

A D-vitamin metabolizmusa humán hepatocellularis carcinomában és az azt körülvevő tumormentes májszövetben

Horváth Evelin dr.¹ ■ Balla Bernadett dr.¹ ■ Kósa János Pál dr.¹
Lakatos Péter András dr.¹ ■ Lazáry Áron dr.⁴ ■ Németh Dániel dr.¹
Jozilan Hasan dr.¹ ■ Somorác Áron dr.² ■ Korompay Anna dr.²
Gyöngyösi Benedek dr.² ■ Borka Katalin dr.² ■ Kiss András dr.²
Kupcsulik Péter dr.³ ■ Schaff Zsuzsa dr.² ■ Szalay Ferenc dr.¹

Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, ¹I. Belgyógyászati Klinika,
²II. Patológiai Intézet, ³I. Sebészeti Klinika, Budapest
⁴Országos Gerincgyógyászati Központ, Budapest

Bevezetés: Az 1,25-dihidroxi-D₃-vitamin tumorelles hatása hepatocellularis carcinomában már részben ismert. *Célkitűzés:* Az 1,25-dihidroxi-D₃-vitamint inaktiváló *CYP24A1*-mRNS- és fehérjeexpresszió, az aktiváló *CYP27B1*- és a VDR-mRNS-expresszió mértékének összehasonlítása humán hepatocellularis carcinomában és az azt körülvevő tumormentes májszövetben. *Módszer:* 13 beteg friss fagyasztott májszövetmintáját a *CYP24A1*-mRNS- és fehérje-, 36 beteg paraffinba ágyazott májszövetmintáját használtuk a VDR- és a *CYP27B1*-mRNS-expresszió kimutatására. Az mRNS-expressziót RT-PCR-rel, a fehérjét immunhisztokémiai vizsgálatokkal mértük. *Eredmények:* A hepatocellularis carcinomaminták többségében kimutatható volt a *CYP24A1*-mRNS-expresszió, míg a nem tumoros májszövetminták egyikében sem. A *CYP27B1*- és VDR-expresszió szignifikánsan alacsonyabb hepatocellularis carcinomában a tumormentes májszövethez képest ($p < 0,05$). A *CYP24A1*-mRNS-expressziót fehérjeszintézis követi. *Következtetések:* A *CYP24A1* inaktiváló enzim jelenléte, az aktiváló *CYP27B1* és a VDR csökkent expressziója humán hepatocellularis carcinomában a D-vitamin csökkent helyi aktivitására enged következtetni, mint egy menekülő mechanizmus a tumor részéről a D-vitamin antitumorhatása ellen. *Orv. Hetil.*, 2016, 157(48), 1910–1918.

Kulcsszavak: hepatocellularis carcinoma, *CYP24A1*, *CYP27B1*, D-vitamin

Vitamin D metabolism and signaling in human hepatocellular carcinoma and surrounding non-tumorous liver

Introduction: 1,25-Dihydroxy vitamin D₃ mediates antitumor effects in hepatocellular carcinoma. *Aim:* We examined mRNA and protein expression differences in 1,25-Dihydroxy vitamin D₃-inactivating *CYP24A1*, mRNA of activating *CYP27B1* enzymes, and that of VDR between human hepatocellular carcinoma and surrounding non-tumorous liver. *Methods:* Snap-frozen tissues from 13 patients were studied for mRNA and protein expression of *CYP24A1*. Paraffin-embedded tissues from 36 patients were used to study mRNA of VDR and *CYP27B1*. mRNA expression was measured by RT-PCR, *CYP24A1* protein was detected by immunohistochemistry. *Results:* Expression of VDR and *CYP27B1* was significantly lower in hepatocellular carcinoma compared with non-tumorous liver ($p < 0.05$). The majority of the HCC samples expressed *CYP24A1* mRNA, but neither of the non-tumorous liver. The gene activation was followed by *CYP24A1* protein synthesis. *Conclusions:* The presence of *CYP24A1* mRNA and the reduced expression of VDR and *CYP27B1* mRNA in human hepatocellular carcinoma samples indicate decreased bioavailability of 1,25-Dihydroxy vitamin D₃, providing an escape mechanism from the anti-tumor effect.

Keywords: hepatocellular carcinoma, *CYP24A1*, *CYP27B1*, vitamin D

Horváth, E., Balla, B., Kósa, J. P., Lakatos, P. A., Lazáry, Á., Németh, D., Jozilan, H., Somorácz, Á., Korompay, A., Gyöngyösi, B., Borka, K., Kiss, A., Kupcsulik, P., Schaff, Zs., Szalay, F. [Vitamin D metabolism and signaling in human hepatocellular carcinoma and surrounding non-tumorous liver]. *Orv. Hetil.*, 2016, 157(48), 1910–1918.

(Beérkezett: 2016. augusztus 6.; elfogadva: 2016. október 1.)

Rövidítések

AFP = alfa-foetoprotein; A.U. = Arbitrary Unit; BMI = body mass index; *CYP24A1* = vitamin D₂₄-hidroxiláz enzim; *CYP27B1* = 25-hidroxivitamin-D₃ 1-alfa-hidroxiláz; DNS = dezoxiribonukleinsav; ETT = Egészségügyi Tudományos Tanács; HBV = hepatitis B-vírus; HCC = hepatocellularis carcinoma; HCV = hepatitis C-vírus; mikro-RNS = mikro-ribonukleinsav; ns = nem szignifikáns; PCR = polimeráz láncreakció; RNáz = ribonukleáz; RNS = ribonukleinsav; RT-PCR = real-time polimeráz láncreakció; SD = standard deviáció; TUKEB = Tudományos és Kutatásügyi Bizottság; VDR = D-vitamin-receptor

A leggyakoribb primer májrák a hepatocellularis carcinoma, az ötödik leggyakoribb daganatos betegség és a daganatos halálozásban világviszonylatban a harmadik helyen szerepel [1]. Előfordulása és etiológiája igen változatos földrajzi különbségeket mutat. A Nemzeti Rákregiszter adatai alapján Magyarországon évente körülbelül 600 új esetet diagnosztizálnak, és mintegy ugyanennyire tehető az évente hepatocellularis carcinomában elhalálozott betegek száma [2]. A hepatocellularis carcinoma az esetek 70–90%-ában májcirrhosis talaján alakul ki [3–5]. A leggyakoribb etiológiai tényezők világviszonylatban az alkohol, a hepatitis B-, a hepatitis C-vírus-fertőzés, a nem alkoholos steatohepatitis és az aflatoxinmérgezés [3]. Az 1,25-dihidroxi-D₃-vitamin tumorellenes hatása számos rosszindulatú daganatban ismert (emlő, prosztatata, bőr, vastagbél) [6, 7]. A szérum-1,25-dihidroxi-D₃-vitamin alacsony szintje összefüggésbe hozható több daganat gyakoribb előfordulásával (vastagbél, prosztatata, bőr, emlő) [8–12]. Hepatocellularis carcinomára vonatkozó ilyen irányú adat kevés van. Vizsgálták a VDR-polimorfizmus és a HCC előfordulása közötti összefüggést [13]. Ismert, hogy az 1,25-dihidroxi-D₃-vitamin gátolja a HCC kialakulását az immunsejtekben expresszálandó p27(kip1) fehérje túlszabályozása és a gyulladáshoz vezető citokinek termelésének csökkentésén keresztül [14].

Az 1,25-dihidroxi-D₃-vitamin intracelluláris hatásainak nagy részét a D-vitamin receptorán (VDR) keresztül fejt ki, amely a transzkripció faktorok nagy magi receptor szupercsaládjába tartozik [15]. A hormonnak szerepe van a máj regenerációs folyamatában is [16]. 1,25-dihidroxi-D₃-vitamin-analóggal végzett fázis II vizsgálatban a hepatocellularis carcinomás betegek egyharmadában nem progrediált a betegség vagy teljes tumorellenes választ észleltek [17].

Az 1,25-dihidroxi-D₃-vitamin metabolizmusa összetett szabályozómechanizmusokon keresztül történik. Ebben kulcsszerepe van a hormon végső hidroxilálását és ezzel aktiválását végző *CYP27B1* enzimnek, valamint a *CYP24A1* fehérjének, amely az aktív hormont inaktiválja [18–21].

Az 1,25-dihidroxi-D₃-vitamin metabolizmusa feltételezhetően különbözik a humán egészséges májszövetben, a cirrhoticus májban és a hepatocellularis carcinomában. Nem ismert a különbség mértéke és módja sem. Ezért célunk volt összehasonlítani ugyanazon betegből származó hepatocellularis carcinomában és a tumormentes környező májszövetben az 1,25-dihidroxi-D₃-vitamin-metabolizmust. Mindehhez vizsgáltuk és összehasonlítottuk a lebontást végző *CYP24A1*-mRNS- és fehérje-, az aktiváló *CYP27B1*- és a VDR-mRNS-expresszió mértékét a fenti mintákban. Továbbá összefüggést kerestünk a fenti expressziós értékek és a májdaganat etiológiája és grade-értéke, valamint a betegek szérum-AFP-, kalciumszintjei és egyéb klinikopatológiai értékei között.

Módszer

A vizsgálatba összesen 49 beteget vontunk be a Semmelweis Egyetem, Tudományos Kutatásügyi Bizottság által kiadott engedély birtokában (ETT TUKEB 5637-0/2010-1018EKU – 402/PI/010). A humán szövettani minták a 2003 és 2011 között a Semmelweis Egyetemen diagnosztizált és az I. Sebészeti Klinikán terápiás céllal májresekción átesett hepatocellularis carcinomában szenvedő betegek tumorszövetéből, illetve az azt körülvevő tumormentes májszövetből származnak. Valamennyi minta patológiai feldolgozása és kiértékelése a Semmelweis Egyetem II. Patológiai Intézetében történt.

A *CYP24A1*-mRNS-expresszió vizsgálatához 13 beteg daganatos és tumormentes májszövetének friss fagyasztott mintáit használtuk fel. A májresekción nyert szövettani minták egy részét azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük, és –80 °C-on tároltuk az RNS-izolálásig. A minta másik feléből formaldehidbe való fixálás, majd paraffinba ágyazást követően hematoxin-eozinnal festett szövettani metszet készült, amit az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz használtunk fel. A 13 beteg férfi/nő aránya 8/5, átlagéletkoruk 64 ± 14,8 év. A HCC etiológiai megoszlása a következő: 6 alkoholos eredetű, 2 HCV-, 1 HBV-fertőzés talaján kialakult cirrhosis és 4 kriptogén eredetű HCC, amelyből 2 beteg diabetes mel-

litusban is szenvedett. Egy 21 éves fiatal nőbeteg HCC-je ép májban kialakult fibrolamellaris carcinoma volt. A betegek klinikopatológiai adatait az 1. táblázat foglalja össze.

A *CYP27B1*- és a VDR-mRNS vizsgálatához és összehasonlításához 36, hepatocellularis carcinómában szenvedő beteg daganatos és tumormentes májszövetének paraffinba ágyazott szövettani mintáiból készült metszeteit használtuk fel. A 36 beteg férfi/nő aránya 27/9, átlagéletkoruk $64 \pm 12,66$ év. A májrák etiológiai megoszlása a következő: 12 alkoholos cirrhosis, 8 HCV-, 5 HBV-fertőzés és 11 kriptogén májrák, amelyből 7 beteg esetén volt ismert diabetes mellitus. A betegek klinikopatológiai adatait a 2. táblázat foglalja össze.

A friss fagyasztott mintákból az RNS-izolálást High Pure Total RNA Isolation Kit (Roche, Indianapolis, IN, Amerikai Egyesült Államok) segítségével végeztük a gyártó útmutatása szerint. Az izolált RNS-t felhasználásig -80 °C-on tároltuk. A 36 betegből származó, paraffinba ágyazott tumoros és tumormentes májszövetből a High Pure RNA Paraffin Kit (Roche, Indianapolis, IN, Amerikai Egyesült Államok) segítségével totál RNS-t izoláltunk a gyártó útmutatása alapján. A fenti módsze-

rekkel izolált RNS koncentrációját NanoDrop spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, Montchanin, DE, Amerikai Egyesült Államok) határoztuk meg, az RNS minőségi kontrollját RNáz-mentes 1%-os agarózgélén (Sigma-Aldrich, St. Louis, Amerikai Egyesült Államok) történő futtatással végeztük. Csak a szabályos 18S és 28S riboszomális RNS-mintázatot mutató próbákat használtuk fel a további vizsgálatokhoz.

A génexpressziót valós idejű RT-PCR vizsgálattal mértük. 500 ng RNS-t írtunk át cDNS-sé random hexamer primerek és Moloney Murine leukaemiavírus (M-MLV) reverz transzkriptáz segítségével a gyártó (Promega, Madison, WI, Amerikai Egyesült Államok) utasítása szerint. Próbánként 500 ng RNS-t, 6 μ l reverz transzkriptáz puffert, 1,5 μ l random hexamer primert, 3 μ l dNTP-t, 1,5 μ l reverz transzkriptázt használtunk fel. A humán VDR-, *CYP27B1*- és *CYP24A1*-expresszió összehasonlító vizsgálatát komparatív $\Delta\Delta$ CT-módszerrel végeztük (SDS szoftver, Applied Biosystems, Foster City, CA, Amerikai Egyesült Államok). A vizsgált gének expressziós értékeinek kiszámításához az endogén kontrollként használt ubiquitin C-expresszió szintjéhez viszonyított értékeit használtuk. A valós idejű RT-PCR vizsgálathoz a POWER SYBR® Green PCR Master Mixet és az ABI StepOnePlus Real-Time PCR Systemet (mindkettő Applied Biosystems) használtuk. A polimeráz lánreakció során alkalmazott protokoll a következő volt: 2 percig 50 °C, 2 percig 94 °C, majd 40 ciklus (15 perc 94 °C és 30 másodperc 60 °C). A specifikus szensz és antiszensz primerek (Applied Biosystems) a következők voltak: Hs00167999_m1 a *CYP24A1*, Hs00168017_m1 a *CYP27B1* és Hs00172113_m1 a VDR esetén.

A *CYP24A1* fehérje kimutatásához kétlépcsős indirekt immunperoxidáz módszert alkalmaztunk az mRNS vizsgálatához alkalmazott friss fagyasztott minták 5 μ m vastag paraffinba ágyazott metszetein. Primer antitestként a WH0001591M7 klónt (egérben előállított monoklonális anti-*CYP24A1*, klón 1F8 antitest; Sigma-Aldrich) használtuk a gyártó utasításait követve 1:200-szoros hígításban. Normális veseszövetet alkalmaztunk pozitív kontrollként. A *CYP24A1* protein expressziójának mértékét szemikvantitatív módon értékeltük. Véletlenszerűen kiválasztott 10 különböző látótérben 500 sejtet számoltunk meg 400-szoros nagyításban (Nikon Eclipse E400, Tokió, Japán). A festődés mértékét a következő módon osztályoztuk: nincs festődés (negatív), enyhe pozitívitas (+), mérsékelt pozitívitas (++) , erős pozitívitas (+++).

Az adatokat Windows alapú SPSS (18. verzió, IBM, Armonk, NY, Amerikai Egyesült Államok) programmal értékeltük. A végső eredményt két független változó átlagából számoltuk. Az eredményeket átlag \pm standard hibaként adtuk meg. A statisztikai analízist kétmintás Student t-próbával végeztük. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0,05$ értéket vettük.

1. táblázat | A betegek klinikai paraméterei a *CYP24A1*-expresszió vizsgálatához

Paraméterek	Májcirrhosis ($n_1 = 9$)	Májcirrhosis nélkül ($n_2 = 4$)
Kor (év \pm SD)	$67,6 \pm 7,2$	$56,0 \pm 24,8$
Nem (férfi/nő)	6/3	2/2
AFP (mg/ml \pm SD)	$80,66 \pm 119,0$	$1220,3 \pm 2107,3$
Szérumkalcium (mmol/L \pm SD)	$2,07 \pm 0,15$	$2,40 \pm 0,15$
Tumor mérete (cm^3)	$964,5 \pm 1609,8$	$1246,1 \pm 1163,8$
Szolid/multiplex tumor	7/2	4/0
Metasztázis jelenléte	2	1

AFP = alfa-foetoprotein; SD: standard deviáció

2. táblázat | A betegek klinikai paraméterei a *CYP27B1*- és VDR-mRNS-expresszió vizsgálatához

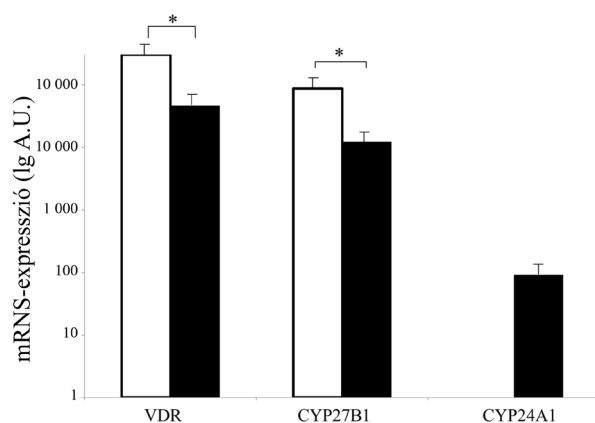
Paraméterek	Májcirrhosis ($n_1 = 27$)	Májcirrhosis nélkül ($n_2 = 9$)
Kor (év \pm SD)	$64,6 \pm 10,4$	$62,3 \pm 16,7$
Nem (férfi/nő)	23/4	6/3
AFP (mg/ml \pm SD)	$28515,9 \pm 90049,1$	$182,4 \pm 360,4$
Szérumkalcium (mmol/L \pm SD)	$2,20 \pm 0,20$	$2,63 \pm 0,98$
Tumor mérete (cm^3)	$285,0 \pm 407,2$	$305,98 \pm 465,7$
Szolid/multiplex tumor	23/4	9/0
Metasztázis jelenléte	4	1

AFP = alfa-foetoprotein; SD = standard deviáció

Eredmények

Csökkent VDR-mRNS-expresszió hepatocellularis carcinomában

36 beteg paraffinba ágyazott májszövetmintáin végzett vizsgálataink azt igazolták, hogy az 1,25-dihidroxi-D₃-vitamin receptora, a VDR-mRNS valamennyi daganatos májszövetben és az azt körülvevő tumormentes májszövetben is expresszálódik, habár igen különböző mértékben. Valamennyi hepatocellularis carcinomamintát összehasonlítva ugyanazon betegekből származó tumor-

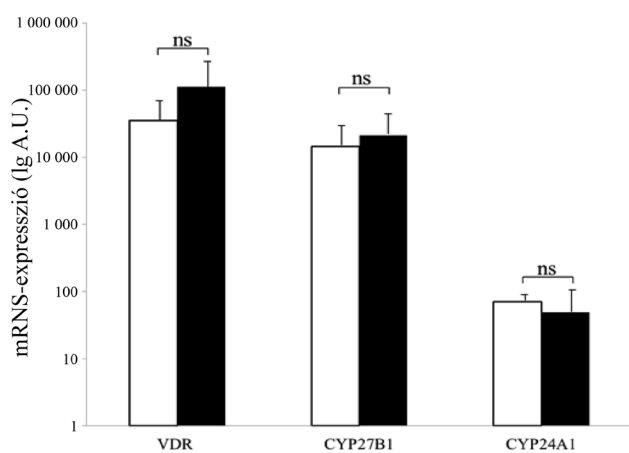


□ Tumormentes májszövet
■ Hepatocellularis carcinomaszövet

1. ábra

VDR-, CYP27B1- és CYP24A1-mRNS-expresszió összehasonlítása hepatocellularis carcinomában a környező tumormentes májszövettel

A.U. = Arbitrary Unit; * $p < 0,05$

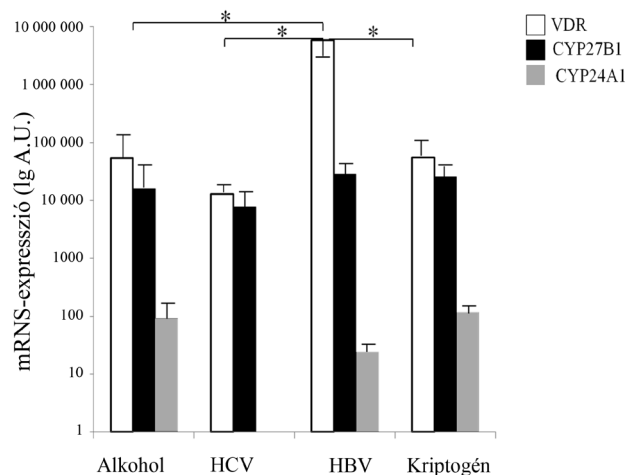


□ Nem cirrhoticus májban kialakult hepatocellularis carcinoma
■ Cirrhoticus májban kialakult hepatocellularis carcinoma

2. ábra

VDR-, CYP27B1- és CYP24A1-mRNS-expresszió-különbségek a cirrhoticus nélküli májban és a cirrhoticus talján kialakult hepatocellularis carcinoma-szövetminták között

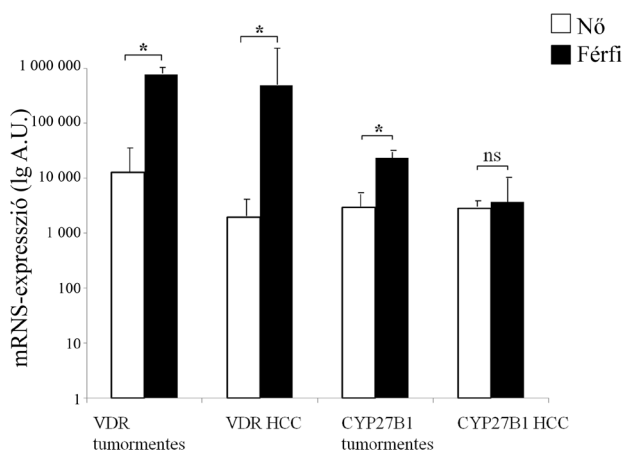
A.U. = Arbitrary Unit; ns = nem szignifikáns



3. ábra

VDR-, CYP27B1- és CYP24A1-mRNS-expressziók összehasonlítása alkohol, hepatitis C-vírus- (HCV-), hepatitis B-vírus- (HBV-) fertőzés és kriptogén etiológiájú hepatocellularis carcinomaszövetben

A.U. = Arbitrary Unit; * $p < 0,05$



4. ábra

Nemek közötti VDR- és CYP27B1-mRNS-expresszió-különbségek hepatocellularis carcinomában (HCC) és az azt körülvevő tumormentes májszövetben

A.U. = Arbitrary Unit; * $p < 0,05$; ns = nem szignifikáns

mentes májszövettel, a receptor mRNS-expressziója szignifikánsan csökkent hepatocellularis carcinomaszövetben a tumormentes májszövethez képest (ubiquitin C-re normalizált expresszió: $44046,80 \pm 22338,75$ versus $304493,83 \pm 96655,44$; $p < 0,05$) (1. ábra). Nincs különbség a cirrhosis talján és cirrhosis nélküli májban kialakult hepatocellularis carcinoma-szövetminták VDR-expressziója között ($113243,81 \pm 68675,28$ versus $35417,67 \pm 25937,91$; $p = 0,7$) (2. ábra). Érdekes és új adat, hogy a HBV-infekció talján kialakult HCC-ben szignifikánsan magasabb a VDR expressziója ($5890581,5 \pm 5873880,36$) a HCV ($13066,33 \pm 5575,24$; $p = 0,04$), illetve a kriptogén etiológiájú ($54778,43 \pm 39119,69$; $p = 0,04$) daganathoz képest (3. ábra). Csupán a kriptogén etiológia esetén mutatha-

tó ki szignifikáns VDR-mRNS-expresszió-csökkenés a tumorban ($54778,43 \pm 39119,69$ versus $450697,62 \pm 146634,25$; $p = 0,04$) a tumormentes májszövethez képest. További érdekes adat a nemek között megfigyelhető VDR-expresszió-különbségek. Nemcsak a hepatocellularis carcinomaszövetben ($1978,14 \pm 1121,48$ versus $494907,22 \pm 418109,39$; $p = 0,02$), hanem a tumormentes májszövetben ($12663,00 \pm 12043,94$ versus $638079,67 \pm 286809,06$; $p = 0,05$) is alacsonyabb a VDR expressziója nőkben etiológiától függetlenül (4. ábra). A HCC-ben észlelt VDR-mRNS-expresszió mértéke pozitív korrelációt mutat a betegek szérumkalcium- és -AFP-szintjével (3. táblázat).

Csökkent CYP27B1-mRNS-expresszió hepatocellularis carcinomában

A VDR-mRNS-hez hasonlóan szintén szignifikánsan alacsonyabb CYP27B1 1,25-dihidroxi-D₃-vitamint aktiváló enzim mRNS-expressziót találtunk hepatocellularis carcinomában a környező tumormentes májszövethez képest a 36 beteg paraffinba ágyazott szövetének vizsgálata során ($31402,40 \pm 7281,92$ versus $87312,75 \pm 12382,22$; $p < 0,05$) (1. ábra). Ebben az esetben sem volt különbség a cirrhosis talaján kialakult daganat és a cirrhosis nélküli májban kialakult hepatocellularis carcinoma között ($21261,70 \pm 10311,49$ versus $14747,44 \pm 10755,9$; $p = 0,9$) (2. ábra). Nem volt különbség a különböző etiológia talaján kialakult hepatocellularis carcinomaminták között a CYP27B1 tekintetében (3. ábra). Hasonlóan nem találtunk eltérő expressziós mintázatot a különböző differenciáltságú tumoros májminták között sem. A VDR-hez hasonló nemek közötti expressziókülönbség csupán a nem tumoros minták között volt megfigyelhe-

tő: csökkent CYP27B1-mRNS-expresszió a női nemből a férfiakhoz képest ($2969,57 \pm 1683,54$ versus $98792,10 \pm 38549,52$; $p = 0,03$) (4. ábra).

CYP24A1-mRNS-expresszió hepatocellularis carcinomában

A 13 friss fagyasztott tumor környezetéből származó 13 minta egyikében sem expresszálódik kimutatható mértékben az 1,25-dihidroxi-D₃-vitamint inaktíváló CYP24A1-mRNS. Ezzel ellentétben a 13 hepatocellularis carcinomamintából 8 esetben kimutatható volt az mRNS expressziója ($90,62 \pm 38,94$). A VDR-hez és a CYP27B1-hez hasonlóan a CYP24A1 esetén sem találtunk különbséget a cirrhosis talaján és a cirrhosis nélkül kialakult májdaganatos minták között ($49,25 \pm 37,00$ versus $70,42 \pm 29,49$; $p = 0,3$) (2. ábra).

CYP24A1 fehérje expressziója hepatocellularis carcinomában

Erős immunhisztokémiai pozitívitas (+++) volt megfigyelhető a hepatocellularis szövetmintákban a nem tumoros környező májszövethez képest (5. ábra). A CYP24A1 fehérje expressziója, az irodalomban leírtaknak megfelelően, a daganatos sejtek citoplazmájában volt megfigyelhető az enzim mitokondriális elhelyezkedésének megfelelően.

Megbeszélés

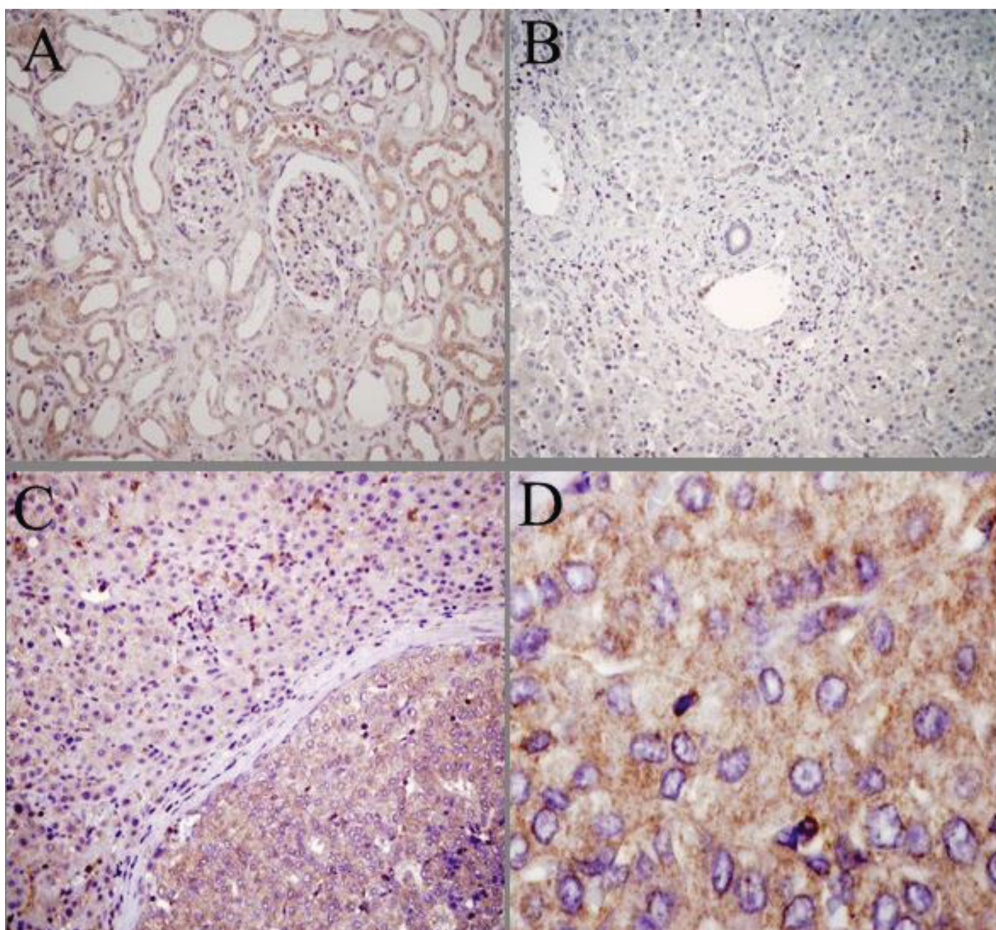
Az 1,25-dihidroxi-D₃-vitamin összetett metabolizmusának megértése céljából 49, hepatocellularis carcinomában szenvedő beteg daganatszövetében és az azt körülvevő tumormentes májszövetben vizsgáltuk a CYP24A1, a CYP27B1 és a VDR jelenlétét. Mai tudásunk szerint ez az első olyan, irodalomban ismert vizsgálat, amely összehasonlítja az ugyanazon betegből származó májrakos szövetben lévő fent említett expressziós értékeket a daganat körüli nem tumoros májszövetben lévő expresszióval, továbbá összefüggést keres az etiológiai tényezők és egyéb klinikopatológiai adatok között. Vizsgálataink során kimutattuk, hogy az 1,25-dihidroxi-D₃-vitamin aktiválását végző CYP27B1 enzim és a VDR mind a tumoros, mind a tumormentes májszövetben kimutatható, habár igen különböző mértékben.

Az 1,25-dihidroxi-D₃-vitamin daganatellenes hatása számos rosszindulatú daganat patogenezisében szerepet játszik. *In vitro* és *in vivo* vizsgálatok zajlanak a számos terápiás próbálkozás ellenére is igen rossz prognózisú hepatocellularis carcinoma carcinogenesisében betöltött szerepéről és esetleges terápiás alkalmazásáról [17, 22, 23]. Vita tárgyát képezi az alacsonyabb szérum-1,25-dihidroxi-D₃-vitamin-szint és a hepatocellularis carcinoma kialakulásának magasabb kockázata között fennálló összefüggés [24, 25]. Huang és munkacsoportja a közel-

3. táblázat | A VDR- és CYP27B1-expresszió mértéke hepatocellularis carcinomaszövetben és a tumorparaméterek közötti összefüggés

Klinikai és tumorparaméterek	p-érték VDR	p-érték CYP27B1
Kor	0,21	0,24
Nem	0,016*	0,815
Grade	0,88	0,26
Tumornekrózis	0,393	0,433
Érinvázio	0,608	0,779
Cirrhosis	0,747	1,00
Etiológia	0,216	0,721
Stádium	0,073	0,65
Szolid-multiplex	0,774	0,387
Metasztázis	0,689	0,52
Diabetes mellitus	0,138	0,925
AFP	0,034*	0,067
Szérumkalcium	0,04*	0,12

AFP = alfa-fetoprotein; szignifikáns = * $p < 0,05$.



5. ábra | *CYP24A1* enzim expressziójának immunhisztokémiai kimutatása hepatocellularis carcinómában és a környező tumormentes májszövetben. A barna szín jelzi a pozitív reakciót. A sejtmagokat hematoxilinnal festettük (kék). A) Normális veseszövet (200-szoros nagyítás). B) Tumormentes cirrhoticus máj *CYP24A1*-expresszió nélkül (200-szoros nagyítás). C) HCC és környező tumormentes májszövet határa. Magas a *CYP24A1* fehérje expressziója hepatocellularis carcinómában a tumormentes májszövethez képest (200-szoros nagyítás). D) HCC-szövet magas *CYP24A1* fehérje expressziója (600-szoros nagyítás)

múltban igazolta, hogy az 1,25-dihidroxi- D_3 -vitamin hepatocellularis carcinómában megfigyelt antitumorhatásának egyik lehetséges mechanizmusa a *HDAC2* fehérje fokozott expresszióján keresztül valósul meg [26]. Habár az 1,25-dihidroxi- D_3 -vitamin szisztémás *in vivo* alkalmazását jelentősen korlátozza hypercalcaemiás hatása, és csupán a betegek egy része reagált teljes válasszal vagy nem progrediált a betegség az 1,25-dihidroxi- D_3 -vitamin-analóg kezelés során [17, 27]. Mindezek alapján célszerűnek látszik az egyes hepatocellularis carcinomás betegek között lévő klinikopatológiai különbségek vizsgálata és ezek szerepének elemzése az 1,25-dihidroxi- D_3 -vitamin-kezelésre adott válaszban.

Az elmúlt években végzett számos kutatás is igazolja a VDR-expresszió élettani jelentőségét malignus daganatokban, mint emlő-, prosztatá- és pajzsmirigy-carcinómában [28–30]. Humán vastagbélrákban a VDR-expressziós aktivitás összefüggésben van a malignitás mértékével [31]. Vastagbél-adenocarcinómában a VDR-mRNS expressziója csökken a differenciáltsági fok csökkenésével, és a VDR alacsonyabb expressziója összefüggést mutat a daganat rosszabb prognózisával [31, 32].

Saját vizsgálatunkban nem találtunk összefüggést a VDR-expresszió mértéke és a daganat differenciáltsági foka között. Ennek egyik magyarázata lehet, hogy a hepatocellularis carcinoma patológiai szempontból is igen heterogén daganat, és egy tumoron belül számos eltérő differenciáltságú szubtumorkok fordulhatnak elő.

A VDR jelenlétét daganatmentes májban és hepatocellularis carcinómában már korábban leírták [33–36]. Élettani kutatásokból ismert, hogy az emberi egészséges máj felveszi a vérből az 1,25-dihidroxi- D_3 -vitamint és az epével eltávolítja azt [37]. Több vizsgálat felvetette annak a lehetőségét, hogy a VDR-expresszió jelenlétének védős szerepe lehet a hepatocarcinogenesisrel szemben [22, 38]. *Segura és munkacsoportja* igazolta, hogy a hepatocyták, a biliaris traktus sejtei és a máj nem parenchymás sejtei is pozitívítást mutatnak a VDR-fehérjére [39]. Ezzel ellentétben *Gascon-Barré és munkacsoportja* a VDR gén transzkripciójának hiányát mutatta ki ép májsejtekben, miközben a sinusoidális és epeúti sejtpopulációk expresszálják a receptort [33]. Mindezek magyarázatul szolgálhatnak az általunk kapott eltérő VDR-expressziós értékekre, aminek vizsgálatához teljes

májszövetet használtunk, nem téve különbséget az egyes sejttípusok (hepatocyta, epeúti sejt) között.

Ismert, hogy a VDR-mRNS-expresszió poszttranszkripció szabályozás alatt is áll mikro-RNS-ek közreműködésével [40]. Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a VDR-mRNS expressziója alacsonyabb ugyanazon beteg hepatocellularis carcinomaszövetében, összehasonlítva a nem tumoros daganat körüli májszövettel. Hasonló eredményeket találtak humán vastagbél-, emlő- és tüdő-daganatos szövetben, viszont petefészek-daganatokban ennek ellenkezője, a VDR fokozott expressziója mutatható ki a nem tumoros petefészekhez képest [41, 42]. Ezen túlmenően prospektív vizsgálatok kimutatták, hogy a magas VDR-fehérje-expressziót mutató prosztata-daganatos férfi betegek kedvezőbb klinikopatológiai paraméterekkel rendelkeznek az alacsony VDR-expressziót mutató társaikhoz képest [29, 43]. Nyelőcső-adenocarcinómában is a VDR-expresszió mértéke prediktív markernek tekinthető [44].

Nem ismert teljes mértékben, hogy milyen mechanizmusok felelősek egyes malignus daganatokban megfigyelhető alacsonyabb VDR-expresszióért. Egyes vizsgálatok szerint hepatocellularis carcinómában a Krüppel-like faktor 4 (KLF4) expressziójának elvesztése, valamint a Snail fehérje túlzott expressziója vezet a VDR alacsonyabb expressziójához [45, 46]. Az irodalmi adatokkal megegyezően nem találtunk összefüggést a hepatocellularis carcinomaszövet VDR-expresszió mértéke és a betegek túlélése között [46]. Vizsgálataink során nőbetegekben alacsonyabb VDR-mRNS-expressziót mutattunk ki a daganatos szövetben a férfi betegekhez képest. Ismert a VDR jelátviteli útvonal és az ösztrogén mediálta sejtproliferáció és -differenciáció közötti kapcsolat [47]. Több kutatócsoport is igazolta korábban, hogy az emlő ösztrogénreceptor-pozitív malignus daganatában alkalmazott 1,25-dihidroxi-D₃-vitamin antitumorhatása az ösztrogénreceptor alulszabályozásán keresztül érvényesül [48, 49]. További vizsgálatokra van szükség a nemek közötti VDR-expressziós különbségek pontosabb megértéséhez.

A HCC-ben talált VDR-mRNS-expresszió mértéke és a betegek szérumkalcium- és -AFP-szintje közötti pozitív korreláció magyarázatára kevés adat van az irodalomban. Állatkísérletekből ismert, hogy a szérum alacsonyabb kalcium- és D-vitamin-szintje a mellékpajzsmirigyben a VDR-mRNS-expresszió csökkenésével jár, érthető patofiziológiai okokra visszavezethetően [50]. HCC-re vonatkozó ilyen adat nincs az irodalomban, mint ahogy az AFP-vel való összefüggésre sem.

Hepatocellularis carcinómában a környező tumormentes májszövethez képest a VDR-mRNS-hez hasonlóan szignifikánsan alacsonyabb *CYP27B1* 1,25-dihidroxi-D₃-vitamin-aktiváló enzim mRNS-expressziót találtunk.

Az irodalomból ismert a hepatocellularis carcinómában expresszáldott *CYP27B1* enzim jelenléte [51], azonban a tumormentes májjal ez idáig nem történt összehasonlítás.

Ezzel ellentétben a hormont inaktíváló *CYP24A1* enzim mRNS-e nem expresszáldott a nem tumoros májszövetben, ugyanakkor a hepatocellularis carcinomaszövetek nagy részében kimutatható volt. A hepatocellularis carcinómában talált eredményeink megegyeznek az irodalomban ismert emberi malignus vastagbél-, prosztata-, pajzsmirigy- és nyelőcső-daganatokban leírt eredményekkel [32, 42, 43, 52, 53]. A *CYP24A1*-expresszió mértéke negatív összefüggést mutatott a prognózissal tüdő-adenocarcinómában [54]. Vizsgálataink során ilyen összefüggést hepatocellularis carcinoma esetén nem találtunk, ami a betegek kis számával is magyarázható. További, nagyobb betegszámú vizsgálatra van szükség az expressziós értékek és a betegek túlélése közötti esetleges összefüggések kimutatására HCC-ben.

Csökcent *CYP27B1*- és emelkedett *CYP24A1*-expressziót cholangiocarcinoma esetén már korábban kimutattak [55]. Az irodalomból ismert, hogy hepatitis C-vírus-fertőzés esetén a májszövetben megemelkedik a helyi 1,25-dihidroxi-D₃-vitamin-aktivitás az inaktíváló *CYP24A1*-expresszió csökkenésének hatására [56]. Egyik hepatitis C-vírus-fertőzött betegünk hepatocellularis carcinómájában sem volt kimutatható a *CYP24A1* expressziója.

Következtetések

A hepatocellularis carcinómában a tumormentes májszövethez képest talált alacsonyabb *CYP27B1*- és VDR-expresszió utalhat a májráksejtek 1,25-dihidroxi-D₃-vitamin antitumorhatásával szembeni csökkent érzékenységre. Ezzel párhuzamosan az inaktíváló *CYP24A1* enzim pozitívítása a tumorsejtek 1,25-dihidroxi-D₃-vitamin lebontó képességére utal. Ez lehet az egyik oka a klinikai vizsgálatok során tapasztaltaknak, miszerint a hepatocellularis carcinómás betegek nagy része nem reagál az alkalmazott 1,25-dihidroxi-D₃-vitamin-kezelésre. Ezen új adatok alapján feltételezhető, hogy a jövőben hatékonyabb lenne az 1,25-dihidroxi-D₃-vitamin HCC-ellenes hatása jól megválasztott, szelektált betegek esetén. Továbbá az 1,25-dihidroxi-D₃-vitammal együttesen adott, irodalomból jól ismert, *CYP24A1*-gátlók fokozhatják a hormon antitumor hatását.

Anyagi támogatás: H. E. 2009 és 2012 között a Semmelweis Egyetem Doktori Iskolájának PhD-ösztöndíjában részesült.

Szerzői munkamegosztás: H. E.: Betegek adatainak gyűjtése és rendezése, szövetminták összegyűjtése, molekuláris biológiai és immunhisztokémiai reakciók elvégzése és értékelése, ábrák szerkesztése, a kézirat megírása és szerkesztése. B. B.: Molekuláris biológiai vizsgálatok elvégzése, a kézirat szerkesztése. K. J. P.: Laboratórium bizto-

sítása, molekuláris biológiai vizsgálatok kiértékelése, kézirat szerkesztése. L. P. A.: Laboratórium biztosítása, a vizsgálat megtervezése és koordinálása, a kézirat szerkesztése. L. Á.: Statisztikai analízis. N. D., J. H.: Betegek adatainak gyűjtése és rendezése. S. Á., K. A., Gy. B.: Betegek adatainak és szövetmintáinak összegyűjtése. B. K.: Immunhisztokémiai vizsgálatok megtervezése és kivitelezése, a kézirat szerkesztése. K. A.: Immunhisztokémiai laboratórium biztosítása, a kézirat szerkesztése. K. P.: A betegek májszövetmintáinak sebési úton történő reszekálása és biztosítása kutatás céljára, betegek adatainak biztosítása. Sch. Zs.: Laboratórium biztosítása, betegek adatainak és szövetmintáinak rendelkezésre bocsátása, a kézirat szerkesztése. Sz. F.: A vizsgálat megtervezése és koordinálása, a laboratórium biztosítása, molekuláris biológiai és immunhisztokémiai vizsgálatok megtervezése, az adatok kiértékelése, a kézirat megírása és szerkesztése. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

Érdekltségek: A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

Irodalom

- [1] *El-Serag, H. B., Rudolph, K. L.*: Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, 2007, 132(7), 2557–2576.
- [2] <http://www.onkol.hu/hu/rakregiszter-statisztika>
- [3] *Bosetti, C., Turati, F., La Vecchia, C.*: Hepatocellular carcinoma epidemiology. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 2014, 28(5), 753–770.
- [4] *Hu, K. Q., Tong, M. J.*: The long-term outcomes of patients with compensated hepatitis C virus-related cirrhosis and history of parenteral exposure in the United States. *Hepatology*, 1999, 29(4), 1311–1316.
- [5] *Serfaty, L., Aumaître, H., Chazouillères, O., et al.*: Determinants of outcome of compensated hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hepatology*, 1998, 27(5), 1435–1440.
- [6] *Deeb, K. K., Trump, D. L., Johnson, C. S.*: Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat. Rev. Cancer*, 2007, 7(9), 684–700.
- [7] *Welsh, J.*: Vitamin D metabolism in mammary gland and breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2011, 347(1–2), 55–60.
- [8] *Giovannucci, E.*: Epidemiology of vitamin D and colorectal cancer. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 2013, 13(1), 11–19.
- [9] *Shui, I. M., Mucci, L. A., Kraft, P.*: Vitamin D-related genetic variation, plasma vitamin D, and risk of lethal prostate cancer: a prospective nested case-control study. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2012, 104(9), 690–699.
- [10] *Reddy, K. K.*: Vitamin D level and basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and melanoma risk. *J. Invest. Dermatol.*, 2013, 133(3), 589–592.
- [11] *Köstner, K., Denzer, N., Müller, C. S., et al.*: The relevance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms for cancer: a review of the literature. *Anticancer Res.*, 2009, 29(9), 3511–3536.
- [12] *Köstner, K., Denzer, N., Koreng, M., et al.*: Association of genetic variants of the vitamin D receptor (VDR) with cutaneous squamous cell carcinomas (SCC) and basal cell carcinomas (BCC): a pilot study in a German population. *Anticancer Res.*, 2012, 32(1), 327–333.
- [13] *Falletti, E., Bitetto, D., Fabris, C., et al.*: Vitamin D receptor gene polymorphisms and hepatocellular carcinoma in alcoholic cirrhosis. *World J. Gastroenterol.*, 2010, 16(24), 3016–3024.
- [14] *Guo, J., Ma, Z., Ma, Q., et al.*: 1,25(OH)₂D₃ inhibits hepatocellular carcinoma development through reducing secretion of inflammatory cytokines from immunocytes. *Curr. Med. Chem.*, 2013, 20(33), 4131–4141.
- [15] *Moore, D. D., Kato, S., Xie, W., et al.*: The NR1H and NR1I receptors: constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, farnesoid X receptor alpha, farnesoid X receptor beta, liver X receptor alpha, liver X receptor beta, and vitamin D receptor. *Pharmacol. Rev.*, 2006, 58(4), 742–759.
- [16] *Goupil, D., Ethier, C., Zarnegar, R., et al.*: Hepatic expression of regeneration marker genes following partial hepatectomy in the rat. Influence of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in hypocalcemia. *J. Hepatol.*, 1997, 26(3), 659–668.
- [17] *Dalhoff, K., Dancy, J., Astrup, L., et al.*: A phase II study of the vitamin D analogue Seocalcitol in patients with inoperable hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer*, 2003, 89(2), 252–257.
- [18] *Prosser, D. E., Jones, G.*: Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem. Sci.*, 2004, 29(12), 664–673.
- [19] *Fraser, D. R., Kodicek, E.*: Unique biosynthesis by kidney of a biological active vitamin D metabolite. *Nature*, 1970, 228(5273), 764–766.
- [20] *Holick, M. F.*: 25-OH-vitamin D assays. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2004, 90(5), 3128–3129.
- [21] *Cheng, J. B., Levine, M. A., Bell, N. H., et al.*: Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 2004, 101(20), 7711–7715.
- [22] *Pourgholami, M. H., Akhter, J., Finlay, I. G., et al.*: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ dissolved in lipidol produces a sustained anti-proliferative effect in the human hepatoblastoma cell line HepG2. *Anticancer Res.*, 2000, 20(2A), 723–727.
- [23] *Ghous, Z., Akhter, J., Pourgholami, M. H., et al.*: Inhibition of hepatocellular cancer by EB1089: *in vitro* and *in vivo* study. *Anticancer Res.*, 2008, 28(6A), 3757–3761.
- [24] *Colombo, M., Sangiovanni, A.*: Vitamin D deficiency and liver cancer: more than just an epidemiological association? *Hepatology*, 2014, 60(4), 1130–1132.
- [25] *Fedirko, V., Duarte-Salles, T., Bamia, C., et al.*: Prediagnostic circulating vitamin D levels and risk of hepatocellular carcinoma in European populations: a nested case-control study. *Hepatology*, 2014, 60(4), 1222–1230.
- [26] *Huang, J., Yang, G., Huang, Y., et al.*: 1,25(OH)₂D₃ inhibits the progression of hepatocellular carcinoma via downregulating HDAC2 and upregulating P21(WAF1/CIP1). *Mol. Med. Rep.*, 2016, 13(2), 1373–1380.
- [27] *Pourgholami, M. H., Morris, D. L.*: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in lipidol for the treatment of hepatocellular carcinoma: cellular, animal and clinical studies. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2004, 89–90(1–5), 513–518.
- [28] *Lopes, N., Sousa, B., Martins, D., et al.*: Alterations in vitamin D signalling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions. *BMC Cancer*, 2010, 10, 483.
- [29] *Hendrickson, W. K., Flavin, R., Kasperzyk, J. L., et al.*: Vitamin D receptor protein expression in tumor tissue and prostate cancer progression. *J. Clin. Oncol.*, 2011, 29(17), 2378–2385.
- [30] *Clinckspoor, I., Hauben, E., Verlinden, L., et al.*: Altered expression of key players in vitamin D metabolism and signaling in malignant and benign thyroid tumors. *J. Histochem. Cytochem.*, 2012, 60(7), 502–511.
- [31] *Lointier, P., Meggoub, F., Dechelotte, P., et al.*: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors and human colon adenocarcinoma. *Br. J. Surg.*, 1991, 78(4), 735–739.
- [32] *Matusiak, D., Murillo, G., Carroll, R. E., et al.*: Expression of vitamin D receptor and 25-hydroxyvitamin D₃-1[alpha]-hydroxylase in normal and malignant human colon. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2005, 14(10), 2370–2376.

- [33] Gascon-Barré, M., Demers, C., Mirshahi, A., et al.: The normal liver harbors the vitamin D nuclear receptor in nonparenchymal and biliary epithelial cells. *Hepatology*, 2003, 37(5), 1034–1042.
- [34] Miyaguchi, S., Watanabe, T.: The role of vitamin D₃ receptor mRNA in the proliferation of hepatocellular carcinoma. *Hepato-gastroenterology*, 2000, 47(32), 468–472.
- [35] Han, S., Chiang, J. Y.: Mechanism of vitamin D receptor inhibition of cholesterol 7- α -hydroxylase gene transcription in human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.*, 2009, 37(3), 469–478.
- [36] Han, S., Li, T., Ellis, E., et al.: A novel bile acid-activated vitamin D receptor signaling in human hepatocytes. *Mol. Endocrinol.*, 2010, 24(6), 1151–1164.
- [37] Gascon-Barré, M., Gamache, M.: Contribution of the biliary pathway to the homeostasis of vitamin D₃ and of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology*, 1991, 129(5), 2335–2344.
- [38] He, R. K., Gascon-Barré, M.: Influence of the vitamin D status on the early hepatic response to carcinogen exposure in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1997, 281(1), 464–469.
- [39] Segura, C., Alonso, M., Fraga, C., et al.: Vitamin D receptor ontogeny in rat liver. *Histochem. Cell Biol.*, 1999, 112(2), 163–167.
- [40] Mobri, T., Nakajima, M., Takagi, S., et al.: MicroRNA regulates human vitamin D receptor. *Int. J. Cancer*, 2009, 125(6), 1328–1333.
- [41] Anderson, M. G., Nakane, M., Ruan, X., et al.: Expression of VDR and CYP24A1 mRNA in human tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2005, 57(2), 234–240.
- [42] Horváth, H. C., Lakatos, P., Kósa, J. P., et al.: The candidate oncogene CYP24A1: A potential biomarker for colorectal tumorigenesis. *J. Histochem. Cytochem.*, 2010, 58(3), 277–285.
- [43] Hendrickson, W. K., Flavin, R., Kasperzyk, J. L., et al.: Vitamin D receptor protein expression in tumor tissue and prostate cancer progression. *J. Clin. Oncol.*, 2011, 29(17), 2378–2385.
- [44] Trowbridge, R., Sharma, P., Hunter, J. W., et al.: Vitamin D receptor expression and neoadjuvant therapy in esophageal adenocarcinoma. *Exp. Mol. Pathol.*, 2012, 93(1), 147–153.
- [45] Yang, M. H., Chen, C. L., Chau, G. Y., et al.: Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2009, 50(5), 1464–1474.
- [46] Li, Q., Gao, Y., Jia, Z., et al.: Dysregulated Krüppel-like factor 4 and vitamin D receptor signaling contribute to progression of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2012, 143(3), 799–810.
- [47] Zinser, G. M., McEleney, K., Welsh, J.: Characterization of mammary tumor cell lines from wild type and vitamin D₃ receptor knockout mice. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2003, 200(1–2), 67–80.
- [48] Swami, S., Krishnan, A. V., Feldman, D.: 1- α ,25-dihydroxyvitamin D₃ down-regulates estrogen receptor abundance and suppresses estrogen actions in MCF-7 human breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 2000, 6(8), 3371–3379.
- [49] Stoica, A., Saceda, M., Fakbro, A., et al.: Regulation of estrogen receptor- α gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D in MCF-7 cells. *J. Cell. Biochem.*, 1999, 75(4), 640–651.
- [50] Canalejo, A., Canalejo, R., Rodriguez, M. E., et al.: Development of parathyroid gland hyperplasia without uremia: role of dietary calcium and phosphate. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2010, 25(4), 1087–1097.
- [51] Chiang, K. C., Yen, C. L., Yeh, C. N., et al.: Hepatocellular carcinoma cells express 25(OH)D-1 α -hydroxylase and are able to convert 25(OH)D to 1 α ,25(OH)₂D, leading to the 25(OH)D-induced growth inhibition. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2015, 154, 47–52.
- [52] Balla, B., Kósa, J. P., Tobiás, B., et al.: Marked increase in CYP24A1 gene expression in human papillary thyroid cancer. *Thyroid*, 2011, 21(4), 459–460.
- [53] Mimori, K., Tanaka, Y., Yoshinaga, K., et al.: Clinical significance of the overexpression of the candidate oncogene CYP24 in esophageal cancer. *Ann. Oncol.*, 2004, 15(2), 236–241.
- [54] Chen, G., Kim, S. H., King, A. N., et al.: CYP24A1 is an independent prognostic marker of survival in patients with lung adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2011, 17(4), 817–826.
- [55] Kennedy, L., Baker, K., Hodges, K., et al.: Dysregulation of vitamin D₃ synthesis leads to enhanced cholangiocarcinoma growth. *Dig. Liv. Dis.*, 2013, 45(4), 316–322.
- [56] Gal-Tanamy, M., Bachmetov, L., Ravid, A., et al.: Vitamin D: an innate antiviral agent suppressing hepatitis C virus in human hepatocytes. *Hepatology*, 2011, 54(5), 1570–1579.

(Horváth Evelin dr.,
Budapest, Korányi Sándor u. 2/A, 1083
e-mail: horvath.evelyn@gmail.com)

Tisztelt Szerzőink, Olvasóink!

Az Orvosi Hetilapban megjelenő/megjelent közlemények elérhetőségére több lehetőség kínálkozik.

Rendelhető különnyomat, melynek áráról bővebben a www.akkrt.hu honlapon (Folyóirat Szerzőknek, Különnyomat menüpont alatt) vagy Szerkesztőségünkben tájékozódhatnak.

A közlemények megvásárolhatók pdf-formátumban is, illetve igényelhető Optional Open Article (www.oopenart.com).

Adott díj ellenében az online közlemények bárki számára hozzáférhetők honlapunkon (a közlemények külön linket kapnak, így más oldalról is linkelhetővé válnak).

Bővebb információ a hirdetes@akkrt.hu címen vagy különnyomat rendelése esetén a Szerkesztőségtől kérhető.