

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**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

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A nem-alkoholos zsírmáj

2.1.1. Epidemiológia

2.1.2. Aetiopathogenesis

2.1.3. A steatosis kialakulása

2.1.4. Progresszió, avagy a második ütés: steatosisból steatohepatitisbe

2.2. Az uncoupling protein-2 (UCP2)

2.2.1. Általános megfontolások

2.2.2. Az UCP2 és a mitokondriális ROS-termelés

2.2.3. Az UCP2 és az ATP-termelés

2.2.4. Az UCP2 és a zsírsav-metabolizmus

2.2.5. Az UCP2 és a steatosis

2.2.6. Az UCP2 és a steatohepatitis

2.2.7. A zsírmáj és a hepatocellularis carcinoma

2.3. A fluvastatin és a neoplasia

2.3.1. A statinok pleiotróp hatásai

2.3.2. A statinok és az izoprenoidok

2.3.3. A statinok hatása a daganatok képződésére

2.3.4. A fluvastatinról

3. MÓDSZEREK

3.1. Az egerek kezelése

3.2. Szöveti vizsgálatok

3.3. DNS fragmentációs vizsgálat

3.4. Biokémiai mérések

3.5. Western blot

3.6. Májperfúzió és sejtszeparáció

3.7. Laser capture microdissection (LCM)

3.8. Real-time PCR

3.9. A patkányok kezelése és a fluvastatin adagolási módszerei

3.10. Daganatindukció

3.11. A Gelaspon korongok előkészítése

3.12. Sebészeti módszerek

3.13. Statisztikai módszerek

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az UCP2 hiányának hatása a túlélésre

4.2. Transzamináz aktivitások

4.3. Szövettani eredmények H&E-festéssel

4.4. Fas-mediált májsejtelhalás

4.5. Fas-expresszió

4.6. A hepaticus ATP-raktárak változásai

4.7. Az oxidatív stressz változása

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

4.9. A tumorimplantáció optimális körülményeinek meghatározása

4.10. A fluvastatin hatása a tumorimplantációval azonos időben elkezdve

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

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

5. MEGBESZÉLÉS

6.1. ÖSSZEFOGLALÁS

6.2. SUMMARY

7. IRODALOMJEGYZÉK

8. SAJÁT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

9. TÁRGYSZAVAK, RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

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) klinikai jelentőségét az adja, hogy bár egyrészt jóindulatú, további progressziót nem mutató állapotot takar, másrészt az esetek egy jelentős részében a steatosist a későbbiekben steatohepatitis (non-alcoholic steatohepatitis, NASH), fibrosis és cirrhosis, valamint hepatocellularis carcinoma követheti.

A zsírmáj-betegség igen érzékenyen reagál mindazon állapotokra, melyek a hepatocellularis energia homeosztázist befolyásolják, ugyanakkor a betegség kialakulásában a reaktív oxigéngyökök (reactive oxygen species, ROS) fokozott termelése is alapvető. Elgondolkodtató, hogy mind az adenzin-trifoszfát (ATP), mind a reaktív oxigéngyökök termelésének egyik fontos szabályozója a mitokondrium belső membránjában elhelyezkedő uncoupling protein-2 (UCP2). Biológiai funkciói még mindig nem egészen tisztázottak, de feltételezhető, hogy a proton gradienst megcsapolva, azt az ATP-termeléstől szétválasztva a sejtek energiatermelésével versenyez. Emellett a légzési láncra nehezedő elektrokémiai gradienst befolyásolva a celluláris oxidatív stressz egyik fontos modulátora.

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. Bár a fehérje hatásával interferál a sejt ATP-termelésével, emellett a ROS-termelés negatív szabályozója is. A mitokondriális membránpotenciál csökkenése a reaktív oxigéngyökök termelését limitálja, így az UCP2 expressziójának fokozása potenciális terápiás eszközként merült fel a sejtek oxidatív stressz elleni védelmében. A zsírmájban megfigyelhető UCP2-szignál fokozódása egyrészt az ATP-termeléssel vetélkedve a szöveti ATP-szintek csökkenését okozhatja; másrészt az ROS-képződést gátolva az oxidatív stresszt képes limitálni. Ezáltal az UCP2-expresszió fokozódása egyrészt káros, másrészt jótékony hatású lehet a májszövetre nézve. Meglepő módon azonban, az UCP2 hiányának nincs laboratóriumi, vagy szövettani vizsgálatokkal detektálható hatása az UCP2-knockout egerekben létrehozott zsírmájra. Ez 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 akutan létrejövő májkárosodásra.

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 „jótékony 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^{+/+}* és *ob/ob:ucp2^{-/-}*) egerekben. Az antitest dózisfüggő módon Fas-receptoron keresztüli hepatocelluláris destrukciót és fulmináns májelhalást képes kiváltani. Megfigyeltük a különböző dózisú 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 sejttypusaiban az UCP2 regulációja.

Az obesitashoz rendkívül gyakran társul hyperlipidaemia, melynek kezelése a hosszútávú ischaemiás szövődmények elkerülése végett alapvető. A statinok jelenleg már széleskörben alkalmazott koleszterinszint-csökkentő gyógyszerek, melyek a koleszterin bioszintézis kulcsenzimjét, a 3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) reduktázt gátolják. A koleszterinszint csökkenésén kívül ún. pleiotróp hatásaik is vannak, melyek a sejtproliferációban résztvevő mevalonát metabolitok termelésének csökkentésén alapulnak: a statinok gátolják a sejtproliferációt és apoptosist indukálnak, bár még mindig csak korlátozottan áll rendelkezésre információ ezen gyógyszerek daganat- és áttétképződésre gyakorolt hatásáról. 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 és ismert a daganatnövekedést gátló hatása is bizonyos neoplasiákban. A gyógyszer májszelektív, metabolitjai így nem a vesén keresztül ürülnek, *in vivo* hatékony adagjai ráegcsálókban pedig a lovastatinhoz hasonlóak.

Célul tűztük ki a fentiek mellett, hogy a fluvastatin tumorelleses, daganatfejlődésre gyakorolt *in vivo* hatásait megvizsgáljuk, ezáltal igazolva a 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.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A nem-alkoholos zsírmáj

2.1.1. Epidemiológia

A nem-alkoholos zsírmáj a májbetegségek leggyakoribb formája a fejlett társadalmakban. A gyakran tünetmentesen zajló megbetegedés során a máj hisztológiai vizsgálata az alkoholos májbetegséghez hasonló eltéréseket mutat, de a betegek anamnézisében nem szerepel rendszeres alkoholfogyasztás (<40g hetente). A NAFLD klinikopathológiai fogalomként gyakorlatilag az egyszerű triglicerid lerakódástól, steatosistól a gyulladással kísért zsírmájon keresztül egészen a fibrosisig, cirrhosisig, végső esetként hepatocellularis carcinomáig (HCC) terjed (*Neuschwander-Tetri BA, Caldwell S. Hepatology 2003;37:1202-1219*).

Jelentőségét gyakorisága és a gyakran tünetmentesen kialakuló súlyos, végstádiumú fibroticus májbetegség (cryptogen cirrhosis), hepatocellularis carcinoma adja. A kóros májfunkciós tesztek leggyakoribb oka az USA-ban a zsírmáj (*Clark JM, et al. Am J Gastroenterol 2003;98:960-967* és *Angulo P. N Engl J Med 2002;346:1221-1231*), ezáltal mintegy 30 millióan érintettek csak ebben az országban. A nem-alkoholos zsírmáj a népesség 10-24%-ánál, míg a NASH a népesség körülbelül 2-3%-ánál fordul elő (*Angulo P. N Engl J Med 2002;346:1221-1231* és *Falck-Ytter Y, et al. Semin Liver Dis 2001; 21:17-26*). Gyakran véletlenszerűen, mellékletként derül rá fény, jellemzően középkorú nők érintettek gyakrabban, ám a gyermekek mintegy 2,6%-ánál is megfigyelhető (*Tominaga K, et al. Dig Dis Sci 1995; 40:2002-2009*). A betegség lefolyásában etnikai különbségek is megfigyelhetőek: A fehérekkel vagy színesbőrűekkel összehasonlítva, a latin népesség

körében gyakrabban megy át cirrhosisba. Szemben a latinokkal, a feketék valószínűleg kisebb rizikóval bírnak a NASH és a végstádiumú májbetegség kialakulását tekintve (*Browning JD, et al. Am J Gastroenterol 2004; 99:292-298 és Caldwell SH, et al. Am J Gastroenterol 2002; 97:1496-1500*).

2.1.2. Aetiopathogenesis

A zsírmáj gyakorlatilag kóros zsírfelhalmozódás a májban. A szerv zsírtartalma normálisan 5% alatt van. Steatosis esetén ez az arány nagyobb, a lipidtartalom a máj tömegének akár 50%-át is kiteheti. Főleg a neutrális zsírok (trigliceridek) mennyisége nő meg; a többletzsír főként a hepatocytákban, valamint az ún. zsírtároló sejtekben (Ito-sejtekben, másnéven: hepatic stellate cell - HSC) akkumulálódik. Szövettanilag az elzsírosodás lehet nagycseppes (macrovesicularis), vagy kiscseppes (microvesicularis). A fokozott zsírfelhalmozódás mechanizmusában több faktor és ezek kombinációja játszhat szerepet:

1. Nagymennyiségű zsír áramlik be a májba vér, vagy nyirok útján (pl. fogyás, túltáplálás esetén).
2. A zsírsavoxidáció és -felhasználás csökken a májban, vagy nem tart lépést a kínálattal (pl. az alkohol gátolja a zsírsavak béta-oxidációját).
3. Fokozódik a májban a zsírsavak szintézise.
4. Csökken a very low density lipoprotein (VLDL, a májból történő triglicerid-kiáramlás jellemző fehérjéje) kiválasztása.

A májban történő excesszív lipidlerakódással több tényező, így különböző gyógyszerek, étrendi tényezők és az anyagcsere számos genetikai zavara összefüggésbe hozható, mégis a leggyakoribb tényezőként az inzulinrezisztenciát nevezhetjük meg (*Angulo P. N Engl J Med 2002; 346:1221-1231*). Ekként, a nem-alkoholos zsírmáj a metabolikus

szindróma részjelensége (*Marchesini G, et al. Diabetes 2001; 50:1844-1850*). Így gyakrabban találkozunk NAFLD kialakulásával elhízásban, 2-es típusú diabetesben, hyperlipidaemiában. Fentiek alapján a nem-alkoholos zsírmáj olyan anyagcsere-betegségek hepaticus megjelenési formája, melyekre az obesitas, hyperinsulinaemia, inzulinrezisztencia (későbbiekben diabetes mellitus), illetve hypertriglyceridaemia jellemző. Az elhízottak 30-100%-ában, a 2-es típusú diabeteses betegek 10-75%-ánál, míg a hyperlipidaemiások 20-92%-ában figyelhető meg a NAFLD (*Angulo P. N Engl J Med 2002; 346:1221-1231*). A legtöbb betegnél tisztán macrovesicularis steatosis figyelhető meg, melyet egyáltalán nem, vagy csak minimálisan kísérnek tünetek, és a betegség sem mutat észrevehető progressziót (*Brunt EM. Semin Liver Dis 2001; 21:3-16*). Következésképpen, a NAFLD ezen stádiumát gyakran nem is tartják betegségnek, pedig körülbelül ezen betegek 20-30%-a a betegség következő, gyulladással kísért stádiumába (NASH) progrediál, melyet gyakoribb panaszok, laboratóriumi eltérések, szövettani elváltozások kísérnek. A steatohepatitises betegek mintegy 15-20%-ában figyelhető meg további progresszió, mely cirrhosishoz, végül hepatocellularis carcinomához vezet (*McCullough AJ, et al. Clin Liver Dis 2004; 8:521-533* és *Marrero JA, et al. Hepatology 2002; 36:1349-1354*).

Általánosságban elmondható, hogy steatosishoz elsősorban táplálkozási tényezők (alkoholizmus, elhízás, protein-energia malnutritio, totalis parenteralis táplálás, jejunoilealis bypass), anyagcserebetegségek (diabetes mellitus, hyperlipidaemia, jóval ritkábban abetalipoproteinaemia, Wilson-kór, galactosaemia, glycogenosis, tyrosinaemia) vezetnek, de megemlítendő bizonyos toxikus ártalmak (kortikoszteroidok, ösztrogének, tamoxifen, amiodaron, direkt hepatotoxinok: szén-tetraklorid, sárgafoszfor) és a krónikus hepatitis C vírus (HCV) infekció szerepe is. A steatosis súlyossága arányos az alkohol mennyiségével és a fogyás időtartamával. Az obesitas során kialakuló zsírmáj a testsúly csökkentésével javul, de a hirtelen nagy fogyás, a máj zsírsavmetabolizáló képességének túltelítésével rontja

a zsírmáját. Fehérje-energia malnutritioval a világ éhező részein és táplálkozási zavarok kialakulása során kell számolni. A parenteralis táplálás megfelelő vitaminbevitel mellett is okozhat zsírmáját, mely gyakran cholestasissal jár. Az anaerobok felszaporodásával járó megváltozott bélflóra fokozott endotoxin- és litokólsav-terhelés szintén károsítja a májat. A 2-es típusú diabetesesek között elsősorban ez elhízottak veszélyeztetettek, a hyperlipidaemiások véréből a májba beáramló nagy mennyiségű triglicerid a hepatocytákban nagy mennyiségben rakódik le. A kortikoszteroidok nem csak gyógyszerként adva, hanem Cushing-kórban is okozhatják a máj elzsírosodását. Akut zsírmáj direkt hepatotoxinok hatására általában májelégtelenség tüneteivel együtt jelentkezik, míg az infekciók közül a krónikus HCV-fertőzés nemritkán okoz zsírmáját.

A NASH pontos pathogenesisise csak részleteiben ismert. Jelenlegi ismereteink szerint a betegség kialakulásában fontos szerepe van a májban zajló lipidperoxidációnak, az 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 (*Day CP, James OF. Gastroenterology 1998; 114:842-845*). Az elgondolás alapján az első lépés a hepatocyták cytoplasmájában történő lipiddepozíció, mely az inzulinrezisztencia kialakulását kíséri. Az utóbbi elváltozás rutinszerűen megfigyelhető obesitasban, 2-es típusú diabetesben, hyperlipidaemiában egyaránt. A mitokondriumokban zajló β -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.

2.1.3. A steatosis kialakulása

Az obesitas kövekeztében kialakuló inzulinrezisztenciát hyperinsulinaemia, a máj fokozott glükóztermelése és csökkent felhasználása jellemzi. Az adipocytákban az

inzulinrezisztencia következtében fokozódik a hormonszenzitív lipáz (HSL) aktivitása, mely a lipolysis mértékének emelésével elősegíti a fokozott szabadzsírsav (free fatty acid, FFA) beáramlást a májba (*Lewis GF, et al. Endocr Rev 2002; 23:201-229*). A hepaticus zsírsavfelvételi ráta nem szabályozott, ennek következtében proporcionálisan követi a plazma FFA-koncentrációját (*Wahren J, et al. J Clin Invest 1984; 73:1367-1376*). Obesitasban jelentősen fokozódik a keringő szabad zsírsavak mennyisége. A felvett zsírsavak egyrészt a mitokondriumokban oxidálódva ATP-termelésre használódhatnak fel. Másrészt, trigliceriddé észterifikálódva raktározódhatnak a májban, vagy a VLDL-képződésben, annak szekréciójában vehetnek részt. Az inzulin és a glükóz egymástól függetlenül szabályozza a *de novo* zsírsavszintézist. A hyperinsulinaemia a májban a sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) expresszióját fokozva az összes lipogenetikus enzim (így az ATP-citrát-liáz: ACL, acetyl-CoA karboxiláz: ACC, zsírsav-szintetáz: FAS, sztearil-CoA deszaturáz: SCD, hosszúláncú zsírsav-elongáz: LCE) aktivitását fokozza (*Horton JD, et al. J Clin Invest 2002; 109:1125-1131* és *Horton JD, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100:12027-12032*). Ezzel egyidőben a hyperglycaemia a carbohydrate response element binding protein (ChREBP) expressziójának fokozásán keresztül a máj glikolízisben résztvevő kulcsenzime, a piruvátkináz (liver-type pyruvate kinase, L-PK) aktivitását fokozza; és szintén a lipogenetikus hatású enzimeket aktiválja (*Iizuka K, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101:7281-7286*). A SREBP-1c és a ChREBP szinergikus hatása egyértelműen a glükóztöbblet zsírsavakká történő átalakítása irányában hat. A harmadik, a zsírmáj kialakulásában résztvevő transzkripciós faktor – rágcsálókban – a peroxisome proliferator activator receptor- γ (PPAR γ). Az egészséges májban normálisan igen alacsony mennyiségben expresszálandó PPAR γ szignálja az inzulinrezisztenciával, steatosissal járó állatmodellekben markánsan emelkedik és a SREBP-1c is képes transzkripcionálisan aktiválni (*Kim JB, et al. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:4333-4337*). Ugyanakkor, a hepaticus PPAR γ genetikus deléciója

jelentősen csökkenti a zsírmáj progresszióját leptindeficiens *ob/ob* egerekben, függetlenül a hyperinsulinaemia, vagy hyperglycaemia jelenlététől (*Matsusue K, et al. J Clin Invest 2003; 111:737-747*), bár annak mechanizmusa, hogy a PPAR γ miként segíti elő májban történő triglicerid depozíciót, még nem teljesen tisztázott.

A fokozott zsírsavszintézis következményeként fokozódik a malonil-CoA produkciója, mely a karnitil-palmitoil transzferáz-1 (CPT-1) aktivitását, így a mitokondriumba történő zsírsavfelvételt gátolja. Ennek következtében, mind a nagy mennyiségben beáramló, mind pedig az újonnan képződött zsírsavak elsődlegesen trigliceridekké észterifikálódnak, és csökken az amúgy is túlterhelt mitokondriális β -oxidáció sebessége.

2.1.4. Progresszió, avagy a második „csapás”: steatosisból steatohepatitisbe

Egyértelmű, hogy a zsírmáj kialakulása előfeltétele a NASH-hez vezető későbbi eseményeknek. Annak ellenére, hogy a nem-alkoholos zsírmáj gyakori elváltozás, valamint potenciálisan végstádiumú májbetegség és carcinoma kialakulásának lehetőségét rejti magában, azok a háttérben rejlő pontos etiológiai faktorok, melyek a meghatározzák a betegség progresszióját, továbbra sem teljesen tisztázottak. Egyrészt nincs olyan kísérletes állatmodell, mely a humán steatohepatitis összes vonását magán hordozná. Másrészt a humán máj noninvazív vizsgálati módszerei limitáltak, harmadrészt a humán NASH egyértelmű diagnosztizálásához szükséges májbiopszia invazivitása, lehetséges szövődményei eleve kizárják a nagy, populációsintű vizsgálatokat. Fentiek alapján jelenlegi ismereteink jórészt az állatmodellekből származnak.

A NASH szövettanilag nem különbözik az alkoholos steatohepatitistól, és számos faktor közös a két betegségben. Ezek a tényezők alapvetően két csoportra oszthatók:

- az oxidatív stresszt és mitokondrium funkciózavart okozók,
- proinflammatorikus citokinek expresszióját fokozók.

Az oxidatív stressz a prooxidáns és antioxidáns tényezők közötti egyensúly eltolódása következtében jön létre (*Robertson G, et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2001; 281: G1135-G1139*). A zsírmájban dominálón szinglet oxigén, szuperoxid-anion, hidrogén-peroxid és hidroxiradikálok alkotják a reaktív oxigéngyököket. A zsírsavoxidáció, bárhol is menjen végbe a sejtben, a ROS-termelés jelentős tényezője: a mitokondriális β -oxidáció a légzési láncon keresztül, a peroxiszómális β -oxidáció az acil-CoA oxidázon (AOX) keresztül, a mikroszómális ω -oxidáció pedig a citokróm P450 enzimrendszer (CYP2E1, 4A10, 4A14) tagjai segítségével járul hozzá az oxidatív stresszhez (*Lieber CS. Hepatol Res 2004; 28:1-11* és *Mannaerts GP, et al. Cell Biochem Biophys 2000; 32:73-87* és *Garcia-Ruiz C, et al. Mol Pharmacol 1995; 48:825-834*). A többszörösen telítetlen zsírsavak (polyunsaturated fatty acid, PUFA) rendkívül érzékenyek a ROS által generált lipidperoxidációra, melynek következtében különböző aldehidek, így hidroxinonenal (HNE) és malondialdehid (MDA) keletkeznek. Ezek önmagukban is toxikusak és a 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 (*Robertson G, et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2001; 281: G1135-G1139* és *Bergamini CM, et al. Curr Pharm Des 2004; 10:1611-1626*). A ROS és lipidperoxidációs termékek fibrosishoz vezethetnek a kollagéntermelő HSC-k aktivációján keresztül. A humán NASH-ben is megfigyelhető a lipidperoxidációs termékek emelkedett szintje (*Seki S, et al. J Hepatol 2002; 37:56-62*).

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 (*Pérez-Carreras M, et al. Hepatology 2003; 38:999-1007*), valamint ATP-deplécióra utalnak (*Cortez-Pinto H, et al. Gastroenterology 1999; 116:1184-1193*). Ha az elektronáramlás megakad, vagy lelassul az ETC valamelyik pontján, akkor a lánc megelőző tagjai az elektronokat közvetlenül a molekuláris oxigénre képesek átadni, így szuperoxid-aniont, vagy hidrogénperoxidot produkálva (*Garcia-Ruiz C, et al. Mol Pharmacol 1995; 48:825-834*) és *Hensley K, et al. Carcinogenesis 2000; 21:983-989*). Ahogy a mitokondriumok oxidatív kapacitása zavart szenved, a citoszolikus zsírsavak felhalmozódnak. A zsírsav-oxidáció alternatív (peroxiszómális és mikroszómális) útvonalai aktiválódhatnak, ezzel is tovább fokozva az ROS-termelést (*Berson A, et al. Gastroenterology 1998; 114:764-774* és *Johnson EF, et al. FASEB J 1996; 10:1241-1248* és *Kersten S, et al. J Clin Invest 1999; 103:1489-1498*).

A reaktív oxigéngyökök a fent említett helyi hatások mellett a PUFA-károsítás következtében aldehid termékeket, HNE-t és MDA-t produkálnak. Ezek a molekulák hosszabb féléletidejüknel fogva távolabbi hatásokat képesek létrehozni, mint az egyszerű reaktív oxigéngyökök. A mitokondriális membrán zsírsavait támadva tovább rontják az ETC működését, valamint az ApoB molekula proteolízisét elősegítve gátolják rágcsálókban a VLDL-szekréciót (*Pan M, et al. J Clin Invest 2004; 113:1277-1287*), ezáltal hozzájárulva a májban történő triglicerid akkumulációhoz.

Obes rágcsálókon végzett kísérletekből ismert, hogy a steatosist krónikus gyulladás kíséri a májban, melyeket a hepaticus NF- κ B (nuclear factor kappa-B) fokozott aktivitása jellemez (*Cai D, et al. Nat Med 2005; 11:183-190* és *Arkan MC, et al. Nat Med 2005; 11:191-198*). Az NF- κ B a TNF- α , IL-6, IL-1 β szintjének emelésén keresztül a Kupffer-sejteket aktiválja. A citokinek a NASH összes jellemzőjének létrejöttében részt vesznek: a hepatocytá necrosisban és apoptosisban (TNF- α /TGF- β), neutrofil kemotaxisban (IL-8), a HSC-aktivációban (TNF- α /TGF- β) és a Mallory-testek kialakulásában (TGF- β). Emellett

humán kísérletes adatok bizonyították, hogy a NASH-ben szenvedő obes egyének májában szignifikánsan magasabb a citokinek génexpressziója azon elhízott egyénekhez viszonyítva, akiknek egészséges a májuk, emellett a génexpresszió a szövettani súlyossággal is korrelált (*Crespo J, et al. Hepatology 2001; 34:1158-1163*).

2.2. Az uncoupling protein-2 (UCP2)

2.2.1. Általános megfontolások

Az uncoupling (szétkapcsolás; a mitokondrium belső membránja körül felépülő proton gradiens és az ATP-termelés szétválasztása) már régóta csábító területe az obesitas kezelésének. A dinitrofenolt, mely hatékony szétkapcsoló ágens, az 1930-as években próbálták ki elhízás elleni szerként, bár súlyos mellékhatásai miatt később felhagytak vele. 1961-ben közölte Peter Mitchell azóta mérföldkövé vált kemiozmotikus elméletét, mely az oxidatív foszforiláció és a mitokondriális energiatermelés kérdésével foglalkozott (*Mitchell P. Naturwissenschaften 1961; 191:141-148*). A glükóz és a zsírsavak égetéséből származó redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) és szukcinát által leadott elektronok végighaladnak az elektron transzport láncon, míg végül a molekuláris oxigént vízzé redukálják a citokróm c oxidáz (komplex IV) segítségével. Az elektronok végighaladása során felszabaduló energia a protonok mitokondriális mátrixból az intermembrán térbe irányuló transzlokációjára használódik fel. Az így létrejövő elektrokémiai gradiens (egyéb nevein: proton-motive force, back pressure, mitokondriális membrángradiens, $\Delta\Psi_m$) következtében létrejövő proton visszaáramlás az ATP-szintetázon keresztül energiatermelésre használódik fel.

Ismert, hogy az oxidatív foszforiláció sohasem 100%-os hatásfokú, azaz az elhasznált oxigén egy része – a protonok visszacsorgása következtében – nem használdik fel ATP-termelésre, és hőenergia formájában felszabadul (*Brand MD, et al. Int J Obes Relat Metab Disord 1999; 23 Suppl 6:S4-S11*). A protoncsorgás a mitokondriális belső membrán sajátosságai mellett (bazális proton konduktancia) speciális karrier proteinek működéséből adódik (indukálható proton konduktancia) (*Stuart JA, et al. Biochim Biophys Acta 2001; 1504:144-158*). 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 (*Klingenberg M. J Bioenerg Biomembr 1999; 31:419-430*).

1997-ben két, egymástól függetlenül dolgozó munkacsoport klónozte az UCP2-t (*Fleury C, et al. Nat Genet 1997; 15:269-272* és *Gimeno RE, et al. Diabetes 1997; 46:900-906*). Az UCP3-at majdnem ezzel egyidejűleg fedezték fel, majd rövidesen további két tagja is ismertté vált a mitokondriális anion karrier fehérjéknek (*Bouillaud F, et al. Biochim Biophys Acta 2001; 1504:107-119*). Fleury és Gimeno fent említett, a fehérjét először leíró munkáiból ismert, hogy az *ucp2* 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 α -helixet tartalmaz, melyek a mitokondrium belső membránjába ágyazottak, ahol a fehérje homodimerként funkcionál (*Fleury C, et al. Int J Biochem Cell Biol 1999; 31:1261-1278*).

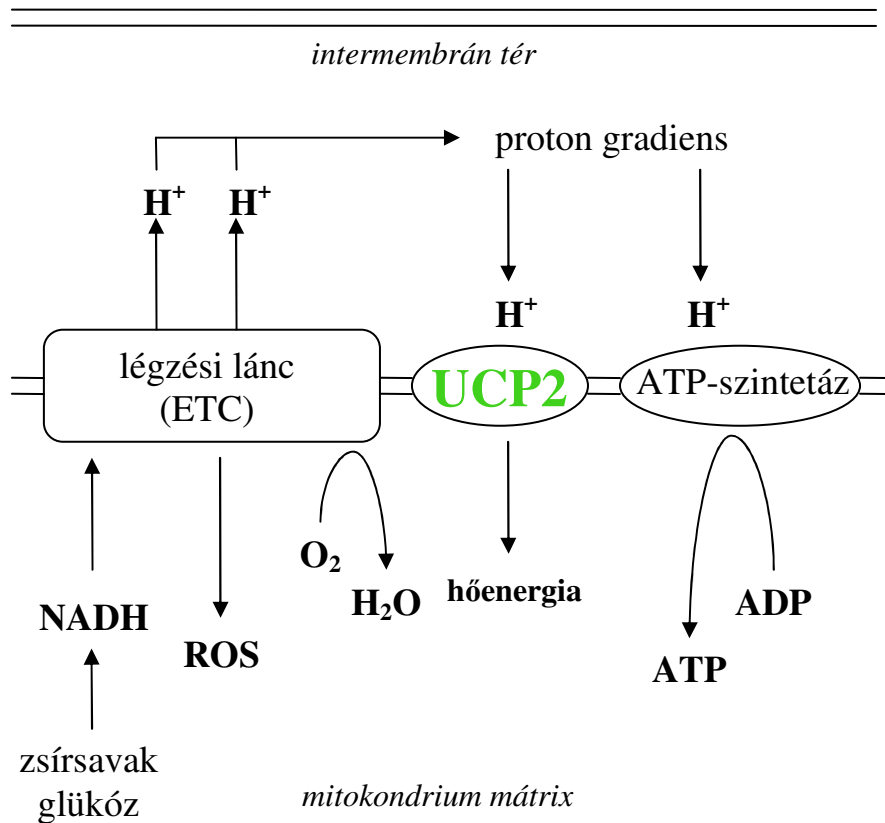
A fentebb részletezett homológia alapján azt várhatnánk, hogy az UCP2 jelentős szerepet játszik a thermogenesis szabályozásában. Azonban az UCP2 által mediált protoncsorgás fiziológiás szerepe a mai napig vita tárgya: élesztőkben például csak

nagyságrenddel az élettani koncentrációt meghaladóan indukál protoncsorgást, valamint az emlősökben megfigyelt bazális konduktanciáért önmagában biztosan nem tehető felelőssé (Stuart JA, et al. *J Biol Chem* 2001; 276:18633-18639). Az UCP1 az egyetlen eddig ismert szétkapcsoló fehérje, melyről egyértelműen bizonyított, hogy fiziológias koncentrációkban is hozzájárul a proton konduktancia változásához. Mennyisége a barna zsírszövetben az összes mitokondriális fehérje akár 5%-át is elérheti. Az UCP2 különböző mennyiségben gyakorlatilag az összes szövetben detektálható, ugyanakkor expressziója egy-két nagyságrenddel kisebb, mint az UCP1-é a barna zsírszövetben (Jezek P, et al. *Physiol Res* 2004; 53 Suppl 1:S199-S211). 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 (Zhang C, et al. *Cell* 2001; 105:745-755).

A fehérjét először leíró munkák az UCP2 mRNS-ét számos szövetben detektálták. A későbbiekben az expresszió mértékét különösen magasnak találták az immunrendszer sejtjeiben, szöveteiben, így a thymusban, lépben és a makrofágokban (Larrouy D, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 235:760-764 és Pecqueur C, et al. *J Biol Chem* 2001; 276:8705-8712 és Bechmann I, et al. *Biochem Pharmacol* 2002; 64:363-367). Felismerték, hogy az UCP2 mRNS és fehérje szintje nem mindig korrelál, így a transzlációs reguláció jelentős lehet (Pecqueur C, et al. *J Biol Chem* 2001; 276:8705-8712). 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 (Larrouy D, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 235:760-764).

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 ágyazva

2.2.2. Az UCP2 és a mitokondriális ROS-termelés

Jelenleg ezt tartják a legfontosabbnak a fehérje funkciói közül. A proton gradiens a fentebb leírt módon, a glükóz- és zsírsavkatabolizmus redukált szubsztátjainak az ETC által való oxidálása során jön létre, ezáltal biztosítva az ATP-szintetáz működését. Bármilyen egyensúlyeltolódás a gradiens felépítése és az ATP szintézise között a $\Delta\Psi_m$ növekedését eredményezi: amennyiben túl sok szubsztát áll rendelkezésre (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 elektron transzport lánc sebessége lelassul. Az elektronok torlódása a szuperoxid-anionok keletkezésének kedvez, mivel megnő azon mobil elektronkarrierek féléletideje, melyek az oxigén parciális redukcióját, és szuperoxid-termelést hoznak létre (*Skulachev VP. Biochim Biophys Acta 1998; 1363:100-124*). Fentieket alapul véve az UCP2 által szabályozott 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 ROS-termelésben játszott szerepét több megfigyelés is alátámasztja. Arsenijevic és mtsai írták le, hogy UCP2-KO egerek peritoneális makrofágjainak szabadgyök-termelése és így a mikrobák elleni védekezőképessége megnő, és rezisztenssé válnak *Toxoplasma* fertőzéssel szemben (*Arsenijevic D, et al. Nat Genet 2000; 26:435-439*). UCP2-t „túlexpresszáló” corticalis neuronok és UCP2-transzgen egerek agyszövege, az egyebekben sejthalált előidéző glükóz- és oxigénmegvonással szemben ellenállóbbá vált (*Mattiasson G, et al. Nat Med 2003; 9:1062-1068*). Munkacsoportunk írta le partialis hepatectomia után regenerálódó UCP2-knockout egerek májában a reaktív oxigényökök emelkedett voltát, mely hozzájárul az elhúzódo regenerációhoz (*Horimoto M, et al. Hepatology 2004; 39:386-392*). 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 (*Echtay KS, et al. Nature 2002; 415:96-99*).

2.2.3. Az UCP2 és az ATP-termelés

A fehérje ezen funkciójához nem szükséges, hogy az UCP2 mint kizárólagos protonkarrier hasson, hiszen az UCP2 szállíthat bármely más molekulát is a belső membránon

keresztül, és így is képes vetélkedni az ATP-termeléssel. 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 β -sejtjeinek inzulintermelését az UCP2 aktivitása negatívan befolyásolja. Ennek a folyamatnak potenciális jelentőségét inzulinrezisztens diabetesben igazolták Zhang és mtsai, miszerint az inzulinrezisztencia és a másodlagos hyperglycaemia fokozott inzulin-elválasztást igényelne, amely azonban a β -sejtek megnövekedett UCP2-expressziója miatt inadekvát marad (*Zhang C, et al. Cell 2001; 105:745-755*).

2.2.4. Az UCP2 és a zsírsav-metabolizmus

A protontranszport mechanizmusa részleteiben még nem tisztázott, de kétségtelen, a szabad zsírsavak emelkedésével járó állapotok, így a magas zsírtartalmú diéta, illetve az obesitas, az UCP2 szignál szignifikáns emelkedését okozzák egerek fehér zsírszövetében (*Fleury C, et al. Nat Genet 1997; 15:269-272* és *Gimeno RE, et al. Diabetes 1997; 46:900-906*). Állatkísérletes adatok alapján a hepatocytákban az UCP2 expressziója rendkívül alacsony, ám a plazma FFA-emelkedésével járó állapotokban, illetve steatosisban szignifikánsan emelkedik (*Chavin KD, et al. J Biol Chem 1999; 274:5692-5700* és *Baffy G, et al. Hepatology 2002; 35:753-761*); mely megerősíti azon feltételezést, hogy az UCP2 szerepet játszik a zsírmáj-betegség pathogenesisében. *Ob/ob* egerek májában az UCP2-szignál (mRNS és fehérje) szignifikánsan magasabb a sovány állatokhoz viszonyítva (*Chavin KD, et al. J Biol Chem 1999; 274:5692-5700*).

A különböző zsírsavak eltérően hatnak az UCP2 expressziójára. Patkány hepatocytákban a többszörösen telítetlen zsírsavak szignifikánsan jobban emelték az UCP2 mRNS expresszióját, mint az olajsav (egyszeresen telítetlen zsírsav), míg a palmitátnak

(telített zsírsav) gyakorlatilag nem volt hatása. Mindezek alapján valószínűleg a zsírsavak által regulált transzkripciós faktorok és az *ucp2* gén komplex interakciójával van dolgunk. A fenti munka alapján a PPAR-családnak feltételezhetően szerepe van a szabályozásban (Armstrong MB, et al. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 281:E1197-E1204). A PPAR α a hepaticus zsírsav-oxidációt és ketogenezist serkenti, a PPAR γ az adipocyták differenciálódását szabályozza, míg a PPAR δ a koleszterin-anyagcserében és szintén a zsírsav-oxidációban involvált (Kersten S, et al. *Nature* 2000; 405:421-424).

Ismert, hogy az UCP1 által katalizált proton konduktancia szorosan szabályozott: purin nukleotidok gátolják, mely gátlást a zsírsavak felülvezérlik, amikor a hidegre adott válaszként az adrenerg beidegzés következtében az intracelluláris triglicerid raktárakból FFA áramlik ki (Brand MD, Esteves TC. *Cell Metabolism* 2005; 2:85-93). Jelenleg széles körben elfogadott, hogy aktiváció nélkül az UCP2 nem működik proton transzporterként (Echtay KS, et al. *Nature* 2002; 415:96-99). Ugyanakkor az is elfogadást nyert, hogy az UCP2, UCP3, madár- és növény-UCP-k is specifikus aktiváló molekulák jelenlétében proton karriereként működnek és fokozzák a konduktanciát a mitokondriumokban (Considine MJ, et al. *J Biol Chem* 2003; 278:22298-22302 és Brand MD, et al. *Free Radic Biol Med* 2004; 37:755-767). Echtay munkáiból ismert, hogy az aktivációban zsírsavak és lipid-peroxidok is részt vesznek valószínűleg úgy, hogy áttörik a purin nukleotidok gátló hatását (Echtay KS, et al. *Nature* 2002; 415:96-99 és *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:1416-1421, valamint *EMBO J* 2003; 22:4103-4110).

2.2.5. Az UCP2 és a steatosis

Az UCP2 karriereként képes részt venni a zsírsavak transzportjában is. Bizonyos feltételezések szerint magának a protonnak a transzportja is a zsírsavak segítségével történik. Eme, ún. „flip-flop” modell szerint a zsírsavak protonálódva szabadon bejutnak a

mitokondrium mátrixba (flip), ahol a mátrix acil-CoA szintetáz hiánya miatt felhalmozódnak és deprotonálódnak. Az UCP2 a zsírsav-anionokat exportálva (flop) ezáltal nettó eredményként proton influxot katalizál. Mivel nemcsak zsírsavak, hanem zsírsav-peroxidok is szállíthatódnak ilyen úton, ezáltal a hepatocellularis lipotoxicitástól védi a májat (*Goglia F, Skulachev VP. FASEB J 2003; 17:1585-1591*). 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.

2.2.6. Az UCP2 és a steatohepatitis

Bár az UCP2 számos szövetben kimutatható, ez nem feltétlenül jelenti azt, hogy a fehérje funkcionálisan is jelen van mindezen szövetekben. Nem kétséges, hogy funkcionálisan aktív az UCP2 pl. a lépben, vagy a thymusban és immunsejtekben (makrofágok, limfociták). Felmerül annak a lehetősége is, hogy sok szövetben, ahol az UCP2 mRNS és fehérje azonosítható, a szignál annak tudható be, hogy az immunrendszer sejtjei szinte mindenhová eljutnak a szervezetben. Ez látszik igazolódni a máj esetében. Az egészséges máj UCP2 expresszióját sikerült a Kupffer-sejtekbe lokalizálni, míg a parenchymás sejtek UCP2 szignálja alig detektálható (*Larrouy et al, Biochem Biophys Res Commun 1998, 235:760-764*). Ugyanakkor zsírmáj-betegségben az UCP2 expressziója jelentősen fokozódik a parenchymás májsejtekben (*Chavin KD, et al. J Biol Chem 1999; 274:5692-5700* és *Rashid A, et al. Hepatology 1999; 29:1131-1138* és *Baffy G, et al. Hepatology 2002; 35:753-761*).

A májban felhalmozódó lipidek nem semlegesek, így a kialakuló zsírmáj lényegesen sebezhetőbbé válik, mely a második „csapásnak” készíti elő a talajt. Az előző fejezetekben taglaltak szerint, amennyiben nagy mennyiségű zsírsav jut be a mitokondriumokba, a légzési lánc lelassulása a reaktív oxigénradikálok kialakulásának kedvez, emellett a β -oxidáció fluxusa

is csökken. Utóbbi következtében a belépő alternatív zsírsavoxidációs utak tovább fokozzák az oxidatív stresszt. Emellett egyéb folyamatok is rontják a mitokondriumok működését: így a toxikus dikarboxilsavak felhalmozódása a mikroszómális ω -oxidáció által (*Tonsgard JH, et al. J Clin Invest 1985; 76:816-825*), vagy a direkt oxidatív mitokondriális DNS-károsodás következtében, mely utóbbi jelentős részben kódolja az elektrontranszport-lánc tagjait. NASH-betegek májában az összes ETC-tag komplex – beleértve a csak nukleárisan kódolt II-es komplexet – aktivitása csökkent (*Pérez-Carreras M, et al. Hepatology 2003; 38:999-1007*). A steatohepatitisben sejtmorfológiai változások is ismertek: így a megamitokondriumok, inclusiós testek kialakulása és a mitokondriális cristák elvesztése is jellemző a nem-alkoholos steatohepatitisre (*Sanyal AJ, et al. Gastroenterology 2001; 120:1183-1192* és *Caldwell SH, et al. J Hepatol 1999; 31:430-434*).

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 ráécsálók zsírmájában a fehérje fokozott expressziója ellenére az oxidatív stressz jelentős (*Yang S, et al. Arch Biochem Biophys 2000; 378:259-268* és *Soltys K, et al. Hepatology 2000; 34:13-18*). 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 (*Park JW, et al. J Gastroenterol Hepatol 2007; 22:491-497*). 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.

Az egészséges májban az UCP2 expressziója dominálón a Kupffer-sejtekbe lokalizált, ugyanakkor ez az eloszlás bizonyos állapotokban megváltozik. Például a fehérje kifejeződésének csökkenését és a ROS-termelés fokozódását figyelték meg *ob/ob* egerek peritoneális makrofágjaiban, míg sovány egerekből nyert makrofágokban hasonló változások voltak detektálhatók endotoxin hatására (Lee FY, et al. *Am J Physiol* 1999; 276:C386-394). Ezek a megfigyelések arra irányították a figyelmet, hogy zsírmáj-betegség során a hepatocytákban megfigyelhető nagyfokú UCP2-expresszió fokozódást párhuzamos expresszió csökkenés kísérheti a makrofágokban, és rokon sejtjeikben, a Kupffer-sejtekben. Non-parenchymás sejtekben az UCP2 mRNS szintje csökkent, ezzel párhuzamosan a parenchymás májsejtek UCP2 szignálja fokozódott fibrát, vagy halolaj hatására patkányokban (Nakatani T, et al. *J Biol Chem* 2002; 277:9562-9569). 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 észlelhető csökkent fehérjeexpresszióval, mintsem a hepatocytákban bekövetkező szignálfokozódással magyarázható. A fenti negatív szabályozás, mely a makrofágokban kimutatható, eddig csak az endotoxinra adott válaszban nyert bizonyítást. Spekulációk léteznek arra vonatkozóan, hogy a fehérje 2-es exonjába lokalizált, egy feltehetőleg 36 aminosavból álló fehérjét kódoló uORF (upstream Open Reading Frame) szakasz (Pecqueur C, et al. *J Biol Chem* 2001; 276:8705-8712), vagy a 2-es intronban leírt enhancer element megszakadása (Kizaki T, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:9392-9397) okozhatja a jelenséget.

Az UCP2-expresszió fokozódása az ATP-szintézissel interferálhat a zsírral telt májsejtekben. Bár az elhízás embereknél önmagában nem befolyásolja a hepaticus ATP-raktárakat (Nair S, et al. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:446-470), az ATP homeosztázis zavara zsírmájban bizonyított: graft elégtelenség gyakrabban következik be zsírmáj-betegségben szenvedő donorok részvételével történt májtranszplantáció után (Clavien PA, Selzner M. *Liver*

Transpl 2002; 8:980), biopsziával igazolt NASH-ben fruktóz adása után az ATP-raktárak visszaállítása lassul a BMI növekedésével (*Cortez-Pinto H, et al. JAMA* 1999; 282:1659-1664). Patkányokban a kolinszegény diéta hatására létrejövő steatosisban csökken a máj ATP-tartalma, mely tovább redukálódik éheztetés – és így a zsírmáj-betegség progressziója – hatására (*Vendemiale G, et al. Hepatology* 2001; 33:808-815).

2.2.7. A zsírmáj és a hepatocellularis carcinoma

Cryptogen cirrhosisban az obesitas független prediktora a májráknak, emellett az obesitas önmagában egyéb daganatok incidenciáját is fokozza (*Nair S, et al. Hepatology* 2002; 36:150-155 és *Calle EE, N Engl J Med* 2003; 348:1625-1638). A HCC előfordulási gyakorisága *ob/ob* egerekben is gyakoribb. Mivel ezen állatokban a steatosis követően nem alakul ki fibrosis a leptin genetikai hiánya miatt; azt feltételezik, hogy nem a fibrosis, hanem az inzulinrezisztencia maga lehet az oka NAFLD-ben a hepatocellularis carcinoma kialakulásának (*Yang S, et al. Cancer Res* 2001; 61:5016-5023). Az apoptózis szabályozásában a mitokondriumok központi szerepet játszanak: míg az intrinsic útvonal elsősorban a metabolikus kisiklásokra és az intracelluláris oxidatív stresszre reagál, addig az extrinsic út a sejtfelszíni sejthalál-receptorokon (pl. Fas, más néven CD95) keresztül valósul meg (*Green DR and Reed JC. Science* 1998; 281:1309-1312). A folyamat során a pro-apoptotikus 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 kaspázok aktivációjának eredményeként a sejt szétesése követ (*Green DR and Reed JC. Science* 1998; 281:1309-1312). A reaktív oxigéngyökök emelkedett szintje daganatsejtekben ismert (*Hussain SP, et al. Nat Rev Cancer* 2003; 3:276-285). Az UCP2 a mitokondrium membránpotenciáljának változtatásával, az 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 (*Harper ME, et al. FASEB J 2002; 16:1550-1557* és *Horimoto M, et al. Clin Cancer Res 2004; 10:6203-6207*); ezáltal – az UCP2-expresszió fokozásával – a sejtek túlélési előnyhöz juthatnak.

2.3. A fluvastatin és a neoplasia

2.3.1. A statinok pleiotróp hatásai

A HMG-CoA reduktáz non-steroid inhibitorai (a statinok) a hepaticus koleszterin bioszintézis kulcsenzimjét gátolják. Az enzim gátlása következtében, 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 (*pl. WOSCOP – West of Scotland Coronary Prevention Study; LCAS – Lipoprotein and Coronary Atherosclerosis Study*), 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 hatásaik 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 (*Márk L, Katona A. Cardiologia Hungarica 1999; 28:131-136*). A pleiotróp hatások létezése mellett szólnak azok az érvek is, miszerint a statinoknak kimutatható plakkstabilizáló hatásuk alakul ki viszonylag hamar, a koleszterin

szintjének szignifikáns csökkentése előtt (pl. *MIRACL – Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering vizsgálat*).

A statinok a koleszterinszint csökkentésén túl – többek között – javítják az endothel diszfunkciót, csökkentik a thrombocyta aktivációt és a thromboxán képződését, csökkentik a leukocyták adhézióját az endothelhez, gátolják a C-reaktív protein (CRP) proinflammatoricus hatását. Antioxidáns hatásuk mellett stabilizálják az atheroscleroticus plakkokat, illetve lassítják az Alzheimer-kór progresszióját is (*Paragh Gy, et al. Orv Hetil 2004; 145:1903-1910*).

2.3.2. A statinok és az izoprenoidok

A statinok a HMG-CoA reduktáz gátlásával nem csak a koleszterin szintjét csökkentik, hanem a nem-koleszterin jellegű mevalonát metabolitok termelését is redukálják (*Brown MS, Goldstein JL. J Lipid Res 1980; 21:505-517* és *Galton DJ. Int J Obes 1981; 5:619-625*). 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 (*Goldstein JL, Brown MS. Nature 1990; 343:425-430*). A kis GTPázok prenilizációja biztosítja ezen fehérjék kovalens kapcsolatát, szubcelluláris lokalizációját és membránhoz kötődését, azaz az inaktív citoszolikus alak aktív, membránhoz kötött formájának kialakulását (*Aktories K. J Clin Invest 1997; 99:827-829* és *Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Genes Dev 1997; 11:2295-2322*). 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.

2.3.3. A statinok hatása a daganatképződésre

A kezdeti kétségeket követően igazolódott a statinok biztonságossága a tumorigenesiszist illetően. Öt, nagy esetszámú, statinokkal végzett multicentrikus, randomizált vizsgálat meta-analízise igazolta, hogy statinkezelést követően nem növekszik a daganatok gyakorisága (Bjerre LM, LeLorier J. *Am J Med* 2001; 110:716-723). 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 (Bansal N, et al. *Leuk Res* 1989; 13:875-882 és Corsini A, et al. *Cardiology* 1996; 87:458-468 és Maltese WA, et al. *J Clin Invest* 1985; 76:1748-1754). Ezen kívül atherosclerosisban és daganatképződésben a statinok kemopreventívnek bizonyultak egyéb anyagokkal együtt adva (Schulz S, Nyce JW. *Carcinogenesis* 1994; 15:2649-2652 és Cuthbert JA, Lipsky PE. *Cancer Res* 1995; 55:1732-1740). 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 (Vitale M, et al. *Endocrinology* 1999; 140:698-704). Az izoprenoidok bizonyos sejtfehérjék (pl. laminin, G-fehérjék és a kis GTP-kötő proteinek) éréséhez szükségesek (Wang W, Macaulay RJ. *Int J Cancer* 1999; 82:430-434 és Vitale M, et al. *Endocrinology* 1999; 140:698-704 és Maltese WA. *FASEB J* 1990; 4:3319-3328). Az izoprenoidok növekedés-szabályozó fehérjék membránlokalizációjában és következményes aktivációjában is részt vesznek, valamint emlős sejtekben szükségesek a sejtciklus S-fázisába történő belépéshez is (Rogler G, et al. *Basic Res Cardiol* 1995; 90:443-450). 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 (Wang IK, et al. *Oncology* 2000; 59:245-254). A lovastatinról például ismert, hogy elősegíti az apoptosist különböző tumorsejtekben (Dimitroulakos J, et al. *Blood* 1999; 93:1308-1318), valamint *in vitro* és rágszálókon gátolja a

tüdődaganat fejlődését (*Hawk, et al. Cancer Lett 1996; 109:217-222*). Későbbi vizsgálatok eredményei alapján a statinkezelésben nem részesülő hyperlipidaemiás betegekben a colon-, prostata- és a húgyhólyagdaganat prevalenciája magasabbnak bizonyult a kezeltékhez képest (*Kaye JA, Jick H. Br J Cancer 2004; 90:635-637*).

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 (*Davignon J, Mabile L. Ann Endocrinol 2001; 62:101-112* és *Moyad MA, Sonnleithner M. Urol Clin North Am 2004; 31:207-212*). Szintén nem tisztázott, hogy a különböző molekuláris struktúrájú HMG-CoA reduktáz inhibitorok valóban hasonló módon és mértékben hatnak-e a tumor- és áttétképződés folyamatára.

2.3.4. A fluvastatinról

A fluvastatin egy nyílt gyűrűt tartalmazó szintetikus HMG-CoA reduktáz inhibitor, melyet az 1990-es évek óta használnak a hyperlipidaemia, atherosclerosis kezelésében (*Yuan JN, et al. Atherosclerosis 1991; 87:147-157*). Gátolja az érfalban elhelyezkedő simaizomsejtek proliferációját (*Soma MR, et al. J Cardiovasc Pharm 1995; 25 (Suppl 4):S20-S24*), valamint humán pancreas daganatsejtek invazivitását csökkenti a RhoA-mediált geranilgeraniláció gátlásán keresztül (*Kusama T, et al. Cancer Res 2001; 61:4885-4891*). Humán makrofágokban gátolja a szöveti faktor felszabadulását és így az atherosclerosis progresszióját (*Colli S, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17:265-272*). Csökkenti a leukocyták endothelhez történő adhézióját patkányokban, ezáltal mérsékli a gyulladási választ (*Kimura M, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17:1521-1526*). Gátolja a low-density lipoprotein (LDL) oxidációját és a szuperoxid termelését is (*Rikitake Y, et al. Atherosclerosis 2001; 154:87-96*). A fluvastatin – az atorvastatinhoz hasonlóan – 4-fluorofenil-jellegű molekula. Feltételezik, hogy kémiai struktúrájához és lipofil karakteréhez

köthető antioxidáns, valamint nitrogénmonoxid-szintetázt aktiváló hatása is (*Nakashima A, et al. Life Sci 2001; 69:1381-1389* és *Sumi D, et al. Atherosclerosis 2001; 155:347-357* és *Ikeda U, et al. J Cardiovasc Pharmacol 2001; 38:69-77*). A gyógyszer májszelektív (*Parker RA, et al. J Lipid Res 1990; 31:1271-1282*), *in vivo* hatékony adagjai rágcsálókban a lovastatinhoz hasonlóak (*Mascaró C, et al. Arch Biochem Biophys 2000; 374:286-292*), Magyarországon 40 és 80 mg-os kiszerelésekben van forgalomban.

3. MÓDSZEREK

3.1. Az egerek kezelése

Az *ucp2* gén ablációját 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 párosztatása következtében kettős homozigótákat (knockoutokat) nyertünk, melyekben az UCP2 fehérje nem detektálható; valamint a leptin hiánya következtében az állatok elhíznak, májukban súlyos steatosis alakul ki. Ezen, 8-18 hetes kettős homozigóta (*ob/ob:ucp2^{-/-}*) obes nőstény egereket, illetve szintén obes, de UCP2-t expresszáló (*ob/ob:ucp2^{+/+}*) 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. Szövetteni 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 megszámláltunk 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 apoptosist jellemző DNS fragmentációt a gyorsított apoptoticus DNS-létra protokoll (accelerated apoptotic DNA laddering protocol) módosított változatával vizsgáltuk (Yeung MC. *Biotechniques* 2002; 33:734-736). 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 MgSO₄, 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-dezoxikolát + 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 β -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-szerinti *in situ* kollagenáz perfúziós módszerrel (Van Harken, et al. *J Biol Chem* 1969; 244:2278-2285). Az állatok pentobarbitál anesztéziája után laparotomiából a portális vénát kanulálva 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 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 μm -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 tripánkéssel ellenőriztük, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd az oldatokat -80°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 fiziológias sóoldatban százszorosára hígított, 200 µl steril India-festéssel 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/ µl. 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 (*de Kok JB, et al. Lab Invest 2005; 85:154-159*). 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 higítási sorait használva vettük fel a standard görbét. 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 FLF₁ (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[®], 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 beültetése után 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[®], Germed, Germany) használtunk. Az 1 mm vastag, 4 mm átmérőjű korongokat etilénoxiddal 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 ismételten 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

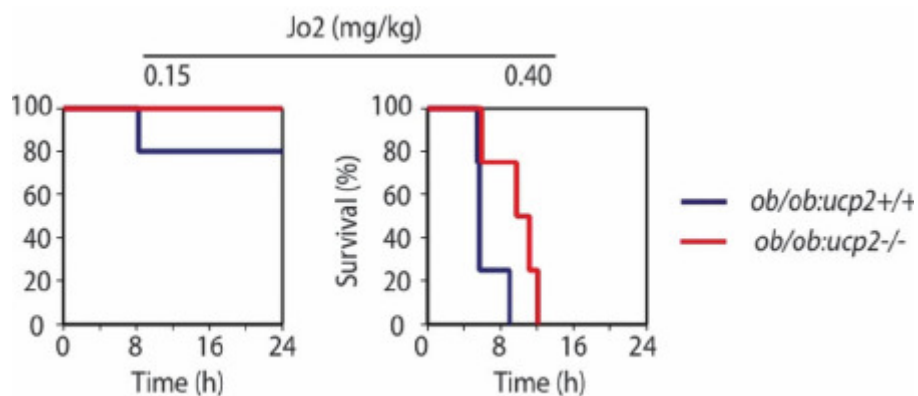
A kísérleteink során kapott adatok statisztikai összehasonlítását Student-féle nem párosított t-tesztel, vagy többszörös összehasonlítások esetén varianciaanalízis, ANOVA (one-way analysis of variance) segítségével végeztük. Az összefüggések vizsgálatához Fisher-féle valószínűségi számítást, Mann-Whitney-féle 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-tesztel 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^{-/-}* egerek között, míg az *ob/ob:ucp2^{+/+}* állatok közül egy hullott el 24 órán belül (2. ábra, bal panel). Ezzel szemben a nagy dózisú antitest beadása mindkét csoportban egyértelműen letálisnak bizonyult: az összes állat elpusztult 24 órán belül mindkét csoportban (2. ábra, jobb panel). Ugyanakkor az utóbbi esetben, az obes UCP2-knockout egerek túlélése szignifikánsan hosszabbnak bizonyult obes, UCP2-t expresszáló társaikénál (571 ± 81 perc, vs. 390 ± 50 perc; $p < 0,05$).

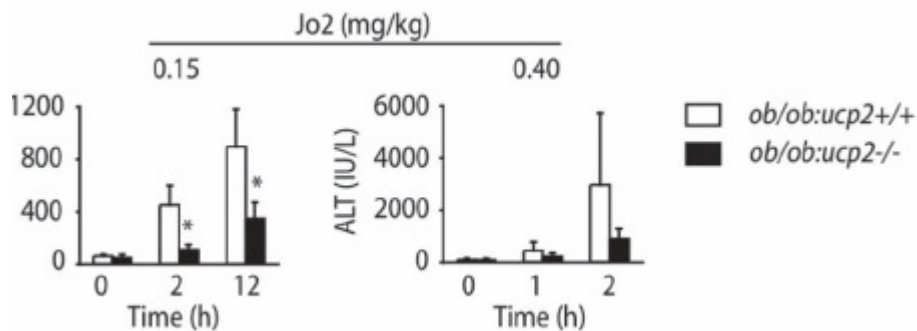


2. ábra: A Kaplan-Maier túlélési görbék alakulása a Jo2 különböző dózisait követően

4.2. Transzamináz aktivitások

A Jo2-indukált akut májkárosodás laboratóriumi megítéléséhez az állat elhullásáig, maximum 24 óra elteltéig monitoroztuk a szérum alanin-aminotranszferáz aktivitásokat. Az alacsony dózisú injekciót követően az *ob/ob:ucp2^{+/+}* állatok ALT aktivitása minden vizsgált időpontban magasabbnak bizonyultak *ob/ob:ucp2^{-/-}* társaikénál (kezdeti: $60,8 \pm 10,1$ vs. $46,1 \pm 25,7$ IU/L; 2 óra után: $449,5 \pm 150,0$ vs. $111,5 \pm 36,8$ IU/L; 12 óra elteltével: $896,3 \pm 285,2$

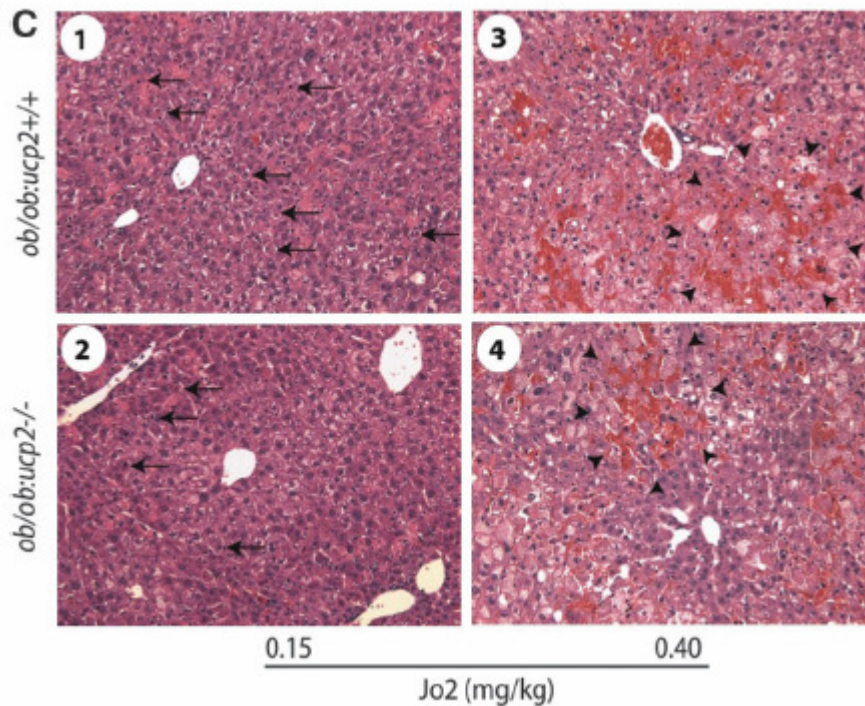
vs. $348,7 \pm 119,9$ IU/L; 3. ábra, bal panel). 0,4 mg/ttkg dózisú Jo2 antitest beadása után gyorsabban és magasabbra emelkedő ALT aktivitásokat mértünk, melyek azonban kevésbé voltak kifejezettek az *ob/ob:ucp2^{-/-}* egerek esetében (kezdeti: $99,1 \pm 49,8$ vs. $93,8 \pm 45,9$ IU/L, 1 óra múlva: $447,4 \pm 344,6$ vs. $227,8 \pm 119,2$ IU/L; 2 óra elteltével: $2968,9 \pm 2761,9$ IU/L vs. $907,4 \pm 382,3$ IU/L; 3. ábra, jobb panel).



3. ábra: A szérumban ALT aktivitások változása (* $p < 0,05$, az *ob/ob:ucp2^{+/+}* egerekhez képest)

4.3. Szöveti eredmények hematoxilin-eozin festéssel

Kisdózisú injekció után számos apoptotikus sejt volt azonosítható, azonban kevesebb elváltozást találtunk az *ob/ob:ucp2^{-/-}* egerek májában (4. ábra). Nagy adag beadása után masszív haemorrhagiás necrosis jött létre mindkét genotípusú, de főleg az *ob/ob:ucp2^{+/+}* egerek májában. Kevésbé kiterjedt elhalás volt megfigyelhető az *ob/ob:ucp2^{-/-}* egereknél, különösen a periportal tér megkíméltsége volt feltűnő. A fiziológiai sóoldattal injektált egerek körében sem elhalást nem észleltünk, valamint ALT aktivitásaikban és szövetükben sem észleltünk változást.



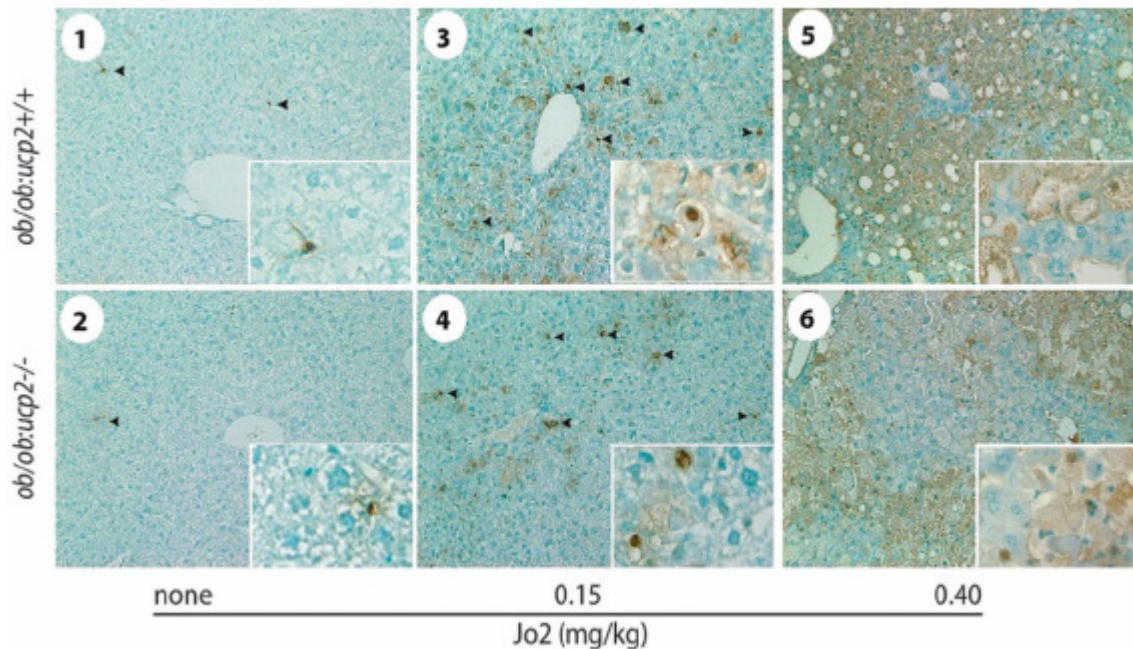
4. ábra: Apoptosis (nyilak) és necrosis (nyílhegyek) a májban (400-szoros nagyítás, HE-festés)

4.4. Fas-mediált májsejtelhalás

A májkárosodás pontosabb megítélése érdekében meghatároztuk és összehasonlítottuk a hepatocellularis apoptoticus mértékét a különböző csoportokban. Megjegyzendő, hogy a sóoldatot kapott egerek májában is észleltünk kismértékű TUNEL-pozitivitást; és azt találtuk, hogy a kiinduló hepatocellularis apoptoticus ráta szignifikánsan alacsonyabb volt az *ob/ob:ucp2^{-/-}* egerekben (5. ábra, panel 1 és 2). A 0,15 mg/ttkg dózisú Jo2 injekció is jelentősen emelte az apoptoticus rátát, ám ez kisebb mértékűnek bizonyult az UCP2-KO egerek esetében (5. ábra, panel 3 és 4). Ezek az eredmények korrelálnak az *ob/ob:ucp2^{-/-}* állatoknál megfigyelt alacsonyabb transzamináz értékekkel.

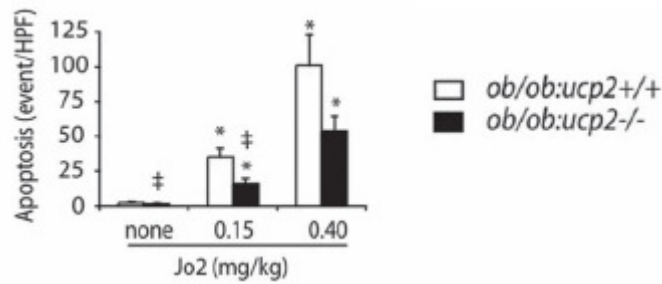
A 0,4 mg/ttkg dózisú Jo2 antitest fulmináns májkárosodást okozva drámaian emelte az apoptoticus sejtek számát, melyekkel párhuzamosan konfluáló necroticus területeket is megfigyeltünk, melyek szintén TUNEL-pozitívnak bizonyultak (5. ábra, panel 5 és 6). Ezen

areákon belül számos sejt diffúz festődési mintázatot mutatott a necrosisnak megfelelően, szemben az apoptosissra jellemző sötét, zsugorodott sejtmagokkal.



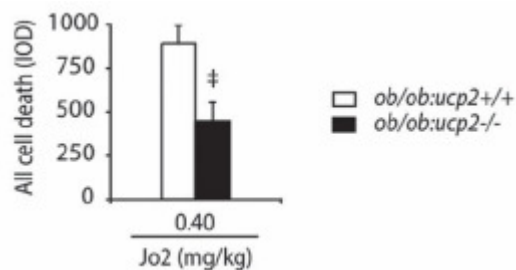
5. ábra: Az apoptózis immunhisztokémiája (TUNEL)

A TUNEL-pozitív sejteket megszámlálva kijelenthető (6. ábra), hogy a hepatocellularis apoptotikus ráta az *ob/ob:ucp2^{+/+}* egerekben szignifikánsan magasabb kiinduláskor és kisdózisú Jo2 adása után is, szemben az *ob/ob:ucp2^{-/-}* állatokban észleltekkkel (kezdeti: $2,37 \pm 0,64$ vs. $1,53 \pm 0,55$ apoptotikus sejtmag/látómező; kisdózisú antitest után: $35,40 \pm 6,07$ vs. $16,18 \pm 3,72$ apoptotikus sejtmag/látómező). Ez a tendencia volt megfigyelhető a nagy dózisú injekció adása után is ($101,0 \pm 22,0$ vs. $54,0 \pm 10,3$ apoptózis/látómező), ám ez a különbség már nem volt szignifikáns ($p=0,086$).



6. ábra: Az apoptoticus ráta változása (* $p < 0,05$, a Jo2-val nem kezelthez képest; ‡ $p < 0,05$, az *ob/ob:ucp2^{+/+}* egerekhez képest)

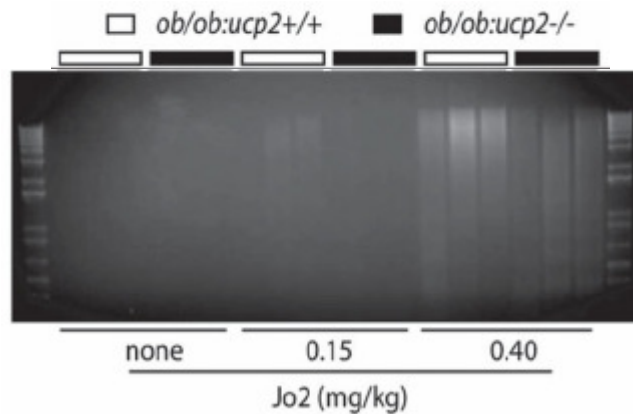
Mivel a nagy dózisú Jo2 injekció után apoptózisra és necrosisra utaló jeleket is észleltünk, a hepatocellularis sejtelhalás mértékének megítélésére a szövettani minták képanalízisét végeztük el. A vizsgálat alapján megállapítható, hogy a 0,4 mg/ttkg dózisú Jo2 szignifikánsan enyhébb károsodást okozott az *ob/ob:ucp2^{-/-}* egerek májában ($895,13 \pm 100,75$ vs. $449,62 \pm 104,47$ AU; 7. ábra).



7. ábra: Az összes sejtelhalás (apoptosis+necrosis) mértéke képanalízis segítségével (‡ $p < 0,05$, az *ob/ob:ucp2^{+/+}* egerekhez képest)

A programozott sejthalál folyamata energiaigényes, ezzel szemben a sejtek energiakészletének csökkenése inkább necrosisra hajlamosít (Lemasters JJ, et al. *J Bioenerg Biomembr* 1999; 31:305-319). Így arra a következtetésre juthatnánk, hogy az obes UCP2-KO egerek májában a sejtek ATP-raktárai megkíméltebbek, ezáltal a sejtelhalás domináló formája inkább az apoptózis. Ezzel szemben az apoptózis egyik kulcsfolyamatának, a DNS

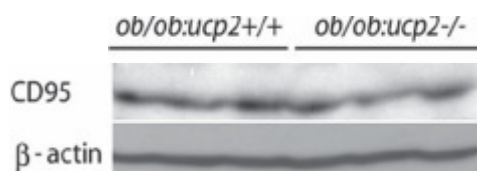
fragmentációjának vizsgálata azt mutatta, hogy a létraképződés – összehasonlítva az *ob/ob:ucp2^{+/+}* állatokkal – kisebb mértékű az *ob/ob:ucp2^{-/-}* egerekben. Ez a különbség mind a kis-, mind pedig a nagydózisú antitest injekció beadása után megfigyelhető (8. ábra).



8. ábra: A DNS fragmentáció (létraképződés) Jo2-injekciót követően

4.5. Fas-expresszió

Ismert, hogy diétával kiváltott obesitasban szenvedő egerekben a Fas (CD95) expressziója fokozódik, mely hozzájárul a Fas-mediált májkárosodáshoz (*Feldstein AE, et al. J Hepatol 2003; 39:978-983*). Ezért immunoblottal meghatároztuk a Fas (CD95) expresszóját az *ob/ob:ucp2^{-/-}* és *ob/ob:ucp2^{+/+}* egerekben is. Mivel különbséget nem találtunk, ez arra utal, hogy nem a Fas (CD95)-expresszió megváltozása okozta az *ob/ob:ucp2^{-/-}* egerek enyhébb májkárosodását (9. ábra).

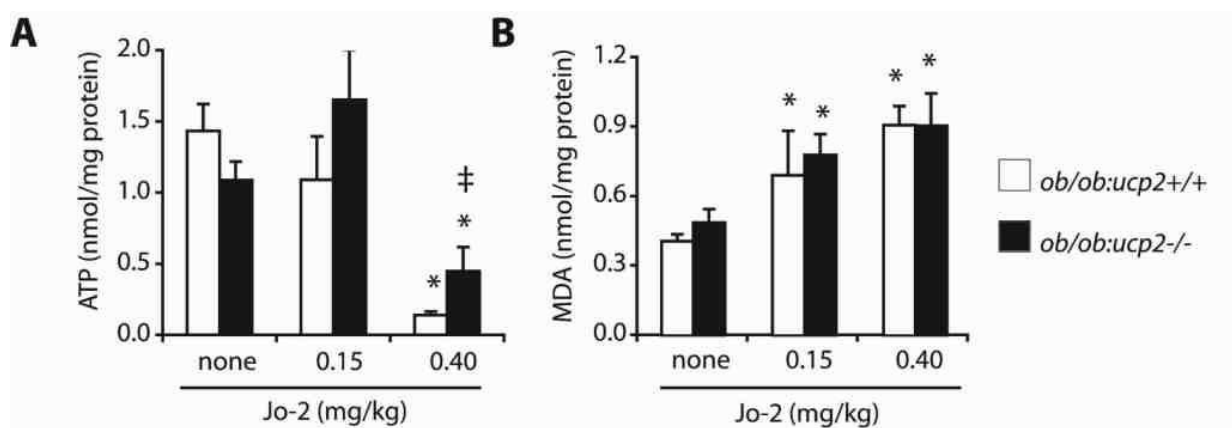


9. ábra: A Fas (CD95) expressziója a Jo2 különböző dózisait követően

4.6. A hepaticus ATP-raktárak változásai

Megvizsgáltuk az UCP2 hatását a májszövet energia homeosztázisára is, ugyanis az *ob/ob* egerek májában az UCP2 expressziója lényegesen fokozott a sovány társaikéhoz viszonyítva. Így a hepatocellularis ATP-szintézis károsodása az *ob/ob:ucp2^{+/+}* egerekben a májat lényegesen érzékenyebbé teheti akután kialakuló károsító hatásokkal szemben.

Azt találtuk (10/A ábra), hogy az ATP mennyisége a sóldatot kapott UCP2-knockout és azt expresszáló obes egerekben hasonló volt (*ob/ob:ucp2^{+/+}* vs. *ob/ob:ucp2^{-/-}* egerek: $1,432 \pm 0,189$ vs. $1,086 \pm 0,131$ nmol/mg protein). Ez a megfigyelés nem meglepő azon vizsgálatok tükrében, melyek azt igazolták, hogy az UCP2 biológiai hatásai a fehérje aktivációjakor lesznek nyilvánvalókká (Brand MD, Esteves TC. *Cell Metab* 2005; 2:85-93). A kisdózisú Jo2 injekciót követően a máj ATP-tartalma lényegében változatlan maradt, ezzel szemben nagydózisú antitest-injekció adását követően az ATP-raktárak drámaian csökkentek a májban, melyre az aktív UCP2-nek egyértelmű hatása volt: a moribund *ob/ob:ucp2^{-/-}* egerekben a máj reziduális ATP-tartalma háromszorosa volt a hasonló állapotú *ob/ob:ucp2^{+/+}* állatokhoz képest (*ob/ob:ucp2^{+/+}* vs. *ob/ob:ucp2^{-/-}* egerek kis dózis után: $1,090 \pm 0,303$ vs. $1,652 \pm 0,349$ nmol/mg protein; nagy dózis után: $0,139 \pm 0,024$ vs. $0,448 \pm 0,167$ nmol/mg protein).



10. ábra (A): Az ATP-raktárak és (B) a szöveti MDA-szintek változása (* $p < 0,05$, a Jo2-val nem kezelthez képest; ‡ $p < 0,05$, az *ob/ob:ucp2^{+/+}* egerekhez képest)

4.7. Az oxidatív stressz változása

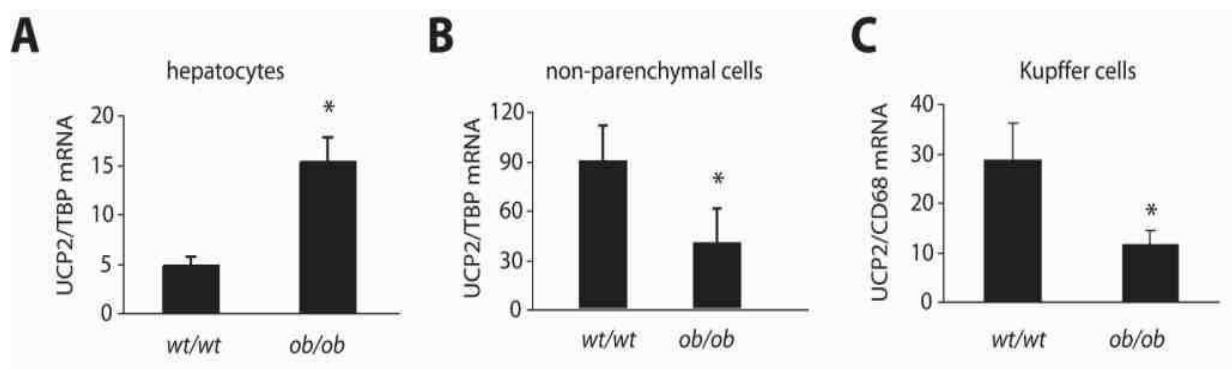
Ismert, hogy az UCP2 egyik legfontosabb funkciója a reaktív oxigéngyökök termelésének szabályozása. Kíváncsiak voltunk az UCP2 hiányában változó ROS-termelésre is Jo2-injekciót követően. Feltételezésünknek megfelelően, a Jo2 növekvő adagjai szignifikáns emelkedést okoztak a mért lipidperoxidációs termék (malondialdehid) mennyiségében (10/B ábra). Meglepő módon ugyanakkor, az UCP2 hiányának nem volt szignifikáns hatása a májszövetben mért MDA-szintekre (*ob/ob:ucp2^{+/+}* vs. *ob/ob:ucp2^{-/-}* egerek sóoldat után: $0,405 \pm 0,031$ vs. $0,486 \pm 0,080$ nmol/mg protein; kis dózis után: $0,688 \pm 0,191$ vs. $0,775 \pm 0,090$ nmol/mg protein, nagy dózist követően: $0,903 \pm 0,081$ vs. $0,900 \pm 0,140$ 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 hepatocytáiban és a Kupffer-sejtekben

Ahogy már fentebb részleteztük, az egészséges májban az UCP2 fő forrása elsődlegesen a Kupffer-sejt. A hepatocytákban normál körülmények között alig, vagy egyáltalán nem detektálható UCP2-szignál (*Larrouy D, et al. Biochem Biophys Res Commun 1997; 235:760-764*). Ez a sejtspecifikus mintázat látszik megváltozni genetikailag, vagy étrendileg létrehozott elhízásban, amikor is a hepatocytákban kifejezetten emelkedik az UCP2 mRNS és fehérje mennyisége (*Chavin KD, et al. J Biol Chem 1999; 274:5692-5700*). Obes rágcsálók peritoneális makrofágjaiban az UCP2 expressziója csökkent (*Lee FY, et al. Am J Physiol 1999; 276:C386-C394*), ugyanakkor az még nem ismert, hogy a Kupffer-sejtekben végbemegy-e hasonló változás. Hipotézisünk szerint az *ob/ob* egerek Kupffer-sejtjeiben bekövetkező UCP2-expresszió csökkenés magyarázatul szolgálhat arra, hogy a

knockoutokban nem volt megfigyelhető az oxidatív stressz további fokozódása. Ebben az esetben ugyanis az UCP2 ablációjának nem lenne számottevő további hatása a Kupffer-sejtre (mely a ROS-termelés kiemelt helye a májban), mivel a sejten belül a fehérje expressziója eleve csökkent zsírmáj-betegségben.

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. $15,463 \pm 2,516$; 11/A ábra), mely összhangban van a korábbi megfigyelésekkel, miszerint a hepatocyták zsírsavbeáramlásra az UCP2 expressziójának fokozódásával válaszolnak (Cortez-Pinto H, et al. *Gastroenterology* 1999; 116:1184-1193). 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. $39,26 \pm 21,34$; 11/B ábra).



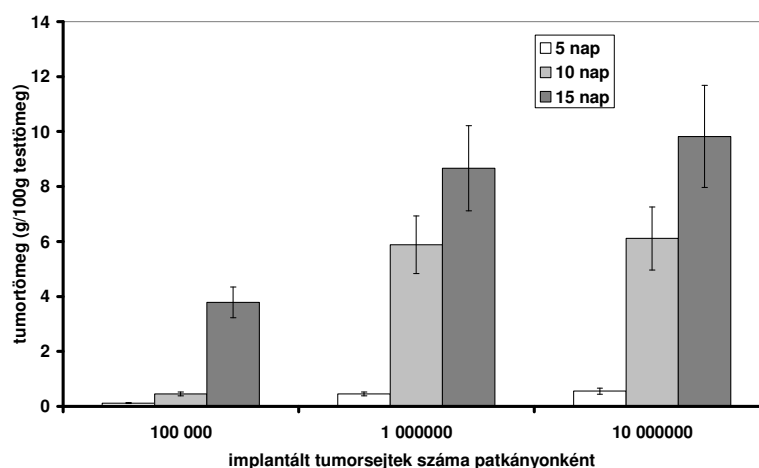
11. ábra: Az UCP2-expresszió sejtspecifikus változása *ob/ob* egerek májában (* $p < 0,05$, a *wt/wt*-hez képest)

Az NPC frakció azonban nemcsak Kupffer-sejtekből áll, hanem sinusoidális endothelsejteket és HSC-ket is tartalmaz, melyekben az UCP2 expressziójának mértéke nem

ismert. Az India-festéket fagocitált Kupffer-sejteket azonosítva, azokat laser capture microdissection módszerrel gyűjtöttük össze; a non-Kupffer-sejtekkel való kontaminációt elkerülendő, az UCP2 mRNS szintjét a Kupffer-sejtekre specifikus CD68 mRNS-ére normalizáltuk. Hasonlóan az NPC frakciókból nyert adatokkal, az UCP2 expressziója szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult az *ob/ob* állatokból nyert Kupffer-sejtekben a vad típusúakhoz képest ($28,69 \pm 7,43$ vs. $11,71 \pm 2,82$; 11/C ábra).

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 (12. ábra). Hosszabb időintervallumokat nem vizsgáltunk, mivel előkísérleteink alapján 15-25 napon belül már az állatok elhullásával kellene számolnunk.

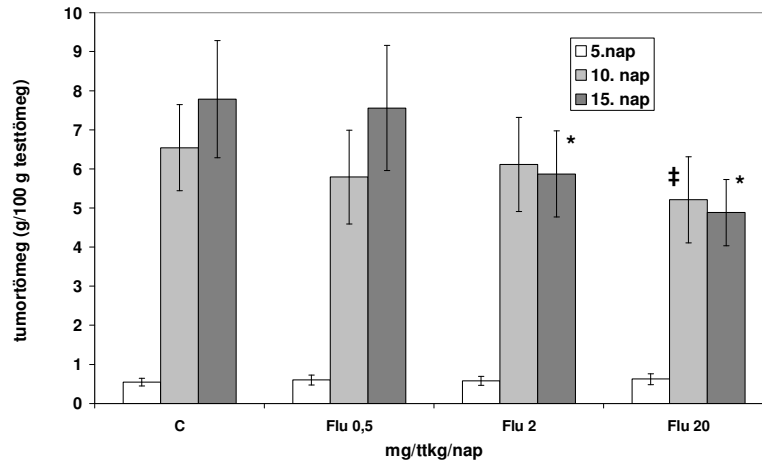


12. ábra: A tumornövekedés a beültetett sejtek száma és az eltelt idő függvényében

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

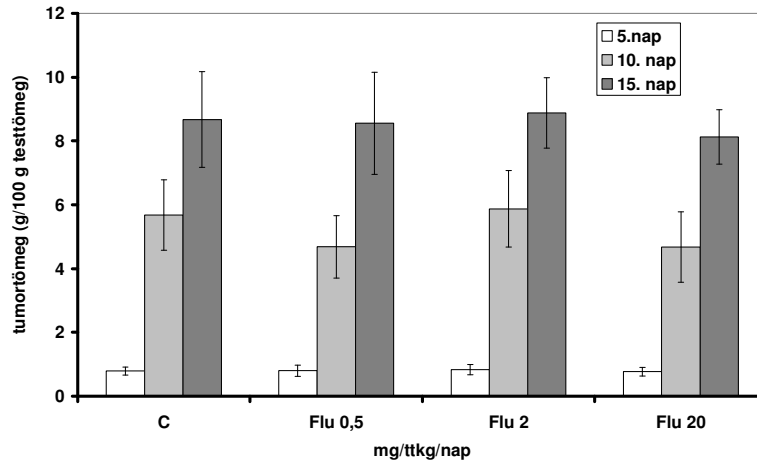
Az első csoportban a daganatsejtek beültetésével szimultán kezdtük el adni a gyógyszert $0,5$ mg/ttkg, 2 mg/ttkg és 20 mg/ttkg dózisokban (13. ábra). A fluvastatin a legkisebb dózisban adva nem volt hatással a tumornövekedésre (kontrollcsoport tumortömege az ötödik napon: $0,55 \pm 0,1$; tizedik napon: $6,54 \pm 1,1$; 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). Ezzel szemben, a 20 mg/ttkg adagban adott fluvastatin már a tizedik napon is szignifikáns csökkenést okozott a hepatocellularis carcinoma növekedési ütemében, mely még szignifikánssá vált a tizenötödik napon (ötödik napon: $0,62 \pm 0,1$; tizedik napon: $5,21 \pm 1,1$; tizenötödik napon: $4,88 \pm 0,9$ g/100g testtömeg).



13. ábra: A daganat implantációjával egyidőben elkezdett fluvastatin hatása a tumornövekedésre (* $p < 0,001$, ‡ $p < 0,01$ a fluvastatinnal nem kezelt kontrollcsoporthoz (C) képest)

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

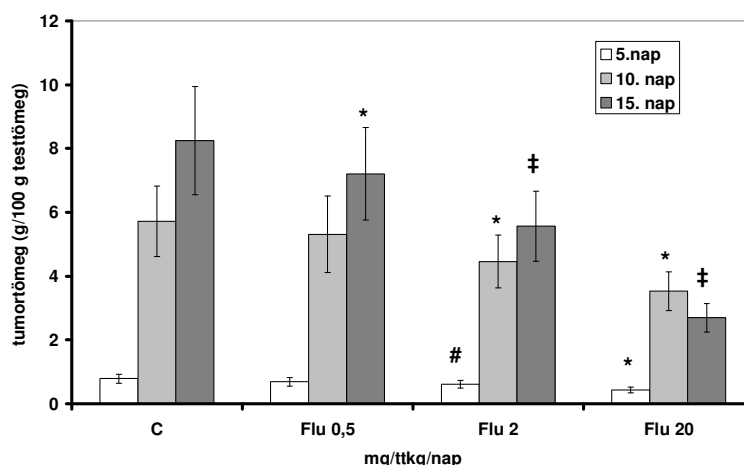
A második csoport a gyógyszert 21 nappal a tumorimplantáció előtt kezdte el kapni, majd a beültetéskor a fluvastatint felfüggesztettük. A 14. ábrán látható, hogy az alkalmazott kondíciók mellett a fluvastatin nem fejtett ki szignifikáns kemopreventív hatást a tumor fejlődésére (kontrollcsoport tumortömege 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).



14. ábra: A fluvastatin tumorfejlődésre gyakorolt hatása 21 napos előkezelést követően

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: a közepes és nagy dóziséjú gyógyszeres kezelés mindhárom vizsgált intervallumot követően szignifikánsan csökkentette a tumorok növekedési ütemét (15. ábra).



15. ábra: A tumorbeültetést megelőző, illetve azt követően is adott fluvastatin hatása a daganatok fejlődésére (# $p < 0,05$, * $p < 0,01$, ‡ $p < 0,001$ a fluvastatinnal nem kezelt kontrollcsoporthoz (C) képest)

Ekkor már a kisdózisú 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 reaktív oxigéngyökök 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. Bár a fehérje hatásával interferál a sejt ATP-termelésével, emellett a ROS-termelés negatív modulátora is. A mitokondriális membránpotenciál csökkenése a reaktív oxigéngyökök termelését limitálja, így az UCP2 expressziójának fokozása potenciális terápiás eszközként merült fel a sejtek oxidatív stressz elleni védelmében. Az UCP2 hiányának nincs laboratóriumi, vagy szövettani vizsgálatokkal detektálható hatása az UCP2-

knockout egerekben létrehozott zsírmájra (*Baffy G, et al. Hepatology 2002; 35:753-761*), 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 akutan létrejövő májkárosodásra.

Tanulmányunkban az akut károsodást Jo2-antitest intraperitoneális adásával váltottuk ki UCP2-t expresszáló, valamint UCP2-deficiens leptinhiányos obes (*ob/ob:ucp2^{+/+}* és *ob/ob:ucp2^{-/-}*) egerekben. Az antitest dóziszfüggő módon Fas-receptoron keresztüli hepatocelluláris destrukciót és fulmináns májelhalást képes kiváltani. A túlélési vizsgálatainkból kiemelendő, hogy nagy dózisú (0,4 mg/ttkg) Jo2-antitest beadását követően az *ob/ob:ucp2^{-/-}* egerek túlélése szignifikánsan hosszabbnak bizonyult *ob/ob:ucp2^{+/+}* 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 sejtelhalással szemben.

Hematoxilin-eozin festéssel számos apoptoticus sejt volt azonosítható, azonban kevesebb számú és kisebb kiterjedésű elváltozást találtunk az *ob/ob:ucp2^{-/-}* egerek májában akár kis- akár nagy dózisú Jo2-injekció után. A fiziológiás sóoldattal injektált egerek körében elhalást nem észleltünk, valamint ALT aktivitásaikban 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^{-/-}* egerekben. A Jo2 injekció már kisebb dózisban is jelentősen emelte az apoptózis rátát, ám ez kisebb mértékűnek bizonyult az *ob/ob:ucp2^{-/-}* 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^{-/-}* egerek májában. Megfigyeléseinket megerősítette a DNS-fragmentáció vizsgálata is. Immunoblottal igazoltuk, hogy a Fas-expresszió között nem volt különbség az *ob/ob:ucp2^{-/-}* és *ob/ob:ucp2^{+/+}* egerekben, így nem ennek változása okozta az obes UCP2-KO egyedek enyhébb májkárosodását.

Az UCP2-knockout és az azt expresszáló obes egerek hepaticus ATP mennyisége között nem volt szignifikáns különbség sem fiziológias 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^{-/-}* egerekben a máj reziduális ATP-tartalma szignifikánsan magasabb, megkíméltebb volt a hasonló állapotú *ob/ob:ucp2^{+/+}* 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^{-/-}* 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 sejtben 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 alacsonyabb volt 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 oxigéngyök-termelésnek. Ugyanakkor ez a folyamat az *ob/ob:ucp2^{-/-}* egerekben nem fejt ki számottevő hatást, mivel az UCP2 ablációja már nem csökkenti lényegesen az eleve alacsony 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 kiütése megfontolandó hatású a parenchymás sejtekben, mivel az UCP2-deficiencia láthatóan megkíméli az ATP-raktárakat és enyhíti az *ob/ob:ucp2^{-/-}* 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^{-/-}* 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 a Kupffer-sejtek UCP2-expressziójának negatív transzkripciószabályozása és ennek egyéb következményei még feltétlenül tisztázandóak.

Az elhízáshoz rendkívül gyakran társuló hyperlipidaemia kezelésében a statinok alapvető fontosságúak. A HMG-CoA reductázt gátolva a koleszterin szintézisét blokkolják. E gyógyszerek a koleszterinszint csökkentésén kívül a mevalonát ciklusba beavatkozva apoptosist indukálnak, illetve a sejtproliferációt is szabályozzák. A koleszterin-bioszintézis köztes molekulái a fehérjék poszttranszlációs modifikációjában is részt vesznek a preniláción keresztül: az izoprenoidok különböző, a sejtproliferációban részt vevő sejtfehérjék éréséhez szükségesek. A statinoknak fentiekben alapulnak ún. pleiotróp hatásai: gátolják a simaizomsejt-proliferációt, sejtmigrációt, emellett szabadgyök-fogó hatásuk is van. Nem teljesen ismert azonban, hogy a statinok, eltérő szerkezetükből adódóan, hasonló hatásúak-e a daganatképződésre. A fluvastatin nyílt gyűrűt tartalmazó lipofil molekula, melyet a hyperlipidaemia kezelésében Magyarországon is törzskönyveztek. Az obesitashoz társuló zsírmáj-betegség nem elhanyagolható hányadában a steatosis később steatohepatitisbe, súlyosabb esetben hepatocellularis carcinomába torkollik. Jelen tanulmányunkkal igazolni próbáltuk a gyógyszernek a májrák fejlődésére gyakorolt gátló hatását.

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 (*Uzvolgyi et al., Cancer Lett 1990; 51:1-5*).

A daganatbeültetés optimális körülményeinek meghatározása után a humán adagoláshoz hasonló dózisokban *per os* adagoltunk patkányoknak fluvastatint. Az első csoportban a daganatsejtek beültetésével szimultán kezdtük el adni a gyógyszert. Közepes

dózisban 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. Iyen kondíciók 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 a nagyobb adagok mindhárom vizsgált időintervallumban jelentősen gátolták a tumorok fejlődését, azaz a fluvastatin antitumor hatása ekkor bizonyult a legkifejezettebbnek.

Összefoglalásul 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.

6.1. ÖSSZEFOGLALÁS

A zsírmáj, és ennek következtében létrejövő inzulinrezisztencia az obesitas egyik legfontosabb szövődménye. A NAFLD 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 akutan 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^{-/-}*) és ezek UCP2-t expresszáló társait (*ob/ob:ucp2^{+/+}*) 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^{-/-}* 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^{-/-}* egerek túlélése hosszabb volt és hepaticus ATP-raktárai 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 májlipidumban mért MDA-szintjében. 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^{+/+}* egerekben, mely lényegesen hozzájárul a fokozott oxidatív stresszhez és csökkenti az UCP2 ablációjának a hatását is. A zsírmájban megfigyelhető UCP2 szignálfokozódás 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 a 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.

6.2. SUMMARY

Non-alcoholic fatty liver and subsequent insulin resistency are important complications of obesity. NAFLD is vulnerable to conditions that compromise hepatocellular energy homeostasis. Lipid-laden hepatocytes highly express uncoupling protein-2, which – by mediating the proton leak – competes with the cells' ATP synthesis and modulates the generation of reactive oxygen species. However, the link between UCP2 expression and susceptibility of fatty liver to acute injury is still unclear. We asked whether absence of UCP2 is beneficial for leptin deficient *ob/ob* mice when challenged with Fas-mediated cell destruction and subsequent acute liver injury. *Ob/ob* mice deficient for UCP2 (*ob/ob:ucp2^{-/-}*) and UCP2-competent littermates (*ob/ob:ucp2^{+/+}*) received a single dose of agonistic anti-Fas antibody (Jo2) intraperitoneally. Low-dose Jo2 (0,15 mg/ttkg) caused less ALT elevation and lower apoptosis rates in *ob/ob:ucp2^{-/-}* mice. High-dose Jo2 (0,4 mg/ttkg) proved uniformly fatal in 24 hours; however, *ob/ob:ucp2^{-/-}* mice survived longer with less depletion of hepatic ATP stores, indicating that fatty hepatocytes may benefit from ablation of UCP2 during Fas-mediated acute liver injury. Although UCP2 reportedly controls mitochondrial generation of ROS, we could not detect significant difference in MDA levels of tissue lysates from the different genotypes. This finding prompted us to determine UCP2 expression in Kupffer cells, a major source of intrahepatic oxidative stress. UCP2 expression was found diminished in Kupffer cells of untreated *ob/ob:ucp2^{+/+}* mice, contributing to increased oxidative stress and limiting the impact of UCP2 ablation. Therefore, UCP2 abundance in fatty liver exacerbates Fas-mediated cell destruction by compromising ATP stores and diminished expression of UCP2 found in Kupffer cells results in persistent oxidative stress. Our data emphasize the cell-specific therapeutic approach when considering the enhancement of mitochondrial uncoupling in fatty liver disease.

Fluvastatin is a widely used drug in treatment of hyperlipidemia which is commonly associated with obesity. However, its chemopreventive effect on *in vivo* tumor development has not been studied yet. Using Gelaspon sponge discs we implanted hepatocellular cancer cells under the renal capsules of rats. The animals received different doses of fluvastatin orally, either started simultaneously with the implantation or were pretreated only before the surgical procedure. Also, fluvastatin was administered before and continued after the tumor implantation in a third group of animals. The drug showed no significant impact on cancer development when given only before implantation; while the anticancer effect was detectable in higher doses of simultaneous administration. Additionally, chemopreventive fluvastatin treatment continued after tumor implantation demonstrated the most intense anticancer effect. Our results draw the attention to the beneficial effect of fluvastatin inhibiting *in vivo* hepatocellular cancer development.

7. IRODALOMJEGYZÉK

Aktories K. Bacterial toxins that target Rho proteins. *J Clin Invest* 1997; 99:827-829

Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346:1221-1231

Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M. IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 2005; 11:191-198

Armstrong MB, Towle HC. Polyunsaturated fatty acids stimulate hepatic UCP-2 expression via a PPARalpha-mediated pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 281:E1197-E1204

Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, Miroux B, Couplan E, Alves-Guerra MC, Gubern M, Surwit R, Bouillaud F, Richard D, Collins S, Ricquier D. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet* 2000; 26:435-439

Baffy G, Zhang CY, Glickman JN, Lowell BB. Obesity-related fatty liver is unchanged in mice deficient for mitochondrial uncoupling protein 2. *Hepatology* 2002; 35:753-761

Bansal N, Houle AG, Melnykovich G. Comparison of dexamethasone and lovastatin (mevinolin) as growth inhibitors in cultures of T-cell derived human acute leukemia lines (CEM). *Leuk Res* 1989; 13:875-882

Bechmann I, Diano S, Warden CH, Bartfai T, Nitsch R, Horvath TL. Brain mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2): a protective stress signal in neuronal injury. *Biochem Pharmacol* 2002; 64:363-367

Bergamini CM, Gambetti S, Dondi A, Cervellati C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr Pharm Des* 2004; 10:1611-1626

Berson A, De Beco V, Lettéron P, Robin MA, Moreau C, El Kahwaji J, Verthier N, Feldmann G, Fromenty B, Pessayre D. Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1998; 114:764-774

Bjerre LM, LeLorier J. Do statins cause cancer? A meta-analysis of large randomized trials. *Am J Med* 2001; 110:716-723

Blanc J, Alves-Guerra MC, Esposito B, Rousset S, Gourdy P, Ricquier D, Tedgui A, Miroux B, Mallat Z. Protective role for uncoupling protein 2 in atherosclerosis. *Circulation* 2003; 107:388-390

Bouillaud F, Couplan E, Pecqueur C, Ricquier D. Homologues of the uncoupling protein from brown adipose tissue (UCP1): UCP2, UCP3, BMCP1 and UCP4. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1504:107-119

Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med* 2004; 37:755-767

Brand MD, Brindle KM, Buckingham JA, Harper JA, Rolfe DF, Stuart JA. The significance and mechanism of mitochondrial proton conductance. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; 23 Suppl 6:S4-S11

Brand MD, Esteves TC. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab* 2005; 2:85-93

Brown MS, Goldstein JL. Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J Lipid Res* 1980; 21:505-517

Browning JD, Kumar KS, Saboorian MH, Thiele DL. Ethnic differences in the prevalence of cryptogenic cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99:292-298

Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 3-16

Cai D, Yuan M, Frantz D, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. *Nat Med* 2005; 11:183-190

Caldwell SH, Harris DM, Patrie JT, Hespeneide EE. Is NASH underdiagnosed among African Americans? *Am J Gastroenterol* 2002; 97:1496-1500

Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, Iezzoni JC, Hespeneide EE, Parks JK, Parker WD Jr. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 1999; 31:430-434

Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003; 348:1625-1638

Chavin KD, Yang S, Lin HZ, Chatham J, Chacko VP, Hoek JB, Walajtys-Rode E, Rashid A, Chen CH, Huang CC, Wu TC, Lane MD, Diehl AM. Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. *J Biol Chem* 1999; 274:5692-5700

Chung WK, Chua SC, Lee GH, Leibel RL. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP) and electrophoretic assays for the mouse obese (Lepob) mutation. *Obes Res* 1997; 5:183-185

Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:960-967

Clavien PA, Selzner M. Hepatic steatosis and transplantation. *Liver Transpl* 2002; 8:980

Colli S, Eligini S, Lalli M, Camera M, Paoletti R, Tremoli E. Vastatins inhibit tissue factor in cultured human macrophages. A novel mechanism of protection against atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:265-272

Considine MJ, Goodman M, Echtay KS, Laloi M, Whelan J, Brand MD, Sweetlove LJ. Superoxide stimulates a proton leak in potato mitochondria that is related to the activity of uncoupling protein. *J Biol Chem* 2003; 278:22298-22302

Corsini A, Bernini F, Quarato P, Donetti E, Bellosta S, Fumagalli R, Paoletti R, Soma VM. Non-lipid-related effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Cardiology* 1996; 87:458-468

Cortez-Pinto H, Chatham J, Chacko VP, Arnold C, Rashid A, Diehl AM. Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. *JAMA* 1999; 282:1659-1664

Cortez-Pinto H, Zhi Lin H, Qi Yang S, Odwin Da Costa S, Diehl AM. Lipids upregulate uncoupling protein 2 expression in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1999; 116:1184-1193

Crespo J, Cayón A, Fernández-Gil P, Hernández-Guerra M, Mayorga M, Domínguez-Díez A, Fernández-Escalante JC, Pons-Romero F. Gene expression of tumour necrosis factor α and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001; 34:1158-1163

Cuthbert JA, Lipsky PE. Suppression of the proliferation of Ras-transformed cells by fluoromevalonate, an inhibitor of mevalonate metabolism. *Cancer Res* 1995; 55:1732-1740

Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114:842-845

Davignon J, Mabile L. Mechanisms of action of statins and their pleiotropic effects. *Ann Endocrinol* 2001; 62:101-112

de Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, Swinkels DW, Span PN. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest* 2005; 85:154-159

Duval C, Negre-Salvayre A, Dogilo A, Salvayre R, Penicaud L, Casteilla L. Increased reactive oxygen species production with antisense oligonucleotides directed against uncoupling protein 2 in murine endothelial cells. *Biochem Cell Biol* 2002; 80:757-764

Echtay KS, Esteves TC, Pakay JL, Jekabsons MB, Lambert AJ, Portero-Otin M, Pamplona R, Vidal-Puig A, Wang S, Roebuck SJ, Brand MD. A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *EMBO J* 2003; 22:4103-4110

Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S, Clapham JC, Brand MD. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 2002; 415:96-99

Echtay KS, Winkler E, Frischmuth K, Klingenberg M. Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H⁺ transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone). *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:1416-1421

Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Semin Liver Dis* 2001; 21:17-26

Feldstein AE, Canbay A, Guicciardi ME, Higuchi H, Bronk SF, Gores GJ. Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice. *J Hepatol* 2003; 39:978-983

Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, Warden CH. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinaemia. *Nat Genet* 1997; 15:269-272

Fleury C, Sanchis D. The mitochondrial uncoupling protein-2: current status. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31:1261-1278

Galton DJ. The regulation of cholesterol synthesis in human cells. *Int J Obes* 1981; 5:619-625

Garcia-Ruiz C, Colell A, Morales A, Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC. Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor kappa-B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Mol Pharmacol* 1995; 48:825-834

Gimeno RE, Dembski M, Weng X, Deng N, Shyjan AW, Gimeno CJ, Iris F, Ellis SJ, Woolf EA, Tartaglia LA. Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis. *Diabetes* 1997; 46:900-906

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281:1309-1312

Goglia F, Skulachev VP. A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet. *FASEB J* 2003; 17:1585-1591

Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990; 343:425-430

Harper ME, Antoniou A, Villalobos-Menuey E, Russo A, Trauger R, Vendemelio M, George A, Bartholomew R, Carlo D, Shaikh A, Kupperman J, Newell EW, Bespalov IA, Wallace SS, Liu Y, Rogers JR, Gibbs GL, Leahy JL, Camley RE, Melamede R, Newell MK. Characterization of a novel metabolic strategy used by drug-resistant tumor cells. *FASEB J* 2002; 16:1550-1557

Hawk MA, Cesen KT, Siglin JC, Stoner GD, Ruch RJ. Inhibition of lung tumor cell growth in vitro and mouse lung tumor formation by lovastatin. *Cancer Lett* 1996; 109:217-222

Hensley K, Kotake Y, Sang H, Pye QN, Wallis GL, Kolker LM, Tabatabaie T, Stewart CA, Konishi Y, Nakae D, Floyd RA. Dietary choline restriction causes complex I dysfunction and increased H₂O₂ generation in liver mitochondria. *Carcinogenesis* 2000; 21:983-989

- Herd JA, Ballantyne CM, Farmer JA, Ferguson JJ 3rd, Jones PH, West MS, Gould KL, Gotto AM Jr. Effects of fluvastatin on coronary atherosclerosis in patients with mild to moderate cholesterol elevations. Lipoprotein and Coronary Atherosclerosis Study (LCAS). *Am J Cardiol* 1997; 80:278-286
- 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; 39:386-392
- Horimoto M, Resnick MB, Konkin TA, Routhier J, Wands JR, Baffy G. Expression of uncoupling protein-2 in human colon cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10:6203-6207
- Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002; 109:1125-1131
- Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, Goldstein JL. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:12027-12032
- Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:276-285
- Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:7281-7286
- Ikeda U, Shimpo M, Ikeda M, Minota S, Shimada K. Lipophilic statins augment inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated cardiac myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38:69-77
- Jezek P, Záčková M, Růžicka M, Skobisová E, Jabůrek M. Mitochondrial uncoupling proteins – facts and fantasies. *Physiol Res* 2004; 53 Suppl 1:S199-S211
- Johnson EF, Palmer CN, Griffin KJ, Hsu MH. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor in cytochrome P450 4A gene regulation. *FASEB J* 1996; 10:1241-1248
- Kaye JA, Jick H. Statin use and cancer risk in the General Practice Research Database. *Br J Cancer* 2004; 90:635-637
- Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 2000; 405:421-424

- Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 1999; 103:1489-1498
- Kim JB, Wright HM, Wright M, Spiegelman BM. ADD1/SREBP-1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:4333-4337
- Kimura M, Kurose I, Russell J, Granger DN. Effects of fluvastatin on leukocyte-endothelial cell adhesion in hypercholesterolemic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1521-1526
- Kizaki T, Suzuki K, Hitomi Y, Taniguchi N, Saitoh D, Watanabe K, Onoe K, Day NK, Good RA, Ohno H. Uncoupling protein 2 plays an important role in nitric oxide production of lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:9392-9397
- Klingenberg M. Uncoupling protein – a useful energy dissipator. *J Bioenerg Biomembr* 1999; 31:419-430
- Kusama T, Mukai M, Iwasaki T, Tatsuta M, Matsumoto Y, Akedo H, Nakamura H. Inhibition of epidermal growth factor-induced RhoA translocation and invasion of human pancreatic cancer cells by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Cancer Res* 2001; 61:4885-4891
- Larrouy D, Laharrague P, Carrera G, Viguerie-Bascands N, Levi-Meyrueis C, Fleury C, Pecqueur C, Nibbelink M, André M, Casteilla L, Ricquier D. Kupffer cells are a dominant site of uncoupling protein 2 expression in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 235:760-764
- Lee FY, Li Y, Yang EK, Yang SQ, Lin HZ, Trush MA, Dannenberg AJ, Diehl AM. Phenotypic abnormalities in macrophages from leptin-deficient obese mice. *Am J Physiol* 1999; 276:C386-394
- Lemasters JJ, Qian T, Bradham CA, Brenner DA, Cascio WE, Trost LC, Nishimura Y, Nieminen AL, Herman B. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *J Bioenerg Biomembr* 1999; 31:305-319
- Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002; 23:201-229
- Lieber CS. CYP2E1: from ASH to NASH. *Hepatol Res* 2004; 28:1-11

- Maltese WA. Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells. *FASEB J* 1990; 4:3319-3328
- Maltese WA, Defendini R, Green RA, Sheridan KM, Donley DK. Suppression of murine neuroblastoma growth in vivo by mevinolin, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Clin Invest* 1985; 76:1748-1754
- Mannaerts GP, van Veldhoven PP, Casteels M. Peroxisomal lipid degradation via beta- and alpha-oxidation in mammals. *Cell Biochem Biophys* 2000; 32:73-87
- Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001; 50:1844-1850
- Márk L, Katona A. Statinok és fibrátok lipidszint-moduláció túl, úgynevezett pleiotróp hatásai. *Cardiologia Hungarica* 1999; 28:131-136
- Marrero JA, Fontana RJ, Su GL, Conjeevaram HS, Emick DM, Lok AS. NAFLD may be a common underlying liver disease in patients with hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology* 2002; 36:1349-1354
- Mascaró C, Ortiz JA, Ramos MM, Haro D, Hegardt FG. Sterol regulatory element binding protein-mediated effect of fluvastatin on cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase transcription. *Arch Biochem Biophys* 2000; 374:286-292
- Matsusue K, Haluzik M, Lambert G, Yim SH, Gavrilova O, Ward JM, Brewer B Jr, Reitman ML, Gonzalez FJ. Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J Clin Invest* 2003; 111:737-747
- Mattiasson G, Shamloo M, Gido G, Mathi K, Tomasevic G, Yi S, Warden CH, Castilho RF, Melcher T, Gonzalez-Zulueta M, Nikolich K, Wieloch T. Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nat Med* 2003; 9:1062-1068
- McCullough AJ. The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2004; 8:521-533

Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Naturwissenschaften (Nature)* 1961; 191:144-148

Moyad MA, Sonnlleitner M. Prostate cancer and coronary heart disease: correlation or coincidence? *Urol Clin North Am* 2004; 31:207-212

Nair S, P Chacko V, Arnold C, Diehl AM. Hepatic ATP reserve and efficiency of replenishing: comparison between obese and nonobese normal individuals. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:446-470

Nair S, Mason A, Eason J, Loss G, Perillo RP. Is obesity an independent risk factor for hepatocellular carcinoma in cirrhosis? *Hepatology* 2002; 36:150-155

Nakashima A, Ohtawa M, Iwasaki K, Wada M, Kuroda N, Nakashima K. Inhibitory effects of fluvastatin and its metabolites on the formation of several oxygen species. *Life Sci* 2001; 69:1381-1389

Nakatani T, Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Miura S, Ezaki O. Mechanism for peroxisome proliferator-activated receptor- α activator-induced upregulation of UCP2 mRNA in rodent hepatocytes. *J Biol Chem* 2002; 277:9562-9569

Neuschwander-Tetri BA, Caldwell S. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD single topic conference. *Hepatology* 2003; 37:1202-1219

Pan M, Cederbaum AI, Zhang YL, Ginsberg HN, Williams KJ, Fisher EA. Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production. *J Clin Invest* 2004; 113:1277-1287

Paragh Gy, Márk L, Katona E. A statinok nem lipid hatásai. *Orv Hetil* 2004; 145:1903-1910

Park JW, Jeong G, Kim SJ, Kim MK, Park SM. Predictors reflecting the pathological severity of non-alcoholic fatty liver disease: comprehensive study of clinical and immunohistochemical findings in younger Asian patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22:491-497

Parker RA, Clark RW, Sit SY, Lanier TL, Grosso RA, Wright JJ. Selective inhibition of cholesterol synthesis in liver versus extrahepatic tissues by HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lipid Res* 1990; 31:1271-1282

Pecqueur C, Alves-Guerra MC, Gelly C, Levi-Meyrueis C, Couplan E, Collins S, Ricquier D, Bouillaud F, Miroux B. Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem* 2001; 276:8705-8712

Pérez-Carreras M, Del Hoyo P, Martín MA, Rubio JC, Martín A, Castellano G, Colina F, Arenas J, Solis-Herruzo JA. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 38:999-1007

Rashid A, Wu TC, Huang CC, Chen CH, Lin HZ, Yang SQ, Lee FY, Diehl AM. Mitochondrial proteins that regulate apoptosis and necrosis are induced in mouse fatty liver. *Hepatology* 1999; 29:1131-1138

Rikitake Y, Kawashima S, Takeshita S, Yamashita T, Azumi H, Yasuhara M, Nishi H, Inoue N, Yokoyama M. Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 2001; 154:87-96

Robertson G, Leclercq I, Farrel GC. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G1135-G1139

Rogler G, Lackner KJ, Schmitz G. Mevalonate is essential for growth of porcine and human vascular smooth muscle cells in vitro. *Basic Res Cardiol* 1995; 90:443-450

Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001; 120:1183-1192

Schulz S, Nyce JW. Inhibition of protein farnesyltransferase: a possible mechanism of tumor prevention by dehydroepiandrosterone sulphate. *Carcinogenesis* 1994; 15:2649-2652

Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, Ganz P, Oliver MF, Waters D, Zeiher A, Chaitman BR, Leslie S, Stern T; Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Study Investigators. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001; 285:1711-1718

Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J Hepatol* 2002; 37:56-62

Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995; 333:1301-1307

Skulachev VP. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1363:100-124

Soltys K, Dikdan G, Koneru B. Oxidative stress in fatty livers of obese Zucker rats: rapid amelioration and improved tolerance to warm ischemia with tocopherol. *Hepatology* 2000; 34:13-18

Soma MR, Parolini C, Donetti E, Fumagalli R, Paoletti R. Inhibition of isoprenoid biosynthesis and arterial smooth muscle cell proliferation. *J Cardiovasc Pharm* 1995; 25 (Suppl 4):S20-S24

Stuart JA, Cadenas S, Jekabsons MB, Roussel D, Brand MD. Mitochondrial proton leak and the uncoupling protein 1 homologues. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1504:144-158

Stuart JA, Harper JA, Brindle KM, Jekabsons MB, Brand MD. Physiological levels of mammalian uncoupling protein 2 do not uncouple yeast mitochondria. *J Biol Chem* 2001; 276:18633-18639

Sumi D, Hayashi T, Thakur NK, Jayachandran M, Asai Y, Kano H, Matsui H, Iguchi A. A HMG-CoA reductase inhibitor possesses a potent anti-atherosclerotic effect other than serum lipid lowering effects – the relevance of endothelial nitric oxide synthase and superoxide anion scavenging action. *Atherosclerosis* 2001; 155:347-357

Tominaga K, Kurata JH, Chen YK, Fujimoto, E, Miyagawa S, Abe I, Kusano Y. Prevalence of fatty liver in Japanese children and relationship to obesity. An epidemiological ultrasonography review. *Dig Dis Sci* 1995; 40:2002-2009

Tonsgard JH, Getz GS. Effect of Reye's syndrome serum on isolated chinchilla liver mitochondria. *J Clin Invest* 1985; 76:816-825

Uzvolgyi E, Katona A, Kertai P. Tumor cell implantation with use of Gelaspon gelatin sponge disc. *Cancer Lett* 1990; 51:1-5

Yang S, Lin HZ, Hwang J, Chacko VP, Diehl AM. Hepatic hyperplasia in noncirrhotic fatty livers: is obesity-related hepatic steatosis a premalignant condition? *Cancer Res* 2001; 61:5016-5023

Yang S, Zhu H, Li Y, Lin H, Gabrielson K, Trush MA, Diehl AM. Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress. *Arch Biochem Biophys* 2000; 378:259-268

Yeung MC. Accelerated apoptotic DNA laddering protocol. *Biotechniques* 2002; 33:734-736

Yuan JN, Tsai MY, Hegland J, Hunninghake DB. Effects of fluvastatin (XU 62-320), an HMG-CoA reductase inhibitor, on the distribution and composition of low density lipoprotein subspecies in humans. *Atherosclerosis* 1991; 87:147-157

Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 1997; 11:2295-2322

Van Harken DR, Dixon CW, Heimberg M. Hepatic lipid metabolism in experimental diabetes. V. The effect of concentration of oleate on metabolism of triglycerides and on ketogenesis. *J Biol Chem* 1969; 244:2278-2285

Vendemiale G, Grattagliano I, Caraceni P, Caraccio G, Domenicali M, Dall'Agata M, Trevisani F, Guerrieri F, Bernardi M, Altomare E. Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology* 2001; 33:808-815

Vitale M, Matola T, Rossi G, Laezza Ch, Fenzi G, Bifulco M. Prenyltransferase inhibitors induce apoptosis in proliferating thyroid cells through a p53-independent CrmA-sensitive, and caspase-3-like protease-dependent mechanism. *Endocrinology* 1999; 140:698-704

Wahren J, Sato Y, Ostman J, Hagenfeldt L, Felig P. Turnover and splanchnic metabolism of free fatty acids and ketones in insulin-dependent diabetics at rest and in response to exercise. *J Clin Invest* 1984; 73:1367-1376

Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of invasion and MMP-9 expression in NIH 3T3 and v-H-Ras 3T3 fibroblasts by lovastatin through inhibition of ras isoprenylation. *Oncology* 2000; 59:245-254

Wang W, Macaulay RJ. Apoptosis of medulloblastoma cells in vitro follows inhibition of farnesylation using manumycin A. *Int J Cancer* 1999; 82:430-434

Wong WW, Tan MM, Xia Z, Dimitrioulakos J, Minden MD, Penn LZ. Cerivastatin triggers tumor-specific apoptosis with higher efficacy than lovastatin. *Clin Cancer Res* 2001; 7:2067-2075

Zhang C, Baffy G, Perret P, Krauss S, Peroni O, Grujic D, Hagen T, Vidal-Puig AJ, Boss O, Kim Y, Zheng XX, Wheeler MB, Shulman GI, Chan CB, Lowell BB. Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell* 2001; 105:745-755

8. SAJÁT 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

9. TÁRGYSZAVAK, RÖVIDÍTÉSJEYZÉK

Elhízás, nem-alkoholos zsírmáj, uncoupling protein-2, akut májkárosodás, energia homeosztázis, reaktív oxigéngyökök, Kupffer-sejt, sejtspecifikus UCP2-expresszió, hepatocellularis carcinoma, fluvastatin, pleiotróp hatások, kemoprevenció

Key words: Obesity, non-alcoholic fatty liver disease, uncoupling protein-2, acute liver injury, energy homeostasis, reactive oxygen species, Kupffer cell, cell-specific UCP2 expression, hepatocellular cancer, fluvastatin, pleiotropic effects, chemoprevention

Az értekezésben használt rövidítések jegyzéke:

ACC: acetyl-CoA karboxiláz
ACL: ATP-citrát-liáz
ADP: adenzin-difoszfát
ALT: alanin-aminotranszferáz
AOX: acil-CoA oxidáz
ApoB: apolipoprotein B
ATP: adenzin-trifoszfát
AU: arbitrary units
bp: bázispár
CD: Cluster of Differentiation (antigén)
ChREBP: carbohydrate response element binding protein
CPT-1: karnitil-palmitoil transzferáz-1
CRP: C-reaktív protein
CYP: citokróm P450
DNS: dezoxi-ribonukleinsav
ETC: elektron transzport lánc, légzési lánc
EDTA: etiléndiamin-tetraacetát
EGTA: etilén-glikol-tetraacetát
FAS: zsírsav-szintetáz
FFA: free fatty acid
GBSS: Gray's balanced salt solution
GTP: guanozin-trifoszfát
HCC: hepatocellularis carcinoma
HCV: hepatitis C vírus
HE festés: hematoxilin-eozin festés
HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A
HNE: hidroxinonenal
HPF: high-power field
HSC: hepatic stellate cell
HSL: hormonszenzitív lipáz
IL: interleukin
IOD: integrated optical density
IU/L: international unit/liter
KRB: Krebs-Ringer buffer
LCAS: Lipoprotein and Coronary Atherosclerosis Study
LCE: hosszúláncú zsírsav-elongáz
LCM: laser capture microdissection
LDL: low density lipoprotein

L-PK: liver-type pyruvate kinase
MDA: malondialdehyd
MIRACL: Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering
mRNS: messenger ribonukleinsav
NAD: nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADH: redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid
NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease
NASH: non-alcoholic steatohepatitis
NF- κ B: nuclear factor kappa-B
NPC: nonparenchymás sejt
ob/ob: a leptin génjének ablációjával létrehozott obes genotípus
ob/ob:ucp2^{+/+}: leptindeficiens, UCP2-t expresszáló genotípus
ob/ob:ucp2^{-/-}: leptindeficiens, UCP2-re is ablált, azaz kettős knockout genotípus
PBS: phosphate-buffered saline
PC: parenchymás sejt
PCR: polymerase chain reaction
PPAR: peroxisome proliferator activator receptor
PUFA: többszörösen telítetlen zsírsav
RNS: ribonukleinsav
ROS: reactive oxygen species
RT: reverse transcription
SCD: sztearil-CoA deszaturáz
SD: standard deviáció
SDS: sodium dodecyl sulphate
SEM: standard error of mean
SREBP-1c: sterol regulatory element-binding protein-1c
TAE: Tris-acetát-EDTA
TBP: TATA box binding protein
TGF- β : tumor growth factor-beta
TNF- α : tumor necrosis factor-alpha
TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick-end labeling”
UCP: uncoupling protein
UCP2-KO: UCP2-knockout
uORF: upstream Open Reading Frame
VLDL: very low density lipoprotein
WOSCOP: West of Scotland Coronary Prevention
wt/wt: vad genotípus

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Paragh Györgynek és Baffy Györgynek. Mindkettejüktől a legfontosabbat, a gondolkodásmódot tanultam. Paragh professzor negyedéves medikus korom óta támogatja mindenben munkámat. Diákkörösként csatlakozva munkacsoportjához, számtalan alkalommal biztosított bizalmáról, segítőkészségéről. Emellett személyes kapcsolatainak kiaknázásával messzemenően hozzájárult külföldi tanulmányutamhoz. Klinikusi, tudományos és oktatói tevékenységem állandó, töretlen segítése miatt igazi mentorként tekintek rá.

Őszintén hálás vagyok Baffy Györgynek, a Brown University és Rhode Island Hospital Liver Research Center munkacsoportvezető gasztroenterológusának, akinek hihetetlenül magas szintű szakmai hozzáállása, őszinte emberisége nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre. Nagyon sokat kaptam tőle.

Köszönöm Fóris Gabriella és Kertai Pál professzoroknak a fluvastatinnal, illetve a patkányokkal végzett kísérletekhez nyújtott segítségét, bátorítását, önzetlen segítségét.

Köszönöm klinikánk kutatólaborjából Seres Ildikó tudományos főtanácsadónak a kísérleti munkában nyújtott segítségét.

Szintén köszönettel tartozom Kakuk György professzornak, hogy annak idején klinikájára felvett és munkámat a kezdetektől fogva mindenben támogatta.

Köszönöm Derdák Zoltánnak, a Providence-i laborban azóta is dolgozó ösztöndíjas kollégának, hogy hozzájárult a munka mélyrehatóbbá, alaposabbá válásához.

Végül köszönettel tartozom feleségemnek és kislányomnak, valamint szüleimnek, hogy a szeretetükkel, türelmükkel segítettek. Inspirációjuk sok erőt adott számomra.