

Bírálat

Paku Sándor: „A májregeneráció és a daganatos áttétképzés tanulmányozása morfológiai vizsgáló módszerekkel” c. MTA doktori pályázatáról.

Az utolsó évtized kutatásaiban a molekuláris biológiai módszerek kiterjedt alkalmazásának vagyunk tanúi, nem szólva a genetikai ismeretek robbanásszerű növekedéséről. Ez a medicinában is a diagnosztikai és terápiás lehetőségek bővülésével járt. Ugyanekkor, - amint arra a Pályázó is rámutat, - a morfológiai vizsgálatok háttérbe szorultak, szerepük kevésbé hangsúlyozott, pedig a különböző betegségekben zajló folyamatok természetének megismerésében, és az elkülönítő kórismézésben is, a morfológiai háttér tisztázása ma is meghatározó. Ezért értékes az a másfél évtizedes kutatói munkásság, amely *Paku Sándor* MTA doktori pályázatának alapját képezi, s amely a májregeneráció és daganat áttétképződés terén a morfológiai vizsgálatok jelentőségét illusztrálja.

A doktori pályázat **tézises összefoglalója** 44 oldal szöveges részt és 53 irodalmi hivatkozást tartalmaz, ehhez csatlakozik az alapul szolgáló **19 angol nyelvű dolgozat** eredeti formájában és terjedelmében. A kutatási eredményeket a Szerző magas színvonalú lektorált nemzetközi folyóiratokban kitűnően dokumentáltan publikálta, ezek összimpaktfaktora 64.235.

A pályázat szöveges része 7 fejezetre tagolódik, (bevezetés, célkitűzések, anyag és módszer, eredmények, új eredmények, saját közlemények és az irodalomjegyzék).

A mivel tézisszerű összefoglalásról van szó, a megállapítások irodalmi hivatkozásra való utalást nem tartalmaznak, ezek csak a csatolt közleményekben található meg.

A *bevezetésben* a Pályázó hangsúlyozza a májregeneráció mechanizmusait illetően a máj őssejtekre vonatkozó ismeretek fontosságát, és tárgyalja a malignomák metasztázisképzésével kapcsolatos elméletek, valamint a tumor indukálta angiogenesis jelentőségét.

A *célkitűzésekben* a májregenerációval összefüggésben az interlobularis epeutráteret jellemzése, a máj szerkezetének helyreállításának módja és az őssejtek lokalizációjának kérdése, a metasztázisképzést illetően pedig a tumor indukálta angiogenesisformák, a tumorsejtek motilitása és a szervpreferencia vizsgálata szerepel.

Az *anyag és módszer* c. rész egy oldalon vázlatos felsorolást ad az *in vivo* és *in vitro* kísérletekről, a regenerációval, az ovális sejtek szerepével, az angiogenezissel és metasztázisképzéssel kapcsolatban. A morfológiai megfigyelések többsége immunfluoreszcens vizsgálatokon alapul, konfokális, elektron- és scanning elektronmikroszkópot is alkalmazott. A metodikai részletek után érdeklődő azokat a csatolt eredeti közleményekben találhatja meg.

Az *eredmények és megbeszélés* fejezetben a *májregenerációval* kapcsolatban mindenképp előtérbe hozta az epeutráteret szerkezetét és immunfenotípusát vizsgálta. Megállapította, hogy az *emberi májban* az epeutráteret sejtek CK19/CK7 pozitívak, az epeutráteret nem lépnek be a lebenyek állományába, viszont közelükben arteriolák jelenlétére utaló strukturák igazolhatók.

A májregeneráció tanulmányozásához *új módszert* dolgozott ki a májlebenyek méretének objektív vizsgálatára. Ezt alkalmazva igazolta, hogy a máj fiziológiai növekedése az egyedfejlődés születést követő fázisában új lebenyek képződésével, azok fokozatos növekedésével, a hepatocyták megnagyobbodásával jár. Ezzel szemben, a hepatektómia utáni regeneráció során új lebenyek nem képződnek, hanem a meglévők

mérete növekszik. Ezek szerkezete bonyolultabb lesz, a centralis vénát körülvevő portális ágak száma megnő, és megváltozik a zonális megoszlást mutató enzimek (pl P450 2E1, glutamin szintetáz) mintázata.

Acetaminofluorén kezeléssel kombinált parciális hepatektomia állatmodellben kimutatta a Hering csatornák sejtjeinek proliferálását. Igazolta, hogy a regenerációhoz szükséges máj őssejtek a Hering csatornák sejtjei között, illetve a legkisebb terminális epeutakban helyezkednek el. Az ovális sejtek nem hemopoetikus őssejt eredetűek, csontvelői őssejt markert nem hordoznak, - ellenétben a myofibroblastokkal. A májregeneráció utolsó lépésében az ovális sejtek májsejteké differenciálódnak. A regeneráció a máj eredeti szerkezetének felhasználásával zajlik, új szöveti struktúrák nem keletkeznek. Primer mitogénekkel kísérleti állapotokban az ovális sejtek mitotikus aktivitása fokozható volt, gyorsítható volt a hepatocytá irányú differenciálódás.

A *tumor indukálta angiogenesis*t vizsgálta egerek melanomájában, továbbá az angiogenesis új mechanizmusát írta le egerekben növekvő szubkután oltott colonrákok esetében. Kísérletes agymetasztázisokban az érdenzitás növekedése a metasztázisban kizárólag az agyszövet meglévő érhálózatának átrendeződésével jön létre. Tumorsejteket az agyszövetbe oltva a tumorok csupán a meglévő erek bekebelezésével tettek szert saját érrendszerre.

A *májmetasztázisok vérellátását* tanulmányozva azt igazolta, hogy a metasztázisokban új erek képződése helyett a sinusoidok fúziója, az artériás rendszert határoló struktúrák destrukciója, a metasztázisok arterializációja következik be. A Szerző a hatékony anti-angiogenesis, anti-vascularis terápiák kialakításához fontosnak tartja a különböző célszervekben az alapvető ereződési típusok tisztázását.

A *metasztázisképződéssel* kapcsolatban vizsgálta sejt migrációt, a tumorsejteknek a kötőszövetbe való kijutása vagyis az extravazáció és a szervpreferencia kérdését. Megállapította, hogy az endothelsejtek kulcsszerepet játszanak az extravazáció folyamatában. A szervpreferencia kialakulásában az extravazáció sebessége az egyik meghatározó tényező, a másik a tumorsejteknek az erek bazálmembránjához való tapadása. A bazálmembrán egyi komponense a *perlekán*, ennek specifikus antitesttel történő blokkolása gátolta egérben a Lewis lung tumor májmetasztázisának kialakulását.

Új eredményeit 13 pontban sorolta fel, a legfontosabb megállapítások a következőkben foglalhatók össze:

1. A patkány máj *epeut rendszerének* egy új CK7-/CK19+ kompartmentjét írta le, amely nagy valószínűséggel tartalmazza a *máj őssejtjeit*. Humán májban ezek a struktúrák CK7 pozitívak, EMA-, CD563, CD133+ fenotípusúak, és a vascularis szeptumban arteriolák kísérik őket.

2. Az *ovális sejtek* által képzett struktúrák a *Hering csatornák* meghosszabításának tekinthetők, bazálmembránt szintetizálnak, az általuk alkotott csőrendszer funkcionális kapcsolatot biztosít a hepatocyták és epeut rendszer elemei között.

3. Az ovális sejtek nem expresszálnak hemopoetikus őssejt markert. Májsejteké történő differenciálódásukban fontos a bazálmembrán degradációja és a májspecifikus transkripciós faktor megjelenése. Az ovális sejtek differenciálódása primer hepatocytá mitogén kezeléssel elősegíthető.

4. Az *angiogenesis* új formáját írta le, amelyre jellemző az endothel hidak kialakulása az ér lumenében, majd kollagén kötegek transzportja az érlumen keresztül az endothelsejtek segítségével.

5. Kísérletes *agyi mikrometastasokban* igazolta, hogy az érdenzitás növekedése endothel sejt proliferáció nélkül, a meglévő kapilláris rendszer átrendeződésével megy végbe. A metasztázisok környezetében nem zajlik angiogenesis, a tumorok érhálózatukat a már meglévő erek inkorporációjával hozzák létre.

6. Kísérletes *colonrák májmetasztázisaiban* a vaszkularizáció új formáját írta le, amelynek a lényege a tumor felszínén keletkező fuzionált szinusoidok inkorporációja. Ezek a májmetasztázisok artériás vérellátásra tesznek szert 2 mm-es tumor méret felett.

7. Kimutatta, hogy a Lewis *lung karcinoma* májpreferenciája mögött valószínűleg a tumorsejteknek a szinusoidok heparán szulfát proteoglikánjához történő specifikus adhéziója áll.

Megjegyzés és kérdések

A májbetegségek végstádiumában, cirrhosisban, vagy fulmináns májelégtelenségben (gyógyszer- v. gombamérgezésben, súlyos akut hepatitisben) szenvedő betegek gyógyításával foglalkozó klinikus bíráló számára a Pályázó *májregenerációval* kapcsolatos megállapításai a legizgalmasabbak. Mivel a májtranszplantáció - a donorok hiánya miatt - korlátozott lehetőség, régóta keresik az alternatív megoldásokat. Köztük szerepel a „bridging terápia”: ez segíthet áthidalni az időt, amíg pl. fulmináns hepatitisben a regeneráció megindul, vagy amíg cirrhosisban a májtranszplantáció elérhetővé válik. Ezen a téren a máj őssejt kutatások rendkívül aktuálisak, így a Szerző kiváló morfológiai vizsgálatait igen előremutatóak.

Kérdések:

1. Eredményei szerint a *máj őssejtek* részvételével zajló *regenerációja* felgyorsítható. Milyen próbálkozások történtek ilyen céllal fulmináns májelégtelenségben?

2. Csontvelői mononuklearis sejtekből endotheliális progenitor sejtek izolálhatók kísérletes körülmények között, ezek hepatoprotektív, antifibrotikus citokineket termelhetnek.

Kérdés: a betegek csontvelőjének *colonia stimuláló faktorokkal* (G-CSF, HGF, FGF) történő mobilizációja révén megnövelhető-e a perifériás vérben és főleg a májban az *endothelialis és hepatocita* progenitor sejtek száma, olyan fokban, hogy az áthidaló megoldást jelenthessen fulmináns elégtelenségben vagy terminális cirrhosisban a transzplantációig.

Adatokat közöltek arról, hogy G-CSF kezeléssel mobilizált CD133 autológ csontvelősejtek infúziója hasznos volt transzplantációra váró betegekben. Súlyos akut hepatitises betegek perifériás vérében kimutatták, hogy megnőtt az endothelialis és hemopoetikus progenitor sejtek száma, májvékonyban pedig magas HGF szintet mértek - a regeneratív folyamatok jelzésként.

3. A *máj csillagsejtek* (hepatikus stellatum sejtek) őssejt markeret expresszálhatnak, AFP-t, GGT termelhetnek, in vitro HGF, FGF növekedési faktor expozícióra hepatocita sejtekké differenciálódtak. Ezek szerint, ha a csillagsejtek progenitor sejtek potenciájával bírnak, szerepük lehet a regenerációs folyamatban, alkalmazhatók-e esetleg őssejt terápiára?

4. A kísérletes májmetasztázisban észlelt *perlekán* elleni blokkoló antitest metastasist gátló hatásának analógiájára, bazálmembran-komponensek elleni monoklonális antitestek, pl *colon carcinoma máj metastázisában* intrahepatikusan adva védő hatásúak lehetnek-e, esetleg kiegészítve a máj metastázis műtéti eltávolításával, ami bizonyos esetekben lehetséges.

5. Emberi vérből lehetőség van-e izolálni olyan hepatikus-biliaris progenitor sejteket, amelyeknek molekuláris elváltozásai, marker expressió változásai esetleg előjelezhetnék a fenyegető kóros sejtproliferációt, ezáltal prediktorai lehetnek pl. krónikus noxa talaján kialakuló daganatnak. Ilyen primer sclerotizáló cholangitisben (PSC) az epeutak gyulladása: a kórfolyamat évente 1.5 %-ban, 10 év alatt 15%-ban vezet cholangiocellularis carcinomához. Ezt ma szerológiai marker nem tudja előrejelezni, beleértve a CA 19-9 antigent is, amelynek szérumszintje sokáig normális lehet, ha kóros, legtöbbször már késő.

Összefoglalva

Paku Sándor MTA doktori pályázatának témaválasztása indokolt, tartalmi és formai kivitelezése példaszerű. Magas szintű morfológiai kutatás eredményeit tartalmazza, számos eredeti megfigyeléssel. A módszerek korszerűek, alkalmasak a feltett kérdések megválaszolására. Az eredményekből levont következtetések megalapozottak. A szöveges részhez csatolt dolgozatok lektorált nemzetközi folyóiratokban jelentek meg.

A munka sok ismerettel gazdagította tudásunkat a májregeneráció és a daganatos áttétképzés morfológiájáról. Az új adatok jelentősen gyarapították a tudomány szakot, hozzájárultak a tudomány fejlődéséhez. Mindez indokolta teszi a Pályázó kérését az MTA doktori cím elnyerésére.

Javasolom az értekezés nyilvános vitára bocsátását, és sikeres védelem esetén Paku Sándor számára az MTA doktori cím odaítélését.

Pécs, 2013, március 16.

Pár Alajos
MTA doktora