

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**ZSÍRMÁJ, ELHÍZÁS ÉS HEPATOCELLULARIS CARCINOMA: AZ UNCOUPLING  
PROTEIN-2 ÉS A FLUVASTATIN LEHETSÉGES HATÁSAI**

**Dr. Fülöp Péter**

**Témavezetők:**

**Dr. Paragh György**

**Dr. Baffy György**



**DEBRECENI EGYETEM ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM**

**I. sz. BELGYÓGYÁSZATI KLINIKA**

**DEBRECEN**

**2007**

## 1. BEVEZETÉS

### 1.1. A nem-alkoholos zsírmáj

Az elhízás és a hozzá kapcsolódó megbetegedések a leggyakoribb és a legnagyobb kihívást jelentő állapotok közé sorolhatók a XXI. század medicinájában. Az obesitas következtében kialakuló egyik legfontosabb anyagcserezavar az inzulinrezisztencia, mely a májban történő triglicerid lerakódást kíséri. Az így létrejövő zsírmáj (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) a májbetegségek leggyakoribb formája a fejlett társadalmakban. A nem-alkoholos zsírmáj klinikopathológiai fogalomként gyakorlatilag az egyszerű triglicerid lerakódástól (steatosisól) a gyulladással kísért zsírmájon (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) keresztül egészen a fibrosisig, cirrhosisig (cryptogen cirrhosis), végső esetként hepatocellularis carcinomáig (HCC) terjed. Klinikai jelentőségét a fentiek mellett gyakorisága is aláhúzza: az USA-ban a kóros májfunkciós tesztek leggyakoribb oka a zsírmáj, mely a népesség 10-24%-ánál, míg a NASH a népesség körülbelül 2-3%-ánál fordul elő. A nem-alkoholos zsírmáj olyan anyagcsere-betegségek hepaticus megjelenési formája, melyekre az obesitas, hyperinsulinaemia, inzulinrezisztencia, illetve hypertriglyceridaemia jellemző: ekként, a nem-alkoholos zsírmáj a metabolikus szindróma részjelensége. Pontos pathogenesis csak részleteiben ismert. Jelenlegi ismereteink szerint a betegség kialakulásában fontos szerepe van a májban zajló lipidperoxidációnak, az adenzin-trifoszfát (ATP) készlet csökkenésének, valamint a Kupffer-sejtek és a mitokondriumok működési zavarának. A progresszió leírásában elsőként Day és James vetették fel a „kettős csapás” modelljét. Az elgondolás alapján az első lépés a hepatocyták cytoplasmájában történő lipid depozíció, mely az inzulinrezisztencia kialakulását kíséri. A mitokondriumokban zajló  $\beta$ -oxidáció túlterheltsége folytán bekövetkező triglicerid akkumuláció kitűnő alapot teremt a súlyosabb, progresszív májbetegség kialakulásához, mely a fokozott oxidatív stresszel járó második csapás következtében jön létre.

Az obesitas következtében kialakuló inzulinrezisztenciát hyperinsulinaemia, a máj fokozott glükóztermelése és csökkent felhasználása jellemzi. A hormonszenzitív lipáz aktivitásának fokozódása következtében nagy mennyiségű szabad zsírsav (free fatty acid, FFA) áramlik be a májba. A hepaticus zsírsavfelvételi ráta nem szabályozott, ennek következtében proporcionálisan követi a plazma FFA-koncentrációját. A felvett zsírsavak egyrészt a mitokondriumokban oxidálódva ATP-termelésre használnak fel; másrészt, trigliceriddé észterifikálva raktározódnak a májban. Emellett a very low density lipoprotein (VLDL) képződésében, annak szekréciójában vehetnek részt. Az inzulin és a glükóz egymástól függetlenül, de szinergikus módon, transzkripciós faktorok (sterol regulatory element-binding protein-1c: SREBP-1c; és carbohydrate response element binding protein: ChREBP) segítségével a glükóztöbblet zsírsavakká történő átalakítását fokozzák. A harmadik, a zsírmáj kialakulásában résztvevő transzkripciós faktor a peroxisome proliferator activator receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), melynek mennyisége az inzulinrezisztenciával, steatosisal járó állatmodellekben markánsan emelkedik, bár annak mechanizmusa, hogy a PPAR $\gamma$  miként segíti elő májban történő triglicerid

depozíciót, még nem teljesen tisztázott. A fokozott zsírsavszintézis következményeként fokozódik a malonil-CoA produkciója, mely gátolja a karnitin-palmitoil transzferáz-1 (CPT-1) aktivitását, így a mitokondriumba történő zsírsavfelvétel csökken. Ennek következtében, mind a nagy mennyiségben beáramló, mind pedig az újonnan képződött zsírsavak elsődlegesen trigliceridekké észterifikálódnak, és csökken az amúgy is túlterhelt mitokondriális  $\beta$ -oxidáció sebessége.

## **1.2. A nem-alkoholos steatohepatitis**

Az oxidatív stressz a prooxidáns és antioxidáns tényezők közötti egyensúly eltolódása következtében jön létre. A zsírmájban dominálón szinglet oxigén, szuperoxid-anion, hidrogénperoxid és hidroxiradikálok alkotják a reaktív oxigéngyököket (reactive oxygen species, ROS). A zsírsavoxidáció a ROS-termelés jelentős tényezője: a mitokondriális  $\beta$ -oxidáció a légzési láncon keresztül, a peroxisómális  $\beta$ -oxidáció az acil-CoA oxidázon keresztül, a mikroszómális  $\omega$ -oxidáció pedig a citokróm P450 enzimrendszer segítségével járul hozzá az oxidatív stresszhez. A többszörösen telítetlen zsírsavak (polyunsaturated fatty acid, PUFA) rendkívül érzékenyek a ROS által generált lipidperoxidációra, melynek következtében különböző aldehidek, így hidroxinonal (HNE) és malondialdehid (MDA) keletkeznek. Ezek önmagukban is toxikusak, valamint szabadon diffundálnak az extracelluláris térbe, ezáltal távolabbi sejteket is képesek károsítani. A reaktív oxigéngyökök és a toxikus aldehidek ATP- és nikotinamid-dinukleotid depléciót, DNS-károsodást, fehérje denaturációt, glutation depléciót és membrándestrukciót okozva járulnak hozzá az oxidatív stresszhez és a sejthalálhoz, valamint fokozzák a proinflammatorikus citokinek szekrécióját, ezáltal a neutrofilek kemotaxisát. A ROS és lipidperoxidációs termékek fibrosishoz vezetnek a kollagéntermelő Ito-sejtek (hepatic stellate cells, HSC) aktivációján keresztül. A humán NASH-ben is megfigyelhető a lipidperoxidációs termékek emelkedett szintje.

A mitokondriális funkciózavar szintén jellemző a nem-alkoholos steatohepatitisre. Olyan ultrastrukturális változások figyelhetők meg a mitokondriumokban, melyek az oxidatív foszforiláció, illetve az elektron transzport lánc (electron transport chain, ETC) aktivitásának csökkenésére, valamint ATP deplécióra utalnak. Ha az elektronáramlás megakad, vagy lelassul az ETC valamelyik pontján, akkor a lánc megelőző tagjai az elektronokat közvetlenül a molekuláris oxigénre képesek átadni, szuperoxid-aniont, vagy hidrogénperoxidot produkálva. Ahogy a mitokondriumok oxidatív kapacitása kezd kimerülni, a citoszolikus zsírsavak felhalmozódnak és a zsírsavoxidáció alternatív (peroxisómális és mikroszómális) útvonalai aktiválódhatnak, ezzel is tovább fokozva az ROS-termelést. A létrejövő HNE és MDA a mitokondriális membrán zsírsavait támadva tovább rontják az ETC működését, valamint az apolipoprotein B molekula proteolízisét elősegítve gátolják rágcsálókban a VLDL-szekréciót, ezáltal hozzájárulva a májban történő triglicerid akkumulációhoz.

Obes rágcsálókon végzett kísérletekből ismert, hogy a steatosist krónikus gyulladás kíséri a májban, melyet a hepaticus NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) aktivitása jellemez. A fokozott NF- $\kappa$ B aktivitás bizonyos citokinek (tumor necrosis factor alpha: TNF- $\alpha$ ; interleukin-6 és -1 $\beta$ : IL-6, IL-1 $\beta$ )

szintjének emelésén keresztül a Kupffer-sejteket aktiválja. A citokinek a NASH összes jellemzőjének létrejöttében szerepet játszanak, így a hepatocyták necrosisában és apoptosisában, a neutrofilek kemotaxisában, a HSC-k aktiválásában és a Mallory-testek kialakulásában is.

### 1.3. Az uncoupling protein-2 (UCP2)

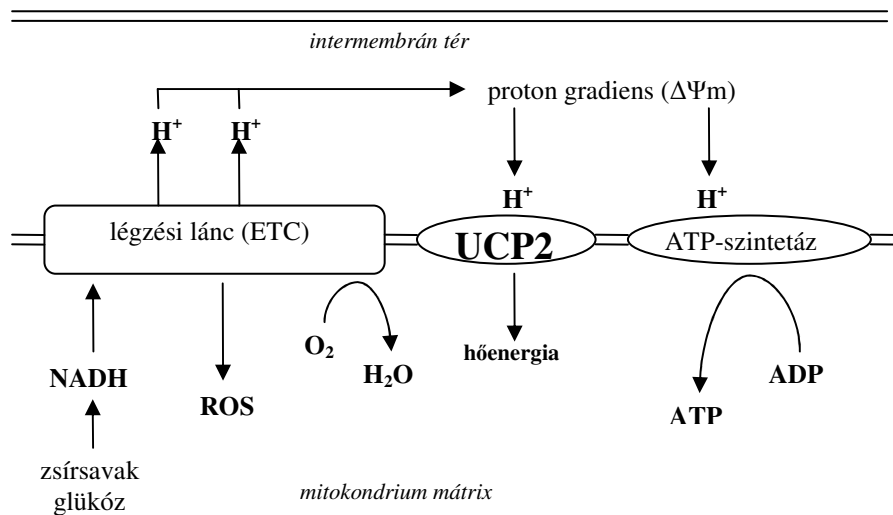
Az uncoupling (szétkapcsolás; a mitokondrium belső membránja körül felépülő proton gradiens és az ATP-termelés szétválasztása) már régóta csábító területe az elhízás kezelésének. 1961-ben közölte Peter Mitchell azóta mérföldkövé vált kemiozmotikus elméletét, mely az oxidatív foszforiláció és a mitokondriális energiatermelés kérdésével foglalkozott. A glükóz és a zsírsavak oxidációjából származó redukált szubsztrátok által leadott elektronok végighaladnak az elektron transzport láncon, míg végül a molekuláris oxigént vízzé redukálják a citokróm c oxidáz (komplex IV) segítségével. A végighaladás során felszabaduló energia a protonok mitokondriális mátrixból az intermembrán térbe irányuló transzlokációjára használandó fel. Az így létrejövő elektrokémiai gradiens (mitokondriális membrángradiens,  $\Delta\Psi_m$ ) következtében létrejövő proton visszaáramlás az ATP-szintetázon keresztül energiatermelésre használandó fel.

Ismert, hogy az oxidatív foszforiláció sohasem 100%-os hatásfokú, azaz az elhasznált oxigén egy része – a protonok visszacsorgása következtében – nem használandó fel ATP-termelésre, és hőenergia formájában szabadul fel. A protoncsorgás a mitokondriális belső membrán sajátosságai mellett (bazális proton konduktancia) speciális karrier proteinek működéséből adódik (indukálható proton konduktancia). Ezt a funkciót a barna zsírszövet mitokondriumaiban az uncoupling protein (UCP, vagy thermogenin, későbbi nevén UCP1) látja el, így a hideghez való adaptációban, thermogenesisben nélkülözhetetlen a szerepe.

1997-ben két, egymástól függetlenül dolgozó munkacsoport klónozták az UCP2-t. Génje egerekben a 7-es kromoszómán, emberekben a 11q13 szintetikus régióba lokalizált. A humán UCP2 fehérje 308 aminosavból áll, 33 kDa molekulásúlyú és aminosav-szekvenciája 59%-os homológiát mutat az UCP1-gyel. Az UCP2 szerkezete így igen hasonló az UCP1-hez, valamint meglehetősen konzervált a különböző fajokban. A többi mitokondriális karrier fehérjéhez hasonlóan az UCP2 is hat  $\alpha$ -helixet tartalmaz, melyek a mitokondrium belső membránjába ágyazottak, ahol a fehérje homodimerként funkcionál. Fenti homológia alapján kézenfekvő lenne, hogy az UCP2 jelentős szerepet játszik a thermogenesis szabályozásában. Azonban az UCP2 által mediált protoncsorgás fiziológiás szerepe a mai napig vita tárgya, élesztőkben például csak nagyságrenddel az élettani koncentrációt meghaladóan indukál protoncsorgást. Az UCP2 különböző mennyiségben gyakorlatilag az összes szövetben detektálható, expressziója ugyanakkor egy-két nagyságrenddel kisebb, mint az UCP1-é a barna zsírszövetben: ennek következtében az UCP2 lényegesen kisebb mértékben járul hozzá a protonok mitokondriális mátrixba történő visszacsorgásához. Szintén ismert, hogy az *ucp2* gén ablációjával létrehozott UCP2-knockout (UCP2-KO) egerek nem híznak el és alapanyagcseréjük gyakorlatilag változatlan marad.

A fehérjét először leíró munkák az UCP2 mRNS-ét számos szövetben detektálták, ám az expresszió mértékét különösen magasnak találták az immunrendszer sejtjeiben, szöveteiben, így a thymusban, lépben és a makrofágokban. Felismerték, hogy az UCP2 mRNS és a fehérje szintje nem mindig korrelál, így a translációs reguláció jelentős lehet. A gyakorlatilag ubiquiter jelenléte ellenére, az egészséges májban az UCP2 expressziója jellemzően a Kupffer-sejtekre korlátozódik, míg a hepatocytákban nagyon alacsony, vagy nem detektálható mennyiségben van jelen. Jelenlegi ismereteink szerint a fehérje az alább részletezett funkciókat látja el (1. ábra):

1. limitálja a reaktív oxigéngyökök képződését,
2. csökkenti a sejt ATP-termelését,
3. befolyással van a zsírsav-anyagcserére.



1. ábra: Az UCP2 feltételezett hatásai a mitokondrium belső membránjába ágyazottan

1. Az UCP2 csökkenti a reaktív oxigéngyökök képződését: Amennyiben túl sok redukáló szubsztrát áll rendelkezésre (pl. obesitas, diabetes, hirtelen nagy fogyás következtében), a respirációs lánc nem képes lépést tartani a kínálattal és maximális ATP-szintézis mellett megcsappan a sejt adenzin-difoszfát (ADP)-készlete. Az így létrejövő mitokondriális hiperpolarizáció következtében az ETC sebessége lelassul. Az elektronok torlódása a szuperoxid-anionok keletkezésének kedvez, mivel megnő azon mobil elektronkarrierék féléletideje, melyek az oxigén parciális redukcióját, és szuperoxid-termelést hoznak létre. Fentieket alapul véve az UCP2 által mediált protoncsorgás (ún. „mild uncoupling”) kedvező hatású, mivel – az ADP jelenlététől függetlenül – csökkenti a proton gradienst és elősegíti a légzési lánc zavartalan működését, így visszafogja a szuperoxid képződését és a sejtekre háruló oxidatív stresszt. Az UCP2 és a ROS között reciprok összefüggés is igazolódott: a

szuperoxid, vagy terméke a mátrixban közvetlenül serkenti az UCP2 aktivitását és így a protonkonduktanciát.

2. *Az UCP2 csökkenti a sejt ATP-termelését:* Amennyiben a protonok mitokondriális mátrixba történő visszaáramlása nem az ATP-szintetázon keresztül, hanem az UCP2 segítségével valósul meg, a sejtek ATP-termelése csökken. Mivel az ATP-szint gyors ingadozásait a metabolikus ráta változásával nehézkes lenne biztosítani, így a proton gradiens és az ATP-szintetáz alternatív úton való szabályozása kézenfekvő megoldás. A mechanizmus egyik érdekes megnyilvánulása az, ahogyan a pancreas  $\beta$ -sejtjeinek inzulintermelését az UCP2 aktivitása negatívan befolyásolja.

3. *Az UCP2 szabályozza a zsírsav-anyagcserét:* A protontranszport mechanizmusa részleteiben még nem tisztázott, de kétségtelen, hogy a hepatocytákban az UCP2 expressziója rendkívül alacsony, ám a plazma FFA-emelkedésével járó állapotokban, illetve steatosisban szignifikánsan emelkedik. Ez megerősíti azon feltételezést, hogy a fehérje szerepet játszik a zsírmáj-betegség pathogenesisében. Leptindeficiens *ob/ob* egerek májában az UCP2-szignál (mRNS és fehérje) szignifikánsan magasabb a sovány állatokhoz viszonyítva. A fehérje által képviselt protonkonduktancia szorosan szabályozott: purin nukleotidok gátolják, mely gátlást a zsírsavak felülvezérlik, amikor a hidegre adott válaszként az adrenerg beidegzés következtében az intracelluláris triglicerid raktárakból FFA-kiáramlás jön létre. Jelenleg széles körben elfogadott, hogy aktiváció nélkül az UCP2 nem működik proton transzporterként. Az aktivációban zsírsavak és lipid-peroxidok is részt vesznek valószínűleg úgy, hogy áttörik a purin nukleotidok gátló hatását.

#### **1.4. Az UCP2 és a nem-alkoholos májbetegségek**

Feltételezhető, hogy az UCP2 aktivitása elősegíti a zavartalan zsírsav-oxidációt, különösen a szubsztrátok túlkínálata, obesitas esetén. Más szóval, a zavartalan lipidkatabolizmus – legalábbis bizonyos élettani körülmények mellett – megkövetelheti az UCP2 jelenlétét. Az egészséges máj UCP2 expresszióját sikerült a Kupffer-sejtekbe lokalizálni, míg a parenchymás sejtek UCP2-szignálja alig detektálható. Ugyanakkor zsírmáj-betegségben a parenchymás májsejtek UCP2-expressziója jelentősen fokozódik. A májban felhalmozódó lipidek nem semlegesek, így a kialakuló zsírmáj lényegesen sebezhetőbbé válik, mely a „második csapásnak” készíti elő a talajt. A fokozott zsírsavbeáramlás következtében jelentkező ROS-produkció a májszövetet jelentősen károsítja. Azt gondolhatnánk, hogy az UCP2-expresszió fokozódása a hepatocytákat megvédi az oxidatív stressz káros hatásaitól, ugyanakkor rágcsgálók zsírmájában a fehérje fokozott expressziója ellenére az oxidatív stressz jelentős. Megemlítendő, hogy a humán zsírmáj és steatohepatitis UCP2 expressziójáról adatok csak mérsékelt mennyiségben állnak rendelkezésre: immunhisztokémiai vizsgálatok alapján az UCP2 szignálja fokozott, mely korrelál a betegség súlyosságával. Bár úgy tűnik, hogy a zsírmájban az UCP2 fehérje expressziója nemcsak fokozódik, hanem funkcionálisan is aktív, nincs egyértelmű bizonyíték arra, hogy a fehérje jelentősen limitálva a reaktív oxigéngyökök termelését, gátolná a steatohepatitis kialakulását. Ennek ellenére egy érdekes jelenség képes megmagyarázni eme paradoxont. Eszerint

zsírmáj-betegségben, a hepatocytákban megfigyelhető UCP2 expresszió fokozódást párhuzamos expresszió csökkenés kíséri a makrofágokban, és rokon sejtjeikben, a Kupffer-sejtekben. Fentiek alapján, ha az UCP2 valóban gátló hatással van a reaktív oxigéngyökök produkciójára NASH-ben, a betegségben megfigyelhető fokozott ROS-termelés sokkal inkább a Kupffer-sejtekben megfigyelhető csökkent fehérjeexpresszióval, mintsem a hepatocytákban bekövetkező szignálfokozódással magyarázható. A fenti negatív szabályozás, mely a makrofágokban megfigyelhető, eddig csak az endotoxinra adott válaszban nyert bizonyítást.

Fentiek mellett, cryptogen cirrhosisban az obesitas független prediktora a hepatocellularis carcinomának, illetve az obesitas önmagában egyéb daganatok incidenciáját is fokozza. A HCC előfordulási gyakorisága *ob/ob* egerekben is gyakoribb. Feltételezik, hogy nem a fibrosis, hanem az inzulinrezisztencia maga lehet az oka NAFLD-ben a májrák kialakulásának. Az apoptosis szabályozásában a mitokondriumok központi szerepet játszanak: míg az intrinsic útvonal elsősorban a metabolikus kisiklásokra és az intracellularis oxidatív stresszre reagál, addig az extrinsic út a sejtfelszíni sejthalál-receptorokon (pl. Fas, másik nevén CD95) keresztül valósul meg. A folyamat során a pro-apoptoticus bcl-2 proteinek oligomerizációja és mitokondriumokba történő transzlokációja, a külső mitokondriális membrán áteresztőképességének fokozódása és a protongradiens megszűnése következik be, melyet intermembrán proteinek (pl. citokróm c) citoszolba történő kiáramlása, majd a kaszpázok aktivációjának eredményeként a sejt szétesése követ. A reaktív oxigéngyökök emelkedett szintje daganatsejtekben ismert. Az UCP2 a mitokondrium membránpotenciáljának változtatásával, a ROS- és ATP-termelés befolyásolásával elvileg a folyamat bármelyik pontján be tud avatkozni a sejthalál folyamatába, valamint szerepe lehet az eleve emelkedett oxidatív stresszel rendelkező daganatsejtek különböző környezeti körülményekhez történő adaptációjában; ezáltal – az UCP2-expresszió fokozásával – a sejtek túlélési előnyhöz juthatnak.

### **1.5. A statinok pleiotróp hatásai**

Az obesitashoz rendkívül gyakran társul hyperlipidaemia, melynek kezelése a hosszútávú ischaemiás szövődmények elkerülése végett alapvető. Régóta ismert, hogy a 3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) reduktáz non-steroid inhibitorai (a statinok) a koleszterin bioszintézis kulcsenzimjét gátolják. A koleszterinképződés csökkenését a sejtfelszíni LDL-receptorok mennyiségének emelkedése kíséri, melynek következtében a keringésből nagyobb mennyiségben veszik fel a sejtek a koleszterint. A HMG-CoA reduktáz gátlókkal végzett nagy esetszámú klinikai vizsgálatok során azt tapasztalták, hogy néhány alkalommal kedvezőbb volt a halálozás és a kardiovaszkuláris események előfordulásának gyakorisága, mint ahogy az a lipidcsökkentő hatás alapján várható lett volna. Ez arra utal, hogy ezen gyógyszereknek a lipidcsökkentésen kívül egyéb kedvező hatásai is vannak, melyeket összefoglaló néven pleiotróp hatásoknak nevezünk. Ilyen hatásnak tartunk minden olyan változást, mely a HMG-CoA reduktáz gátló szedésével függ össze, de nem feltétlenül direkt úton, azaz a lipidszintek befolyásolásán keresztül érvényesül. Emellett szólnak

azok az érvek is, miszerint a statinoknak kimutatható plakkstabilizáló hatásuk alakul ki viszonylag hamar, a koleszterin szintjének szignifikáns csökkentése előtt.

A statinok a koleszterinszint csökkentésén túl – többek között – javítják az endothel diszfunkciót, csökkentik a thrombocyta aktivációt és a thromboxán képződését, csökkentik a leukocyta adhéziót, gátolják a C-reaktív protein (CRP) proinflammatoricus hatását. Antioxidáns hatásuk mellett stabilizálják az atheroscleroticus plakkokat, illetve lassítják az Alzheimer-kór progresszióját is.

A statinok a HMG-CoA reduktáz gátlásával nem csak a koleszterin szintjét csökkentik, hanem a nem-koleszterin jellegű mevalonát metabolitok termelését is redukálják. Ezen izoprenoid metabolitok (pl. farnezil-pirofoszfát, geranil-geranil-pirofoszfát) a sejt szignáltranszdukciós folyamataiban résztvevő kis guanozin-trifoszfát (GTP)-kötő fehérjék (Rho, Ras) poszttranszlációs módosításában (prenilizációjában) vesznek részt. A kis GTPázok prenilizációja biztosítja ezen fehérjék kovalens kapcsolatát, szubcelluláris lokalizációját és membránhoz kötődését, azaz az inaktív citoszolikus alak aktív, membránhoz kötött formájának kialakulását. A Ras és Rho fehérjék fontos szubsztrátul szolgálnak a prenilizációhoz, így a statinok kitűnő célpontjai lehetnek: a HMG-CoA reduktáz gátlók fent említett nem-lipid hatásai a kis GTP-kötő fehérjék gátlásán keresztül alakulnak ki.

#### **1.6. A statinok hatása a daganatképződésre**

A statinok gátolják a sejtproliferációt és apoptosist indukálnak, ezáltal a daganatnövekedést *in vitro* és *in vivo* is hátráltatják, mely hatásukat állatkísérletekben és humán malignomákban is bizonyították. Ezen kívül atherosclerosisban és daganatképződésben a statinok kemopreventívnek bizonyultak egyéb anyagokkal együtt adva. A mevalonát ciklus gátlásával hozható összefüggésbe antitumor hatásuk, mivel a ciklus mindkét nem-koleszterin jellegű fő molekulája, a farnezil- és a geranil-geranil-pirofoszfát is a sejtproliferáció és sejthalál folyamatának szabályozásában vesz részt. Az izoprenoidok bizonyos sejtfehérjék (pl. laminin, G-fehérjék és a kis GTP-kötő proteinek)éréséhez szükségesek. Az izoprenoidok növekedés-szabályozó fehérjék membránlokalizációjában és következményes aktivációjában is részt vesznek, valamint emlős sejtekben szükségesek a sejtciklus S-fázisába történő belépéshez is. Emellett a statinok – szintén a mevalonát ciklusba beavatkozva – gátolják az áttétképződés folyamatát is, mely a Rho alcsalád geranil-geranilált fehérjéi termelésének gátlásán keresztül valósul meg. Későbbi vizsgálatok eredményei alapján a statinkezelésben nem részesülő hyperlipidaemiás betegekben a colon-, prostata- és a húgyhólyagdaganat prevalenciája magasabbnak bizonyult a kezeltékhez képest. Bár a statinok fenti hatásai klinikai alkalmazásuk szempontjából igen fontos, de még mindig csak korlátozott mennyiségű információ áll rendelkezésre ezen gyógyszerek daganat- és áttétképződésre gyakorolt hatásáról. Szintén nem tisztázott, hogy a különböző molekuláris struktúrájú HMG-CoA reduktáz inhibitorok valóban hasonló módon és mértékben hatnak-e a tumor- és áttétképződés folyamatára.

## 1.7. A fluvastatinról

A fluvastatin egy nyílt gyűrűt tartalmazó, szintetikus HMG-CoA reduktáz inhibitor, melyet az 1990-es évek óta használnak a hyperlipidaemia, atherosclerosis kezelésében. Gátolja az érfalban elhelyezkedő simaizomsejtek proliferációját, valamint humán pancreas daganatsejtek invazivitását is csökkenti a RhoA-mediált geranilgeraniláció gátlásán keresztül. Humán makrofágokban gátolja a szöveti faktor felszabadulását és így az atherosclerosis progresszióját. Csökkenti a leukocyták endothelhez történő adhézióját patkányokban, ezáltal mérsékli a gyulladásos választ. Gátolja a low-density lipoprotein (LDL) oxidációját és a szuperoxid termelését is.

A fluvastatin – az atorvastatinhoz hasonlóan – 4-fluorofenil-jellegű molekula. Feltételezik, hogy kémiai struktúrájához és lipofil karakteréhez köthető antioxidáns, valamint nitrogénmonoxid-szintetáz aktiváló hatása is. A gyógyszer májszelektív, *in vivo* hatékony adagjai rágcsálókban a lovastatinhoz hasonlóak. Magyarországon 40 és 80 mg-os kiszerezésekben van forgalomban.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

### 2.1. Az UCP2 és az akut májkárosodás

Jelen munkám egyik célja az UCP2 akut májkárosodásra kifejtett szerepének tisztázása volt kísérletes körülmények között. Ezáltal a fokozott UCP2-expresszió „káros hatásait”, így a sejt energiatermelésének csökkentését; mind pedig a „jótevény hatásokat”, így a ROS-termelés csökkentését is tisztázni kívántuk. Tanulmányunkban az akut károsodást Jo2-antitest intraperitoneális adásával váltottuk ki UCP2-t expresszáló, valamint UCP2-deficiens leptinhiányos obes (*ob/ob:ucp2<sup>+/+</sup>* és *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>*) egerekben. Az antitest dóziszfüggő módon Fas-receptoron keresztüli hepatocelluláris destrukciót és fulmináns májelhalást képes kiváltani. Megfigyeltük a különböző dózisu intraperitoneális anti-Fas injekciók után az UCP2-re vad típusú, valamint UCP2-knockout elhízott állatok túlélési idejét, a máj szövettani eltéréseit, összehasonlítottuk az állatok májában mérhető ROS-termelést, ill. ATP-raktárakat. Mivel a májban számos különböző sejttípus (hepatocyta, Kupffer-sejt, Ito-sejt, endothel) is található, célkitűzésként a fenti kérdések megválaszolása mellett arra a kérdésre is választ kerestünk, miszerint hogyan változik a máj egyes sejttípusaiban az UCP2 regulációja.

### 2.2. A fluvastatin hatása a hepatocellularis carcinoma fejlődésére

Az obesitashoz rendkívül gyakran társuló hyperlipidaemia kezelésében a statinok alapvető fontosságúak. A koleszterinszint csökkenésén kívül ún. pleiotróp hatásai is vannak, melyek a sejtproliferációban résztvevő mevalonát metabolitok termelésének csökkentésén alapulnak. Gátolják a sejtproliferációt és apoptosist indukálnak, bár még mindig csak korlátozottan áll rendelkezésre információ ezen gyógyszerek daganat- és áttétképződésre gyakorolt hatásáról. Célul tűztük ki, hogy a fluvastatin tumorelles, daganatfejlődésre gyakorolt *in vivo* hatásait megvizsgáljuk, ezáltal igazolva

ezen gyógyszer pleiotróp hatását. Munkánkhoz patkányok vesetokja alá implantált hepatocellularis daganatsejteket használtunk, és bizonyítani kívántuk a különböző dózisokban adott fluvastatinnak a neoplasma fejlődésére gyakorolt kemopreventív és terápiás hatásait.

### 3. MÓDSZEREK

#### 3.1. Az egerek kezelése

Az *ucp2* gén roncsolását és az UCP2-knockout egerek létrehozását korábban leírták (Zhang C, et al. *Cell* 2001; 105:745-755). Az *ucp2* és *ob* génre heterozigóta (*ucp2 +/-* és *ob +/-*) egereket kereszteztük a kettős heterozigóták létrehozása érdekében. Előbbieket Dr. Bradford Lowelltól (Harvard Medical School, Boston, MA) kaptuk, utóbbiakat a Jackson Laboratories-tól (Bar Harbor, ME) rendeltük. A kettős heterozigóták pároztatása következtében kettős homozigótákat (knockoutokat) nyertünk, melyekben az UCP2 fehérje nem detektálható; valamint a leptin hiánya következtében az állatok elhízhatnak, májukban súlyos steatosis alakul ki. Ezen, 8-18 hetes kettős homozigóta (*ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>*) obes nőstény egereket, illetve szintén obes, de UCP2-t expresszáló (*ob/ob:ucp2<sup>+/+</sup>*) nőstény társaikat használtuk. A genotipizálást az egerek farkából emésztéssel nyert DNS segítségével végeztük, az irodalomban már ismertetett módon (Zhang C, et al. *Cell* 2001; 105:745-755 és Chung WK, et al. *Obes Res* 1997; 5:183-185).

Az állatokat egy alkalommal intraperitoneális Jo2 antitesttel (BD PharMingen, San Diego, CA) oltottuk be alacsony (0,15 mg/ttkg), vagy nagy dózisban (0,4 mg/ttkg). A kontroll állatokat szintén intraperitoneálisan, fiziológiás sóoldattal injektáltuk. A szérum alanin-aminotranszferáz (ALT) aktivitásokat 24 óráig követtük, hacsak az állatok hamarabb el nem haltak. A vért a farokvénából, vagy – pentobarbitál anesztéziát követően – szívpunkcióval nyertük. Az egerek máját egészben kivéve azt két részre osztottuk: az egyiket folyékony nitrogénben azonnal lefagyasztottuk, a másik májdarabkát szövettani vizsgálatra használtunk fel. Az összes, állaton végzett *in vivo* kísérletet a Rhode Island Hospital (Providence, RI, USA) etikai bizottsága hagyta jóvá.

#### 3.2. Szövettani vizsgálatok

A májszövetet egy éjszakán át 4% paraformaldehidet tartalmazó PBS-ben (phosphate-buffered saline) fixáltuk 4°C-on, majd dehidrációt követően paraffinba ágyasztuk és mikrotómmal 4 µm vastagságú szeletekre vágtuk. A májban lezajló apoptosist és necrosist hagyományos hematoxylin-eozin festéssel, illetve „terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick-end labeling” (TUNEL) assay segítségével vizsgáltuk (ApopTag Plus Peroxidase, Serologicals Corp., Norcross, GA). A genotípus ismerete nélkül megszámoztunk minden 100 hepatocytára eső TUNEL-pozitív apoptoticus sejtmagvat, állatonként legalább 2000 májsejtet vizsgálva. Az apoptosist és necrosist közös megítéléséhez a TUNEL-képeket digitalizáltuk (MicroPublisher 3.3 RTV, Qimaging, Burnaby, British

Columbia), és a peroxidáz festődés területét és intenzitását egy konstans optikai denzitással rendelkező háttér felett rögzítettük szoftver segítségével (Image Pro Plus 5.1, MediaCybernetics, Silver Springs, MD). Az így kapott integrált optikai sűrűséget (IOD, integrated optical density) önkényes egységekben (AU, arbitrary units) adtuk meg. Az állandó optikai körülményeket az összes morfológiai vizsgálatnál megtartottuk.

### **3.3. DNS fragmentációs vizsgálat**

Az apoptózisra jellemző DNS fragmentációt a gyorsított apoptotikus DNS-létra protokoll (accelerated apoptotic DNA laddering protocol) módosított változatával vizsgáltuk. A májszövetet lízis pufferben (50 mmol/l Tris-HCl, pH 7,5; 1% NP-40, 20 mmol/l EDTA) homogenizáltuk, majd a lizátumot 5 percig 16000g-n, 4°C hőmérsékleten ultracentrifugáltuk, majd a felülúszót fenol-kloroform-izoamilalkohol 25:24:1 arányú (pH 7,4; 0,5 ml) elegyében extraháltuk. A DNS-fragmentumokat a folyadékfázisból 50 µl 3 mol/l nátrium-acetát (pH 5,2), 1 µl nukleázmentes glikogén (Roche, Mannheim, Németország) és 0,6 ml izopropanol segítségével precipitáltuk. Miután 5 percig jégen tartottuk, a precipitátumot 4°C-on 12900g-n 10 percig centrifugáltuk. 70%-os etanollal történő mosás után a pelletet Tris-EDTA pufferben rekonstituáltuk és a DNS-koncentrációt spektrofotometriával detektáltuk. A DNS egyenlő mennyiségeit RnaseOne (Promega, Madison, WI) segítségével emésztettük, majd ötszörös mennyiségű Orange G festéket adtunk a mintákhoz és a DNS-fragmentumokat 1,8%-os TAE agaróz gélelektroforézis után vizualizáltuk.

### **3.4. Biokémiai mérések**

A szérum ALT aktivitásának meghatározásához kereskedelmi kitet használtunk (Infinity ALT Reagent, Sigma, St. Louis, MO). Az oxidatív stressz becsléséhez a malondialdehid (MDA) mennyiségének meghatározását végeztük el, mely a lipidperoxidáció végterméke. A nitrogénben lefagyasztott májmintát 1 térfogatszázalék butil-hidroxitoluént tartalmazó fiziológiás sóoldatban homogenizáltuk, majd az MDA-t kereskedelmi kit (Bioxytech MDA-586, OxisResearch, Portland, OR) segítségével határoztuk meg. A májszövet ATP-tartalmát szintén a májdarabka homogenizálása (20 mmol/l glicin, 50 mmol/l MgSO<sub>4</sub>, 4 mmol/l EDTA tartalmú pufferben; pH 7,75) után mértük meg, luciferin-luciferáz alapú lumineszcenciás vizsgálattal (ATPLite Luminescence ATP Detection System, Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA). A többi kémiai reagenst a Sigmától (St. Louis, MO) rendeltük.

### **3.5. Western blot**

A májdarabokat lízis pufferben (30 mmol/l Tris, pH 7,5; 2 mmol/l EDTA, 150 mmol/l NaCl, 0,1% SDS, 1% NP-40, 10% glicerol, 0,5 % Na-dezoxikolat + proteáz inhibitorok (Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Indianapolis, IN) preparáltuk. A lizátumok fehérjekoncentrációját a BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL)

mértük. A fehérjéket 10%-os SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk szét, majd nitrocellulóz membránra (Perkin-Elmer) transzferáltuk. A blotokat poliklonális nyúl anti-Fas antitestekkel (1:1000, Abcam, Cambridge, MA) rögzítettük. A tormaperoxidázzal jelölt szekunder antitesteket végül elektron-kemilumineszcenciás (ECL, Perkin-Elmer) módszerrel vizualizáltuk, kontrollként  $\beta$ -aktint használtunk.

### **3.6. Májperfúzió és sejtszeparáció**

A parenchymás (parenchymal cell, PC) és nonparenchymás (nonparenchymal cell, NPC) sejteket 8-12 hetes UCP2-t expresszáló *ob/ob* és vékony, vad típusú (*wt/wt*) egerek májából nyertük, a módosított Van Harken-szerű *in situ* kollagenáz perfúziós módszerrel. Az állatok pentobarbitál anesztéziája után laparotómiából a portális vénát kanülálva 10 percig 20 mmol/l glükózt és 0,1 mmol/l EGTÁ-t tartalmazó Krebs-Ringer (KRB) oldattal, majd újabb 10 percig kiegészített KRB-vel (20 mmol/l glükóz, 1,37 mmol/l  $\text{CaCl}_2$ , 150 U/ml I-es típusú kollagenáz - Worthington, Lakewood NJ) perfundáltuk 2-3 ml/perc sebességgel. A PC frakció kinyeréséhez ezután a májat eltávolítottuk az állatból, felapróztuk, 70  $\mu\text{m}$ -es szűrőn (BD Falcon, San Jose, CA) átszűrtük, majd 5 percig 50g sebességgel lecentrifugáltuk; a felülúszó leöntése után a hepatocyták alkotják a pelletet.

Az NPC frakció kinyeréséhez az átszűrt májlizátumot újabb tízperces emésztési lépéssel (100 U/l kollagenáz, 0,02% pronáz és 0,005% DNáz) egészítettük ki. Filtrálás és centrifugálás után (mint fent), a nyers NPC-t tartalmazó felülúszót újabb 10 percig 1000g-n centrifugáltuk és az üledéket iodixanolban (Opti-Prep, Axis-Shield, Norton, MA) reszuszpendáltuk, 17% iodaxinol és GBSS-t (Gray's balanced salt solution) egymásra rétegezve. 15 perces centrifugálás (500g) után a két oldat közötti határretegbe kerülő NPC-frakciót GBSS-ben reszuszpendáltuk. A sejtek életképességét tripánkékekkel ellenőriztük, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd az oldatokat  $-80^\circ\text{C}$ -on tároltuk további felhasználásig. A későbbi PCR-vizsgálatokhoz az RNS-t a PARIS Kit (Ambion, Austin, TX) segítségével extraháltuk.

### **3.7. Laser capture microdissection (LCM)**

Az egereket 24 órával a máj kivétele előtt a farokvénán keresztül fiziológiás sóoldatban százszorosára hígított, 200  $\mu\text{l}$  steril India-festékkel injektáltuk. A laser capture technikát Arcturus Autopix automata LCM-rendszerrel végeztük. A Kupffer-sejteket (KC) semleges széntartalmuk alapján detektáltuk a lefagyasztott májszeletekben, mintánként kb. 500-at. Az elfogott sejtekből RNS-t vontunk ki a PicoPure RNS-izolációs kit (Arcturus, Mountain View, CA) segítségével. Az RNS minőségét Agilent Bioanalyser segítségével ellenőriztük, melynek feloldóképessége 200 pg/  $\mu\text{l}$ . A real-time PCR-hoz a teljes kivonat 50-100%-át használtuk, visszafelé átírva Sensiscript RT kit (Qiagen) segítségével, úgy, hogy reakciónként kevesebb, mint 50 ng RNS-t használjunk.

### 3.8. Real-time PCR

A vizsgálatokat iCycler iQ Multi-Color Real Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA) segítségével végeztük. Az egér-UCP2 azonosításához egy referenciaplazmidot hoztunk létre, a gén egy 929 bázispár (bp) hosszúságú fragmentumjának felszaporításával (előre: 5'-GAT CCA TAT GGT TGG TTT CAA GGC CAC-3'; reverz: 5'-ATG AAG CTT TCA GAA AGG TGC CTC CC-3'), majd ezt pCR2.1 vektorba klónoztuk, referenciagénként a TATA-box binding protein (TBP) génjét használtuk. A teljes hosszúságú egér-TBP génjét (957 bp) amplifikáltuk (forward primer: 5'-ATG GAC CAG AAC AAC AGC CTT C-3'; reverz: 5'-CTA TGT GGT CTT CCT GAA TCC CTT T-3'), és szintén pCR2.1-be klónoztuk. Az UCP2 és TBP hígítási sorait használva vettük fel a standard görbéket. Az UCP2 felszaporításához 45 ciklust alkalmaztunk: 15 másodperces denaturáció 95°C-on, 30 másodperces hőkezelés 60°C-on, majd extenzió 30 másodpercig 72°C-on. 0,4 µmol/l végső koncentrációban alkalmaztuk az intron-spanning primereket (előre: 5'-AGC CCT TGA CTC TCC CCT TG-3', visszafele: 5'-GCA TTG CAG ATC TCA TCA CTT TCC-3', 51 bp amplikonhossz). A TBP vizsgálatához a reakcióelegy 0,6 µmol/l intron-spanning primert tartalmazott (forward: 5'-ACT TCG TGC AAG AAA TGC TGA A-3', reverz: 5'-TGT CCG ZGG CTC TCT TAT TCT CA-3', az amplikonhossz 75 bp volt). Minden mintából duplikátumot futtattunk és az UCP2 mennyiségét a minta TBP-tartalmára normalizáltuk.

### 3.9. A patkányok kezelése és a fluvastatin adagolási módszerei

A daganatellenes hatásokat 150-200 grammos hím FLF<sub>1</sub> (F344 x FE) hibrid patkányokon tanulmányoztuk. Az állatokat hagyományos laboratóriumi körülmények között tartottuk, félszintetikus eledel (LATI, Gödöllő) mellett ivóvizet kaptak. A humán terápiás adagok alapján 0,5 mg/ttkg, 2 mg/ttkg és 20 mg/ttkg fluvastatin (Lescol<sup>®</sup>, Novartis) dózisokat állapítottunk meg. A gyógyszert 0,5 ml kukoricaolajban szuszpendáltuk és gyomorszondán keresztül napi egy alkalommal, felületes éteranesztéziát követően adtuk be. Az első csoportban a statint a daganatsejtek beültetésével egy időben kezdtük el adni 5, 10, illetve 15 napig. A második csoport a gyógyszert 21 nappal a tumorimplantáció előtt kezdte el kapni, majd a daganat beültetésekor a statint felfüggesztettük. A harmadik csoportban (a fentieket kombinálva) az állatokba 21 napos fluvastatin adagolást követően ültettük be a tumorsejteket, majd ezt követően is folytattuk a gyógyszer adását. Kísérleteink során egyetlen állat sem hullott el. Vizsgálatainkat az etikai követelményeknek megfelelően, egyetemünk Állatkísérletes Etikai Bizottsága jóváhagyásával végeztük.

### 3.10. Daganatindukció

A hepatocellularis carcinomát beltenyésztett újszülött F344 patkányokban hoztuk létre, fiziológiás sóoldatban oldott 125 µg dimetil-nitrózamin (Sigma No.77561) intraperitonealis adásával. A kifejlődött daganatot az állatok 5-7 hónapos korában távolítottuk el, majd a tumorsejteket steril körülmények között izoláltuk. Az eltávolított daganatszövetet apró darabokra vágtuk, homogenizáltuk

és műanyaghálon keresztül átszűrtük. Az így kapott He/De14 tumorsejteket folyékony nitrogénben tároltuk. Implantáció előtt a sejteket M 199 médiumban szuszpendáltuk és hígítottuk. A daganat növekedési ütemét 5, 10, 15 nappal a beültetést követően határoztuk meg.

### **3.11. A Gelaspon korongok előkészítése**

A tumorsejtek beültetéséhez zselatinszivacs korongokat (Gelaspon<sup>®</sup>, Germed, Germany) használtunk. Az 1 mm vastag, 4 mm átmérőjű korongokat etilénoxidral történt sterilizálás után egy héten belül felhasználtuk: beültetés előtt a daganatsejt-szuszpenzióból 1 µl-t cseppentettünk a szivacskorongra.

### **3.12. Sebészeti módszerek**

A patkányokat éterrel anesztetizáltuk, majd a lumbalis régiót leborotváltuk. Uzvölgyi módszere alapján a bal vesét felkerestük, majd a tumorsejteket tartalmazó Gelaspon korongot a vesetok alá behelyeztük. A jobb vesetok alá – kontrollként – steril, daganatsejteket nem tartalmazó korongot implantáltunk, majd a sebet zártuk. A beültetést követő ötödik, tizedik és tizenötödik napon az állatokat ismételtelen anesztetizáltuk és mindkét vesét eltávolítottuk. A szervek tömegét megmérve kiszámoltuk a különbséget a tumoros és a nem-tumoros vese között. A tumortömeg nem haladta meg a patkányok testtömegének 10%-át.

### **3.13. Statisztikai módszerek**

A kísérleteink során kapott adatok statisztikai összehasonlítását Student-féle nem párosított t-teszttel, vagy többszörös összehasonlítások esetén varianciaanalízis, ANOVA (one-way analysis of variance) segítségével végeztük. Az összefüggések vizsgálatához Fisher-féle valószínűségszámítást, Mann-Whitney-féle U-tesztet és binomiális számítást végeztünk. Szignifikáns különbségnek a  $p < 0,05$  szintet tekintettük, a mérési adatoknál az átlagértéket és annak közepes hibáját (átlag  $\pm$  SEM) adtuk meg. A statinnal végzett vizsgálatokhoz szintén ANOVA varianciaanalízist használtunk, melyet Bonferroni-féle t-teszttel is kiegészítettünk. Szignifikáns különbségnek a  $p < 0,05$  szintet tekintettük, a mérési adatoknál az átlagértéket és a standard deviációt (átlag  $\pm$  SD) adtuk meg.

## **4. EREDMÉNYEK**

### **4.1. Az UCP2 hiányának hatása a túlélésre**

A kisdózisú Jo2 antitest-injekció nem okozott elhullást az *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* egerek között, míg az *ob/ob:ucp2<sup>+/+</sup>* állatok közül egy hullott el 24 órán belül. Ezzel szemben a nagy dózisú antitest beadása mindkét csoportban az összes állat 24 órán belüli elhullását okozta mindkét csoportban. Ugyanakkor

az utóbbi esetben, az obes UCP2-knockout egerek túlélése szignifikánsan hosszabbnak bizonyult a szintén elhízott, de UCP2-t expresszáló társaikénál (571±81 perc, vs. 390±50 perc; p<0,05).

#### 4.2. Transzamináz aktivitások

Az alacsony dózisu injekciót követően az *ob/ob:ucp2<sup>+/+</sup>* állatok ALT aktivitása minden vizsgált időpontban magasabbnak bizonyult *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* társaikénál (kezdeti: 60,8±10,1 vs. 46,1±25,7 IU/L; 2 óra után: 449,5 ± 150,0 vs. 111,5±36,8 IU/L; 12 óra elteltével: 896,3±285,2 vs. 348,7±119,9 IU/L). A 0,4 mg/ttkg dózisu Jo2 beadása után gyorsabban és magasabbra emelkedő ALT-szinteket mértünk, melyek azonban kevésbé voltak kifejezettek az *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* egerek esetében (kezdeti: 99,1±49,8 vs. 93,8±45,9 IU/L, 1 óra múlva: 447,4±344,6 vs. 227,8±119,2 IU/L; 2 óra elteltével: 2968,9±2761,9 IU/L vs. 907,4±382,3 IU/L).

#### 4.3. Szövettani eredmények hematoxin-eozin festéssel

Kisdózisu injekció után számos apoptotikus sejt volt azonosítható, azonban kevesebb elváltozást találtunk az *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* egerek májában. 0.4 mg/ttkg adag beadása után masszív haemorrhagiás necrosis jött létre mindkét genotípusú, de főleg az *ob/ob:ucp2<sup>+/+</sup>* egerek májában. Kevésbé kiterjedt elhalás volt megfigyelhető az *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* egereknél, különösen a periportalis tér megkíméltsége volt feltűnő. A fiziologiás sóoldattal injektált kontroll állatok között sem elhalást nem észleltünk, valamint ALT-szintjeikben és szövettanukban sem észleltünk változást.

#### 4.4. Fas-mediált májsejtelhalás

A sóoldatot kapott egerek esetében a kiinduló hepatocellularis apoptotikus ráta alacsonyabb volt az *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* egyedekben. A 0,15 mg/ttkg dózisu Jo2 injekció jelentősen emelte az apoptosist, ám ez kisebb mértékűnek bizonyult az obes, UCP2-KO egerek esetében. Ezek az eredmények korrelálnak az *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* állatoknál megfigyelt alacsonyabb transzamináz értékekkel. A 0,4 mg/ttkg dózisu Jo2 fulmináns májkárosodást okozva drámaian emelte az apoptotikus sejtek számát, melyekkel párhuzamosan konfluáló necroticus területeket is megfigyeltünk, melyek szintén TUNEL-pozitívnak bizonyultak. Ezen areákon belül számos sejt diffúz festődési mintázatot mutatott a necrosisnak megfelelően, szemben az apoptosissal jellemző sötét, zsugorodott sejtmagokkal. A TUNEL-pozitív sejteket megszámlálva kijelenthető, hogy a hepatocellularis apoptotikus ráta az *ob/ob:ucp2<sup>+/+</sup>* egerekben szignifikánsan magasabb kiinduláskor és kisdózisu Jo2 adása után is, szemben az *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* állatokban észleltekkkel (kezdeti: 2,37±0,64 vs. 1,53±0,55 apoptotikus sejtmag/látómező; kisdózisu antitest után: 35,40±6,07 vs. 16,18±3,72 apoptotikus sejtmag/látómező). Ez a tendencia volt megfigyelhető a nagydózisu injekció adása után is (101,0±22,0 vs. 54,0±10,3 apoptosist/látómező), ám ez a különbség már nem volt szignifikáns (p=0,086).

Mivel a nagydózisu Jo2 injekció után apoptosissal és necrosisra utaló jeleket is észleltünk, a hepatocellularis sejtelhalás mértékének megítélésére a szövettani minták képanyalízisét végeztük el. A

vizsgálat alapján megállapítható, hogy a 0,4 mg/ttkg dózisu Jo2 szignifikánsan enyhébb károsodást okozott az *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* egerek májában (895,13±100,75 vs. 449,62±104,47 AU).

A programozott sejthalál folyamata energiaigényes, ezzel szemben a sejtek energiakészletének csökkenése inkább necrosisra hajlamosít. Így arra a következtetésre juthatnánk, hogy az obes UCP2-KO egerek májában a sejtek ATP-raktárai megkíméltebbek, ezáltal a sejtelhalás domináló formája inkább az apoptosis. Ezzel szemben az apoptosis egyik kulcsfolyamatának, a DNS fragmentációjának vizsgálata azt mutatta, hogy a létraképződés – összehasonlítva az *ob/ob:ucp2<sup>+/+</sup>* állatokkal – kisebb mértékű az *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben. Ez a különbség mind a kis-, mind pedig a nagy dózisu antitest injekció beadása után megfigyelhető.

#### 4.5. Fas-expresszió

Ismert, hogy diétával kiváltott obesitasban szenvedő egerekben a Fas expressziója fokozódik, mely hozzájárul a Fas-mediált májkárosodáshoz. Ezért immunoblottal meghatároztuk a Fas expresszióját az *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* és *ob/ob:ucp2<sup>+/+</sup>* egerekben is. Mivel különbséget nem találtunk, ez arra utal, hogy nem a Fas-expresszió megváltozása okozta az *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* egerek enyhébb májkárosodását.

#### 4.6. A hepaticus ATP-raktárak változásai

Az ATP mennyisége a sóoldatot kapott UCP2-knockout és azt expresszáló obes egerekben hasonló volt (*ob/ob:ucp2<sup>+/+</sup>* vs. *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* egerek: 1,432±0,189 vs. 1,086±0,131 nmol/mg protein). Ez a megfigyelés nem meglepő azon vizsgálatok tükrében, melyek azt igazolták, hogy az UCP2 biológiai hatásai a fehérje aktivációjakor lesznek nyilvánvalókká. A kis dózisu Jo2 injekciót követően a máj ATP-tartalma lényegében változatlan maradt, ezzel szemben nagy dózisu antitest-injekció adását követően az ATP-raktárak drámaian csökkentek a májban, melyre az aktív UCP2-nek egyértelmű hatása volt: a moribund *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben a máj reziduális ATP-tartalma háromszorosa volt a hasonló állapotú *ob/ob:ucp2<sup>+/+</sup>* állatokhoz képest (*ob/ob:ucp2<sup>+/+</sup>* vs. *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* egerek kis dózis után: 1,090±0,303 vs. 1,652±0,349 nmol/mg protein; nagy dózis után: 0,139±0,024 vs. 0,448±0,167 nmol/mg protein).

#### 4.7. Az oxidatív stressz változása

Feltételezésünknek megfelelően, a Jo2 növekvő adagjai szignifikáns emelkedést okoztak a mért lipidperoxidációs termék, a malondialdehid mennyiségében. Meglehető módon ugyanakkor, az UCP2 hiányának nem volt szignifikáns hatása a májszövetben mért MDA-szintekre (*ob/ob:ucp2<sup>+/+</sup>* vs. *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* egerek sóoldat után: 0,405±0,031 vs. 0,486±0,080 nmol/mg protein; kis dózis után: 0,688±0,191 vs. 0,775±0,090 nmol/mg protein, nagy dózist követően: 0,903±0,081 vs. 0,900±0,140 nmol/mg protein). Ez a megfigyelésünk azonban nem állt összhangban azon előző vizsgálatokkal, melyek az UCP2 hiányában fokozott ROS-termelést írtak le (például *Blanc J, et al. Circulation 2003*;

107:388-390 és Duval C, et al. *Biochem Cell Biol* 2002; 80:757-764). Ezt az ellentmondást újabb kísérletekkel próbáltuk feloldani.

#### **4.8. Az UCP2 expressziója *ob/ob* egerek hepatocytaiban és a Kupffer-sejtekben**

A fehérje-expresszió sejtspecifikus változásait kiderítendő, UCP2-t expresszáló leptindeficiens *ob/ob* egerekből és ezek nem elhízott, leptinre vad típusú (*wt/wt*) társaiból *in situ* májperfúziós módszerrel parenchymás (PC) és nonparenchymás (NPC) sejtfrakciókat nyertünk. Az *ob/ob* egerekből nyert PC frakcióban az UCP2 mRNS-expressziója szignifikánsan magasabb volt ( $4,80 \pm 0,965$  vs.  $15,463 \pm 2,516$ ). Ezzel ellentétben, az *ob/ob* egerekből nyert NPC frakcióban az UCP2 expressziója szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult *wt/wt* társaikkal összehasonlítva ( $89,27 \pm 22,12$  vs.  $39,26 \pm 21,34$ ). Az NPC frakció azonban nemcsak Kupffer-sejtekből áll, hanem sinusoidalis endothelsejteket és HSC-ket is tartalmaz, melyekben az UCP2 expressziójának mértéke nem ismert. Az India-festéket fagocitált Kupffer-sejteket azonosítva, azokat LCM-mel összegyűjtve, az UCP2 expressziója ezen sejtcsoportban is szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult az *ob/ob* egyedekben ( $28,69 \pm 7,43$  vs.  $11,71 \pm 2,82$ ).

#### **4.9. A tumorimplantáció optimális körülményeinek meghatározása**

A fluvastatinnal végzett vizsgálataink első lépéseként az optimális implantálandó tumorsejtszámot, majd a daganatfejlődés lemeréséhez szükséges optimális időt határoztuk meg. Mindehhez  $10^5$ ,  $10^6$ , illetve  $10^7$  hepatocellularis carcinoma sejtet implantáltunk a nem kezelt patkányok bal vesetokja alá. A daganatok fejlődését pedig a sebészeti beavatkozást követően az 5., 10. és a 15. napon vizsgáltuk. Megállapítható, hogy tumornövekedés már az ötödik napon detektálható, mely a maximumát a tizenötödik napon érte el. Hosszabb időintervallumokat nem vizsgáltunk, mivel előkísérleteink alapján 15-25 napon belül már az állatok elhullásával kellene számolnunk.

Másrészt, a tumornövekedés mértéke szerénynek bizonyult  $10^5$  sejt implantációja után (5. napon:  $0,119 \pm 0,02$ ; 10. napon:  $0,456 \pm 0,07$ ; 15. napon:  $3,789 \pm 0,56$  g/100g testtömeg). Ugyanakkor  $10^6$  daganatsejt beültetését követően egy nagyságrenddel több ( $10^7$ ) sejtet használva már nem észleltünk további szignifikáns növekedést a daganat fejlődési ütemében (5. napon:  $0,455 \pm 0,07$  vs.  $0,553 \pm 0,11$  g/100g testtömeg,  $p=0,0965$ ; 10. napon:  $5,882 \pm 1,05$  vs.  $6,117 \pm 1,15$  g/100g testtömeg,  $p=0,2612$ ; 15. napon:  $8,673 \pm 1,55$  vs.  $9,823 \pm 1,86$  g/100g testtömeg,  $p=0,0524$ ). Mindezek alapján a további vizsgálatokat  $10^6$  implantált sejtszámmal végeztük.

#### **4.10. A fluvastatin hatása a tumorimplantációval azonos időben elkezdve**

Az első csoportban a daganatsejtek beültetésével szimultán kezdtük el adni a gyógyszert 0,5 mg/ttkg, 2 mg/ttkg és 20 mg/ttkg dózisokban. A fluvastatin a legkisebb dózisban adva nem volt hatással a tumornövekedésre (kontrollcsoport tumortömege az ötödik napon:  $0,55 \pm 0,1$ ; tizedik napon:  $6,54 \pm 1,1$ ; tizenötödik napon  $7,78 \pm 1,5$  g/100g testtömeg vs. a kisdózisú fluvastatint kapó állatok

tumortömege az ötödik napon:  $0,60\pm 0,1$ ; tizedik napon:  $5,79\pm 1,2$ ; tizenötödik napon:  $7,56\pm 1,6$  g/100g testtömeg). Közepes dózisban már antitumor hatás volt detektálható, mely a tizenötödik nap után vált szignifikánssá (ötödik napon:  $0,58\pm 0,1$ ; tizedik napon:  $6,11\pm 1,2$ ; tizenötödik napon:  $5,87\pm 1,1$  g/100g testtömeg;  $p<0,001$ ). Ezzel szemben, a 20 mg/ttkg adagban adott fluvastatin már a tizedik napon is szignifikáns csökkenést okozott a hepatocellularis carcinoma növekedési ütemében, mely még szignifikánssabbá vált a tizenötödik napon (ötödik napon:  $0,62\pm 0,1$ ; tizedik napon:  $5,21\pm 1,1$ ;  $p<0,01$ ; tizenötödik napon:  $4,88\pm 0,9$  g/100g testtömeg;  $p<0,001$ ).

#### **4.11. A fluvastatin hatása a daganat fejlődésére, 21 napos előkezelést követően**

A második csoport a gyógyszert 21 nappal a tumorimplantáció előtt kezdte el kapni, majd a beültetéskor a fluvastatint felfüggesztettük. Az alkalmazott kondíciók mellett a fluvastatin nem fejtett ki szignifikáns kemopreventív hatást a tumor fejlődésére (kontrollcsoport tumortömege az ötödik napon:  $0,79\pm 0,1$ ; tizedik napon:  $5,68\pm 1,1$ ; tizenötödik napon:  $8,67\pm 1,7$  g/100g testtömeg; 0,5 mg/ttkg fluvastatin csoport tumortömege az ötödik napon:  $0,80\pm 0,2$ ; tizedik napon:  $4,68\pm 1,0$ ; tizenötödik napon:  $8,56\pm 1,8$  g/100 g testtömeg; 2 mg/ttkg fluvastatin csoport tumortömege az ötödik napon:  $0,83\pm 0,2$ ; tizedik napon:  $5,87\pm 1,2$ ; tizenötödik napon:  $8,88\pm 1,8$  g/100 g testtömeg; 20 mg/ttkg fluvastatin csoport tumortömege az ötödik napon:  $0,77\pm 0,1$ ; tizedik napon:  $4,67\pm 1,1$ ; tizenötödik napon:  $8,12\pm 1,6$  g/100 g testtömeg).

#### **4.12. A fluvastatin hatása a tumor fejlődésére, a megelőző kezelést az implantáció után is folytatva**

A harmadik csoportban 21 napos fluvastatin adagolást követően ültettük be a tumorsejteket az állatokba, majd ezt követően is folytattuk a gyógyszer adását. A legkifejezettebb daganatellenes hatásokat ebben, a kombinált kezelési sémát kapó csoportban lehetett elérni. Ekkor már a kis dózisú statinkezelés is hatékonynak bizonyult a tizenötödik napot követően, míg a közepes és nagy dózisban adott fluvastatin mindhárom vizsgált intervallumot követően szignifikánsan gátolta a daganat növekedését (kontrollcsoport tumortömege az ötödik napon:  $0,79\pm 0,1$ ; tizedik napon:  $5,72\pm 1,1$ ; tizenötödik napon:  $8,24\pm 1,7$  g/100g testtömeg; 0,5 mg/ttkg fluvastatin csoport tumortömege az ötödik napon:  $0,69\pm 0,1$ ; tizedik napon:  $5,31\pm 1,2$ ; tizenötödik napon:  $7,21\pm 1,5$  g/100 g testtömeg; 2 mg/ttkg fluvastatin csoport tumortömege az ötödik napon:  $0,61\pm 0,1$ ; tizedik napon:  $4,46\pm 0,8$ ; tizenötödik napon:  $5,56\pm 1,1$  g/100 g testtömeg; 20 mg/ttkg fluvastatin csoport tumortömege az ötödik napon:  $0,44\pm 0,1$ ; tizedik napon:  $3,53\pm 0,6$ ; tizenötödik napon:  $2,69\pm 0,5$  g/100 g testtömeg).

## 5. MEGBESZÉLÉS

Az obesitas napjaink egyik népbetegsége. Az elhízáshoz társuló zsírmáj potenciálisan progresszív betegség, mivel a steatosist a későbbiekben steatohepatitis, fibrosis és cirrhosis, valamint hepatocellularis carcinoma követheti. A zsírmáj-betegség igen érzékenyen reagál mindazon állapotokra, melyek a hepatocellularis energiahomeosztázist befolyásolják, a betegség kialakulásában a reaktív oxigéngyökök fokozott termelése is alapvető. Az ATP, illetve a ROS termelésének egyik fontos modulátora a mitokondrium belső membránjában elhelyezkedő uncoupling protein-2. Biológiai funkciói még mindig nem egészen tisztázottak, de feltételezhető, hogy a proton gradienst megcsapolva, azt az ATP-termeléstől szétkapcsolva a sejtek energiatermelésével versenyez. Emellett a légzési láncra nehezedő elektrokémiai gradienst befolyásolva a celluláris oxidatív stressz egyik fontos szabályozója.

Az egészséges májban megfigyelhető alacsony UCP2-expresszió fő forrása a Kupffer-sejt. Zsírmáj-betegségben azonban a fehérje expressziója jelentősen megnő, és döntően a lipiddel telt hepatocytákba lokalizált. Bár a lipidakkumuláció és -peroxidáció az UCP2 funkcióját feltételezhetően befolyásolja a májsejtekben, de ezen változások biológiai jelentősége még nem tisztázott. Ugyanakkor az sem teljesen világos, hogy az UCP2-szignál fokozódása hatással van-e a zsírmáj-betegségben megfigyelhető hepatocellularis energiaraktár-csökkenésre. Az UCP2 hiányának nincs laboratóriumi, vagy szövettani vizsgálatokkal detektálható hatása az UCP2-knockout egerekben létrehozott zsírmájra, mely a fokozott fehérjeexpresszió biológiai hatásának hiányára, vagy hosszútávú kompenzatorikus mechanizmusok kialakulására hívja fel a figyelmet. Ugyanakkor azt még nem tanulmányozták korábban, hogy az UCP2-deficiencia hatással van-e az akután létrejövő májkárosodásra.

Tanulmányunkban az akut károsodást Jo2-antitest intraperitoneális adásával váltottuk ki UCP2-t expresszáló, valamint UCP2-deficiens leptinhiányos obes (*ob/ob:ucp2<sup>+/+</sup>* és *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>*) egerekben. A túlélési vizsgálatainkból kiemelendő, hogy nagy dózisú (0,4 mg/ttkg) Jo2 beadását követően az *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* egerek túlélése szignifikánsan hosszabbnak bizonyult *ob/ob:ucp2<sup>+/+</sup>* társaikénál. Az ALT aktivitásokat – ezzel összhangban – konzekvensen alacsonyabbnak mértük az elhízott UCP2-KO állatokban. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az UCP2 hiánya, legalábbis részben, védelmet jelent a Fas-mediált sejtelhálással szemben.

Hematoxilín-eozin festéssel számos apoptoticus sejt volt azonosítható, azonban kevesebb számú és kisebb kiterjedésű elváltozást találtunk az *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* egerek májában akár kis- akár nagy dózisú Jo2 injekció után. A fiziológias sóoldattal injektált egerek körében elhalást nem észleltünk, valamint ALT aktivitásukban és szövettanukban sem észleltünk változást. Megfigyeléseink a túlélési adatokkal korrelálva arra utalnak, hogy az UCP2 hiánya enyhíti a Fas-mediált akut májkárosodást leptindeficiens obes egerekben.

A hepatocellularis apoptózis pontosabb megítélése végett további vizsgálatokat végeztünk. Már a kontroll, azaz sóoldatot kapott egerek májában is észleltük, hogy a kiinduló hepatocellularis

apoptoticus ráta szignifikánsan alacsonyabb az *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben. A Jo2 injekció már kisebb dózisban is jelentősen emelte az apoptosist, ám ez kisebb mértékűnek bizonyult az *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* állatokban. Ezek az eredmények korrelálnak ezen egerekben megfigyelt alacsonyabb transzamináz értékekkel. A nagyobb dózisban adott Jo2 antitest fulmináns májkárosodást okozott, így apoptoticus területeket és konfluáló necroticus areákat is megfigyelhettünk mikroszkóp alatt. A módszerrel a különbség utóbbi esetben nem volt szignifikáns, azonban képanalízist végezve már kijelenthetjük, hogy a 0,4 mg/ttkg dózisú Jo2 szignifikánsan enyhébb károsodást okozott az *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* egerek májában. Megfigyeléseinket megerősítette a DNS fragmentáció vizsgálata is. Immunoblottal igazoltuk, hogy a Fas expressziója között nem volt különbség az *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* és *ob/ob:ucp2<sup>+/+</sup>* egerekben, így nem ennek változása okozta az *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* egyedek enyhébb májkárosodását.

Az UCP2-knockout és azt expresszáló obes egerek hepaticus ATP mennyisége között nem volt szignifikáns különbség sem fiziológiás sóoldat, sem pedig kisdózisú Jo2 adását követően. Ez egyrészt arra utal, hogy az UCP2 expressziójának fokozódása nem veszélyezteti az ATP szintézist nyugvó sejtekben, másrészt a hepatocellularis ATP homeosztázis egyensúlyát jelzi; és összhangban van a túlélési megfigyeléseinkkel. A nagydózisú antitest-injekció adását követően az ATP raktárak drámaian csökkentek, de a moribund *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben a máj reziduális ATP tartalma szignifikánsan magasabb, azaz megkíméltebb volt a hasonló állapotú *ob/ob:ucp2<sup>+/+</sup>* állatokhoz képest. Ezek a megfigyeléseink arra utalnak, hogy a hepaticus energiaraktárak az UCP2 hiányában jobban konzerváltak. Azaz, a steatosisban megfigyelhető UCP2-bőség valószínűleg hozzájárul a zsírmáj fokozott vulnerabilitásához.

Feltételezésünknek megfelelően, a Jo2 növekvő adagjait követően szignifikánsan emelkedő lipidperoxidációs aktivitást mértünk a májmintákban. Az UCP2 hiányának azonban nem volt szignifikáns hatása a májszövetben mért MDA szintekre, mely arra utal, hogy valószínűleg nem az oxidatív stressz változása a Fas-mediált májkárosodás fő modulátora az *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben. Mivel megfigyelésünk nem állt összhangban a korábbi megfigyelésekkel, melyek az UCP2 hiányában leírt fokozott ROS-termelést írtak le, ezért ezt az ellentmondást újabb kísérletekkel próbáltuk feloldani.

Ismert, hogy az egészséges májban az UCP2 fő forrása elsődlegesen a Kupffer-sejt, míg elhízáshoz társuló steatosisban a hepatocytákban emelkedik meg az UCP2-szignál mennyisége. Ugyanakkor az még nem volt ismert, hogy a Kupffer-sejtek hogyan reagálnak a májban történő excesszív lipidlerakódásra. Fenti vizsgálataink után úgy gondoltuk, hogy az *ob/ob* egerek Kupffer-sejtjeiben bekövetkező esetleges UCP2-expresszió csökkenés magyarázatul szolgálhat arra, hogy a knockoutokban nem volt megfigyelhető az oxidatív stressz további fokozódása. Ugyanis – ezen hipotézis helyessége esetén – az UCP2 ablációjának minimális további hatása lenne a Kupffer-sejtre (mely a ROS-termelés kiemelt helye a májban), mivel a sejten a fehérje expressziója eleve csökkent zsírmáj-betegségben. Ahhoz, hogy elgondolásunkat igazoljuk, UCP2-t expresszáló leptindeficiens *ob/ob* egerekből és ezek vad típusú vékony (*wt/wt*) társain májperfúzióval parenchymás és

nonparenchymás sejtfrakciókat szeparáltunk. Az *ob/ob* egerek PC frakcióiban az UCP2 mRNS-expressziója szignifikánsan magasabbnak, míg az NPC frakciókban az UCP2 expressziója szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult *wt/wt* társaikkal összehasonlítva. Ezzel összhangzó eredményt kaptunk a Kupffer-sejteket is megvizsgálva: az UCP2 expressziója szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult az *ob/ob* állatokból nyert Kupffer-sejtekben a vékony, vad típusúakhoz képest.

Eredményeinkkel bizonyítottuk, hogy a Kupffer-sejtek UCP2 expressziója csökken *ob/ob* egerek májában, hasonlóan például a peritoneális makrofágokhoz. Bár a minták kicsiny mérete és az UCP2 fehérjeszignál csökkenése miatt Western blotot nem tudtunk végezni, a Kupffer-sejtekben általunk igazolt változások potenciálisan igen hasznosak és az irodalomban először közöltek. Feltételezhetően, inkább a Kupffer-sejtekben megfigyelhető UCP2-expresszió csökkenés, mintsem a hepatocytákban történő expressziófokozódás az oka az *ob/ob* egerek zsírmájában megfigyelhető fokozott reaktív oxigén-gyök-termelésnek. Ugyanakkor ez a folyamat az *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben nem fejt ki számottevő hatást, mivel az UCP2 ablációja már nem csökkenti lényegesen az eleve csökkent UCP2-szignált a Kupffer-sejtekben. Így az UCP2 hiányának nincs szignifikáns hatása az elzsírosodott májszövet malondialdehid-tartalmára sem a Jo2-injekciót követően. Ezzel szemben az UCP2 expressziójának hepatocytákban megfigyelhető fokozódása jelentős tényező; és így az UCP2 ablációja megfontolandó hatású a parenchymás sejtekben, mivel az UCP2-deficiencia láthatóan megkíméli az ATP-raktárakat és enyhíti az *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* állatok érzékenységét a Fas-mediált akut májkárosodás iránt.

Megfigyeléseinket összegezve, az *ob/ob* egerekben kialakuló zsírmáj-betegség fent tanulmányozott vonásai leginkább egy sejtspecifikus modellel írhatóak le, amely alapján az UCP2-szignál különbözőképpen változik az egyes sejtekben. Eszerint az UCP2-expresszió csökkenése a Kupffer-sejtekben elsősorban az oxidatív stressz fokozódásához vezet, míg a fehérje expressziójának hepatocytákban megfigyelhető fokozódása az ATP-termelést, ezáltal a hepatocellularis energiaegyensúlyt veszélyezteti. Mivel az UCP2 specifikus aktivátorok jelenlétében fejt ki hatását, a fehérjeszignál fokozódása kizárólag akut hatások („kihívások”) után válik nyilvánvalóvá. Így a lipiddel telt hepatocytákban az UCP2 ablációja egyértelműen előnyös, amint azt az *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* állatok jobb túlélése is bizonyította.

Ugyanakkor az még nem ismert, hogy a zsírmáj egyéb állatkísérletes modelljeiben is hasonlóan bekövetkezik-e a fent leírt sejtspecifikus transzkripcionális szabályozás. Szintén keveset tudunk a humán NAFLD-ben megfigyelhető UCP2-expresszióról is. Eredményeink alapján az UCP2 stimulációja kérdéses eszköz maradt a humán zsírmáj-betegségben, hacsak ez nem a Kupffer-sejtek fehérje expressziójának specifikus fokozására irányul. Bár az utóbbi kívánatos célnak tűnik, de a makrofágok és Kupffer-sejtek UCP2-expressziójának negatív transzkripció szabályozása és ennek egyéb következményei még feltétlenül tisztázandóak.

Az elhízáshoz rendkívül gyakran társuló hyperlipidaemia kezelésében a statinok alapvető fontosságúak. A HMG-CoA reduktáz gátlásán keresztül a koleszterin szintézisét blokkolják, emellett a lipidcsökkentésen kívül egyéb kedvező hatásai is vannak, melyeket összefoglaló néven pleiotróp hatásoknak nevezünk. A statinok a nem-koleszterin jellegű mevalonát metabolitok termelését is redukálják. Ezen izoprenoid metabolitok (pl. farnezil-pirofoszfát, geranil-geranil-pirofoszfát) a sejt szignáltranszdukciós folyamataiban résztvevő kis guanozin-trifoszfát (GTP)-kötő fehérjék (Rho, Ras) poszttranszlációs módosításában (prenilizációjában) vesznek részt. A Ras és Rho fehérjék fontos szubsztrátul szolgálnak a prenilizációhoz, így a statinok kitűnő célpontjai. A statinok gátolják a sejtproliferációt és apoptosist indukálnak; antitumor hatásuk a mevalonát ciklus gátlásával hozható összefüggésbe, mivel a ciklus mindkét nem-koleszterin jellegű fő molekulája, a farnezil- és a geranil-geranil-pirofoszfát is a sejtproliferáció és sejthalál folyamatának szabályozásában vesz részt. Bár a statinok fenti hatásai klinikai alkalmazásuk szempontjából igen fontos, de még mindig csak korlátozott mennyiségű információnk van ezen gyógyszerek daganat- és áttétképződésre gyakorolt hatásáról. Szintén nem tisztázott, hogy a különböző molekuláris struktúrájú HMG-CoA reduktáz inhibitorok valóban hasonló módon és mértékben hatnak-e a tumor- és áttétképződés folyamatára. A fluvastatin egy nyílt gyűrűt tartalmazó szintetikus, lipofil karakterű HMG-CoA reduktáz inhibitor, melyet az 1990-es évek óta használnak a hyperlipidaemia, atherosclerosis kezelésében. Gátolja az érfalban elhelyezkedő simaizomsejtek proliferációját, valamint humán pancreas daganatsejtek invazivitását csökkenti a RhoA-mediált geranilgeraniláció gátlásán keresztül. Feltételezik, hogy kémiai struktúrájához és lipofil karakteréhez köthető antioxidáns, valamint nitrogénmonoxid-szintetáz aktiváló hatása is. A gyógyszer májszelektív, Magyarországon 40 és 80 mg-os kisserelésekben van forgalomban.

Vizsgálatunkban a fluvastatin tumorelleses, daganatfejlődésre gyakorolt *in vivo* hatásait tanulmányoztuk, melyhez patkányok vesetokja alá implantált hepatocellularis daganatsejteket használtunk. Kíváncsiak voltunk a különböző adagolási módszerekkel adott fluvastatinnak a neoplasma fejlődésére gyakorolt kemopreventív és terápiás hatásaira. Tumorsejtek és tumordarabok vesetok alá történő beültetése gyakori módszer a daganatok fejlődésének megítélésében, ugyanakkor a pontos daganatellenes hatás kiértékelése nem mindig megbízható. A Gelaspon használatának előnye az, hogy a zselatinkorong az egymáshoz és a vese kollagénrostjaihoz tapadó sejteket reabszorbeálja. Ennek következtében a sejtaggregátumok nem gátolják a vese mikrocirkulációját, melynek egyértelmű negatív hatása lenne a szöveti metabolizmusra. Emellett a módszer olcsó, valamint kemoterápiás és kemopreventív gyógyszerek hatásának kvantitatív értékeléséhez is hasznos.

A daganatbeültetés optimális körülményeinek meghatározása után a humán adagoláshoz hasonló dózisokban *per os* adagoltunk patkányoknak fluvastatint. Az első csoportban a daganatsejtek beültetésével egyidőben kezdtük el adni a gyógyszert. Közepes dózisan adva a tizenötödik nap után, nagy dózisban már a tizedik nap után is szignifikáns volt a gyógyszer daganatfejlődésre gyakorolt gátló hatása. A második csoportban a gyógyszert 21 nappal a tumorimplantáció előtt kezdtük el adni,

melyet a daganatimplantációval egyidőben felfüggesztettünk. Az alkalmazott kísérleti körülmények mellett azonban a fluvastatinnak nem volt észrevehető kemopreventív hatása a tumor fejlődésére. A harmadik csoportban a fenti adagolási módok kombinációját, azaz gyógyszeres előkezelést, majd a beültetést követően is folytatódó statin terápiát alkalmaztunk. 0,5 mg/ttkg dózisban adva a 15. napon már szignifikáns csökkenés volt detektálható a daganat növekedési ütemében; míg nagyobb adagok után mindhárom vizsgált időintervallumban jelentősen gátolta a tumorok fejlődését. Mindezek alapján a fluvastatin antitumor hatása ekkor bizonyult a legkifejezettebbnek.

Elmondható, hogy a fluvastatin *per os* adagolása hatékonyan gátolta az implantált hepatocellularis carcinoma növekedését patkányokban. A gyógyszer antitumor hatása nagyobb dózisok mellett a daganat beültetésével egyidőben elkezdve már detektálható, azonban a hatás fokozható úgy, hogy a fluvastatint kemopreventív adagolás után folytatjuk, az implantációt követően is. Ekkor már kisebb gyógyszerdózis mellett is megfigyelhető szignifikáns növekedésgátló hatás. Fentiek alapján az atherosclerosis prevencióján túl, a fluvastatin alkalmazása humán malignomákban is hasznos lehet; biztonságosságát és hatékonyságát illetően azonban még további vizsgálatok szükségesek.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

A zsírmáj, és ennek következtében létrejövő inzulinrezisztencia az obesitas egyik legfontosabb szövődménye. A nem-alkoholos zsírmáj érzékeny mindazon noxákra, melyek a hepatocellularis energia homeosztázist károsítják. A zsírmáj lipiddel telt hepatocytáiban az uncoupling protein-2 expressziója fokozott. Az UCP2 a protoncsorgás szabályozásán keresztül versenyez a sejtek ATP-szintézisével, illetve szabályozza a reaktív oxigéngyökök termelését is. Ugyanakkor, a fehérje expressziója és a májat akután károsító behatások következményei közötti összefüggés még nem tisztázott. Felmerült a kérdés, miszerint az UCP2 hiánya előnyös-e leptinhiányos *ob/ob* egerekben létrehozott Fas-mediált akut májkárosodásban. UCP2-deficiens *ob/ob* egereket (*ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>*) és ezek UCP2-t expresszáló társait (*ob/ob:ucp2<sup>+/+</sup>*) anti-Fas (Jo2) injekcióval oltottuk intraperitonealisan. A kisebb dózisú (0,15 mg/ttkg) Jo2-antitest kisebb mértékű ALT-emelkedést és alacsonyabb apoptoticus rátát eredményezett az *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* egerekben. A nagyobb adagban (0,4 mg/ttkg) injektált anti-Fas antitest az összes állat 24 órán belüli elhalását eredményezte, ugyanakkor az *ob/ob:ucp2<sup>-/-</sup>* egerek túlélése hosszabb volt és hepaticus ATP-raktáruk is enyhébb mértékben csökkentek, mely eredmények arra utalnak, hogy a zsírmáj hepatocytáiban az UCP2 hiánya előnyös a Jo2-mediált akut májkárosodás során. Bár irodalmi adatokból ismert, hogy az UCP2 a mitokondriális reaktív oxigéngyökök termelését is szabályozza, vizsgálatainkkal nem találtunk különbséget a különböző genotípusú egerek májlízátumban mért MDA-szintjeiben. Megfigyelésünk arra ösztönzött minket, hogy meghatározzuk a fehérje expresszióját Kupffer-sejtekben is, melyek jelentős mértékben járulnak

hozzá az intrahepaticus oxidatív stresszhez. Azt találtuk, hogy az UCP2 expressziója jelentős mértékben csökkent a nem kezelt *ob/ob:ucp2<sup>+/+</sup>* egerekben, mely lényegesen hozzájárul a fokozott oxidatív stresszhez és csökkenti az UCP2 ablációjának a hatását is. A zsírmájban megfigyelhető UCP2 szignál fokozódás így fokozza a Fas-mediált sejtelhalás mértékét az ATP-raktárak kimerülése miatt, ugyanakkor a Kupffer-sejtekben megfigyelhető szignálcsökkenés az állandó oxidatív stresszhez járul hozzá zsírmájban. Adataink alapján sejtspecifikus terápiás megközelítés fontosságát húzzák alá a mitokondriális szétkapcsolás fokozásának irányában tett terápiás próbálkozásokban.

Az elhízáshoz is gyakran társuló hyperlipidaemia kezelésében a fluvastatin széles körben elfogadott gyógyszer, ugyanakkor *in vivo* daganatfejlődésre kifejtett kemopreventív hatását mindeddig nem tanulmányozták. Vizsgálataink során patkányok vesetokja alá, Gelaspon zselatinkorong segítségével implantáltunk hepatocellularis carcinoma sejteket, mellyel egyidőben, illetve azt megelőzően, vagy folyamatosan *per os* fluvastatint adtunk különböző dózisokban. A csak a tumorbeültetést megelőzően adott statin nem fejtett ki szignifikáns antitumor hatást, míg ez, az implantációval egyidőben kezdve már észlelhető volt. A legkifejezettebb növekedésgátló effektus a kemopreventíven adott, majd a beültetést követően is folytatott gyógyszeradagolás során volt megfigyelhető. Mindez felhívja a figyelmet a fluvastatin *in vivo* hepatocellularis carcinoma fejlődésére gyakorolt gátló, humán szempontból előnyös hatására.

## 7. TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

**Fülöp P**, Derdák Z, Sheets A, Sabo E, Berthiaume EP, Resnick MB, Wands JR, Paragh G, Baffy G. Lack of UCP2 reduces Fas-mediated liver injury in ob/ob mice and reveals importance of cell-specific UCP2 expression. *Hepatology* 2006; 44(3):592-601

**IF: 9,792**

Paragh G, Kertai P, Kovács P, Paragh G Jr, **Fülöp P**, Fóris G. HMG CoA reductase inhibitor fluvastatin arrests the development of implanted hepatocarcinoma in rats. *Anticancer Res* 2003; 23(5A):3949-3954

**IF: 1,347**

### Egyéb témájú közlemények:

Paragh G, Seres I, Balogh Z, Katona E, **Fülöp P**, Kárpáti I, Mátyus J, Kakuk G. Szérum paraoxonáz aktivitás vizsgálata krónikus urémiás betegekben. *Hypertonia és Nephrologia* 1999; 3(2):106-109

Paragh G, Seres I, Balogh Z, Harangi M, Katona E, **Fülöp P**, Kakuk G. A szimvasztatin hatása a szérum lipid szintekre és a paraoxonáz aktivitásra. *Magyar Belorv Arch* 1999; 3:255-258

Seres I, Varga Z, Balogh Z, Harangi M, **Fülöp P**, Kakuk G, Paragh G. Szérum paraoxonáz aktivitás és E-vitamin szintek hypercholesterolaemiás betegekben. *Magyar Belorv Arch* 2000; 53:115-117

Balogh Z, **Fülöp P**, Seres I, Harangi M, Katona E, Kosztáczky B, Paragh G. Effects of simvastatin on serum paraoxonase activity. *Clin Drug Invest* 2001; 21:505-510

**IF: 0,846**

Audikovszky M, Pados G, Seres I, Harangi M, **Fülöp P**, Katona E, Winkler G, Paragh G. Obes betegek lipidprofiljának és paraoxonáz aktivitásának változása orlistat kezelést követően. *Orv Hetil* 2001; 142(50):2779-2783

Illyés L, Seres I, **Fülöp P**, Paragh G. Revaszkularizációs műtéten átesett betegek szérum paraoxonáz aktivitása. *Cardiologia Hungarica* 2003; 33:11-15

Horimoto M, **Fülöp P**, Derdák Z, Wands JR, Baffy G. Uncoupling protein-2 deficiency promotes oxidant stress and delays liver regeneration in mice. *Hepatology* 2004;39(2):386-92

**IF: 10,416**

Paragh G, Fóris G, Paragh G Jr, Seres I, Karányi Z, **Fülöp P**, Balogh Z, Kosztáczky B, Teichmann F, Kertai P. Different anticancer effects of fluvastatin on primary hepatocellular tumors and metastases in rats. *Cancer Lett* 2005; 222(1):17-22

**IF: 3,049**

Derdák Z, **Fülöp P**, Sabo E, Tavares R, Berthiaume EP, Resnick MB, Paragh G, Wands JR, Baffy G. Enhanced colon tumor induction in uncoupling protein-2 deficient mice is associated with NF-kappaB activation and oxidative stress. *Carcinogenesis* 2006; 27(5):956-961

**IF: 5,108**

Kosztáczky B, Fóris G, Seres I, Balogh Z, **Fülöp P**, Koncsos P, Paragh G. Neuropeptides induced a pronounced and statin-sensitive dysregulation of mevalone cycle in human monocytes of patients with hypercholesterolemia. *Neuropeptides* 2006; 40(5):309-316

**IF: 2,155**

Seres I, Fóris G, Varga Z, Kosztáczky B, Kassai A, Balogh Z, **Fülöp P**, Paragh G. The association between angiotensin II-induced free radical generation and membrane fluidity in neutrophils of patients with metabolic syndrome. *J Membr Biol* 2006; 214(1-2): 91-98

**IF: 2,112**

Audikovszky M, Pados G, Seres I, Harangi M, **Fülöp P**, Katona E, Illyés L, Winkler G, Katona ÉM, Paragh G. Orlistat increases serum paraoxonase activity in obese patients. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007; 17(4) 268-273

**IF: 1,482**

**Az in extenso közlemények összesített impakt faktora: 36, 307**

**Nemzetközi folyóiratban megjelent idézhető absztraktok:**

Seres I, Varga Z, Balogh Z, Harangi M, **Fülöp P**, Kakuk G, Paragh G. Paraoxonase activity and alpha-tocopherol levels in hypercholesterolemic patients. *European Atherosclerosis Society, 2000 EAS Workshop*, Istanbul, Turkey. *Atherosclerosis* 2000; 146(Suppl):35

**Fülöp P**, Resnick M, Wands JR, Baffy G. UCP2 affects fasting-induced steatosis and metabolic parameters in lean and obese mice. *Hepatology* 2002; 36:486A (AASLD President's Choice Poster)

**Fülöp P**, Resnick M, Wands JR, Baffy G. Fas-mediated liver injury in ob/ob mice is attenuated in the absence of uncoupling protein-2. *Gastroenterology* 2003; 124(4 Suppl 1):A757 (AGA Poster of Distinction)

Horimoto M, **Fülöp P**, Wands JR, Baffy G. Liver regeneration is delayed after partial hepatectomy in mice deficient for uncoupling protein-2. *Gastroenterology* 2003; 124(4 Suppl 1):A722

Monti NA, **Fülöp P**, Resnick M, Wands JR, Baffy G. Uncoupling protein-2 modulates crypt cell apoptosis rate in the colon of mice fed with high-fat diet. *Gastroenterology* 2003; 124(4 Suppl 1):A261

Horimoto M, Derdák Z, **Fülöp P**, Wands JR, Baffy G. Uncoupling protein-2 deficiency alters cell cycle protein expression in regenerating mouse liver. *Hepatology* 2003; 38:235A

Derdák Z, **Fülöp P**, Konkin A, Resnick A, Wands JR, Paragh G, Baffy G. Azoxymethane is more tumorigenic in the colon of UCP2-deficient mice. *Gastroenterology* 2005; 125(4 Suppl 1):A176

#### **Kongresszusi részvételek/előadások:**

Tóth A, **Fülöp P**, Csontos C, Gergely P, Erdődi F. Protein foszfatáz tisztítása és azonosítása típus-specifikus antitestekkel. *Magyar Biokémiai Társaság Molekuláris Biológiai Szakosztály I. Tudományos Ülése*, Seregélyes, 1996.

Katona E, Seres I, Balogh Z, **Fülöp P**, Kakuk G, Paragh G. Szérum paraoxonáz aktivitás változása krónikus vesebetegekben. *Magyar Atherosclerosis Társaság XII. Kongresszusa*, Sopron, 1998.

**Fülöp P**, Katona E, Seres I, Balogh Z, Harangi M, Paragh G. Szimvasztatin terápia hatása a szérum paraoxonáz aktivitására. *Magyar Atherosclerosis Társaság XII. Kongresszusa*, Sopron, 1998.

Katona E, Seres I, Balogh Z, **Fülöp P**, Kakuk G, Paragh G. Szérum paraoxonáz aktivitás változása hemodializált vesebetegekben. *SOTE Korányi Frigyes Szakkollégium III. Tudományos Fóruma*, Budapest, 1999. (elsődíjas előadás)

Seres I, Varga Z, Balogh Z, Harangi M, **Fülöp P**, Kakuk G, Paragh G. Szérum paraoxonáz aktivitás és az E-vitamin szintjének változása hemodializált betegekben. *Magyar Atherosclerosis Társaság XIII. Kongresszusa*, Sopron, 2000.

Baffy G, **Fülöp P**, Wands JR, Horimoto M. Modulation of oxidant production and cell cycle activity by uncoupling protein-2 in regenerating mouse liver. *XII Falk Liver Week*, Freiburg, Germany, 2003. (díjnyertes poszter)

**Fülöp P**, Derdák Z, Resnick M, Wands JR, Paragh G, Baffy G. A mitokondriális UCP2 hatása az éhezés-indukált steatosisra. *Magyar Atherosclerosis Társaság XV. Kongresszusa*, Sopron, 2004.

**Fülöp P**, Sheets A, Derdák Z, Resnick M, Paragh G, Wands JR, Baffy G. Studies on the effects of UCP2 on hepatic lipid metabolism in fasting. Uncoupling protein-2 hatása a máj lipid metabolizmusára éhezésben. *Magyar Szabadgyökkelkutató Társaság III. Kongresszusa*, Debrecen, 2005.

Derdák Z, **Fülöp P**, Konkin A, Resnick A, Wands JR, Baffy G. Enhanced colon tumor induction by azoxymethane in mice deficient for UCP2. *Uncoupling proteins: Current status and therapeutic prospects*, Madrid, Spain, 2005.