Cyp2b10 expressziójának mérésével. Mindhárom csoportban szignifikáns növekedést tapasztaltunk, de a kontroll állatokban kifejezettebb volt. A Cyclin A expressziója a 36. órában volt a legmagasabb és itt is szignifikáns különbség mutatkozott a kontroll és cirrhotikus állatok között. A TGFβ1 és p27 szintje mindvégig magasabbnak mutatkozott a cirrhotikus csoportokban és ráadásul mindhárom csoportban növekedést is tapasztaltunk.

Következő kísérletünkben megpróbáltuk csoportosítani immunhisztokémiai reakciók segítségével a humán májban különböző körülmények között létrejött duktularis reakciókat. Az irodalomban a duktulusok vizsgálatára használt immunhisztokémiai reakciók közül az AFP, chromogranin, CEA, DLK1, DMBT-1 az összes vizsgált mintában negatív volt, míg a CK19, EpCAM, E.cadherin, claudin 2 mind az

epeutakat, mind a ductulusokat megfestette, így ezek az antitestek alkalmatlannak bizonyultak a ductularis reakciók elkülönítésére. A CK7 szintén jelölte az epeutakat és a ductulusokat is, ugyanakkor halvány festődésével kijelölte az átmeneti hepatobiliáris sejteket is, ezért ezt a antitestet használtuk a ductulusok láthatóvá tételére.
Az EMA, CD10, CD56 különböző festődési mintázatokat mutatott a ductulusokban, ezen mintázatok alapján a 69 esetből 59-et 3 csoportba tudtunk sorolni. Vizsgálataink során a mintában domináló fenotípust vettük alapul.

A Primitív (P) típusú reakcióban a ductularis sejtek CD56 pozitívak, CD10 és EMA negatívak voltak. Morphológiailag lapos sejtek alkotta lumen nélküli kötegeket tudtunk megfigyelni CK7 festéssel. A legtöbb minta ebbe a csoportba tartozott, ide került az összes fokális noduláris hyperpláziát és primer biliáris cirrhosist tartalmazó minta, de néhány egyéb betegségben is megfigyelhető volt ez a típusú reakció.

A következő úgynevezett Differenciálódó (D) típusú, CD56, CD10 és EMA pozitivitást mutató csoportba két nagy betegségtípus tartozott, a cirrhosis és a fulmináns májelégtelenség. A két csoport között morfológiai különbség volt látható. Míg a fulmináns májelégtelenségben a ductulusok alkotásában sok nagy méretű CK7-tel halványan festődő, úgynevezett átmeneti hepatobiliáris sejtet találtunk, addig a cirrhotikus májakban a ductulusok megint az atípusos ductularis reakció képét mutatták kevés átmeneti hepatobiliáris sejttel.

Az Obstruktiv (O) típusú reakcióban a ductulusok epeutakra hasonlítottak, csak CK7 és EMA pozitivitást mutattak, CD10 és CD56 negatívak voltak. Az ebbe a csoportba tartozó

betegségek közös jellemzője az epeúti obstrukció volt (akut epeútelzáródás, biliáris atrézia, szekunder biliáris cirrhosis)

Megbeszélés

Vizsgáltuk a TGF β1 hatását a TCPOBOP okozta hepatocyta proliferációra. Kísérletünk eredményei alapján a primer hepatocyta mitogén TCPOBOP indukálta májsejt proliferáció nem érzékeny a TGF β1 mitoinhibitor hatására.
Ez alapján felmerül, hogy az egyes primer hepatocyta mitogéneknek tulajdonított hepatocyta carcinogenesist gátló hatásban szerepet játszhat a primer mitogének TGF β1-től független hatása. A TGF β paradoxonként ismert teória szerint a daganatos sejtek elveszítik a TGF β1 iránti érzékenységüket, így relatív növekedési előnyre tesznek szert az egészséges sejtekkel szemben. Primer hepatocyta mitogén alkalmazásával esetleg ez a növekedési előny mérsékelhető lenne, nem érvényesülne teljes egészében a TGF β paradoxon.
A cirrhotikus májak csökkent regenerációs képességéért is részben a TGF β1 fokozott termelését teszik felelőssé. Eredményünk alapján felmerül, hogy a cirrhotikus májak regenerációs képessége javítható lenne primer hepatocyta mitogének adagolásával. Következő kísérletünkben ezt vizsgáltuk.

Következő kísérletünkben vizsgáltuk, hogy a TCPOBOP képes-e májsejt proliferációt létrehozni cirrhotikus májban. Eredményeink alapján a TCPOBOP képes volt számottevő proliferációt indukálni cirrhotikus egérmájban, de ez elmaradt a kontroll állatokéhoz képest.
Irodalmi adatok szerint az idős egerek májának regenerációs képessége elmarad a fiatal állatok májához képest, ezért részben a p27 fokozott expresszióját teszik felelőssé. TCPOBOP adagolásával javítható volt az idős állatok májának

regenerációja és kimutatható volt a kísérlet során a p27 expresszió csökkenése idős májban. Jelen kísérletünkben nem lehetett kimutatni a p27 expresszió csökkenését, ez lehet felelős azért, hogy a TCPOBOP képes volt jelentős hyperpláziát kiváltani a fibrotikus májakban, de ennek mértéke jelentősen elmaradt a kontroll állatokétól.
Eredményeink alapján, bár a cirrhotikus májak reakciója a TCPOBOP hatására szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll állatokéhoz képest, mégis jelentős proliferációt sikerült elérni a kezeléssel, így elképzelhető, hogy megfelelő humán hepatocyta mitogén alkalmazásával javítható lenne a cirrhotikus májak regenerációs képessége is.

A különböző, májat károsító állapotokban megjelenő ductularis reakciók igen heterogének, mind megjelenésükben mind eredetükben mind funkciójukban. A
vizsgálatok és megfigyelések eredményeinek összevetését nehezíti az egységes, racionális osztályozás, nevezéktan hiánya. A ductularis reakciók csoportosítására tett kísérletünk során a reakciók jelentős részét, 86 százalékát, 3 csoportba tudtuk osztani. Az azonos betegségekben kialakult reakciók többsége azonos csoportba került, így a csoportosítás tükrözi a ductularis reakciók eredetét, patológiai szerepét is. Munkánk nem jelent végleges és tökéletes módszert a ductularis reakciók csoportosítására, de kiindulópontja lehet más, nagyobb esetszámon végzett vizsgálatoknak.

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.

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.

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.

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.