

# A D-vitamin metabolizmusát befolyásoló faktorok vizsgálata hepatocelluláris carcinómában

Doktori tézisek

**Dr. Horváth Evelin**

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szalay Ferenc, D.Sc., professor emeritus

Hivatalos bírálók: Dr. Dezső Katalin, PhD., egyetemi tanársegéd

Dr. Patai Árpád, PhD., főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Schaff Zsuzsa, D.Sc., professor emerita

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Banai János, D.Sc., egyetemi tanár

Dr. Hersényi László, D.Sc., egyetemi docens

Budapest

2016

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b>	4
<b>2. BEVEZETÉS</b>	6
2.1. A hepatocelluláris carcinóma epidemiológiai áttekintése	6
2.2. Májcirrhosis, mint független kockázati tényező	8
2.3. A HBV infekció szerepe a hepatocarcinogenezisben	9
2.4. A HCV infekció szerepe a hepatocarcinogenezisben	10
2.5. Az alkohol és a HCC	12
2.6. Az obesitás, a NASH és a HCC kapcsolata	13
2.7. Az aflatoxin B1 HCC kialakulásában betöltött szerepe	15
2.8. Szinergista hatások	15
2.9. A D-vitamin metabolizmusa és tumorelles hatásának felfedezése	16
2.10. A D-vitamin élettani hatásai VDR-en keresztül és attól függetlenül	19
2.11. A D-vitamin és a HCC	20
2.12. VDR polimorfizmus vizsgálatok	23
<b>3. CÉLKITŰZÉSEK</b>	25
3.1. HCC epidemiológiai vizsgálata a Semmelweis Egyetem I.sz. Belklinikán	25
3.2. D-vitamin hatásának vizsgálata különböző HCC sejtvonalakon in vitro	25
3.3. Humán vizsgálatok	26
<b>4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b>	27
<b>4.1. Hepatocelluláris carcinómás betegek epidemiológiai vizsgálata</b>	27
4.1.1. Betegek	27
4.1.2. Statisztikai értékelés	27
<b>4.2. D-vitamin hatásának vizsgálata különböző HCC sejtvonalakon in vitro</b>	27
4.2.1. Sejtvonalak	27
4.2.2. 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> inkubáció	28
4.2.3. RNS izolálás, cDNS szintézis és kvantitatív RT-PCR	29
4.2.4. CYP24A1 immuncitokémiai vizsgálata	29
4.2.5. Statisztikai analízis	30

<b>4.3. Humán vizsgálatok</b>	30
4.3.1. Betegek a CYP24A1 mRNS és fehérje vizsgálatához	30
4.3.2. Betegek a CYP27B1 és VDR mRNS vizsgálatához	31
4.3.3. RNS izolálás	32
4.3.4. A VDR, CYP27B1 és CYP24A1 génexpresszió vizsgálata	33
4.3.5. A CYP24A1 fehérje indirekt immunhisztokémiai kimutatása	33
4.3.6. Statisztikai értékelés	34
<b>5. EREDMÉNYEK</b>	35
<b>5.1. Hepatocelluláris carcinómás betegek epidemiológiai vizsgálata</b>	35
<b>5.2. D-vitamin hatásának vizsgálata különböző HCC sejtvonalakon in vitro</b>	39
5.2.1. VDR mRNS expresszió	39
5.2.2. CYP27B1 mRNS expresszió	40
5.2.3. CYP24A1 mRNS expresszió változás	41
5.2.4. CYP24A1 mRNS dózisfüggő expresszióváltozása	44
5.2.5. CYP24A1 mRNS időfüggő expresszióváltozása	46
5.2.6. CYP24A1 fehérje expresszió HepG2 sejtvonalon	48
<b>5.3. Humán vizsgálatok</b>	49
5.3.1. Csökkent VDR mRNS expresszió HCC-ben	49
5.3.2. Csökkent CYP27B1 mRNS expresszió HCC-ben	50
5.3.3. Klinikopatológiai paraméterekkel való összefüggések	50
5.3.4. CYP24A1 mRNS expresszió HCC-ben	51
5.3.5. CYP24A1 fehérje expresszió HCC-ben	55
<b>6. MEGBESZÉLÉS</b>	56
<b>7. KÖVETKEZTETÉSEK</b>	64
<b>8. ÖSSZEFOGLALÁS - SUMMARY</b>	66
<b>9. IRODALOMJEGYZÉK</b>	68
<b>10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>	88
<b>11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE</b>	90
11.1. A doktori értekezés témájával összefüggő közlemények	90
11.2. Egyéb közlemények	90

## 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AFP: alfa-fötóprotein

AFP-L1: alfa-fötóprotein L1

AFP-L2: alfa-fötóprotein L2

AFP-L3: alfa-fötóprotein L3

AFU:  $\alpha$ 1-fukozidáz

AMPK: adenzin monofoszfát-aktivált protein kináz

1 $\alpha$ ,25(OH)2D2: 1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-cholecalciferol, kalcidiol

1 $\alpha$ ,25(OH)2D3: 1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-cholecalciferol, kalcitriol

AU: arbitrary unit

BMI: body mass index

CYP24A1: vitamin D24-hydroxylase enzyme

CYP27B1: 25-hydroxyvitamin D3 1-alpha-hydroxylase

DBP: vitamin D binding protein

DNS: dezoxiribonukleinsav

FC-GP73: fukozilált GP73

ETT: Egészségügyi Tudományos Tanács

FUO: fever of unknown origin

GAPDH: gliceraldehyd 3-foszfát dehidrogenáz

GGT: gamma-glutamil transzferáz

GPC3: glipikán-3

HBeAg: hepatitis B vírus e antigén

HBsAg: hepatitis B vírus surface antigén

HBV: hepatitis B vírus

HCC: hepatocelluláris carcinoma

HCV: hepatitis C vírus

HDV: hepatitis D vírus

HIV: human immunodeficiency virus

HSP70: hősokk fehérje 70

IGF1: inzulin-like growth factor

IL28B: interleukin 28B

IRS-1: insulin receptor substrate 1  
JNK: c-Jun kináz  
MAPK: mitogén-aktivált protein kináz  
MARSS: membrane-associated rapid response steroid-binding protein  
microRNS: micro-ribonukleinsav  
M-MLV: Moloney Murine leukémia vírus  
mVDR: D-vitamin membránreceptor  
NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease  
NASH: nem-alkoholos steatohepatitis  
ns: nem szignifikáns  
PCR: polimeráz láncreakció  
PDGF: trombocita növekedési faktor  
PTEN: tenzin-homológ foszfatáz  
PTH: parathormon  
RNáz: ribonukleáz  
RNS: ribonukleinsav  
RT-PCR: real-time polimeráz láncreakció  
SCCA: squamous cell carcinoma antigén  
TERT: telomeráz reverz transzkriptáz  
TGF- $\beta$ 1: transzformáló növekedési faktor  $\beta$ 1  
TNF $\alpha$ : tumor nekrozis faktor  $\alpha$   
TUKÉB: Tudományos és Kutatásetikai Bizottság  
VDR: D-vitamin receptor  
VDRE: vitamin D response element  
VEGF: endoteliális növekedési faktor  
VEGFR: endoteliális növekedési faktor receptor

## 2. BEVEZETÉS

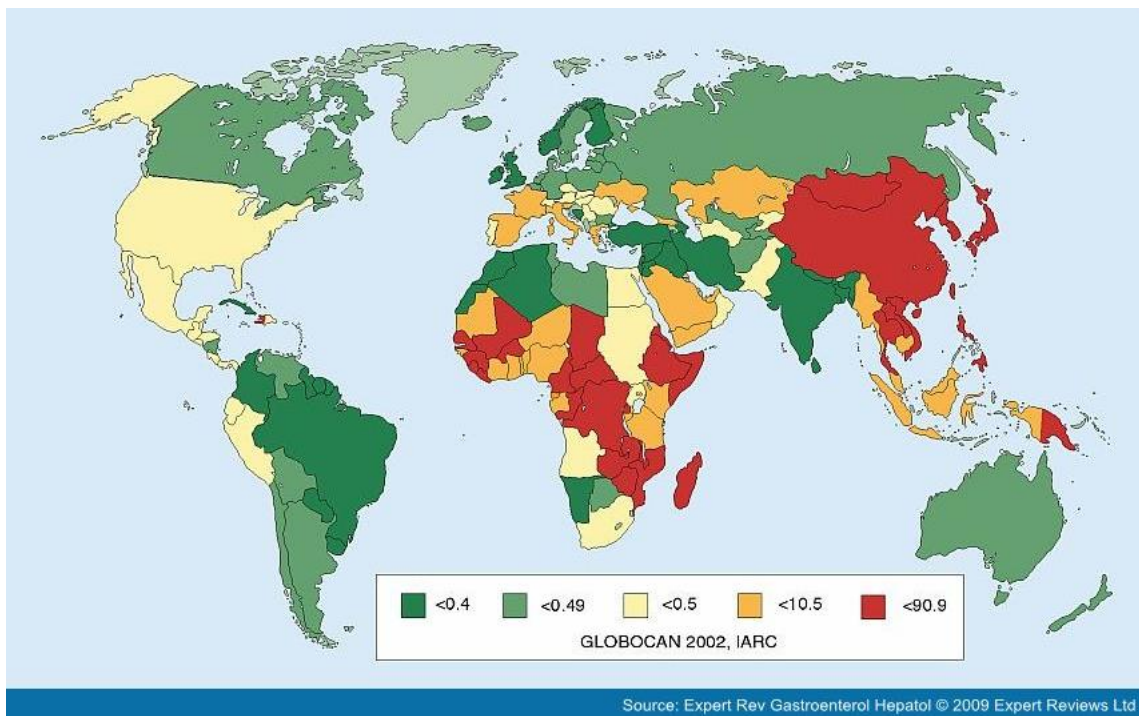
A rosszindulatú daganatok és a biológiailag aktív D-vitamin, az  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  között fennálló összefüggés, mint általában az orvostudományban, az egyedi megfigyelésekből indult ki. A biológiailag aktív D-vitamin, a cholecalciferol felfedezése a XX. század első felére tehető, számos tudós együttműködésének köszönhetően (1). A D-vitamin szerepe a rosszindulatú daganatokban kezdetben preventív faktorként merült fel (2; 3; 4). Vastagbél-daganat incidenciája kapcsán figyelték meg elsőként, hogy a napsütötte órák számának, ezzel párhuzamosan a betegek szérumban D-vitamin szintjének csökkenésével jelentősen emelkedik a colorectalis carcinoma előfordulása (5). A prosztaták előfordulásában is kimutattak egy ehhez hasonló észak-déli irányú incidenciacsökkenést (6; 7). A további kutatások során bebizonyosodott a D-vitamin antitumor hatása *in vitro* és *in vivo*, nemcsak colorectális rákban, hanem számos más rosszindulatú daganatban (8; 9; 10; 11).

A hepatocelluláris carcinóma (HCC) valamivel később került a D-vitaminnal kapcsolatos daganatkutatás előterébe. A kezdeti kutatások során kiderült, hogy a D-vitamin hiányos egerek fogékonyabbak a vegyi anyagok hatására kísérletesen indukált hepatocarcinogenezisre (12). Több oka van, hogy miért választottam a doktori disszertációm témájaként a D-vitamin metabolizmus vizsgálatát HCC-ben. Habár Magyarországon az évente diagnosztizált HCC-és betegek száma alulmarad a tüdőrák vagy a colorectális rák incidenciájának, de sajnálatos módon a daganat mortalitását tekintve az elsők között szerepel (13). A HCC kezelése egyre gyakoribb feladat a magyarországi orvosi gyakorlat számára is. Az utóbbi években a HCC molekuláris carcinogenezisének pontosabb megismerésével a kezelési lehetőségek is bővültek. Új lokális és szisztémás terápiás szerek állnak rendelkezésre, ugyanakkor továbbra is az egyik legrosszabb kuratív aránnyal bíró daganatok közé tartozik.

### 2.1. A hepatocelluláris carcinoma epidemiológiai áttekintése

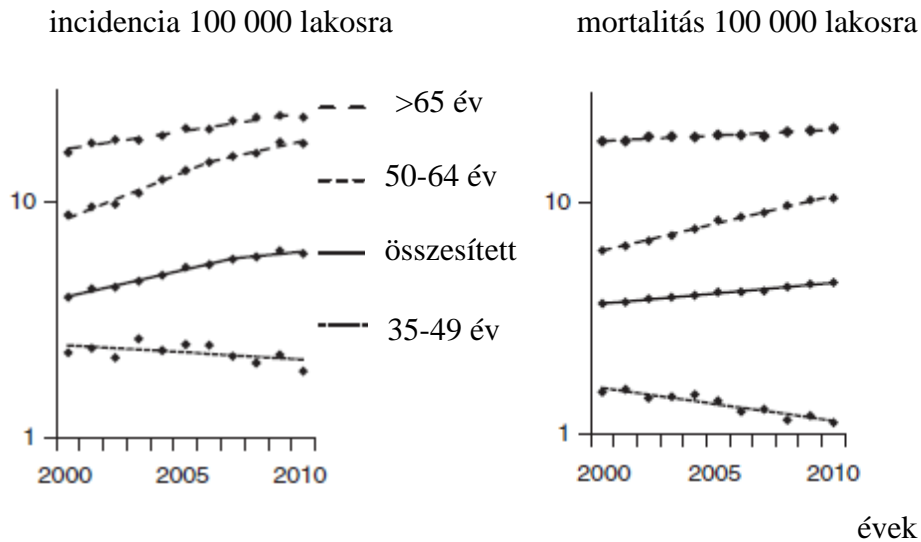
A hepatocelluláris carcinoma a leggyakoribb primer májrák. Az ötödik leggyakoribb daganatos betegség és a daganatos halálozásban világviszonylatban a harmadik helyen szerepel (13). Előfordulása és etiológiája igen változatos földrajzi különbségeket mutat. Leggyakoribb Kínában, ahol százezer lakosra számított új esetek

száma 48,5 évente (13). Ritka daganatnak számít Észak- és Dél-Amerikában, Észak-Európában és Óceániában (<5,0/100 000 lakos). Spanyolország, Olaszország és Görögország a közepes incidenciájú országok közé sorolható (5,0-20,0/100 000 lakos) (13) (1. ábra). Az országos Rákregiszter adatai alapján Magyarországon évente kb. 600 új esetet diagnosztizálnak, és kb. ugyanennyire tehető az évente HCC-ben elhalálozott betegek száma. A Semmelweis Egyetem I.sz. Sebészeti Klinikáján 1996-2009 között 211 esetben végeztek májrezekciót HCC miatt (14).



1. ábra: HCC incidencia világvizonylatban

A férfiak körében kb. négyszer gyakoribb a HCC, mint a nőkben, ami felvetette az androgén hormonok kockázemelő, illetve a női nemi hormonok védő hatását a daganattal szemben (15). Altekruse és munkatársai által a közelmúltban közölt legújabb adatok alapján 2007-2010 között emelkedett a HCC mortalitása az Egyesült Államokban (16). Az epidemiológiai felmérések alapján a HCC incidenciája és a májrák mortalitási adatai emelkednek fekete, hispán és kaukázusi, 50 évnél idősebb férfiakban, ugyanakkor csökkenően van 35-49 év közötti férfiakban valamennyi rasszban. Szignifikánsan növekvő incidencía és mortalitási arány figyelhető meg női nembn a fekete, hispán és a kaukázusi rasszban 50 év felett (2. ábra).



2. ábra: Életkor szerinti HCC incidencia és mortalitás 2000-2010 között (Altekruse et al. nyomán) (16)

## 2.2. Májcirrhosis, mint független kockázati tényező

A hepatocelluláris carcinoma kialakulásának az egyik legfőbb kockázati tényezője a májcirrhosis. A HCC 70-90%-a májcirrhosis talaján alakul ki. A cirrhotikus betegek körében a HCV infekció a leggyakoribb kockázati tényező (5 év kumulatív incidencia ráta 30%), amit a hereditær haemochromatosis követ (5 év kumulatív incidencia ráta 21%). HBV fertőzés esetén ez az arány az endémiás területeken 15%, a nem endémiás területeken 10%. Alacsonyabb az incidencia ráta alkoholos cirrhosis (8%), illetve primer biliáris cirrhosisban (4%). HBV/HCV és HBV/HDV koinfekció a HCC kockázatát 2- illetve 6-szorosára növeli. Bizonyított, hogy a HBV replikáció csökkentésével csökken a HCC kialakulásának kockázata HBV indukált májcirrhosisban (17).

A májcirrhosis leggyakoribb oka a HBV, HCV infekció, alkoholos májkárosodás és a NASH. Kevésbé gyakori a hereditær haemochromatosis,  $\alpha$ -1 antitripszin hiány, autoimmun hepatitis, Wilson-kór és néhány porfíriatípus (13). A cirrhotikus göbök kb. felében kimutatható klónális sejtszaporodás (18). Azonban a daganat kialakulásának kockázata magasabb HBV, ritkábban HCV infekció esetén is. A májcirrhosis



kialakulása nélkül a vírus indukálta génmutációk és a repair mechanizmusok meghibásodása vezet diszpláziához, majd carcinóma kialakulásához (19). Nemcsak az aktív fertőzés, de a látens vírushordozók (HBeAg negatív, HBsAg pozitív) körében is gyakoribb a HCC kialakulása (20).

### **2.3. A HBV infekció szerepe a hepatocarcinogenezisben**

A világ egészét tekintve a HCC leggyakoribb etiológiai faktora a hepatitis B vírus (HBV) fertőzés, ami onkogén vírusnak tekinthető. Becslések szerint 350-400 millió fertőzöttel kell számolni világszerte (21). A HBV DNS-e integrálódik a hepatociták genomjába, és akut, illetve krónikus gyulladást okozva indítja el a carcinogenezis folyamatát (22; 23; 24). A HBV vírus az esetek 70-90%-ában cirrhosison keresztül okoz májrákot. A HBV vírus hordozók HCC-re való kockázata 100-szorosa a vírust nem hordozókhöz képest, ami mutatja, hogy a vírus cirrhosis nélkül is karcinogén hatású direkt genomiális károsító hatások révén (21). Az endémiás területeken leggyakoribb fertőzési mód az anyáról az újszülöttre (vertikális átvitel) történő fertőzés. Az így fertőzött újszülöttek 90%-a válik krónikus vírushordozóvá. Az alacsony HCC incidenciájú területeken, ahol a HBV leggyakoribb átviteli módja felnőttkorban szexuális úton, illetve parenterálisan történik. Ezekben az esetekben a fertőzöttek több, mint 90%-a spontán meggyógyul. Ázsiában a HBV incidenciája 0,4% és 0,6% között van (13). Számos kockázati tényezőt azonosítottak, amelyek megnövelik a HBV hordozókban a HCC kialakulását; pl. a férfi nem, a magasabb életkor (a fertőzés fennállásának ideje), ázsiai és afrikai rassz, a májcirrhosis jelenléte, HCC a családi anamnézisben, aflatoxin expozíció, alkohol, dohányzás vagy HCV/HDV koinfekció. Szintén magasabb a HCC-re való kockázat magas HBV replikációs ráta esetén, aminek legfőbb indikátora a HBeAg jelenléte vagy a magas HBV-DNS szint. Továbbá ázsiai vizsgálatok bizonyítják, hogy a C genotípusnak súlyosabb a májkárosító hatása, mint a B genotípusú vírusnak (25). A hepatitis B vírus elleni vakcina széleskörűen elismert és alkalmazott megelőzési módszer a HBV infekció és egyben a HCC megelőzésére. 10 évvel az immunizációs program bevezetését követően, a 6 és 14 év közötti taiwani gyermekek körében a HCC incidenciája 0,7/100 000-ről 0,36/100 000-re csökkent (26). A kérdés jelentőségét az is mutatja, hogy felmérések szerint 2000-ben a HBV-vel

összefüggésbe hozható halálesetek száma 620 000 volt, ebből kb. 580 000 krónikus HBV infekció talaján kialakult májcirrhosis és HCC volt. A bevezetett gyermekkori HBV védőoltás 90%-os lefedettsége esetén és az első dózis alkalmazásával a születéskor, a HBV-vel összefüggő halálozások 84%-a megelőzhető lenne (27).

Régóta ismert, hogy a HBV DNS integrálódik a hepatociták genomjába. Ez a folyamat az esetek egy részében már az akut fertőzés során megtörténik (28; 29). A beépülés után a fertőzött sejtek klonális expanziója indul meg. Összetett genomiális folyamatok részeként a beépült vírus DNS szekvencia a gazdaszerv bizonyos DNS fragmentumaival együtt képes transzlokálódni akár egyik kromoszómáról a másikra, ami kromoszóma instabilitást okoz (30; 31). Ezen kívül a beépült idegen szekvencia a gazdaszervezet génjeiben expresszióváltozást is okoz, ami jelentősen befolyásolja a sejtproliferációt és az intracelluláris jelátviteli mechanizmusokat (32; 33).

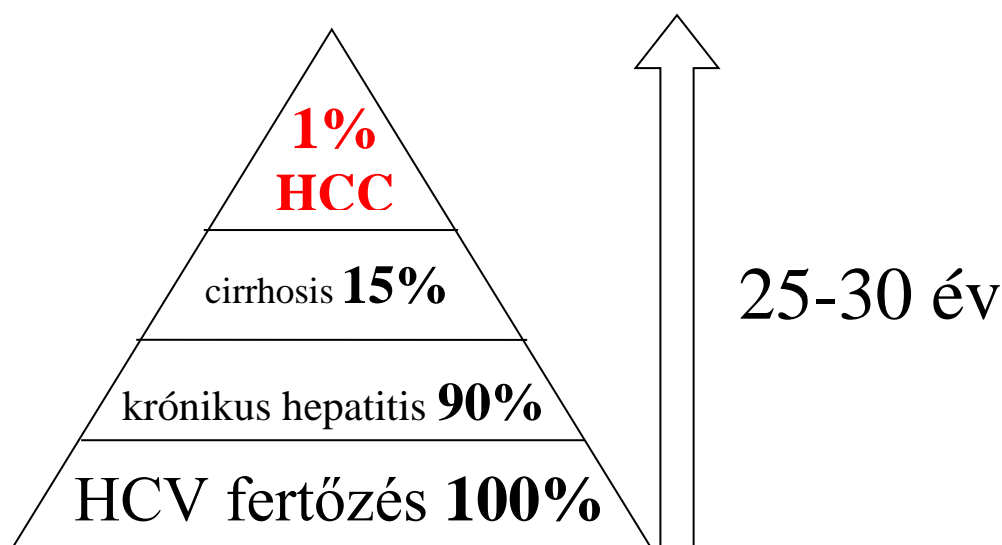
Számos HBV infekció talaján kialakult HCC esetén kimutatott a telomerázt kódoló gén és a kalcium homeosztázisban szerepet játszó gének HBV okozta károsodása (34). Ma már világossá vált, hogy a HBV fertőzés kimenetelét alapvetően meghatározza a gazdaszervezet vírusfehérjék ellen indított immunválasza. Habár a HBV nem tekinthető alapvetően citopatogén vírusnak, számos vírusfehérjéről bizonyított, hogy közvetlenül szerepe van a krónikus hepatitis és a HCC kialakulásában (18). Nem találtak összefüggést a krónikus HBV fertőzött betegek VDR gén polimorfizmusa és a HCC kialakulásának kockázata között (35).

#### **2.4. A HCV infekció szerepe a hepatocarcinogenezisben**

A HBV infekciónál magasabb a HCC kialakulásának a kockázata (a májcirrhosistól függetlenül) HCV fertőzés esetén (3. ábra). A HCC-s betegek 44-66%-a Olaszországban, 27-58%-a Franciaországban, 60-80%-a Spanyolországban és 80-90%-a Japánban HCV fertőzött (13). Egy metaanalízis vizsgálat szerint HCV fertőzés esetén a HCC kialakulása 17-szeresére emelkedik a vírusmentes csoporthoz képest (36).

A HCC kialakulásának kockázatát nehéz megbecsülni adekvát hosszú távú kohort vizsgálatok hiányában, jóllehet a hozzávetőleges becslések szerint 30 év alatt 1-3% köze tehető. A HCV fibrózis, majd cirrhosis kialakulásán keresztül okoz HCC-t. Ha már egyszer kialakult a HCV talaján a cirrhosis, a HCC kialakulásával az esetek 1-4%-ában

kell számolnunk, habár ez az arány Japánban 7% felett is lehet. A cirrhosis kialakulásának aránya 25-30 év HCV fertőzés során 15-35% között van (37) (3. ábra). A cirrhosis és a HCC kialakulásának aránya a legmagasabb a HCV-vel fertőzött vért vagy vérkészítményt kapók (pl. hemofíliások) között volt, a legalacsonyabb azokban a nőkben, akik egyszeri anti-D immunglobulin kezelésben részesültek. Nem találtak szoros összefüggést a HCV genotípus vagy a vírustiter és a HCC kialakulásának kockázata között. A HCV fertőzött betegek sikeres antivirális kezelése (pl. pegilált interferon + ribavirin) csökkenti a HCC kialakulásának kockázatát (38).



3. ábra: HCV fertőzött betegek HCC megoszlása (Hassan et al. nyomán módosítva) (39)

A HBV vírussal ellentétben a HCV RNS vírus, és fertőzés esetén nem integrálódik a humán genomba. Ugyanakkor számos vírusfehérje interakcióba lép a gazdaszervezet fehérjéivel, epigenetikai és genetikai módosulások során onkogének aktiválódnak, tumor szupresszor gének inaktiválódnak, és komplex jelátviteli útvonalak károsodása révén vezet végül a kontrollálatlan sejtproliferációhoz és a HCC kialakulásához (40). Számos vizsgálat mutat összefüggést a HCV core proteinjét kódoló génben bekövetkezett mutációk és a HCC kialakulása között (41). HCV infekció talaján kialakult HCC-ben bizonyított az interferon metabolizmus, az apoptózis, az oxidatív stressz és a lipidmetabolizmusban érintett jelátviteli útvonalak károsodása (42; 43).

Az elmúlt néhány évben vetődött fel a microRNS-ek szerepe a hepatocarcinogenezisben. Néhány microRNS (Dicer, p68) kóros regulációja szerepet

játszhat a HCC kialakulásában, illetve jelenlétük rosszabb prognózisra utal (44). A miR-122 és a -199a a HCV replikációt (45; 46; 47), míg a miR-122 a gazdaszervezet interferon jelátviteli útvonalat befolyásolja (48). A HCV indukált miR-155 expresszió elősegíti a hepatociták proliferációját és a tumorigenézis folyamatát a Wnt jelátviteli útvonal aktiválásával. A miR-155 fokozott expressziójával szignifikánsan csökken a májsejtek apoptózisa és fokozódik azok proliferációja (49).

Ismert, hogy a krónikus hepatitis C vírus fertőzött betegekben alacsonyabb a szérumban D-vitamin koncentráció. Bitetto és munkacsoportja bebizonyította, hogy a betegek antivirális kezelés előtt mért szérumban D-vitamin koncentráció értéke az IL28B gén polimorfizmussal együtt igen jelentős prediktív értékkel bír az antivirális kezelés szempontjából a treatment-naív krónikus hepatitis C fertőzött betegek esetén (50). Ezt követően egy izraeli munkacsoport bebizonyította a D-vitamin direkt antivirális hatását *in vitro*, és feltételezi az intrahepatikus D-vitamin endokrin rendszer és a HCV fertőzés között fennálló kapcsolatot, továbbá a D-vitamin szerepét az antivirális folyamatokban (51). Okkal merül fel a kérdés, hogy mi volt előbb; a D-vitamin hiány hajlamosít krónikus HCV infekció kialakulására, vagy a krónikus HCV fertőzés okoz, eddig nem ismert mechanizmusokon keresztül, D-vitamin hiányt az érintett betegekben (52). Az mindenesetre ismert, hogy a D-vitamin hiány általános jelenség a krónikus májbetegségben szenvedők esetén (az arány eléri a 92%-ot) (53). A kérdésre a válasz egyelőre nem tisztázott.

## **2.5. Az alkohol és a HCC**

Hazánkban a rendszeres alkoholfogyasztás komoly probléma. Az európai populációban az alkohol okozta HCC aránya 10,2%-ra tehető (54). Számos vizsgálat igazolja, hogy az oxidatív stressz áll az alkohol okozta májkárosodás középpontjában (55). A felszabaduló reaktív szabad gyökök bizonyos sejtfehérjékkal adduktokat képeznek, ezáltal neoantigéneket létrehozva (56). Ezek a komplex prooxidatív folyamatok direkt DNS károsodásán, mutációk kialakulásán, vagy/és indirekt módon génexpresszióváltozáson, illetve jelátviteli kaszkád útvonalak megváltozott működésén keresztül vezet kontrollálatlan sejtproliferációhoz (57). A krónikus alkoholfogyasztás során a CYP2E1 fokozott expressziója, az oxigén szabadgyökök fokozott képződése és

a c-myc állandó expressziója mutatható ki, aminek mind jelentős szerepe van a HCC kialakulásának patogenezisében (58). A nagy mennyiségű rendszeres alkoholfogyasztás (heavy drinker) szorosan kapcsolódik a májcirrhosis kialakulásához, de az alkoholnak direkt karcinogén hatása is van.

Egyre több adat bizonyítja, hogy az alkohol és a vas okozta májkárosítás folyamata több szempontból hasonlóságot mutat (59). Azokban a hereditár haemochromatosisban szenvedő betegekben, akik rendszeresen alkoholt is fogyasztanak, emelkedett a HCC kialakulásának a kockázata. Továbbá nemcsak a haemochromatosis talaján kialakult májcirrhosis, hanem a HFE génben jelen lévő mutáció önmagában predisponáló faktor HCC-re (60). Azon haemochromatosisban szenvedő betegek, akik napi 60 g alkohólnál többet fogyasztanak, 9-szer magasabb a HCC kialakulásának kockázata az ennél kevesebb alkoholt fogyasztó betegtársaikhoz képest (60).

Egyes adatok szerint az elfogyasztott alkoholmennyiséggel arányosan emelkedik a HCC kockázata, más adatok szerint viszont csak napi 40-60 g elfogyasztott alkoholmennyiség felett emelkedik a daganat előfordulása (61). Persson és munkacsoportja bebizonyította, hogy a magasabb folsav bevitel csökkenti az alkohol indukált HCC kialakulását (62).

## **2.6. Az obesitás, a NASH és a HCC kapcsolata**

A fejlett országokban igen jelentős probléma és nagyszámú beteget érint a túlsúly és az elhízás. Korábban kriptogén cirrhosisnak tartott esetek nagy részéért a nem alkoholos zsírmáj (nonalcoholic fatty liver disease – NAFLD), illetve a nem-alkoholos steatohepatitis (nonalcoholic steatohepatitis – NASH) felelős, mely betegek nagy része metabolikus szindrómában szenvedő férfi. A NASH klinikai diagnózisa nehéz, ha már egyszer kialakult a májcirrhosis és a hepatocelluláris carcinóma (13). A NASH cirrhosis nélkül is okozhat HCC-t (63). Az irodalomban kevés és kisszámú prospektív vizsgálat található a NASH és a HCC kapcsolatáról. Az azonban világosnak látszik, hogy cirrhosis nélküli NAFLD-ben vagy NASH-ban a HCC kockázata jóval kisebb, mint cirrhosis és NASH együttes előfordulásakor (64). Ugyanakkor ez utóbbi csoportban kisebb a HCC-re való rizikó, mint a HCV talaján kialakult májcirrhosisban (2,6-2,7%

éves incidencia szemben 4-4,7%) (65). Ugyanakkor a metabolikus szindróma önmagában is fokozza a HCC kialakulásának kockázatát (66).

Az obesitás hajlamosít valamennyi rosszindulatú daganat kialakulására, többek között hepatocelluláris carcinoma kialakulására (67). A HCC-ben szenvedő betegeknél kimutatták, hogy a 35 kg/m<sup>2</sup> feletti body mass index (BMI) nőknél 1,68-, férfiaknál 4,52-szeresére fokozza a daganat mortalitását (68). A cukorbetegség független rizikófaktora a HCC kialakulásának. A NASH és a HCC között lévő összefüggésről már volt szó. A NASH-cirrhosis–HCC patogenezisének lépései többnyire mára már jól ismertek; a mitotikus útvonalak aktiválódása, az megemelkedett oxidatív stressz, az NF- $\kappa$ B aktiváció, immunológiai alterációk vezetnek diszplasztikus nodulusok kialakulásához. Ehhez járulnak hozzá a genetikai károsodások, mint a pontmutációk, a kromoszóma károsodások vagy a kulcsgének aberráns promotermetilációja (69), a telomeráz reverz transzkriptáz (TERT), a vasculáris endoteliális faktor (VEGF) és a trombocita növekedési faktor (PDGF) aktivációja, ami kontrollálatlan sejszaporodáshoz és az apoptózis hiányához vezet (70). A nem cirrhotikus NASH talaján kialakult HCC-hez vezető folyamat kevésbé ismert, bár már számos elemét azonosították. A két csapás teória elvén alapszik a folyamat: az első csapás a zsírmáj kialakulása, amit második csapásként követ az inzulinrezisztencia kialakulása, ami számos proinflammatorikus citokin felszabadulásával jár (71). Az új, „multipárhuzamos” elmélet szintén fenntartja az inzulinrezisztencia fontosságát, de számos más kedvezőtlen faktor jelentőségét is hangsúlyozza, mint az endoplazmás retikulum stressz vagy az autofágia. A NASH-ban kialakult inzulinrezisztencia során megemelkedik a tumor-necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), az IL-6 és a leptin, ugyanakkor csökken az adiponektin szintje (72). Mindez elősegíti a májban a gyulladás, majd a fibrózis és a rák kialakulását. Az adiponektinnek szintén szerepe van a májfibrózis kialakulásában. Adiponektin génkiütött egerekben zsírmáj és májfibrózis alakult ki, továbbá a hypoadiponektinaemia elősegítette a HCC kialakulását a kísérleti állatokban (73; 74). Az inzulinrezisztenciából származó hyperinzulinaemia fokozott inzulin-like growth factor (IGF1) és inzulin receptor szubsztrát-1 (IRS-1) termeléssel jár. Az IGF1 egy peptid hormon, ami sejtproliferáció fokozásával és a hepatociták apoptózisának gátlásával növekedésfokozó hatással bír. Ezen kívül szignifikánsan fokozza a mitogén-aktivált protein kinázt (MAPK) és fokozza a c-fos és c-jun protoonkogének expresszióját, ami a hepatocarcinogenezis folyamatában

kulcsszerepet játszik (75). A fokozott IRS-1 aktiváció szintén fokozott MAPK expresszióhoz, és következésképpen a Wnt/ $\beta$ -katenin jelátviteli útvonal aktivációjához vezet (76). Ezen kívül az NF- $\kappa$ B, JNKs (c-Jun kináz) és STAT3 útvonal (77), az AMPK (adenozin monofoszfát-aktivált protein kináz) (78), toll-like receptorok (TLRs) fokozott expressziója (79), és a PTEN csökkent expressziója (80) és a posztranszkripció módosításokat végző microRNS-ek is mind szerepet játszanak a NASH talaján kialakult HCC kialakulásában.

## **2.7. Az aflatoxin B1 HCC kialakulásában betöltött szerepe**

Az aflatoxin B1 mérgezés világviszonylatban igen jelentős szereppel bír a HCC kialakulásában. Az aflatoxint termelő penészgombák elsősorban a meleg égövi országokban fordulnak elő. Egyes adatok szerint a HCC kockázatát 3-szorosára növeli (81). Leggyakrabban a földimogyorón keresztül történik a fertőzés, de előfordulhat szójában, rizsben, kávéban és egyéb takarmányfélésekben is. Az aflatoxin B1 mérgezés a fejlődő országokban a HBV vírus mellett a HCC legjelentősebb etiológiai faktora. Régóta ismert, hogy a toxin többek között a p53 tumorszupresszor gén mutációja, illetve DNS adduktok képzése révén indítja el a hepatocarcinogenezis folyamatát (82; 83). Ezen kívül bizonyított, hogy aktiválja az IGF-I receptort, az Akt és Erk1/2 foszforilációját, ezáltal okozva a hepatoma sejtek migrációját in vitro (84).

## **2.8. Szinergista hatások**

Az elhízás és az alkoholfogyasztás együttes jelenlétekor szinergista módon jelentősen emelkedik a HCC kialakulásának kockázata (85). A dohányzás önmagában, de az alkohollal együtt additív módon növeli a HCC kialakulását (86). Epidemiológiai adatok bizonyítják, hogy nemcsak a HBV a HCV fertőzéssel együttesen, hanem a krónikus alkoholfogyasztás a vírusinfekció mellett szinergista módon fokozza a HCC kialakulásának kockázatát (87; 88). HIV pozitív betegekben gyakori a HCV és/vagy a HBV koinfekció. A HIV vírus hepatokarcinogén hatásáról nincsenek bizonyító adatok, ugyanakkor a javuló antivirális kezelésnek köszönhetően a betegek túlélése jelentősen javult, ezzel egyidőben fokozódott a májcirrhosis és a HCC prevalenciája ezen betegek

körében (89). Ezzel ellentétben a rendszeres aspirin szedése és a kávéfogyasztás csökkenti a HCC kialakulásának kockázatát (90; 91).

Arról már volt szó, hogy világviszonylatban a leggyakoribb etiológiai tényező a krónikus HBV infekció. Amerikában és Európában a leggyakoribb oka a krónikus HCV infekció, amelynek számának növekedésével nő a daganat incidenciája. De kettős, HCV-HBV koinfekció is előfordul. A HCV infekció száma az 1960-70-es években jelentősen emelkedett az amerikai kontinensen és Közép-Európában az intravénás droghasználat megjelenésével. Ezt követően folyamatosan nőtt a fertőzöttek száma. Miután 1990-ben bevezették a vérminták szűrését, az újonnan fertőzött esetek száma drasztikusan csökkent. Becslések szerint a HCV talaján kialakult HCC esetek száma 2010-ben érte el a maximumát (13). Habár kimutatható némi különbség a HCC klinikai képének súlyossága, illetve a tumor klinikopatológiai megjelenése a különböző etiológiájú daganatok között, de a betegek túlélését a HCC etiológiája nem befolyásolja (92).

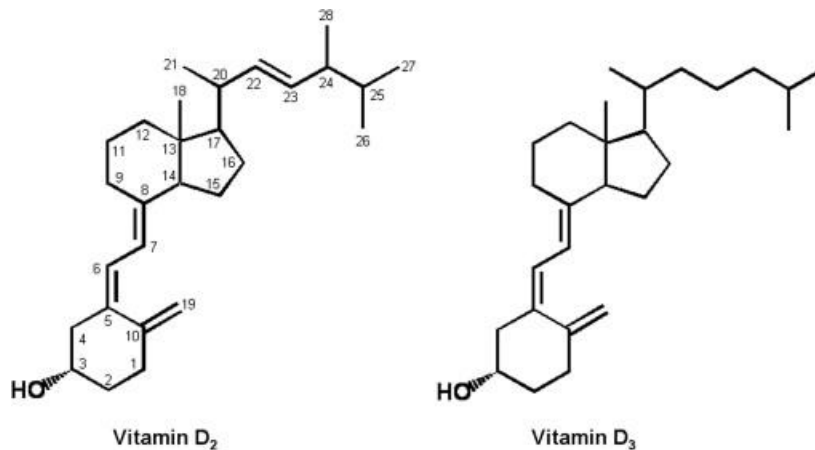
## **2.9. A D-vitamin metabolizmusa és tumorelles hatásának felfedezése**

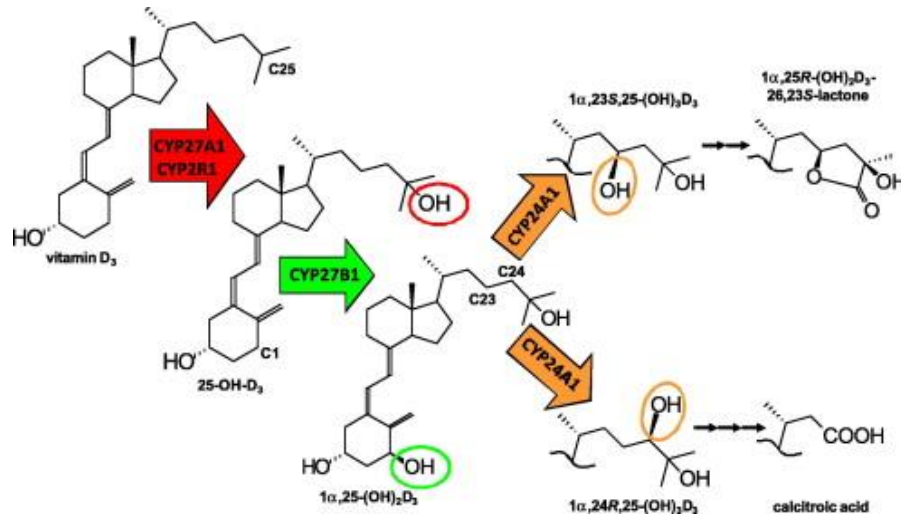
Mintegy 90 évvel ezelőtt azonosítottak egy rachitis ellenes vegyületet, ami termelődhet a bőrben napfény hatására, és a táplálékkal is bevihető; D-vitaminnak nevezték el. Ez az elnevezés két vegyületre utal: cholecalciferol (vitamin D3), ami UV sugárzás hatására keletkezik a bőrben 7-dehydrocholesterolból, illetve az ergocalciferol (vitamin D2), ami ergoszterolból képződik legfőképpen a gombákban. Ez a fenti két vegyület biológiai aktivitással nem rendelkezik. Kétlépcsős hidroxilációs folyamat során keletkezik a fenti két prekursor vegyületből a biológiailag aktív  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D ( $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  vagy  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ ). Az első hidroxiláció a 25-ös szénatomon (25-hidroxiláció a májban), a második az első szénatomon történik ( $1\alpha$ -hidroxiláció a vesében). Ezek az enzimek azonban nemcsak a májban, illetve a vesében expresszálódnak. A szervezetben számos szövet, immunsejtek, gasztrointesztinális rendszer sejtjei, agyszövet és a bőrsejtek is képesek  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  előállítására. Mivel ezek a sejtek VDR-t is tartalmaznak, a D-vitamin autokrin/parakrin szabályozó szerepe nem kétséges. Mostanáig 4 különböző humán P450 enzimet azonosítottak, ami vitamin D 25-hidroxiláz aktivitással rendelkezik, a mitokondriális CYP27A1 és CYP2R1, a



CYP2J2 és CYP3A4 (93; 94; 95). Az  $1\alpha$ -hidroxilációt végző enzim a szintén mitokondriális CYP27B1, amely legnagyobb mennyiségben a vese proximális tubulusaiban expresszálódik, habár alacsonyabb mértékben számos más szövetben is megtalálható (96). A CYP27B1 expresszió legfőbb szabályozója a parathormon (PTH) és maga az  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Az enzim konstitutíven magas expresszióját mutatták ki az emberi szervezetben a légzőrendszer epithelialis sejteiben (97), a bőr keratinocitáiban, ahol valószínűleg a helyileg termelt  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -nak szerepe van a külső noxák elleni védelemben (98) (4. ábra).

A szövetekben megtalálható biológiailag aktív D-vitamin féléletideje rövid. A D- vitamin a VDR receptor aktiválásán keresztül önmaga is aktiválja saját katabolizáló enzimét, a CYP24A1-et. A CYP27A1 és CYP27B1-hez hasonlóan a CYP24A1 is a mitokondrium belső membránjában helyezkedik el. Legnagyobb mértékben a vesében és az oocitákban expresszálódik, mérsékelten expresszálódik a tracheában, a tonsillákban, kis mértékben a fibroblastokban, agyszövetben, pajzsmirigyben, szívben, monocytákban, endometriumban és a placentában (99). A normál májszövetben a CYP24A1 nem expresszálódik (100).





4. ábra: A D-vitamin kaszkád. Jones et al. nyomán módosítva (101)

Számos *in vivo* és *in vitro* vizsgálat bizonyítja, hogy 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> hatására a CYP24A1 gyors és nagy mértékben expresszálódik nemcsak egészséges, hanem kóros sejtekben is (102). Az enzim azonban nemcsak a 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> hatására aktiválódik, hanem pl. a litokólsav, retinoidsav, de a hosszantartó rifampicin, carbamazepin vagy fenobarbitál kezelés is képes az enzim aktiválására nemcsak VDR, hanem egyéb receptorokon keresztül is (103; 104). Továbbá, magas CYP24A1 expresszió mutatható ki számos humán malignus daganatban (emlő, prostata, bőr, nyelöcső és a gasztrointesztinális traktus egyéb része). A magas CYP24A1 expresszió rosszabb prognózissal járt, valószínűleg az enzim fokozott aktivitásával összefüggő alacsonyabb helyi antitumor hatással bíró 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> koncentrációsökkenés miatt (105; 106; 107). Ezen vizsgálatokból kiindulva felmerült annak a lehetősége, hogy CYP24A1 gátlókkal növelhető lenne a szövetekben előforduló D-vitamin mennyisége, és ezáltal annak pozitív hatásai is. Ma már több, mint 400 ilyen hatású vegyületet tesztelnek (108).

Számos rosszindulatú daganatban bizonyított, hogy az alacsony szérumban D-vitamin koncentráció rizikófaktora a betegség kialakulásának. Hepatocelluláris carcinómára vonatkozó ilyen irányú adat kevés van. Elsőként 1991-ben egy japán HCC-ban szenvedő férfi esetén mutattak ki alacsonyabb D-vitamin koncentrációt a szérumban. Ezt azzal magyarázták, hogy a HCC paraneoplasztikusan termel foszfaturiás hatással bíró anyagokat, amik nemcsak a beteg hipofoszfataemiáját, hanem a vese

tubuláris sejtjeiben lévő 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase enzim gátlásán keresztül okozzák az alacsonyabb D-vitamin koncentrációt a szérumban (109). Majd 2000-ben a közölték 10 HCC-s beteg vizsgálatával, hogy a HCC szövetben expresszálódik a D-vitamin receptora (VDR) (110). Ezt követően sorra jelentek meg HCC-ben alkalmazott D-vitamin analóg kezelés hatékonyságáról szóló közlemények (111; 112; 113; 114; 115; 116; 117). 2013 januárjában megjelent közleményben, HCV vírus fertőzött betegek körében azt találták, hogy a fibrózis-cirrhosis-hepatocelluláris carcinóma folyamat során a betegek szérumában szignifikánsan és progresszíven csökken a D-vitamin koncentráció, melynek mértéke összefüggést mutatott a betegség progressziójával (118). Nem sokkal ezt megelőzően látott napvilágot a cikk, amelyben a vizsgálok a HCC szövetben szignifikánsan alacsonyabbnak találták a VDR expresszióját a tumormentes májszövethez képest (a minták nem ugyanabból a betegből származtak) (119). Ismert, hogy a HCC-és betegek szérumában szignifikánsan alacsonyabb a D-vitamin kötő fehérje koncentrációja (DBP – vitamin D binding protein), aminek a mértéke fordított összefüggést mutat a HCC prognózisával (120).

## **2.10. A D-vitamin élettani hatásai VDR-en keresztül és attól függetlenül**

A D-vitamin intracelluláris hatásainak nagy részét a VDR receptorán keresztül fejtí ki. A VDR magi szteroidreceptorcsaad tagja, amelynek génje a szervezet szöveteinek nagy részében expresszálódik. Valós idejű kvantitatív RT-PCR vizsgálattal igazolt expressziója a gasztrointesztinális traktusban, vesében, pajzsmirigyben, csontban, bőrben és a májszövetben is (121). A D-vitamin erős affinitással kötődik VDR hidrofób részéhez, ezáltal azon egy konformációváltozást hozva létre, ami által képes heterodimert képezni a retinoid X receptorral. Az így létrejött heterodimer képes kötődni bizonyos DNS szekvenciákhoz, vitamin D response element-hez (VDREs), ami a D-vitamin célgénjeinek szabályozó régiója. A DNS-hez kötődet követően a heterodimerhez számos szabályozó fehérjekomplex kapcsolódik, aminek következtében hisztonok enzimikus módosítása, és a célgének transzkripciója indul meg (122). A D-vitamin által szabályozott gének sejtípusonként eltérőek. A genom mintegy 5%-a áll a D-vitamin szabályozása alatt, és több, mint 900 gén közvetlenül válaszol a D- vitamin hatására (123). Ezek között szerepelnek a kalcium homeosztázis fenntartásáért, a

csontintegritásért felelős gének, de számos sejtproliferációban, sejt differenciációban, oxidatív stresszre adott válaszfolyamatokban, gyulladási folyamatokban szerepet játszó gének is D-vitamin szabályozás alatt állnak (124; 125). Ugyanakkor nemcsak a D-vitamin, hanem pl. a litokólsav, arachidonsav, és néhány táplálékkal bevitt vegyület (kurkuma, telítetlen szírsavak) is képesek aktiválni a VDR jelátviteli útvonalat, habár három nagyságrenddel nagyobb koncentrációban, mint a D-vitamin (126).

Az 1980-as évek közepétől ismert, hogy a D-vitaminnak van egy gyors, intracelluláris kalciumemelkedéssel járó hatása is. Újabban bizonyított, hogy ez a hatás non-genomikus útvonalon érvényesül, feltehetően a sejtmembránban elhelyezkedő VDR-en (mVDR) keresztül, ami számos sejtben megtalálható (127; 128; 129). Mostanáig két sejtmembránfehérjét azonosítottak, amelyek felelősek a gyors intracelluláris D-vitamin hatásért. Az egyik a enterociták basolaterális membránjában elhelyezkedő membrane-associated rapid response steroid-binding protein (1,25D3-MARSS) (130), a másik az osteosarcoma sejtekben kimutatott annexin II (131). Néhány példa bizonyítja, hogy D-vitamin hatására gyors intesztinális kalcium abszorpció, a pancreas  $\beta$  sejtjeinek inzulin szekréciója, vagy az osteoblastokban kalcium és klorid csatornák megnyílása és az endotheliális sejtek gyors migrációja figyelhető meg (132).

## 2.11. A D-vitamin és a HCC

A D-vitamin daganatokban betöltött szerepéről már az előzőekben volt szó (4). Hogy milyen intracelluláris hatásokon keresztül fejti ki antitumor hatását, az minden daganattípusnál különbözik, még egy daganattípuson belül is változik, a daganatok heterogenitását és komplex intracelluláris jelátviteli folyamatait ismerve. A tudomány mai állása szerint, a parciális hepatectomia a HCC standard kezelése azoknál a betegeknél, akiknél a daganat rezekálható, illetve nincs előrehaladott cirrhosisuk. Ugyanakkor a májtranszplantáció és a rádiófrekvenciás abláció a rezekcióval összevethető eredményeket hozhat, különösen, ha a tumor kisebb, mint 3 cm (133). Egy Child-Pugh A stádiumban lévő beteg, akinek van egy szolid tumora, a fentebb említett radikális kezelési módszerekkel az 5 éves túlélése elérheti a 70%-ot, ugyanakkor kezelés nélkül a 3 éves túlélése csupán 65% lenne (134). Ugyanakkor az előrehaladott stádiumban lévő betegek, akik alkalmatlanok bármilyen kezelésre, az átlagos túlélési

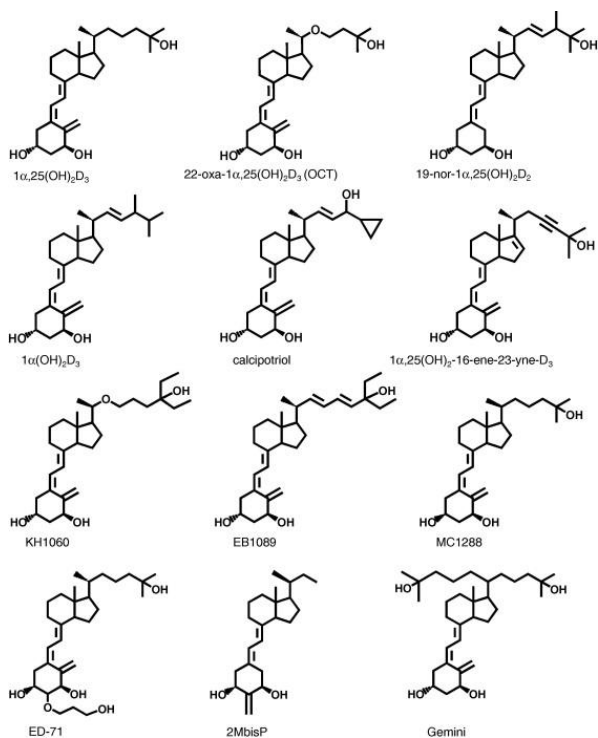
idejük kevesebb, mint 6 hónap (135). Azonban a HCC-s betegek nagy része (70-80%) közepes-előrehaladott stádiumban kerül diagnosztizálásra, amelyben jelenleg nem áll rendelkezésre hatékony, kuratív módszer a kezelésre (134). Mindezek alapján nyilvánvaló, hogy új, hatékony terápiás módszerek kifejlesztésére van szükség a HCC kezelésében. Számos új kemoterápiás szerről merült fel, hogy hatékony lehetne, mint az octreotid, interferon, interleukin-2, tamoxifen, de sem önállóan, sem kombinációban alkalmazva őket nem hosszabbították meg a betegek túlélését (136).

A HCC molekuláris biológiájának pontosabb megismerése és megértése elősegítette egy új szisztémás szer, a multi-kináz inhibitor (VEGFR, PDGF, c-kit receptor, Raf gátló) sorafenib megjelenését és per os alkalmazását HCC-s betegek esetén, ami az átlagos túlélését szignifikánsan meghosszabbította (137). Magyarországon 2008 óta van forgalomban Nexavar® néven. Számos klinikai vizsgálat folyik a sorafenib és erlotinib kombinációról, vagy a linifanibbel való összehasonlításról első vonalbeli kezelésként (138). Azon betegek számára, akik nem tolerálják a sorafenib kezelést, második vonalbeli kezelésként brivanib, everolimus vagy monoklonális antitestek (ramucirumab) vizsgálata zajlik (138). A jövő a személyre szabott terápiájé, amely során a különböző onkogének és ezen gének biomarkereinek azonosítása, lehetővé tenné az egyénre szabott célzott tumorelles kezelést.

Az elmúlt két évtizedben a D-vitamin antiproliferatív, pro-differenciálódást, pro-apoptotikus, antiangiogenetikus hatása miatt számos daganat, így a HCC kutatás homlokterébe is bekerült. In vitro vizsgálatokat, preklinikai állatkísérleteket és klinikai vizsgálatokat is végeztek a D-vitamin hatásának vizsgálatához HCC-ben. Pourgholami és munkatársai bebizonyították, hogy az  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -nek jelentős növekedésgátló hatása van HepG2 és Hep3B sejtvonalakon (117). Azt már előzetesen bebizonyították, hogy a D-vitamin p21 és p27 indukciója révén, D1, E és A ciklinek és ciklindependens kináz 2 és 4 szupresszióját okozza számos sejtvonalon, ezáltal a sejtciklust a G0/G1 átmenetnél állítja le (139). A D-vitamin, mint szisztémás szer, illetve a terápiás hatás eléréséhez szükséges dózis alkalmazása hiperkalcémiát és hiperkalciuriát okozó hatása miatt korlátozott. Több ezer D-vitamin analóg van vizsgálat alatt, amelyek nem okoznak hipercalcaemiát, illetve még jelentősebb antitumor hatással bírnak, mint a D-vitamin. Ugyanakkor Morris és munkacsoportja lipiodolban oldott  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  hepatikus artériába történő beadásával érte el a tumorban érvényesülő magas D-vitamin

koncentrációt, kiküszöbölve ezzel a súlyos, nem kívánt szisztémás hatásokat, illetve, hogy az aktív D-vitamin 24-hidroxilációja megtörténjen a kívánt hatás helyének elérése előtt (111).

HCC esetén két D-vitamin analóg, EB 1089 és CB 1093 áll kipróbálás alatt (140). Chiang és munkatársai egy újabb vegyületet, a MART-10 –et teszteltek HepG2 sejtvonalon, amelynek antiproliferatív hatása 100-szor hatékonyabbnak bizonyult a  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -nál (141). Továbbá bizonyított, hogy a D-vitamin kezelést halolajjal kombinálják, a hatékonyság sokszorosára emelkedik (116). Ghous és munkacsoportja bizonyította, hogy az EB1089 analóg hatékonyan gátolta a HCC növekedését xenograft állatmodellben anélkül, hogy hiperkalcémiát okozott volna (115). Sőt az EB1089 kemoprevencióként is hatásos, állatkísérletben 2 hónapig történő rendszeres adását követően a HCC incidenciája 36,4%-ról 3,9%-ra csökkent (112). Számos más D-vitamin analógot és VDR aktivátort fejlesztettek, mint a Maxacalcitol, 16-ene analógok, 19-nor analógok,  $1\alpha$ -hydroxivitamin D5, LG190119, C-20 cyclopropylcalcitriol, elocalcitol, Gemini D-vitamin analógok, amelyek vizsgálata preklinikai stádiumban van (142) (5. ábra).



5. ábra: D-vitamin analógok (Brown nyomán (142)).

A HCC hatékony kezelési módjának megtalálása sürgető feladat. Az eddigi vizsgálatok alapján a D-vitamin és analógjairól bebizonyosodott, hogy hatékony részei lehetnek az előrehaladott HCC kezelési protokolljának. Az EB1089-cel végzett fázis II. vizsgálat során 56 inoperábilis HCC-s beteget kezeltek per os egy éven át. Habár szignifikáns túlélési idő növekedést nem lehetett kimutatni (kontroll csoport hiányában), 2 beteg esetén csökkent a tumor mérete, 12 betegnél pedig stabilizálódott a betegség (113). Nyilvánvalóan további vizsgálatok szükségesek az EB1089 HCC-ben való hatékonyságának bizonyítására, illetve terápiás hatékonyságának különbözőségének az okának a megértésére.

## **2.12. VDR polimorfizmus vizsgálatok**

A VDR gén szekvenciájának nagy részét Miyamoto és munkatársai írták le 1997-ben (143). A gén a 12q13.1 régióban helyezkedik el, hosszúsága 100kb felett van. Számos VDR polimorfizmust kapcsolatba hoztak néhány malignus betegséggel, sőt néhány daganat esetén, mint prosztata, emlő, veserák, a prognózissal is összefügg (144). Ezidáig 25 gyakori VDR polimorfizmust azonosítottak a kaukázusi populációban (68). Ezek a polimorfizmusok érinthetik a  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  kötőhelyét a VDR-hez, a VDRE-t, ami végül a transzkripció aktivitást és a protein szintézist befolyásolja. Falletti és munkacsoportja májtranszplantáción átesett betegek körében vizsgálta a VDR polimorfizmust. HCC-t 80 esetben diagnosztizáltak, a FokI, BsmI, ApaI és TaqI VDR polimorfizmusokat vizsgálta, és azt találta, hogy a BsmI génben a b/b genotípus hordozó, illetve a TaqI génben a T/T genotípus hordozás esetén magasabb a HCC incidenciája (145). Továbbá alkoholos májbetegségben a BAT gén A-T-C és a G-T-T haplotípusa HCC-re hajlamosított. Ezzel ellentétben Huang és munkatársai azt találták, hogy HBV hordozóknál a VDR polimorfizmus befolyásolja a betegség fenotípusát, de nem mutat összefüggést a HCC kialakulásával (35). Yao és munkacsoportja 968 HBV fertőzött beteg bevonásával végzett ezirányú vizsgálatot. 436 esetben diagnosztizáltak HCC-t, 532 esetben HCC nem volt kimutatható. Azt találták, hogy HCC-s betegekben a FokI TT genotípusa gyakoribb volt, mint a HCC nélküli betegekben. Továbbá a TT genotípus hordozóknál előrehaladott tumorstádium, cirrhosis jelenlétével, és

nyirokcsomó metasztázissal lehetett számolni. Következtetésként felvetették, hogy a FokI gén polimorfizmus molekuláris markerként használható, prediktív markere lehetne a HBV fertőzött betegekben a HCC kockázatának megbecsülésére (146).

Számos onkogenetikai útvonalról HCC-ben végzett vizsgálat során derült ki, hogy szerepet játszik benne a D-vitamin, mint például a VEGFR és az epidermális növekedési faktor útvonal is (147; 148). Bebizonyították, hogy a D-vitamin képes csökkenteni az epidermális növekedési faktor receptor expressziót, ami a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) gátlásához, és a sejt differenciáció, az apoptózis és a sejtnövekedés gátlásához vezet (149). Ehhez hasonlóan a D-vitamin gátolja az endoteliális sejtnövekedést, és ezáltal gátolja a angiogenezésist (150; 151). Az pedig régebb óta ismert, hogy HCC-ben a VEGFR túlexpressziója és a magas érsűrűség negatívan befolyásolja a prognózist (152). A glükokortikoidok a VDR átírásának serkentésén keresztül fokozzák a D-vitamin antitumor hatását (153).



### 3. CÉLKITŰZÉSEK

A hepatocelluláris carcinóma incidenciája az irodalmi adatok szerint emelkedőben van. Magyarországon kevés epidemiológiai adat áll rendelkezésre HCC-vel kapcsolatban. A HCC kezelési lehetőségei korlátozottak, a túlélési ideje rövid. A D-vitamin és analógjainak antitumor hatása hepatocellularis carcinómában számos vizsgálat tárgya. A kutatásokból úgy tűnik, hogy nem minden sejtvonalban, illetve nem minden beteg esetén egyformán érvényesül a tumorelles hatás. Ennek pontos oka nem ismert. Feltételezhető, hogy a D-vitamin HCC-ben VDR-en keresztül hat. Ugyanakkor a CYP27B1, a CYP24A1 enzimek kitüntetett jelentőséggel bírnak a lokálisan elérhető szöveti D-vitamin mennyiségének szabályozásában. A VDR és az anyagcserében kulcsszerepet játszó enzimek expressziójának vizsgálata lehetővé teszi, hogy megértsük a D-vitamin hatás különbözőségét HCC-ban a környező tumormentes májszövetrel összehasonlítva. Vizsgálataink célkitűzései ezért a következők:

#### 3.1. Hepatocelluláris carcinómás betegek epidemiológiai vizsgálata a Semmelweis Egyetem I.sz. Belklinikán

1. Melyek a legfontosabb etiológiai tényezők a HCC kialakulásában?
2. Milyen a nemek közötti, életkor szerinti, a cirrhosis – cirrhosis nélküli májban kialakult HCC megoszlási aránya?
3. Mennyi a betegek átlagos túlélési ideje?
4. Milyen a HCC-s betegek szérum AFP szintjének eloszlása?

#### 3.2. D-vitamin hatásának vizsgálata különböző HCC sejtvonalakon in vitro

1. Expresszálódnak-e a VDR, CYP24A1 és CYP27B1 enzimek a különböző HCC sejtvonalakban?
2. Ha igen, változik-e az expresszió mértéke  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  adására in vitro?
3. Ha változik, van-e különbség az egyes sejtvonalak között?
4. Hogyan változik az expresszió a  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  kezelés időtartamának, illetve az dózisának függvényében az egyes HCC sejtvonalakban?

### 3.3. Humán vizsgálatok

1. Expresszálódik-e humán tumormentes májszövetben és HCC szövetben a VDR, a CYP27B1 és a CYP24A1?
2. Ha igen, van-e expressziókülönbség a HCC és a környező tumormentes májszövet között?
3. Van-e expressziókülönbség a fenti enzimekben a cirrhosis talaján kialakult HCC és a cirrhosis nélküli májban kialakult HCC között?
4. Van-e expressziókülönbség a fenti enzimekben a különböző etiológia talaján kialakult HCC között?
5. Van-e összefüggés a CYP24A1, a CYP27B1 és VDR gének expresszió mértéke és a betegek klinikopatológiai paraméterei (nem, grade, kor, metasztázis, stb.) között?
6. Van-e összefüggés a CYP24A1, a CYP27B1 és VDR gének expresszió mértéke és a betegek túlélése között?

## **4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### **4.1. Hepatocelluláris carcinómás betegek epidemiológiai vizsgálata**

#### *4.1.1. Betegek*

A Semmelweis Egyetem I.sz. Belgyógyászati Klinikán 2004 és 2009 között diagnosztizált hepatocellularis carcinómás eseteket gyűjtöttük össze. A klinikopatológiai adatokat (életkor, nem, cirrhosis jelenléte, AFP, stb), az etiológiai tényezőket vizsgáltuk retrospektíven. Az adatokat a Semmelweis Egyetem hivatalos informatikai rendszerének adatbázisából (MedSol), illetve a betegek kórlapjaiból gyűjtöttük ki előzetes etikai engedély birtokában (Semmelweis Egyetem, Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottság, TUKEB szám: 199/2009). A HCC-ben szenvedő betegek listáját a hivatalosan alkalmazott BNO kódok alapján kerestük: C2200 – májsejt rák, C2290 – máj rosszindulatú daganata, k.m.n., C2270 – A máj egyéb meghatározott rákjai.

Ezzel a módszerrel összesen 163 HCC-ben szenvedő beteget találtunk a fent említett időszakban. A vizsgálat szempontjából releváns adat összesen 102 beteg esetében állt rendelkezésre, így a statisztikai feldolgozás során ezt a betegcsoportot használtuk. Kriptogénnek neveztük azt az etiológiát, akinek az anamnézisében kizárható a hepatitis B, C vírus infekció, alkohol fogyasztás, egyéb toxikus hatások, illetve az autoimmun májbetegségek, a Wilsón-kór és a hemochromatosis is.

#### *4.1.2. Statisztikai értékelés*

Az adatokat Windows-on alkalmazott SPSS (18. Verzió, IBM, Armonk, NY, USA) programmal értékeltük. Az eredményeket átlag  $\pm$  standard hiba-ként adtuk meg.

### **4.2. D-vitamin hatásának vizsgálata különböző HCC sejtvonalakon in vitro**

#### *4.2.1. Sejtvonalak*

In vitro vizsgálatokat 4 különböző humán HCC sejtvonalon végeztünk: HepG2, Huh-Neo, Huh5-15 és Hep3B. Huh-Neo és Huh5-15 sejtvonalakat a németországi

Heidelbergi Egyetem Molekuláris Virologiai Tanszéke biztosította számunkra a Semmelweis Egyetem I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetén keresztül. A Huh-Neo sejtvonal neomicin foszfortranszferáz gént tartalmaz, ezáltal rezisztens a neomicinre (154). A Huh5-15 sejtek subgenomikus HCV replikont tartalmaznak (I<sub>389</sub>hyg-ubi/NS3-3'), R. Bartenschlager által a Heidelbergi Egyetemen kifejlesztve (155; 156). A HepG2 (ATCC® no. HB-8065 HepG2) eredetileg egy 15 éves kaukázusi-amerikai férfi magasan differenciált hepatocelluláris carcinómájából származik (Sigma-Aldrich GmbH, St. Louis, MO, USA). A Hep3B szintén magasan differenciált sejtvonal egy 8 éves fekete nőbetegből, amely HBV integrált genomot tartalmaz (Sigma-Aldrich GmbH) (157; 158). A sejteket Dulbecco's Modified Eagle's Medium-ban inkubáltuk (Life Technologies – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), ami 10% magzati borjú szérumot (Life Technologies – Invitrogen), 1 mM nátrium piruvátot (Sigma-Aldrich GmbH), 100 IU penicillint, 100 g/ml streptomocint és 4 mM glutamint (valamennyi a Life Technologies – Invitrogen-től) tartalmaz, 37°C-on, 95%-os párasított atmoszférikus levegőn és 5% CO<sub>2</sub>-on inkubálva. A médiumot minden második nap cseréltük a sejteken. A sejt szubkultúrákat a következők szerint tenyésztettük: a médium eltávolítása után, a sejteket 2 ml tripszin-EDTA oldattal választottuk el a tenyésztő edény felületéről, szobahőmérsékleten hagyva 3-4 percig, amíg a sejtek leválnak az edény felületéről, ezt követően friss tenyésztő oldattal leválasztottuk, pipettával felszívtuk és új tenyésztő edénybe injektáltuk a sejteket.

#### 4.2.2. *1 $\alpha$ ,25(OH)2D3* inkubáció

A biológiailag aktív 1 $\alpha$ ,25(OH)2D3 (Sigma-Aldrich GmbH) hormont 100 M koncentrációjú etanolban oldottuk, és Opti-MEM-ben hígítottuk (Life Technologies – Invitrogen) 0,1% koncentrációjúra. A kontroll sejt kultúrákat 0,1% -ban etanolt tartalmazó Opti-MEM –mel kezeltük a többi sejt kultúrával megegyező ideig. Minden egyes sejtvonal tenyészetet 1 nM és 10 nM D-vitamint tartalmazó Opti-MEM oldatban kezeltük 5 órán keresztül, 37°C-on, párasított levegőben, amely 95% légköri levegőt és 5% CO<sub>2</sub>-ot tartalmazott. A sejteket előzőleg leírtak alapján összegyűjtöttük és mértük a CYP24A1, CYP27B1 és VDR mRNS expressziókat. A dózisfüggés vizsgálatában a sejteket különböző mennyiségű 1 $\alpha$ ,25(OH)2D3–mal kezeltük (0,256; 0,64; 1,6; 4,0; 10,0 nM) 5 órán át két párhuzamos sejtvonalon. Az időfüggés

vizsgálatára valamennyi sejtkultúrát 4nmol  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -mal kezeltük 30 percig, 1, 2, 5, 8, 10, 12, 14, 24, 26 és 28 órán át két párhuzamos sejtvonalon. Kontrollként D-vitamin nélküli, standart körülmények között tartott sejteket alkalmaztunk. Valamennyi D-vitamint tartalmazó oldatot szérum-mentes Opti-MEM-ben oldottuk. A kísérleteket három alkalommal ismételtük meg, és az eredmények átlagát vettük.

#### 4.2.3. RNS izolálás, cDNS szintézis és kvantitatív RT-PCR

A totál RNS-t Roche High Pure Total RNA Isolation Kit (Roche, Indianapolis, IN, USA) segítségével izoláltuk a gyártó utasításait követve. 500 nanogramm totál RNS-t írtunk át cDNS-é reverz transzkriptázzal (Promega, Madison, WI, USA). A valós idejű PCR vizsgálatokat TaqMan Gene Expression Assays kittel végeztük az Applied Biosystems-től (Life Technologies – Invitrogen) a gyártó utasításai szerint. Minden egyes kit tartalmazott génspecifikus forward és reverz primert és fluoreszcens génpróbát (Applied Biosystems TaqMan® Assays). Endogén kontrollként GAPDH-t használtunk. A különböző génekre alkalmazott primerek a következők voltak: Hs00167999\_m1 a CYP24A1, Hs99999905\_m1 a gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH), Hs00168017\_m1 a CYP27B1 és Hs00172113\_m1 a VDR mRNS kimutatására. A PCR vizsgálatot a következő protokoll szerint végeztük: 10 perc 95°C-on történő deszaturáció, 45 ciklus ciklusonként 15 másodperc 95°C-on történő deszaturáció, ezt követően 1 perc hőkezelés 60°C-on. A PCR reakciós elegy (20  $\mu\text{l}$ ) tartalma: 2  $\mu\text{l}$  cDNS, 10  $\mu\text{l}$  TaqMan x2 Universal PCR Master Mix NoAmpErase UNG (Applied Biosystems), 1  $\mu\text{l}$  génspecifikus TaqMan Gene Expression Assay Mix és 7  $\mu\text{l}$  desztillált víz. A minták génexpressziós eredményeit ABI Prism 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems) segítségével értékeltük. Relatív kiértékelő vizsgálatokat a 7500 System SDS software 1.3 (Applied Biosystems) használatával végeztünk.

#### 4.2.4. CYP24A1 immuncitokémiai vizsgálata

Az immuncitokémiai vizsgálatokhoz a sejteket speciális sejttenyésztő lemezen (Lab-Tek® Chamber Slide™ and Lab-Tek® Chambered Coverglass, Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen, Germany) inkubáltuk a korábbiaknak leírtaknak megfelelően. A CYP24A1 fehérje kimutatásához kétlépcsős indirekt immunperoxidáz

módszert alkalmaztunk. Antitestként WH0001591M7 (egérben előállított monoklonáris anti-CYP24A1, klón 1F8 antitest; Sigma-Aldrich) használtunk a gyártó utasításait követve. Normál veseszövetet használtunk pozitív kontrollként.

#### 4.2.5. Statisztikai analízis

Az adatokat Windows-on alkalmazott SPSS (18. Verzió, IBM, Armonk, NY, USA) programmal értékeltük. A végső eredményt két független változó átlagából számoltuk. Az eredményeket átlag  $\pm$  standard hiba-ként adtuk meg. A statisztikai analízist kétmintás Student t-próbával végeztük. Statisztikailag szignifikánsnak a  $p < 0,05$  értéket vettük.

### 4.3. Humán vizsgálatok

#### 4.3.1. Betegek és szövettani minták a CYP24A1 mRNS és fehérje vizsgálatához

A humán szövettani minták felhasználására a Semmelweis Egyetem Tudományos Kutatás-Értékelési Bizottság által kiadott engedély birtokában került sor (ETT TUKEB 5637-0/2010-1018EKU – 402/PI/010). A minták 2003 és 2011 között a Semmelweis Egyetemen diagnosztizált és az I.sz. Sebészeti Klinikán terápiás céllal májrezekción átesett HCC-ben szenvedő betegek tumorszövetéből, illetve az azt körülvevő tumormentes májszövetéből származnak. Valamennyi minta patológiai feldolgozása és kiértékelése a Semmelweis Egyetem II. sz. Patológiai Intézetében történt.

A CYP24A1 mRNS expresszió vizsgálatához 13 HCC-ben szenvedő beteg daganatos és tumormentes májszövetének friss fagyasztott mintáit használtuk fel. A májrezekció során nyert szövetminták egy részét azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük, és  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk az RNS izolálásig. A minta másik feléből formaldehidbe való fixálás, majd paraffinba ágyazást követően hematoxin-eozinnal festett szövettani metszet készült, amit az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz használtunk fel. A 13 beteg férfi-nő aránya 8/5, átlagéletkoruk  $64 \pm 14,8$  év. A HCC etiológiai megoszlása a következő: 6 alkohol, 2 HCV, 1 HBV és 4 kriptogén. A betegek klinikai adatai az 1. táblázatban találhatóak.

1. táblázat: A betegek klinikai paramétereit a CYP24A1 expresszió vizsgálatához (SD: standard deviáció)

paraméterek	májcirrhosis (n <sub>1</sub> =9)	májcirrhosis nélkül (n <sub>2</sub> =4)
kor (év±SD)	67,6±7,2	56,0±24,8
nem (férfi/nő)	6/3	2/2
AFP (mg/ml±SD)	80,66±119,0	1220,3±2107,3
szérum kalcium (mmol/L±SD)	2,07±0,15	2,40±0,15
tumor mérete (cm <sup>3</sup> )	964,5±1609,8	1246,1±1163,8
szolid/multiplex tumor	7/2	4/0
metasztázis jelenléte	2	1

#### 4.3.2. Betegek és szövettani minták a CYP27B1 és VDR mRNS vizsgálatához

A CYP27B1 és a VDR mRNS vizsgálatához és összehasonlításához 36 HCC-ben szenvedő beteg daganatos és tumormentes májszövetének paraffinba ágyazott szövettani mintáiból készült metszeteit használtuk fel. A 36 beteg férfi-nő aránya 27/9, átlagéletkoruk 64±12,66 év volt. A HCC etiológiai megoszlása a következő: 12 alkohol, 8 HCV, 5 HBV és 11 kriptogén. A betegek klinikai adatai a 2. számú táblázatban találhatóak.

2. táblázat: A betegek klinikai paramétereit a CYP27B1 és VDR mRNS expresszió vizsgálatához (SD: standard deviáció)

paraméterek	májcirrhosis (n <sub>1</sub> =27)	májcirrhosis nélkül (n <sub>2</sub> =9)
kor (év±SD)	64,6±10,4	62,3±16,7
nem (férfi/nő)	23/4	6/3
AFP (mg/ml±SD)	28515,9±90049,1	182,4±360,4
szérum kalcium (mmol/L±SD)	2,20±0,20	2,63±0,98
tumor mérete (cm <sup>3</sup> )	285,0±407,2	305,98±465,7
szolid/multiplex tumor	23/4	9/0
metasztázis jelenléte	4	1

#### 4.3.3. RNS izolálás

A műtéti rezekátumokból származó májszövet mintákat a rezekció során azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük és -80°C-on tároltuk a feldolgozásig. Totál RNS izolálást High Pure Total RNA Isolation Kit (Roche, Indianapolis, IN, USA) segítségével végeztük a gyártó útmutatása szerint. Az izolált RNS homogenizátumot felhasználásig -80°C-on tároltuk.

A 36 betegből származó paraffinba ágyazott tumoros és tumormentes májszövetből a High Pure RNA Paraffin Kit (Roche, Indianapolis, IN, USA) segítségével totál RNS-t izoláltunk a gyártó útmutatása alapján. A fenti módszerekkel izolált RNS koncentrációját NanoDrop spektrofotométerrel (NanoDrop, Technologies Montchanin, DE USA) határoztuk meg, az RNS minőségi kontrollját RNáz-mentes 1%-os agaróz gélen (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) történő futtatással végeztük. Csak a szabályos 18S és 28S riboszómális RNS-mintázatot mutató próbákat használtuk fel a további vizsgálatokhoz. A genomiális DNS teljes eltávolítására DNáz kezelést



alkalmaztunk (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) a gyártó útmutatása szerint.

#### 4.3.4. A VDR, CYP27B1 és CYP24A1 génexpresszió vizsgálata

A génexpressziót valós idejű RT-PCR vizsgálattal végeztük. 500 ng RNS-t írtunk át cDNS-sé random hexamer primerek és Moloney Murine lekuemia vírus (M-MLV) reverz transzkriptáz segítségével a gyártó (Promega, Madison, WI, USA) utasítása szerint. Próbánként 500 ng RNS-t, 6  $\mu$ l reverz transzkriptáz puffert, 1,5  $\mu$ l random hexamer primert, 3  $\mu$ l dNTP-t, 1,5  $\mu$ l reverz transzkriptázt használtunk fel. A humán VDR, CYP27B1 és CYP24A1 génexpresszió összehasonlító vizsgálatát komparatív  $\Delta\Delta$ CT módszerrel végeztük (SDS software Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A vizsgált gének expressziós értékeinek kiszámításához az endogén kontrollként használt ubiquitin C expresszió szintjéhez viszonyított értékeit és ennek expressziós mértékével normalizált használtuk. A valós idejű RT-PCR vizsgálathoz a POWER SYBR®Green PCR Master Mix-et és az ABI StepOnePlus Realtime PCR System-et (mindkettő Applied Biosystems) használtunk. A polimeráz láncreakció során alkalmazott program a következő volt: 2 percig 50 °C, 2 percig 94 °C majd 40 ciklus (15 perc 94°C és 30 másodperc 60°C). A specifikus szensz és antiszensz primerek (Applied Biosystems) a következők voltak:

Hs00167999\_m1 a CYP24A1, Hs00168017\_m1 a CYP27B1 és Hs00172113\_m1 a VDR esetén.

#### 4.3.5. A CYP24A1 fehérje indirekt immunhisztokémiai kimutatása

A CYP24A1 fehérje kimutatásához kétlépcsős indirekt immunperoxidáz módszert alkalmaztunk az mRNS vizsgálatához alkalmazott metszetek friss fagyasztott mintáknak megfelelő 5  $\mu$ m vastag paraffinba ágyazott metszetein. Antitestként WH0001591M7 (egérben előállított monoklonáris anti-CYP24A1, klón 1F8 antitest; Sigma-Aldrich) használtunk a gyártó utasításait követve 1:200-szoros hígításban. Normál veseszövetet használtunk pozitív kontrollként. A CYP24A1 protein expresszió mértékét szemikvantitatív módon értékeltük. Véletlenszerűen kiválasztott 10 különböző látótérben 500 sejtet számoltunk meg 40x nagyításban (Nikon Eclipse E400, Tokió,

Japán). A festődés mértékét a következő módon osztályoztuk: festődés nélkül (negatív), enyhén pozitív (+), mérsékelten pozitív (++) , erősen pozitív (+++).

#### *4.3.6. Statisztikai értékelés*

Az adatokat Windows-on alkalmazott SPSS (18. Verzió, IBM, Armonk, NY, USA) programmal értékeltük. A végső eredményt két független változó átlagából számoltuk. Az eredményeket átlag  $\pm$  standard hiba-ként adtuk meg. A statisztikai analízist kétmintás Student t-próbával végeztük. Statisztikailag szignifikánsnak a  $p < 0,05$  értéket vettük.

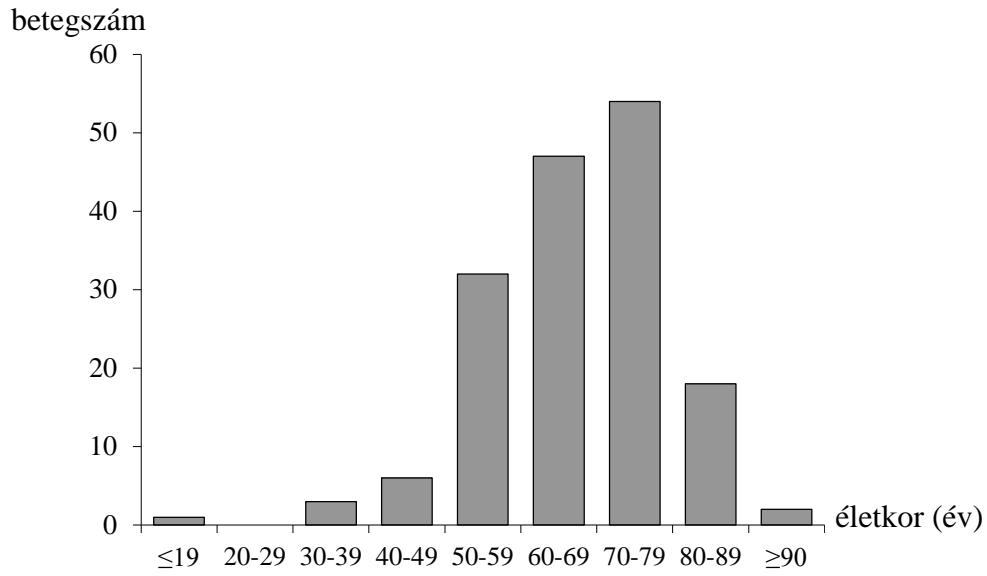
## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. Hepatocelluláris carcinómás betegek epidemiológiai vizsgálata

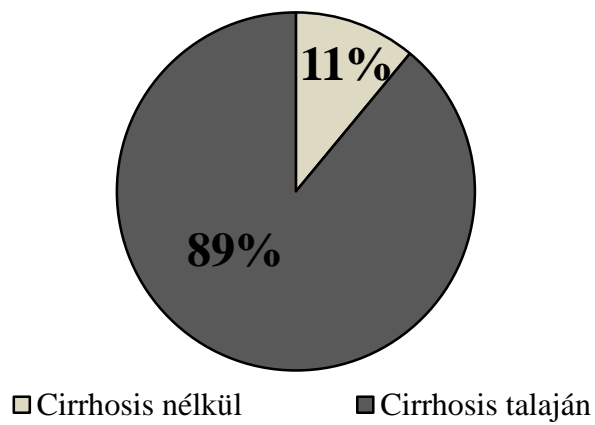
Összesen 163 HCC-s beteg adatait dolgoztuk fel a kórkép epidemiológiai vizsgálatának céljából. A nemek közötti megoszlás a következő volt: 113 férfi (69%), 50 nő (31%). Átlagéletkor 64 év, amely nem különbözött szignifikánsan a két nem között. A legfiatalabb beteg 19 éves, a legidősebb 91 éves volt. A betegek nagy része 70-79 éves kora között került diagnosztizálásra, de szinte minden életkorban előfordulhat a betegség (6. ábra). A betegek mindössze 3,68%-a volt életben 5 évvel a HCC diagnózisának felállítása után. A hepatocellularis carcinóma az esetek 89%-ban cirrhosis talaján alakult ki (7. ábra).

Az etiológiai tényezők vizsgálata során 163-ból 102 esetben találtunk adatot. Ennek a magyarázata egyrészt az adminisztrációs hibára vezethető vissza, másrészt sok esetben a betegség igen késői stádiumban került felfedezésre, fulmináns lefolyású volt, így nem volt lehetőség a beteg társbetegségeinek, illetve az etiológiai faktorok kivizsgálására. Másrészt csupán néhány éve ismert és használatos a hepatológiai gyakorlatban az elmélet, miszerint a nem-alkoholos steatohepatitis májcirrhosis nélkül is rizikófaktora a hepatocelluláris carcinóma kialakulásának. Feltételezésünk szerint a nem cirrhotikus betegek nagy része ebben a kórképben szenvedett, illetve ez lehet az egyik oka a betegek egy részénél az „ismeretlen etiológiájú” májcirrhosis kialakulásának.

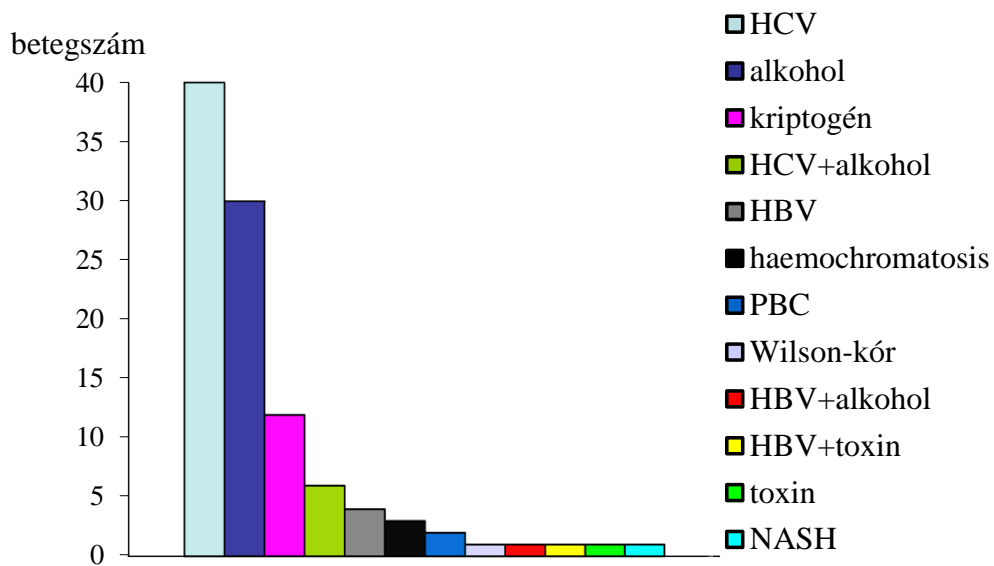
Az általunk vizsgált betegcsoportban a HCC kialakulásában szerepet játszó leggyakoribb etiológiai tényező a hepatitis C vírus fertőzés volt, 102-ből 40 esetben (39%). A második leggyakoribb ok az alkohol (30/102, 29%), ezt követi a kriptogén etiológia (12/102, 11,8%). Krónikus hepatitis B vírus fertőzése 4 (4%), haemochromatosis 3 (3%), primer biliáris cirrhosis 2 (2%), Wilson-kórja és nem-alkoholos steatohepatitise 1-1 hepatocellularis carcinómás betegnek volt. Az anamnézisben két esetben szerepel szerves oldószer expozíció. A betegek egy részében (8/102, 7,6%) több környezeti tényező szerepel egyidőben (alkohol+HCV, alkohol+HBV, HCV+toxin) (8. ábra).



6. ábra: HCC-s betegek életkor szerinti megoszlása a diagnóziskor

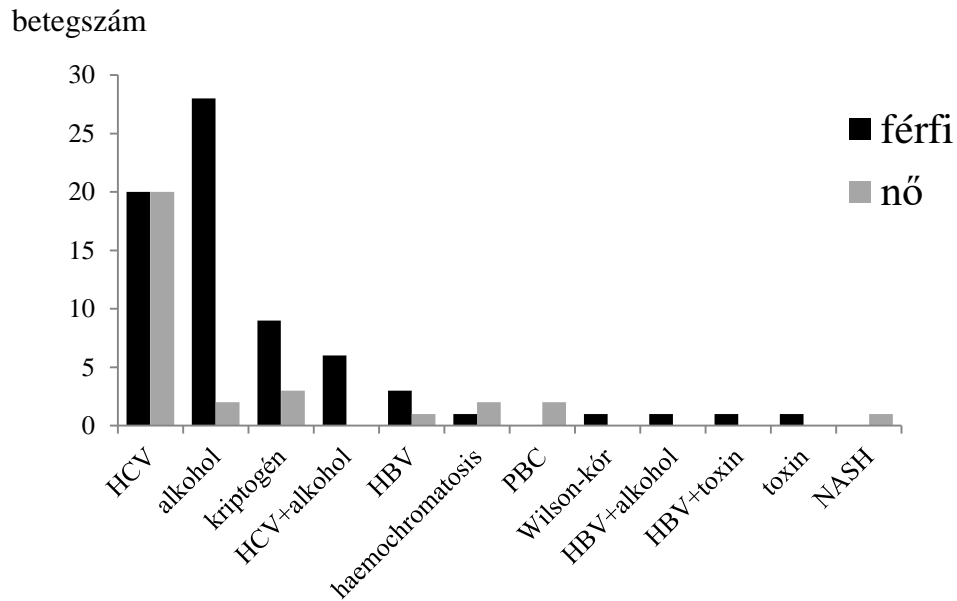


7. ábra: HCC megoszlása a cirrhosis jelenlétének függvényében



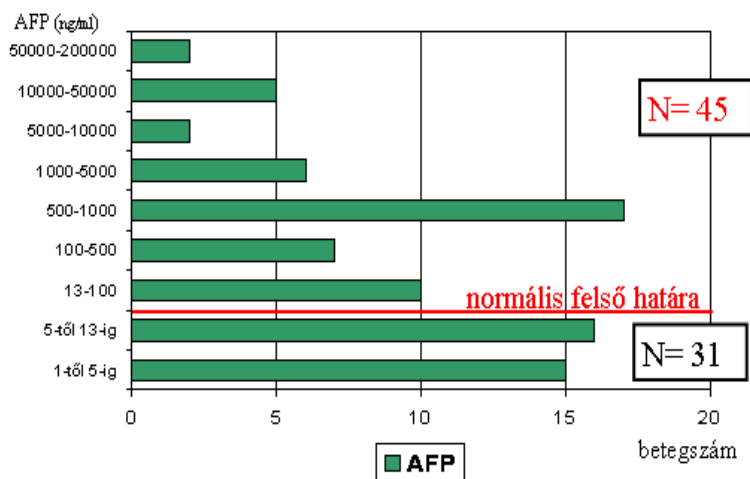
8. ábra: A HCC-s betegek etiológia szerinti megoszlása (n=102)

A HCC etiológiáját nemek szerint vizsgálva azt találtuk, hogy a női nemmel ellentétben férfiakban nem HCV krónikus fertőzés, hanem a krónikus alkoholfogyasztás szerepel, mint leggyakoribb etiológiai tényező. Ezt követi a HCV infekció, majd a kriptogén eredet, és a HCV krónikus hepatitis és az alkoholfogyasztás együttes jelenléte is gyakori (9. ábra). A HCV fertőzés egyenlő arányban fordult elő a két nemben. PBC-ban szenvedő betegek mindegyike nő, ugyanakkor a Wilson kór talaján kialakult HCC-s betegek mindegyike férfi.



9. ábra: HCC etiológiai megoszlási különbsége a nemek között (n=102)

Az AFP értékre vonatkozóan 76 betegnél találtunk adatot. Csupán 45 (59%) beteg esetén volt a normálnál magasabb az AFP értéke (10. ábra). Az átlagérték 5635,5 ng/ml, a legmagasabb érték 104800 ng/ml volt.



10. ábra: AFP értékek megoszlása a HCC-s betegekben

Az anamnesztikus adatokat részletesen vizsgálva azt találtuk, hogy a májrák diagnózisára többnyire már a betegség előrehaladott stádiumában kerül sor. Általában az atípusos panaszok későn jelennek meg, mint jobb bordaív alatti fájdalom, fogyás, anaemia vagy láz (FUO). Szintén előfordulhat, hogy egyéb okból végzett vizsgálatok során véletlenszerűen derül ki a GGT, ALP emelkedés vagy UH vizsgálat során a gócos májelváltozás. Hajlamosító betegség monitorozása, akut vagy tervezett műtét, májtranszplantáció során végzett vizsgálatok során is diagnosztizálásra kerülhet a betegség. Nem ritka, hogy post mortem szekció alkalmával gócos májelváltozást találnak a patológusok, aminek szövettani vizsgálata igazolja a HCC diagnózisát.

## **5.2. Az $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ hatásának vizsgálata különböző HCC sejtvonalakon in vitro**

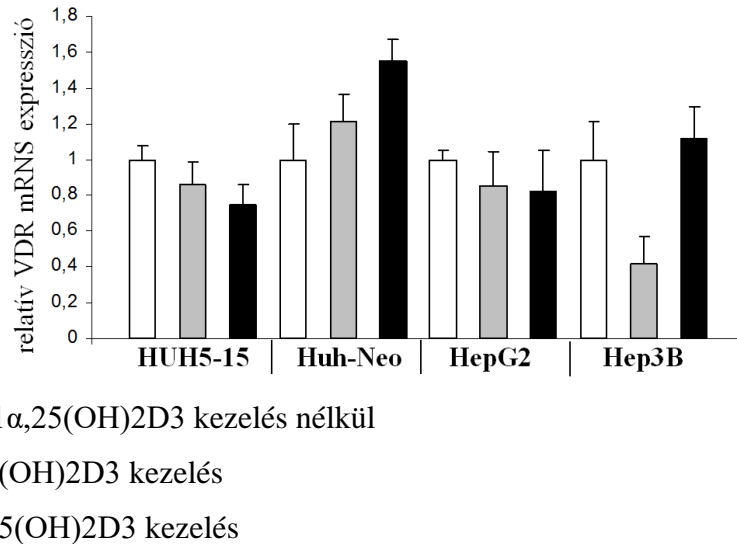
Vizsgálataink következő részében arra kerestük a választ, hogy expresszálódik-e a D-vitamin VDR membránreceptora, a hormont aktiváló CYP27B1, illetve az inaktív CYP24A1 különböző humán HCC sejtvonalakon. Továbbá ha expresszálódik, változik-e az expresszió mértéke a biológiailag aktív  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sejtekhez való adását követően.

Eredményeink szerint, valamennyi általunk vizsgált négy HCC sejtvonal expresszálja mindhárom fentebb nevezett mRNS-t, bár különböző mértékben. Ehhez hasonlóan igen eltérő eredményeket kaptunk az  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  kezelés során a különböző HCC sejtvonalakban. A továbbiakban ismertetem a VDR, CYP27B1 és a CYP24A1 mRNS expressziós eredményeket a HUH5-15, Huh-Neo, HepG2 és Hep3B sejtvonalakon.

### *5.2.1. VDR mRNS expresszió*

Eredményeink alapján mind a négy, fent említett HCC sejtvonal expresszálja a VDR mRNS-t, habár igen alacsony mértékben. Nincs különbség az expresszió mértékében az egyes sejtvonalak között. Ahogy a 11. ábra mutatja, sem az 1nM, sem a 10 nM koncentrációjú  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -mal, 5 órán át történő kezelés során sem volt szignifikáns változás a VDR mRNS expresszióban egyik sejtvonalon sem.

Érdekes módon a HUH5-15 és a HepG2 sejtvonalakon a VDR mRNS expressziója csökkenő, míg a Huh-Neo sejtvonalon növekvő tendenciát mutatott a növekvő koncentrációjú D-vitamin kezelés hatására, bár a változások nem voltak statisztikailag szignifikánsak (11.ábra).



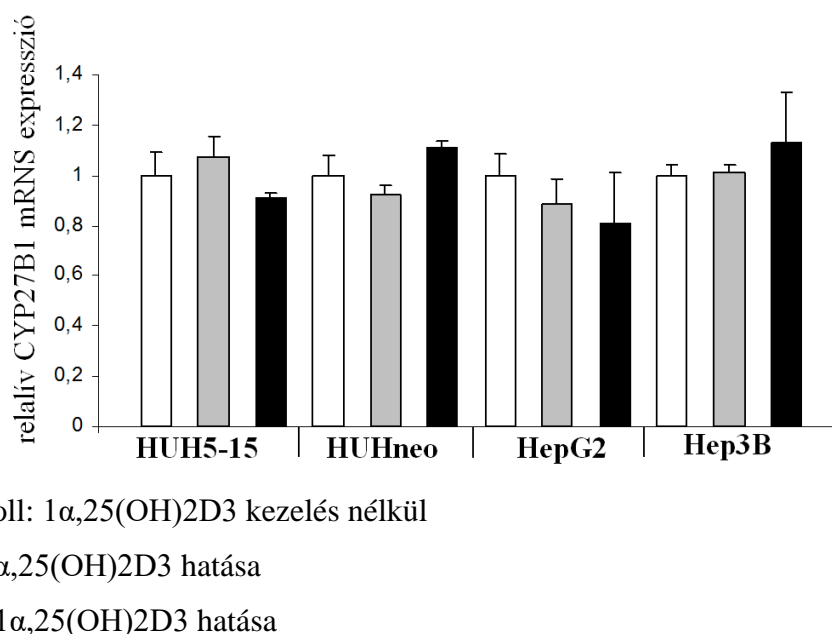
11. ábra: VDR mRNS expresszió mértéke különböző HCC sejtvonalakon 1α,25(OH)2D3-mal történő 5 órás inkubációt követően. Kontrollként a 1α,25(OH)2D3-mal nem kezelt sejteket használtuk.

### 5.2.2. CYP27B1 mRNS expresszió

A VDR mRNS expresszióhoz hasonlóan, a CYP27B1 D-vitamint aktiváló enzim mRNS-e szintén expresszálódik valamennyi általunk vizsgált, fent említett HCC sejtvonalon. Nem volt szignifikáns különbség az expresszió mértékében az egyes sejtvonalak között.

Sem az 1nM, sem a 10nM koncentrációjú 1α,25(OH)2D3-mal történő 5 órás kezelés nem okozott szignifikáns expresszió változást a CYP27B1 D-vitamint aktiváló enzim mRNS expressziójában egyik HCC sejtvonalon sem (12. ábra). Egyedül a HepG2 HCC sejtvonalon volt kimutatható, hogy a D-vitamin dózisának emelkedésével a CYP27B1 mRNS expressziója csökkenő tendenciát mutat, de ez statisztikailag nem szignifikáns.



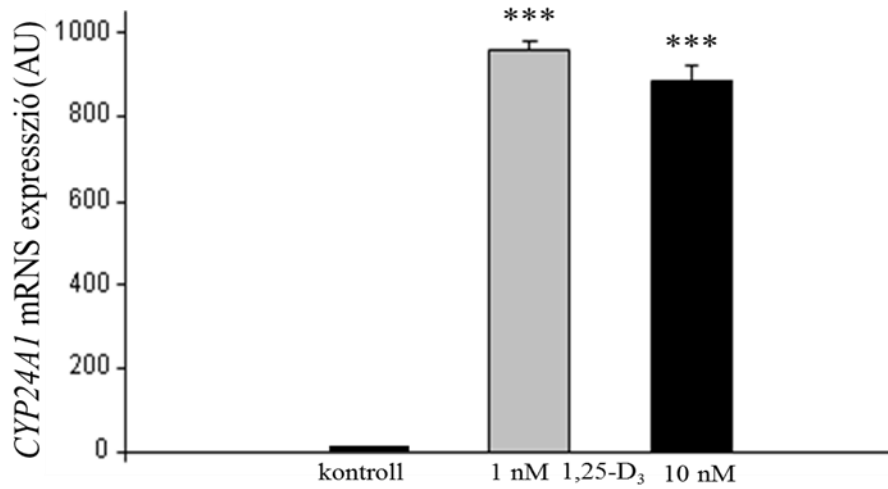


12. ábra: Relatív CYP27B1 mRNA expresszió változások négy különböző HCC sejtvonalon. Kontrollként 1α,25(OH)2D3-mal nem kezelt sejteket használtunk.

### 5.2.3. CYP24A1 mRNA expresszió

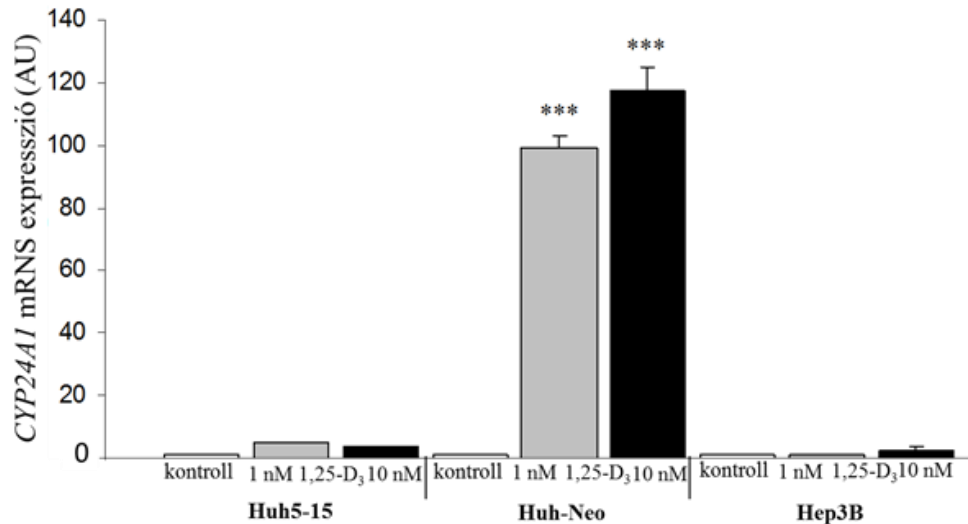
A VDR és a CYP27B1 mRNA-hez hasonlóan, a D-vitamint inaktíváló CYP24A1 mRNA-t is expresszálja mind a négy HCC sejtvonal. Az expresszió mértéke igen alacsony volt. Nincs különbség az CYP24A1 mRNA expresszió mértékében a HepG2, a Huh-Neo, a HUH5-15 és a Hep3B sejtvonalak között.

Ezzel szemben az 1α,25(OH)2D3-mal történő kezelés során igen jelentős különbségeket találtunk a CYP24A1 mRNA expresszió tekintetében a különböző sejtvonalak között. Huh-Neo és HepG2 HCC sejtvonalakon már 1nM koncentrációjú D-vitaminnal való 5 órán át történő kezelés igen jelentős, szignifikáns CYP24A1 mRNA expresszió emelkedést okozott ( $p < 0,0001$ ). A CYP24A1 mRNA növekedés három nagyságrendű volt a HepG2 sejtvonal esetén, és közel 100-szoros a Huh-Neo esetén 1nM D-vitaminnal történő kezelés során. 10-szeres koncentrációjú D-vitamin a Huh-Neo sejteken további szignifikáns CYP24A1 mRNA expresszió fokozódást eredményezett, míg a HepG2 sejtvonalakon nem okozott további jelentős változást. A legmagasabb CYP24A1 mRNA expresszió növekedést a HepG2 sejtvonalon találtuk 1nM mennyiségű 1α,25(OH)2D3 adását és 5 órás inkubációt követően (13. ábra).



13. ábra: CYP24A1 mRNS expresszió változás HepG2 sejtvonalon különböző mennyiségű  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  hatására 5 óra inkubációt követően. Kontroll:  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -mal nem kezelt sejtek. \*\*\*  $p < 0,0001$ . AU: Arbitrary units.  $1,25\text{-D}_3$ :  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

A HepG2 és Huh-Neo sejtvonalakkal ellentétben, a másik két sejtvonalon (HUH5-15, Hep3B) sem az 1nM, sem a 10 nM koncentrációjú D-vitamin nem okozott szignifikáns CYP24A1 mRNS expresszió változást 5 órán át történő inkubációt követően (14. ábra). A négy sejtvonalon tapasztalt expresszióváltozásokat a 3. táblázatban foglaltuk össze.



14. ábra: CYP24A1 mRNS expresszió Huh5-15, Huh-Neo, Hep3B sejtvonalon különböző mennyiségű  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  hatására 5 óra inkubációt követően. Kontroll:  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -mal nem kezelt sejtek. \*\*\*  $p < 0,0001$ . AU: Arbitrary units. 1,25-D<sub>3</sub>:  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

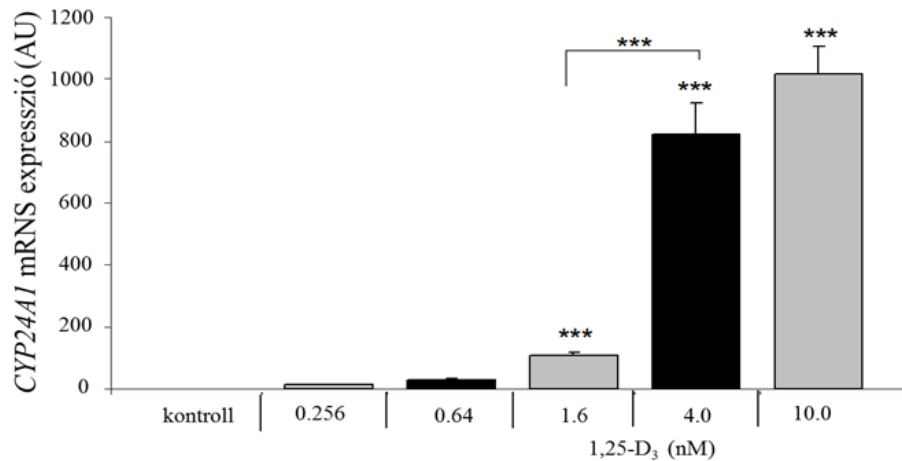
3. táblázat: CYP24A1, CYP27B1 és VDR mRNS expresszió különbségek négy HCC sejtvonalon 1nM és 10nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  adását követően in vitro. Kontroll a  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -mal nem kezelt sejtek expresszió értéke. \* $p < 0,05$

sejtvonal	$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ koncentráció	relatív CYP24A1 mRNS expresszió	relatív CYP27B1 mRNS expresszió	relatív VDR mRNS expresszió
HepG2	0 nM	1	1	1
	1 nM	959,74*	0,89	0,86
	10 nM	887,44*	0,81	0,82
Huh-Neo	0 nM	1	1	1
	1 nM	99,50*	0,92	1,21
	10 nM	117,30*	1,11	1,55
Huh5-15	0 nM	1	1	1
	1 nM	4,80	1,07	0,86
	10 nM	3,81	0,91	0,76
Hep3B	0 nM	1	1	1
	1 nM	1,30	1,01	0,42
	10 nM	2,65	1,13	1,11

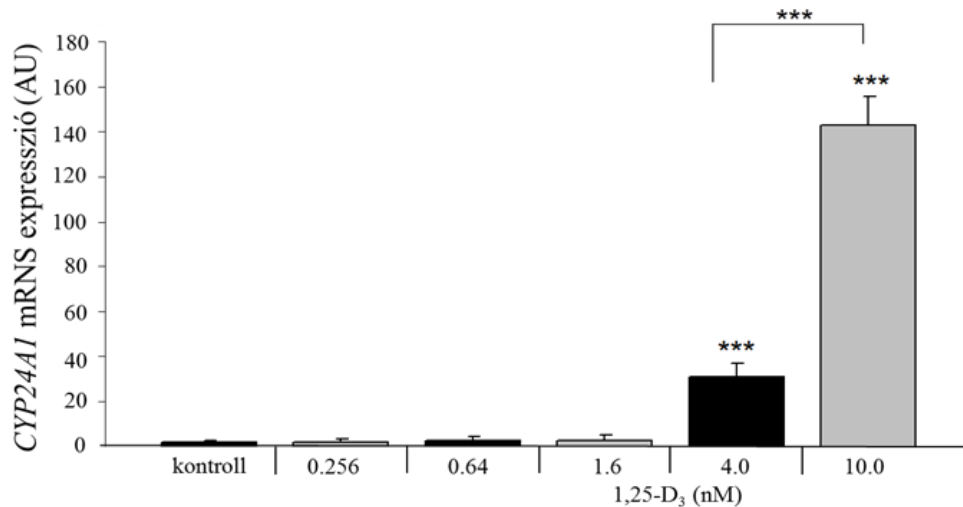
#### 5.2.4. CYP24A1 mRNS dózisfüggő expresszióváltozása

Az előzőekben kapott eredményeink alapján a biológiailag aktív D-vitamin a HepG2 és a Huh-Neo humán HCC sejtvonalakon szignifikáns CYP24A1 mRNS expresszió növekedést okoz. A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  növekvő koncentrációja hogyan befolyásolja a két sejtvonal CYP24A1 mRNS expresszióját, illetve mennyi az a  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  koncentráció, amelynél a legmagasabb a D-vitamint inaktiváló enzim expressziója. Ehhez a sejteket 0,256; 1,6; 4,0 és 10,0 nM emelkedő koncentrációjú  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -mal kezeltük 4 órán keresztül, és a CYP24A1 mRNS expressziós értékeket mértük, illetve hasonlítottuk össze a D-vitaminnal nem kezelt sejtek expressziós értékével.

A  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  koncentrációjának emelkedésével mind a HepG2, mind a Huh-Neo sejtvonalakon fokozatosan emelkedett a CYP24A1 mRNS expressziója. Az emelkedés mértéke azonban különbözött a két sejtvonal között. A HepG2 sejtvonalon már 1,6 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  adását követően szignifikáns expresszióemelkedést tapasztaltunk ( $p < 0,001$ ), míg ugyanez az emelkedés a Huh-Neo sejtvonalon csak 4,0 nM adását követően volt tapasztalható ugyanazon kísérleti körülmények között (15.16. ábra). A HepG2 sejtvonalon már 1,6 nM D-vitamin nagyságrendbeli CYP24A1 mRNS expressziónövekedést okozott, míg ugyanilyen mértékű emelkedést a Huh-Neo sejtvonalon magasabb, 4nM koncentrációjú D-vitamin 4 órán történő kezelésével lehetett kimutatni. 10nM D-vitaminnal történő kezelés a HepG2 sejtekben egy nagyságrenddel nagyobb CYP24A1 mRNS expresszió növekedést okozott a Huh-Neo sejtvonalhoz képest. A  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  emelkedő koncentrációjú kezelés során a HepG2 sejtek esetén 180-, 820- és 1010-szoros volt a D-vitamint inaktiváló CYP24A1 mRNS emelkedése (15. ábra). Ugyanakkor a HUH-Neo sejtek esetén ugyanazon koncentrációk alkalmazása során a CYP24A1 mRNS 2,0-, 38- és 140-szoros emelkedését mutattuk ki megegyező kísérleti körülmények között (16. ábra).



15. ábra: CYP24A1 mRNS expresszió változás **HepG2** sejtvonalon növekvő mennyiségű  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  adását követően 4 óra inkubáció során. Kontrollként  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -mal nem kezelt sejtvonalakat használtunk. \*\*\* $p < 0,0001$ . AU: Arbitrary units. 1,25-D<sub>3</sub>:  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

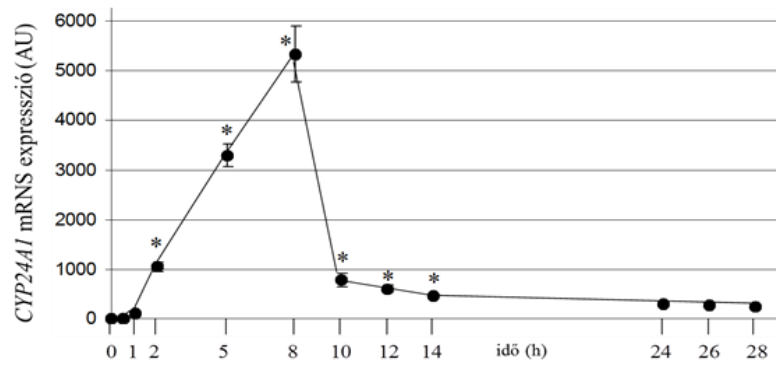


16. ábra: CYP24A1 mRNS expresszió változás **Huh-Neo** sejtvonalon növekvő mennyiségű  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  adását követően 4 óra inkubáció során. Kontrollként D vitaminnal nem kezelt sejtvonalakat használtunk. \*\*\* $p < 0,0001$ . AU: Arbitrary units. 1,25-D<sub>3</sub>:  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

#### 5.2.5. CYP24A1 mRNS időfüggő expresszióváltozása

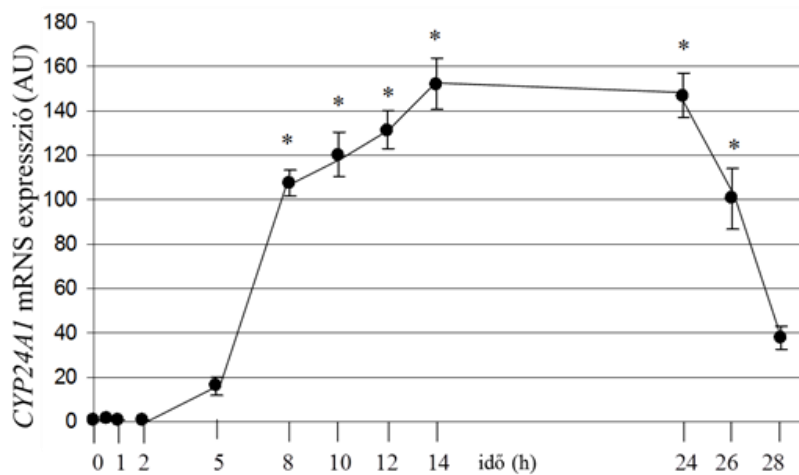
Az  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  biológiai hatásai nem csak a kezelés során alkalmazott mennyiségétől, hanem a kezelés időtartamától is függ. Azt már az előzőekben bebizonyítottuk, hogy 4nM koncentrációjú, biológiailag aktív D-vitamin mind a HepG2, mind a Huh-Neo HCC sejtvonalakon szignifikáns mértékű CYP24A1 mRNS expresszió emelkedést okoz 4 órán át történő inkubáció során. Ezért a 4nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  koncentrációt kiválasztva kezeltük a HepG2 és Huh-Neo sejteket 28 órán keresztül, és mértük a CYP24A1 mRNS expresszióját a korábban már ismertetett, 17.18. ábrán látható időpontokban. Eredményeink alapján a CYP24A1 mRNS expresszió időfüggvényében történő változása jelentős különbséget mutatott a HepG2 és a Huh-Neo sejtvonal között.

A HepG2 sejtvonal esetén a 4nM koncentrációjú D-vitamin a kezelés 2. órájában már 3 nagyságrendnyi CYP24A1 mRNS expresszió emelkedést okozott a D-vitamin kezelést nem kapott, kontroll sejtekhez képest. A kezelés idejét növelve további CYP24A1 mRNS expresszió emelkedés volt megfigyelhető, amely az 5. órában több, mint 3000-szeres volt a kontrollhoz képest. A maximumát a 4nM D-vitamin kezelés 8. órájában érte el, 5300-szorosát a kontrollhoz képest. Ezt követően gyors CYP24A1 mRNS expresszió csökkenés volt megfigyelhető, ami azonban a kezelés 10. órájában még mindig 800-szoros volt a kontrollhoz képest. További folytatva a méréseket, továbbra is szignifikánsan magasabb CYP24A1 mRNS expresszió volt kimutatható a HepG2 HCC sejtekben a 4nM D-vitaminnal való kezelés 12., 14. és 24. órájában is. Az enzim mRNS expressziója 28 órával a kezelés megkezdését követően is még kimutatható volt (17. ábra).



17. ábra: CYP24A1 mRNA expresszió változás HepG2 sejtvonalon az idő függvényében 4 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  hatására.  $*p < 0,0001$ . AU: Arbitrary Units

A Huh-Neo sejtek esetén a CYP24A1 mRNA expressziója másként változott az idő függvényében 4nM D-vitamin kezelés során ugyanazon kísérleti körülmények között. Szignifikáns expresszió fokozódást hosszabb kezelési idővel lehetett elérni, mint a HepG2 sejtek esetén. Csupán a kezelés 5. órájában volt az emelkedés szignifikáns, ami a kezelés idejének növekedésével tovább emelkedett. A maximumát jóval később érte el, mint a HepG2 sejtek, csupán a kezelés 14. órájában, ami kisebb mértékű, de még így is igen jelentős, 152-szeres volt a nem kezelt sejtekhez képest. Ezt követte egy „plató” fázis, és a 24. órában mért CYP24A1 mRNA expresszió nem különbözött a 14. órában mérthez képest. Ezt követte egy gyors csökkenés, de még a kezelés kezdetétől eltelt 28. órában is 40-szeres volt a kezelést nem kapott kontroll sejtekhez képest (18. ábra).

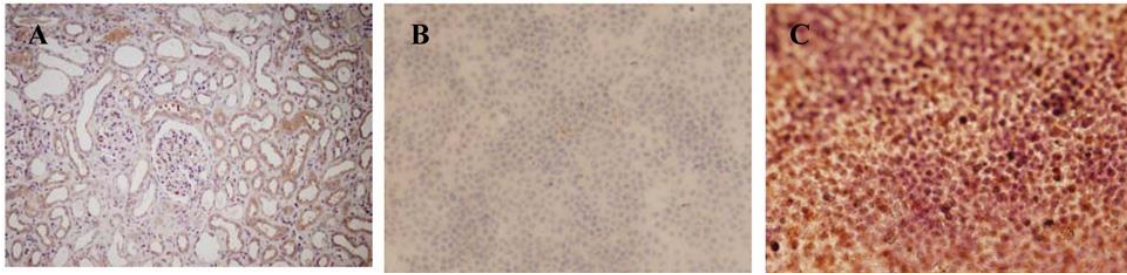


18. ábra: CYP24A1 mRNA expresszió változás Huh-Neo sejtvonalon az idő függvényében 4nM D-vitamin hatására. \* $p < 0,0001$ . AU: Arbitrary units.

#### 5.2.6. CYP24A1 fehérje expresszió HepG2 sejtvonalon

Immuncitológiai vizsgálattal kimutattuk, hogy  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  adását követően nemcsak a CYP24A1 mRNA expresszió emelkedik nagy mértékben, hanem az mRNA szintézist effektív transzláció, vagyis fehérje szintézis követ. Ennek kimutatására normál veseszövetet használtunk pozitív kontrollként (19. A ábra). A D-vitamin kezelést nem kapott HepG2 sejtek nem mutattak CYP24A1 fehérje festődést (19. B ábra). Erősen pozitív (+++) CYP24A1 enzim expresszió volt kimutatható HepG2 sejteken 32 óra, 4 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  - mal történő inkubációt követően (19. C ábra). A 19. ábrán látható a CYP24A1 fehérje citoplazmatikus expressziója; a pettyezett citoplazmatikus mintázat az enzim mitokondriális elhelyezkedésére utal.





19. ábra: CYP24A1 immuncitokémiai vizsgálata

**A:** Normál veseszövet, pozitív kontroll. A barna szín jelzi a pozitív reakciót. A sejtmagokat hematoxilinnal festettük (200-szoros nagyítás)

**B:** HepG2 sejtek  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  kezelés nélkül, negatív kontroll (20-szoros nagyítás)

**C:** CYP24A1 enzim expresszió kimutatása HepG2 sejtenyészetben immuncitológiai módszerrel 32 órával a  $4\text{nM } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  hozzáadása után (20-szoros nagyítás)

### 5.3. Humán vizsgálatok

#### 5.3.1. Csökkent VDR mRNA expresszió HCC-ben

36 beteg paraffinba ágyazott májszövet mintáin végzett vizsgálataink azt igazolták, hogy a D-vitamin sejtmembrán receptora, a VDR mRNA expresszálódik valamennyi HCC szövetben és az azt körülvevő tumormentes májszövetben is, habár igen különböző mértékben. Valamennyi HCC mintát együttesen vizsgálva és összehasonlítva ugyanazon betegekből származó tumormentes májszövettel, a receptor mRNA expressziója szignifikánsan csökkent HCC szövetben a tumormentes májszövethez képest ( $44046,80 \pm 22338,75$  versus  $304493,83 \pm 96655,44$ ,  $p < 0,05$ ; 20. ábra).

Nem volt különbség a cirrhosis talaján és cirrhosis nélküli májban kialakult HCC szövetminták VDR expressziója között ( $113243,81 \pm 68675,28$  versus  $35417,67 \pm 25937,91$ ,  $p = 0,7$ ; 21. ábra). Érdekes és új adat, hogy a HBV infekció talaján kialakult HCC-ben szignifikánsan magasabb a VDR expressziója ( $5890581,5 \pm 5873880,36$ ) a HCV ( $13066,33 \pm 5575,24$ ;  $p = 0,04$ ), illetve a kriptogén etiológiájú ( $54778,43 \pm 39119,69$ ;  $p = 0,04$ ) daganathoz képest (22. ábra). Amikor a különböző etiológiájú HCC mintákat hasonlítottuk össze a hozzátartozó tumormentes

májzsövettel, csupán a kriptogén etiológia esetén mutattunk ki szignifikáns VDR mRNS expresszió csökkenést a tumorban ( $54778,43 \pm 39119,69$  versus  $450697,62 \pm 146634,25$ ;  $p=0,04$ ).

További érdekes adat a nemek között megfigyelhető VDR expresszió különbségek. Nem csak a HCC szövetben ( $1978,14 \pm 1121,48$  versus  $494907,22 \pm 418109,39$ ;  $p=0,02$ ), hanem a tumormentes májzsövetben ( $12663,00 \pm 12043,94$  versus  $638079,67 \pm 286809,06$ ;  $p=0,05$ ) is alacsonyabb a VDR expressziója nőbeteg esetén a férfiakhoz képest az etiológiától függetlenül (23. ábra).

### 5.3.2. Csökkent CYP27B1 mRNS expresszió HCC-ben

A VDR mRNS-hez hasonlóan szintén szignifikánsan alacsonyabb CYP27B1 D-vitamint aktiváló enzim mRNS expressziót találtunk HCC-ben a környező tumormentes májzsövethez képest a 36 beteg paraffinba ágyazott szövetének vizsgálata során ( $31402,40 \pm 7281,92$  versus  $87312,75 \pm 12382,22$ ;  $p < 0,05$ . 20. ábra).

Ebben az esetben sem volt különbség a cirrhosis talaján kialakult daganat és az cirrhosis nélküli májban kialakult HCC között ( $21261,70 \pm 10311,49$  versus  $14747,44 \pm 10755,9$ ;  $p=0,9$ , 21. ábra). Nem volt különbség a különböző etiológia talaján kialakult HCC minták között a CYP27B1-et tekintetében. Hasonlóan nem találtunk változó expresszióváltozást a különböző differenciáltságú HCC minták között. A VDR-hez hasonló nemek közötti expresszió különbség csupán a nem tumoros minták között volt megfigyelhető: csökkent CYP27B1 mRNS expresszió női nemben a férfiakhoz képest ( $2969,57 \pm 1683,54$  versus  $98792,10 \pm 38549,52$ ;  $p=0,03$ ; 23. ábra).

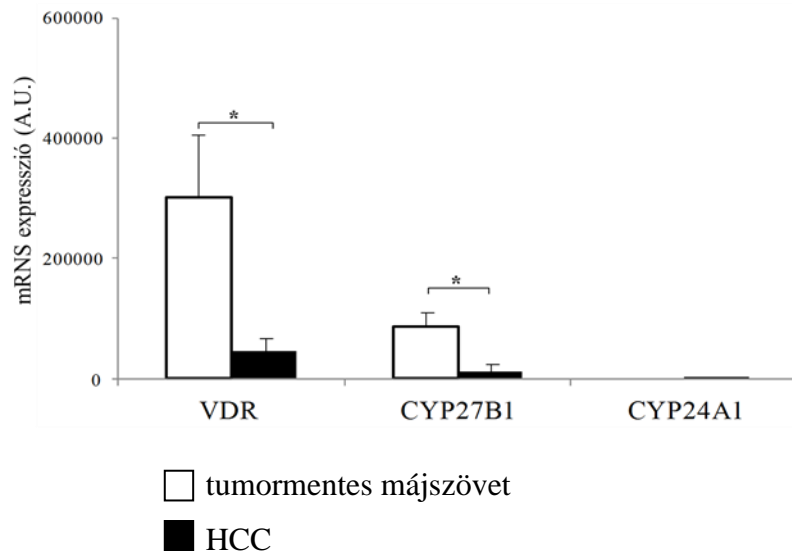
### 5.3.3. Klinikopatológiai paraméterekkel való összefüggések

Pozitív korrelációt mutattunk ki a HCC szövetminták VDR mRNS expresszió mértéke és a betegek szérum AFP és kalcium értékei között. Férfiakban a nem tumoros májzsövet CYP27B1 mRNS expressziója összefüggést mutatott a 2 típusú cukorbetegség jelenlétével, ugyanakkor ez az összefüggés nők esetén nem volt kimutatható, ami magyarázható a női nem alacsonyabb számával. A két nemet együtt értékelve pozitív összefüggés van a HCC minták CYP27B1 mRNS expresszió mértéke és a betegek szérum bilirubin és kolinészteráz szintjei között (4. táblázat).

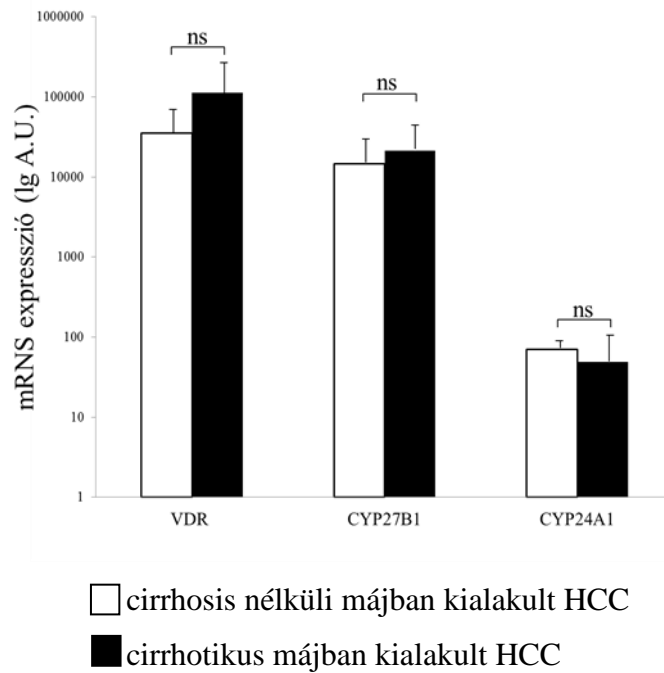
Nem találtunk összefüggést a VDR, a CYP27B1 és a CYP24A1 enzimexpressziók és a betegek túlélése között.

#### 5.3.4. CYP24A1 mRNS expresszió HCC-ben

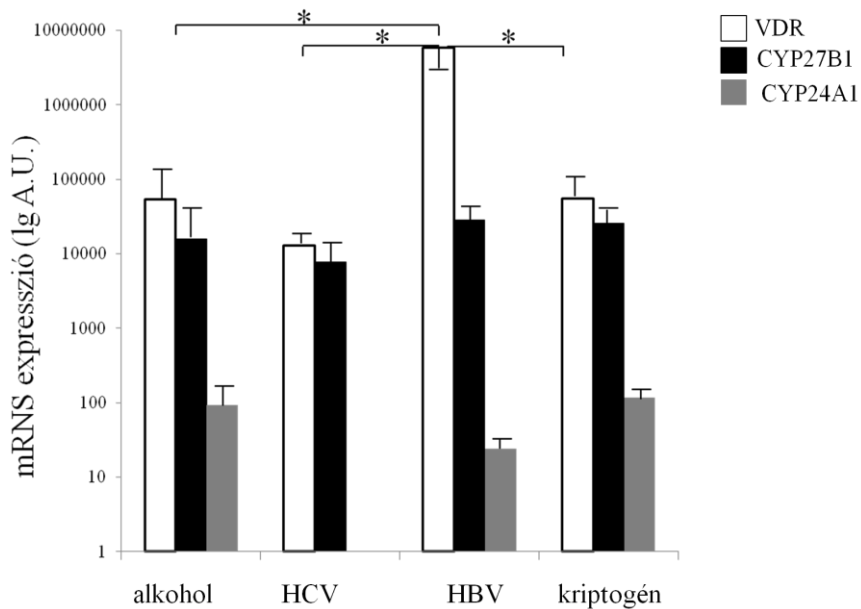
A humán vizsgálatok talán legérdekesebb eredménye, hogy a 13 friss fagyasztott tumor környezetéből származó 13 minta közül egyikében sem expresszálódik kimutatható mértékben a D-vitamin inaktiváló CYP24A1 mRNS. Ezzel ellentétben a 13 HCC mintából 8 esetében kimutatható volt az mRNS expressziója ( $90,62 \pm 38,94$ ; 20. ábra). A VDR-hez és a CYP27B1-hez hasonlóan a CYP24A1 esetén sem találtunk különbséget a cirrhosis talaján és a cirrhosis nélkül kialakult HCC minták között ( $49,25 \pm 37,00$  versus  $70,42 \pm 29,49$ ;  $p=0,3$ ; 21. ábra).



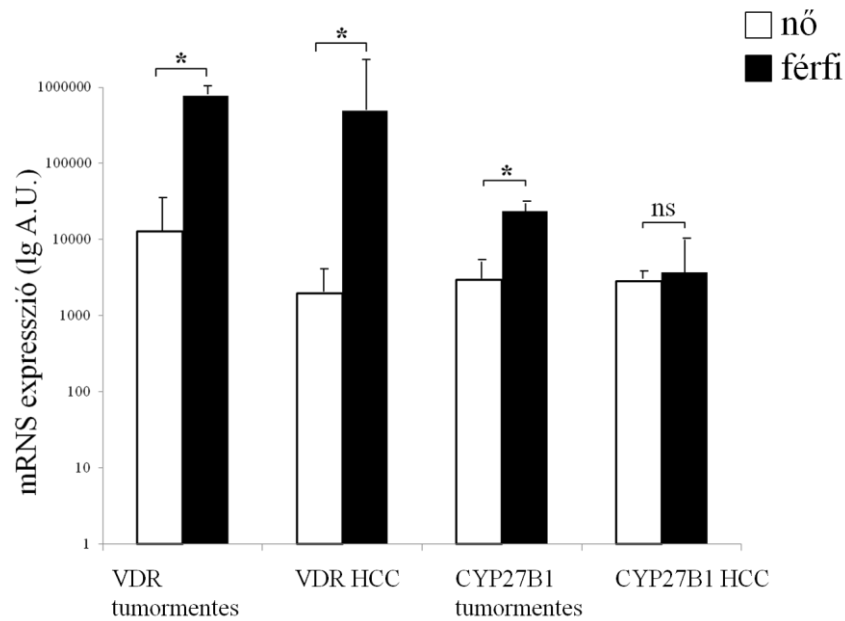
20. ábra VDR, CYP27B1 és CYP24A1 mRNS expresszió összehasonlítása HCC-ben a környező tumormentes májszövettel (\*  $p < 0,05$ ).



21. ábra: VDR, CYP27B1 és CYP24A1 mRNS expresszió különbségek a cirrhosis nélküli májban és a cirrhosis talaján kialakult HCC szövetminták között (ns: nem szignifikáns).



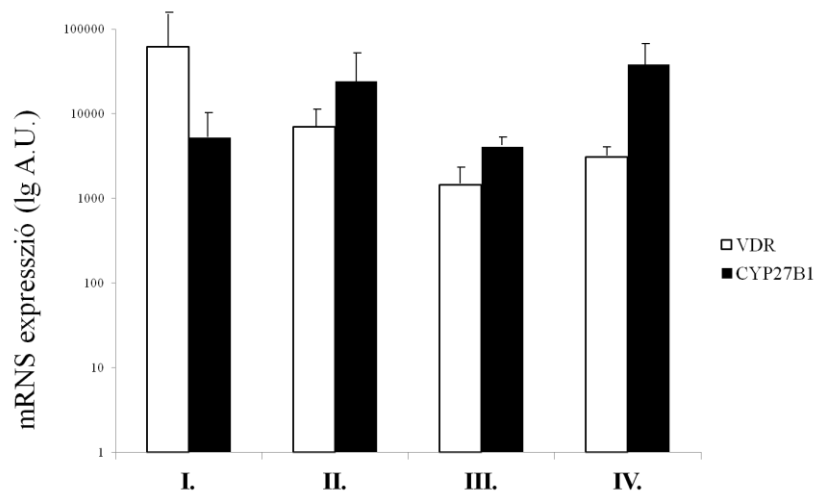
22. ábra VDR, CYP27B1 és CYP24A1 mRNS expressziók összehasonítása alkohol, HCV, HBV és kriptogén etiológiájú HCC szövetben (\*  $p < 0,05$ ).



23. ábra: Nemek közötti VDR és CYP27B1 mRNS expresszió különbségek HCC-ben és az azt körülvevő tumormentes májszövetben (\* $p < 0,05$ ; ns: nem szignifikáns)

4. táblázat VDR és CYP27B1 expresszió HCC-ben és tumor paraméterek közötti összefüggés (szignifikáns: \* $p < 0,05$ )

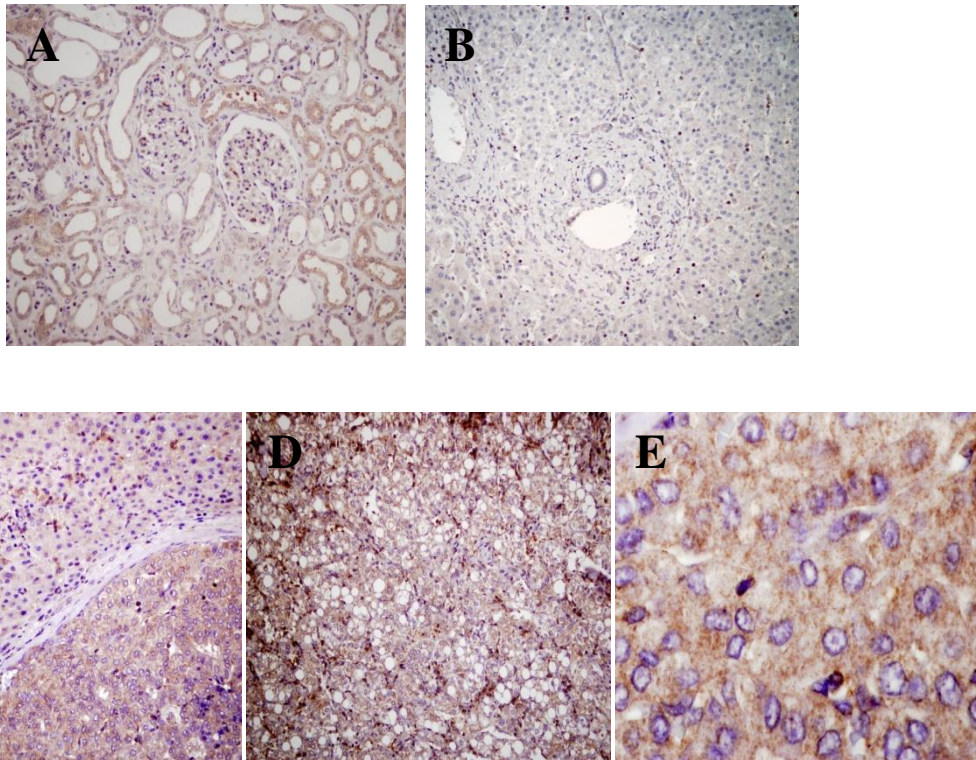
Klinikai és tumor paraméterek	p érték VDR	p érték CYP27B1
kor	0,21	0,24
nem	0,016*	0,815
grade	0,88	0,26
tumornekrózis	0,393	0,433
érinvázió	0,608	0,779
cirrrosis	0,747	1,00
etiológia	0,216	0,721
stádium	0,073	0,65
szolid-multiplex	0,774	0,387
metasztázis	0,689	0,52
diabetes mellitus	0,138	0,925
AFP	0,034*	0,067
szérum kalcium	0,04*	0,12



24. ábra: VDR és CYP27B1 mRNS expresszió különbségek a TNM függvényében

### 5.3.5. CYP24A1 fehérje expresszió HCC-ben

Az immunhisztokémiai vizsgálatok bebizonyították, hogy a HCC-ben megfigyelt magasabb CYP24A1 mRNS expressziót aktív fehérjeexpresszió követi. Erős immunhisztokémiai pozitivitás (+++) volt megfigyelhető a HCC szövetmintákban a nem tumoros környező májszövethez képest (24. ábra). A CYP24A1 fehérjeexpresszió az irodalomban leírtaknak megfelelően a daganatos sejtek citoplazmájában volt megfigyelhető az enzim mitokondriális elhelyezkedésének megfelelően.



25. ábra: CYP24A1 enzim expresszió immunhisztokémiai kimutatása HCC-ben és a környező tumormentes májszövetben. A barna szín jelzi a pozitív reakciót. A sejtmagokat hematoxilinnal festettük (kék).

- A.** Normál veseszövet (200-szoros nagyítás)
- B.** Tumormentes cirrhotikus máj CYP24A1 expresszió nélkül (200-szoros nagyítás)
- C.** HCC és környező tumormentes májszövet határa. Magas CYP24A1 fehérje expresszió HCC-ben a tumormentes májszövethez képest (200-szoros nagyítás)
- D.** HCC szövet magas CYP24A1 fehérje expresszióval (200-szoros nagyítás)
- E.** HCC szövet magas CYP24A1 fehérje expressziója (600-szoros nagyítás)

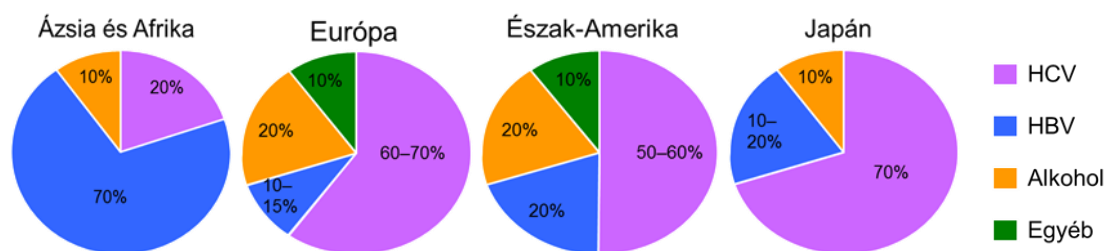
## 6. MEGBESZÉLÉS

A hepatocelluláris carcinóma diagnózisa és főként terápiája komoly kihívás a mindennapi orvosi gyakorlatban világszerte. Altecruse és munkatársai közelmúltban publikált adatai szerint a HCC incidenciája és mortalitása emelkedik világszerte, adatai arra engednek következtetni, hogy a HCC epidemiológiai csúcspontja zajlik napjainkban illetve várható a közeljövőben (16). Sajnálatos módon a daganat incidenciája és mortalitása továbbra sem csökken Magyarországon sem, illetve Európában, annak ellenére, hogy számos a daganat kialakulásában szerepet játszó etiológiai faktor ismert és megelőzhető. A terápiás lehetőségek korlátozottak, a tudomány jelen állása szerint végleges gyógyulást csak az időben elvégzett májrezekció, illetve májtranszplantáció hozhat, melyek alkalmazási lehetőségei igen korlátozottak, hiszen a daganat az esetek csaknem 90%-ában már cirrhotikus májon alakul ki, melynek funkcionális rezervkapacitása korlátozott.

A D-vitamin antitumor hatásának felfedezése új lehetőség a daganatterápiában. Számos rosszindulatú daganattal kapcsolatban zajlanak vizsgálatok, bár a HCC-vel kapcsolatos adatok korlátozottak. A D-vitamin in vivo szisztémás alkalmazása során számolni kell annak hiperkalcémiát okozó hatásával (159). Ugyanakkor számos munkacsoport dolgozik ezzel a mellékhatással nem rendelkező D-vitamin analóg kezelési módszerek kifejlesztésén (160; 111).

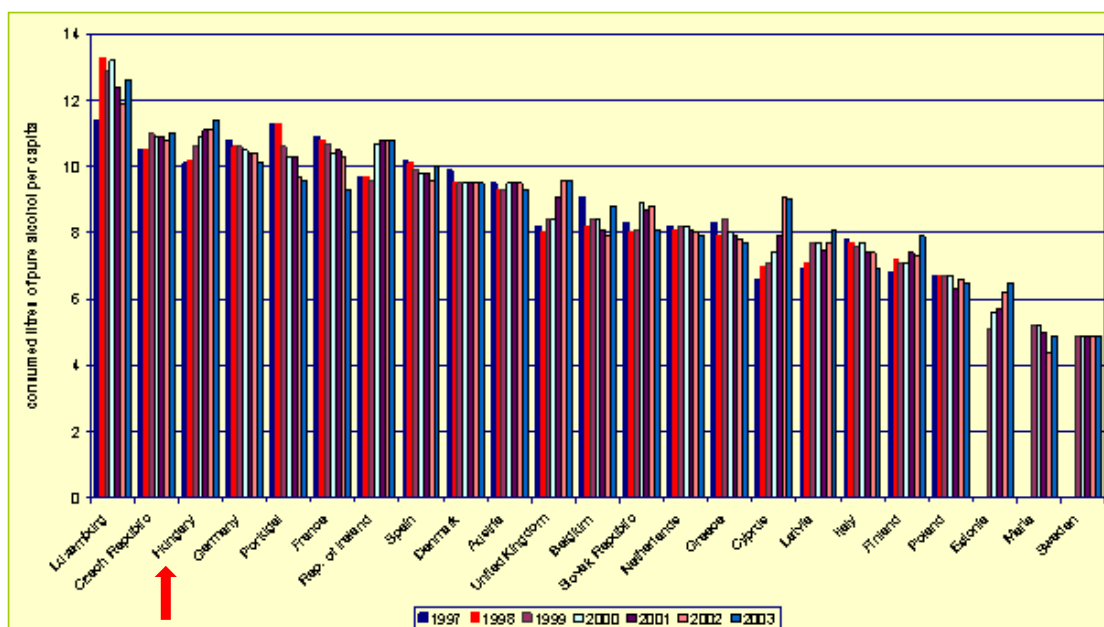
Mindezek alapján PhD munkám során érdemesnek láttam több szempontból megvizsgálni a HCC-ben szenvedő betegek klinikopatológiai jellemzőit a Semmelweis Egyetem beteganyagában. Tudomásunk szerint elsőként végeztünk átfogó epidemiológiai felmérést Magyarországon erre a betegségre vonatkozóan, elsősorban az etiológiai faktorokra koncentrálva. Az irodalommal megegyezően azt találtuk, hogy a HCC férfiakban kb. 3-szor gyakoribb, mint nőkben, illetve, hogy 89%-ban májcirrhosis talaján alakul ki. 102 beteg vizsgálata során kimutattuk, hogy az európai adatokkal megegyezően a HCV infekció a leggyakoribb etiológiai faktor, hasonlóan az európai adatokhoz (25. ábra), bár érdekes módon a két nemet külön vizsgálva férfiaknál az alkohol szerepel az első helyen, és csak azt követően a HCV infekció.





25. ábra: Etiológiai tényezők megoszlása HCC-ban (134)

Az alkoholizmus Magyarországon komoly szociálegészségügyi probléma. Az Európai Unió adatai szerint Magyarország az elsők között szerepel a fejenként elfogyasztott alkoholmennyiség tekintetében (26. ábra).



26. ábra: Elfogyasztott száraz alkoholmennyiség/fő (1997-2003) Forrás: World Advertising Research Centre

Az 1992-ben bevezetett vérvizsgálatok hepatitis B és C vírus elleni szűrés és az egyszerhasználatos fecskendők bevezetése (1985) nagy előrelépés volt Magyarországon egészségügyében. Csakúgy, mint a hepatitis B oltás bevezetése, a várandós nők rutinszerű szűrése, amely nemcsak a fertőzés megelőzésében, hanem a HCC kialakulásának megelőzésében is igen nagy előrelépést jelentett. Nem elhanyagolható a társadalom egészségügyi szempontból való tájékoztatása a szexuális úton, a testékszerek és tetoválások útján terjedő fertőző betegségekről. Ismereteink bővülése ellenére sok

esetben a HCC etiológiája ismeretlen marad, amely jelzi a még feltáratlan faktorok jelenlétét és szerepét a betegségben.

Irodalmi adatok igazolják, hogy a HCC túlélését jelentősen befolyásolja a korai diagnózis és a korai terápia döntés (161). Ezért létfontosságú magas szenzitivitású és specificitású tumormerek azonosítása a betegség szűrésére a rizikócsoportba tartozók körében, még a klinikai tünetek megjelenése előtt. Az AFP a korábbi évek során széles körben alkalmazták a HCC szűrésére, de a magas álnegatív eredmények száma alapján (főként az AFP negatív HCC esetek magas száma miatt) megkérdőjelezték hasznosságát a kórkép szűrésére. Az AFP szenzitivitása 41-65%, specificitása 80-94% között van 20 ng/ml cut-off értéknél (162). Az irodalmi adatokkal megegyezően az általunk vizsgált betegcsoportnak csak egy részében (59%) volt a normálisnál magasabb a szérumban AFP szintje. Ezek alapján mi sem javasoljuk önmagában az AFP rutinszerű használatát a HCC szűrésére. Az újabb labortechnológiai módszereknek köszönhetően ma már ismert az AFP-nek három formája van a lektin lens agglutininhez történő kötődése alapján (AFP-L1, AFP-L2 and AFP-L3). Az AFP-L3 kizárólag HCC-s betegekben mutatható ki, szenzitivitása 96,9%, specificitása 92% (163). További vizsgálat alatt álló lehetséges tumormarkerek HCC-ben a HSP70, HSP27, GPC3, SCCA, GP73, TAG72, ZAG, DCP, GGT, AFU, TGF- $\beta$ 1, VEGF, stb. (164).

2014 februárjában a *Hepatology*-ban megjelent közlemény elsőként a világon beszámol arról, hogy az alacsony szérumban D-vitamin koncentráció rizikófaktora a HCC kialakulásának egy nyugat-európai populáció átfogó vizsgálata alapján (165). Mivel a daganat incidenciája emelkedőben van az egyébként alacsony incidenciájú országokban, továbbá ismert az európai populáció alacsony szérumban D-vitamin szintje, érdemesnek láttuk összefüggést keresni a kettő között. Ugyanakkor különbséget kell tenni a szérumban D-vitamin szintje és a tumorban helyileg hozzáférhető D-vitamin koncentrációja között.

A biológiailag aktív 1,25(OH) $_2$ D $_3$  hormon antitumor hatása *in vitro* és *in vivo* számos rosszindulatú daganatban igazolódott. Felvetődött terápia hatékonysága HCC esetén is (113; 166; 167). A vizsgált betegek száma kevés, és csupán csak a HCC-s betegek egy része mutatott regressziót vagy a daganatos betegség stabilizálását a 1,25(OH) $_2$ D $_3$  analóg adására (113; 160). Mindez felveti a lehetőségét, hogy a HCC daganat különböző metabolizmussal és patofiziológiai folyamattal bír egyéntől függően. Valamilyen oknál fogva nem egyformán hat ugyanaz a D-vitamin minden HCC

daganatban. Vizsgálataink során erre is kerestük a választ. Mi lehet az oka, hogy egyes HCC daganatok reagálnak a D-vitamin kezelésre, mások nem. Az egyik ok lehet, hogy a szöveti szinten a sejtekhez jutott D-vitamin mennyisége eltérő. Ennek mérése azonban igen bonyolult labortechnológiai folyamat. Másik lehetőség, hogy a D-vitamin intracelluláris hatását közvetítő VDR receptor nem egyformán expresszálódik a az egyes betegekben. Másrészt a D-vitamin metabolizmusában kulcsszerepet játszó enzimek, mint a fentebb említett CYP24A1 és CYP27B1 eltérő mértékben expresszálódik, így az adott D-vitamin mennyiségnek csak egy része rendelkezik intracelluláris hatással.

1,25(OH)2D3 szöveti koncentrációját jelentősen befolyásoló CYP24A1 emelkedett aktivitását mutatták ki korábban vastagbél, tüdő, prosztatata, pajzsmirigy és emlő daganatsejtekben egyaránt (168; 169; 170; 171). Ismereteink szerint PhD munkám keretein belül elsőként vizsgáltuk a CYP24A1 mRNS és fehérje expresszióját különböző humán HCC sejtvonalakon in vitro és in vivo egyaránt. Adataink szerint a HepG2 és Huh-Neo HCC sejtvonalak D-vitamin adás hatására bekövetkező nagymértékű CYP24A1 mRNS és fehérje expresszióval válasza igazolja, hogy a HCC sejtek alkalmasak a D-vitamin önálló metabolizálására. Ugyanakkor ez a megfigyelés nem volt elmondható a másik két, Hep3B és Huh5-15 HCC sejtvonalról. Mindez magyarázható a sejtek eltérő eredetével, illetve a HCC eltérő patofiziológiai mechanizmusával, de a pontos okok feltárásához további vizsgálatok szükségesek. Csakúgy, mint az a klinikai megfigyelés is, hogy az in vivo alkalmazott D-vitamin jelentős hatáskülönbségeket mutat az egyes betegekben. Hasonló eredményeket kaptak méhnyak és petefészek sejtek vizsgálata során a kutatók (172).

Ugyanakkor HepG2 sejtekben egy nagyságrenddel nagyobb volt a CYP24A1 mRNS emelkedése, mint a petefészek sejtekben (OVCAR-3), annak ellenére, hogy a petefészek sejtek esetén 100nM, a mi vizsgálatainkban csupán 4nM volt az alkalmazott D-vitamin koncentrációja. Mindez arra enged következtetni, hogy a HepG2 sejtek jóval érzékenyebbek a D-vitamin hatására a CYP24A1 expresszió tekintetében. A HepG2 sejtvonalon a D-vitamin hatására megfigyelt jelentős (5300-szoros) CYP24A1 mRNS expresszióhoz hasonló adat van az irodalomban prosztatata (DU-145) és néhány vastagbél tumorsejtvonalon is (Caco-2, COGA-1) (168; 173).

Az *in vivo* végzett vizsgálataink eredményei arra engednek következtetni, hogy a D-vitamin antitumor hatása növelhető lehetne HCC szövetben CYP24A1 enzimgátlók alkalmazásával. Mindez már bizonyított humán prosztatata tumorsejtekben *in vitro* és állatmodellen egyaránt (173). Továbbá a CYP24A1 –et onkogénként tartják számon vastagbél és emlőrákban. Mindennek a bizonyítására HCC esetén további vizsgálatokra van szükség.

Epidemiológiai vizsgálataink is igazolták a krónikus HCV infekció jelentős etiológiai hatását a HCC kialakulásában. Továbbá a közelmúltban megjelent közlemény igazolta, hogy HCV fertőzött betegek antivirális kezelés során a szérumban D-vitamin koncentráció pozitív prediktív értékkel bír (50). Szintén összefüggés lehet az antivirális kezelésre nem reagáló HCV-s betegek magasabb HCC incidenciája és a szérumban D-vitaminszint között. Ugyanakkor sejtvonal vizsgálataink során a HCV genomot tartalmazó Huh5-15 HCC sejtvonal nem mutatott CYP24A1 mRNS expresszió változást D-vitamin adás hatására.

A CYP24A1 expresszió változással ellentétben a VDR expressziója nem változott egyik HCC sejtvonalon sem D-vitamin adására *in vitro* a korábban ismertetett kísérleti körülményeink között. Ehhez hasonló eredményeket mutatott más munkacsoport is a vastagbél és emlő sejtek vizsgálata során (106). Ugyancsak számos közlemény ismert az irodalomban, hogy carcinóma sejtvonalak D-vitamin kezelése nem okoz változást a CYP27B1 mRNS expressziójában (168). Mindezen HCC sejtvonalon végzett vizsgálataink arra engednek következtetni, hogy egyes HCC sejtvonalak növekvő CYP24A1 expresszióváltozással reagálnak az *in vitro* adott D-vitamin hatására, mintegy védekező mechanizmust alkalmazva a hormon antitumor hatása ellen.

A továbbiakban vizsgáltuk, hogy *in vivo* fiziológiai körülmények között, 49 HCC-s beteg bevételeivel, expresszálja-e a HCC szövet a CYP24A1, CYP27B1 és VDR mRNS-t. Ugyanakkor érdekesnek tartottuk összevetni az expressziókat ugyanabból a betegből származó HCC körüli tumormentes májszövettel. Ismereteink szerint ez az első tudományos vizsgálat, amely humán hepatocelluláris szövetben vizsgálja a fenti gének expresszióját, összehasonlítva ugyanazon beteg környező, tumormentes májszövetével, illetve az HCC etiológiájával, a betegek nemével és egyéb klinikopatológiai paraméterekkel. Az irodalomban ismert eredményekkel megegyezően azt találtuk, hogy valamennyi HCC szövetben és tumormentes májszövetben

expresszálódik a VDR mRNS, jóllehet különböző mennyiségben. Hasonló VDR expressziót találtak egyéb malignus szövetben, mint emlő, prosztatata és pajzsmirigy tumorokban (171; 174; 175). Vastagbél-daganatban a VDR expresszió csökkenése összefüggést mutatott a malignitás fokával, illetve a vastagbél adenocarcinómában a differenciáltsági fok elvesztésével párhuzamosan csökkent a VDR mRNS expresszió, ami egyben a betegség rosszabb prognózisát is jelenti (176; 177). Az általunk vizsgált betegcsoportban nem találtunk összefüggést a HCC differenciáltsági foka és a VDR mRNS expresszió mértéke között. Ennek magyarázatául szolgálhat, hogy a HCC jelentős heterogenitást mutató daganat, sok esetben egy gócon belül számos kisebb, különböző differenciáltságú góc helyezkedik el, és a vizsgálatok során csupán egy adott reprezentatív szövetmintával dolgozunk, nem ismerve a daganat többi részének patológiai sajátosságait.

A VDR receptor jelenléte egészséges májban és hepatocelluláris carcinómában már korábbról ismert (178; 110; 179; 180). Fiziológiai vizsgálatok igazolták, hogy a májban történik 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> felvétel és annak epébe történő kiválasztása, vagyis a hormon jelen van az egészséges májban is (181). Továbbá arról is van adat, hogy a májban lévő VDR expressziónak védő szerepe lehet a hepatocarcinogenezis ellen (166; 182). Segura és munkatársai közölték, hogy a normál májban mind a hepatociták, mind a biliáris és nem parenchimás sejtekben pozitív a VDR fehérje expressziója, ugyanakkor Gascon-Barré és munkacsoportja azt találta, hogy a normál hepatociták nem mutatnak VDR gén transzkripciót a máj biliáris és sinusoidális sejtjeivel szemben (183; 178). Az általunk végzett vizsgálatok teljes májszöveten történtek, ami magában foglalja a máj valamennyi sejtjét. Ez magyarázat lehet a kísérleti eredményekből adódó különbségekre. Ugyanakkor az is ismert, hogy a D-vitamin VDR receptor gén átírása poszttranszkripcionális miRNS szabályozás alatt áll, ami befolyásolhatja az eltérő mRNS és fehérje expressziós eredményeket (184).

Fingas és munkacsoportja 62 HCC-s beteg és ugyanannyi egészséges kontroll vizsgálatára azt találta, hogy a HCC-ben szenvedő betegek szérumban alacsonyabb a D- vitamin koncentráció, ugyanakkor VDR mRNS expressziója magasabb volt a tumorszövetben és a környező tumormentes májban is az egészséges kontrollhoz képest (185). Vizsgálataink során a HCC szövetben talált alacsonyabb VDR mRNS expressziót találtunk ugyanazon betegek környező tumormentes májszövetéhez képest, ami az

esetek nagy részében nem egészséges, hanem cirrótikus, illetve krónikus gyulladásban lévő májszövet. Mindez részben magyarázhatja az eltérő eredményeket. Hasonlóan alacsonyabb VDR mRNS expressziót találtak humán vastagbél, emlő és tüdő daganatban is, de magasabb volt az expresszió petefészek daganatban a nem daganatos szövetrel összehasonlítva (106; 107). Továbbá prosztatá és nyelőcsőrákban a VDR expresszió pozitív prediktív tényezőnek vélhető (174; 186; 187).

A VDR expresszió mértékének csökkenése a daganatfiziológiában még nem teljesen tisztázott. Egyes adatok arra utalnak, hogy a Krüppel-like faktor 4 (KLF4) expressziója és a Snail fokozott expressziója szerepet játszhat a VDR expresszió csökkenésében hepatocelluláris carcinómában (188; 189). Ezen vizsgálatokhoz hasonlóan mi sem találtunk összefüggést a HCC szövet VDR expresszió mértéke és a beteg túlélése között az általunk vizsgált betegcsoportban (189).

Disszertációs munkám során talált további érdekes és új adat, hogy női nemből kialakult HCC-ben csökkent a VDR mRNS expressziója a férfiakhoz képest. Ismert, hogy a VDR egyik funkcióját, hogy szerepet játszik az ösztrogén mediált proliferációs és sejtdifferenciálódási folyamatokban (190). További vizsgálati eredmények igazolják, hogy rosszindulatú ösztrogén-receptor pozitív emlődaganatban a D-vitamin antitumor hatása az ösztrogén receptorok számának csökkenésén keresztül szabályozott (191; 192). A HCC-ben tapasztalt nemek közötti különbség pontos megértéséhez és a két jelátviteli folyamat közötti kapcsolat megértéséhez további vizsgálatok szükségesek.

A VDR mRNS expresszióhoz hasonlóan szintén kimutatható a D-vitamint aktiváló CYP27B1 mRNS expressziója HCC szövetben és a környező tumormentes májban is, habár eltérő mértékben. A VDR-hez hasonlóan a CYP27B1 mRNS is szignifikánsan csökkent HCC szövetben a környező tumormentes májhoz képest. Ugyanakkor érdekes adat, hogy az inaktiváló enzim CYP24A1 mRNS expressziója csupán a hepatocelluláris carcinoma szövetben volt kimutatható, a környező tumormentes májszövet egyikében sem. Cholangiocelluláris carcinómában már korábban leírták a CYP27B1 expresszió csökkenését és a CYP24A1 emelkedését (193). Mindezen eredmények összhangban vannak egyéb malignus daganatokban, mint emlő, nyelőcső, vastagbél, pajzsmirigy és tüdőben talált CYP24A1 mRNS expresszió-fokozódással (194; 106; 107; 170). Az irodalomban egyes daganatokban megfigyelt CYP24A1 expresszió mértéke és a betegek túlélése között pozitív

összefüggés mutatható ki (195). Saját vizsgálataink során nem mutattunk ki összefüggést a CYP24A1 expresszió mértéke és a túlélés között, habár a vizsgált betegek száma alacsony volt.

További új adat, hogy egyik HCV talaján kialakult HCC-ben sem volt kimutatható a CYP24A1 expresszió. Ez összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy a HCV infekcióban a májban növekszik a helyileg hozzáférhető D-vitamin mennyisége a vírus CYP24A1 –en kifejtett gátló hatása hatásán keresztül (196).

## 7. KÖVETKEZTETÉSEK

PhD munkám során végzett kísérletek eredményeiből a következő következtetéseket vonhatjuk le:

1. A hepatocelluláris carcinóma rossz prognózisú betegség. Törekedni kell a rizikócsoportba tartozó, májcirrótikus betegek szűrésére és a korai diagnózisra. Magyarországon legnagyobb a kockázat a HCV fertőzés és az alkoholfogyasztás, illetve a két rizikófaktor együttes előfordulása esetén. Adataink szerint a betegséget sok esetben későn ismerik fel. A betegek túlélési ideje alacsony. Az AFP-t önmagában nem ajánljuk a magyarországi populációban sem a HCC szűrésére alacsony szenzitivitása miatt.

2. HepG2 és Huh-Neo humán HCC sejtvonalak jelentős CYP24A1 mRNS és fehérje expressziója fokozódásával válaszolnak az aktív D-vitamin in vitro adására, ugyanakkor a CYP27B1 és a VDR mRNS expressziója nem változik D-vitamin adására. A CYP24A1 mRNS expressziója nem változott a Hep3B és a HCV genomot tartalmazó Huh5-15 sejtvonalak esetén. Az expresszió emelkedése különböző mértékű az egyes sejtvonalakban, és nagymértékben függ az alkalmazott D-vitamin mennyiségétől és a kezelés idejétől.

3. HCC szövetben szignifikánsan alacsonyabb mértékben expresszálódik a D-vitamin hatását közvetítő VDR és a hormont aktiváló CYP27B1 mRNS a környező, ugyanazon betegből származó tumormentes májszövethez képest.

4. A fenti génekkel ellentétben a D-vitamint inaktiváló enzim, a CYP24A1 mRNS és fehérje kizárólag a HCC szövetben mutatható ki, a környező tumormentes májszövet egyikében sem. Mindezek alapján elmondható, hogy HCC-ben a D-vitamin tumorelles hatása kevésbé érvényesül. A fentebb említett expressziókülönbségek utalhatnak a tumor védekező mechanizmusára a D-vitamin antitumor hatásával szemben.



5. A HBV talaján kialakult HCC szövetben szignifikánsan magasabb a VDR mRNS expresszió. Női nemben kisebb mértékű a VDR mRNS expressziója HCC-ben és a környező tumormentes májszövetben is a férfiakkal összehasonlítva. Ez a különbség CYP27B1 esetén csak a tumormentes májszövetben volt kimutatható.

6. Nincs különbség a VDR, CYP27B1 és CYP24A1 mRNS expressziók között a cirrhosis talaján és a cirrhosis nélkül kialakult HCC szövetminta között, csakúgy, mint a fenti expressziók és a tumor grade, TNM stádiuma és a betegek túlélése között.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

Ismereteink a hepatocelluláris carcinóma patofiziológiájáról és az aktív D-vitamin, az 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ígéretes daganatellenes hatásairól napról napra bővülnek, ennek ellenére a HCC továbbra is rossz prognózisú betegség és kezelése kihívás a mindennapi orvosi gyakorlat számára.

A Semmelweis Egyetem beteganyagában azt találtuk, hogy a HCC az esetek 69%-ban férfiakban és 89%-ban májcirrhosis talaján alakul ki. A leggyakoribb etiológiai tényező az alkoholfogyasztás és a krónikus HCV infekció. Az általunk vizsgált betegcsoport csupán 3,68%-a volt életben a diagnózis felállítása után 5 évvel. Az AFP tumormarker a betegek 41%-ában normális.

Négyféle humán HCC sejtvonalakon megvizsgáltuk, hogyan változik 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> adására a 25-hidroxyvitamin D<sub>3</sub> 24-hidroxiláz (CYP24A1) lebontó enzim mRNS és fehérje expressziója, valamint az aktiváló 25-hidroxyvitamin D<sub>3</sub> 1-alpha-hidroxiláz enzim (CYP27B1) és a D-vitamin receptor (VDR) az mRNS expressziója az 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> koncentrációjának és a kezelés időtartamának függvényében. Humán HCC szövetben és ugyanazon betegből származó tumormentes májszövetben megvizsgáltuk a CYP24A1 mRNS és fehérje, illetve a CYP27B1 és VDR mRNS expressziókat. Eredményeink szerint HepG2 és Huh-Neo HCC sejtvonalon már 1nM 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 5 órás kezelési idő után is szignifikánsan emelkedik a CYP24A1 mRNS és fehérje expressziója, míg a másik két sejtvonalon nem változik. A CYP27B1 és VDR mRNS expressziója egyik sejtvonalon sem változik az aktív D vitamin kezelés hatására.

HCC szövetben csökkent a CYP27B1 és VDR mRNS expressziója a tumormentes környező májszövethez képest. CYP24A1 mRNS és fehérje expressziót csak HCC-ben mutattunk ki, tumormentes májszövetben nem. A fenti expressziók nem mutattak összefüggést a HCC differenciáltsági fokával és a betegek túlélésével.

Eredményeink arra utalnak, hogy egyes hepatocelluláris carcinóma sejtek a CYP24A1 mRNS és fehérje expresszió fokozódásával védekeznek a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> antitumor hatásával szemben. Mindez hozzájárul D-vitamin hepatocelluláris carcinómában betöltött szerepének jobb megismeréséhez és jövőbeli D- vitaminnal történő, egyénre szabott, hatékonyabb kezelések kifejlesztéséhez.

## SUMMARY

Despite the growing information about the pathophysiology of hepatocellular carcinoma and the antitumor effects of the biological active vitamin D, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, the prognosis of the HCC is still very poor and the effective cure of the HCC is a challenge in the clinical practice.

In the Semmelweis University we found, that 69% of HCC develop in men, and 89% of the patients has liver cirrhosis. The most common etiologic factor was the alcohol consumption and the chronic hepatitis C infection. In this population the mean 5 years survival rate was only 3,68%. 41% of the patients had normal AFP levels in the serum.

We aimed to examine mRNA and protein expression of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-inactivating CYP24A1 and mRNA expression of the activating CYP27B1 enzymes, as well as that of vitamin D receptor (VDR), in four HCC cell cultures in response to different concentration and treatment time of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> administration. Moreover we examined mRNA and protein expression differences in CYP24A1, mRNA expression CYP27B1 enzymes, as well as that of VDR between human non-tumorous liver and HCC tissue samples, and studied the correlation with clinicopathological characteristics.

CYP24A1 mRNA expression significantly increased in response to 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> administration in HepG2 and Huh-Neo cell lines. There was no significant change in Hep3B and Huh5-15 cell lines, nor was there any change in CYP27B1 and VDR gene expression in any cell cultures. Immunocytochemistry in HepG2 cells proved that gene activation was followed by CYP24A1 protein synthesis.

Expression of VDR and CYP27B1 was significantly lower in HCC compared with non-tumorous liver. The majority of the HCC samples expressed CYP24A1 mRNA, in contrast neither of the non-tumorous liver expressed this gene. Immunohistochemistry studies confirmed that the gene activation was followed by CYP24A1 protein synthesis.

Our novel data on the presence of CYP24A1 mRNA, as well as reduced expression of VDR and CYP27B1 mRNA in human HCC samples indicate decreased bioavailability of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in HCC cells, providing an escape mechanism from the anti-tumor effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

**9. IRODALOMJEGYZÉK**

1. Wolf G. (2004) The discovery of vitamin D: the contribution of Adolf Windaus. *J Nutr*, 134(6): 1299-1302.
2. Garland CF, Comstock GW, Garland FC, Helsing KJ, Shaw EK, Gorham ED. (1989) Serum 25-hydroxyvitamin D and colon cancer: eight-year prospective study. *Lancet*, 2(8673): 1176-1178.
3. Heilbrun LK, Nomura A, Hankin JH, Stemmermann GN. (1985) Dietary vitamin D and calcium and risk of colorectal cancer. *Lancet*, 1(8434): 925.
4. Garland C, Shekelle RB, Barrett-Connor E, Criqui MH, Rossof AH, Paul O. (1985) Dietary vitamin D and calcium and risk of colorectal cancer: a 19-year prospective study in men. *Lancet*, 1(8424): 307-309.
5. Emerson JC, Weiss NS. (1992) Colorectal cancer and solar radiation. *Cancer Causes Control*, 3(1): 91-95.
6. Schwartz GG. (1992) Multiple sclerosis and prostate cancer: what do their similar geographies suggest? *Neuroepidemiology*, 11(4-6): 244-254.
7. Hanchette CL, Schwartz GG. (1992) Geographic patterns of prostate cancer mortality. Evidence for a protective effect of ultraviolet radiation. *Cancer*, 70(12): 2861-2869.
8. Tanaka Y, Wu AY, Ikekawa N, Iseki K, Kawai M, Kobayashi Y. (1994) Inhibition of HT-29 human colon cancer growth under the renal capsule of severe combined immunodeficient mice by an analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, DD-003. *Cancer Res*, 54(19): 5148-5153.
9. Tsuchiya H, Morishita H, Tomita K, Ueda Y, Tanaka M. (1993) Differentiating and antitumor activities of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in vitro and 1 alpha-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> in vivo on human osteosarcoma. *J Orthop Res*, 11(1): 122-130.
10. Naveilhan P, Berger F, Haddad K, Barbot N, Benabid AL, Brachet P, Wion D. (1994) Induction of glioma cell death by 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>: towards an endocrine therapy of brain tumors? *J Neurosci Res*, 37(2): 271-277.
11. Vink-van Wijngaarden T, Pols HA, Buurman CJ, van den Bemd GJ, Dorssers LC, Birkenhäger JC, van Leeuwen JP. (1994) Inhibition of breast cancer cell

- growth by combined treatment with vitamin D3 analogues and tamoxifen. *Cancer Res*, 54(21): 5711-5717.
12. He RK, Gascon-Barré M. (1997) Influence of the vitamin D status on the early hepatic response to carcinogen exposure in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 281(1): 464-469.
  13. El-Serag HB, Rudolph KL. (2007) Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, 132(7): 2557-2576.
  14. Kupcsulik P. (2010) Surgical oncology of hepatocellular carcinoma (HCC). *Orv Hetil*, 151(37): 1483-1487.
  15. Yeh YT, Chang CW, Wei RJ, Wang SN. (2013) Progesterone and related compounds in hepatocellular carcinoma: basic and clinical aspects. *Biomed Res Int*, 2013: 290575.
  16. Altekruse SF, Henley SJ, Cucinelli JE, McGlynn AK. (2014) Changing Hepatocellular Carcinoma Incidence and Liver Cancer Mortality Rates in the United States. *Am J Gastroenterol*, 109(4): 542-553.
  17. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. (2004) Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*, 127: 35-50.
  18. Brechot C, Kremsdorf D, Soussan P, Pineau P, Dejean A, Paterlini-Brechot P, Tiollais P. (2010) Hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC): molecular mechanisms and novel paradigms. *Pathol Biol*, 58(4): 278-287.
  19. Idilman R, De Maria N, Colantoni A, Van Thiel DH. (1998) Pathogenesis of hepatitis B and C-induced hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat*, 5(5): 285-99.
  20. Tong MJ, Trieu J. (2013) Hepatitis B "inactive carriers": Clinical course and outcomes. *J Dig Dis*, 14(6): 311-317.
  21. Ryu WS. (2003) Molecular aspects of hepatitis B viral infection and the viral carcinogenesis. *J Biochem Mol Biol*, 36(1): 138-143.
  22. Popper H, Shafritz DA, Hoofnagle JH. (1987) Relation of the hepatitis B virus carrier state to hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 7(4): 764-772.
  23. Lai MY, Chen DS, Chen PJ, Lee SC, Sheu JC, Huang GT, Wei TC, Lee CS, Yu SC, Hsu HC. (1988) Status of hepatitis B virus DNA in hepatocellular

- carcinoma: a study based on paired tumor and nontumor liver tissues. *J Med Virol.* 25(3): 249-258.
24. Brechot C, Pourcel C, Louise A, Rain B, Tiollais P. (1980) Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature*, 286(5772): 533-535.
  25. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. (2002) Genotypes and clinical phenotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection. 40(4): 1207-1209.
  26. Kane MA. (2003) Global control of primary hepatocellular carcinoma with hepatitis B vaccine: the contributions of research in Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 12(1): 2-3.
  27. Goldstein ST, Zhou F, Hadler SC, Bell BP, Mast EE, Margolis HS. (2005) A mathematical model to estimate global hepatitis B disease burden and vaccination impact. *Int J Epidemiol*, 34(6): 1329-1339.
  28. Lugassy C, Bernuau J, Thiers V, Krosgaard K, Degott C, Wantzin P, Schalm SW, Rueff B, Benhamou JP, Tiollais P. (1987) Sequences of hepatitis B virus DNA in the serum and liver of patients with acute benign and fulminant hepatitis. *J Infect Dis*, 155(1): 64-71.
  29. Murakami Y, Minami M, Daimon Y, Okanou T. (2004) Hepatitis B virus DNA in liver, serum, and peripheral blood mononuclear cells after the clearance of serum hepatitis B virus surface antigen. *J Med Virol*, 72(2): 203-214.
  30. Ziemer M, Garcia P, Shaul Y, Rutter WJ. (1985) Sequence of hepatitis B virus DNA incorporated into the genome of a human hepatoma cell line. *J Virol*, 53(3): 885-892.
  31. Wang Y, Lau SH, Sham JS, Wu MC, Wang T, Guan XY. (2004) Characterization of HBV integrants in 14 hepatocellular carcinomas: association of truncated X gene and hepatocellular carcinogenesis. *Oncogene*, 23(1): 142-148.
  32. Paterlini-Bréchet P, Saigo K, Murakami Y, Chami M, Gozuacik D, Mugnier C, Lagorce D, Bréchet C. (2003) Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene*, 22(25): 3911-3916.

33. Murakami Y, Saigo K, Takashima H, Minami M, Okanoué T, Bréchet C, Paterlini-Bréchet P. (2005) Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas. *Gut*, 54(8): 1162-1168.
34. Horikawa I, Barrett JC. (2003) Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms. *Carcinogenesis*, 24(7): 1167-1176.
35. Huang YW, Liao YT, Chen W, Chen CL, Hu JT, Liu CJ, Lai MY, Chen PJ, Chen DS, Yang SS, Kao JH. (2010) Vitamin D receptor gene polymorphisms and distinct clinical phenotypes of hepatitis B carriers in Taiwan. *Genes Immun*, 11(1): 87-93.
36. Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A, Decarli A, Trevisi P, Ribero ML, Martelli C, Porru S, Nardi G. (2002) Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol*, 155(4): 323-331.
37. Freeman AJ, Dore GJ, Law MG, Thorpe M, Von Overbeck J, Lloyd AR, Marinos G, Kaldor JM. (2001) Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 34: 809-816.
38. Ogawa E, Furusyo N, Kajiwara E, Takahashi K, Nomura H, Maruyama T, Tanabe Y, Satoh T, Nakamuta M, Kotoh K, Azuma K, Dohmen K, Shimoda S, Hayashi J. (2013) Efficacy of pegylated interferon alpha-2b and ribavirin treatment on the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C: a prospective, multicenter study. *J Hepatol*, 58(3): 495-501.
39. Hassan MM, Frome A, Patt YZ, El-Serag HB. (2002) Rising prevalence of hepatitis C virus infection among patients recently diagnosed with hepatocellular carcinoma in the United States. *J Clin Gastroenterol*, 35(3): 266-269.
40. Jeong SW, Jang JY, Chung RT. (2012) Hepatitis C virus and hepatocarcinogenesis. *Clin Mol Hepatol*, 18(4): 347-356.
41. Fishman SL, Factor SH, Balestrieri C, Fan X, Dibisceglie AM, Desai SM, Benson G, Branch AD. (2009) Mutations in the hepatitis C virus core gene are associated with advanced liver disease and hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 15(9): 3205-3213.

42. Yamashita T, Honda M, Takatori H, Nishino R, Minato H, Takamura H, Ohta T, Kaneko S. (2009) Activation of lipogenic pathway correlates with cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 50(1): 100-110.
43. Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Kaneko S. (2006) Different signaling pathways in the livers of patients with chronic hepatitis B or chronic hepatitis C. *Hepatology*, 44(5): 1122-1138.
44. Kitagawa N, Ojima H, Shirakihara T, Shimizu H, Kokubu A, Urushidate T, Totoki Y, Kosuge T, Miyagawa S, Shibata T. (2013) Downregulation of the microRNA biogenesis components and its association with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*, 104(5): 543-551.
45. Murakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, Shimotohno K. (2009) Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a. *J Hepatol*, 50(3): 453-60.
46. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. (2005) Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*, 309(5740): 1577-1581.
47. Sarasin-Filipowicz M, Krol J, Markiewicz I, Heim MH, Filipowicz W. (2009) Decreased levels of microRNA miR-122 in individuals with hepatitis C responding poorly to interferon therapy. *Nat Med*, 15(1): 31-33.
48. Dharancy S, Malapel M, Perlemuter G, Roskams T, Cheng Y, Dubuquoy L, Podevin P, Conti F, Canva V, Philippe D, Gambiez L, Mathurin P, Paris JC, Schoonjans K, Calmus Y, Pol S, Auwerx J, Desreumaux P. (2005) Impaired expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha during hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*, 128(2): 334-342.
49. Zhang Y, Wei W, Cheng N, Wang K, Li B, Jiang X. (2012) Hepatitis C Virus-induced upregulation of miR-155 promotes hepatocarcinogenesis by activating Wnt signaling. *Hepatology*, 56(5): 1631-1640.
50. Bitetto D, Fattovich G, Fabris C, Ceriani E, Falletti E, Fornasiere E, Pasino M, Ieluzzi D, Cussigh A, Cmet S, Pirisi M, Toniutto P. (2011) Complementary role of vitamin D deficiency and the interleukin-28B rs12979860 C/T polymorphism in predicting antiviral response in chronic hepatitis C. *Hepatology*, 53(4): 1118-1126.



51. Gal-Tanamy M, Bachmetov L, Ravid A, Koren R, Erman A, Tur-Kaspa R, Zemel R. (2011) Vitamin D: an innate antiviral agent suppressing hepatitis C virus in human hepatocytes. *Hepatology*, 54(5): 1570-1579.
52. Bitetto D, Fabris C, Falletti E, Toniutto P. (2011) Vitamin D deficiency and HCV chronic infection: What comes first? *J Hepatol*, 55(4): 944-945.
53. Arteh J, Narra S, Nair S. (2010) Prevalence of vitamin D deficiency in chronic liver disease. *Dig Dis Sci*, 55: 2624–2628.
54. Polesel J, Montella M, Dal Maso L, Crispo A, Serraino D, Talamini R. (2012) Re: hepatocellular carcinoma risk factors and disease burden in a european cohort: a nested case-control study. *J Natl Cancer Inst*, 104(21): 1681-1683.
55. Arteel GE. (2003) Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease. *Gastroenterology*, 124: 778-790.
56. Stewart SF, Vidali M, Day CP, Albano E, Jones DEJ. (2004) Oxidative stress as a trigger for cellular immune responses in patients with alcoholic liver disease. *Hepatology*, 39: 197–203.
57. Klaunig JE, Kamendulis LM. (2004) The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44: 239–267.
58. Tsuchishima M, George J, Shiroeda H, Arisawa T, Takegami T, Tsutsumi M. (2013) Chronic Ingestion of Ethanol Induces Hepatocellular Carcinoma in Mice Without Additional Hepatic Insult. *Dig Dis Sci*, 58(7): 1923-1933.
59. Tavill AS, Qadri AM. (2004) Alcohol and iron. *Semin Liver Dis*, 24: 317–325.
60. Lauret E, Rodríguez M, González S, Linares A, López-Vázquez A, Martínez-Borra J, Rodrigo L, López-Larrea C. (2002) HFE gene mutations in alcoholic and virus-related cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*, 97: 1016–1021.
61. Donato F, Gelatti U, Limina RM, Fattovich G. (2006) Southern Europe as an example of interaction between various environmental factors: a systematic review of the epidemiologic evidence. *Oncogene*, 25(27): 3756-3770.
62. Persson EC, Schwartz LM, Park Y, Trabert B, Hollenbeck AR, Graubard BI, Freedman ND, McGlynn KA. (2013) Alcohol consumption, folate intake, hepatocellular carcinoma, and liver disease mortality. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 22(3): 415-421.

63. Alexander J, Torbenson M, Wu TT, Yeh MM. (2013) Nonalcoholic Fatty Liver Disease Contributes to Hepatocellular Carcinoma in Non-cirrhotic Liver: A Clinical and Pathological Study. *J Gastroenterol Hepatol*, 28(5): 848-854.
64. White DL, Kanwal F, El-Serag HB. (2012) Association between nonalcoholic fatty liver disease and risk for hepatocellular cancer, based on systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 10(12): 1342-1359.
65. Torres DM, Harrison SA. (2012) Nonalcoholic steatohepatitis and noncirrhotic hepatocellular carcinoma: fertile soil. *Semin Liver Dis*, 32(1): 30-38.
66. Turati F, Talamini R, Pelucchi C, Polesel J, Franceschi S, Crispo A, Izzo F, La Vecchia C, Boffetta P, Montella M. (2012) Metabolic syndrome and hepatocellular carcinoma risk. *Br J Cancer*, 108(1): 222-228.
67. Caldwell SH, Crespo DM, Kang HS, Al-Osaimi AM. (2004) Obesity and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 127(5): 97-103.
68. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. (2003) Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*, 348(17): 1625-1638.
69. Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. (2007) Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis*, 27(1): 55-76.
70. Llovet JM, Bruix J. (2008) Molecular targeted therapies in hepatocellular. *Hepatology*, 48(4): 1312-1327.
71. Tilg H, Moschen AR. (2010) Evolution of inflammation in nonalcoholic. *Hepatology*, 52(5): 1836-1846.
72. Hashimoto E, Tokushige K. (2012) Hepatocellular carcinoma in nonalcoholic steatohepatitis: Growing evidence of an epidemic? *Hepatol Res*, 42(1): 1-14.
73. Asano T, Watanabe K, Kubota N. (2009) Adiponectin knockout mice on high fat diet develop fibrosing steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*, 24(10): 1669-1676.
74. Kamada Y, Matsumoto H, Tamura S. (2007) Hypoadiponectinemia accelerates hepatic tumor formation in a nonalcoholic steatohepatitis mouse model. *Hepatol*, 47(4): 556-564.

75. Price JA, Kovach SJ, Johnson T. (2002) Insulin-like growth factor I is a comitogen for hepatocyte growth factor in a rat model of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 36(5): 1089–1097.
76. Longato L, de la Monte S, Kuzushita N. (2009) Overexpression of insulin receptor substrate-1 and hepatitis Bx genes causes premalignant alterations in the liver. *Hepatology*, 49(6): 1935–1943.
77. Longato L, de la Monte S, Califano S, Wands JR. (2008) Synergistic premalignant effects of chronic ethanol exposure and insulin receptor substrate-1 overexpression in liver. *Hepatol Res*, 38(9): 940–953.
78. Singh R, Kaushik S, Wang Y. (2009) Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, 458(7242): 1131–1135.
79. Seki E, Brenner DA. (2008) Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology*, 48(1): 322–335.
80. Sze KM, Wong KL, Chu GK, Lee JM, Yau TO, Oi-Lin Ng I. (2011) Loss of phosphatase and tensin homolog enhances cell invasion and migration through AKT/Sp-1 transcription factor/matrix metalloproteinase 2 activation in hepatocellular carcinoma and has clinicopathologic significance. *Hepatology*, 53(5): 1558–1569.
81. Asim M, Sarma MP, Thayumanavan L, Kar P. (2011) Role of aflatoxin B1 as a risk for primary liver cancer in north Indian population. *Clin Biochem*, 44(14-15): 1235-40.
82. Ozturk M. (1991) p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *Lancet*, 338(8779): 1356-1359.
83. Li D, Cao Y, He L, Wang NJ, Gu JR. (1993) Aberrations of p53 gene in human hepatocellular carcinoma from China. *Carcinogenesis*, 14(2): 169-173.
84. Ma Y, Kong Q, Hua H, Luo T, Jiang Y. (2012) Aflatoxin B1 up-regulates insulin receptor substrate 2 and stimulates hepatoma cell migration. *PLoS One*, 7(10): e47961.
85. Loomba R, Yang HI, Su J, Brenner D, Barrett-Connor E, Iloeje U, Chen CJ. (2013) Synergism between obesity and alcohol in increasing the risk of hepatocellular carcinoma: a prospective cohort study. *Am J Epidemiol*, 177(4): 333-342.

86. Purohit V, Rapaka R, Kwon OS, Song BJ. (2013) Roles of alcohol and tobacco exposure in the development of hepatocellular carcinoma. *Life Sci*, 92(1): 3-9.
87. Tagger A, Donato F, Ribero ML, Chiesa R, Portera G, Gelatti U, Albertini A, Fasola M, Boffetta P, Nardi G. (1999) Case-control study on hepatitis C virus (HCV) as a risk factor for hepatocellular carcinoma: the role of HCV genotypes and the synergism with hepatitis B virus and alcohol. Brescia HCC Study. *Int J Cancer*, 81(5): 695-659.
88. Brescia HCC Study. Donato F, Tagger A, Chiesa R, Ribero ML, Tomasoni V, Fasola M, Gelatti U, Portera G, Boffetta P, Nardi G. (1997) Hepatitis B and C virus infection, alcohol drinking, and hepatocellular carcinoma: a case-control study in Italy. *Hepatology*, 26(3): 579-584.
89. Ioannou GN, Bryson CL, Weiss NS, Miller R, Scott JD, Boyko EJ. (2013) The prevalence of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in patients with human immunodeficiency virus infection. *Hepatology*, 57(1): 249-257.
90. Sahasrabudhe VV, Gunja MZ, Graubard BI, Trabert B, Schwartz LM, Park Y, Hollenbeck AR, Freedman ND, McGlynn KA. (2012) Nonsteroidal anti-inflammatory drug use, chronic liver disease, and hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 104(23): 1808-1814.
91. Inoue M, Yoshimi I, Sobue T, Tsugane S. (2005) Influence of coffee drinking on subsequent risk of hepatocellular carcinoma: a prospective study in Japan. JPHC Study. *J Natl Cancer Inst*, 97(4): 293-300.
92. Gelatti U, Donato F, Tagger A, Fantoni C, Portolani N, Ribero ML, Martelli C, Trevisi P, Covolo L, Simonati C, Nardi G. (2003) Etiology of hepatocellular carcinoma influences clinical and pathologic features but not patient survival. *Am J Gastroenterol*, 98(4): 907-914.
93. Usui E, Noshiro M, Ohyama Y, Okuda K. (1999) Unique property of liver mitochondrial P450 to catalyze the two physiologically important reactions involved in both cholesterol catabolism and vitamin D activation. *FEBS Lett*, 274(1-2): 175-177.
94. Aiba I, Yamasaki T, Shinki T, Izumi S, Yamamoto K, Yamada S, Terato H, Ide H, Ohyama Y. (2006) Characterization of rat and human CYP2J enzymes as Vitamin D 25-hydroxylases. *Steroids*, 71(10): 849-856.

95. Gupta RP, Hollis BW, Patel SB, Patrick KS, Bell NH. (2004) CYP3A4 is a human microsomal vitamin D 25-hydroxylase. *J Bone Miner Res*, 19(4): 680-688.
96. Townsend K, Evans KN, Campbell MJ, Colston KW, Adams JS, Hewison M. (2005) Biological actions of extra-renal 25-hydroxyvitamin D-1 $\alpha$ -hydroxylase and implications for chemoprevention and treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 97(1-2): 103-109.
97. Hansdottir S, Monick MM, Hinde SL, Lovan N, Look DC, Hunninghake GW.(2008) Respiratory epithelial cells convert inactive vitamin D to its active form: potential effects on host defense. *J Immunol*, 181(10): 7090-7099.
98. Schuster I, Egger H, Astecker N, Herzig G, Schüssler M, Vorisek G. (2001) Selective inhibitors of CYP24: mechanistic tools to explore vitamin D metabolism in human keratinocytes. *Steroids*, 66(3-5): 451-462.
99. Le Carrouer T, Assou S, Tondeur S, Lhermitte L, Lamb N, Reme T, Pantesco V, Hamamah S, Klein B, De Vos J. (2007) A meta-analysis of human embryonic stem cells transcriptome integrated into a web-based expression atlas. *Stem Cells*. 25(4): 961-973.
100. [www.nursa.org/10.1621/datasets.02001](http://www.nursa.org/10.1621/datasets.02001). NURSA. 2010.
101. Jones G, Prosser DE, Kaufmann M. (2012) 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): its important role in the degradation of vitamin D<sub>9-18</sub>. *Arch Biochem Biophys*, 523(1): 9-18.
102. Akeno N, Saikatsu S, Kawane T, Horiuchi N. (1997) Mouse vitamin D-24-hydroxylase: molecular cloning, tissue distribution, and transcriptional regulation by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Endocrinology*, 138(6): 2233-40.
103. Adachi R, Honma Y, Masuno H, Kawana K, Shimomura I, Yamada S, Makishima M. (2005) Selective activation of vitamin D receptor by lithocholic acid acetate, a bile acid derivative. *J Lipid Res*, 46(1): 46-57.
104. Pascussi JM, Robert A, Nguyen M, Walrant-Debray O, Garabedian M, Martin P, Pineau T, Saric J, Navarro F, Maurel P, Vilarem MJ. (2005) Possible involvement of pregnane X receptor-enhanced CYP24 expression in drug-induced osteomalacia. *Clin Invest*, 115(1): 177-186.

105. Albertson DG, Ylstra B, Seagraves R, Collins C, Dairkee SH, Kowbel D, Kuo WL, Gray JW, Pinkel D. (2000) Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat Genet*, 25(2): 144-146.
106. Anderson MG, Nakane M, Ruan X, Kroeger PE, Wu-Wong JR. (2006) Expression of VDR and CYP24A1 mRNA in human tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*, 57(2): 234-240.
107. Horváth HC, Lakatos P, Kósa JP, Bácsi K, Borka K, Bises G, Nittke T, Hershberger PA, Speer G, Kállay E. (2010) The candidate oncogene CYP24A1: A potential biomarker for colorectal tumorigenesis. *J Histochem Cytochem*, 58(3): 277-285.
108. Schuster I, Egger H, Astecker N, Herzig G, Schüssler M, Vorisek G. (2001) Selective inhibitors of CYP24: mechanistic tools to explore vitamin D metabolism in human keratinocytes. *Steroids*, 66(3-5): 451-462.
109. Mizuno Y, Masaki N, Hashimoto H, Ogata I, Aizawa C, Fujiwara K, Toda G, Mori M, Machinami R, Kurokawa K. (1991) Marked hypophosphatemia with decreased serum 1,25-dihydroxyvitamin D in a patient with hepatocellular carcinoma complicating liver cirrhosis. *Jpn J Med*, 30(1): 81-86.
110. Miyaguchi S, Watanabe T. (2000) The role of vitamin D3 receptor mRNA in the proliferation of hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 47(32): 468-472.
111. Morris DL, Jourdan JL, Finlay I, Gruenberger T, The MP, Pourgholami MH. (2002) Hepatic intra-arterial injection of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in lipiodol: Pilot study in patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*, 21(4): 201-206.
112. Sahpazidou D, Stravoravdi P, Toliou T, Geromichalos G, Zafiriou G, Natsis K, Gigis P. (2003) Significant experimental decrease of the hepatocellular carcinoma incidence in C3H/Sy mice after long-term administration of EB1089, a vitamin D analogue. *Oncol Res*, 13(5): 261-268.
113. Dalhoff K, Dancy J, Astrup L, Skovsgaard T, Hamberg KJ, Loftis FJ, Rosmorduc O, Erlinger S, Bach Hansen J, Steward WP, Skov T, Burcharth F,

- Evans TR. (2003) A phase II study of the vitamin D analogue Seocalcitol in patients with inoperable hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*, 89(2): 252-257.
114. Pourgholami MH, Morris DL.(2004) 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in lipiodol for the treatment of hepatocellular carcinoma: cellular, animal and clinical studies. *Steroid Biochem Mol Biol*, 89-90(1-5): 513-518.
115. Ghous Z, Akhter J, Pourgholami MH, Morris DL. (2008) Inhibition of hepatocellular cancer by EB1089: in vitro and in vivo study. *Anticancer Res*, 28(6A): 3757-3761.
116. Chiang KC, Persons KS, Istfan NW, Holick MF, Chen TC. (2008) Fish oil enhances the antiproliferative effect of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on liver cancer cells. *Anticancer Res*, 29(9): 3591-3596.
117. Pourgholami MH, Akhter J, Lu Y, Morris DL. (2000) In vitro and in vivo inhibition of liver cancer cells by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Cancer Lett*, 151(1): 97-102.
118. Hammad LN, Abdelraouf SM, Hassanein FS, Mohamed WA, Schaalaa MF. (2013) Circulating IL-6, IL-17 and vitamin D in hepatocellular carcinoma: Potential biomarkers for a more favorable prognosis? *J Immunotoxicol*, 10(4): 380-386.
119. Li Q, Gao Y, Jia Z, Mishra L, Guo K, Li Z, Le X, Wei D, Huang S, Xie K. (2012) Dysregulated Krüppel-like factor 4 and vitamin D receptor signaling contribute to progression of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 143(3): 799-810.
120. Gressner OA, Gao C, Siluschek M, Kim P, Gressner AM. (2009) Inverse association between serum concentrations of actin-free vitamin D-binding protein and the histopathological extent of fibrogenic liver disease or hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 21(9): 990-995.
121. Bookout AL, Jeong Y, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ. (2006) Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell*, 126(4): 789-799.
122. Pike JW, Meyer MB, Watanuki M, Kim S, Zella LA, Fretz JA, Yamazaki M, Shevde NK. (2007) Perspectives on mechanisms of gene regulation by 1,25-

- dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 103(3-5): 389-395.
123. Wang TT, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, Libby E, MacLeod NB, Nagai Y, Bourdeau V, Konstorium A, Lallemant B, Zhang R, Mader S, White JH. (2005) Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> target genes. *Mol Endocrinol*, 19(11): 2685-2695.
124. Kovalenko PL, Zhang Z, Cui M, Clinton SK, Fleet JC. (2010) 1,25-dihydroxyvitamin D-mediated orchestration of anticancer, transcript-level effects in the immortalized, non-transformed prostate epithelial cell line, RWPE1. *BMC Genomics*, 11: 26.
125. Gombart AF. (2009) The vitamin D-antimicrobial peptide pathway and its role in protection against infection. *Future Microbiol*, 4(9): 1151-1165.
126. Haussler MR, Haussler CA, Bartik L, Whitfield GK, Hsieh JC, Slater S, Jurutka PW. (2008) Vitamin D receptor: molecular signaling and actions of nutritional ligands in disease prevention. *Nutr Rev*, 66: 98-112.
127. Fleet JC. (1999) Vitamin D receptors: not just in the nucleus anymore. *Rev*, 57(2): 60-62.
128. Nemere I, Garbi N, Hämmerling GJ, Khanal RC. (2010) Intestinal cell calcium uptake and the targeted knockout of the 1,25D<sub>3</sub>-MARRS (membrane-associated, rapid response steroid-binding) receptor/PDIA3/Erp57. *J Biol Chem*, 285(41): 31859-31866.
129. Chen J, Olivares-Navarrete R, Wang Y, Herman TR, Boyan BD, Schwartz Z. (2010) Protein-disulfide isomerase-associated 3 (Pdia3) mediates the membrane response to 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in osteoblasts. *J Biol Chem*, 285(47): 37041-37050.
130. Nemere I, Garbi N, Hammerling G, Hintze KJ. (2012) Role of the 1,25D<sub>3</sub>-MARRS receptor in the 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-stimulated uptake of calcium and phosphate in intestinal cells. *Steroids*, 77(10): 897-902.
131. Baran DT, Quail JM, Ray R, Leszyk J, Honeyman T. (2000) Annexin II is the membrane receptor that mediates the rapid actions of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J Cell Biochem*, 78(1): 34-46.



132. Norman AW, Mizwicki MT, Norman DP. (2004) Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat Rev Drug Discov*, 3(1): 27-41.
133. Lau WY, Lai EC. (2009) The current role of radiofrequency ablation in the management of hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Ann Surg*, 249(1): 20-25.
134. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. (2003) Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 362(9399): 1907-1917.
135. Tsuzuki T, Sugioka A, Ueda M, Iida S, Kanai T, Yoshii H, Nakayasu K. (1990) Hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *Surgery*, 107(5): 511-520.
136. Llovet JM, Bruix J. (2003) Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology*, 37(2): 429-442.
137. Bruix J, Raoul JL, Sherman M, Mazzaferro V, Bolondi L, Craxi A, Galle PR, Santoro A, Beaugrand M, Sangiovanni A, Porta C, Gerken G, Marrero JA, Nadel A, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Llovet JM. (2012) Efficacy and safety of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: subanalyses of a phase III trial. *J Hepatol*, 57(4): 821-829.
138. Villanueva A, Llovet JM. (2011) Targeted therapies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 140(5): 1410-1426.
139. Hager G, Formanek M, Gedlicka C, Thurnher D, Knerer B, Kornfehl J. (2001) 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> induces elevated expression of the cell cycle-regulating genes P21 and P27 in squamous carcinoma cell lines of the head and neck. *Acta Otolaryngol*, 121(1): 103-109.
140. Akhter J, Lu Y, Finlay I, Pourgholami MH, Morris DL. (2001) 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its analogues, EB1089 and CB1093, profoundly inhibit the in vitro proliferation of the human hepatoblastoma cell line HepG2. *ANZ J Surg*, 71(7): 414-417.
141. Chiang KC, Yeh CN, Chen MF, Chen TC. (2011) Hepatocellular carcinoma and vitamin D: a review. *J Gastroenterol Hepatol*, 26(11): 1597-1603.
142. Brown AJ, Slatopolsky E. (2008) Vitamin D analogs: therapeutic applications and mechanisms for selectivity. *Mol Aspects Med*, 29(6): 433-452.

143. Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, Inoue Y, Morita K, Takeda E, Pike JW. (1997) Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol Endocrinol*, 11(8): 1165-1179.
144. Köstner K, Denzer N, Müller CS, Klein R, Tilgen W, Reichrath J. (2009) The relevance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms for cancer: a review of the literature. *Anticancer Res*, 29(9): 3511-3536.
145. Falletti E, Bitetto D, Fabris C, Cussigh A, Fontanini E, Fornasiere E, Fumolo E, Bignulin S, Cmet S, Minisini R, Pirisi M, Toniutto P. (2010) Vitamin D receptor gene polymorphisms and hepatocellular carcinoma in alcoholic cirrhosis. *World J Gastroenterol*, 16(24): 3016-3024.
146. Yao X, Zeng H, Zhang G, Zhou W, Yan Q, Dai L, Wang X. (2013) The Associated Ion between the VDR Gene Polymorphisms and Susceptibility to Hepatocellular Carcinoma and the Clinicopathological Features in Subjects Infected with HBV. *Biomed Res Int*, 2013: 953974.
147. Ng IO, Poon RT, Lee JM, Fan ST, Ng M, Tso WK. (2001) Microvessel density, vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1 and Flk-1/KDR in hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol*, 116(6): 838-845.
148. Jeng KS, Sheen IS, Wang YC, Gu SL, Chu CM, Shih SC, Wang PC, Chang WH, Wang HY. (2004) Prognostic significance of preoperative circulating vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in resectable hepatocellular carcinoma: a prospective study. *World J Gastroenterol*, 10(5): 643-648.
149. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. (2007) Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*, 7(9): 684-700.
150. Chung I, Wong MK, Flynn G, Yu WD, Johnson CS, Trump DL. (2006) Differential antiproliferative effects of calcitriol on tumor-derived and matrigel-derived endothelial cells. *Cancer Res*, 66(17): 8565-8573.
151. Iseki K, Tatsuta M, Uehara H, Iishi H, Yano H, Sakai N, Ishiguro S. (1999) Inhibition of angiogenesis as a mechanism for inhibition by 1 $\alpha$ -hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> of colon carcinogenesis induced by azoxymethane in Wistar rats. *Int J Cancer*, 81(5): 730-733.

152. Poon RT, Lau C, Pang R, Ng KK, Yuen J, Fan ST. (2007) High serum vascular endothelial growth factor levels predict poor prognosis after radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: importance of tumor biomarker in ablative therapies. *Ann Surg Oncol*, 14(6): 1835-1845.
153. Hidalgo AA, Deeb KK, Pike JW, Johnson CS, Trump DL. (2011) Dexamethasone enhances 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> effects by increasing vitamin D receptor transcription. *J Biol Chem*, 286(42): 36228-36237.
154. Cagnon L, Wagaman P, Bartenschlager R, Pietschmann T, Gao T, Kneteman NM, Tyrrell DL, Bahl C, Niven P, Lee S and Simmen KA. (2004) Application of the trak-C HCV core assay for monitoring antiviral activity in HCV replication systems. *J Virol Methods*, 118(1): 23-33.
155. Frese M, Barth K, Kaul A, Lohmann V, Schwärzle V and Bartenschlager R (2003) Hepatitis C virus RNA replication is resistant to tumour necrosis factor- $\alpha$ . *J Gen Virol*, 84: 1253-1259.
156. Lohmann V, Körner F, Koch J, Herian U, Theilmann L and Bartenschlager R. (1999) Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, 285: 110-113.
157. Knowles BB, Howe CC and Aden DP. (1980) Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*, 209: 497-499.
158. Hsu SL, Lin YF, Chou CK. (1993) Retinoic acid biphasically regulates the gene expression of hepatitis B virus surface antigen in human hepatoma Hep3B cells. *J Biol Chem*, 268: 23093-23097.
159. Spina CS, Tangpricha V, Uskokovic M, Adorinic L, Maehr H, Holick MF. (2006) Vitamin D and cancer. *Anticancer Res*, 26: 2515-2524.
160. Pourgholami MH, Morris DL. (2004) 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in lipiodol for the treatment of hepatocellular carcinoma: cellular, animal and clinical studies. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 89-90: 513-518.
161. Trinchet JC, Alperovitch A, Bedossa P, Degos F, Hainaut P, Beers BV. (2009) Epidemiology, prevention, screening and diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Bull Cancer*, 96: 35-43.

162. Debruyne EN, Delanghe JR. (2008) Diagnosing and monitoring hepatocellular carcinoma with alpha-fetoprotein: new aspects and applications. *Clin Chim Acta*, 395: 19–26.
163. Molecular and serum markers in hepatocellular carcinoma: predictive tools for prognosis and recurrence. Singhal A, Jayaraman M, Dhanasekaran DN, Kohli V. *s.l. : Crit Rev Oncol Hematol.* , 2012, Vols. 82:116–140.
164. Zhao Y, Qiang J, Li G. (2013) Tumor markers for hepatocellular carcinoma. *Mol Clin Oncol*, 1(4): 593–598.
165. Fedirko V, Duarte-Salles T, Bamia C, Trichopoulou A, Aleksandrova K, Trichopoulos D, Trepo E, Tjønneland A, Olsen A, Overvad K, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, Kvaskoff M, Kühn T, Lukanova A, Boeing H, Buijsse B, Klinaki E, Tsimakidi C, Naccarati A. (2014) Pre-diagnostic circulating vitamin D levels and risk of hepatocellular carcinoma in European populations: A nested case-control study. *Hepatology*, 60(4): 1222-1230.
166. Pourgholami MH, Akhter J, Finlay IG, Morris DL. (2000) 1,25-dihydroxyvitamin D3 dissolved in lipiodol produces a sustained antiproliferative effect in the human hepatoblastoma cell line HepG2. *Anticancer Res*, 20: 723-727.
167. Ghous Z, Akhter J, Pourgholami MH, Morris DL. (2008) Inhibition of hepatocellular cancer by EB1089: in vitro and in vivo study. *Anticancer Res.*, 28: 3757-3761.
168. Lechner D, Kállay E, Cross HS. (2007) 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 downregulates CYP27B1 and induces CYP24A1 in colon cells. *Mol Cell Endocrinol*, 263(1-2): 55-64.
169. Parise RA, Egorin MJ, Kanterewicz B, Taimi M, Petkovich M, Lew AM, Chuang SS, Nichols M, El-Hefnawy T, Hershberger PA. (2006) CYP24, the enzyme that catabolizes the antiproliferative agent vitamin D, is increased in lung cancer. *Int J Cancer*, 119(8): 1819-1828.
170. Balla B, Kósa JP, Tobiás B, Halászlaki C, Takács I, Horváth H, Speer G, Nagy Z, Horányi J, Járay B, Székely E, Lakatos P. (2011) Marked increase in CYP24A1 gene expression in human papillary thyroid cancer. *Thyroid*, 21(4): 459-460.

171. Lopes N, Sousa B, Martins D, Gomes M, Vieira D, Veronese LA, Milanezi F, Paredes J, Costa JL, Schmitt F. (2010) Alterations in Vitamin D signalling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions. *BMC Cancer*, 10: 483.
172. Kloss M, Fischer D, Thill M, Friedrich M, Cordes T, Salehin D, Diedrich K, Köster F. (2010) Vitamin D, calcidiol and calcitriol regulate vitamin D metabolizing enzymes in cervical and ovarian cancer cells. *Anticancer Res*, 30(11): 4429-4434.
173. Muindi JR1, Yu WD, Ma Y, Engler KL, Kong RX, Trump DL, Johnson CS. (2010) CYP24A1 inhibition enhances the antitumor activity of calcitriol. *Endocrinology*, 151(9): 4301-4312.
174. Hendrickson WK, Flavin R, Kasperzyk LJ, Fiorentino M, Fang F, Lis R. (2011) Vitamin D Receptor Protein Expression in Tumor Tissue and Prostate Cancer Progression. *J Clin Onc*, 29: 2378-2385.
175. Clinckspoor I, Hauben E, Verlinden L, Van den Bruel A, Vanwalleghem L, Vander Poorten V, Delaere P, Mathieu C, Verstuyf A, Decallonne B. (2012) Altered expression of key players in vitamin D metabolism and signaling in malignant and benign thyroid tumors. *J Histochem Cytochem*, 60(7): 502-511.
176. Lointier P, Meggouh F, Dechelotte P, Pezet D, Ferrier C, Chipponi J, Saez S. (1991) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 receptors and human colon adenocarcinoma. *Br J Surg*, 78(4): 735-739.
177. Matusiak D, Murillo G, Carroll RE, Mehta RG, Benya RV. (2005) Expression of vitamin D receptor and 25-hydroxyvitamin D3-1{alpha}-hydroxylase in normal and malignant human colon. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14(10): 2370-2376.
178. Gascon-Barre M, Demers C, Mirshahi A, Neron S, Zalzal S, Nanci A. (2003) The normal liver harbours the vitamin D nuclear receptor in nonparenchymal and biliary epithelial cells. *Hepatology*, 37: 1034-1042.
179. Han S, Chiang JY. (2009) Mechanism of vitamin D receptor inhibition of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene transcription in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*, 37(3): 469-478.

180. Han S, Li T, Ellis E, Strom S, Chiang JY. (2010) A novel bile acid-activated vitamin D receptor signaling in human hepatocytes. *Mol Endocrinol*, 24(6): 1151-1164.
181. Gascon-Barré M, Gamache M. (1991) Contribution of the biliary pathway to the homeostasis of vitamin D<sub>3</sub> and of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Endocrinology*, 129(5): 2335-2344.
182. He RK, Gascon-Barré M. (1997) Influence of the vitamin D status on the early hepatic response to carcinogen exposure in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 282: 464-469.
183. Segura C, Alonso M, Fraga C, García-Caballero T, Diéguez C, Pérez-Fernández R. (1999) Vitamin D receptor ontogenesis in rat liver. *Histochem Cell Biol*, 112(2): 163-167.
184. Mohri T, Nakajima M, Takagi S, Komagata S, Yokoi T. (2009) MicroRNA regulates human vitamin D receptor. *Int J Cancer*, 125(6): 1328-1333.
185. Fingas CD, Altinbas A, Schlattjan M, Beilfuss A, Sowa JP, Sydor S, Bechmann LP, Ertle J, Akkiz H, Herzer K, Paul A, Gerken G, Baba HA, Canbay A. (2013) Expression of apoptosis- and vitamin D pathway-related genes in hepatocellular carcinoma. *Digestion*, 87(3): 176-181.
186. Hendrickson WK, Flavin R, Kasperzyk JL, Fiorentino M, Fang F, Lis R, Fiore C, Penney KL, Ma J, Kantoff PW, Stampfer MJ, Loda M, Mucci LA, Giovannucci E. (2011) Vitamin D receptor protein expression in tumor tissue and prostate cancer progression. *J Clin Oncol*, 29(17): 2378-2385.
187. Trowbridge R1, Sharma P, Hunter WJ, Agrawal DK. (2012) Vitamin D receptor expression and neoadjuvant therapy in esophageal adenocarcinoma. *Exp Mol Pathol*, 93(1): 147-153.
188. Yang MH, Chen CL, Chau GY, Chiou SH, Su CW, Chou TY, Peng WL, Wu JC. (2009) Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 50(5): 1464-1474.
189. Li Q, Gao Y, Jia Z, Mishra L, Guo K, Li Z, Le X, Wei D, Huang S, Xie K. (2012) Dysregulated Krüppel-like factor 4 and vitamin D receptor signaling

- contribute to progression of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 143(3): 799-810.
190. Zinser GM, McEleney K, Welsh J. (2003) Characterization of mammary tumor cell lines from wild type and vitamin D3 receptor knockout mice. *Mol Cell Endocrinol*. 200: 67-80.
  191. Swami S, Krishnan AV, Feldman D. (2000) 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 down-regulates estrogen receptor abundance and suppresses estrogen actions in MCF-7 human breast cancer cells. *Clin Cancer Res*, 6(8): 3371-3379.
  192. Stoica A, Saceda M, Fakhro A, Solomon HB, Fenster BD, Martin MB. (1999) Regulation of estrogen receptor-alpha gene expression by 1, 25-dihydroxyvitamin D in MCF-7 cells. *J Cell Biochem*, 75(4): 640-651.
  193. Kennedy L, Baker K, Hodges K, Graf A, Venter J, Hargrove L, Harris R, Harnish E, Meng F, Francis H. (2013) Dysregulation of vitamin D3 synthesis leads to enhanced cholangiocarcinoma growth. *Dig Liver Dis*, 45(4): 316-322.
  194. Mimori K, Tanaka Y, Yoshinaga K, Masuda T, Yamashita K, Okamoto M, Inoue H, Mori M. (2004) Clinical significance of the overexpression of the candidate oncogene CYP24 in esophageal cancer. *Ann Oncol*, 15(2): 236-241.
  195. Chen G, Kim SH, King AN, Zhao L, Simpson RU, Christensen PJ, Wang Z, Thomas DG, Giordano TJ, Lin L, Brenner DE, Beer DG, Ramnath N. (2011) CYP24A1 is an independent prognostic marker of survival in patients with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 17(4): 817-826.
  196. Gal-Tanamy M, Bachmetov L, Ravid A, Koren R, Erman A, Tur-Kaspa R, Zemel R. (2011) Vitamin D: an innate antiviral agent suppressing hepatitis C virus in human hepatocytes. *Hepatology*, 54(5): 1570-1579.

## 10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Prof. Dr. Szalay Ferenc** tanár úrnak, aki PhD munkám első percétől fogva bíztatott, hitt közös munkáink eredményességében, ezáltal szakmai tudásával és tapasztalatával utat mutatva a tudományos munka olykor nehézkes, de sok izgalmat magában rejtő útvesztőjében. Útmutatásai által nemcsak a tudomány iránti tiszteletet, elhivatottságot és szeretet erősítette kutatóéveim során, hanem az azzal járó csapatmunka és szakmai etika olykor íratlan szabályaira is megtanított. A közösen átdolgozott évek során megtanultam, hogy az orvostudománynak aktív, előremutató szereplői lehetünk, ami egyben a jó orvos belső készítetése is. Szalay professzor széles látókörűsége arra is megtanított, hogy a tudományos kísérletek, szövetek, klinikai paraméterek mögött meglássam a beteget, aki ugyan egy adat a tudományos statisztikai értékelés során, de orvosként és emberként megtanuljam a velük való kommunikációt is.

Köszönet **Prof. Dr. Szatmári Miklós** professzor úrnak, hogy PhD éveim során az általa vezetett klinika munkatársa lehettem.

Köszönet **Prof. Dr. Lakatos Péter** professzor úrnak, aki tudományos ötleteivel és útbaigazításaival mindig rendelkezésemre állt, és akinek molekuláris biológiai laboratóriumában lehetőségem volt a kísérletek elvégzéséhez.

Köszönet **Dr. Balla Bernadett**nek, aki baráti jótanácsaival és szakmai felkészültségével igen sokszor átsegített a mindennapok nehéz helyzetein. Köszönet **Dr. Kósa János**nak, **Dr. Borka Katalinnak**, hogy megosztották velem a sok éves kutatómunka kapcsán szerzett tapasztalataikat. **Prof. Dr Kupcsulik Péter**nek, hogy az általa korábban vezetett I.sz. Sebészeti Klinikán lehetővé tette a májdaganatos betegek szövettani mintáihoz és adataihoz való hozzáférést. **Dr. Kovalszky Iona** professzor asszonynak a HCC sejtvonalakért.

**Dr. Gyöngyösi Benedek, Dr. Somorác Áron, Dr. Korompay Anna, Dr. Fábíán Melinda, Dr. Németh Dániel és Dr. Hasan Jozilan** PhD és volt TDK társaimnak a minták és az adatok gyűjtésében való segítségét.

Köszönöm a laboratórium minden kedves munkatársának, **Szabóné Sinkovits Tünde, Keresztényi Györgyi, Dr. Sklánitzné Samodai Erika** türelmét és gyakorlati segítségét. **Dr. Lazáry Áron**nak az eredmények statisztikai kiértékelésében nyújtott szakmai segítségét.



Nem utolsó sorban szüleimnek, húgomnak, nagyszüleimnek és férjemnek, akik a kutatómunkával járó valamennyi személyes lemondás elszenvedői voltak, és mindvégig türelemmel és szeretettel kísérték a céljaim megvalósításához vezető úton.

## 11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### 11.1. A doktori értekezés témájával összefüggő közlemények

1. **Horváth E**, Lakatos P, Balla B, Kósa JP, Tóbiás B, Jozilan H, Borka K, Horváth HC, Kovalszky I, Szalay F. (2012) Marked increase of CYP24A1 mRNA level in hepatocellular carcinoma cell lines following vitamin D administration.

Anticancer Res. 32(11): 4791-4796.

**IF (2012): 1,713**

2. **Horváth E**, Balla B, Kósa JP, Lakatos PA, Lazáry Á, Németh D, Jozilan H, Somorácz Á, Korompay A, Gyöngyösi B, Borka K, Kiss A, Kupcsulik P, Schaff Zs, Szalay F. (2016) A D-vitamin metabolizmusa humán hepatocellularis carcinomában és az azt körülvevő tumormentes májszövetben. Orv. Hetil. 157(48): 1910-1918.

**IF (2015): 0,291**

### 11.2. Egyéb közlemények

1. Osztovits J, **Horváth E**, Tax J, Csihi L, Horvath T, Littvay L, Toth T, Abonyi M, Lakatos PL, Kollai M, Feher J, Szalay F, Blum HE. (2011) Reversible autonomic dysfunction during antiviral treatment in patients with chronic hepatitis C virus infection: Anti-HCV therapy and autonomic function. Hepat Mon. 11(2): 114-118.

**IF (2011): 2,19**

2. Bata P, Tarnoki AD, Tarnoki DL, **Horváth E**, Berczi V, Szalay F. (2012) Acute severe thrombocytopenia following non-ionic low-osmolarity intravenous contrast medium injection. Korean J Radiol. 13(4): 505-509.

**IF (2012): 1,555**

3. Kósa JP, Horváth P, Wölfling J, Kovács D, Balla B, Mátyus P, **Horváth E**, Speer G, Takács I, Nagy Z, Horváth H, Lakatos P. (2013) CYP24A1 inhibition facilitates the anti-tumor effect of vitamin D3 on colorectal cancer cells. World J Gastroenterol. 19(17): 2621-2628.

**IF (2013): 2,433**

4. Tobiás B, Halászlaki Cs, Balla B, Kósa JP, Árvai K, Horváth P, Takács I, Nagy Z, **Horváth E**, Horányi J, Járay B, Székely E, Székely T, Győri G, Putz Z, Dank M, Valkusz Z, Vasas B, Iványi B, Lakatos P. (2016) Genetic Alterations in Hungarian Patients with Papillary Thyroid Cancer. *Pathol Oncol Res.* 22(1):27-33.

**IF (2015): 1,940**