

dc_301_11

MTA Doktora Pályázat

Tézisek

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

Paku Sándor

2011

1. Bevezetés

A biológiai rendszerekben a struktúra és a funkció szerves egységet alkot. A szövetek, szervek struktúrájának meghatározásában döntő szerepe van az extracelluláris mátrixnak, ezen belül is a bazális membránnak, mely kompartmentekre osztja fel a szöveteket, szerveket és a parenchimális sejtek differenciált állapotának fenntartásáért is felelős. Ugyan a morfológiai vizsgálatok eszközei használata önmagában is hozzájárulhat a biológiai folyamatok jobb megértéséhez, a morfológiai vizsgálatok lényege, hogy az egyes molekuláris elemeket képes hozzárendelni a strukturális elemekhez. A fizioiógias és patológiás folyamatok megismeréséhez elengedhetetlen a strukturális elemek és a hozzájuk rendelt molekulák változásának nyomon követése. A molekuláris biológiai módszerek előretörésével azonban a morfológiai vizsgálatok érdemtelenül a háttérbe szorultak. Kiterjedt morfológiai vizsgálatok hiányában azonban a túlzott általánosítások csapdájába eshetünk, mely a nagy ráfordítással kidolgozott molekuláris terápiák hatékonyságát jelentősen csökkentheti. Ennek a szemléletnek a példái az angiogenezis kutatás témaköréből azok a nézetek, melyek szerint az érképződés domináló formája minden szövetben, szervben a bimbózó („sprouting”) angiogenezis, illetve hogy a daganat ereinek struktúrája alapvetően különbözik a normál erek struktúrájától. Ezek az egyszerűsítések összefüggésben lehetnek az anti-angiogenezis terápiák nem megfelelő hatékonyságával. Mint az alábbiakban majd láthatjuk, a kép sokkal árnyaltabb, igazán hatékony terápiák kidolgozásához elkerülhetetlen lesz az egyes célszervek és az azokban növekvő különböző daganatokban lezajló folyamatok részletes morfológiai vizsgálata.

Az alábbiakban két eltérő területen (májregeneráció és daganatos áttétképzés) tett megfigyeléseink alapján szeretnénk rámutatni a morfológiai vizsgálatok fontosságára.

A máj kitűnő regenerációs képessége régóta jól ismert. A klasszikus és alaposan tanulmányozott, patkányokon kialakított modellben a máj 2/3-ának eltávolítása után a májtömeg 7-10 nap alatt teljesen regenerálódik. A regeneráció a megmaradt lebenyek sejtjeinek, döntően a hepatociták a kompenzatórikus hiperpláziája révén valósul meg, tehát az eltávolított lebenyek nem nőnek vissza.

Az elmúlt két évtizedben a májregeneráció alternatív, „tartalék” mechanizmusaira derült fény. Ha a májsejtek proliferációja gátolt, akkor új májsejtek az őssejtek aktiválásával és az úgynevezett ovális sejtek közbeiktatásával keletkeznek. Az utóbbi években a kutatás homlokterébe került a hemopoetikus őssejtek segítségével lezajló szövetregeneráció. Bár számos közlemény igazolni látszik, hogy a hemopoetikus őssejtek transzdzifferenciálódhatnak közvetlenül, vagy ovális sejtek közbeiktatásával májsejtekké, a folyamat hatásfoka nagyon alacsonynak bizonyult. Magát a transzdzifferenciáció folyamatát is több szerző kétségbe vonja, hiszen kimutatták, hogy a legtöbb esetben csak sejtfüzióról van szó. A hemopoetikus őssejtek segítségével lezajló regeneráció jelentősége azért is megkérdőjelezhető, mivel mint fentebb láthattuk, maga a máj is több regenerációs mechanizmussal rendelkezik, melyek a körülményektől függően aktiválódnak.

A fentiek alapján látható hogy a máj őssejtjeinek lokalizációja és fenotípusa nem ismert, tehát ezeknek a meghatározása nagyon fontos lenne ezen sejtpopuláció későbbi terápiás hasznosíthatósága szempontjából.

A malignus tumorok legjellemzőbb tulajdonsága, hogy növekedésük során távoli áttéteket képeznek. Legtöbb esetben ez vezet a különböző malignus betegségben szenvedő beteg halálához. A metasztatizálás folyamatát több, egymástól többé-kevésbé elkülöníthető, de egyenként igen bonyolult lépésre oszthatjuk.

1/ Tumor növekedés, tumorsejt leszakadás, szövetinvázió

2/ Angiogenezis

3/ Intravazáció

4/ Kölcsönhatás a vér alakos elemeivel és oldott alkotórészeivel

5/ Mechanikus vagy specifikus elakadás/kitapadás a célszerv érrendszerében.

6/ Extravazáció

A metasztázisképzés folyamata többször is ismétlődhet, így másodlagos illetve harmadlagos metasztázisok is kialakulhatnak. Ezért, bár a tumorok klinikai felismerésekor már legtöbbször mikrometasztázisok vannak jelen, ezen lépések nagyobb részének gátlása megakadályozhatja újabb metasztázisok kialakulását.

A másodlagos és harmadlagos metasztázisok kialakulása nagyrészt úgynevezett generalizációs helyeken keresztül történik, melyek főleg nyirokcsomók, máj és tüdő lehetnek. A generalizációs helyeket általában az anatómiai viszonyok határozzák meg, mely legtöbbször a vénás illetve nyirokfolyásnak felel meg. Tumorsejtek azonban átjuthatnak a szervek kapilláris hálózatán anélkül, hogy ott elakadnának és áttéteket hoznának létre. A két folyamat eredményeképpen jöhet létre a metasztázisok bizonyos tumorokra jellemző szerveleszlása, melynek kialakulását két egymásnak ellentmondó, bár egymást nem kizáró elmélet próbálja magyarázni. Az egyik a "mechanikus" elmélet, mely szerint a primer tumorból elszabadult tumorsejtek az első elért szerv kapilláris hálózatában hoznak létre áttéteket, míg a "mag-talaj" teória szerint a tumorsejtek és a célszerv specifikus tulajdonságai határozzák meg a metasztázisok kialakulását és ez független az anatómiai viszonyoktól. Mindkét hipotézist számos humán és állati tumor vizsgálatából származó adat támasztja alá.

A tumor indukált angiogenezis kettős szerepet játszik a tumorok progressiójában. Az újonnan képződött erek egyrészt tápanyaggal látják el a tumort, másrészt növelik a hematogén úton képződött metasztázisok kialakulásának valószínűségét. Az utóbbi évek kutatási eredményei bizonyították a limfangiogenezis létét is, valamint az újabban elérhető specifikus nyirokér markerek segítségével összefüggést találtak a nyirokérdenzítés és a tumorok metasztatizáló képessége között. Az újonnan képződött erek nagyon vonzó terápiás célpontot kínálnak, hiszen az erek genetikailag stabil sejtekből épülnek fel, szemben a tumorokkal (bár újabb eredmények a proliferáló endotélsejtek genetikai instabilitására utalnak), azonban a számos próbálkozás ellenére az anti-angiogén terápiák nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket.

2. Célkitűzések

Vizsgálataink két nagy kérdéskört ölelnek fel, a májregenerációt illetve a metasztázisképzést. A legfontosabb megválaszolendő kérdéseket az alábbiakban foglalhatjuk össze.

1. Májregeneráció

Milyen a patkány illetve humán máj interlobuláris epeúthálózatának szerkezete és immunfenotípusa?

Hogyan zajlik le a máj szerkezetének helyreállítása májregeneráció során?

Hol helyezkedhetnek el a májregenerációban résztvevő őssejtek?

2. Metasztázisképzés

2a. *Tumor indukált angiogenezis*

Milyen alapvető angiogenezis formák figyelhetők meg primer tumorok környezetében?

Van-e eltérés az angiogenezis folyamatában különböző szervekben, szövetekben?

Befolyásolja-e az angiogenezis folyamatát a tumorok differenciációs foka, a célszerv (bazális membrán) szerkezete?

Hogyan játszódik le a kísérletes májmetasztázisok arterializálódása?

2b. *Tumorsejt motilitás és szervpreferencia*

Hogyan változnak a tumorsejtek mozgása során a sejtadhéziós helyek és azok komponenseinek eloszlása?

Befolyással van-e a célszerv kapillárisainak szerkezete az extravazáció folyamatára illetve a szervpreferenciára?

3. Anyag és módszer.

3.1. Állatkísérletek

A máj epeútszerét normál különböző korú patkány illetve humán májakon vizsgáltuk.

A normál máj regenerációját a klasszikus parciális hepatektómia (2/3) modellben vizsgáltuk.

Az ovális sejtek szerepét a májregenerációban egy, a Solt-Farber- féle karcinogenezis modell (patkány) módosított változatában vizsgáltuk, mely 2 hetes acetilaminofluorén (AAF) kezeléssel és a kezelés közepén elvégzett parciális hepatektómiából áll.

Az angiogenezis és metasztázis vizsgálatokhoz különböző humán in vitro, valamint egér in vivo fenntartott tumorvonalakat használtunk.

Primer tumorokban lezajló angiogenezist a tumorsejtek (B16 melanóma, C38 kolon karcinóma illetve HT25 humán kolon karcinóma) intrakután vagy szubkután oltását követően vizsgáltuk.

Agy metasztázisokban lezajló angiogenezist a tumorsejtek karotiszba (3LL-HH karcinóma, B16, A2058, WM983 melanómák, 293 veserák), vagy direkt az agyszövetbe történő oltását követően vizsgáltuk (ZR-75-1 emlőrák, HT25 kolon karcinóma, H1650 tüdő adenokarcinóma, HT1080 fibroszarkóma).

Májmetasztázisok vaszkularizációját a tumorsejtek lépbe (C38 kolon karcinóma,) történő oltását követően vizsgáltuk. Az arterializáció folyamatát korróziós készítmények segítségével vizsgáltuk (A2058 melanóma, Lewis Lung karcinóma, C38 kolon karcinóma).

A tumorsejtek extravazációjának a vizsgálatához Lewis Lung karcinóma sejteket oltottunk farokvénába, szív bal kamrába, és lépbe.

3.2. Morfológiai módszerek

Megfigyeléseink döntő többsége fagyasztott metszeteken illetve sejt kultúrákon elvégzett, immunfluoreszcens vizsgálatokon alapul. A minták analizését legtöbbször konfokális mikroszkóppal végeztük el, mely lehetőséget adott a detektált jelek háromdimenziós rekonstrukciójára is. A kapott eredményeket normál illetve immun-elektronmikroszkópos vizsgálatokkal egészítettük ki. 3D rekonstrukciót félvékony sorozatmetszetek felhasználásával is végeztünk. A korróziós készítményeket sztereó- illetve szkenningszkennings elektronmikroszkóp segítségével vizsgáltuk.

Vinkulin eloszlását a sejt migráció során élő sejtekben GFP-vinkulin konstrukció transzfekcióját követően vizsgáltuk.

Az ovális sejtek sorsának követését retrovírus jelöléssel végeztük el.

4. Eredmények és megbeszélés

4.1. Májregeneráció

4.1.1. A máj epeútrendszerének szerkezete és immunfenotípusa (I,II).

A Hering csatornák, az epeútrendszer legtávolabbi szakaszai, melyek összeköttetést biztosítanak az epeutak és a hepatociták alkotta epekanalikusok között. Elnevezésüket leírójukról kapták, aki először figyelt meg olyan rövid, 2-3 sejtsor hosszúságú duktulusokat a májban, melyek alkotásában epeúthámsejtek és hepatociták egyaránt részt vesznek. Egyértelmű azonosításuk csak elektronmikroszkópos vizsgálattal lehetséges.

Patkánymájban ezek a struktúrák a „limiting plate”-en kívül periportálisan helyezkednek el, tehát sosem hatolnak be a parenchimába. Vizsgálataink kimutatták, hogy ezek a struktúrák a CK19+/CK7- immunfenotípust hordozzák. Ugyanakkor a nagyobb interlobuláris epeutak CK19+/CK7+ fenotípusúak. CK19+/CK7- immunfenotípusú epeutak azonban nem találhatók humán májokban, ebben az esetben minden epeút CK19 illetve CK7 pozitív. A CK7 negatív epeutak sajátos entitását igazolja, hogy míg a CK7 pozitív epeutak mérete a máj hilusa felé fokozatosan növekszik, addig a CK7 negatívaké állandónak adódott, májbeli helyzetüktől függetlenül. A CK7 negatív epeutak több száz mikrométer hosszú kanyarulatot tartalmazó struktúrák, melyek több helyen kapcsolódhatnak a májsejtekhez. Bár a Hering kanálisok szorosabb definíciójának ezen epeutak nem minden szakasza felel meg, fenotípusuk alapján ez a struktúra az epeútrendszernek egy morfológiai és funkcionális egységét alkotja (I).

Ép, humán májokban is jellemeztük az epeútrendszer legdisztálisabb szakaszát (II). A CK7 immunreakció alkalmas volt az epeutak és a hepatociták egyértelmű elkülönítésére. A CK7-tel jelölt metszetek konfokális mikroszkóppal történő vizsgálata, illetve sorozatmetszetekből számítógép segítségével végzett 3D rekonstrukciós vizsgálatok segítségével megállapítottuk, hogy az ép emberi májokban az epeutak a periportális kötőszövetből kilépve látszólag betérjednek a májparenchimába. Az infiltráció azonban csak látszólagos, mert az emberi májban is kezdetleges formában jelen vannak a néhány más állatfajban fellelhető jól fejlett interlobuláris vaszkuláris (kötőszövetes) szeptumok, amelynek mentén az epeutak tejednek, azaz intraparenhimálisak, de mégsem lépnek be a lebenyek állományába. Az epeutak közelében NG2 pozitív struktúrák is megfigyelhetők voltak, amely arteriolák jelenlétére utal. A tradicionális, eredetileg leírt Hering csatornák csak ezen epeutak terminális szegmentumának felelnek meg. Ezeknek a hosszú duktulusoknak az egységes, és nagyobb epeutaktól eltérő (EMA-/CD56+/CD133+) immunfenotípusa arra utal, hogy sajátos funkcionális egységet alkotnak. Különböző életkorú humán és patkány májkból származó minták vizsgálatával megállapítottuk, hogy ez az elrendeződés és immunfenotípus az újszülöttek májában még nem alakul ki, hanem posztnatálisan jön létre.

Összefoglalva tehát alapvető különbség van a patkány és a humán máj szerkezetében. Míg patkány májban az epeutak a „limiting plate”-en végződnek, humán májban az epeutak a lebenyke palástja mentén futnak. Ez a különbség hatással van az artériás rendszer szerkezetére is. Miután az artériás rendszer a májban főleg az epeutak vérellátásáért felelős, a humán májban a szerteágazó és a parenchimába is betérjedő epeútrészt egy ugyanolyan felépítésű artériás rendszer is követi, mely végül a szinuszoidokba ömlik. Ezzel szemben patkány májban az epeutak nem hagyják el a portális teret, ezért az artériás rendszer elvezetése főleg a portális rendszerrel alkotott anasztomózisokon keresztül valósul meg.

4.1.2 Májregeneráció hepatektómiát követően (III).

A májszövet legáltalánosabban elfogadott morfológiai alapegysége a lebenyke (lobulus). Az egyes májlebenyek regeneratív növekedése elvileg háromféleképpen történhet meg: a/ a májlebenyek méretének növekedése, b/ új májlebenyek képződése c/ a két folyamat kombinálódása révén. Meglepő módon napjainkig sem volt tisztázva, hogy a fenti három lehetőség közül melyik történik meg a májregeneráció során. Ennek magyarázata, hogy a máj lebenykeinek mérete meglehetősen nehezen vizsgálható. A májlebenyek egy bonyolult hierarchikus rendszert alkotva építik fel a májszövetet. Ezen a hierarchián belül a lebenyek mérete változik a hilstól való távolság alapján, továbbá a különböző lebenyek tengelye sem párhuzamos. Ebből adódik, hogy hagyományos szövettani metszeteken a lebenyek méretéről szinte semmi felvilágosítás nem nyerhető. Munkacsoportunk kidolgozott egy új módszert mely lehetővé teszi a májlebenyek méretének objektív vizsgálatát. Azokat a korábbi megfigyeléseket használtuk ki, hogy a/ a májtok alatti lebenyek az említett hierarchiában azonos helyet foglalnak el b/ tengelyük, mely lényegében azonos a centrális vénák legperifériásabb ágával, merőleges a máj felszínére. Ezért ha a hepatikus vénákon keresztül fluoreszcens műgyantával retrográd módon feltöltjük a centrális vénák ágrendszerét és rajtuk keresztül a szinuszoidokat, a máj felszínén megbízhatóan kirajzolódnak a lebenyek határai. A máj felszínéről készített felvételeken a lebenyek tetszőleges paraméterei objektíven meghatározhatók. Módszerünk természetesen csak a felszíni lebenyek méretéről nyújt egyértelmű felvilágosítást, de az említett hierarchikus elrendeződés miatt ez legalábbis tendenciájában tükrözi a mélyben zajló folyamatokat is.

A fenti módszert alkalmazva összehasonlítottuk a máj posztnatális, fiziológiás növekedését a sebészi parciális hepatektómiát követő regenerációval. Megállapítottuk, hogy az egyedfejlődés születést követő fázisában a máj tömegének gyarapodásához új lebenyek képződése és a lebenyek fokozatos növekedése is hozzájárul, ez utóbbi folyamatban pedig szerepe van a hepatociták megnagyobbodásának is. A regeneratív növekedés során viszont kizárólag a már meglévő lebenyek mérete növekszik, új lebenyek nem képződnek és a hepatociták sem képesek további megnagyobbodásra. A regeneráció eredményeként megnagyobbodott lebenyek viszont bonyolultabb szerkezetűek. Ez tükröződik az egy centrális vénát körülvevő portális vénaágak számának megnövekedésében, továbbá abban, hogy különböző zonális megoszlást mutató enzimek (pl. CYP450IIE1, glutamin szintetáz) a szokásos koncentrikus elrendeződés helyett karéjzott mintázatot mutatnak. Feltételezésünk szerint ezen utóbbi szerkezeti változások oka, hogy az ideális porto-centrális távolság ne növekedjen jelentős mértékben a lebenyek megnagyobbodása következtében.

4.1.3. Májregeneráció a máj őssejtjeinek részvételével (I, IV-VII).

Az őssejtek részvételével lezajló májregenerációt az úgynevezett AAF/Ph modellben vizsgáltuk, melynek lényege, hogy AAF kezelés hatására a hepatociták osztódása gátolt, aminek következtében a parciális hepatektómiával kiváltott proliferációs stimulus hatására őssejtek aktiválódásával zajlik le a regeneráció. Proliferáló ovális/progenitor sejtek - az őssejtek leszármazottjai - szaporodnak fel a májban és később májsejteké differenciálódnak. Az őssejtek lokalizációja a májban, fenotípus markerük nem lévén, pontosan nem ismert. A legtöbb adat arra utal, hogy az őssejtek az epeutak és a hepatociták között elhelyezkedő speciális képletek, a fentebb jellemzett Hering csatornák sejtjei között található. Más elképzelések szerint az epeúrendszer összes sejtje rendelkezik őssejt tulajdonsággal. Novikoff és mtsai. szerint szintén a terminális epeutakban található, de a bazális membránhoz nem kitapadt primitív sejtek lennének a máj őssejtjei. Ezekkel szemben olyan elképzelések

is napvilágot láttak, hogy az ovális sejtek a periportális térben elhelyezkedő nem jellemezett sejtek, illetve csontvelőből származó őssejtek leszármazottjai lennének.

A következőkben az őssejtek lokalizációjának meghatározására vonatkozó vizsgálatainkat ismertetjük. Azt már korábban tapasztalták, hogy bár az ovális sejtek portális térből történő kivándorlása csak a hepatektómiát követően kezdődik meg, a sejtproliferáció a portális térben már két AAF kezelést követően megindul. A proliferáló sejtek pontos lokalizációja azonban nem volt ismert. Vizsgálatainkban immun-elektronmikroszkópia segítségével állapítottuk meg a brómdezoxiuridint (BrdU) inkorporáló sejtek pontos elhelyezkedését. Összehasonlítóképpen epeútlekötésen átesett állatok máját is vizsgáltuk, mivel ebben az esetben a lezajló epeút proliferáció nem jár ovális sejtek megjelenésével, tehát őssejt aktivációval sem. Megállapítottuk, hogy két AAF kezelést követően a legnagyobb arányban a Hering kanálisok sejtjei proliferáltak szemben az epeút lekötéssel, ahol a nagyobb epeutak sejtjei voltak többségben a proliferáló sejtek között **(IV)**. Ez a megfigyelés azt támasztotta alá, hogy az őssejtek a Hering kanálisok sejtjei között helyezkednek el. A Hering kanálisok azonban a definíció szerint, mindössze a májsejtekhez kapcsolódó és bazális membrán által félkör alakban körülvett néhány sejtől álló struktúrák, melyek valószínűleg nem tartalmaznak annyi őssejtet amennyi a máj teljes regenerációjához szükséges. A fentebb ismertetett (CK19+/CK7-) epeút kompartment azonban, mely megfelel a legkisebb terminális epeutaknak és magában foglalja a Hering kanálisokat is, elegendő őssejtet tartalmazhat a máj regenerálásához. Ezen epeutak sejtjei is nagyobb proliferációs aktivitást mutattak két AAF dózist követően, mint a nagyobb CK7+ epeutak **(I)**. Véleményünk szerint ezek tartalmazzák a legnagyobb valószínűséggel a máj őssejtjeit. Sajnos ez a fenotípus nem volt stabil, tehát nem használható az őssejtek leszármazottjainak követésére, hiszen a proliferáló ovális sejtek expresszálják a CK 7-et.

Mint fentebb említettük, ovális sejtek megjelenésére a parenchimában, melyek bizonyítottan a periportálisan proliferáló sejtek leszármazottjai csak az AAF kezelés közepén elvégzett hepatektómiát követően kerül sor. Bár azt már korábban kimutatták, hogy az ovális sejtek a máj epeútrendszerével folytonosságot mutató, elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján nem folytonos bazális membránnal körülvett csőrendszert alkotnak, ezen struktúrák pontos viszonya a portális térhez illetve máj parenchimájához ismeretlen volt. Mi konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk az ovális sejtek és a bazális membrán viszonyát a parciális hepatektómiát követően azon időponttól kezdve, amikor az ovális sejtek már áttörték a „limiting plate”-et. Megfigyeltük, hogy a néhány sejt hosszúságú csövek körül a bazális membrán ugyanolyan „U” formában helyezkedik el, mint a Hering kanálisok körül, amely azt mutatja, hogy az ovális sejt csövek a Hering kanálisok meghosszabbításai. A csövek az idő előrehaladtával egyre hosszabbak és kanyargósabbak lettek, de végük mindig hepatocitákhoz kapcsolódott, így összeköttetésben maradt májsejtek közötti elemi epeút rendszerrel **(IV)**. Ez a tény nagy jelentőséggel bír, hiszen azt mutatja, hogy az epeelvezetés és így a szerv funkciója a regeneráció során végig biztosított. Ez kiegészül azzal a megfigyeléssel is, hogy az ovális sejt-csővek a szinuszoidok között helyezkedtek el arra utalva, hogy növekedésük során a károsodott hepatocita lemez helyét foglalják el, ezzel a szerv vérkeringésének zavartalansága is biztosított. Soha nem figyeltünk meg bazális membrán nélküli CK19-et expresszáló, a kötőszövetben vagy a Disse térben elhelyezkedő sejteket, mely azt jelzi, hogy az ovális sejtek által alkotott csövek növekedése szabályozottan a sejtek polarizált állapotát megtartva történik. Ezt a tényt szem előtt tartva hasonlóképpen nem tartjuk elképzelhetőnek, hogy a máj őssejtjei az epeút rendszeren kívül helyezkedjenek el a portális térben, melyet alátámaszt az a megfigyelésünk, hogy nem találtunk citokeratin illetve AFP pozitív sejteket a bazális membránon kívül, sem pusztán az AAF kezelést követően sem az ovális sejt csövek növekedése során. Ezzel összhangban nem figyeltünk meg bazális membránon átmigráló sejteket sem. Találtunk ugyan a Novikoff által leírt bazális sejtekhez hasonló primitív

hemopoetikus sejtekre emlékeztető sejteket a növekvő ovális sejt csövekben, de osztódó alakokat nem találtunk közöttük. Ilyen sejtek nem voltak jelen a Hering kanálisokban illetve a kis epeutakban a két AAF kezelést követően sem (IV). Hemopoetikus sejtekhez hasonló sejtek jelenléte az ovális sejt csövekben felveti annak lehetőségét, hogy ezek a sejtek csontvelői eredetűek és ovális sejtekké transzdifferentiálódnak, mint ahogy azt Petersen és munkatársai leírták. Ezt a nagyon vonzó lehetőséget alátámasztja az is, hogy az ovális sejtek hemopoetikus őssejtek fenotípus jegyeit viselik (c-kit, CD34). Hemopoetikus sejtek ovális sejtekké történő transzdifferentiálódását azonban többen kétségbe vonják. Az ovális sejtek csontvelői eredetét saját eredményeink is cáfolják (V), hiszen kimutattuk, hogy a csontvelői őssejtek markereként ismert Thy-1 molekulát nem az ovális sejtek - mint ahogy azt Petersen és munkatársai leírták -, hanem a bazális membránon kívül elhelyezkedő SMA pozitív miofibroblaszt populáció expresszálja, míg a dezmin pozitív aktivált „stellate” sejtek elenyésző mértékben mutattak Thy-1 pozitivitást. Kollagenáz perfúziót követően izolált ovális sejtekből illetve szövettani metszetekből mikrodisszekált ovális sejtekből izolált RNS-ben valós idejű RT-PCR módszerrel nem volt kimutatható a Thy-1 mRNS, ami viszont jelen volt a miofibroblasztokat is tartalmazó frakcióból izolált RNS-ben, igazolva, hogy a Thy-1 molekula RNS szinten sem termelődik az ovális sejtekben.

Összefoglalva tehát vizsgálataink eredményeit azt mondhatjuk, hogy a máj őssejtek a Hering kanálisokat is magukba foglaló terminális epeutakban helyezkednek el és hasonlóan más szervek őssejtjeihez (bél, bőr, agy), a bazális membránon nyugszanak. Utódsejtjeik (ovális sejtek) polarizált sejtek melyek duktusokat alkotnak és migrációjuk illetve szaporodásuk során folytonos bazális membránt építenek fel.

Az őssejtek részvételével megvalósuló májregeneráció utolsó lépése az ovális sejtek májsejtekké történő differenciációja, mely folyamatra vonatkozó vizsgálatainkat ismertetjük az alábbiakban.

Korábbi vizsgálatokból kiderült, hogy az általunk használt modellben az ovális sejtek differenciációja májsejtekké függ az AAF alkalmazott dózisától. Eszerint a nagy dózisú AAF gátolta az ovális sejtek differenciációját, míg az AAF alacsonyabb koncentrációja gyors májsejt irányú differenciációt eredményezett. Alaposabban megvizsgálva ezt a jelenséget két különböző típusú differenciációt figyeltünk meg az AAF dózisától függően (VI). Kis dózisú AAF kezelés az ovális sejtek szinte egyidejű differenciációját eredményezte 5-6 nappal a hepatektómiát követően. Ezzel szemben differenciálódó sejtek csak később (11-13. nap a hepatektómiát követően) jelentek meg a májban fókuszokat alkotva és az ovális sejtek nagy többsége nem alakult át májsejtekké nagy dózisú kezelést követően. Az ovális sejtek májsejtekké történő differenciációja teljesen hasonló módon zajlott le mindkét rendszerben, az eredmény kis hepatociták megjelenése volt. A kis dózis esetében a kis hepatociták elrendeződése megegyezett az ovális sejtek elrendeződésével, vagyis duktusokat alkottak, melyek a portális terek körül sugár irányban helyezkedtek el. Nagy dózis esetében a kis hepatociták fókuszokba rendeződtek, de ezen belül ebben az esetben is duktusokat formáltak. Mindkét esetben a kis hepatociták által formált duktusok összeköttetésben maradtak a máj epeút rendszerével. A differenciálódás legmarkánsabb jele a bazális membrán eltűnése volt az ovális sejt-csövek körül, amellyel teljesen párhuzamosan történt a HNF-4 α -nak, a májsejtek terminális a differenciációját meghatározó transzkripciós faktornak a megjelenése (VI). Közvetlen összefüggés azonban valószínűleg nincs a bazális membrán lebomlása és a HNF-4 α megjelenése között, hiszen a bazális membrán lebomlásának elmaradása és a HNF-4 α megjelenése a nagy dózisú kezelés során gyakran megfigyelt intesztinális metapláziához vezet. A kis dózisú differenciálódás esetében lehetett a legjobban megfigyelni a duktusok disztális részén ultrastukturálisan a bazális membrán fragmentálódását, illetve teljes lebomlását, valamint a májsejtekre jellemző sejtorganellumok megjelenését. A bazális membrán eltűnésével párhuzamosan az $\alpha 6$ integrin alegység expressziója is csökkent, amely

fehérje a kizárólagosan laminint kötő integrinek alegysége és jelen van a máj epeúrendszerének minden szegmensében. Ezzel szemben a duktuláris struktúrákat alkotó kis hepatociták bazális és laterális részén megjelenik a $\alpha 1$ integrin amely elsősorban kollagénekot köt és a normál hepatociták jellemző adhézíós molekulája **(VI)**. A bazális membrán lebomlása nem jár együtt a duktuláris szerkezet azonnali felbomlásával és egyelőre nem tudjuk, hogy a normál májsejt gerendák hogyan alakulnak ki. Annyi azonban bizonyos, hogy a bazális membrán lebomlását követően rögtön megkezdődik az elemi epeutak kialakulása a kis májsejtek között, amit az igen sajátos csillagszerű elrendeződést mutató CD26 expresszió jelez. A differenciálódás során képződő elemi epeutak közvetlen kapcsolatban maradnak az elvezető nagyobb epeutak lumenével, melyet az epeúrendszer fluoreszcens lektinnel való retrográd feltöltésével sikerült igazolnunk.

Összefoglalva a normál és az őssejtek segítségével történő májregenerációra vonatkozó vizsgálatainkat azt mondhatjuk, hogy a regeneráció a máj eredeti szerkezetének felhasználásával zajlik le, új szöveti struktúrák nem keletkeznek.

Az úgynevezett primer hepatocita mitogének előzetes májkárosodás nélkül is jelentős hepatocita hiperpláziát képesek előidézni. Ha a nagy dózisú AAF/Ph protokollal kezelt állatokat primer mitogénekkel kezelünk, (trijódtironin (T3) vagy ólomnitrát) a májsejtek proliferációja elmarad. Ehelyett az ovális sejtek mitotikus aktivitásának fokozódását lehetett megfigyelni, melyet nagyon gyorsan, a kezelést követő 48 órán belül az ovális sejtek jelentős részének hepatocita irányú differenciálódása követett **(VII)**. A differenciálódás folyamata teljesen megegyezett a fentebb leírt alacsony dózisú differenciálódás folyamatával. A hormonkezelt állatok szérumában a bilirubin szint szignifikáns csökkenését, illetve a máj szintetikus funkcióját tükröző protrombin szint emelkedését is meg lehetett figyelni, jelezve, hogy a differenciálódásnak szervezet szintjén is észlelhető májfunkció javulás volt a következménye. Annak igazolására, hogy a májban hirtelen megjelenő „kis” hepatociták valóban az ovális sejtekből származnak, az ovális sejteket a hormonkezelés előtt retrovírussal „jelöltük meg”, mely jelzés később a kis hepatocitákban volt fellelhető.

Eredményeink azt bizonyítják, hogy a máj őssejtek részvételével zajló regenerációja felgyorsítható. Ez a megfigyelés elvi háttérül szolgálhat a klinikai gyakorlatban például fulmináns májelégtelenségben a regeneráció felgyorsítására irányuló próbálkozásokhoz.

4.2. Tumor indukált angiogenesis

Az első angiogenesis modellt Folkman és mtsai. dolgozták ki a 70-es évek végén. Megállapították, hogy a tumorok angiogenesis függőek, azaz nem képesek növekedni egy bizonyos (1-2 mm) méreten túl, a tápanyagellátást biztosító új erek képződése nélkül. Vizsgálataikban főleg az újonnan, bimbózással („sprouting”) képződött erekre koncentráltak, melyekről feltételezték, hogy azok a tumorsejtek inváziójához hasonlóan növekednek, majd a tumorokba belenöve hozzák létre a növekedéshez szükséges tápanyagellátást biztosító érhálózatot. A tumorsejt invázió és az angiogenesis közötti hasonlóság abban áll, hogy az angiogenesis első lépésében is a bazális membrán degradációja következik be, melyet a polarizációjukat vesztett endotélsejteknek a kötőszövetbe történő migrációja követ. Az új erek lumenének kialakulására ez a modell semmilyen magyarázatot nem tudott adni. Ezzel szemben mi korábban egy ettől eltérő angiogenesis modellt írtunk le, mely szerint az endotélsejtek megtartják polarizált állapotukat (a sejtkapcsoló struktúrák nem bomlanak fel az endotélsejtek proliferációjának migrációjának megindulásakor) és a bazális membrán lokális degradációja után az endotélsejtek egymással párhuzamosan migrálnak, így az endotélsejtek között azonnal egy résszerű lumen keletkezik, amely folytonos az eredeti ér

lumenével. Az éretlen kapilláris növekedése során folyamatosan történik a bazális membrán szintézise és depozíciója. (VIII, IX).

A malignus tumorok vérellátásáért több, egymástól eltérő mechanizmus is felelős lehet. Ezek közül a talán legjelentősebbnek tartható érbimbózás (sprouting) fentebb ismertetett két angiogenezis modellje azonban csak azon, főként primer tumorok (melanóma, emlő, vastagbélrák) kiindulási helyeként szereplő szövetek esetében érvényes, melyek nagy arányú kötőszöveti kollagént tartalmaznak, ami teret biztosít új kapillárisok növekedéséhez. Az érdenzitás növekedését a fenti tumorok estében egy másik mechanizmus, az úgynevezett „intussuszeptív” angiogenezis is biztosíthatja, mely valójában a venulák osztódását jelenti, lefolyásának mechanizmusa azonban vitatott.

4.2.1. Angiogenezis primer tumorokban

4.2.1.1. Melanómák vaszkularizációja (X).

Mint fentebb említettük a melanómák vaszkularizációja esetében a bimbózó angiogenezis játszik a fő szerepet. Humán melanómák esetében a vaszkularizáltság és a prognózis között összefüggést kereső tanulmányokban már korábban leírták, hogy a tumor szélén az érdenzitás mindig sokkal magasabb, mint a tumorok belsejében. Saját vizsgálataink hasonló eredményt hoztak kiegészítve azzal a fontos megfigyeléssel, hogy a vastagabb tumorok belsejében az erek kerülete szignifikáns emelkedést mutatott a peritumorális szövethez képest. Érdekes módon a metasztázisok kialakulása és a túlélés az intratumorális érdenzitással mutatott szoros összefüggést. A humán melanómákban megfigyelt érelszlálás létrejöttének részletesebb vizsgálatára, egy a humán viszonyokat hűen visszaadó egér modellre alakítottunk ki, mely során a tumorsejteket intrakután (ortotopikusan) oltottuk. Az egér melanóma növekedése során is kialakult a tumor alapján a humán tumorokban megfigyelt denz érhalózat, melynek sűrűsége a tumor belseje felé csökkent. Az egyes régiók érdenzitásának időbeni változását vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a tumor perifériáján az érdenzitás sokkal gyorsabban növekszik, mint a peritumorális régióban, azt jelezve, hogy a növekvő tumor a bőr eredetileg is meglévő ereit az újonnan képződött kapillárisokkal együtt inkorporálja. Ezt a következtetést alátámasztotta a tumor-stróma határon levő érhalózat szerkezetének háromdimenziós analízise is, ami kimutatta, hogy mind a humán mind az egér melanómák esetében a kapilláris hálózat a daganat felszínével párhuzamos lefutású, sűrűn egymás mellett elhelyezkedő kapillárisok kötegeiből épül fel. A tény, hogy a daganatok érstrukturájának vizsgálatkor radiális lefutású, a tumor centruma felé mutató kapillárisokat nem észleltünk, már önmagában bizonyítja, hogy a melanómák elsősorban a peritumorális kapillárisfonat bekebelezésével tesznek szert a vérellátásukat biztosító érhalózatra.

Az érdenzitásnak a tumor belseje felé megfigyelt csökkenése elsősorban annak a következménye, hogy a tumor a növekedése során „felhígítja” az inkorporált érhalózatot. Az endotélsejtek proliferációjára vonatkozó vizsgálataink kimutatták, hogy a tumor belsejében az endotél proliferáció kisebb mint peritumorálisan, ami szintén alátámasztja az érdenzitás ebben a régióban megfigyelt csökkenését. Az érdenzitás csökkenésének egy másik nagyon fontos oka lehet, hogy a tumorban megszűnik az erek bimbózási, ennek következtében az alacsony szintű endotél proliferáció az erek méretének növekedését eredményezi. Az erek bimbózási megszűnésének egyik oka, hogy a tumorban (melanómák) nem áll rendelkezésre megfelelő extracelluláris mátrix (kollagén I) a kapillárisok növekedéséhez, illetve a tumorba került erek bazális membrán szerkezetének megváltozása sem teszi lehetővé a bimbózást. Ez utóbbi lehetőségre utalnak azok a megfigyeléseink melyek szerint a tumor belsejében levő erek tumorsejtek általi folyamatos inváziója zajlik, ami az erek körüli koncentrikusan

elhelyezkedő bazális membrán rétegek kialakulásához vezet, feltehetően meggátolva ezzel a bimbózást. A bazális membrán inváziója azonban szerepet játszhat az erek kerületének megfigyelt növekedésében.

Általánosan elfogadott nézet, hogy az újonnan képződött kapillárisok érési folyamatának fontos eleme a periciták megjelenése az erek körül. Pericita borítás nélkül az újonnan képződött kapillárisok regressziója figyelhető meg VEGF illetve PDGF megvonását követően. Megfigyeléseink szerint intrakután növekvő melanómák esetében mind a peritumorális mind az intratumorális erek pericita borítása komplett volt. Ez azt jelenti, hogy a bőrben lezajló angiogenezis során, szemben a szubkután tumorok esetében megfigyelt angiogenezissel, a periciták rögtön megjelennek a bimbózó kapilláriskezdemények körül, így érett kapillárisok kerülnek inkorporációra. Bár az általánosan elfogadott, hogy a tumorokban található erek szerkezete nagymértékben eltér a normál erekétől, amit a tumorinváziót elősegítő tényezőnek tartanak, eredményeink alapján azonban melanómák esetében ez a jelenség nem lehet az intratumorális érdenzitás és metasztázisképzés közötti összefüggés oka.

4.2.1.2 Az intusszusceptív angiogenezis egy új mechanizmusa (XI)

Megfigyeléseink szerint egerekben növekvő szubkután oltott kolonrákok esetében az angiogenezis fő formája az intusszusceptív angiogenezis (érosztódás), míg a sprouting (bimbózó) típus alig fordul elő. Ezen daganatok vaszkularizációjának vizsgálata során érdekes jelenséget figyeltünk meg. Venulák lumenében úgynevezett oszlopok („pillar”) voltak jelen, amelyek erre az angiogenezis típusra jellemző struktúrák (27). Eltérően azonban az elfogadott pillar szerkezettől, kezdeti stádiumban ezek az oszlopok nem tartalmaztak kötőszöveti sejteket illetve pericitákat, hanem kizárólag egy kollagén kötegből álltak, melyet endotélsejtek borítottak. Az intusszusceptív angiogenezis elfogadott mechanizmusa szerint a pillar képződés első lépése az érlumen szemközti falainak benyomódása, mely az endotélsejtek érintkezéséhez, illetve később a sejtkapcsoló struktúrák reorganizációjához vezet. Arra azonban nincs kielégítő magyarázat, hogy mi szolgáltatja az erőt ehhez a folyamathoz. Az elfogadott magyarázat erre a jelenségre, hogy perivaszkuláris sejtek nyomják be az erek falát, ami erősen megkérdőjelezhető, hiszen sejtek csak elenyésző mértékben képesek nyomóerő kifejtésére. Ezzel szemben több százszor akkora húzóerőt képesek kifejteni. Megfigyeléseink szerint azokon a területeken ahol intenzív intusszusceptív angiogenezis zajlott, mindig megfigyelhető volt az úgynevezett „bridging” is, vagyis endotél hidak voltak jelen az érlumenben. Elképzelésünk szerint ezek az endotél hidak képesek a kötőszöveti kollagén kötegeket az érlumenen áthúzni. Ezt alátámasztja, hogy az oszlopokban található kollagén kötegek mérete szinte teljesen megegyezik a kötőszövetben található kötegek méretével. Ezenkívül számos vinkulint tartalmazó adhézios pont található a kollagén kötegek mentén, valamint az oszlopot felépítő endotélsejtek nagy mennyiségben tartalmaznak mikrofilamentumokat, mely struktúrák összehúzó erő kifejtésére utalnak. Megfigyelhetők voltak olyan kollagén kötegek is, melyek nem teljesen értek végig az oszlopon, egy részük viszont a kötőszövetben helyezkedett el, ami szintén arra utal, hogy a kötegek a kötőszövetből kerülnek az oszlop belsejébe, nem ott szintetizálódnak. Ultrastrukturális vizsgálatok nem mutattak ki bazális membránt az endotélsejtek és a kollagén köteg között, az endotélsejtek közvetlenül tapadtak a kollagén rostokhoz. Az adhézios helyek szerkezete különlegesen érdekes volt, mivel az egyes kollagén rostok mentén szabályosan számos elektrondenz adhézios pont (~50nm) helyezkedett el, melyeket mikrofilamentumok kötöttek össze. Az oszlopok érése során kötőszöveti sejtek és periciták migrálnak be az oszlopokba, amit új kollagén tartalmú mátrix depozíciója, ezáltal az oszlop méretének növekedése követ, mely folyamat végül az ér osztódásához vezet.

4.2.2. *Angiogenezis metasztázisokban*

4.2.2.1. *Glomeruloid testek kialakulása kísérletes agymetasztázisokban (XII)*

A glomeruloid testek kapillárisokból felépülő, jellegzetes érstruktúrák, amelyek nevüket a vese glomerulusaihoz való látszólagos hasonlóságuk alapján kapták. Leggyakrabban a központi idegrendszer primer daganataiban és metasztázisaiban figyelhetők meg. Előfordulnak azonban más szövetek tumoraiban is (tüdő-, prosztata-, emlőrák, melanóma), jelenlétüket pedig összefüggésbe hozták a rossz prognózissal. Kialakulásuk pontos mechanizmusa nem ismert, de az erek dilatációja, majd az ezt követő endotél proliferáció, valamint hídképződés, az intusszuszeptív angiogenezishoz hasonló folyamatra enged következtetni.

Mi a glomeruloid testek kialakulásának egy további, nagyon egyszerű formáját írtuk le agymetasztázisokban (XII). Érdekes, hogy a számos felhasznált különböző eredetű humán és rágsáló tumor (tüdőrák, melanóma, veserák) megegyező struktúrájú glomeruloid testeket hozott létre. Vizsgálataink kimutatták, hogy a tumorsejtek az extravazációt követően az agykapillárisok bazális membránjához tapadtak és azon kiterültek. Már egyes sejtek estében is megfigyelhető volt az a jelenség, hogy a tumorsejtek által befedett kapilláris szegmenseken először egy, majd több egyszerű csavarulat keletkezett. A tumorsejtek szaporodásuk közben nem távolodtak el a kapillárisoktól, hanem annak mentén terjedtek, illetve több rétegben helyezkedtek el a kapillárisok körül. A mikrometasztázisok növekedése során, a kapillárisokon képződött hurkok egyre bonyolultabbak lettek és végül kaotikus, a tumorsejt fészkek belsejében elhelyezkedő érgombolyagok alakultak ki. A folyamat magyarázata lehet, hogy a kapillárisok bazális membránjához $\alpha 6$ integrin segítségével tapadó és azon kiterült tumorsejtek aktin citoskeletonja a kapilláris hurkok kialakulásához vezető húzóerőt fejt ki. Ezt alátámasztja az a megfigyelésünk, hogy a szomszédos tumorsejt fészkek között levő kapilláris szakaszok sokszor elvékonyodtak, sőt néhány esetben el is szakadtak. A folyamatban nagy szerepet játszhat, hogy az agyszövetben nincs kötőszöveti típusú extracelluláris mátrix, így az agyszövet mechanikai stabilitása kicsi, lehetővé téve a kapillárisok elmozdulását. További érdekessége a folyamatnak, hogy az endotélsejtek proliferációs indexe nem emelkedik, jelezve, hogy sem bimbózó sem egyéb más endotél proliferációt igénylő angiogén folyamat nem zajlik (erre az erek morfológiája sem utalt), az érdenzitás növekedése a tumorban kizárólag az agyszövet meglévő érhálózatának átrendeződésével jött létre.

4.2.2.2. *Angiogenezis vizsgálata kísérletes agymetasztázisokban (XIII)*

A fentiekben ismertettünk a glomeruloid testek egy lehetséges keletkezési mechanizmusát, amihez a tumorsejteket az állatok karotiszába oltottuk. A módszer hátránya, hogy nagyszámú mikrometasztázist eredményez, ami gyorsan az állatok pusztulásához vezet. Ezért egy másik kísérletsorozatban a tumorsejteket közvetlenül az agyszövetbe oltottuk, hogy a tumorok elérjék az angiogenezis megindulásához szükséges méretet („angiogenic switch”, 1-2 mm átmérő). Morfometriai vizsgálatok azt mutatták, hogy angiogenezis nem zajlik a peritumorális területeken. Ezzel összhangban angiogenezis egyszerű sebzést követően sem volt megfigyelhető az agyszövetben. A tumorok csupán a meglévő erek bekebelezése által tettek szert saját érrendszerre. Ezek a megfigyelések szöges ellentétben állnak az elfogadott nézettel, miszerint agytumorokban és metasztázisokban valamint érelzáródást követően

intenzív angiogenezis tapasztalható a sérülés határterületén. Mindegyik tumor esetében az érdenzitás alacsonyabb, emellett az érátmérő, illetve az ereket alkotó sejtek proliferációja magasabb volt intratumorálisan, mint peritumorálisan. Ez a már fentebb említett jelenségre utal miszerint a tumorok növekedésük következtében az inkorporált érálózatot folyamatosan „kihígtják”. Negatív összefüggést találtunk a bekebelezett erek száma, valamint az ereket alkotó sejtek proliferációja között, aminek hátterében az állhat, hogy az alacsony érdenzitású tumorokban az egyes erek felületének nagyfokú növelésével jön létre a tumor növekedéséhez szükséges érterület. A differenciáltabb tumorokban, melyek ún. „pushing” típusú növekedési mintázatot mutattak, alacsonyabb volt az érdenzitás, magasabb az erek sejteinek proliferációja, szemben az invazív növekedési mintázatú tumorokkal. A tumor differenciációs foka tehát hatással van a vaszkularizáció mintázatára, azaz nyilvánvaló hogy a kompakt szerkezetű (differenciált) tumorok inkorporációs képessége alacsonyabb, mint a lazább szerkezetű differenciálatlanabb tumoroké. A bekebelezett erek mellett, hogy a tumorsejtek eltávolították róluk az asztrocitákat, megtartották normál struktúrájukat. Az ér bazális membránjával létrejött kapcsolat az emlőkarcinóma sejtek differenciációjához vezetett. A tumor szélén a parenchimában mintegy „úszó” izolált sejtek az erek bazális membránjával való kölcsönhatást követően mirigyszerű struktúrákba szerveződtek apikális felszínükön claudin 3-t és EMA-t expresszáltak, míg bazális felszínükön laminin5-öt tartalmazó extracelluláris mátrixot szekretáltak, ami az agykapillárisok bazális membránjának felszínéhez kötődött.

Az intusszuszeptív angiogenezishez rendkívül hasonló folyamat volt megfigyelhető a fibroszarkóma sejtvonal agymetasztázisaiban. A tumorsejtek érfehérítő tapadása ismeretlen módon az érterület kettéosztását eredményezte, és az így kialakult üreket tumorsejtek töltötték meg. Az érálózat ilyen formában történő átrendeződése azonban nem tekinthető igazi angiogenezisnek, mivel a folyamat a tumorsejtek aktivitásától függ. Érdekes módon sem a sejtvonalak fehérje szintű VEGF expressziója, sem az intratumorális VEGF mRNS szintje nem mutatott korrelációt az intratumorális erek sejteinek proliferációjával. Mindemellett az emelkedett növekedési faktor receptor szintek (VEGFR1, PDGFR β , Tie-2) kapcsolatban állhatnak az erek sejteinek megnövekedett proliferációjával, illetve a bekebelezett erek struktúrájának stabilizációjával. Ezek az adatok arra utalnak, hogy kísérletes körülmények között az agymetasztázisok növekedéséhez nem szükséges bimbózó (sprouting) angiogenezis.

4.2.2.3. Májmetasztázisok vaszkularizációja ((IX, XIV)

A máj a metasztázisképzés egyik leggyakoribb célszerve. Korábban három különböző kolorektális karcinóma metasztázis típusát írtak le: „replacement”, „pushing” és „desmoplastic”. Az első metasztázis típusnál a tumor növekedése során a máj szinuszoidális szerkezete többé-kevésbé megtartott, de a májsejtek helyét tumorsejtek foglalják el. A második és harmadik típusú metasztázis növekedése során a máj szerkezete torzul, a tumorsejtek komprimálják a májszövetet, illetve nagy mennyiségű kötőszövet halmozódik fel a metasztázisok perifériáján.

A „pushing” típusú metasztázisok vaszkularizációjára egy új mechanizmust írtunk le a C38 egér kolonrák tumorvonal esetében (XIV). A májszinuszoidokba bejuttatott tumorsejtek kezdetben avaszkuláris szolid fészkeket képeztek, melyek felszínén simaizom aktint kifejező sejtek jelentek meg. Ezzel párhuzamosan a májsejtek eltűntek a tumor felszínével szomszédos szinuszoidok közül, ami a szinuszoidok fúziójához vezetett. Ez a folyamat egy fordított intusszuszeptív angiogenezisnek is tekinthető.

A tumor szferoidoknak csak a felszíni 100 μ m-es rétegében voltak élő tumorsejtek. Az egyre növekvő méretű centrális nekrozis feltehetően megakadályozta, hogy a tumor

továbbra is gömb formában növekedjék, amely végül azt eredményezte, hogy a tumorban jellegzetes szerkezetű invaginációk keletkeztek. Az invaginációkat kívülről a tumor bazális membránja határolta, ennek közvetlen közelében a simaizom aktint expresszáló sejtekbe ágyazott fuzionált szinuszoidok helyezkedtek el, legfeljebb pedig májsejtek voltak találhatóak. Érdekes, hogy ezen májsejtek között szinuszoidok nem voltak megfigyelhetők, ami tovább erősíti annak lehetőségét, hogy a májsejtek kimigráltak a szinuszoidok közül és az invaginációk közepén torlódtak fel. Az invaginációknak a tumor centruma felé eső részén azonban már csak ritkán voltak májsejtek megfigyelhetők, itt a kapillárisok centrális pozíciót foglaltak el. Az invaginációk mélyülésével párhuzamosan feltehetően a tumor által kifejtett nyomás is nőtt, főleg az invaginációk alapjára, ami végül ahhoz vezetett, hogy az invaginációk belső része részlegesen elvált a környező májszövetből. A folyamat végül kötőszövetes oszlopok kialakulásához vezetett a tumorszövetben. Ezen oszlopokban, melyeket a tumor bazális membránja határol, simaizom aktint kifejező sejtek, nagy mennyiségű újonnan szintetizált kötőszöveti kollagén, valamint egy centrálisan elhelyezkedő kapilláris található. A képződött oszlopok azonban tengelyirányban összeköttetésben maradtak a máj szinuszoidális rendszerével, vérkeringés fennmaradására utal. Ez a jelenség azt is sejteti, hogy a metasztázisok vérellátása szinuszoidális, tehát főleg vénás eredetű.

Hasonlóan a korábban Lewis lung karcinóma esetében leírtakhoz **(IX)**, a C38 kolonrák esetében sem figyeltünk meg a tumorok közvetlen közelében elhelyezkedő szinuszoidokban emelkedett endotél proliferációt, ami kizárja, hogy érbimbózás folyna ebben a régióban. Tekintve azonban a máj szinte maximális vaszkularizáltságát megfelelő tér sem áll rendelkezésre az ilyen típusú angiogenezishez. Érdekes azonban, hogy mindkét tumor esetében megindult az endotélsejtek proliferációja az inkorporációt követően, bár a kialakult érszerkezet teljesen eltérő volt. A kolon karcinómában található oszlopokban felhalmozódott kötőszövet már elég teret biztosított a „sprouting” típusú angiogenezis beindulásához is.

Vizsgálataink arra utalnak, hogy a tumor differenciációs foka hatással lehet a májmetasztázisok vaszkularizációjára.. Alacsonyán differenciált tumorok „replacement” típusú növekedést mutatnak. Erre jó példa a Lewis lung karcinóma általunk korábban leírt szinuszoidális típusú metasztázisainak vaszkularizációja, melynek során a tumorsejtek a szinuszoidális bazális membránok mentén, a Disse térben migrálnak és leválasztják az endotélsejteket saját bazális membránjukról, aminek következtében kanyarulatot érrendszer alakul ki a metasztázisokban **(IX)**. Differenciáltabb tumorok „pushing” típusú növekedést mutatnak. Az érhalózat kialakulásában mindkét típusú növekedés során nagy szerepet játszik a módosult (fuzionált) májszinuszoidok inkorporációja, mely a primer melanómák és az agymetasztázisok esetében megfigyelt jelenségekkel együtt arra utal, hogy a gazdaszövet meglévő ereinek inkorporációja, függetlenül a gazdaszövetből, alapvető szerepet játszik a tumorok vaszkularizációjában.

Véleményünk szerint a kolon karcinóma esetében lezajló vaszkularizáció egy általános érvényű, minden a májban növekvő differenciált tumorra alkalmazható modell lehet.

4.2.2.4. Májmetasztázisok vérellátásának vizsgálata **(XV, XVI)**

A májmetasztázisok kezelésének napjainkban is elfogadott módszerei (intra-arteriális kemoterápia, embolizáció) azon az elven alapulnak, hogy vérellátásuk artériás eredetű. Olyan közlemények is napvilágot láttak azonban, melyek a portális véna szerepét hangsúlyozzák a májmetasztázisok vérellátásában. Korábban leírtuk a vaszkularizáció egy lehetséges folyamatát Lewis lung karcinóma esetében **(IX)** ami a fentebb ismertetett „pushing” típusú metasztázisok vaszkularizációja során tett megfigyeléseinkkel együtt azt mutatta, hogy a metasztázisokban található erek közvetlen kapcsolatban vannak a szinuszoidokkal. Ez a

jelenség azt sugallja, hogy a metasztázisok vérellátása szinuszoidális eredetű tehát a tumorok döntő többségükben kevert vért kapnak. Ezen megfigyelések lehetséges hatását a májmetasztázisok kezelésére egy levélben összegeztük, hangsúlyozva a portális rendszer szerepét a kemoterápiás szerek májmetasztázisokba történő eljuttatásában, mely közlésére sor is került, de a leírtak nagyobb visszhangot nem kaptak (XV).

Három tumorvonal esetében végeztük el a májmetasztázisok vérellátásának vizsgálatát (XVI). (Lewis lung karcinóma, C38 kolon karcinóma, A2058 humán melanóma). Miután a három tumor különböző növekedési mintázatot mutatott, kísérleteink során arra is választ kaptunk, hogy a tumor invazivitása milyen módon befolyásolja a metasztázisok vérellátását. Normál egér máj mikrovaszkulaturájának vizsgálata megmutatta, hogy nagyszámú anasztomózis található az artériás és a vénás rendszer között, valamint hogy az artériás rendszernek minden lebenykéhez általában egy csatlakozópontja van, mely a lebenyke alján helyezkedik el. Ezek a csatlakozópontok megtalálhatók mind a nagy portális ágak mentén, mind a periférián elhelyezkedő lebenyekék esetében. A korróziós készítményeken az artériákból a szinuszoidokba ömlő vér piramis formájú struktúrák alakjában jelenik meg, melyeknek csúcsa a centrális véna felé mutat. Hasonló struktúrákat írtak le korábban a portális rendszer feltöltése során, amelyeket mikrocirkulációs alegységeknek neveztek el (HMS, Hepatic Microcirculatory Subunit). Ennek alapján, a megfigyelt struktúrákat arteriális mikrocirkulációs alegységnek neveztük el (aHMS). A májmetasztázisokat vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a metasztázisok növekedésük során új erek képződése helyett a szinuszoidok fúzióját váltják ki (mely folyamatot az előző fejezetben ismertettünk), és ezek inkorporációja során alakul ki a tumorok érhálózata, függetlenül attól, hogy a tumor milyen növekedési mintázatot mutat. A folyamat során az arteriális HMS-ek szinuszoidjainak fúziója is bekövetkezik, ami végül az artériás rendszert határoló struktúrák destrukciójához és a metasztázisok arterializálódásához vezet. A metasztázisok elméletileg tehát egy lebenykének megfelelő méret elérése után már arterializálódnak. Adataink szerint azonban a metasztázisok 95%-a csak a 2mm-es méret elérése után arterializálódik, de ebben eltérések mutatkoznak a tumorok növekedési mintázatának és a növekedési sebességének megfelelően. Differenciált és/vagy lassan növekvő tumorok később arterializálódnak, de 2,5mm-es méret felett minden metasztázis elsődlegesen artériás ellátású. Az artériás ellátás kialakulása együtt jár a tumorba vezető artériák kitágulásával. Érdekes, hogy az 1800 μ m alatti metasztázisok 85-95%-át egyetlen artéria látja el és ezek az artériák nagyrészt a metasztázis centrumában helyezkednek el. Ennek a jelenségnek a hátterében feltehetően az áll, hogy a növekvő tumorok nem képesek, szemben a portális és centrális rendszer ágaival, a nagynyomású arteriális ágakat komprimálni illetve a tumor perifériájára szorítani. A metasztázis tágult véredényrendszere, amelyben feltehetően az arteriális nyomáshoz közeli nyomás uralkodik (prekapilláris záróizom szinuszoid fúzió során történő destrukciója) tulajdonképpen egy söntöt képez az artériás és vénás (centrális) rendszer között.

A fenti eredmények azt mutatják, hogy korábbi nézetünket felülvizsgálni szükséges, mert annak ellenére, hogy a máj szinuszoidális rendszere és a tumor vaszkulaturája között közvetlen kapcsolat van, a metasztázisok nem portális (szinuszoidális) ellátásúak. A szinuszoidok fúziójuk következtében csak a metasztázis véredényrendszerének kialakításában játszanak szerepet az arteriális HMS-ek inváziója elengedhetetlenül már nagyon korán a metasztázisok arterializációjához vezet. A metasztázis centrumában elhelyezkedő artéria következtében a vér feltehetően a metasztázisból kifelé a centrális vénák felé áramlik. Az intra-arteriális kemoterápiák létjogosultsága tehát megkérdőjelezhetetlen.

Összefoglalva tumor indukált angiogenezis tanulmányozása során tett megfigyeléseinket, azt mondhatjuk, hogy hatásos anti-angiogenezis vagy anti-vaszkuláris terápiák csak akkor lesznek kialakíthatók, ha minden fontos célszerv esetében sikerül feltérképezni az alapvető ereződési típusokat.

4.3. Metasztázisképzés

4.3.1. Sejtmigráció (XVII)

A tumorsejtek motilitási képessége alapvető szerepet játszik a metastázisok kialakulásában. A tumorsejteknek jelentős távolságot kell leküzdeniük, míg a primer tumorból eljutnak az első vér- vagy nyirokérig, ahol aztán át kell hatolniuk az érfalon (intravazáció). A célszervbe eljutva a kitapadás után újabb migráció, a kapilláris falon való áthatolás történik meg (extravazáció), végül a tumorsejt megtelepszik a célszerv kötőszövetében.

A sejtek kitapadása az extracelluláris mátrixhoz főképpen integrinek segítségével történik. In vitro ezeket a kitapadási helyeket fokális adhézióknak nevezik, melyek az integrinek erőteljes aggregációja következtében jönnek létre. A membrán citoplazma felőli oldalán található a fokális adhéziók azon komponensei (valamint számos más szignáltranszdukciós elem), melyek az integrinek és az aktin citoskeleton közötti összeköttetést biztosítják. A ma elfogadott és a tumorsejtek kétdimenziós migrációjára is érvényes modell szerint a sejtekben keletkező erő párhuzamos a mozgás irányával. Ez a modell azonban számos jelenséget nem tud magyarázni. 1. Tekintve a mozgó sejtek in vitro általánosan megfigyelt legyező formáját, nem világos, hogy mi lesz a sorsa azon nagyszámú adhézióknak, melyek a vezető lamella élén keletkeznek, és mint ismeretes stacionáriusak maradnak a szubsztráthoz képest, miközben a sejt elhalad felettük, hiszen a mozgó sejtek hátsó részén általában csak néhány adhézió található. 2. A sejtek kontraktilitását aktin kötegek biztosítják, melyek polarizáltan a fokális adhéziókban végződnek. A migráció során tehát a sejtek teljeseen át kellene rendezni a citoskeletonját ahhoz, hogy a sejt elején keletkezett adhéziókhoz tapadó aktin kötegek ellentétes irányultsággal tapadjanak ugyanezekhez az adhéziókhoz, amikor a sejt már elhaladt felettük. 3. A mozgó sejtekben gyakran figyelhetők meg aktin kötegek, melyek a sejt teljes hosszát áthidalják. Az adhézióknak a sejt hátulján történő megszűnésekor a vezető élén található adhézió is szükségszerűen megszűnik, hiszen az adhéziók létének feltétele, hogy a hozzájuk tapadó aktin kötegek feszültség alatt legyenek. Ez a jelenség jelentősen csökkentené a vezető lamella stabilitását.

Létezik azonban egy másik sejtmigrációs modell, melyet hal keratociták migrációjára dolgoztak ki. Ebben az esetben érdekes módon a legnagyobb erők a migráció irányára merőlegesek, de a mérések szerint a sejt mozgásáért kisebb közel sugárirányú erők felelősek. Ezek a sejtek a mozgásuk során félkör alakot vesznek fel melyet hosszabb idejű migráció során is fenn tudnak tartani. A mozgásukra kidolgozott kinematikai modell szerint (Graded Radial Extension, GRE modell), ahhoz hogy a sejtek a mozgás során félkör alakjukat megtarthassák, minden, a félkörön található pontnak az érintőre merőleges irányban kell elmozdulnia. Mivel ez az elmozdulás a sejt csúcsától az átmérő felé haladva a szubsztráthoz képest egyre kisebb, a vezető él minden pontja egy görbe vonalat ír le, míg a sejthez viszonyítva a pontok a sejt csúcsától a sejt egyenlítője felé mozognak.

Humán fibroszarkóma sejtek mozgását vizsgálva bazális membrán mátrix (Matrigél) felszínén egy érdekes jelenségre figyeltünk fel (XVII). Meglepő módon a kiterülést követően a tumorsejtek a hal epidermisz sejtekhez hasonlóan mozogtak. Mozgó sejtek fokális adhézióit tanulmányozva azt figyeltük meg, hogy adhéziók csak a vezető élén, egy-két sorban, félkör alakban, az sejt peremére merőlegesen helyezkedtek el. Ezek az adhéziók tartalmaztak minden, a fokális adhéziókra jellemző komponenst, (vinkulin, talin, FAK, $\alpha 6$ integrin), ami nem támasztja alá az adhéziók korábban feltételezett érési folyamatát a sejtmigráció során.

GFP-vinkulint kifejező humán fibroszarkóma sejtek fluoreszcens video mikroszkópiával történő vizsgálata azt mutatta, hogy az adhéziók a sejtmigráció során a GRE

modellnek megfelelően előre és oldalra haladnak, majd elérve a sejt egyenlítői régióját a sejt belseje felé kezdenek csúszni a szubsztrát felszínén, végül eltűnnek a sejtben. Ezzel szemben az adhéziók a vezető élen diszkrét pontok formájában keletkeztek néhány mikrométerre a már meglévő adhéziósor előtt. A mozgó sejtek aktin citoskeletonját vizsgálva azt figyeltük meg, hogy a nagyobb aktin kötegek a mozgásirányra merőlegesek, de enyhén ívelt formájúak voltak. (homorú oldaluk mutatott a mozgás irányába). Miután az aktin kötegek a sejt szélén elhelyezkedő fokális adhéziókhoz tapadnak, és azokon keresztül fejtenek ki erőt a szubsztrátra, a megfigyelt ívek összehúzódása nagyon hatékonyan képes előre mozgatni a sejttestet, amihez hozzájárul az is, hogy adhéziók nem voltak megfigyelhetők a sejttest alatt. A mozgás során az aktin kötegek ívelt formája a sejtmag tehetetlenségéből eredő ellenőrző következtében alakulhat ki. A modellünk szerint a sejt csúcsán mindig újabb adhéziók és aktin kötegek képződnek, mely utóbbiak folyamatosan nőnek, ahogy a sejt előre halad. Az aktin kötegek elrendeződése arra utal, hogy a szubsztrátra kifejtett erő közelítőleg sugár irányú, és ezen erők eredője felelős a sejt mozgásáért. Modellünk egyszerűen képes magyarázni a fibroblasztok mozgására kidolgozott modell által felvetett problémákat. 1. Az adhéziók a vezető élen állandóan újraképződve, GRE modell által megadott utat követve jutnak el a sejt két széléig. 2. Az aktin kötegek irányultságának hirtelen nagymértékű megváltozására nincs szükség, hiszen az adhéziók folyamatosan újraképződnek a vezető élen miközben orientációjuk feltehetően az aktin ívek által kifejtett egyre növekvő erő hatására folyamatosan változik (0-90 fok). 3. Az adhéziók egyszerre bomlanak le egy-egy aktin köteg végén (melyek már elérték a sejt egyenlítői vonalát), melynek következtében az egész aktin köteg is lebomlik. Ez a folyamat nincs hatással a lamella többi adhéziójának és aktin kötegének stabilitására.

4.3.2. Extravazáció és szervpreferencia (XVIII, XIX)

A szervpreferencia problémájának vizsgálatára már a 80-as évek elejétől kezdve próbáltak olyan sejt- és tumorvonalakat kialakítani melyek szervpreferenciát, illetve magas metasztatizáló képességet mutattak. Ezek segítségével számos tényezőt (sejtheadhéziót, migrációt illetve proliferációt befolyásoló faktorok) sikerült ugyan azonosítani, de csak néhány olyan fehérjét illetve gént sikerült izolálni, melyek szerepet játszanak a szervpreferencia kialakulásában. A területen végzett kutatásoknak újabb lendületet adhat Ruoslahti és munkacsoportjának kutatási stratégiája, melyben fág könyvtárakban expresszált peptidok különböző szervek endotélsejtjeihez való kitapadását vizsgálják *in vivo*. Ennek a módszernek a segítségével sikerült izolálni egy emlőráksejtek felszínén található proteint, a metadherint, mely felelős a tüdőmetasztázisok kialakulásáért. Sajnos az endotélsejtek felszínén található ligandját még nem sikerült izolálni. Egyéb, a tüdő- és csontmetasztázisok kialakulását meghatározó receptor-ligand párokat is azonosítottak már, melyek közül a tüdő endotélsejtjeinek felszínén található CD26-nak (a molekula enzimatis aktivitásától függetlenül köti a tumorsejtek felszínén található fibronektint), CLCA-1-nek (klór csatorna fehérje, mely a tumor sejtek felszínén található $\alpha 4$ integrint köti) illetve a CXCR4 kemokin receptor ligandjának a SDF-1-nek a szerepét sikerült bizonyítani a metasztázisképzés folyamatában.

A tumorsejtek extravazációját tekintve az általánosan elfogadott nézet, hogy azok a limfocitákhoz hasonlóan, tekintet nélkül a célszerv endotélsejtjeinek szerkezetére egy lépésben hatolnak át az endotélsejteken és a bazális membránon. A helyzet azonban ennél sokkal összetettebb, hiszen már a neutrofil leukociták is ettől eltérő módon extravazálnak. A tumorsejtek esetében a helyzet pedig még árnyaltabb, hiszen az irodalomban található adatok szerint különböző tumorvonalak tüdőben történő extravazációját vizsgálva a fentebb

említetten kívül a tumorsejtek a kötőszövetbe való kijutásának még legalább háromféle módja ismeretes. Ezek a következők: 1/ a tumorsejtek intravaszkuláris szaporodása, amely folyamat végül az ér destrukciójához vezet, 2/ az endotélsejtek retrakcióját követően a tumorsejttel érintkező bazális membrán számos tumorsejt nyúlvány által történő fragmentációja, amely szintén a kapilláris destrukciójához vezet, 3/ a tumorsejtek endotelizációja (endotélsejtekkel történő befedése) és az azt követő áthatolás a bazális membránon.

Mi a Lewis lung tumorvonal extravazációját vizsgáltuk ultrastrukturálisan, amelynek során kimutattuk, hogy különböző szervekben (máj, tüdő, mellékvese, vese, agy) a tumorsejtek extravazációja eltérő módon (szervspecifikusan) zajlik le **(XVIII)**. A tumorsejtek endotelizációja történik meg tüdőben, májban és részben vesében, míg a tumorsejtek egyszerre hatolnak át az endotéliumon és a bazális membránon a mellékvesében és az agyban. Az endotelizáció folyamatának kezdeti lépésében az endotélsejtek az apikális felszínükről nyúlványokat bocsátanak ki, melyek a tumorsejtek felszínéhez tapadnak. Ezt követően a nyúlványok növekedése valamint az endotélsejtek retrakciója következik be, mely folyamat a tumorsejtek endotélsejtekkel történő teljes befedéséhez vezet. Ekkor azonban már az endotélsejtek bazális felszíne érintkezik a tumorsejtekkel, jelezve, hogy a nyúlvány növekedése során a tumorsejtekkel kapcsolatban levő plazmamembrán polaritásváltása történik meg (apikális-bazális). Az endotelizáció fentebb ismertetett folyamata arra utal, hogy az endotélsejtek sokkal aktívabb szerepet játszanak az extravazáció folyamatában, mint korábban gondoltuk.

Az LLT-HH tumorsejtek endotelizációját követően a tüdőben a bazális membrán lokális degradációja következett be. A tumorsejtek a keletkezett 1-2 μm -os kis résen keresztül a kötőszövetbe migráltak. A máj szinuszoidjaiban nem található jól strukturált bazális membrán, egyes komponensek amorf formában vannak jelen a májsejtek mikrovillusai között (Disse tér). Itt nem is figyeltük meg a tüdő, a mellékvese és az agy esetében előforduló jellemző morfológiájú a bazális membrán kis résén átmigráló tumorsejteket. Ehelyett itt a tumorsejtek az endotelizáció után alakváltoztatás nélkül mintegy belesüllyedtek a májsejtekbe **(XVIII)**.

Korábban kimutattuk az intézetünkben izolált magas metasztatizáló képességű Lewis lung tumorvonal úgynevezett „látens” májpreferenciáját. A kifejezés arra utal, hogy a szervpreferencia csak az arteriális rendszerbe történő oltást követően nyilvánult meg. A metasztázisok látszólag ebben az esetben is a mechanikus elméletnek megfelelően az első elért szerv(ek)ben képződnek, azonban különösen a májban, de a mellékvesékben is, a lökettér fogati arányokat messze meghaladó gyakorisággal alakultak ki metasztázisok. Ezzel szemben, a tumorvonal agy, de izom, bél, bőr esetében is negatív preferenciát mutatott. Mint fentebb említettük a metasztázisképzés hatékonysága nagyon alacsony, amelynek fő oka a tumorsejtek mechanikus és immunológiai hatásokra bekövetkező pusztulása lehet, így döntő jelentőséggel bírhat, hogy a tumorsejtek mennyi időt töltenek el ellenséges környezetben az extravazációt megelőzően. Vizsgálataink azt mutatták, hogy az extravazáció a leghamarabb a májban és a mellékvesékben zajlik le (6 óra) mely szervekre pozitív preferencia mutatkozik, míg a leghosszabb időt a kapillárisokban a tumorsejtek az agyban töltik, mely szervre a tumorvonal negatív preferenciát mutat. Miután az extravazáció módja (endotelizáció vs. direkt áthatolás az endotélsejteken és a bazális membránon) és a szervpreferencia között nem volt összefüggés azt mondhatjuk, hogy a szervpreferencia kialakulásában az extravazáció sebessége lehet az egyik meghatározó tényező **(XVIII)**.

A szervpreferencia lehetséges okait vizsgálva, ellentétben számos más korábbi vizsgálattal, nem találtunk összefüggést a tumorvonal szervkolonizációs képessége és a különböző szervekből származó kemotaktikus faktorok által kiváltott migráció között. Hasonlóképpen nem volt összefüggés a tumorvonal fagyasztott metszetekhez való adhéziós képessége és a májpreferencia között. Megfigyeltük azonban, hogy a tumorsejtek a különösen

májból származó fagyasztott metszetek esetében előszeretettel tapadtak az erekhez. A metszetek részletes elektronmikroszkópos vizsgálat kimutatta, hogy a tumorsejtek a portális venulák és szinuszoidok bazális membránjához tapadtak **(XIX)**. Ez a jelenség felvetette annak lehetőségét, hogy az erek bazális membránja szerepet játszhat a szervpreferencia kialakulásában. Ennek részletesebb vizsgálatára különböző bazális membrán komponensek elleni antitestekkel (perlekán, laminin, fibronectin) kezeltünk egereket intravénásan, majd a szív bal kamrájába oltottuk a májpreferenciát mutató LLT-HH tumorsejt vonalat. Azt tapasztaltuk, hogy bár mindhárom antitest csökkentette a vese, illetve a laminin és fibronectin elleni antitestek a tüdő kolonizációját is, a májmetasztázisok kialakulását csak a perlekán elleni antitest volt képes jelentősen gátolni. Tovább vizsgálva a kérdést megállapítottuk, hogy az egerek májából izolált nagy molekulású proteoglikán frakció nem fejt ki kemotaktikus hatást a tumorsejtekre. Ezzel szemben perlekán elleni antitest gátolta a tumorsejtek adhézióját a májból izolált proteoglikánhoz. Ultrastrukturális vizsgálataink azt mutatták, hogy a szinuszoidokban elakadt tumorsejtek az endotélsejtek fenestrációján keresztül nyúlványokat bocsátanak a Disse térbe, ahol nagy mennyiségű perlekán található **(XVIII)**. Ezt nem követi ugyan a tumorsejtek migrációja, de a jelenség szerepet játszhat a tumorsejtek specifikus kitapadásában vagy specifikus növekedési szignálok közvetítésében.

5. Új eredmények.

1. A patkány máj epeút rendszerének egy új, CK7-/CK19+ kompartmentjét írtuk le, mely magába foglalja a Hering kanálisokat is, és a legnagyobb valószínűséggel tartalmazza a máj őssejtjeit. Humán májban ezek a struktúrák CK7 pozitívak, benyúlnak a vaszkuláris szeptumba, ahol arteriolák kísérik őket. Fenotípusuk: EMA-, CD56+, CD133+.

2. Az ovális sejtek által képzett struktúrák a Hering kanálisok meghosszabbításának tekinthetők. Az ovális sejtek proliferációjuk és migrációjuk során folyamatosan bazális membránt szintetizálnak és megtartják polarizált állapotukat. Az általuk alkotott csőrendszert funkcionális kapcsolatot biztosít a hepatociták és az epeút rendszer portális térben elhelyezkedő elemei között.

3. Az ovális sejtek nem fejezik ki a Thy-1 (CD90) hemopoetikus őssejt markert, tehát megjelenésükben transzdifferentiáció nem játszik szerepet. Thy-1-t a máj miofibroblasztjai expresszálják.

4. Az ovális sejtek májsejteké történő differenciálódása két, hisztológiailag jelentősen eltérő módon mehet végbe, a sejt szintű események - melyek legfontosabb jellemzője a bazális membrán eltűnése illetve a HNF4, májsejtspecifikus transzkripciós faktor megjelenése - azonban megegyeznek a két folyamat során. Az ovális sejtek differenciálódása primer hepatocita mitogén kezeléssel elősegíthető.

5. Kimutattuk, hogy a humán és kísérletes melanómák beereződése a tumor felszínén képződött kapilláris hálózat bekebelezésével megy végbe, ami a kapilláris denzitás csökkenéséhez és az erek méretének növekedéséhez vezet a tumor centrum irányában. Humán melanómák esetében az intratumorális érdenzitás bír prognosztikus jelentőséggel.

6. Az intusszuszeptív angiogenezis egy új formáját írtuk le, melynek során a „pillar” képződés első lépése endotélsejt hidak kialakulása az ér lumenében majd kötőszöveti kollagén kötégek transzportja az érlumenen keresztül az endotélsejtek segítségével.

7. A glomeruloid test képződés egy új formáját írtuk le agyi mikrometasztázisok esetében. A folyamat során érdenzitás növekedés a tumorban jelentősebb endotélsejt proliferáció nélkül, az agy meglévő kapilláris rendszerének a tumorsejtek által előidézett átrendeződésével megy végbe.

8. Kimutattuk, hogy kísérletes agymetasztázisok környezetében nem zajlik angiogenezis, a tumorok érhálózatukat kizárólag a már meglévő erek inkorporációjával hozzák létre.

9. A vaszkularizáció egy új formáját írtuk le jól differenciált kísérletes kolonrák májmetasztázisainak esetében. A folyamat lényege a tumor felszínén keletkező fuzionált szinuszoidok inkorporációja.

10. Kimutattuk, hogy a kísérletes májmetasztázisok artériás vérellátásra tesznek szert 2mm-es tumor méret felett. Az arterializálódás folyamata a májlebenyekék arteriális mikrocirkulációs alegységét felépítő szinuszoidok fúziójának és az ezt követő inkorporációjának következtében alakul ki.

11. A sejtmozgás egy új mechanizmusát írtuk le in vitro. A sejt folyamatos mozgását a vezető élen folytonosan megújuló, de a mozgás során ív formában haladó adhézión pontokhoz kapcsolódó konkáv aktin kötegek biztosítják.

12. Kimutattuk, hogy az extravazáció folyamata szervfüggő lehet. Az extravazáció sebessége, nem módja függ össze a szervpreferenciával.

13. Kimutattuk, hogy a Lewis lung karcinóma májpreferenciája mögött legnagyobb valószínűséggel a tumorsejtek szinuszoidok heparánszulfát proteoglikánjához történő specifikus adhézión áll.

6. Az értekezéshez felhasznált saját közlemények

6.1. Májregeneráció

I. Paku S, Dezső K, Kopper L, Nagy P. Immunohistochemical analysis of cytokeratin 7 expression in resting and proliferating biliary structures of rat liver. *Hepatology* 42: 863-870. 2005.

IF: 9, 792

II. Dezső K, **Paku S**, Papp V, Turányi E, Nagy P. Architectural and immunohistochemical characterization of biliary ductules in normal human liver.

Stem Cells Dev. 18: 1417-22. 2009

IF: 4,146

III. Papp V, Dezső K, László V, Nagy P, **Paku S**.

Architectural changes during regenerative and ontogenic liver growth in the rat.

Liver Transplantation 15: 177-183. 2009.

IF: 3,751

IV. Paku S, Schnur J, Nagy P, Thorgeirsson SS. Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver.

Am J Pathol. 158:1313-1323. 2001.

IF: 7,103

V. Dezső K, Jelnes P, László V, Baghy K, Bődör C, **Paku S**, Tygstrup N, Bisgaard H.C, Nagy P. Thy-1 is expressed in hepatic myofibroblasts and not oval cells in stem cell-mediated liver regeneration.

Am J Pathol 171:1529-1537. 2007.

IF: 5,796

VI. Paku S, Nagy P, Kopper L, Thorgeirsson SS. AAF-dose dependent differentiation of oval cells into hepatocytes: confocal and electron microscopic studies.

Hepatology 35: 1353-1361. 2004.

IF: 10,416

VII. László V, Dezső K, Baghy K, Papp V, Kovalszky I, Sáfrány G, Thorgeirsson SS, Nagy P, **Paku S**.

Triiodothyronine accelerates differentiation of rat liver progenitor cells into hepatocytes.

Histochem Cell Biol. 130:1005-14. 2008.

IF: 2,320

6.2. Angiogenesis

VIII. Döme B, Hendrix MJC, **Paku S**, Tóvári J, Tímár J.

Alternative vascularization mechanisms in cancer.

Am J Pathol 170: 1-15. 2007.

IF: 5,796

IX. Paku, S.: Current concepts of tumor-induced angiogenesis.

Pathol Oncol Res 4: 62-75. 1998.

X. Döme B, **Paku S**, Somlai B, Timar J. Vascularization of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance.

J Pathol. 197: 355-62. 2002.

IF: 4,563

XI. Paku S, Dezső K, Bugyik E, Tóvári J, Tímár J, Nagy P, László V, Klepetko W, Döme B. A new mechanism for pillar formation during tumor-induced intussusceptive angiogenesis.

Am J Pathol 179: 1573-1585. 2011.

IF: 5,224

XII. Döme B, Timar J, **Paku S**. A novel concept of glomeruloid body formation in experimental cerebral metastases.

J Neuropathol Exp Neurol 62: 655-661. 2003.

IF: 5,005

XIII. Bugyik E, Dezső K, Reiniger L, László V, Tóvári J, Tímár J, Nagy P, Klepetko W, Döme B, **Paku S**. Lack of angiogenesis in experimental brain metastases.

J Neuropathol Exp Neurol 70: 979-991. 2011.

IF: 4,190

XIV. Paku S, Kopper L, Nagy P. Development of the vasculature in “pushing-type” liver metastases of an experimental colorectal cancer.

Int J Cancer 115: 893-902. 2005.

IF: 4,700

XV. Paku, S., Bodoky, G., Kupcsulik, P., Tímár, J.: Blood supply of tumor metastatic hepatic tumors: suggestions for improved delivery of chemotherapeutic agents.

J Natl Cancer Inst 90: 936-937. 1998. (letter)

XVI. Dezső K, Bugyik E, Papp V, László V, Döme B, Tóvári J, Tímár J, Nagy P, **Paku S**. Development of Arterial Blood Supply in Experimental Liver Metastases.

Am J Pathol. 175: 835-843. 2009.

IF: 5,673

6.3. Sejtmozgás, szervpreferencia

XVII. Paku S, Tóvári J, Lőrincz Zs, Timár F, Döme B, Kopper L, Raz A, Timár J. Adhesion dynamics and cytoskeletal structure of gliding human fibrosarcoma cells: a hypothetical model of cell migration.

Exp Cell Res 290: 246-253. 2003.

IF: 3,949

XVIII. Paku S, Döme B, Toth R, Timar J. Organ-specificity of the extravasation process: an ultrastructural study.

Clin Exp Metastasis.18:481-92. 2001.

IF: 1,966

XIX. Tóvári, J., Paku, S., Ráso, E., Pogány, G., Kovalszky, I., Ladányi, A., Lapis, K., Timar, J. Role of sinusoidal heparan sulphate proteoglycan in liver metastasis formation.

Int. J. Cancer 71: 825-831. 1997.

IF: 3.362

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom az Isz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet valamennyi igazgatójának, Lapis Károlynak, Szende Bélának, Kopper Lászlónak, valamint Matolcsy Andrásnak, hogy biztosították a számomra a szabad és önálló tudományos munkavégzés feltételeit. Közülük is kiemelném Lapis Károlyt, aki közel 30 éve a morfológiai vizsgálatok és metasztázis kutatás felé terelte figyelmemet és Kopper Lászlót, aki az akadémiai munkacsoport megszűnte után lehetővé tette, továbbra is az intézetben folytathassam tudományos munkámat. Köszönettel tartozom Schaff Zsuzsának, akinek a laborjában az elektronmikroszkópos technikákat elsajátítottam.

Közvetlen munkatársaim közül kiemelném Nagy Pétert, akivel a májregeneráció, illetve Döme Balázst, Tímár Józsefet és Tóvári Józsefet, akikkel az metasztázisképzés és az angiogenezis témakörben dolgoztam együtt és még remélhetőleg a jövőben is együtt fogok dolgozni.

Köszönettel tartozom Neidhard Paweletz-nek, Avraham Raz-nak és Alex Eberle-nek akiknek a laborjában sok hasznos tudományos tapasztalattal gazdagodtam.