

## Zárójelentés az OTKA 100931 pályázathoz (2012-2015)

Az őssejtek szerepe a májkárosítások által kiváltott szöveti reakciókban

### 1. A máj őssejtek részvétele a regenerációban

A máj őssejtek részvételével zajló regenerációjának talán legelfogadottabb kísérleti rendszere az ún. AAF/Ph modell, amikor patkányokban 2-acetaminofluoren (AAF) adagolásával megakadályozzuk a hepatocyták osztódását, ezért ezek a sejtek a sebészi parciális hepatectomia (Ph) után nem képesek részt venni a regenerációban. Kísérleteinkben részletesen elemeztünk ennek a régóta tanulmányozott modellnek eddig fel nem tárt aspektusait. A Ph-t követően a periportalis zóna felől ún. ovális sejtekből álló gerendák nőnek a máj parenchymába, majd ezekből alakulnak ki az ún. kis hepatocytá focusok, ahol az ovális sejtek hepatocytákká differenciálódnak.

Kísérleteinkben megállapítottuk, hogy már ezek az ovális sejtekből felépülő gerendák is polarizáltak. A portális mezőtől távoli (a közleményben a bíráló kérésére, szerintünk illogikusan, proximálisnak nevezett) végükön magasabb a hepatocytákra jellemző enzimek (TAT, TDO2) ugyanakkor alacsonyabb a biliaris sejtekre jellemző cytokeratin 19 expresszió. Ugyancsak a proximális véghez közeli sejtek gyakrabban osztódnak (BrdU beépülés, Cyclin A expresszió). Ezek után nem meglepő, hogy az ovális sejtes kötegek proximális végéhez közel jelennek meg a hepatocytává differenciálódás valódi képletei az ún. focusok. Ezeket a képleteket korábban sejtekből random felépülő kupacoknak tartották. Eredményeink szerint viszont már ezekben a focusokban is fellelhetőek a máj parenchymára jellemző strukturális elrendeződés nyomai. Bazális membránnal körülvett tubuláris elrendeződés ismerhető fel, a tubulusokban, melyekben a CD26 gén apicalisan expresszálódik. Megtalálhatóak bennük az U alakú bazális membránnal körülvett Hering csatornákra emlékeztető képletek, melyek a termelt epe elvezetéséről gondoskodnak. A focusok vérellátása szintén jól megszervezett. Korróziós készítményeken bizonyítottuk, hogy a focusok belsejében mindig találhatóak, vena portae ágak, melyek által szállított oxigénben és tápanyagban gazdag vérnek szerepe lehet a regeneráció/differenciálódás szabályozásában előidézésében. Ezzel szemben vena centralis ágak sohasem találhatóak a focusokban, ezek terminális ágai csak kívülről ölelik körül a fokozatosan növekvő hepatocytá csoportokat. A focusokat megjelenésük alapján – bár ezt senki nem bizonyította - klonális eredetű képleteknek tartották. Az ovális sejtes proliferáció korai fázisában a közös epevezetéken keresztül a májba juttatott retrovirusokkal az ovális sejtek egy részét permanensen sikerült „kékre festeni” (béta glaktozidáz expresszió). A későbbi stádiumban leölt állatok májában gyakorta voltak megfigyelhetőek „tarka” focusok, melyekben csak egy többnyire jól körülírt sejtcsoport expresszálta a vizsgált marker enzimet. Ez az eredmény cáfolja a focusok klonális eredetét. A focusok szélén folytonosság figyelhető meg a focusok és a környező májszövet sinusoidjai között, megkönnyítve a focusokból kialakuló új parenchyma beilleszkedését környezetébe. Valóban, ha a kísérleti állatokat 3 hónappal az AAF/Ph kezelést követően termináltuk a lebenykés szerkezet csaknem tökéletes helyreállítását lehetett megfigyelni. A felszíni lebenykék száma nem változott a kontroll állatokéhoz képest, tehát az AAF/Ph kísérleti modellben a máj csakúgy mint egyszerű Ph-t követően a lebenykék megnagyobbodása révén regenerálódik, új lebenykék nem képződnek.

A kezeléseket lezajlása után 3 hónappal leölt állatok májában figyeltük meg, hogy bár a lebenykés szerkezet nagyjából helyreáll, immunhisztokémiai módszerrel kimutathatóak a parenchymában CK7-/CK19+ tubulusok, melyeken AFP és DLK pozitivitás sem mutatható ki. Ez az immunfenotípus pontosan megegyezik azzal, amit korábban ép, F344 patkányok Hering csatornáin figyeltünk meg (Hepatology 42, 86, 2005). Tehát ezek a tubulusok a Hering csatornák meghosszabbításának tekinthetőek és jelenlétük a májbeli őssejt kompartment kiterjedéseként fogható fel. Hasonló képletek alakulnak ki a májban egyszeri dietil nitrózamin (DEN) kezelést követően is. Ha meghosszabbított Hering csatornákat tartalmazó májakkal rendelkező állatokon elvégeztük a fentebb említett AAF/Ph kísérlettel funkcionálisan azonos

AAF/CCl4 kísérletet (technikai okokból a parciális hepatectomiát egy nagy dózisú CCl4 kezeléssel, „kémiai parciális hepatectomiával” váltottuk fel), akkor mind az ovális sejtes reakció, mind pedig a focus képződés előbb játszódott le. Fenti eredményt úgy értelmeztük, hogy a májbeli őssejt kompartment kiterjesztésével felgyorsítható a regeneráció. Ugyanakkor, ha hagytuk túlélni az így kezelt állatokat, azokban nem nőtt meg a májdaganatok száma, tehát az őssejt kompartment kiterjesztés nem jár automatikusan májrák kialakulásával.

## 2, A máj őssejtek részvétele hepatocarcinogenezisben

Az egyik leggyakrabban vizsgált kémiai hepatocarcinogenezis kísérleti modell a leíróról Solt-Farbernek elnevezett protokoll. Ebben a kísérleti modellben a fentebb leírt AAF/Ph kísérletet megelőzi egy nagy dózisú (200mg/Kg) DEN kezelés. Az AAF/Ph kezelést követően az így kezelt állatok májában is kialakul egy intenzív ovális sejtes proliferáció, majd megjelennek a kis hepatocytá focusok, 1 év eltelte után pedig az állatok többségének májrákja lesz. Az eredeti magyarázat szerint a hepatocytá focusok az iniciált hepatocytákból alakulnak ki majd a focusok egy része progrediál daganattá. Ebben a Solt-Farber kísérleti rendszerben a fentebb leírthoz hasonlóan elvégeztük az ovális sejtek retrovirális jelölését, az eredmény is ugyanaz lett. Azaz a focusok egy részében megfigyelhetőek voltak cluster szerű pozitív kis hepatocytá csoportok, de teljes egészében „kék” focust nem találtunk. Eredményünk igazolja, hogy a focusok, legalábbis azok egy része, ovális sejtekből származik és nem klonális eredetűek. Ez az eredmény arra utal, hogy a Solt-Farber modellben is az ún. ovális sejtes proliferáció, focus képződés regeneratív folyamatnak felel meg, aminek a daganat kialakulásában játszott szerepe továbbra is bizonytalan. Mint az előző pontban részletesebben is leírtam az AAF/Ph protokollhoz hasonló AAF/CCl4 kezelés ismétlésével a Solt-Farber modellhez hasonló intenzitású és dinamikájú ovális sejtes reakció idézhető elő, amit viszont nem követ májdaganat kialakulása. Tehát a regeneráció és a carcinogenezis, legalábbis ebben a kísérleti rendszerben, két egymással párhuzamosan zajló, talán egymást befolyásoló, de semmiképpen nem azonos folyamat, az őssejtek és leszármazottaik részvételével megvalósuló regeneráció önmagában nem vezet daganatképződéshez.

## 3. A máj őssejtek szerepe a fibrózisban.

Kísérletes és humán májfibrózisban/cirrrosisban egyaránt megfigyelhető intenzív ún. duktuláris reakció, ami a legáltalánosabban elfogadott nézet szerint egy őssejt eredetű progenitor sejtes proliferációnak felel meg. Két fontos szerepet is tulajdonítanak neki a fibrózis vonatkozásában. Egyrészt a duktuláris reakció mindig szorosan együtt zajlik a myofibroblastok proliferációjával. A myofibroblastok a fibrózis során lerakódó matrix fehérjék legfontosabb forrásai. Májig sem eldöntött kérdés a kétféle sejtpopuláció egymáshoz való viszonya. Melyik szabályozza, idézi elő a másik proliferációját? Másrészt, a cirrhosist a máj regeneráció elhúzódó, krónikus formájának is tekintik. A hepatocyták osztódó képessége viszont folyamatosan hanyatlik, csökken, amit a progenitor sejtek fokozódó aktivitása kompenzálna a ma gyakran emlegetett, de kevésbé bizonyított nézet szerint. Kísérleteinkben ezt a kérdéskört vizsgáltuk humán cirrhotikus májakban és kísérleti állatokban előidézett fibrózis/cirrrosis modellekben.

Humán vizsgálatainkat 56, májtranszplantáció kapcsán eltávolított cirrhotikus májon végeztük. A duktuláris reakció objektív, reprodukálható jellemzésére a cytokeratin (CK)7 antitesttel megfestett digitalizált metszeteket morfometriás módszerrel értékeltük ki. Hasonlóképpen értékeltük ki SMA immunhisztokémiai reakciót követően a myofibroblastos, picro-sirius festés után pedig a fibrózis mértékét. A hepatocyták és a duktuláris reakció sejteinek proliferációs aktivitásáról a Ki67 immunhisztokémiai reakció nyújtott információt. Az így kapott paramétereket statisztikai módszerekkel (Kolmogorov Smirnov és Lillieforts módszere, Mann-

Whitney U próba) vetettük össze egymással és a legfontosabb klinikai paraméterekkel. Az általunk végzett tanulmány további újdonsága volt, hogy a hasonló humán vizsgálatokat a máj nagyon kis részét reprezentáló tű-biopsziás mintákon végzik, míg mi minden esetben 1cm<sup>2</sup>-t meghaladó méretű metszeteket használtunk. A kísérlet legfontosabb eredménye az volt, hogy a hepatocyták osztódási aktivitása korrelációt mutatott a duktuláris reakció osztódásával és a septum vastagsággal (ami a fibrózis mértékének egy elfogadott paramétere). Tehát, nem tudtuk alátámasztani azt a véleményt, hogy a fibrózis előrehaladtával a hepatocyták csökkenő proliferációs aktivitását a duktuláris reakció kompenzálja. A vizsgált morfológiai paraméterek egyike sem mutatott összefüggést a cirrhosis „klinikai stádiumának” jellemzésére elterjedten használt Child-Pugh értékkel. Ugyanakkor korábbi irodalmi adatokkal megegyezve szignifikáns összefüggést figyeltünk meg a duktuláris és a myofibroblastos reakció kiterjedése között. Meglepő módon a vírusfertőzés következtében kialakult cirrhosisban szenvedő betegekben alacsonyabb volt a szérum alkalikus foszfatáz (ALP) aktivitása a májban pedig a kötőszövetes területek aránya. A szérumban meghatározott SGOT aktivitás ugyanakkor pozitívan korrelált a CK7 pozitív területtel. A vizsgált paraméterek alapján nem tudtuk klinikailag releváns módon tovább osztályozni a vizsgált májakat.

Tavaly megjelent közleményében Stueck és Wanless (Hepatology 61,1696,2015) azt az elképzelésüket fejtették ki, hogy cirrhotikus májban néhol nagy parenchyma mentes területek (parenchymal extinction) alakulnak ki, ahol a duktuláris reakció egyes sejtjeiből gócosan kis hepatocytá csoportok alakulnak ki (hepatocyte budding). A fenti saját kísérletből szelektált májmintákon mi is megfigyeltük a „budding” jelenséget. Az eredeti közleményben leírtak mellett azt is megfigyeltük sorozatmetszeteken ill. korróziós készítményeken, hogy az így kialakult kis májsejt szigetek centrumában megfigyelhető egy portális véna ág. Ezzel szemben a cirrhosis korai stádiumától különbözően a centrális vénák mindig kívül rekednek a göbökön, csakúgy mint az epeutak. A hepaticus artéria ha néha át is halad a májsejt szigeteken, azokban nem ad le ágakat. Ezek alapján azt feltételezzük, hogy a duktuláris reakció hepatocytá irányú differenciálódása fokálisan zajlik le a cirrhotikus májban és ennek indukálásában, szabályozásában döntő szerepe van a vena portae ágaknak. Valóban, több késői cirrhotikus májban megfigyeltük, hogy a kialakuló kis hepatocytá csoportok szőlőszem szerűen felfűzve találhatóak a nagyobb véna portae ágak mentén. Ez a fajta átrendeződés azonban a máj eredeti szerkezetének teljes átépülését jelenti. Napjainkban is élénk vita tárgyát képezi, hogy a cirrhosis reverzibilis vagy irreverzibilis folyamat és ha irreverzibilis, mi okozza ezt és vajon felismerhető-e a „point of no return”? Hipotézisünk szerint a „budding” beindulása – bár alapvetően regeneratív jelenség - a máj szerkezetének irreverzibilis torzulását eredményezi. Ezt a véleményünket támasztja alá, hogy patkányokban hosszan tartó tioacetamid vagy széntetraklorid kezeléssel előidézett cirrhosisban csak nagyon későn figyelhető meg a budding jelensége, amikor irodalmi adatok szerint a kísérletes fibrózis/cirrhosis modellek nagy többségétől különbözve a cirrhosis irreverzibilis.

A fentebb leírt humán cirrhosisok elemzésén alapuló vizsgálatához hasonló kísérletet végeztünk egereken. Fibrózist/cirrhosist idéztünk elő C57Bl és azonos genetikai háttérű Transforming growth factor (TGF $\beta$ )-t fokozottan termelő transzgen egerekben tioacetamiddal és széntetrakloriddal. A folyamatot tovább módosítottuk Imatinib és Erlotinib kezeléssel. Az egereket 3 hetente termináltuk, összesen 18 hétig, amikor a májban a cirrhosis morfológiai kritériumai egyértelműen megfigyelhetőek voltak. Ugyanazokat a paramétereket vizsgáltuk, mint a már leírt humán kísérletben, de az állatkísérletben a statikus korreláció analízisen kívül vizsgálni lehetett a fibrózis progressziója során a különböző szöveti átváltozások dinamikáját is. Valamennyi kísérleti csoportban, a már ismert irodalmi adatokkal megegyezve, szoros, szignifikáns korreláció volt megfigyelhető a duktuláris proliferáció és a fibrózis között. Azonban ennek a két paraméternek a vizsgálatával is sikerült eredeti megfigyeléseket tennünk. Bár a duktuláris reakció és a fibrózis közötti korreláció kimutatható a tioacetamid és a

széntetraklorid modellben is, a széntetrakloriddal kezelt egerekben nagyjából a tioacetamiddal indukálthoz hasonló mértékű fibrózishoz sokkal gyéresebb duktuláris reakció társul. Tehát a duktuláris reakció fibrózishoz viszonyított mértéke függ a kiváltó októl. Továbbá, a fibrózis progressziója időben is nagyon jó egyezést mutatott a duktuláris reakcióval. Ezen az sem változtatott, ha elsősorban nagy valószínűséggel a fibrózist fokozó (TGF $\beta$  transzgen egér) vagy pedig a duktuláris reakciót gátló (Erlotinib) kezeléssel egészítettük ki modellünket. Ez a megfigyelés megkérdőjelezi, hogy esetleges ok-okozat kapcsolat állhatna fent valamelyik irányban a duktuláris reakció és a fibrózis között. Inkább az valószínűsíthető, hogy két reakció között számos kölcsönhatás áll fent és ez biztosítja szoros, párhuzamos progressziójukat. A sejtproliferációs adatok és a fibrózis elemzésével egyik állatkísérleti csoportban sem sikerült megfigyelnünk, hogy a fibrózis súlyosbodásával a hepatocyták osztódási aktivitása csökkenne, amit ellensúlyozna a duktuláris reakciót alkotó sejtek fokozódó proliferációs aktivitása. Ellenkezőleg, több csoportban is szignifikánsan pozitív korreláció volt megfigyelhető a hepatocyták és a duktuláris reakció osztódási sebessége között. Tehát állatkísérleteinkben sem sikerült igazolni azt az elméletet, miszerint a duktuláris reakció, azaz a máj progenitor sejtjei fontos regeneratív szerepet játszanak májcirrhosisban, folyamatosan biztosítva a sejtek utánpótlását a hepatocyták elöregedése (cellular senescence) miatt.

#### 4. Az őssejtek részvételével zajló folyamatok befolyásolása molekulárisan célzott vegyületekkel.

A máj őssejtek növekedésének /differentiálódásának szabályozásában jól definiált növekedési faktorok játszanak döntő fontosságú szerepet. Az elmúlt évtizedben a klinikai gyakorlatban is bevezették több viszonylagos specifitással rendelkező tirozin kináz gátló gyógyszert. Kísérleteinkben arra kerestünk választ, hogy ezekkel a vegyületekkel befolyásolhatóak-e érdemben ezek a folyamatok?

A vegyületek első tesztelésére a munkacsoportunk által sokat tanulmányozott AAF/Ph kísérleti modellt használtuk. A bcr/abl tirozin kináz gátlására kifejlesztett, de c-kit, PDGFR gátló hatással is rendelkező gyógyszerek közül kipróbáltuk az Imatinib, Sprycell, Tassigna készítményeket. Teszteltük az EGFR gátló Erlotinibet, a c-met gátló SU 11-t és a multikináz gátló Sorafenibet. Fenti gyógyszerek tolerálható dózistartományban való kezelésével érdemi hatást Erlotinib-bel és Imatinib-bel tudtunk megfigyelni. Az Erlotinib szignifikánsan gátolta az ovális sejtes reakció mértékét, míg Imatinib kezelést követően az ovális sejteken nagyobb mértékben voltak megfigyelhetőek hepatocytá irányú differenciálódásra utaló morfológiai jelek.

Ezen megfigyelések alapján megvizsgáltuk az Imatinib hatását C57Bl egerekben kolin deficiens, etioninnal kiegészített (CDE) diétával és 3,5-diethocarbonyl-1,4 dihydrocollidinnel (DDC) előidézett progenitor (duktuláris) sejtes proliferációval járó modelleken. A CDE modellben Imatinib kezelés hatására szignifikáns mértékben megnőtt az ún. kis hepatocyták által elfoglalt terület ugyanakkor morfometriai analízissel igazolhatóan csökkent a duktuláris reakció ill. a fibrózis mértéke. A kis hepatocyták gyorsabban proliferáltak, mint a környező „nagy” hepatocyták, igazolva, hogy nem atrophias sejtekről van szó. Ugyancsak ezekben a sejtekben immunhisztokémiai vizsgálattal HNF4 magi pozitivitás volt kimutatható, microdissecált sejtekből izolált RNS real time RT-PCR vizsgálatával a kis hepatocytákban magasabb volt az albumin és a PPAR $\alpha$

expresszió, mint a nagy sejtekben, igazolva hepatocytá irányú differenciálódásukat és hepatocytá specifikus gének magas aktivitását. Egész májszeletekből izolált RNS kvantitativ vizsgálatával a dezmin, a CK19 és a PDGFR $\alpha$  gének csökkent expressziója volt megfigyelhető. A két előbbi eredmény alátámasztja morfológiai megfigyeléseinket azaz a fibrózis és a duktuláris reakció intenzitásának mérséklődését, PDGFR $\alpha$  expresszió csökkenését pedig más kísérleti rendszerekben is megfigyelték Imatinib kezelés hatására. Ez az eredmény tehát azt

igazolja, hogy a megfigyelt változások valóban az Imatinib kezelés következményének tekinthetőek. A májparenchyma hatékony működésének előfeltétele a különböző enzimszerek aktivitásának zonális elrendeződése. Két ilyen enzim, a glukóz 6- foszfatáz és CYP-2E1 megoszlását vizsgáltuk hisztokémiai ill. immunhisztokémiai módszerrel. Mindkét enzim zonális jellegű megoszlását szétzilálja, szinte teljesen felismerhetetlenné teszi a CDE diéta. A párhuzamosan adott Imatinib azonban hozzájárul a zonalitás megőrzéséhez. Kísérletünk értelmezéséhez fontos megemlíteni, hogy az elmúlt évben több olyan közlemény is megjelent, amely cáfolja, hogy a CDE modellben a duktuláris reakció sejtjei képesek hepatocytává differenciálódni. Ezt a kérdést direkt módon nem vizsgáltuk, tehát nem tudunk benne állást foglalni. Ugyanakkor egyértelműen bizonyítottuk, hogy Imatinib hatására a CDE diétával károsított májakban nagyobb mértékben jelenik meg egy olyan sejtpopuláció, ami aktív metabolikus funkciókat lát el, mérséklődik a fibrózis és megőződik a májparenchyma zonalitása. Fenti eredmények alátámasztják az Imatinib májvédő hatását egy krónikus májkárosítással járó modellben, amit eddig nem figyeltek meg.

Ugyanezt a jótékony hatást viszont nem sikerült igazolnunk DDC-vel előidézett májkárosítást követően. A DDC modellről azóta bebizonyosodott, hogy alapvetően cholangiofibrózist okoz és valószínűleg nem alakul ki az a mértékű máj metabolizmus funkcionális hiány, ami fokozott parenchyma regenerációt igényelne.

Mint a fentebb leírt egér májfibrózis kísérleti modellünkben röviden megemlítettem megvizsgáltuk az Imatinib és az Erlotinib hatását is tioacetamiddel előidézett májfibrózis alakulására. C57Bl egereken mindkét szer a kísérlet korai fázisában gátolta mind a duktuláris reakció mértékét, mind a fibrózis progresszióját. Későbbi időpontokban azonban mindkét reakció felgyorsult és a kísérlet végén már nem volt érdemi különbség megfigyelhető a szerrel kezelt és a kontroll csoportok között. Ez az átmenti gátlás sem volt megfigyelhető TGF $\beta$  transzgen egerekben, melyekben a fibrotikus folyamat felgyorsult a vad típusu egerekben megfigyelhető képest. Egy másik megközelítésben a humán terápiás próbálkozásokat jobban utánozva, fibrózist idéztünk elő tioacetaiddal és a már fibrotikus májú állatokat kezdtük kezelni Imatinibbel és Erlotinibbel. Mindkét szer teljesen hatástalannak bizonyult ebben a megközelítésben is. Eredményeink szerint mind az Imatinib, mind az Erlotinib rendelkezik egy rövid távú, átmeneti májfibrózis gátló hatással. Hosszabb távon és/vagy kedvezőtlen körülmények között azonban egyik gyógyszer sem bizonyult hatékonynak.

##### 5. EZH2 expresszió vizsgálata humán daganatokon

Kísérleteinkhez érintőlegesen csatlakozik az őssejt biológiában fontos szerepet játszó Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) fehérje diagnosztikus jelentőségének vizsgálata. A leggyakoribb gyerekekben előforduló , malignus májdaganat a hepatoblastoma sejtjei számos hasonlóságot mutatnak a máj őssejtekkel. Ez adta az ötletet, hogy megvizsgáljuk az EZH2 fehérje jelenlétét ezekben a daganatokban immunhisztokémiai módszerrel. Az eredmények megfeleltek várakozásunknak, valamennyi humán hepatoblastoma EZH2 pozitívnak bizonyult. Ez az eredmény azonban nem tekinthető specifikusnak mert a vizsgált egyéb malignus májtumorkok többége is termel EZH2t. Ugyanakkor a benignus májdaganatok és daganatszerű elváltozások nagy többsége EZH2 negatívnak bizonyult. Tehát az EZH2 immunhisztokémiai vizsgálata nem alkalmazható a májtumorkok hisztogenezisének vizsgálatára, de fontos, megbízható segítséget nyújt a tumor jó vagy rosszindulatú természetének elkülönítésére. Hasonló dilemmával gyakran találkozunk nyálmirigy daganatok vizsgálata során is. Eredményeink szerint az EZH2 immunhisztokémiai kimutatása ezekben a daganatokban is hatékonyan járulhat hozzá a helyes diagnózis felállításához. Mivel az EZH2 fehérje terápiás célpontként való felhasználásának lehetősége is felmerült más tumorokban, elsősorban lymphomákban, eredményeink új terápiás eljárások kidolgozásához is hozzájárulhatnak.