

# 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

## 1. 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. Vastagbél-daganat incidenciája kapcsán figyelték meg elsőként, hogy a napsütötte órák számának, illetve a betegek szérumban D-vitamin szintjének csökkenésével jelentősen emelkedik a colorectalis carcinoma előfordulása. A további kutatások során bebizonyosodott a D-vitamin antitumor hatása számos más rosszindulatú daganatban, így hepatocelluláris carcinómában (HCC) is. A kezdeti kutatások során kiderült, hogy a D-vitamin hiányos egerek fogékonyabbak a vegyi anyagok hatására kísérletesen indukált hepatocarcinogenezisre. A HCC előfordulása és etiológiája igen változatos földrajzi különbségeket mutat. Magyarországon az országos Rákregiszter adatai alapján évente kb. 600 új esetet diagnosztizálnak, és kb. ugyanennyire tehető az éves mortalitás. A Semmelweis Egyetem I.sz. Sebészeti Klinikáján 1996-2009 között 211 esetben végeztek májrezekciót HCC miatt. A HCC kezelése egyre gyakoribb feladat a magyarországi orvosi gyakorlat számára is. A legújabb epidemiológiai felmérések szerint az utóbbi években a HCC incidenciája emelkedőben van. A HCC 70-90%-a májcirrhosis talaján alakul ki. A májcirrhosis leggyakoribb oka a HBV, HCV infekció, alkoholos májkárosodás és a nem-alkoholos steatohepatitis (NASH). Kevésbé gyakori a hereditár haemochromatosis,  $\alpha$ -1 antitripszin hiány, autoimmun hepatitis, Wilson-kór és néhány porfíriatípus. A cirrhotikus göbök kb. felében kimutatható klónális sejtszaporodás. Világviszonylatban a HCC leggyakoribb etiológiai faktora a HBV fertőzés. Becslések szerint 350-400 millió fertőzöttel kell számolni világszerte. A HBV vírus az esetek 70-90%-ában cirrhosison keresztül okoz májrákot. A HBV infekciónál magasabb a HCC kialakulásának a kockázata (májcirrhosistól függetlenül) HCV fertőzés esetén. A HCV fertőzött betegek sikeres antivirális kezelése (pl. pegilált interferon + ribavirin) csökkenti a HCC kialakulásának kockázatát. Hazánkban a rendszeres alkoholfogyasztás komoly probléma. Az európai populációban az alkohol okozta HCC aránya 10,2%-ra tehető. 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 gyakorlati diagnózisa nem egyszerű

májcirrhosis és hepatocelluláris carcinóma együttes jelenléte esetén. Az aflatoxin B1 mérgezés világviszonylatban igen jelentős szerepet bír a HCC kialakulásában.

A D-vitamin elnevezés két vegyületre utal: cholecalciferol (vitamin D3), ami UV sugárzás hatására keletkezik a bőrben 7-dehydrocholesterolból, illetve az ergocalciferol (vitamin D2), ami ergoszterolból képződik. Az  $1\alpha$ -hidroxilációt végző enzim a mitokondriális CYP27B1, amely legnagyobb mennyiségben a vese proximális tubulusaiban expresszálódik, habár alacsonyabb mértékben számos más szövetben is megtalálható. 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. Magas CYP24A1 expresszió mutatható ki számos humán malignus daganatban (emlő, prostata, bőr, nyelőcső, stb). A magas CYP24A1 expresszió rosszabb prognózissal járt néhány dagattípusban, valószínűleg az enzim fokozott aktivitásával összefüggő alacsonyabb helyi antitumor hatással bíró  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  koncentrációcsökkenés miatt. 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 szérumban D-vitamin koncentrációt a szérumban. 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. A D-vitamin, mint szisztémás szer, illetve a terápiás hatás eléréséhez szükséges dózis alkalmazása hiperkalcémiát és hiperkalciuriát okozó hatása miatt korlátozott. Számos ilyen mellékhatással nem rendelkező D-vitamin analóg (EB1089, CB1093, MART-10) van kísérleti stádiumban. A D-vitamin intracelluláris hatásainak nagy részét a VDR receptorán keresztül fejt ki.

## **2. CÉLKITŰZÉSEK**

### **2.1. Hepatocelluláris carcinómás betegek epidemiológiai vizsgálata a Semmelweis Egyetem I.sz. Belgyógyászati Klinika anyagában**

1. Melyek a legfontosabb etiológiai tényezők a hepatocelluláris carcinóma (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?

## **2.2. A $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 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?

## **2.3. 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?

## **3. MÓDSZEREK**

### **3.1. Betegek a hepatocelluláris carcinóma epidemiológiai vizsgálatához**

A Semmelweis Egyetem I.sz. Belgyógyászati Klinikán 2004 és 2009 között diagnosztizált HCC eseteket gyűjtöttük össze. A klinikopatológiai adatokat (életkor,

nem, cirrhosis jelenléte, AFP, etiológia, stb.) vizsgáltuk retrospektíven. Az adatokat a Semmelweis Egyetem hivatalos informatikai rendszerének adatbázisából (MedSol), illetve a betegek kórlapjaiból gyűjtöttük ki előzetes etikai engedély birtokában (SETUKEB: 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 HCC etiológiája összesen 102 beteg esetében állt rendelkezésre, így az etiológiai megoszlás statisztikai feldolgozása 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 Wilson-kór és a hemochromatosis is.

### **3.2. Hepatocelluláris carcinóma sejtvonalak**

In vitro vizsgálatokat 4 különböző humán HCC sejtvonalon végeztünk: HepG2, Huh-Neo, Huh5-15 és Hep3B. A Huh-Neo sejtvonala neomicin foszfortranszferáz gént tartalmaz, ezáltal rezisztens a neomicinre. A Huh5-15 sejtek subgenomikus HCV replikont tartalmaznak (I<sub>389</sub>hyg-ubi/NS3-3'). A HepG2 egy 15 éves kaukázusi-amerikai férfi magasan differenciált hepatocelluláris carcinómájából származik. A Hep3B szintén magasan differenciált sejtvonala egy 8 éves fekete nőbetegből, amely HBV integrált genomot tartalmaz. A sejteket Dulbecco's Modified Eagle's Medium-ban inkubáltuk ami 10% magzati borjú szérumot, 1 mM nátrium piruvátot, 100 IU penicillint, 100 g/ml streptomocint és 4 mM glutamint 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 szubkulturákat 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.

### **3.3. 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> inkubáció**

A biológiailag aktív 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> hormont 100 M koncentrációjú etanolban oldottuk, és Opti-MEM-ben hígítottuk 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  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  tartalmazó Opti-MEM oldatban kezeltük 5 órán keresztül,  $37^\circ\text{C}$ -on, párasított levegőben, amely 95% légköri levegőt és 5%  $\text{CO}_2$ -ot tartalmazott. A sejteket előzőleg leírtak alapján összegyűjtöttük. A dóziszfüggés vizsgáló kísérletrészben a sejteket különböző mennyiségű  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -mal kezeltük (0,256; 0,64; 1,6; 4,0; 10,0 nM) 5 órán át két párhuzamos sejtvonalon. Az időfüggés vizsgálatára valamennyi sejt kultúrát 4 nmol  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -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.

#### **3.4. Betegek és szövettani minták a CYP24A1 mRNS és fehérje vizsgálatához**

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 hematoxilin-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.

#### **3.5. 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  $64\pm 12,66$  év volt. A HCC etiológiai megoszlása a következő: 12 alkohol, 8 HCV, 5 HBV és 11 kriptogén.

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

A HCC sejtekből való RNS izoláláshoz RNS-t Roche High Pure Total RNA Isolation Kit-et használtunk a gyártó utasításait követve. A CYP24A1 mRNS vizsgálatához friss fagyasztott, műtéti rezekátumokból származó májszövet mintákat használtunk. Ebben az esetben is a totál RNS izolálást High Pure Total RNA Isolation Kit segítségével végeztük a gyártó útmutatása szerint. Az izolált RNS homogenizátumot felhasználásig  $-80^\circ\text{C}$ -on tároltuk. A CYP27B1 és VDR mRNS

vizsgálatához a paraffinba ágyazott metszetekből a High Pure RNA Paraffin Kit segítségével totál RNS-t izoláltunk a gyártó útmutatása alapján. Valamennyi módszer alapján izolált RNS-ből m cDNS szintézis és kvantitatív RT-PCR vizsgálat azonosan történt: 500 nanogramm totál RNS-t írtunk át cDNS-é reverz transzkriptázzal. A kiválasztott gének amplifikálásához előre megtervezett és validált gén-specifikus TaqMan próba alapú génextpressziós Assayt használtunk ABI Prism 7500 valós idejű PCR rendszerben. Minden gént 3-3 párhuzamos méréssel vizsgáltunk. A relatív kvantifikáció kiértékelése az összegyűjtött adatokból (küszöb ciklus számok, Ct) 7500 System SDS software 1.3 felhasználásával készült. A gén-specifikus mRNS relatív mennyiségét (RQ) a gyártó előírása szerint az átlag  $\Delta Ct$  értékekből (cél gén Ct értéke - endogén kontroll gén Ct értéke) számítottuk.

### **3.7. Immuncitológia és immunhisztokémiai vizsgálatok**

Az immuncitokémiai vizsgálatokhoz a sejteket speciális sejttenyésztő lemezen (Lab-Tek® Chamber Slide™) inkubáltuk a korábbiaknak leírtaknak megfelelően. A humán májszövet CYP24A1 fehérje vizsgálatát a paraffinba ágyazott szövetek 5  $\mu$ m vastag metszetein végeztük. 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.

### **3.8. Statisztikai analízis**

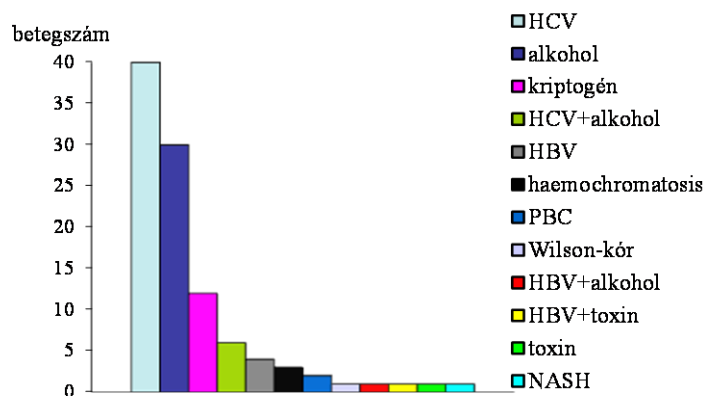
Az adatokat Windows-on alkalmazott SPSS (18. Verzió, IBM, Armonk, NY, USA) programmal értékeltük. A végső eredményt két független változó átlagából számoltuk. Az eredményeket átlag  $\pm$  standard hiba-ként adtuk meg. A statisztikai analízist kétmintás Student t-próbával és Mann-Whitney U teszttel végeztük.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

## **4. EREDMÉNYEK**

### **4.1. 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 betegek 5 éves túlélése mindössze 3,68%, az átlagos túlélés 12 hónap volt. A

vizsgálat lezárásakor a betegeknek csupán 17,8%-a volt életben. A hepatocellularis carcinóma az esetek 89%-ban cirrhosis talaján alakult ki. 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-ből, 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) (1. ábra). 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.



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

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



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

### *4.2.1. VDR mRNS expresszió négy HCC sejtvonalon*

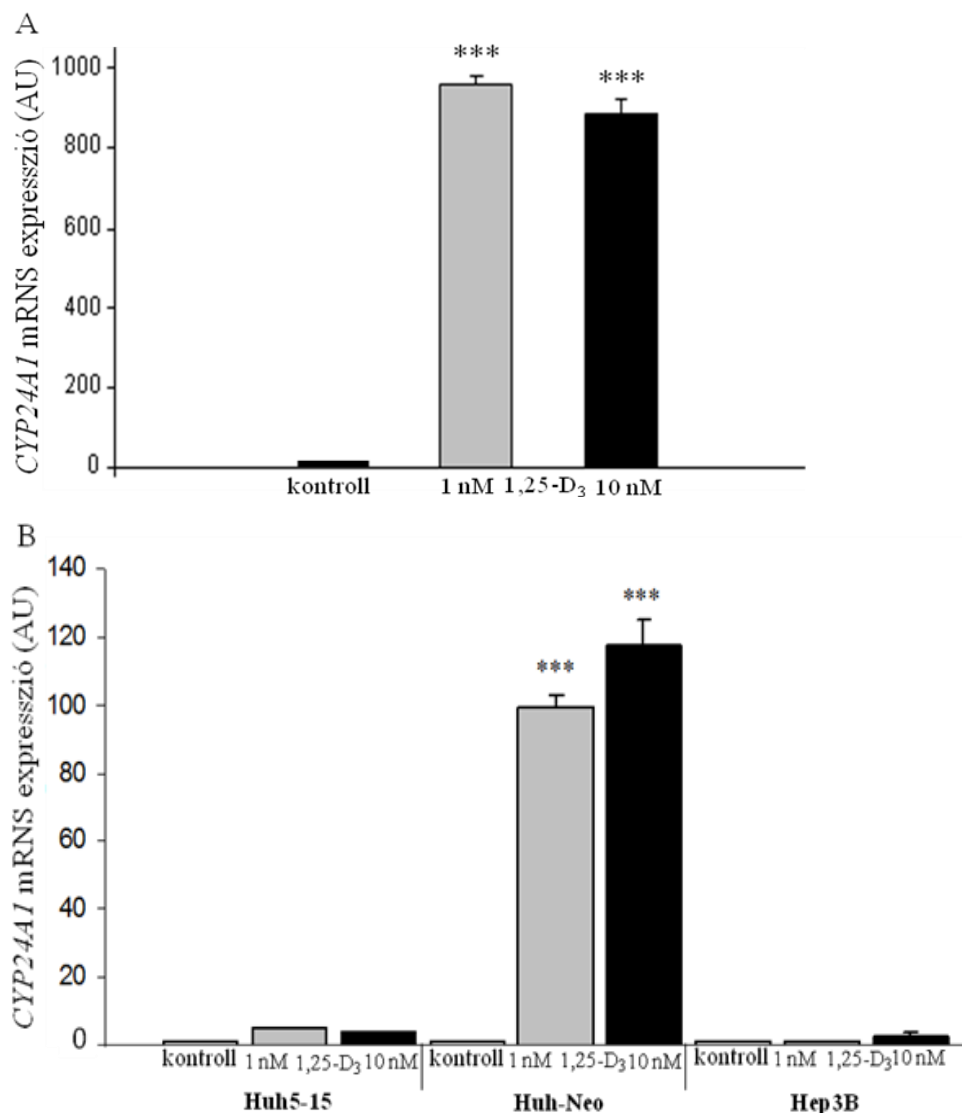
Eredményeink alapján mind a négy HCC sejtvonalon kimutatható a VDR expresszió, habár igen alacsony mértékben. A kétféle koncentraciójú D-vitaminnal történő kezelés hatására nem változott szignifikáns mértékben a VDR expressziója 5 órás inkubációt követően egyik sejtvonalon sem.

### *4.2.2. CYP27B1 mRNS expresszió négy HCC sejtvonalon*

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy mind a négy sejtvonalon expresszálódik a CYP27B1 D-vitamin aktiváló enzim. 1nM és 10nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -mal történő in vitro 5 órás inkubációt követően nem volt kimutatható szignifikáns expresszió változás egyik sejtvonalon sem.

### *4.2.3. CYP24A1 mRNS expresszió négy HCC sejtvonalon*

Mind a négy sejtvonalon kimutatható a CYP24mRNS expressziója, habár igen alacsony mértékben. Mind 1nM, mind 10nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  hozzáadását és 5 órás inkubálást követően szignifikánsan emelkedett az enzim mRNS expressziója HepG2 és Huh-Neo sejtvonalakban ( $p < 0,0001$ ), de nem volt hatással a Huh5-15 és Hep3B sejttípusokra (2. ábra). A legmagasabb CYP24A1 mRNS expresszió növekedést a HepG2 sejtvonalon találtuk 1nM mennyiségű  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  adását és 5 órás inkubációt követően (2.A ábra). A CYP24A1 mRNS növekedés három nagyságrendű volt a HepG2 sejtvonal esetén, és közel 100-szoros a Huh-Neo esetén már 1nM D-vitamin adását és 5 óra inkubációt követően is. HepG2 sejtvonal esetén a nagyobb mennyiségű, 10nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  adása után nem volt tapasztalható nagyobb mértékű CYP24A1 mRNS növekedés, ugyanakkor a hormon koncentrációjának emelkedésével a Huh-Neo sejtvonalon további szignifikáns CYP24A1 mRNS expresszió növekedést figyeltünk meg.



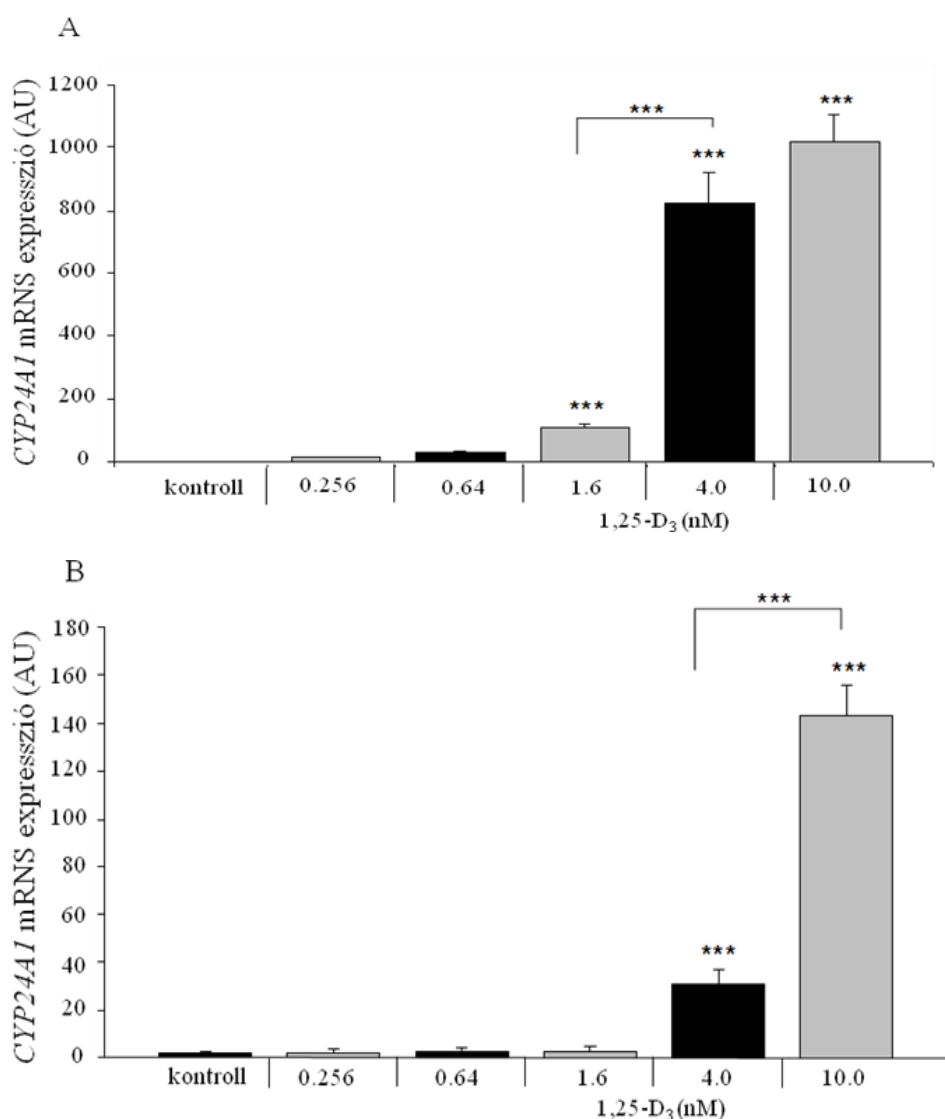
2. ábra: **A:** CYP24A1 mRNA expresszió változás HepG2 sejtvonalon különböző mennyiségű  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  hatására 5 óra inkubációt követően.

**B:** CYP24A1 mRNA 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.

#### 4.2.4. CYP24A1 mRNA expresszió változás mérése a D-vitamin koncentráció mértéke szerint HepG2 és Huh-Neo sejtvonalakon

A CYP24A1 mRNA D-vitamin dózisfüggő expresszióemelkedését mutattuk ki mindkét sejtvonalon 4 órás inkubációt követően. Ugyanazon kísérleti körülmények között a HepG2 sejtekben magasabb volt az enzim expressziója az egyes  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  dózis adását követően a Huh-Neo sejtekhez képest. 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 4,0 nM adását követően volt tapasztalható. 1,6, 4,0 és 10,0 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  kezelést követően a CYP24A1 mRNS expresszió folyamatos expresszió emelkedését figyeltük meg a következő mértékben: HepG2 sejtek esetén 180-, 820- és 1010-szeres emelkedés, a HUH-Neo sejtek 2,0-, 38- és 140-szoros emelkedéséhez képest (3. ábra).

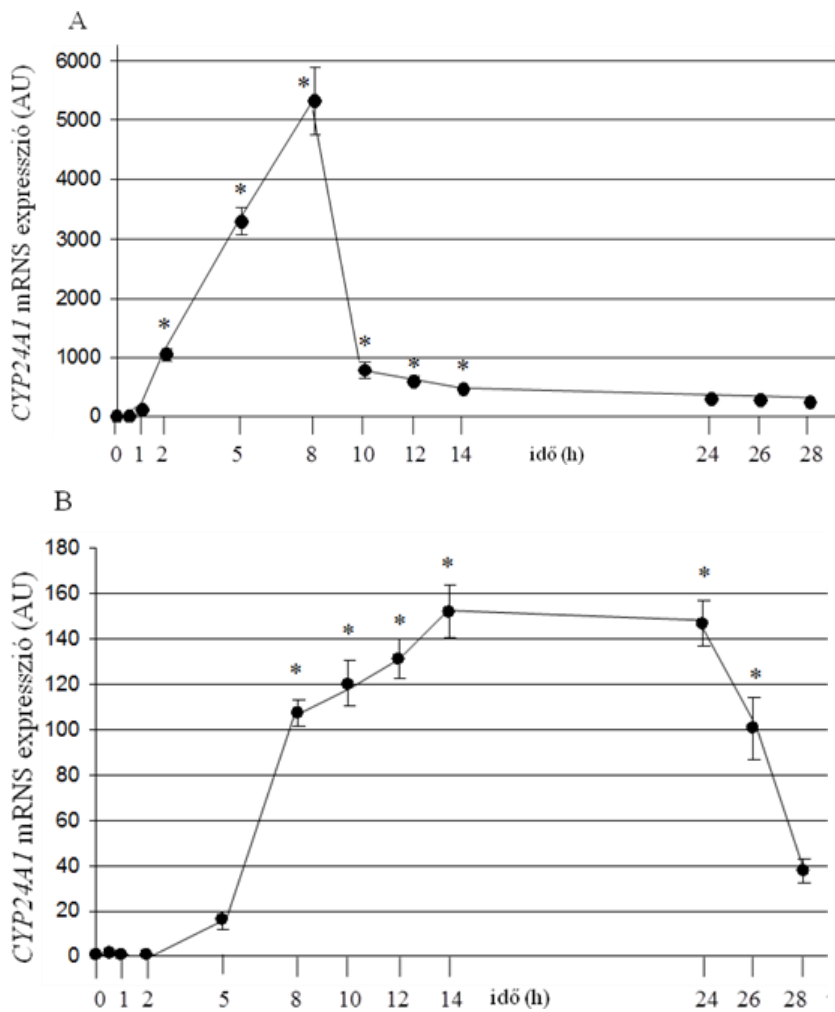


3. ábra: **A.** CYP24A1 mRNS expresszió változás HepG2 sejtvonalon növekvő mennyiségű  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  adását követően 4 óra inkubáció során.

**B.** 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.

4.2.5. CYP24A1 mRNS expresszió változás mérése 4nM D-vitamin adására az idő függvényében HepG2 és Huh-Neo sejtvonalakon

A CYP24A1 enzim mRNS expressziója nem csak a dózistól függően változott a HepG2 és Huh-Neo sejtvonalak között, hanem kinetikai különbség is kimutatható volt. A HepG2 sejtek esetén a CYP24A1 mRNS maximális expressziója 5300-szoros volt a D-vitaminnal történő kezelés 8. órájában (4.A ábra). A Huh-Neo sejtek esetén a maximális expresszió 152-szeres volt a nem kezelt sejtekhez képest, amit a kezelés 14. órájában mutattunk ki (4.B ábra).



4. ábra: A. CYP24A1 mRNS expresszió változás HepG2 sejtvonalon az idő függvényében 4 nM 1 $\alpha$ ,25(OH)2D3 hatására.

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

#### *4.2.6. CYP24A1 fehérje expresszió immuncitológiai kimutatása HepG2 sejtvonalon*

Immuncitológiai vizsgálattal kimutattuk, hogy  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  adását követően tapasztalt jelentős CYP24A1 mRNS expresszió emelkedést fehérje szintézis, vagyis effektív transzláció követ. 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. Ugyanakkor nem mutattunk ki fehérje expressziót ugyanezen, D-vitaminnal nem kezelt sejttenyészetben.

### **4.3. Humán vizsgálatok**

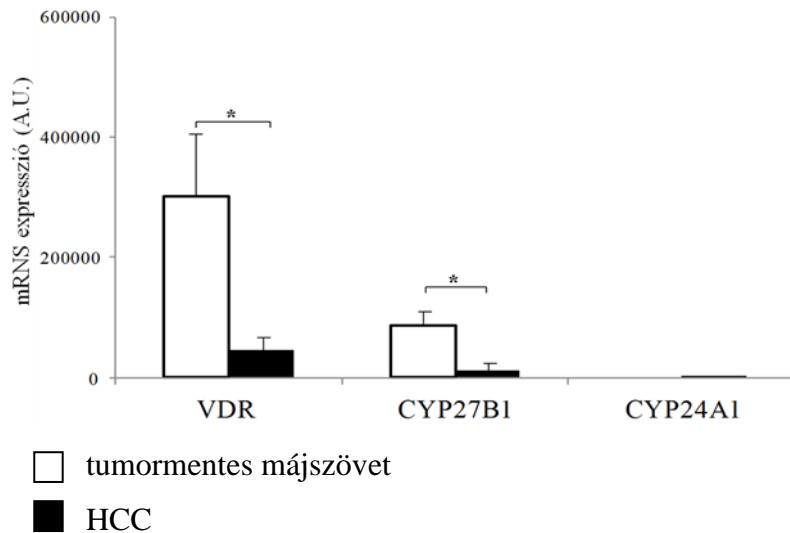
#### *4.3.1. Csökkent VDR mRNS expresszió HCC-ben*

36 beteg paraffinos mintáin végzett vizsgálataink azt igazolták, hogy a D-vitamin sejtmembrán receptora, a VDR mRNS expresszálódik valamennyi HCC szövetben és az azt körülvevő tumormentes májszövetben is, habár a HCC-ben szignifikánsan csökkent az expressziója a környező tumormentes májszövethez képest ( $p < 0,05$ ; 5. ábra). Nem volt különbség a cirrhosis talaján és cirrhosis nélküli májban kialakult HCC szövetminták VDR expressziója között ( $p = 0,7$ ). Érdekes és új adat, hogy a HBV infekció talaján kialakult HCC-ben szignifikánsan magasabb a VDR expressziója a HCV ( $p = 0,04$ ), illetve a kriptogén etiológiájú ( $p = 0,04$ ) daganathoz képest (6. ábra). Amikor a különböző etiológiájú HCC mintákat hasonlítottuk össze a hozzátartozó tumormentes májszövettel, csupán a kriptogén etiológia esetén mutattunk ki szignifikáns VDR mRNS expresszió csökkenést a tumorban ( $p = 0,04$ ). További érdekes adat a nemek között megfigyelhető VDR expresszió különbségek. Nem csak a HCC szövetben ( $p = 0,02$ ), hanem a tumormentes májszövetben ( $p = 0,05$ ) is alacsonyabb a VDR expressziója nőbeteg esetén a férfiakhoz képest az etiológiától függetlenül.

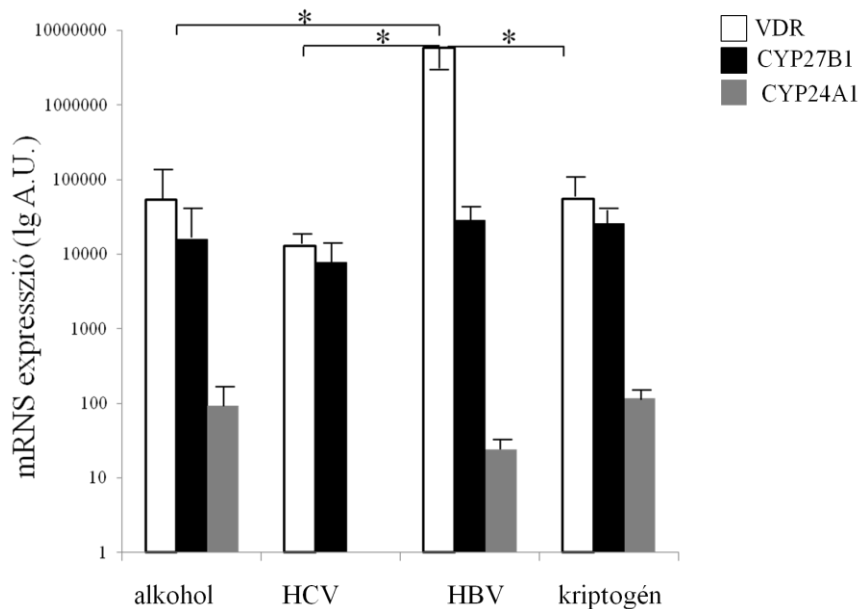
#### *4.3.2. Csökkent CYP27B1 mRNS expresszió HCC-ben*

A VDR mRNS-hez hasonlóan szintén szignifikánsan alacsonyabb CYP27B1 D-vitamint aktiváló enzim mRNS expressziót találtunk HCC-ben a környező tumormentes májszövethez képest a 36 beteg paraffinba ágyazott szövetének vizsgálata során ( $p < 0,05$ . 5. ábra). Ebben az esetben sem volt különbség a cirrhosis talaján kialakult daganat és az cirrhosis nélküli májban kialakult HCC között ( $p = 0,9$ ). Nem volt különbség a különböző etiológia talaján kialakult HCC minták között a CYP27B1-et

tekintetében (6. ábra). 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 mRNA expresszió női nemben a férfiakhoz képest ( $p=0,03$ ).



5. ábra: VDR, CYP27B1 és CYP24A1 mRNA expresszió összehasonlítása HCC-ben a környező tumormentes májszövettel (\*  $p<0,05$ ). AU: Arbitrary units.



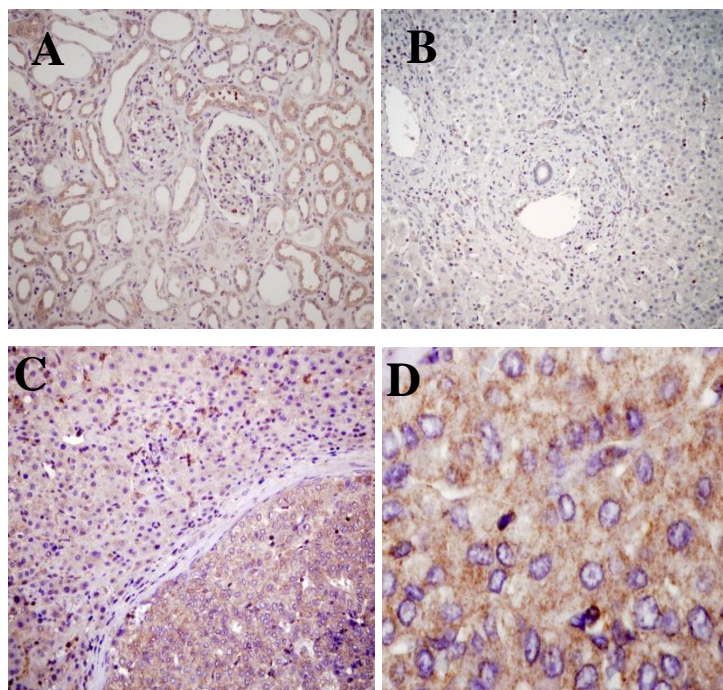
6. ábra: VDR, CYP27B1 és CYP24A1 mRNA expressziók összehasonlítása alkohol, HCV, HBV és kriptogén etiológiájú HCC szövetben (\*  $p<0,05$ ). AU: Arbitrary units.

#### *4.3.3. CYP27B1 és VDR mRNS expresszió és a klinikopatológiai paraméterek közötti 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 májszövet 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. Nem találtunk összefüggést a fenti receptor és enzimexpressziók és a betegek túlélése között.

#### *4.3.4. CYP24A1 mRNS és fehérje expresszió HCC-ben*

A humán vizsgálatok legérdekesebb eredménye, hogy a 13 friss fagyasztott tumor környezetéből származó 13 minta közül egyikében sem expresszálódik a D-vitamin inaktiváló CYP24A1 mRNS. Ezzel ellentétben a 13 HCC mintából 8 esetben kimutatható volt az mRNS expressziója. 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 ( $p=0,3$ ). 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 (7. ábra). A CYP24A1 fehérjeexpresszió az irodalomban leírtaknak megfelelően a daganatos sejtek citoplazmájában volt megfigyelhető az enzim mitokondriális elhelyezkedésének megfelelően.



7. 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 expressziója (600-szoros nagyítás)

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK

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

1. A hepatocelluláris carcinóma rossz prognózisú betegség. Törekedni kell a rizikócsoportha tartozó, májcirrhotikus 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. 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 tumormentes májszövethez képest.

4. A fenti génekkel ellentétben a D-vitamint inaktíváló 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.

## **6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE**

### **Az értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó saját közlemények jegyzéke:**

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, Somorác 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**

**Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó publikációk:**

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**