

Zárójelentés a K 116301 számú NKFI pályázathoz

A duktuláris reakciók eredete és jelentősége a májban

Vezető kutató: Nagy Péter

1. A májcirrhosis vizsgálata kísérleti rendszerekben és humán májmintákon

A jelen pályázatban végzett kísérletek korábbi munkáink folytatását jelentik. Az előzmények összefoglalása megtalálható a 100 931. számú OTKA pályázat zárójelentésében.

A májcirrhosis potenciálisan valamennyi krónikus májbetegség végső közös kimenete, amit hagyományosan a májbetegségek irreverzibilis végstádiumának tekintettek. A cirrhosis lényege a máj diffúz szerkezeti átépülése, a lebenykék helyett az állományt kötőszövetes sővényekkel körbevett állebenykék alkotják, ami súlyos működészavart idéz elő. Az állapot egyetlen hatékony kezelése a májtranszplantatio. A cirrhotikus septumokban majdnem mindig megfigyelhető változatos intenzitású duktuláris reakció, aminek a szerepe, jelentősége nem ismert.

A kísérletes állatokban előidézett májcirrhosisok többsége reverzibilis, a fibrosist előidéző májkárosítás leállítását követően a máj eredeti szerkezete tér vissza. Ennek analógiájára egyre többen figyelték meg humán májakban is a cirrhosis regresszióját (Arch Pathol Lab Med 124,1599-1607, 2000) és megkérdőjelezték a humán betegség irreversibilitását. Az utóbbi években egy óriási klinikai „kísérlet” zajlik, aminek fontos szerepe lehet a kérdés tisztázásában. Az új antivirális gyógyszerek radikálisan megváltoztatták a vírus hepatitisek és következményes krónikus májbetegségek lefolyását. Mind a B, mind a C vírus fertőzött betegek több mint 90%-ban sikerül a vírusok eliminálása és valóban ezzel párhuzamosan – többnyire nem invazív módszerekkel – detektálják a máj fibrosis mérséklődését. Azonban csaknem minden nagy klinikai vizsgálatban, változó arányban de találnak olyan betegeket, akikben a sikeres vírustalanítás ellenére a fibrosis mértéke nem csökken vagy akár progrediál a szokásos szövödményekkel együtt (J Gastroenterol 52,129-140, 2017). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a cirrhosis nem egységes állapot, legalábbis eltérő stádiumai lehetnek, különböző klinikai viselkedéssel. Ezek elkülönítésének, felismerésének az elméleti jelentőség mellett fontos klinikai konzekvenciái is lehetnek.

Kísérleti egerekben és patkányokban széntetraklorid, tioacetamid kezeléssel idéztünk elő kísérletes májfibrosist illetve a kísérlet későbbi időpontjaiban a májat már komplett állebenykék alkották azaz definíció szerint cirrhotikusak voltak. Ezekben a kísérletekben morfometriai módszerekkel jellemeztük a duktuláris reakció, a fibrózis és néhány egyéb paraméter alakulását, az eredmények részben megtalálhatóak az előző pályázatunk zárójelentésében (OTKA 100 931) és megjelentek közlemény formájában is (Plos One 12(4):e0176518, 2017). Ezek közül az eredmények közül csak azt szeretném felidézni, hogy nem sikerült fordított korrelációt megfigyelni a hepatocyták és a duktuláris reakciót alkotó sejtek osztódási aktivitása között, tehát nem támasztották alá azt az elképzelést, hogy a cirrhotikus máj parenchymát a hepatocyták osztódási képtelensége (celluláris szenescencia) miatt a duktuláris reakcióból származó differenciálódó sejtek alkotnák.

Újabb kísérleteinkben elemeztük ezekben a májakban a fibrózis progresszióját. A májkárosítást követő első fázisban centrális necrosis jön létre, majd ennek „gyógyulási” fázisában centrocentrális, néha centroportális kötőszövetes septumok alakulnak ki gyulladással járó sejtekkel, duktuláris reakcióval. Az így kialakuló „cirrhosisokban” (septumokkal körbezárt állebenyek) a máj eredeti szerkezete még felismerhető volt. Az állebenyékben belül gyakran azonosíthatóak voltak a vena portae ágai, néha komplett portális triasok, míg a centralis vénák a septumokban

kerültek. Az erek pontos azonosítását műgyantával való feltöltésük tette lehetővé a vasculaturat korróziós készítményeken jellemeztük. Ez az állapot egyértelműen reverzibilis volt, a széntetraklorid vagy tioacetamid kezelés felfüggesztése után helyreállt a lebenyés szerkezete. Ezzel szemben ha a patkányok májában tovább tartó széntetraklorid/fenobarbitál kombinációval idéztük elő cirrhosist (Hepatology 31,851-857, 2000) az eredeti közleménnyel összhangban a szerkezeti változások irreversibilnek bizonyultak. Részletesebben vizsgálva a cirrhosis jellege különbözött a fentebb leírt rövid távú kezelésben látottól, inkább hasonlított, ahhoz, amit előrehaladott humán cirrhoticus májakban tapasztaltunk (J Hepatology 66,778-786, 2017). A májakban nagy parenchyma-mentes (extinct) területek voltak, melyekben a duktuláris reakció epeút szerű képleteiből „budding” formájában alakultak ki, a terminalis vena portae ágak környezetében „állebenyekék”, melyek azonban különbözve a rövid távú modell állebenykeitől már nem tartalmaztak portális trias maradványokat, nem voltak bennük egyáltalán felismerhetőek a lebenyés szerkezet nyomai.

A kísérleti állatokon tapasztaltakkal jó összhangban humán cirrhotikus májak között is jelentős különbségeket tudtunk megfigyelni. Az előrehaladott cirrhosisok jellemzése részben szerepel előző zárójelentésünkben, az eredményeket komplementálva 2017-ben sikerült publikálni (J Hepatol 66,778-786, 2017). A munka lényege röviden, hogy előrehaladott humán cirrhosisban, főként a máj tokja alatt nagy sejtmentes kötőszövetes területek alakulnak ki, melyekben a duktularis reakciókból kis bimbó-szerű képződményeket formálva képződik máj parenchyma. Ez a folyamat mindig vena portae ágak környezetében történik és nem eredményez akár nyomaiban felismerhető lebenyékéket. Azóta sikerült 3 olyan humán cirrhotikus májat találnunk, melyek bár teljesen átépültek, de bennük a lebenyés szerkezet maradványai még azonosíthatóak voltak: portális triasok voltak az állebenyekék egy részében, a septumokban pedig fellelhetőek voltak a centralis vénák maradvékai.

A kísérletes és a humán adatokat összevetve elképzeléseink szerint a máj cirrhosis progressziójának két szakasza különíthető el. Az első szakaszban a meglévő parenchymát csak felszabdaldják a képződő kötőszövetes septumok, a parenchyma legalábbis részleges regenerációja a hepatocyták osztódása révén valósul meg. Az így torzult szerkezetű májakban valószínűleg vascularis elzáródások miatt (Hepatology 61,1696-1707, 2015) gócosan elpusztul a parenchyma (parenchymal extinction). Ezekben a területeken a túlélő ductulusok sejtszejtjei kezdenek osztódni, differenciálódni és a hepatocytákból ismét cirrhotikus máj alakul ki, de ebben már az eredeti szerkezet nyomokban sem ismerhető fel és ez a máj a károsító ágens megszűnése után sem képes az eredeti lobularis szerkezet visszaállítására. Hipotézisünket indirekt módon alátámasztja, hogy sem humán, sem kísérleti fibrosis/cirrhosis modellekben sem sikerült igazolni a duktuláris reakció részvételét a máj parenchyma steady state állapotának a fenntartásában, ezzel szemben előrehaladott cirrhosisban az állebenyek többsége klonális és a ductularis reakcióból származik (Hepatology 49,1655-1663, 2009), továbbá a teljes értékű májregeneráció előfeltétele a sinusoidális sejtek „túlélése” (PNAS 107,10371-10376, 2010), ami az extinct területeken bizonyosan nem valósul meg.

Természetesen, amennyiben a stádium beosztásunk helyesnek bizonyul, önmagában ezek a megfigyelések nem bizonyítják a második stádium irreverzibilitását, de jó munkahipotézisnek bizonyulhat az ilyen jellegű vizsgálatokhoz.

2. A máj regeneráció tanulmányozása humán májakban masszív májnecrosist követően.

A cirrhosisnál jóval ritkább, de szintén életet veszélyeztető májelégtelenséggel járhat a májparenchyma masszív necrosis, ami igen változatos okok miatt alakulhat ki. A betegek kis hányadában a parenchyma regenerációra képes, de a betegek többsége beavatkozás nélkül meghal. Máig az egyetlen hatékony kezelés a máj transplantatio. Nagyon fontos lenne ebben az

elváltozásban is a regeneráció mechanizmusának tisztázása, ami segíthet annak az eldöntésében is, hogy mely betegek szorulnak transplantációra.

Kísérleteinkben 13 fulmináns májelégtelenség miatt explantált májat dolgoztunk fel részletesen. Kétféle regenerációs mechanizmust sikerült elkülöníteni, melyek valamennyi vizsgált májban vagy-vagy jelleggel fordultak elő, tehát nem keveredtek egymással.

A vizsgált minták egy részében alig alakult ki duktularis reakció, ezekben a szervekben a májsejtek mutattak jelentős változásokat. Intenzív osztódási aktivitásuk mellett megváltozott az elrendeződésük is. Trabeculák helyett acináris mirigy szerű képleteket formálnak, néhol a centralis lumenben epepigment volt látható. Ennél is meglepőbb volt, hogy immunhisztokémiai vizsgálattal onkofetális fehérjék: alfa-fetoprotein és glypican 3 expresszió volt kimutatható bennük.

A másik csoportban a necrotikus területeken intenzív duktularis reakció alakult ki és a cirrhosisnál leírtakkal szinte tökéletesen megegyezve a ductulusokból kiinduló bimbók, a portális véna ágai körül focus szerű sejtcsoportokat alakítottak ki. Ezek a focusok egymásba olvadva igyekeztek pótolni az elpusztult parenchymát de azt tökéletesen egyik májban sem sikerült megvalósítaniuk. A necrotikus területeken a ductulusok gyakran a nagyobb epeutakból kiágazó vakon végződő kis csöveket alkottak, melyeknek nem volt összeköttetése a parenchymával. A rendelkezésre álló kis esetszám miatt nem sikerült kapcsolatot találni a klinikai paraméterek és a regeneráció mintázata között, de a morfológiai kép alapján sejthető, hogy a korábban leírt, májsejtek részvételével zajló regeneráció jobb hatásfokkal működik. Felnőtt emberi májban az említett onkofetális markerek eddig kizárólag daganatokban voltak kimutathatóak. Eredményünk a hepatocyták *in vivo* retrodifferenciációs képességére utal, továbbá az említett biomarkerek szintjének szérumbeli monitorozása segíthet azoknak a betegeknek az azonosításában, akikben a hepatocyták részvételével zajló valószínűleg hatékonyabb regeneráció zajlik és ezért nagyobb esélyük van spontán regenerációra.

A másik csoportban leírt jelenségek: intenzív duktularis reakció, bimbózás útján a portális véna ágak környezetében zajló májsejt focusok kialakulása, tökéletlen regeneráció, pontosan megfelelnek a cirrhosis általunk másodiknak nevezett stádiumában megfigyeltekkel. Ez a hasonlóság arra utalhat, hogy ez egy az evolúció során kialakult és megőrzött, sztereotip regenerációs mechanizmus (a közlemények megjelenése óta sikerült nagyon hasonlókat megfigyelni egy Budd-Chiari szindrómás májban). A regeneráció beindításában, fenntartásában szerepe lehet a portális véna által szállított faktoroknak. További eredeti megfigyelésünk a vakon végződő ductulusok jelenléte a nekrotikus májakban. Elképzelésünk szerint a biliaris rendszer és a parenchyma kapcsolatának megszakadása miatt nem jöhet létre tökéletes regeneráció, mert nincs olyan struktúra, ami orientálhatná a regenerációban részt vevő sejteket. Ha hasonló vak epeutakat sikerülne találnunk előrehaladott cirrhotikus májakban is az további közös nevező lenne a két alapvetően eltérő eredetű, de egyaránt tökéletlen regenerációhoz vezető folyamat között.

3. Az ovális sejtek képesek a máj egyedfejlődés kapcsán létrejövő növekedésének a helyettesítésére is.

A máj progenitor sejtjeit rágcsőknél, magjuk alakja miatt, hagyományosan ovális sejteknek hívják. Ezek, funkciójukat tekintve, azonosnak tekinthetők az emberi májban duktularis reakciót alkotó sejtekkel. Nagyon sok kísérletes modell igazolja, hogy ha kísérleti állatokban gátolják a hepatocyták osztódását regeneratív folyamatokban, akkor a szomatikus őssejtekből származó ovális sejtek jelennek meg és egy részük hepatocytává alakulva segíti elő a máj regenerációját. Arra vonatkozó adat viszont nincs mi történik ha az egyedfejlődéssel kapcsolatos májnövekedést akadályozzák meg.

Kísérletünkben anyjuktól elválasztott, fiatal (60-70g) F344 patkányokban 2-

acetaminofluorénnel (AAF) gátoltuk a máj növekedését. Az AAF kezelés BrdU beépülés vizsgálata alapján hatékonyan gátolta a hepatocyták osztódását, de valódi ovális sejtes reakciót nem váltott ki. A májregeneráció metabolikus szabályozásában nagy szerepet tulajdonítanak az epesavaknak. A fiatal, növekedésben levő patkányok kólsavval történő kezelése (tápra kevert kólsav formájában) átmeneti hepatocytá prolifерáció növekedést eredményezett, ami irodalmi adatok alapján várható volt, a máj szerkezetében változást nem tudtunk megfigyelni. Ha viszont az AAF kezelést kombináltuk kólsavban gazdag táppal való etetéssel, típusos ovális sejtek jelentek meg a májban és a kezelés 7-10 napján hepatocytává differenciálódva kompenzálták az elmaradt növekedést.

Az ovális sejtek nem csak megjelenésükben hasonlítottak az egyéb modellekben előforduló progenitor sejtekre, de expresszálták az azokra jellemző OV-6, AFP, DLK-1 fehérjéket. A kezelés eredményeként megjelenő „kis hepatocyták” a magi HNF-4 pozitivitás igazolta a funkcionális differenciálódást. A kis hepatocyták ovális sejtes eredetét igazoló kísérletet nem végeztünk, de a sejtek alacsony endogén biotin tartalma kizárta hepatocytá eredetüket és az egyéb kísérleti modellekhez való nagyfokú strukturális egyezések alapján alaposan gyanítható a kis hepatocyták ovális sejtes eredete.

Az egész májból izolált RNS mintákban kimutattuk a hepatocytá growth factor (HGF) és stem cell factor (SCF) fokozott expresszióját AAF kezelés után. Az AAF irodalmi adatok alapján cellularis szenescenciát idéz elő a hepatocytákban. a fentebb említett két növekedési faktor részét képezi az ún szenescenciához társuló szekreciós fenotípusnak (SASP) (Annu Rev Pathol 5,99-118, 2010). Mivel ezek a növekedési faktorok irodalmi adatok szerint serkentik az ovális sejtek növekedését, elképzelésünk szerint az AAF által hepatocytákban előidézett szenescenciának fontos szerepe van a kompenzatorikus ovális sejtes növekedés előidézésében. Ugyanakkor az AAF kezelés önmagában nem volt elégséges ovális sejtes reakció kiváltásához. Az epesavak többféle receptorhoz kötődve fejtik ki bonyolult hatásait. A növekedés előidézésében ezek közül az FXR receptornak van legfontosabb szerepe, míg a TGR receptorokon keresztül inkább a metabolikus hatások szabályozódnak. A két receptor expresszióját vizsgálva microdissectált hepatocytákból és biliaris/ovális sejtekből (a két sejtpopuláció nem különíthető el megbízhatóan a microdissectiohoz használt halvány hematoxilín festés alapján) izolált RNS-ben azt találtuk, hogy a TGR expresszió szintje mindkét sejtpopulációban csökkent AAF kezelés hatására. Az FXR expresszió a hepatocytákban csökkent a biliaris/ovális sejtekben viszont nőtt. Azaz AAF kezelés szenescenciát idézett elő a hepatocytákban a biliaris sejteket és a köztük levő szomatikus őssejteket pedig kompetensé tette a kólsav proliferatív hatásának a kifejtésére. A két mechanizmus együttesen idézte elő az ovális sejtes proliferációt/differenciálódást a fiatal állatok májában. Eredeti kérdésünkre válaszolva pedig sikerült bizonyítani, hogy az ovális sejtes reakció képes részt vállalni az egyedfejlődéssel kapcsolatos májnövekedés kompenzálásában is.

Előkísérleteink szerint a kólsavban gazdag diéta serkentette az ovális sejtes reakciót a hagyományos AAF/Ph kísérletben is. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az epesavaknak fontos szerepe lehet a máj progenitor sejtes reakcióinak szabályozásában és érdemes további kísérleteket végezni ezen a nagyrészt feltáratlan területen.

4. Az AAF/BDL kísérleti modell

Részben a fenti kísérlet folytatásaként, az epesavak hatásának tanulmányozására alakítottunk ki egy másik, új duktuláris proliferációval járó kísérleti rendszert. Az ovális sejtes reakció tanulmányozására használt talán legelterjedtebb kísérleti rendszer az AAF/Ph, AAF kezelés kombinálása sebészi parciális hepatectomiával (Ph). Ebben a kísérletben a Ph után a máj kizárólag az ovális sejtek osztódása/differenciálódása révén regenerálódik.

Ennek a kísérletnek az analógiájára az AAF-fel kezelt patkányokban parciális hepatectomia helyett lekötöttük a ductus choledochust (BDL).

A műtét után rendkívül intenzív duktuláris reakció alakul ki a májokban, ami azonban sok tekintetben különbözik az AAF/PH ovális sejtes reakciójától.

Az AAF/BDL rendszerben a duktularis reakciót alkotó sejtek nem termelnek onkofetális markereket (AFP, DLK1) és nem figyelhetőek meg hepatocytává differenciálódás jelei. Ugyanakkor a duktularis reakció szokatlanul intenzív, egy hónappal a műtét után a patkányok májának tömege eléri a testtömeg 15-17%-t szemben a normális 4%-kal és ezt a hatalmas májat szinte kizárólag a duktuláris reakció alkotja, hepatocyták alig találhatóak benne.

Ez a kezelési protokoll egy éves túlélés alatt nem okozott daganatot az állatokban. Ha viszont az AAF/BDL protokoll előtt az állatoknak dietil-nitrózamint (DEN) is adunk a patkányok 80%-ában 1 éves korra cholangiocarcinomák alakulnak ki szemben a DEN –AAF/Ph kísérlettel (Solt-Farber kémiai hepatocarcinogenezis), ami hepatocelluláris carcinomák kialakulásával jár. Tehát azonos iniciálást követően a promoter hatás megváltoztatásával más daganat alakul ki, jelezve, hogy azonos daganat prekursor sejtpopulációból különböző daganatok alakulhatnak ki a promóció változtatásával. Ezekkel a kísérletekkel még nem jutottunk el a publikációig. További vizsgálatokkal remélhetőleg fontos adatokat nyerhetünk az epesavaknak a duktuláris reakciók szabályozásában betöltött szerepéről valamint a hepatocyták-cholangiocyták közötti átalakulás lehetőségeiről, jelentőségéről.