

## Opponensi vélemény

**Dr. Paku Sándor** "*A májregeneráció és a daganatos áttétképzés tanulmányozása morfológiai vizsgálmódszerekkel*" című MTA akadémiai doktori disszertációjáról

Dr. Paku Sándor a Semmelweis Egyetem I. Számú Patológiai és Kísérletes Rákkutató Intézetében dolgozik, ahol évtizedek óta magas szintű és sokrétű daganatkutatás folyik. A Jelölt két eltérő területtel foglalkozik, a májregeneráció és a daganatos áttétképzés témájával. A májregeneráció nemcsak a súlyos májkárosodás gyógyítása szempontjából fontos, hanem az őssejtek vonalán elméletileg kapcsolható a daganatképződéshez is. Az angiogenezis és metasztázis képződés pedig igen fontos és aktuális téma a daganatkutatásban. A májregeneráció és a daganatkutatás nemcsak elméleti síkon mutat összefüggést. Az alkalmazott finom funkcionális morfológiai módszerek hasonlóak a kicsiny epiteliális és endoteliális csövecskék tanulmányozásában, különös tekintettel a bazális membránokra. A Jelölt a legdisztálisabb epeutakat és a kapilláris és szubkapilláris ereket tanulmányozza.

Formailag:

A disszertáció tömör szerkezetű, az irodalommal együtt 55 oldal terjedelmű. A finomabb részletek a disszertációval bekötött 19 angol nyelvű közleményben lelhetők fel. A közlemények összesített impakt faktora 64 felett van. Összesen 53 közleményt idéz.

A bevezetés világos, megfelelő terjedelmű. A célkitűzések konkrét kérdéseket tartalmaznak, tömör megfogalmazásban. Az anyag és módszer fejezetben a májregeneráció és a metasztázis képződés részben alkalmazott módszereket nem választja külön, hanem állatkísérletek és morfológiai módszerek csoportosításban sorolja fel őket. Az eredmények és megbeszélés a mellékelt közlemények sorrendjében, azoknak megfelelő tagoltságban 3 fejezetben és 3, 6 ill. 2 alfejezetben vannak tárgyalva.

Tartalmilag a Jelölt a következő új eredményekről számol be:

— Alapvető különbség van a patkány és humán máj szerkezetében. A patkány disztális epeútjai CK7 negatívak, a nagyobb epeutak CK7 pozitívak. A disztális epeutakhoz tartoznak a Hering csatornák. Emberben ezek CK7 pozitívak és ez alkalmas az epeúthám és a hepatociták elkülönítésére.

— Hepatektómiát követő regenerációban új májlobulusok nem keletkeznek, csak a már meglévő lebenyek mérete növekszik. Ha a májsejtek osztódását 2-acetaminofluorennel (AAF) gátoljuk, a regeneráció őssejtek, ovális sejtek felszaporodásával indul el, melyek később bazális membránjukat elvesztve májsejteké differenciálódnak. Az ovális sejtek sorsának követését retrovírus jelöléssel végezték el. Az ovális sejtek nem expresszálják a THY-1 (CD 90) hemopoetikus őssejt markert, ebből is arra következtetnek, hogy nincs szó hemopoetikus őssejt transzifferenciálódásáról. A májsejt regeneráció a máj eredeti szerkezeti elemeinek felhasználásával történik.

— Malignus tumorok vérellátásában többféle mechanizmus szerepelhet. Az alternatív vaszkularizációs mechanizmusok közül jelentős fokú kötőszöveti strómával bíró tumoroknál az ér-bimbózás jellemző. Jelölt felhívja a figyelmet egy olyan sajátosságra,

mely a korábbi Folkmann modellnél nincs említve. Nevezetesen arra, hogy a bimbózás kezdetén, a fokális kapilláris bazálmembrán degradáció után, a migráló endotelsejtek megtartják polarizált állapotukat. A sejtkapcsoló struktúrák nem bomlanak fel. Az endothel sejtek egymással párhuzamosan migrálnak, köztük egy résszerű lumen van, mely folytonos az eredeti érlumennel. Az éretlen kapilláris növekedésével folyamatosan képződik a bazális membrán.

— Humán melanómákban megfigyelték, hogy a túlélés az intratumorális érdenzitással mutatott szoros összefüggést. A humán melanómákban megfigyelt érelaszítás vizsgálatára kialakítottak egy humán viszonyokat hűen visszaadó egérmodellt, melyben a tumorsejteket intrakután oltották. Ebben a modellben a tumor centruma felé irányuló, radiális lefutású kapillárisokat nem találtak. Azt látták, hogy a növekvő tumor a bőr eredetileg meglévő ereit az újonképzett kapillárisokkal együtt bekebelezi, inkorporálja. A tumorban megszűnik az erek bimbózása.

— Egerekbe szubkután oltott colon rákok esetében nincs bimbózó angiogenesis. Ezzel szemben egy különös intosuszeptív angiogenesis formát ír le, melynek során kollagén rostkötegek endothel sejtek segítségével való áthúzását tapasztalta az érlumenen keresztül.

— Agyi metasztatizisokban számos különböző eredetű tumor megegyező szerkezetű glomeruloid testeket hoz létre. A glomeruloid testek - jelentősebb endothel proliferáció nélkül - az agy meglévő kapilláris rendszerének a tumor sejtek általi átrendeződésével jönnek létre.

— A közvetlenül agyszövetbe oltott tumorok peritumorális területein nem zajlik angiogenesis, a tumorok a meglévő erek bekebelezésére szorítkoznak.

— A pushing típusú májmetasztázisok vaszkularizációjánál egy új mehanizmust ír le C38 egér colonrák esetében. A folyamat lényege a tumor felszínén keletkező fuzionált sinusoidok bekebelezése a tumorba. A metasztatizisok vérellátása sinusoidális, tehát vénás eredetű. Kiemeli ebben a folyamatban a simaizom aktint expresszáló, intersticiális kollagént szintetizáló sejtek felszaporodását, melyeket myofibroblasztnak vagy aktivált Ito sejteknek tekint. Ezeket a sejteket a jelölt potenciális terápiás célpontnak tartja.

— Bár korábbi vizsgálataiban azt találta, hogy a Lewis tüdőkarcinóma pushing típusú májmetasztázisai vérellátásukat a sinusoidok fúziójával alakítják ki, a 2 mm-t meghaladó méret felett a sinusrendszer és az artériás rendszer között shunt-ok kialakulását figyelték meg, melyek által a metasztatizisok arteriális ellátásúak lesznek. Ez a sajátosság az intra-arteriális kemoterápiák létjogosultságát támogatja.

— A tumorsejtek mobilitási képessége alapvető szerepet játszik a metasztatizisok kialakulásában, különös tekintettel az intravazáció és extravazáció folyamatára. A Jelölt a bazális membránok felszíne mentén történő migrációt tanulmányozta HT1080 humán fibrosarkoma sejteken, matrigel felszínen egy konfokális mikroszkóprendszerrel és immunfluoreszcenciával. Élő sejteken a vinculin eloszlását GFP- vinculin constructio transzfekcióját követően vizsgálták. Az ún. graded radial extension modellnek megfelelő migráció egy új mechanizmusát írták le. A sejtmembránon lévő fokális adhéziónak előre és oldalra haladnak, folyamatos megújulás mellett. Az adhéziónak kapcsolódó ívelt aktin kötegek biztosítják a sejt mozgását.

— A Lewis tüdődőtumor extravazációját különböző szervekben szervspecifikusan eltérően találták ultrastrukturális vizsgálatokkal. Tüdőben és májban endothelizációs mechanizmust tapasztaltak, míg a tumor egyszerre halad át az endotheliumon és bazális membránon mellékvesében és agyban. Az tapasztalta, hogy a tumor szervpreferenciájának kialakulásában nem az extravazáció módja, hanem annak sebessége

döntő.

— A májmetasztázizálást preferáló tüdőkarinoma sejtek affinitást mutatnak a szinuszoidális bazális membránokhoz. Különböző anti-bazálmembrán antitestekkel való előkezelés után csak az antiheparán szulfát proteoglikán- ellenes antitestek gátolták a tumorsejt kolonizációt. Az antiheparán szulfát proteoglikán antitestekkel végzett immunfluoreszcencia a szinuszok és vérerek bazális membránját jelölte meg.

A disszertációval kapcsolatban a következő kérdések merülnek fel:

1. A Jelölt az EMA-/CD56+/CD133+ immunfenotípust is leírja patkány epeductulusaiban, de ezt humán vonatkozásban direkt módon nem tárgyalja. Annyit mond, hogy különböző életkorú patkány és humán májminták vizsgálatával megállapították, hogy ez az immun fenotípus az újszülöttek májában még nem alakult ki, hanem posztnatálisan megy végbe. Kérdés, hogy az eredetileg haemopoeticus őssejt markernek leírt CD133 jelen van-e az emberi máj disztális epeútjaiban? Mivel CD133 pozitív sejteket humán hepatocellularis és kolangiocellularis karcinómákban több szerző kimutatott, jó lenne tudni, hogy van-e egy lokális progenitorsejt forrás az emberi májban?
2. Ismert, hogy kapilláris bimbózásban a vascularis endothelialis növekedési faktor játssza a legfontosabb szerepet. Viszont a kapilláris bimbózás tumorok belsejében nem igazán működik. A Jelölt bőr melanoma belsejében a bimbózás megszűnését a megfelelő extracelluláris mátrix hiányával magyarázza, és kiemeli a I. típusú kollagén hiányát. Mennyire lehet ezt a speciális kollagén típust kiemelni? Más kollagén típus is megfelelő környezet a kapilláris-bimbózáshoz?
3. Milyen kollagén típus szerepel az inverz bimbózásnak is nevezhető intususceptív angiogenesis Jelölt által leírt formájában, egérben szubkutan oltott colon rák esetében?
4. Milyen típusú kollagént termelnek a simaizom aktint expresszáló sejtek májba juttatott kolorektális karcinoma sejtek pushing típusú metastázisaiban?
5. Lehetnek-e antivaszkuláris terápia célpontjai az endothel sejteken kívül más extracelluláris mátrix-termelő sejtek?

Összefoglaló értékelés:

A Jelölt fontos témákkal foglalkozik, és igényes módszerekkel számos új megfigyelést tesz. Magam részéről elfogadom a Jelölt által újnak tartott eredményeket. A Jelölt magas fokú tudományos kutatási színvonalát a témában megjelent dolgozatok száma és magas összesített impakt faktora bizonyítja.

A disszertációt vitára alkalmasnak tartom, és azt a bizottságnak elfogadásra, az MTA doktori cím megadására javaslom.

Debrecen, 2013. június 10.

Dr. Nemes Zoltán  
az MTA doktora