

Bírálati vélemény

Paku Sándor

**A májregeneráció és a daganatos áttétképzés tanulmányozása
morfológiai vizsgáló módszerekkel**

című

MTA doktori értekezéséről

Aktuális és gyakorlati szempontból is jelentős téma, magas impakt faktorú rangos nemzetközi folyóiratok által is elismert új adatok alapján logikusan felépített és szerkesztett kitűnő dolgozat, ami mind tartalmi és formai szempontból megfelel az MTA doktori értekezéssel szemben támasztott követelményeknek.

Egy általános megjegyzés: A munka értékes eleme, hogy a struktúra és a funkció egységének szemléletét végig következetesen alkalmazza, rámutat a morfológiai vizsgálatok fontosságára, továbbá, hogy az állatkísérletes vizsgálatok eredményei alapján a humán patológiás folyamatok jobb megértését teszi lehetővé.

A dolgozatban a szerző két fő kérdéskört, a májregenerációt és a rosszindulatú daganatok metasztázisképzését vizsgálja.

A módszerek korszerűek, a kísérletek megtervezése és kivitelezése mintaszerű, a dokumentáció, az immunfluorszcens, a konfokális, az immunelektronmikroszkópos és a szkennung elektronmikroszkópos felvételek minősége kitűnő. Az eredmények értékelése mértéktartó.

Májregeneráció

Ebben a fejezetben a szerző három fő kérdésre kereste a választ, amelyekre az alábbi megállapítások adnak választ.

A máj epeútrendszerének szerkezetét és immunfenotípusát vizsgálta patkányban és sebészeti műtét során tumormetasztázis miatt eltávolított máj rezekátum ép részében. Megállapította, hogy míg patkány májban az epeutak a „limiting plate”-en végződnek, humán májban az epeutak a lebenyke palástja mentén futnak.

Humán májban a szerteágazó és a parenchimába is betérjedő epeútrendszert egy ugyanolyan felépítésű arteriás rendszer követi, amely végül a szinuszoidokba ömlik. Ezzel szemben patkány májban az epeutak nem hagyják el a portális teret, ezért az arteriás rendszer elvezetése a portális rendszerrel alkotott anasztomózisokon keresztül valósul meg.

Munkacsoport tagjaként a májlebenyék méretének objektív vizsgálatára kidolgozott új módszer segítségével kimutatta, hogy a posztnatális fiziológiás növekedést új lebenyék képződése, azok fokozatos növekedése, a hepatociták megnagyobbodása jellemzi. Ezzel szemben a májrezekációt követően megfigyelt regeneratív növekedés során kizárólag a már meglévő lebenyék mérete növekszik, új lebenyék nem képződnek és a hepatociták sem képesek további megnagyobbodásra. A megnagyobbodott lebenyék bonyolultabb

szerkezetűek, amit a centrális vénát körülvevő portális vénaágak számának növekedése és zonális megoszlást mutató enzimek (pl. CYP450IIE1, glutamin szintetáz) a szokásos koncentrikus elrendeződése helyett karéjzott mintázat mutat.

Egy szellemes módszerrel, a Solt-Faber által leírt módszer módosított változatával (AAF/Ph) vizsgálta az őssejtek aktiválódásával zajló regenerációt. 2-acetaminofluoren (AAF) kezelés hatására a hepatociták osztódása gátolt, aminek következtében a részleges hepatektómiával kiváltott proliferációs stimulus hatására az őssejtek aktiválódásával zajlik a regeneráció.

A proliferáló ovális/progenitor sejtek az őssejtek leszármazottai és ezek differenciálódnak később májsejteké. Paku Sándor immunelektronmikroszkópos vizsgálatokkal kimutatta az őssejtek lokalizációját, s megállapította, hogy az ovális sejtek által képzett struktúrák a Hering csatornák meghosszabbításának tekinthetők, s hogy az ovális sejtek proliferációjuk és migrációjuk során folyamatosan bazális membránt szintetizálnak és megtartják polarizációjukat. Az általuk alkotott csőrendszer funkcionális kapcsolatot biztosít a májsejtek és az epeútrendszer portális térben elhelyezkedő elemei között.

Kimutatta, hogy az ovális sejteknek a májsejteké differenciálódása függ az AAF alkalmazott dózisától. Különbséget talált az úgynevezett primer hepatocita mitogének hatásában a nagy dózisu és kis dózisu protokoll szerint. A kis dózisu modellben trijód-tironinnal (T3) kezelt állatokban a májfunkció javulását, a szérumbilirubin csökkenését, a prothrombin szint emelkedését bizonyította. A hormonkezelés előtt retrovírussal történt „megjelöléssel” bizonyította, hogy a kis hepatociták valóban az ovális sejtekből származnak.

A klinikai gyakorlat számára fontos lehet az a mértéktartó megállapítás, hogy az őssejtek részvételével zajló regeneráció felgyorsítható, s ez elvi háttérül szolgálhat például fulmináns májelégtelenségben a regeneráció felgyorsítására irányuló próbálkozásokhoz.

Metasztázis képzés

Tumor indukált angiogenezis

Régebbi felismerés, hogy a tumorok egy bizonyos méretnél túl nem tudnak növekedni tápanyagellátást biztosító új erek képződése nélkül. A szerző munkatársaival egy új angiogenezis modellt írt le, amely szerint az endotélsejtek megtartják polarizált állapotukat és a bazális membrán lokális degradációja után egymással párhuzamosan migrálnak, s így azonnal egy résszerű lumen keletkezik, amely folytonos az eredeti ér lumenével. Az éretlen kapilláris növekedése során folyamatosan történik a bazális membrán szintézise és depozíciója.

Melanómák vaszkularizációja

Humán in vitro és egér in vivo fenntartott tumorvonalakat vizsgált. Mindkét modellben kimutatta, hogy a melanómák beereződése a tumor felszínén képződött kapilláris hálózat bekebelezésével megy végbe, ami a kapilláris denzitás csökkenéséhez és az erek méretének növekedéséhez vezet a tumorközpont irányában. Megállapította, hogy humán melanómák esetében az intratumorális érdenzitás bír prognosztikus jelentőséggel.

Az intusszuszeptív angiogenezis új formáját írta le

egerekbe oltott, szubkután növekvő daganatokban. Megfigyelte azt is, hogy az angiogenezis egy másik formája, a sprouting (bimbózó) típus alig fordul elő. Arra következtetésre jutott, hogy az intusszuszeptív angiogenezis új formájában a kollagén oszlopok (pillar) képződés első lépése az endotél sejt hidak kialakulása az ér lumenében, s ezt követi az ér lumenen keresztül a kötőszöveti kollagén kötegek importja.

Angiogenezis tumor metasztázisokban.

Agyi metasztázisok

A kísérleti állatok arteria carotisába vagy direkt az agyszövetbe bevitt különböző eredetű (tüdő, melanoma, vese és emlőrák) és differenciáltságú daganattétekben vizsgálta az angiogenezist. Az új megállapítások közül a következőket emelem ki.

A agyi mikrometasztázisok esetében a veseglomerulusokhoz hasonló kapilláris hurkok, az úgynevezett glomeruloid testek kialakulásának igen egyszerű formáját írta le. Kimutatta, hogy a folyamat során az érdenzitás növekedése a tumorokban jelentős endotélproliferáció nélkül, a meglévő kapillárisrendszer a tumorsejtek által előidézett átrendeződésével megy végbe. Mivel az agyszövetben nincs kötőszöveti típusú mátrix, az agyszövet mechanikai stabilitása kicsi, ez lehetővé teszi a kapillárisok elmozdulását. A alfa-6 integrinnek és a tumorsejtek aktin citoskeletonjának lehet szerepe a kapilláris hurkok kialakulásához szükséges húzóerő biztosításához.

Máj metasztázisok

Jól differenciált kísérletes colon rák metasztázisok esetében a vaszkularizációnak egy új formáját írta le. A folyamat lényege a tumor felszínén keletkező fuzionált sinusoidok inkorporációja.

Paku Sándok kutatói erényét jól mutatja, hogy korábbi hibás nézetét, hangsúlyozom, hogy a véleményét és nem a tényeket, képes volt revideálni. Egy levélben felvetette, hogy a májmetasztázisok esetében a klinikusok által alkalmazott intraarteriális kemoembolizáció helyett talán jobb volna a véna portae felől adni a gyógyszert, mert a metasztázisok vérellátása szinusoidális, tehát vénás eredetű.

Később ezt a gondolatát felülvizsgálta, mert kimutatta, hogy a májattétek 2 mm nagyság felett már arteriális vérellátásra tesznek szert, aminek a mechanizmusát leírta.

Összefoglalva a tumor által indukált angiogenesis tanulmányozására vonatkozó megfigyeléseit, helyesen állapítja meg, hogy hatásos anti-angiogenezis vagy antivaszkuláris terápiák csak akkor lesznek elérhetők, ha minden fontos célszerv esetében sikerül feltérképezni az alapvető erezési típusokat.

A munka befejező, jelentős megállapításokat tartalmazó részében a metasztázisképzés témakörén belül a tumorsejtmotilitás és a szervpreferencia kérdését vizsgálta.

Sejtmigráció

A daganatok terjedésének egyik fontos útja az áttétképződés. A tumor sejtek a vér- vagy nyirokáram segítségével nagy távolságra képesek eljutni, s más szervekben megtapadva tovább burjánozni. A folyamat mechanizmusáról egyre több az ismeret, de még mindig számos kérdés nyitott.

Human fibroszarkóma sejtek mozgását vizsgálva új mechanizmust írt le. Kimutatta, hogy a sejt folyamatos mozgását a vezető élen folytonosan megújuló, de a mozgás során félkörív formában haladó adhézios pontokhoz kapcsolódó konkáv lerendeződésű aktin kötegek biztosítják.

Extravazáció és szervpreferencia

A Lewis lung tumorvonal (LLT-HH) extravazációját vizsgálva kimutatta, hogy a különböző szervekben (máj, tüdő, mellékvese, vese, agy) a tumorsejtek extravazációja eltérő módon történik. Míg a májban, tüdőben és vesében a tumorsejtek endotelizációja zajlik, a

mellékvesében és az agyban a daganatsejtek egyszerre hatolnak át az endotéliumon és a bazális membránon.

Régi klinikai megfigyelés, hogy bizonyos daganatok bizonyos szervekbe gyakrabban adnak áttétet. Állatkísérletben kimutatta, hogy a magas metasztázáló képességű Lewis tüdő tumorvonal arteriális rendszerbe történő oltásával a májban és a mellékvesében a perctérfogati arányokat messze meghaladó gyakorisággal képez áttétet, és a pozitív preferencia egyik fontos tényezője az extravazáció sebessége.

Elegáns kísérletben kimutatta, hogy a bazális membrán komponensek elleni antitestekkel (perlekán, laminin, fibronectin) történt kezelés után a szív bal kamrájába oltott LLT-HH sejtek áttétképző képességét csökkenteni lehetett, de a májmetasztázisok kialakulását csak a perlekán elleni antitest volt képes jelentősen gátolni.

Kérdések

Egy klinikusnak nehéz fogást találni egy impresszionálisan gondos, rangos nemzetközi folyóiratok bírálói által megítélt és elfogadott eredményeket bemutató, még a bíráló számára is meggyőző morfológiai képekkel dokumentált, logikusan felépített, elegáns kísérletek eredményeit összefoglaló dolgozatban.

Nem is próbálok hajánál fogva előhúzott kifogásokat találni. Inkább tudományos kíváncsiságtól vezetett kérdéseket teszek fel.

1. Az emberi májban tumor vagy egyéb okból végzett rezekciót követő regeneráció mennyiben hasonlítható, és mennyiben tér el az állatkísérletes májrezekció utáni regenerációtól?
2. A májcirrhosis egyik jellemzője a regenerációs göbök kialakulása. Milyen szerepe lehet ebben a Hering csatornáknak, illetve az ovális sejteknek?
3. Van-e (lehet-e) különbség a festéket termelő és a festéket nem termelő melanóma tumorok vaszkularizációjában?
4. Lát-e lehetőséget arra, hogy az angiogenezist gátló gyógyszerek klinikai hatékonyságát fokozni lehessen a mellékhatások fokozódása nélkül? Vizsgálatai alapján melyik lehet az a célmolekula vagy mechanizmus, amelynek befolyásolásával jobb eredményt lehet elérni?
5. Van-e tudomása olyan gyógyszerkutatásról, amelynek révén a daganatok áttétképződését lehetne gátolni?

Új megállapítások

A szerző számos új megállapítása közül az alábbiakat emelem ki

1. Immunhisztokémiai vizsgálatokkal a patkány máj epeút rendszerének egy új, CK7-/CK19+ kompartmentjét írta le, amely magában foglalja a Hering csatornákat is, és legnagyobb valószínűséggel tartalmazza a máj őssejtjeit.

1. 2-acetaminofluoren és részleges hepatectómia (AFF-PH) modellben konfokális és elektronmikroszkópos vizsgálatokkal kimutatta, hogy patkányban az ovális sejteknek májsejteké történő differenciálódása a függ az AAF dózistól.

3. Megállapította, hogy a humán és kísérletes melanómák beereződése a tumor felszínén képződött kapilláris hálózat bekebelezésével megy végbe, s ami a tumor központjának irányában kapilláris denzitás csökkenéséhez és az erek méretének növekedéséhez vezet. Humán melanómák esetében az intratumorális érdenzitás prognosztikai jelentőséggel bír.

4. Kimutatta, hogy kísérletes agy metasztázisok környezetében nem zajlik angiogenezis, a tumorok ér hálózatukat a már meglévő erek inkorporációjával hozzák létre.

5. Megállapította, hogy a kísérletes máj metasztázisok 2 mm-es tumor méret felett arteriális vérellátásra tesznek szert, s az arterializálódás folyamata a szinuszoidok fúziójának és az ezt követő inkorporációjának következtében alakul ki.

6. Kimutatta, hogy Lewis tüdő karcinóma máj áttétképző preferenciája mögött legnagyobb valószínűséggel a tumorsejteknek a szinuszoidok heparánszulfát proteoglycánjához történő specifikus adhéziója áll.

Összefoglalva, Paku Sándor értekezése mindenben megfelel az MTA doktori pályázattal szembeni követelményeknek.

A védelem kitűzését és sikeres védelem esetén az MTA doktora cím odaítélését javaslom.

Budapest, 2013.04.18.



Dr. Szalay Ferenc
egyetemi tanár
az MTA doktora