

Az öregedés és a vastagbélbetegségek kialakulásának molekuláris összefüggései

Doktori értekezés

Dr. Szalayné Dr. Leiszter Katalin

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Molnár Béla, az MTA doktora, tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók: Dr. Dezsőfi Antal, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Szmola Richárd, Ph.D., adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kovalszky Ilona, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Péter Antal, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Szaleczky Erika Ágota, Ph.D., szakorvos

Budapest

2015

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	5
2. BEVEZETÉS	11
2.1. Az öregedés hatása az emberi szervezetre	11
2.2. Az öregedés emésztőrendszeri hatásai	12
2.2.1. Az öregedés makroszkópos jelei az emésztőrendszerben	12
2.2.1.1. Az öregedés funkcionális jelei az emésztőrendszerben	12
2.2.1.2. Az íz- és szagérzékelés megváltozása időskorban	12
2.2.1.3. Az emésztőrendszeri motilitás és morfológia megváltozása az öregedés során	14
2.2.1.4. Az emésztőrendszeri szekréció és metabolizmus megváltozása az öregedés során	15
2.2.1.5. A tápanyagok felszívódásának megváltozása időskorban	17
2.2.1.6. Az időskori testsúlycsökkenés	18
2.2.2. Az öregedéssel összefüggésbe hozható morfológiai, mikroszkópos és molekuláris változások a vastagbélben	20
2.3. A kolorektális daganatok és az öregedés epidemiológiai összefüggései	22
2.4. Az időskori sporadikus vastagbélrák makroszkópos, szövettani és molekuláris jellegzetességei	23
2.5. Az öregedés és a sporadikus kolorektális karcinóma kialakulásának lehetséges molekuláris kapcsolódási pontjai	26
2.5.1. Az időskori vastagbélrák és a daganatössejtek	26
2.5.2. Genetikai instabilitás	28
2.5.3. Epigenetikai változások	29
2.5.3.1. A promotermetiláció	29
2.5.3.2. A telomerrövidülés	33
2.6. A génkifejeződés és bizonyos fehérjék szintézisének megváltozása a vastagbélben az öregedés, valamint a kolorektális karcinogenezis során	36
2.7. A szomatostatin élettani hatásai, különös tekintettel az emésztőrendszerre...	38
2.8. A szomatostatinanalógok szerepe onkológiai kórképek kezelésében.....	42
3. CÉLKITŰZÉSEK	49

4. MÓDSZEREK	50
4.1. Betegek és minták	50
4.2. A proliferáció és az apoptózis vizsgálata kolorektális biopsziás mintákon, szöveti és mRNS-szinten	53
4.2.1. Az osztódó sejtek azonosítása — Ki-67 immunhisztokémia	53
4.2.2. Az apoptotikus sejtek azonosítása — TdT-mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL) módszer	54
4.2.3. A proliferáció-apoptózis arány, a mitotikus index és az apoptotikus index meghatározása digitalizált metszeteken.....	54
4.2.4. Affymetrix oligonukleotid microarray vizsgálat	55
4.2.5. A microarray adatok megerősítése valós idejű polimeráz láncreakcióval — Taqman RT-PCR.....	55
4.3. A vastag- és végbélhám szomatosztatintermelésének vizsgálata biopsziás mintákon	56
4.3.1. Affymetrix oligonukleotid microarray és valós idejű polimeráz láncreakció (Taqman RT-PCR)	56
4.3.2. Szomatosztatin immunhisztokémia	56
4.3.3. A vastag- és végbélhám szomatosztatin termelő sejtjeinek azonosítása digitalizált tárgylemezeken	57
4.4. A szomatosztatinanalóg octreotid sejtosztódást és apoptózist befolyásoló hatásának vizsgálata Caco-2 sejtvonalon	59
4.4.1. Caco-2 sejtvonal octreotid kezelése	59
4.4.2. Áramlási citometriai (flow cytometria) vizsgálat és a Sub-G1 sejtfrakció azonosítása	59
4.5. A szomatosztatinpromoter-metiláció és reverzibilitásának vizsgálata	60
4.5.1. Metilációszenzitív restriktív enzimmel való emésztés és valós idejű polimeráz láncreakció (Metilációspecifikus PCR).....	60
4.5.2. A szomatosztatin kódoló gén kifejeződésének vizsgálata demetiláló hatású 5-aza-2'-deoxicitidin adását követően HT-29 sejtvonalon.....	60
4.6. Statisztikai elemzés	61
5. EREDMÉNYEK	63
5.1. A proliferatorikus és apoptotikus aktivitás változása a vastag- és végbélhámiban,	

az öregedés és a karcinogenezis során	63
5.2. A proliferációt és apoptózist szabályozó gének expressziójának vizsgálata	
kolorektális biopsziás mintákban, az öregedés és a karcinogenezis során.....	69
5.3. A proliferációt és apoptózist szabályozó gének mRNS-expressziós vizsgálata	
és összehasonlítása a gyermek és a daganatos minták között	72
5.4. Microarray módszerrel végzett mRNS-expressziós vizsgálat eredményeinek	
megerősítése valós idejű polimeráz láncreakcióval.....	75
5.5. A kolorektális szomatostatintermelés vizsgálata az élettani öregedés	
és a karcinogenezis során, mRNS- és fehérjeszinten.....	79
5.6. A szomatostatinanalog octreotid sejtszódást és apoptózist befolyásoló	
hatásának vizsgálata Caco-2 sejtvonalon	87
5.7. A szomatostatinpromoter-metiláció és reverzibilitásának vizsgálata.....	89
6. MEGBESZÉLÉS	92
6.1. Az öregedő és daganatos vastag- és végbélnyálkahártya sejtkinetikai eltérései;	
a proliferációt és apoptózist befolyásoló gének eltérő expressziója a kolorektális	
hám hiperproliferatív állapotaiban	92
6.2. A kolorektális szomatostatintermelés megváltozása az élettani öregedés	
és a karcinogenezis során.....	95
7. KÖVETKEZTETÉSEK.....	100
7.1. Következtetések	100
7.2. Legfontosabb új megfigyelések és megállapítások	101
8. ÖSSZEFOGLALÁS	102
8.1. Összefoglalás	102
8.2. Summary	103
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	104
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	119
10.1. Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények jegyzéke.....	119
10.2. Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények jegyzéke.....	120
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	123

1. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

ACF: aberráns kriptafókus (aberrant crypt focus)

ACTH: adrenokortikotrop hormon

ACVR1B: aktivin A receptor, IB típus

AI: apoptotikus index

AIFM2: apoptózis indukáló faktor, mitokondrium-asszociált 2 (apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 2)

AIFM3: apoptózis indukáló faktor, mitokondrium-asszociált 3 (apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 3)

ANXA1: annexin A1

BBS: bombesin

BCL2: B-sejtes CLL/limfóma 2

BFGF: bázikus fibroblaszt növekedési faktor

BRCA1: breast cancer 1

BRCA2: breast cancer 2

BSA: szarvasmarha szérum albumin (bovine serum albumin)

BTK: Bruton agammaglobulinemia tirozin kináz

cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát (cyclic adenosine monophosphate)

CART: kokain- és amfetamin-regulált transzkript (cocaine and amphetamine regulated transcript)

CASP4: kaszpáz-4

CBX4: chromobox homológ 4

CCK: kolecisztokinin (cholecystokinin)

CCNB1: ciklin B1

CCND1: ciklin D1

CCNE1: ciklin E1

CDC2/CDK1: ciklin-dependens kináz 1

CDC20: sejtosztódási ciklus 20 (cell division cycle 20)

CDK1: ciklin-dependens kináz 1

CDK6: ciklin-dependens kináz 6

CDKN2B: ciklin-dependens kináz gátló 2B

cDNS: komplementer dezoxiribonukleinsav
CHEK2: ellenőrző pont kináz 2 (checkpoint kinase 2)
CIDEB: sejthalált indukáló DFFAszerű effektor B (cell death-inducing DFFA-like effector b)
CIDEc: sejthalált indukáló DFFAszerű effektor C (cell death-inducing DFFA-like effector c)
CIMP: CpG-sziget metilátor fenotípus (CpG island methylator phenotype)
CLL: krónikus limfoid leukémia
CRC: vastag- és végbélrák (colorectal cancer)
CRH: kortikotropin felszabadító hormon (corticotropin-releasing hormone)
cRNS: komplementer ribonukleinsav
CSC: daganatőssejt (cancer stem cell)
CT: komputertomográfia (computed tomography)
CTCL: cutan T-sejtes limfóma
DAB: diaminobenzidín
DAPK2: halál asszociált protein kináz (death-associated protein kinase 2)
DMH: dimetilhidrazin
DNáz: dezoxiribonukleáz
DNMT1: DNS (citozin-5-)-metiltranszferáz 1
DNMT3A: DNS (citozin-5-)-metiltranszferáz 3 alfa
DNMT3B: DNS (citozin-5-)-metiltranszferáz 3 béta
DNS: dezoxiribonukleinsav
DYRK2: kettős fajlagosságú tirozin (Y)-foszforiláció szabályozott kináz 2
EDTA: etiléndiamin-tetraecetsav
EGF: epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor)
EGFR: EGF-receptor
ENS: enterális idegrendszer (enteric nervous system)
ER: ösztrogén receptor (estrogen receptor)
ERRP: EGF-receptorhoz kapcsolódó fehérje (EGF-receptor related protein)
ESA: epithelium-specifikus antigén
FAP: familiáris adenomatous polyposis
FCS: főtális borjúsavó (fetal calf serum)

FHF: funkcionális véráramlás a májban (functional hepatic flow)
FSH: follikulus-stimuláló hormon
IFI6: interferon, alfa-indukálható fehérje 6
GALT: bélhez kapcsolódó limfoid szövetet (gut-associated lymphoid tissue)
GAPDH: glicerin-aldehid-3-foszfát
GCRMA: nukleinsavak energetikai viszonyát figyelembe vevő RMA algoritmus
GEO: gene expression omnibus
GH: növekedési hormon (growth hormone)
GHRH: növekedési hormon elválasztását szabályozó hormon (growth hormone-releasing hormone)
GIRK: G-fehérjéhez kapcsolt befelé egyenirányító K⁺ csatorna (G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel)
GLP-2: glukagon-szerű peptid-2 (glucagon-like peptide-2)
GPCR: G-fehérjéhez kötött receptor (G-protein-coupled receptors)
GRP: gastrint felszabadító peptid (gastrin-releasing peptide)
HCC: hepatocelluláris karcinóma (hepatocellular carcinoma)
hMLH1: MutL homológ 1
HNPCC: hereditár nem-polyposus kolorektális karcinóma (hereditary non-polyposis colorectal cancer)
HRP: torma-peroxidáz
HSD: honest significant difference
IGF: inzulinszerű növekedési faktor (insulin-like growth factor)
IGF-IR: IGF-I receptor
IGFBP: IGF-kötő fehérje (IGF binding protein)
IL-1: interleukin-1
IL-6: interleukin-6
INHBA: inhibin béta A
IVT: in vitro transzkripció
LH: luteinizáló hormont
MAL: mal, T-sejt differenciációs fehérje
MALT: nyálkahártyához kapcsolódó limfoid szövet (mucosa-associated lymphoid tissue)
MAPK: mitogén aktivált protein kináz

MI: mitotikus index
MKI67: Ki-67 monoklonális antitest által azonosított antigén
MMR: DNS hibajavítás (mismatch repair)
mRNS: hírvívő ribonukleinsav (messenger RNS)
MSI: mikroszatellitainstabilitás
MTS2: többszörös tumor szuppresszor 2 (multiple tumor suppressor 2)
MYC: v-myc myelocitomatózis virális onkogén homológ
MYOD: miogén differenciáció (myogenic differentiation)
N33/TUSC33: tumor szuppresszor jelölt 3 (tumor suppressor candidate 3)
NHL: non-Hodgkin-limfóma
NOS: nitrogén-monoxid szintáz
NT: neurotensin
P16/CDKN2A: ciklin-dependens kináz inhibitor 2A
PAR: proliferáció-apoptózis arány (proliferative-apoptotic ratio)
PBS: foszfát-pufferelt sóoldat (phosphate buffered saline)
PCNA: proliferáló sejtmag antigén (proliferating cell nuclear antigen)
PCR: polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PDGF: vérlemezke eredetű növekedési faktor (platelet-derived growth factor)
PET: pozitronemissziós tomográfia (positron emission tomography)
PI3 kináz: foszfatidilinozitol-3 kináz
PLAGL2: pleiomorf adenóma génszerű 2 (pleiomorphic adenoma gene-like 2)
PMAIP1: forbol-12-mirisztát-13-acetát-indukált protein 1
POLB: polimeráz (DNS irányított) béta
PROK2: prokineticin 2
PSA: prosztataspécifikus antigén
PTP: protein tirozin foszfatáz
PYY: peptid YY
RAD9A: RAD9 homológ A
RBL1: retinoblastomaszerű 1 (retinoblastoma-like 1)
RIN: RNS integritási szám (RNA integrity number)
RNáz: ribonukleáz
RPMI: Roswell Park Memorial Institute médium

RT-PCR: valós idejű polimeráz láncreakció illetve reverz transzkripció polimeráz láncreakció

SAM: microarray szignifikancia analízis (significance analysis of microarrays)

SCLC: kissejtes tüdőrák (small cell lung cancer)

SDHA: szukcinát-dehidrogenáz A alegység (succinate dehydrogenase subunit A)

SDS: nátrium-dodecyl-szulfát (sodium dodecyl sulphate)

SER: simafelszínű endoplazmatikus retikulum (smooth endoplasmatic reticulum)

SERPINB9: szerpin peptidáz gátló, klád B (ovalbumin), 9. tagja

SFRP1: szekretált frizzled-rokon fehérje 1 (secreted frizzled-related protein 1)

SHP-1: SH2-domén tartalmú foszfátáz 1 (SH2 domain-containing phosphatase 1)

SIVA1: SIVA1, apoptózis indukáló faktor

SOCS3: citokin jelátvitel szuppresszor 3 (suppressor of cytokine signaling 3)

SPN: sialophorin

SST: szomatosztatin

SSTR: szomatosztatinreceptor

TBS: tris-pufferelt sóoldat (tris-buffered saline)

TERC: telomeráz RNS komponens (telomerase RNA component)

TERT: telomeráz reverz transzkriptáz

TFDP1: transzkripció faktor Dp-1

TGF- α : transzformáló növekedési faktor alfa (transforming growth factor alpha)

THF: a májon átáramló vér mennyisége (total hepatic flow)

TIF1- α : transláció iniciációs faktor 1 alfa

TMA: szöveti microarray (tissue microarray)

TNF- α : tumor nekrozis faktor alfa (tumor necrosis factor alpha)

TNFSF10: tumor nekrozis faktor (ligand) szupercsalád 10. tagja

TNFRSF25: tumor nekrozis faktor receptor szupercsalád 25. tagja

TNFRSF10B: tumor nekrozis faktor receptor szupercsalád 10B tagja

TP53I3: p53 által indukálható fehérje 3 (tumor protein p53 inducible protein 3)

TRH: tireotropin felszabadító hormon (thyrotropin-releasing hormone)

TRIS: trisz(hidroximetil)-aminometán

TSH: tiroidea-stimuláló hormon

TUNEL: terminalis-dezoxiribonukleotidil transzferáz mediált dUTP nick-end labeling

VEGF: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

ZAK: steril alfa-motívumot és leucin-cipzárt tartalmazó kináz AZK

(Értekezésemben a gének rövidített nevét *dőlt betűvel*, a géntermékek nevét normál betűvel írtam, az irodalomban alkalmazott írásmódnak megfelelően.)

2. BEVEZETÉS

2.1. Az öregedés hatása az emberi szervezetre

Az öregedés külső és belső tényezők által befolyásolt folyamat, amelynek nemcsak a szervrendszereket, szerveket, szöveteket érintő hatásai, hanem molekuláris, illetve pszichológiai, szociológiai vonatkozásai is számottevőek. Bár számos öregedési elmélet látott már napvilágot, az öregedés pontos molekuláris mechanizmusa a mai napig sem ismert. Olyan folyamat, amely a fogantatással kezdődik és egészen az élet végéig tart [1].

Az öregedés igen komplex jelenség, amelynek során egyre több „hiányállapot” alakul ki a szervezetben. Ezek a változások egyénileg jelentősen különbözhetnek, a külső és belső tényezőktől függően, a különböző szervrendszereket eltérő módon és mértékben érintve. Az öregedés során a szervezet „raktárai” egyre inkább kimerülnek. A szervezet sokáig próbál alkalmazkodni, és egy egyensúlyi állapotot fenntartani, de az élettani és az ehhez társuló további stresszhez egyre kevésbé képes alkalmazkodni. Bár az öregedés ilyen módon a homeosztázis felborulására és a szervrendszerek elégtelen működésére hajlamosíthat, önmagában véve mégsem szükségszerű következmény a betegségek kialakulása. Ugyanakkor, ha a biológiai öregedéssel járó molekuláris eltérésekhez (DNS-károsodás, telomerrövidülés, sejtek előregedése, szabadgyökök hatása, krónikus gyulladás) betegségek (krónikus infekció, szív-érrendszeri betegségek, elhízás, cukorbetegség, daganatok, neurodegeneráció) is társulnak, az jellegzetes klinikai elváltozásokat okozhat. Ilyen például az anorexia, az anaemia, a hiperglikémia, az osteoporosis, a sarcopenia, a gyengeség és kimerültség, a testsúlycsökkenés, a fizikai aktivitás és a teljesítmény csökkenése. Az idős, és a fent említett eltérések miatt igen sérülékeny szervezetben jellegzetes molekuláris eltérések a plazmában a magasabb IL-6-szint, a csökkent teljes koleszterin- és HDL-szint, a hiperglikémia és az inzulinrezisztencia. Az öregedés során gyakrabban előforduló kórképek, amelyek gyakran a betegek halálát is okozzák – a daganatos megbetegedések, a fertőzések, a 2-es típusú cukorbetegség, az atherosclerosis, a krónikus szívelégtelenség és a neurodegeneratív kórképek [2].

2.2. Az öregedés emésztőrendszeri hatásai

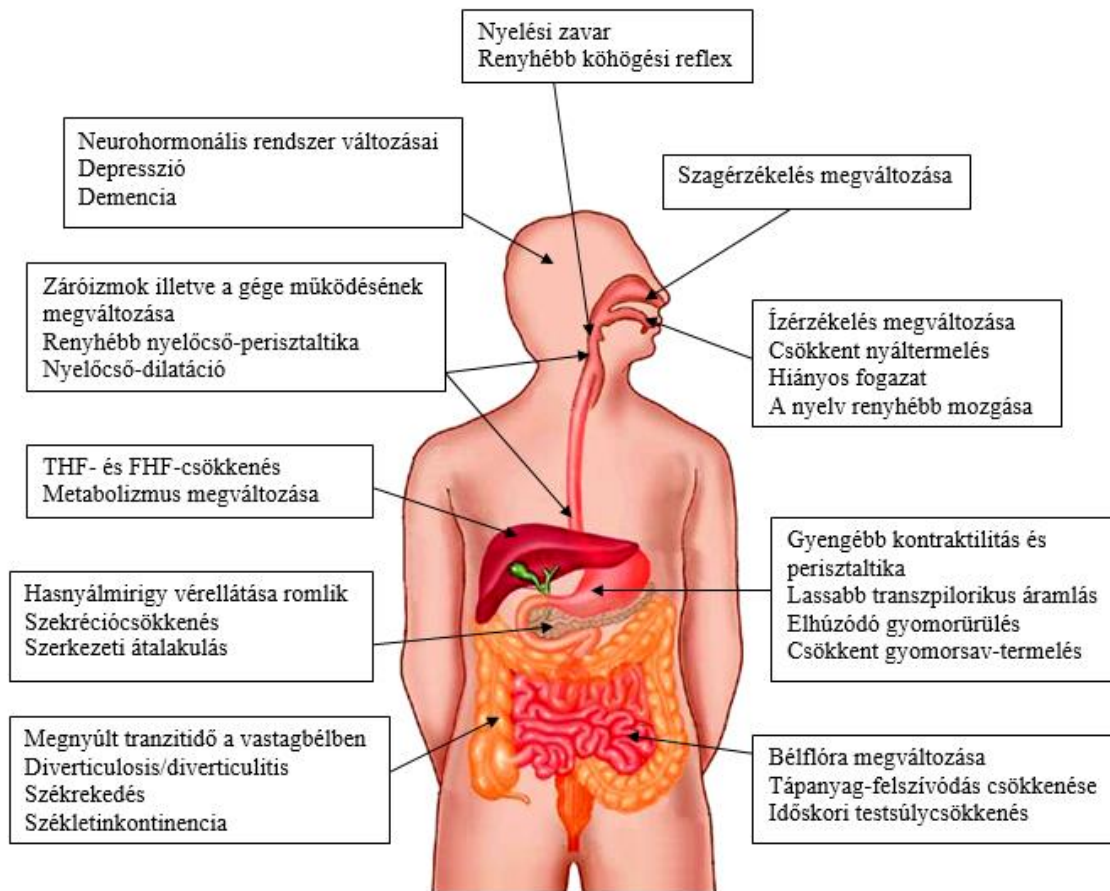
2.2.1. Az öregedés makroszkópos jelei az emésztőrendszerben

2.2.1.1. Az öregedés funkcionális jelei az emésztőrendszerben

Az öregedés valamennyi szervrendszerben változást okoz. Némelyek ezek közül szembetűnőek, mások kevésbé látványosak, bár kialakulásukban számos hasonlóság fedezhető fel. Az öregedés során jelentkező emésztőrendszeri változások vizsgálata az utóbbi években került a figyelem középpontjába (1. ábra). Az emésztőrendszerben gyakran jelentkező tünetek, panaszok, illetve betegségek időskorban az étvágytalanság, a nyelési zavar, a refluxbetegség, az aspirációs pneumónia, a felszívódási és az emésztési zavarok, a testsúly csökkenése, a postprandialis vérnyomáscsökkenés, a cukorbetegség, a vastagbél-diverticulosis és szövődményei, a székrekedés, az inkontinencia, valamint a májban történő metabolizmus megváltozása miatt elhúzódó gyógyszerhatás és gyógyszer-kölcsönhatás [3]. Ezek a változások az idősek életminőségét jelentősen befolyásolhatják.

2.2.1.2. Az íz- és szagérzékelés megváltozása időskorban

A táplálék elfogyasztásában az ízérzékelésnek, a szaglásnak, a tapintásnak, és a hőérzékelésnek is szerepe van. Az ízérzékelés és a szaglás többségében G-fehérjéhez kötött receptorokon keresztül valósul meg. Az ízérző receptorok egy-egy alapíz (édes, sós, savanyú, keserű, umami) azonosításában játszanak szerepet. Az időskorban kialakuló ízérzékszavar molekuláris háttere pontosan még nem ismert. A legjelentősebb változás a sós és az umami íz érzékelésében észlelhető. Az idősek az ízek intenzitását és az apróbb ízbeli különbségeket kevésbé észlelik, az ízérzékelési-küszöb magasabb, kevert ízek esetén nehézséget okozhat azok elkülönítése, továbbá az idősek az „irritáló” ízekre is érzékenyebben reagálnak. A hőérzékelés és a taktilis ingerek észlelése lényegesen nem változik. Az ízérzékelésnek feltételezhetően kisebb a jelentősége a táplálék felvételében, ugyanakkor annál nagyobb az ételek kiválasztásában. Ez összefüggésben állhat azzal a megfigyeléssel, hogy az idősebbek olykor kevésbé változatosan étkeznek [3].



1. ábra: Az öregedés lehetséges hatásai az emésztőrendszer működésére. (Módosított ábra Brandon H Masters: Magic of fiber /<http://www.getfrank.co.nz/magic-of-fiber-2/> alapján.)

A szaglás az öregedés során folyamatosan romlik. *Murphy és munkatársainak* felmérése szerint a szagérezékelés romlásának prevalenciája az 53-59 éves korosztályban 6,1%, míg a 80-97 éves korosztályban 62,5% [4]. A szaglás romlása Alzheimer-kórban szenvedő betegekben még kifejezettebb [5]. Az ornyálkahártya károsodása miatt a szaglóreceptorok 10%-a vész el minden egyes évtizedben, és a szaglás idegrendszeri mechanizmusa is megváltozik. Mindezek következtében időskorban a szagérezékelési küszöb magasabb és a szagok elkülönítése is nehezebb. Egyes feltételezések szerint a táplálékfelvételben nagyobb jelentősége lehet a szaglásnak, mint az ízlelésnek, ezért a szaglás gyengülése hozzájárulhat az időskori hiányos táplálkozáshoz. A szenzóriumban 20 és 80 éves kor között bekövetkező változások akár 100 kalóriával csökkenthetik a napi táplálékbevitelt [3].

2.2.1.3. Az emésztőrendszeri motilitás és morfológia megváltozása az öregedés során

Az emésztőrendszer kiegyensúlyozott működése számos betegség megelőzése és a megfelelő életminőség szempontjából is fontos. Időskorban azonban több olyan változással is számolnunk kell (például nyelési zavar, renyhe nyelőcső-perisztaltika, a- és hipoklorhidria, elhúzódó gyomorürülés, csökkent transzpilorikus áramlás, megnyúlt vastagbél-tranzitidő), amelyek korábban jelentkező jóllakottságérzést, csökkent táplálékfelvételt, tápanyaghiányt, testsúlycsökkenést, a bélflóra megváltozását, székrekedést vagy székletinkontinenciát okozhatnak [3].

A nyelés folyamatának mindhárom fázisa (orális, pharyngealis, és oesophagealis) megváltozik időskorban. A falatképzést jelentősen megnehezíti a hiányos fogazat, a csökkent nyáltermelés és a nyelv renyhébb mozgása, ezzel elnyújtva az orális fázist. A pharyngealis fázisban a perisztaltika sebessége és amplitúdója is csökken, ami szintén lassíthatja a nyelés folyamatát. Ehhez társul a felső nyelőcső-záróizom lassabb és renyhébb megnyílása, továbbá a gége mozgásainak megváltozása [3]. Egyes tanulmányok szerint a közösségben élő idősök 15%-a küzd nyelési zavarral, ami az esetek felében jelentősen rontja az életminőséget [6]. A nyelési zavar és a renyhébb köhögési reflex miatt idős betegekben az aspirációs pneumóniát gyakran nem a gyomortartalom, hanem az oropharyngealis flóra aspirációja okozza. A nyelőcső működésében bekövetkező változás („presbyoesophagus”) a perisztaltika sebességének, illetve hatékonyságának csökkenését jelenti, amely döntően 80 éves kor felett alakul ki [3]. A presbyoesophagus az összehúzódások amplitúdójának csökkenésével, az elhúzódó záróizom-relaxációval és az ennek következtében kialakuló nyelőcsődilatációval jellemezhető [7]. A gastroesophagialis reflux előfordulásának gyakorisága a fiatalabb korosztályéval megegyező, idősökben azonban sokkal elhúzódóbb [3]. Számos tanulmány igazolta, hogy időskorban a gyomorürülés is elhúzódóbb, különösen nagyobb mennyiségű, szolid táplálék fogyasztása esetén [8,9]. Elektrogasztrográfiás vizsgálattal gyengébb perisztaltikát, csökkent kontraktilitást, és lassabb gyomorürülést észleltek [10], Doppler ultrahang és szcintigráfiás vizsgálatokkal pedig lassabb transzpilorikus áramlást igazoltak idősebb korban [11].

Állatmodellekben a vékonybél morfológiájának megváltozásával kapcsolatos megfigyelések nem egységesek. Egyes szerzők patkányokban a villusok kiszélesedését figyelték meg a vékonybél teljes hosszában, a bolyhok magassága döntően az ileumban nőtt az öregedés során. Más szerzők a villusok és az enterociták magasságának csökkenését írták le. A humán vizsgálatok során a vékonybél morfológiájában (villusok magassága, kripták mélysége, kripta-villus arány, enterociták mérete) nem találtak érdemi változást az öregedéssel összefüggésben [1]. A vékonybél-tranzitidőben sincs jelentős változás idősebb korban, ha a baktériumflóra az egészségesekre jellemző összetételt mutatja [3].

A székrekedés gyakran előforduló panasz az idősek körében, ami az orvosi vizitek és a kórházban töltött napok számát is növelheti. A kezeletlen vagy nem megfelelően kezelt székrekedésnek komoly szövődményei lehetnek [12]. Idősekben az obstipáció leggyakoribb okai a hiányos táplálkozás, az elégtelen rost- és folyadékbevitel. A vastagbél-tranzitidő jelentősen megváltozhat időskorban a gát szerkezetének átalakulása miatt, illetve nagyobb hasi, nőgyógyászati műtéteket követően [3]. Egyes tanulmányok szerint a székletinkontinencia a közösségben élő idősek körében 2-13%-ban, az ápolási intézményben élő idősek körében akár 27%-ban is előfordulhat, a nőknél gyakrabban. Ennek hátterében a záróizom szerkezeti átalakulása, a nervus pudendus károsodása, daganatos megbetegedés, székletimpaktáció, depresszió és demencia is állhat [13].

2.2.1.4. Az emésztőrendszeri szekréció és metabolizmus megváltozása az öregedés során

Az öregedés során az emésztőrendszeri szekréció, így a gyomorsav-elválasztás is csökkenhet. Hatvanöt évnél idősebb önkéntesek körében végzett vizsgálatban ugyanakkor a résztvevők közel 90%-ánál normális gyomorsav-elválasztást mértek, akiknél pedig következetesen csökkent mértékű szekréciót találtak, atrófiás gastritiszre utaló szövettani eltérések igazolódtak [14]. A hipo- vagy aklorhidria kialakulásához feltételezhetően a *Helicobacter pylori*-fertőzés, illetve a protonpumpagátló szerek alkalmazása is hozzájárulhat [15]. *Haruma és mtsai* a *Helicobacter pylori*-negatív páciensek körében nem találtak savszekréció-csökkenést az öregedés során, míg a *Helicobacter*-pozitív betegekben csökkent savszekréció igazolódott, amit az atrófiás

gasztritisz növekvő gyakoriságával hoztak összefüggésbe [16]. A gyomorsav-elválasztás csökkenése további következményekkel járhat, mint például a vékonybél baktériumflórájának megváltozása, ebből adódóan pedig a tápanyagok csökkent felszívódása és testsúlycsökkenés jelentkezhethet [17].

Egy olasz kutatócsoport által végzett felmérés szerint a májon átáramló vér mennyisége csökken idős korban. Echo-Doppler vizsgálattal mérték a májon átáramló vér mennyiségét (total hepatic flow – THF), illetve a D-szorbitol-ürülésből következtettek a funkcionális átáramlásra (functional hepatic flow – FHF). Májbetegség nem szerepelt a vizsgálatban részt vevő egyének kórelőzményében. Eredményeik szerint a THF és FHF jelentősen csökkent idős egyének körében, különösen 75 év felett [18]. A máj mérete szintén csökken az öregedés során, ami feltételezhetően a csökkent regenerációs képességnek köszönhető. Mikroszkóposan megfigyelhető változás a mitokondriumok és a simafelszínű endoplazmatikus retikulumok (SER) számának csökkenése. A szérumbilirubinszint és a májenzimek nem változnak idős korban, bizonyos funkcionális vizsgálatok értékei azonban (például az aminopirin-clearance) enyhén csökkennek. Az albuminszintetizáló képesség is csökken, ami a fokozott citokintermeléssel állhat összefüggésben [3]. Egereken végzett microarray vizsgálatok során az öregedés, valamint a rövid és hosszú távú kalóriamegszorítás hatását kutatták fiatal és öreg egyedek májában. Az öregedés során a gyulladást, a stresszválaszt és a fibrózist befolyásoló gének fokozott kifejeződését, míg a sejtciklust, a DNS-replikációt vagy az apoptózist szabályozó gének csökkent mRNS-expresszióját igazolták. A hosszabb ideig tartó kalóriamegszorítás ezen változások jelentős részét visszafordította [19]. A máj számos gyógyszer metabolizmusában fontos szerepet játszik. A metabolizmus I. fázisa döntően a SER-ben található citokróm P450 rendszer segítségével történik (hidroxiláció, N-dealkiláció, szulfoxidáció, redukció, hidrolízis), amelynek aktivitása idős korban, különösen férfiakban csökken [20]. A metabolizmus II. fázisában zajló folyamatok (például a konjugáció) kevésbé változnak az öregedés során [3].

A hasnyálmirigyben mind szerkezeti, mind funkcionális változások kialakulhatnak idős korban, általában progresszív atrófia és fibrózis figyelhető meg. A ductus pancreaticus átmérője idős korban megnő [21], az intralobuláris fibrózis és a duktális hiperplázia a lumen átmérőjének csökkenéséhez vezethet. A generalizált érszűkület következtében a pancreas vérrellátása is károsodhat. A hasnyálmirigy szekréciós

képessége csökken, emiatt bizonyos tápanyagok felszívódása romlik [22]. Az inzulinelválasztás csökkenése és az inzulinrezisztencia hozzájárulhat a csökkent glükóztolerancia és a cukorbetegség kialakulásához [3].

2.2.1.5. A tápanyagok felszívódásának megváltozása időskorban

Az öregedés során a megváltozó transzportfolyamatok ellenére a tápanyagok felszívódása viszonylag kismértékben változik. Néhány szénhidrát (például a laktulóz) felszívódása csökken, de figyelembe kell vennünk, hogy bizonyos vizsgálatokat - mint például a kilégzési tesztet - nagymértékben befolyásolja a bél megváltozott baktériumflórája, a bakteriális túlnövekedés, amely idősokban gyakrabban fordul elő. A fehérjék és a zsírok felszívásában nem találtak eltérést a fiatalokhoz képest. A B12-vitamin abszorpciója csökken, bár ez döntően a csökkent gyomorsav-elválasztásnak köszönhető. Időskorban a kalciumfelszívódás romlása a csökkent D-vitamin-felszívódás, a kevesebb kolekalciferol-termelés, az aktív 1,25-dihidro-kolekalciferollá történő átalakulás csökkenése és a D-vitamin-receptorok számának csökkenése következtében alakulhat ki. Ezt súlyosbíthatja a hiányos táplálkozás, illetve az atrófiás gasztritisz együttes fennállása. A vasszívódásban észlelt változás összefüggésbe hozható a csökkent gyomorsav-elválasztással. Az időskorban fennálló krónikus betegségek a megváltozott citokin-elválasztás (például IL-6) révén befolyásolhatják a vasanyagcserét [3]. Az IL-6 fokozza a hepcidintermelést a májban, ami gátolja a ferroportin hatását, így csökkentve a vas felszívódását [23] (1. táblázat).

1. táblázat: Az öregedés hatása a tápanyagok felszívódására. (Módosított táblázat *Bhutto és mtsai* alapján [3].)

Tápanyag	Felszívódás változása az öregedés során
Fehérje	Változatlan
Zsír	Változatlan
Szénhidrát	Csökkenhet
Laktóz	Csökken
Riboflavin	Változatlan
B6 vitamin	Változatlan
B12 vitamin	Atrófiás gasztritisz esetén csökken
Kalcium	Csökken
A vitamin	Fokozódik
Cink	Csökken
Magnézium	Csökken
Vas	Csökken

2.2.1.6. Az időskori testsúlycsökkenés

Az étvágy és a táplálékfelvétel csökkenése, a fehérje-energia malnutrícióra hajlamosító fogyás kialakulása („anorexia of aging”) egészséges időseknél is megfigyelhető. Ennek háttérében az életkorral párhuzamosan növekvő kolecisztokinin-plazmakoncentráció és a kolecisztokinin (CCK) jóllakottságérzést keltő hatásának fokozódása állhat. A CCK döntően a táplálékkal szervezetbe kerülő zsír és fehérje hatására szabadul fel a vékonybélben. *MacIntosh és mtsai* kimutatták, hogy az idős emberek plazmájában magasabb a kolecisztokinin-8 (CCK-8) alapkonzentrációja, mint a fiatalokban. Időseknek adott CCK-8 tartalmú intravénás infúzió csökkentette a táplálék- és energiafelvételt, illetve az endogén CCK-elválasztást [24]. Idősebb férfiaknál az étvágytalanság gyakrabban fordul elő, mint a nőknél, ami elsősorban a csökkenő tesztoszteronszintnek és az emelkedő leptinszintnek köszönhető [25]. Állatkísérletek eredményei igazolták, hogy az étvágy központi idegrendszeri szabályozása több agyi területet érintve, számos neurotranszmitter (például az opioid rendszer) közreműködésével zajlik. Ezek jelentősége a humán tanulmányokban eddig nem teljesen egyértelmű, bár úgy tűnik, hogy az opioid rendszer szerepet játszhat az idősek körében gyakrabban előforduló exsiccosis kialakulásában [26]. Idős betegeknél gyakrabban kell

tachygastria, *Helicobacter pylori*-fertőzés, valamint epekőbetegség együttes fennállásával is számolnunk, és időskorban a súlyvesztés tekintetében különösen nagy jelentősége van a depresszióknak. Az időskorban észlelt testsúlycsökkenés összetett folyamat, ami szarkopéniával, cachexiával társulhat [3], háttérben a szenzóriumban kialakuló változások, a táplálkozással összefüggésbe hozható neurohormonális változások, valamint szerkezeti változások is állhatnak (2. táblázat).

2. táblázat: A fiziológias időskori testsúlycsökkenéssel összefüggésbe hozható tényezők. (Módosított táblázat *Bhutto és mtsai* alapján [3].)

Szenzorium:	Megváltozott szaglás Megváltozott ízérzékelés
Emésztőrendszer:	Funduscompliance csökkenése Antrumfeszülés fokozódása Elhúzódo gyomorürülés
Hormonrendszer:	Férfiakban csökkenő tesztoszteronszint Emelkedő leptinszint (férfi > nő)
Központi idegrendszeri neurotranszmitterek:	Nitrogén-monoxid Opioidok (állatkísérlet) Y-neuropeptid CART
Pszichoszociális tényezők:	Diszfória Fizikai aktivitás csökkenése Szegénység

Humán tanulmányok igazolták, hogy az idős szervezet tartós éhezést követően kevésbé képes fokozni a táplálékfelvételt [27], illetve az idősek hamarabb jóllaknak, mint a fiatalok. Ez feltételezhetően annak köszönhető, hogy a csökkenő nitrogén-monoxid-szintetáz aktivitás okán kialakuló funduscompliance-csökkenés következtében az antrum tágulása gyorsabban jelentkezik, és ez hozzájárul a korai jóllakottságérzés kialakulásához [3].

2.2.2. Az öregedéssel összefüggésbe hozható morfológiai, mikroszkópos és molekuláris változások a vastagbélben

Az élettani öregedés során a vastagbélben kialakuló molekuláris változások pontosan nem ismertek, az állatkísérletek és a humán tanulmányok eredményei nem egybehangzóak. Egy 2007-ben közölt amerikai tanulmányban a hasi szervek térfogatának és metabolikus aktivitásának változását tanulmányozták képalkotó vizsgálatokkal (CT, PET), különböző életkorban. A PET vizsgálatok eredményei szerint a vastagbél metabolizmusa nem változik szignifikánsan az öregedés során [28].

Szöveti és molekuláris szinten ugyanakkor számos változás alakul ki. *Baum és mtsai* által kutyákon végzett vizsgálat azt igazolta, hogy a tunica muscularis körkörös rétege egyre vastagabb az idő előrehaladtával, míg a hám, illetve a submucosa rétegei nem változnak jelentősen [29]. Más tanulmányok szerint a vastagbél falában a kollagénfibrillumok átmérője nő a harmadik trimeszterig, majd az öregedés során fokozatosan csökken. Ez a változás döntően a bal colonfelet érinti, ami jelentősen befolyásolhatja a bél húzószilárdságát. Nő a kollagénszálak sűrűsége is, köztük keresztkötések alakulnak ki, ami csökkenti a bélfal rugalmasságát. A tágulékonyság, a rugalmasság és a vastagbél belső átmérőjének csökkenése hozzájárulhat a diverticulumok kialakulásához [28]. Az enterális idegrendszerben (ENS) a submucosa és a plexus myentericus idegsejtjeinek száma egyaránt csökken. Egyes állatkísérletek és humán tanulmányok eredményei szerint a neurotranszmitterek csökkent termelése, a NOS-rendszer csökkent aktivitása, valamint az opioid receptorok nagyobb sűrűsége is hozzájárulhat a tranzitidő megnyúlásához és így az idősek körében gyakran előforduló székrekedés kialakulásához [30]. A vastagbél beidegzésének változása az izomzat működésére is hatással van. Csecsemő- és fiatal gyermekkorban az összehúzódások nagyobb amplitúdóval következnek be, aktívabb a bélmozgás, mint idősebb gyermekekben. Az állatkísérletek és a felnőtt humán tanulmányok eredményei nem egységesek arra vonatkozóan, hogy idősebb korban hogyan változik a vastagbél-tranzitidő [28].

A vastagbélhám négy-öt naponta újul meg az emberi szervezetben. A hámsejtek osztódásának és pusztulásának egyensúlya teszi lehetővé a kiegyensúlyozott hámregenerációt. Az egyensúly megbomlása kontrollálatlan sejtszaporodáshoz

(vastagbélrák) vagy hibás regenerációhoz (fekély) vezethet. Sokáig azonban nem volt ismert, hogy az élettani öregedés milyen hatással van a hámregenerációra, illetve összefüggésbe hozható-e a vastagbélrák kialakulásával. *Mandir és mtsai* különböző időpontban feláldozott patkányok testsúlyát, emésztőrendszeri szerveinek méretét, valamint a bélhám mitotikus és apoptotikus aktivitását vizsgálták. A vastagbél tömege és hossza a 9. hétig gyorsan növekedett, majd ezt követően a növekedés üteme lelassult. A vastagbélhamban a kripták osztódása és a sejtosztódás a 3. héten volt a legintenzívebb, majd folyamatosan csökkent a 9. hétig, ezt követően állandó szinten maradt. A sejtpusztulás (apoptózis) szintén a 3. héten volt a legnagyobb mértékű, majd folyamatosan csökkent a 48. hétig. Eredményeik szerint tehát a hámregeneráció a fiatal egyedekben volt a legintenzívebb, vizsgálatukból pedig arra következtetnek, hogy a hámiban fiatal korban végbemenő drámai változások az emésztőrendszer fejlődésével hozhatók összefüggésbe, majd ezt követően az öregedés nincs hatással a vastagbélhám megújulására [31]. *Xiao* munkacsoportjának eredményei ennek ellentmondanak. Patkányokon végzett kísérletükben idősebb (14 illetve 22 hónapos) egyedekben több osztódó sejtet (PCNA-pozitív) találtak a vastagbélhamban, mint a fiatalabbakban (4 hónapos), míg az apoptotikus, TUNEL-pozitív sejtek száma a 22 hónapos egyedekben volt a legkisebb. Az antiapoptotikus Bcl fehérje szintje a legidősebb állatokban volt a legnagyobb, míg a proapoptotikus Bak fehérje szintje az idő előrehaladtával folyamatosan csökkent a vastagbélhamban. Vizsgálatukból arra a következtetésre jutottak, hogy a vastagbélhamban az öregedés fokozott sejtosztódással és csökkent sejtpusztulással társul, ami részben magyarázatot adhatna az időskorban gyakrabban előforduló sporadikus vastagbélrák kialakulására [32]. A tanulmányok eredményeiben tapasztalt ellentmondások hátterében a kísérleti állatok változó életkora, a különböző magasságból történő mintavétel, valamint az eltérő mintafeldolgozási, festési és kiértékelési módszerek állhatnak [33].

Az öregedés során kialakuló változások az immunrendszert, így a szervezet egyik legnagyobb immunszervét, a nyálkahártyához kapcsolódó limfoid szövetet (mucosa-associated lymphoid tissue /MALT/) is érintik. A bélhez kapcsolódó limfoid szövetet (gut-associated lymphoid tissue /GALT/) döntően a tonsillák, a féregnyúlvány, a Peyer-plakkok, a coecum és a vastagbél limfoid aggregátumai, izolált limfoid folliculusok (ILF) alkotják. A tápcsatornán keresztül a szervezet számos kórokozóval és

táplálékkal bekerülő fehérjével van állandó kapcsolatban, ezért a GALT igen fontos feladata, hogy az ártalmatlan és a patogén mikroorganizmusokat elkülönítse és az utóbbiakkal szemben megfelelő védelmet biztosítson [34]. Idősekben a GALT működése jelentős mértékben megváltozik, ami az adaptív immunválasz hanyatlásával („immunosenescence”) és a természetes immunitás fokozott aktivitásával, így proinflammatorikus karakterrel jellemezhető („inflamm-ageing”) [35]. Sejt és molekuláris szinten lényeges változás következik be a luminális antigének transzportjában, amihez hozzájárulhat az M-sejtek számának csökkenése és a sejtkapcsoló struktúrák expressziójának csökkenése, ami az emésztőrendszeri hámbARRIER funkciójának romlásához vezethet. Időskorban megváltozik a mononukleáris fagocitarendszer működése és az IgA-termelés a tápcsatornában. A felnőttekre jellemző emésztőrendszeri mikrobióta két éves kor körül alakul ki, és viszonylag állandónak mondható, bár fertőzések, antibiotikus kezelések, a táplálkozási szokások megváltozása módosíthatják az összetételét. A mikrobióta stabilitása időskorban drámaian csökken; bifidobaktériumok kisebb számban, míg laktobacillusok, bizonyos enterococcus és Clostridium törzsek lényegesen gyakrabban fordulnak elő [34]. A vastagbélben a Toll-like receptorok kifejeződése csökken, proinflammatorikus citokinek szekréciója fokozódik [35,36]. A tápcsatorna immunrendszerének öregedése összefüggésbe hozható az idősök körében gyakrabban előforduló emésztőrendszeri daganatok, gyulladós és autoimmun kórképek, és súlyos gasztrointesztinális fertőzések kialakulásával.

2.3. A kolorektális daganatok és az öregedés epidemiológiai összefüggései

A gazdaságilag fejlett országokban a daganatos kórképek vezetnek a halálozási statisztikákat, a fejlődő országokban a második helyen állnak. A fejlődő országokban is egyre nagyobb számban regisztrált tumoros betegségek kialakulásának valószínű okai, a társadalom elöregedése, a dohányzás, a fizikai aktivitás csökkenése és a táplálkozási szokások megváltozása [37]. Egy, az Egyesült Államokban végzett, nagy esetszámú felmérés eredményei szerint a 40-80 éves korosztályban tumoros megbetegedés a vezető halálok mindkét nemben. A vezető halálokokat vizsgálva, a teljes populációt figyelembe véve a kolorektális daganatok a harmadik helyen, a 40-80 éves korosztályban a férfiak

körében a második helyen, a nők körében a harmadik helyen állnak [38]. A sporadikus kolorektális karcinóma (CRC) incidenciája nagyobb férfiaknál, mint nőknél, valamint az öregedés és a férfi nem jelentős kockázati tényezők a daganat kialakulására. Ötvenéves kor alatt a CRC incidenciája kicsi és az idő előrehaladtával nő; a diagnózis idején a medián életkor 70 év a fejlett országokban [39]. Az előrehaladott életkor a választott kezelési stratégiát és annak sikerességét is jelentősen befolyásolhatja. A CONCORD vizsgálat eredményei szerint vastag- és végbélrák miatt operált betegeknél a 75 évnél idősebb korosztályban mindössze fele annyi betegnél volt kuratív a műtéti beavatkozás, mint 15-64 éves kor között [40]. A CRC miatt operált betegeknél önmagában az életkor is jelentősen befolyásolhatja a műtét kimenetelét. A műtétet követően 30 nappal, illetve 6 hónappal az idősebb korosztályban egyre magasabb a halálozás [41]. A hazai Nemzeti Rákregiszter adatai (<http://www.oncol.hu/rakreg/stat3/index.html>) szerint az idő előrehaladtával Magyarországon is egyre gyakrabban fordul elő vastag- és végbélrák, majd 75-80 éves kor felett csökkenés figyelhető meg e tekintetben. Időseknél azonban nemcsak az invazív vastagbélrák, hanem már a rákmegelőző adenómák prevalenciája is nagyobb [42]. Időskorban a vastagbél benignus és malignus elváltozásai nagyobb arányban érintik a jobb colonfelet [43,44], ezért a betegség tünete szegényebb lehet, előrehaladottabb stádiumban kerülhet felfedezésre, illetve a szűrő jelleggel végzett recto-sigmoideoscopya kevésbé lehet eredményes [45]. Az öregedés tehát önmagában is meghatározó tényező lehet mind a vastagbélrák kialakulásában és kiterjedtségében, mind a betegség diagnosztikai és terápiás lehetőségeit tekintve.

2.4. Az időskori sporadikus vastagbélrák makroszkópos, szövettani és molekuláris jellegzetességei

A rosszindulatú daganatok az idő előrehaladtával egyre gyakrabban fordulnak elő. Az öregedés és a daganatok, így a vastagbélrák kialakulásában is több molekuláris kapcsolódási pont feltételezhető. Emellett említésre méltó, hogy a fiatalabb nemzedékben kialakuló kolorektális karcinóma számos tekintetben eltérést mutat az időskori sporadikus vastagbélrákhoz képest. Ilyen eltérés például a tumor lokalizációja, kiterjedtsége, a nemek közti megoszlása, a multiplicitása, a nyirokcsomó-érintettség, a szövettani kép és a prognózis vonatkozásában figyelhető meg [46].

Időskorban a rákmegelőző adenomatosus elváltozások [47] és a kolorektális karcinóma is [44,48,49] gyakrabban fordul elő a proximális colonban, különösen a nők körében. A legidősebb korosztályban az esetek több, mint felében a vastagbélrák a proximális vastagbélben alakul ki. Ennek oka teljes egészében még nem ismert, bár a környezeti tényezőknek, a női nemi hormonoknak, a bélbe ürülő epesavaknak, a bélben élő baktériumflórának, a helytelen arányú rost, kalória és zsír bevitelnek, a megnyúlt tranzitidőnek, a székrekedésre való hajlamnak, a karcinogének hosszú éveken át tartó hatásának meghatározó szerepe lehet [46,50].

Az időskori vastagbélrák általában előrehaladott állapotban kerül felfedezésre, tünetszegény volta miatt [48]. A legidősebb korosztályban ugyanakkor a vastagbél-daganatok nyirokcsomóba történő áttétképzése kisebb mértékű (38%), mint a némileg fiatalabb korosztályban (46%) [49].

Több vastagbél-daganat együttes jelenléte időskorban gyakrabban fordul elő, bár az öregedés hatása ennek kialakulására nem ismert. A fiatal korosztályban többszörös vastagbél-daganat általában örökletes kórképekre jellemző (például HNPCC, FAP) [51]. Ha az örökletes kórképeket nem vesszük figyelembe, akkor időskorban többszörös kolorektális karcinóma gyakrabban fordul elő. Több daganat együttes fennállása esetén azok általában egymás közelében helyezkednek el [52,53], a diagnózis idején akár már több elváltozás is előrehaladott állapotban van, illetve kezdeti stádiumban lévő (intramucosalis) daganattal társul [54] és gyakran a távoli áttétképzés is megfigyelhető [53].

Az emésztőrendszerben, így például a gyomorban és a vastagbélben az időskori daganatok jellegzetes szövettani megoszlást mutatnak. *Arai és mtsa* közleményében arról számolt be, hogy időskorban a medulláris típusú, alacsonyan differenciált adenokarcinóma és a microsatellitainstabil mucinosus kolorektális karcinóma fordul elő leggyakrabban [46]. Megállapították, hogy az időskori, alacsonyan differenciált vastagbélrákok kétharmada úgynevezett medulláris fenotípusú kolorektális karcinóma. *Knox és mtsainak* vizsgálata ennek némileg ellentmond. Eredményeik szerint a medulláris típusú CRC prevalenciája valóban jelentősen nő az öregedés során, azonban a 3295 kolorektális karcinóma közül mindössze 91 esetben (2,8%-ban) igazolták a medulláris típusú CRC jelenlétét [55]. *Fiehn és mtsainak* közleménye szintén a daganattípus ritka voltát támasztja alá [56]. Szövettanilag a medulláris fenotípusú

alacsonyán differenciált daganatok csoportjába sorolható a medulláris típusú alacsonyán differenciált karcinóma, a solid típusú alacsonyán differenciált karcinóma, a nagysejtes minimálisan differenciált karcinóma és a medulláris karcinóma [46]. Ezeknek az elváltozásoknak szövettani jellegzetessége, hogy a sejtek nem alkotnak mirigyeket hanem trabekulákba rendeződnek, finom kromatinszerkezetű magot és feltűnő magvacskát tartalmaznak, gyakran limfocitainfiltráció figyelhető meg. Ez a szövettani típus leggyakrabban idős nőkben fordul elő, döntően a proximális colonban, a daganatok nagyméretűek, a nyirokcsomó-, illetve távoli áttétképzés azonban kisebb mértékű, és a szövettani megjelenésük ellenére relatíve jó a prognózisuk [57,58]. Az időskori medulláris karcinóma bizonyos tulajdonságaiban hasonlít a fiatalkori HNPPC-hoz, például a diploid DNS-mintázat, a gyakran kimutatható microsatellitainstabilitás és az alacsony p53-expresszió tekintetében [58]. A *hMLH1*-promoter hipermetilációja és a hMLH1 fehérje csökkent termelése szintén gyakran fordul elő ebben a szövettani csoportban, amely fontos szerepet játszhat a karcinogenezis folyamatában [59].

A mucinosus karcinóma a vastagbél-daganatok 6-15%-át teszi ki. Bár fiatalabb korban gyakrabban fordul elő, időskorban az idő előrehaladtával incidenciája fokozatosan nő [49]. Ez a nagy szövettani csoport hisztológiai, illetve genetikai szempontból kisebb részekre tagolható (papillotubularis vagy mucocellularis típusú, „fixed” vagy „floating” típusú, aneuploid vagy diploid típusú, microsatellitastabil vagy -instabil), de valamennyi fajtája közül igen jellegzetes és nagy arányban van jelen (27-62%) a microsatellitainstabil mucinosus kolorektális karcinóma [60]. Általában a proximálisabb vastagbél szakaszokon fordul elő, jellemző rá az exophyticus, expanszív növekedés, szövettani vizsgálata során a Crohn-betegséghez hasonló limfoid reakciót, illetve limfocitainfiltrációt lehet megfigyelni és gyakran hiányzik a hMLH1-expresszió. A medulláris típusú alacsonyán differenciált adenokarcinómával ellentétben a microsatellitainstabil mucinosus karcinóma nem mutat életkorral összefüggő halmozódást, bár a két tumor kialakulásában feltételezhetően számos hasonlóság van [60].

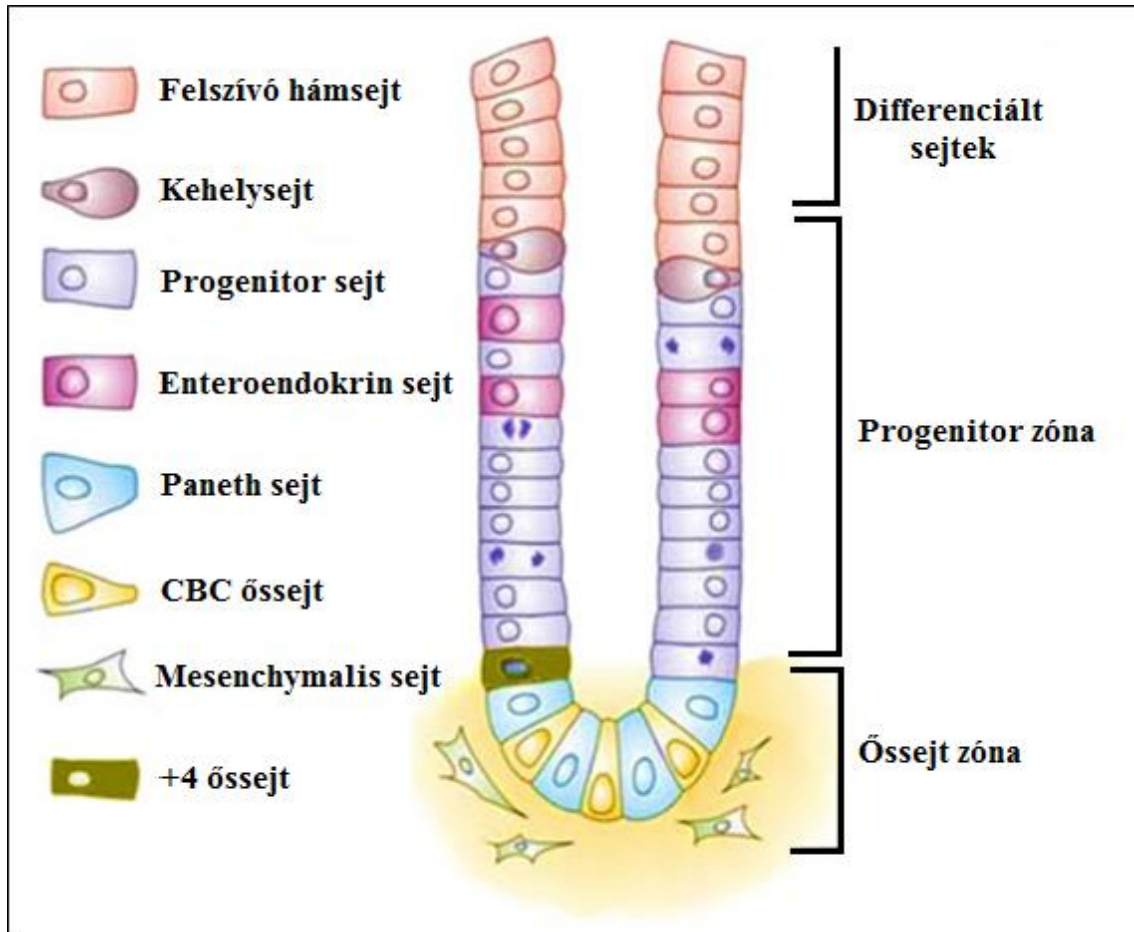
2.5. Az öregedés és a sporadikus kolorektális karcinóma kialakulásának lehetséges molekuláris kapcsolódási pontjai

Az öregedés és a kolorektális karcinogenezis pontos mechanizmusa teljes egészében nem ismert. A két folyamat között ugyanakkor számos molekuláris kapcsolódási pont van, amely rávilágíthat arra, hogy milyen összefüggésben áll az öregedés a daganatok kialakulásával. Mindkét folyamatra jellemző lehet a sejtmagban lévő és a mitokondriális DNS károsodása, bizonyos genetikai és epigenetikai eltérések (promoter-hipermetiláció, telomerázaktivitás csökkenése), az apoptózis vagy a DNS-hibajavítás megváltozása, a metabolizmusban és a neuroendokrin rendszer működésében bekövetkező változások és az immunrendszer „öregedése” [46,61].

2.5.1. Az időskori vastagbélrák és a daganatössejtek

A kolorektális epithelium határt képez a belső milió és a külvilág között, és a tápanyagfelszívásban is szerepet játszik. A felnőtt emberi szervezetben a vastagbélhám 4-5 naponta megújul, a regeneráció a kripták alapjánál elhelyezkedő össejtek révén valósul meg. Az össejtek a lumen felé vándorolva különböző hámsejteké differenciálódnak, majd az elpusztult sejtek leöklődnek és a béltartalommal távoznak (proliferációs hierarchia) (2. ábra). Ezek az össejtek morfológiailag nem különíthetők el a többi hámsejtől, immunhisztokémiai jelölésekkel próbálják azonosítani őket.

Több munkacsoport vizsgálta az öregedés vastagbélhámra, illetve az össejtek viselkedésére gyakorolt hatását egerekben. Az össejtek működésére a hámpusztulás és a hámregeneráció mértékéből lehet következtetni. Egészséges egyedekben az össejtek környezetében megtalálható néhány apoptotikus sejt, és ez nem változik az élettani öregedés során. *Martin és mtsai* kis dózisu gamma-besugárzást követően idősebb egerekben közel kétszer annyi pusztuló sejtet találtak hasonló helyzetben, mint fiatalabb egerekben. Vizsgálták továbbá a kripták túlélését is a besugárzást követően. Nagyobb dózisu besugárzás után az idősebb egerekben sokkal gyorsabban csökkent a túlélő kripták száma. A besugárzást követően lehetőségük nyílt a hámregeneráció tanulmányozására is, és megállapították, hogy az idősebb egerekben lényegesen lassabban regenerálódott a vastagbélhám [62].



2. ábra: Proliferációs hierarchia az emésztőrendszeri hámban. (Módosított ábra *Vries és mtsai* alapján [63]. CBC össejt: Crypt Base Columnar össejt; +4 össejt: olyan össejt, amely arról kapta a nevét, hogy általában az össejt zóna és a progenitor zóna határán, a bázistól számított negyedik sejtpozícióban helyezkednek el.)

Az utóbbi években egyre több tanulmányban hozták összefüggésbe a hámeredetű daganatok kialakulását – így a kolorektális karcinogenezist is – az állandó sejtmegújulásra képes össejtekkel, a daganatössejtekkel (cancer stem cell/CSC/) (a daganat, mint „össejtbetegség” elmélet). A daganatössejtek kialakulásának pontos folyamata nem ismert. Egyes feltételezések szerint mutáció következtében jönnek létre az egészséges össejtekből. *Levi és mtsai* patkányokon végzett kísérletben igazolták, hogy a vastagbélkriptákban nő a daganatössejtek száma az öregedés során és karcinogén dimetilhidrazin-kezelést (DMH) követően. Az utóbbi két hatás összeadódott, vagyis az idős és karcinogénnel kezelt állatokban volt a legnagyobb a daganatos sejtszám növekedése. Eredményeik szerint a daganat kialakulásának folyamatában az össejtszám-

növekedés igen korai lépés. A későbbiekben, a vastagbélrák szűrésében is szerepet kaphatnak ezek a sejtek, hiszen az épnek tűnő vastagbélhamban jelenlevő CSC számának növekedése utalhat a vastagbélrák kialakulására, akár évekkel a daganat megjelenése előtt [64].

Patel és mtsai vastagbélrákos mintákban három sejtfelszíni marker, a CD44, a CD166 és az ESA segítségével azonosították a vastagbélrák-össejteket. Vizsgálatukban arra a kérdésre kerestek választ, hogy a daganatössejtek száma hogyan változik az életkor függvényében, a szövettanilag ép hamban és a daganatmegelőző állapotokban. Az ép hamban nagyobb volt a CD44, a CD166 és az ESA kifejeződése idős korban, mint a fiatalabbakban, ami arra enged következtetni, hogy a daganatössejtek száma az életkor előrehaladtával nő. A fent említett jelzőmolekulák az adenomatosus mirigyekben is megtalálhatóak, így nagy valószínűséggel ezek az össejtek szerepet játszhatnak a daganatok kialakulásában. További megfigyeléseik szerint a hamban is jelenlevő daganatössejtek száma pozitív összefüggést mutat a vastagbélpolipok számával, illetve a daganatössejtszám és az EGFR-expresszió párhuzamosan növekszik az öregedés során [65].

2.5.2. Genetikai instabilitás

Belső és külső környezeti tényezők hatására (ultraibolya-sugárzás, oxigén szabadgyökök) mutációk halmozódnak fel a szervezetben, szerv- és szövetspecifikus módon [66]. A fiatalkorra jellemző, valamennyi szervben előforduló, hasonló mutációs profillal ellentétben, idős korban a mutációk felhalmozódásának mértékében az egyes szervek jelentősen különbözhetnek egymástól, illetve egyazon szervben belül a sejtek között is eltérés mutatkozik [67]. Az emlősök szöveteiben a random mutációk genetikai hatásai sokkal jelentősebbek, mint azt korábban gondolták. Ezek a mutációk a transzkripciót ellenőrző folyamatokban változást okozhatnak, aminek következtében heterogén sejtpopuláció, illetve nagyszámú, az eredeti működését tekintve módosult, vagy feladatát vesztett sejt jön létre [68]. A sejtekben felhalmozódó genetikai változások hozzájárulhatnak a sejt öregedéséhez, pusztulásához, de akár a daganatsejtté való átalakulásához is.

2.5.3. Epigenetikai változások

2.5.3.1. A promotermetiláció

Az életkor és a daganatok incidenciája között szoros kapcsolat van. Az időskori daganatok kialakulásában epigenetikai tényezők is szerepet játszanak, amelyek a DNS-bázissorrend megváltozása nélkül módosítják a gének működését. Ilyen epigenetikai változás például a tumorszuppresszor gének promoterrégiójában bekövetkező fokozott metiláció (hipermetiláció). A metilációt az emlős sejtekben háromféle metiltranszferáz enzim végzi (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B), a metilcsoportot az S-adenozin-metioninról hasítják le [69]. A metiláció a citozin purin gyűrűjének 5. szénatomján következik be, de csak abban az esetben, ha a citozint hozzá foszfodiészter kötéssel kapcsolódó guanin követi. Ez a dinukleotidpár (CpG) legnagyobb koncentrációban általában a gének 5' végén, a promoterrégióban található, amelyet CpG-szigetnek nevezünk. A fiatal emberi szervezet DNS-ében a CpG-helyek közel 70%-a metilált, azonban a metiláció általában ismétlődő szekvenciákat (például Alu-szekvencia), illetve a CpG-helyekben szegényebb szekvenciákat érint, míg a promoterrégióban lévő CpG-szigetek többnyire nem metiláltak. A gének metilációs mintázata számos tényező hatására megváltozhat. Ezután több fehérje közreműködésével (például metilált-DNS-kötő fehérje, hisztonok, deacetilázok) tömör kromatinszerkezet alakul ki, ami nem engedi a transzkripciós faktorok bekötődését a gének promoterrégiójába, ezzel megakadályozva a gének működését [69].

A CpG-helyek metilációjának két típusát különítjük el. Az életkorhoz kötött, A-típusú (age-related) CpG-hipermetiláció az ép vastagbél-nyálkahártyában és a tumorban egyaránt megtalálható. Az A-típusú CpG-hely-metiláció lineárisan nő az idő függvényében, bár ennek ütemében jelentős egyéni különbségek lehetnek [69]. *Issa és mtsai* az ösztrogénreceptor (*ER*) öregedéssel összefüggésbe hozható metilációját igazolták a gén CpG-szigeteiben, ép vastagbél-nyálkahártyában. Továbbá az *ER* gén fokozott metilációját találták kisméretű adenómákban és vastagbélrákban, ami arra enged következtetni, hogy az *ER* gén metilációhoz köthető inaktivációjának fontos szerepe lehet a karcinogenezis korai szakaszában [70]. Az A-típusú metilációt más szervekben (például

a gyomorban), illetve az emésztőrendszeren kívül más szervrendszerekben is igazolták [69] (3. táblázat).

3. táblázat: Az A- és C-típusú metiláció által érintett gének az öregedés során ép szövetekben, valamint daganatokban. (Módosított táblázat Yuasa alapján [69].)

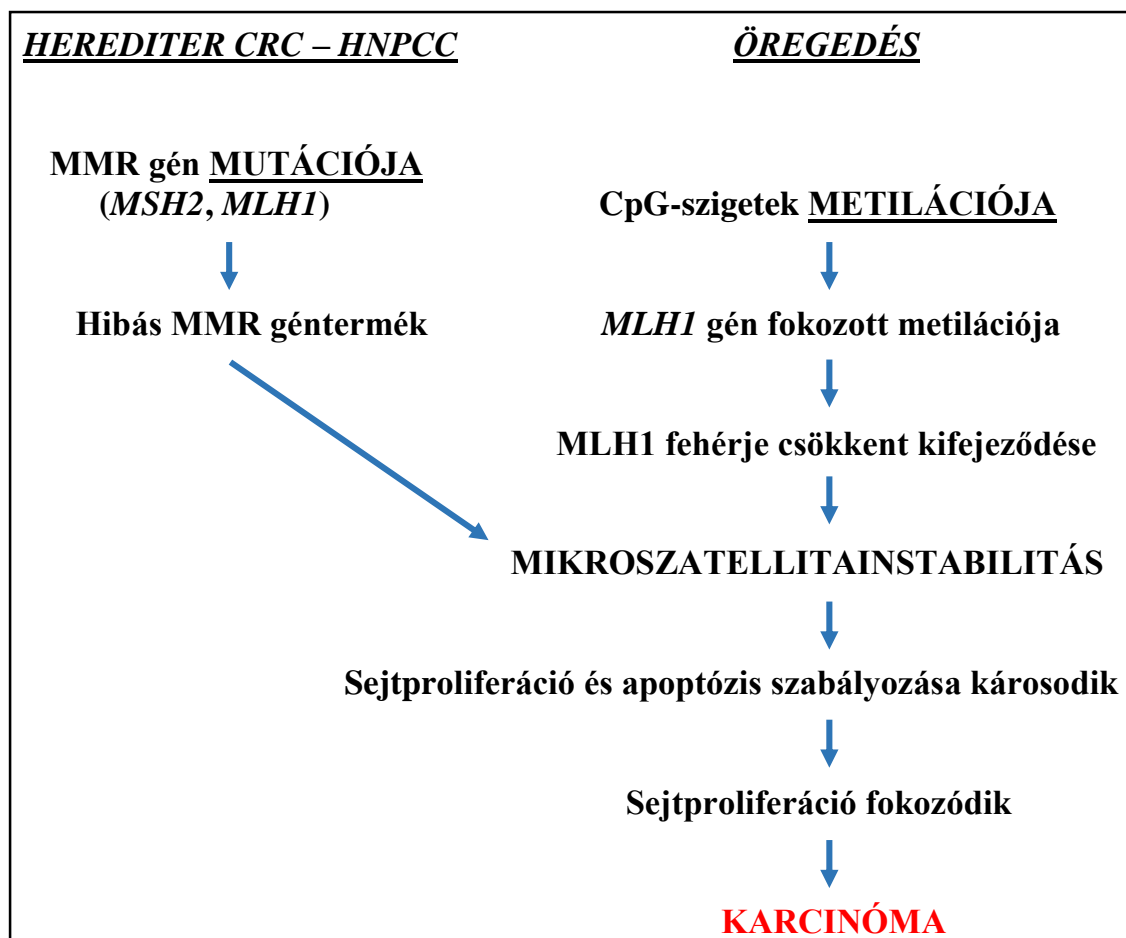
Génszimbólum	Kromoszómalokalizáció	Metiláció az ép szövetben	Metiláció a daganatban
A-típusú metiláció:			
<i>CSPG2</i>	5q12-14	Vastagbél	Vastagbél
<i>ER</i>	6q25.1	Vastagbél	Vastagbél, tüdő, leukémia
<i>MYOD1</i>	11p15.4	Vastagbél	Vastagbél, tüdő
<i>IGF2</i>	11p15.5	Vastagbél	Vastagbél, leukémia
<i>N33</i>	8p22	Vastagbél	Vastagbél, prosztata
<i>HIC1</i>	17q13.3	Prosztata	Vastagbél, tüdő, prosztata
<i>DBCCR1</i>	9q32-33	Húgyhólyag	Húgyhólyag
C-típusú metiláció:			
<i>APC</i>	5q21	-	Vastagbél, gyomor, nyelöcső
<i>COX-2</i>	1q25.2-25.3	-	Vastagbél
<i>hMLH1</i>	2q22	-	Vastagbél, gyomor, méh
<i>DAPK</i>	9q34.1	-	Vastagbél, fej-nyak
<i>WT1</i>	11p13	-	Vastagbél, tüdő
<i>TIMP3</i>	22q12.1-13.2	-	Vastagbél, vese, tüdő, agy
<i>p14ARF</i>	9p21	-	Vastagbél, gyomor, méh
<i>MGMT</i>	10q26	-	Vastagbél, tüdő, fej-nyak
<i>GSTP1</i>	11q13	-	Vastagbél, tüdő, prosztata, máj
<i>P16INK4a</i>	9p21	-	Vastagbél, gyomor
<i>P15INK4b</i>	9p21	-	Leukémia, limfóma

Issa és mtsai colitis ulcerosában szenvedő betegek szövettanilag ép, dysplasticus és daganatos vastagbél biopsziás mintáinak metilációs mintázatát vizsgálták, egészséges kontrollcsoporthoz viszonyítva. Fokozott metilációt találtak a dysplasticus és a daganatos mintákban a kontrollokhöz képest, három gén esetében (*ER*, *MYOD*, *p16*) pedig az ép hámban is fokozott CpG-sziget-metilációt igazoltak. A krónikus gyulladás következtében felgyorsult sejtmegújulás összefüggésben állhat a hipermetilációval, ilyen szempontból a colitis ulcerosát pedig úgy is tekinthetjük, mint a vastagbél-nyálkahártya hámsejtjeinek felgyorsult öregedését [71]. Hasonlóképpen fokozott A-típusú metiláció látható a gyomornyálkahártya hámsejtjeiben krónikus *Helicobacter pylori*-fertőzés esetén [69].

Mind a colitis ulcerosa a vastagbélben, mind a krónikus *Helicobacter pylori*-fertőzés a gyomorban hajlamosító tényező az emésztőrendszeri daganatok kialakulására, ezért a hipermetiláció kapcsolódási pont lehet az öregedés során megfigyelhető változások, az emésztőrendszeri gyulladásos betegségek és a daganatok kialakulása között.

A metiláció másik típusa kizárólag daganatokban fordul elő, amit C-típusú (cancer-related) metilációnak nevezünk. A C-típusú metiláció döntően a tumorsuppresszor, illetve a DNS-hibajavító gének promoterrégiójában lévő CpG-szigeteket érinti, bizonyos gének metilációja pedig daganatspecifikus. A *hMLH1* gén promoterrégiójának hipermetilációja például a vastagbélrákban, a gyomor és az endometrium daganataiban, míg a *BRCA1* gén hipermetilációja a petefészek és az emlő daganataiban figyelhető meg [69]. A CpG-szigetek fokozott metilációja következtében kialakuló daganatokat CIMP típusú (CpG island methylator phenotype) daganatoknak nevezzük. A vastagbél-daganatok vizsgálata során gyakran megfigyelhető a mikroszatellitainstabilitás (MSI), mind a csírasejteket érintő mutáció következtében kialakuló örökletes kórképekben (például HNPCC), mind a sporadikus vastagbélrák bizonyos eseteiben. A mikroszatellitainstabil sporadikus vastagbélrák kialakulásában epigenetikai változásoknak, például a metilációnak is jelentősége lehet, amennyiben a hibajavításban (mismatch repair-ben /MMR/) szerepet játszó gének működése a promoterrégió hipermetilációja következtében akadályozott. A MMR gének hibás működése miatt a mikroszatelliták területén bekövetkező deléció, inszerció nem kerül kijavításra, ami az ismétlődő szakaszokon kóros szekvenciák fennmaradását, mikroszatellitainstabilitást, az érintett gének (például sejtosztódásban, apoptózisban szerepet játszó gének) hibás működése révén pedig fokozott sejtosztódást, daganatok kialakulását eredményezheti [46]. A fent említett *hMLH1* gén terméke olyan fehérje, amely nélkülözhetetlen a MMR hibajavító fehérje-komplex felépüléséhez. Akár csírasejtmutáció következtében változik meg a fehérjét kódoló gén, akár epigenetikai változások, például promotermetiláció miatt csökken vagy szűnik meg a fehérje termelése, a MMR fehérje-komplex működése jelentősen károsodik, ami a daganat kialakulásának kedvez. A *hMLH1* gén promotérének fokozott metilációja mind a szövettanilag ép vastagbélhamban, mind a vastagbélrákban összefügg az életkorral [46], de más gének, például az *ER* [70], a *N33* és a *MYOD* gén [72] promoterrégióiban is fokozódó metilációt találtak az öregedés során. Mivel a CpG-sziget hipermetilációja a génműködést nagymértékben befolyásolja, az öregedéshez

köthető metiláció jelentős szerepet játszhat az időskori vastagbélrák kialakulásában [46,69]. *Arai és mtsai* 23 medulláris típusú és 12 pleiomorf vastagbélkarcinómában vizsgálták a *hMLH1* gén promoterrégiójának metilációját, a génkifejeződést, a fehérjetermelést és a mikroszatellitainstabilitást. Vizsgálatuk eredményei szerint az időskorban - különösen a nők körében - gyakrabban előforduló medulláris típusú karcinóma esetében lényegesen nagyobb volt a *hMLH1* gén promotermetilációja és a mikroszatellitainstabilitás, és kisebb volt a gén kifejeződése, illetve az általa kódolt fehérje szöveti szintje [59] (3. ábra).

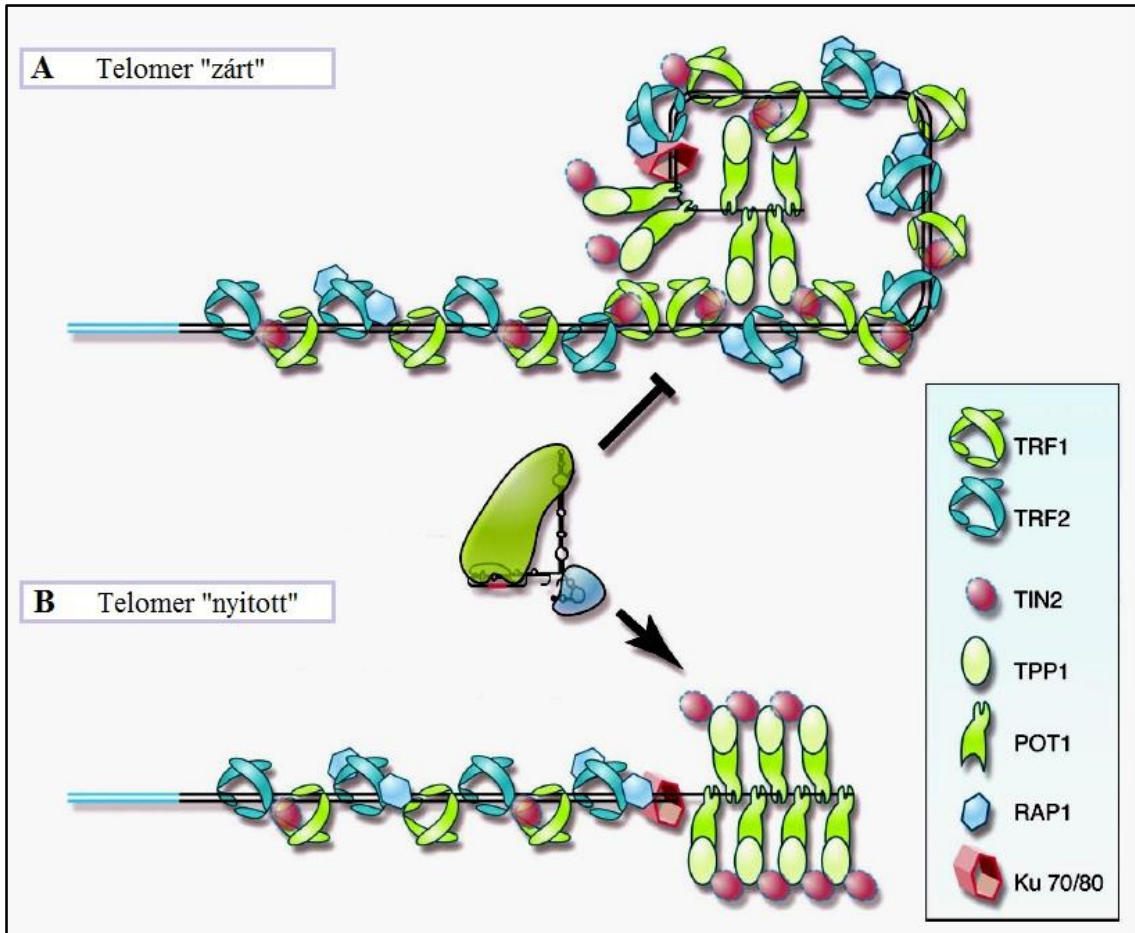


3. ábra: A promoter-hipermetiláció jelentősége az öregedés és az időskori emésztőrendszeri daganatok kialakulásában. (Módosított ábra *Arai és mtsa* alapján [46].)

2.5.3.2. A telomerrövidülés

A telomer a kromoszóma 3' végén található, ismétlődő DNS-szakaszokból (TTAGGG) épül fel, amely génterméket nem kódol, feladata a kromoszóma állandóságának biztosítása. Az emberi szervezet sejtjeiben a telomer 0,5-15 kilobázis hosszúságú, hosszát alapvetően az egyén életkora, a sejtek osztódási aktivitása és a minta szövettani típusa befolyásolja. A telomerhez, annak hosszától függően számos fehérje kapcsolódhat, amely meghatározza a telomer szerkezetét (telomer „nyitott”/telomer „zárt”). Ha a telomer elég hosszú, fehérjék bekötődését követően olyan szerkezetet vesz fel, ami a telomer hosszát növelő telomeráz enzim kapcsolódását megakadályozza (telomer „zárt”). Ha a telomer rövid, akkor kevesebb fehérje tud kötődni, azok között kötés nem alakulhat ki, így a telomer a telomeráz enzim számára hozzáférhetővé válik (telomer „nyitott”) [73] (4. ábra).

A telomer minden egyes sejtosztódás során rövidül, ami a DNS-polimeráz enzim működéséből következik („end replication problem” of DNA-polymerase) [74]. A telomerrövidülés nemcsak a sejtosztódás során következhet be, hanem a telomert bizonyos környezeti tényezők (például az oxigén szabadgyökök) is rövidíthetik. Ha a kromoszómarövidülés telomer hiányában kódoló szekvenciákon következne be, akkor ez részben géntermékek hiányával, funkcióvesztéssel járhatna, részben lehetőséget adna a kromoszómák összekapcsolódására, genetikai instabilitás kialakulására, teljes genetikai káoszt okozva, amely a sejtek pusztulását idézné elő. A sejtekben a telomer hosszának fenntartását a telomeráz enzim biztosítja. A telomeráz enzimkomplexnek szerkezetileg három részét különítjük el. A TERC (telomerase RNA component) templátként szolgál a DNS-szintézishez, a TERT (telomerase reverse transcriptase) az RNS-ről történő DNS-átírásért felelős, a dyskerin pedig az RNS-hez kötődő, azt módosítani képes fehérje. Az elsőként felfedezett telomerázhiánnyal járó genetikai betegség a dyskeratosis congenita, azóta a telomeráz komplex mindhárom elemének több mutációját leírták [73].

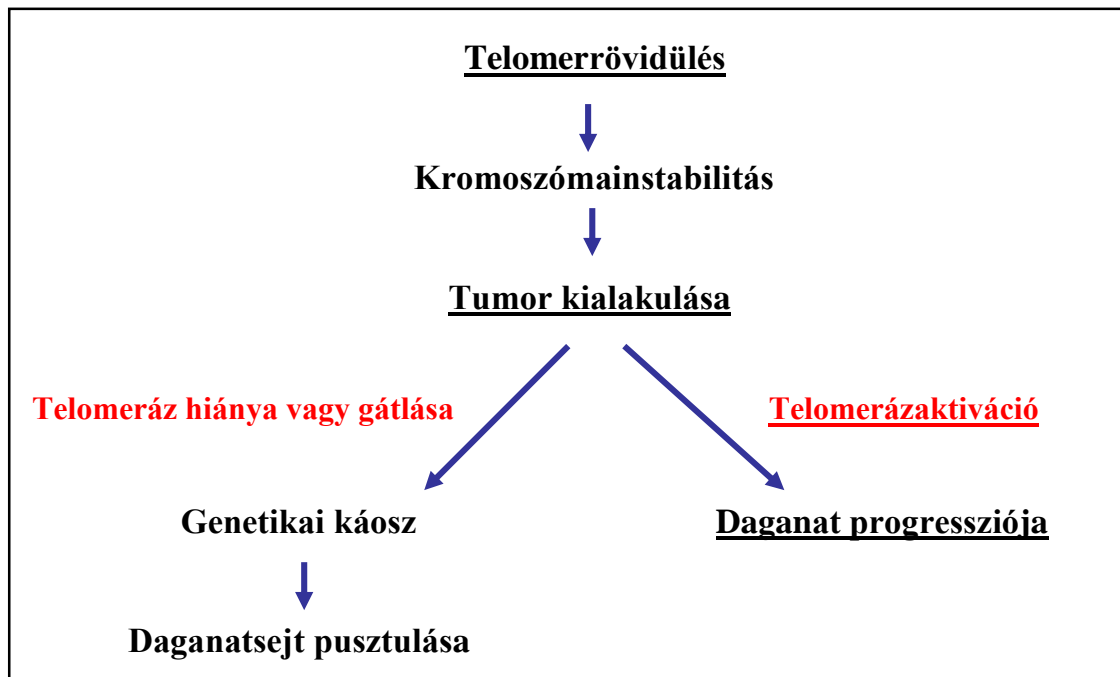


4. ábra: A telomer kétféle szerkezete – A: Telomer zárt (Telomer „closed”), B: Telomer nyitott (Telomer „open”). (Módosított ábra *Aubert és mtsa* alapján [73].)

A telomer hossza lényegesen csökken az idő függvényében az emberi szervezet számos sejtjében. Ilyen sejtek például a bélhámsejtek, a hepatociták, a perifériás vérsejtjei, a limfociták, az endothelsejtek, a vese hámsejtjei, a tüdő hámsejtjei és az izomsejtek. A telomerrövidülést azonban nemcsak az öregedés során figyelték meg, hanem krónikus betegségekben is, többek között gyulladós bélbetegség fennállása esetén a bélhámsejtekben. Egyes betegségekben a telomer rövidülésének mértéke szorosan összefügg a kórkép progressziójával (például májcirrhosis) [75]. Bizonyos daganatokban (vastagbél, hasnyálmirigy, máj, agy, prosztatata, tüdő, emlő és fej-nyaki karcinómák, valamint a hemopoetikus rendszer malignómái) a telomer hossza a betegség kialakulására, illetve annak lefolyására enged következtetni [74].

A daganatok incidenciája az idő előrehaladtával nő, a tumoros betegségek jelentős részét az öregedéssel összefüggő betegségnek is tekinthetjük. A rövidülő telomernek több

szempontból is jelentősége lehet a daganatok kialakulásában. Mivel a telomerrövidülés következtében a sejtek idővel elpusztulnak, ezért a daganatsejtek életben maradásához nélkülözhetetlen a telomer megfelelő hosszának fenntartása. Egészséges felnőtt emberekben a telomer hosszát növelő telomeráz enzim csak a csírasejtekben, illetve bizonyos őssejtekben, progenitor sejtekben aktív. Ugyanakkor az aktivált limfocitákban és bizonyos daganatos megbetegedésekben igazolható a telomeráz enzim reaktiválódása. Az aktív enzim a telomer hosszát folytonosan megnöveli, így biztosítva a tumoros sejtek „halhatatlanságát”. A daganatos sejtek jelentős részében azonban a fokozott telomer aktiváció ellenére sokkal rövidebb a telomer, mint a környező, egészséges szövetben. Erre a látszólagos ellentmondásra az adhat magyarázatot, hogy a telomerrövidülés a kromozómainstabilitás révén az ép sejtek daganatsejtté történő átalakulását segíti elő, míg a rövidebb telomer stabilizálása a fokozott telomerázaktiváció révén nélkülözhetetlen a daganatos sejt életben maradásához [74] (5. ábra).



5. ábra: A telomerrövidülés és a telomeráz enzim aktivációjának hatása a daganat kialakulására és fennmaradására. (Módosított ábra Jiang és mtsai alapján [74].)

2.6. A génkifejeződés és bizonyos fehérjék szintézisének megváltozása a vastagbélben az öregedés, valamint a kolorektális karcinogenezis során

Az öregedés során a szervezetben kialakuló változások molekuláris háttere pontosan nem ismert. Az öregedési elméletek között napjainkban már helyet kap az életkorral változó génkifejeződés lehetséges hatása is. Az elmúlt tíz évben több állatkísérletben génexpressziós szinten is tanulmányozták az öregedés során kialakuló változásokat, microarray vizsgálatok segítségével.

Az eddigi vizsgálatok eredményei azt bizonyítják, hogy az emésztőrendszerben az idő előrehaladtával kialakuló változások szerv-, illetve szövetspecifikusak. A *Lee és mtsai* által patkányokon végzett kísérletben a patkóbél és a vastagbél génexpressziós mintázatának megváltozása eltérő volt. A vastagbélben ezek a változások döntően fokozott „génműködést” eredményeztek, a vékonybéllel ellentétben. A vizsgálat eredményei szerint a fokozott mRNS-expresszió leginkább a sejtek metabolizmusában szerepet játszó enzimeket és membrántranszportereket kódoló géneket érintették, ami szintén a fokozott sejtosztódásnak és az időskori vastagbélrák kialakulásának kedvezhet [76]. A kolorektális karcinogenezisben már számos gén pontmutációját leírták. *Lee* munkacsoportja tanulmányozta a daganatok kialakulásához köthető gének („cancer-related genes”) kifejeződésének megváltozását nem daganatos, idősebb egyedekben is. Ezek közül több gén (*c-K-ras*, *maspin*, *p21*, *CD44*, *citokróm P450 4F1*, riboszomális fehérjéket kódoló gének, *TIF 1- α* , *elongációs faktor 1- γ*) mRNS-expressziója fokozódott a vastagbélben az élettani öregedés során, míg a vékonybélben ezeknek a változásoknak jelentős része nem igazolódott. A génkifejeződés megváltozásához epigenetikai változások, például a metilációs mintázat megváltozása is hozzájárulhat [76,77].

A korábbi tanulmányok eredményei szerint az emésztőrendszer növekedésében, a bélmozgás, a tápanyagfelszívás és a hámsejtosztódás szabályozásában az IGF-rendszernek meghatározó szerepe van. Az IGF-rendszer legfontosabb tagjai a vérben keringő IGF-I, a hámsejtek IGF-I receptora (IGF-IR), és a különböző típusú IGF-kötő fehérjék (IGFBP-3, IGFBP-4). Az azonban nem volt ismert, hogy az öregedés vagy a kalóriabevitel csökkentése milyen hatással lehet az IGF-rendszerre. *Hallberg és mtsai* különböző életkorú patkányok vastagbéljében vizsgálta az *IGF-I*, az *IGF-IR*, valamint az *IGFBP-3* és *IGFBP-4* mRNS-expressziójának változását, hagyományos táplálás és

kalóriacsökkentés mellett. Mind az öregedés, mind a kalóriamegszorítás mRNS-expressziós szinten is érzékelhető változást hoz létre az IGF-rendszerben, csökken az *IGF-I* és *IGF-IR* kifejeződése a vastagbélhamban [78].

Az IGF-rendszeren kívül más növekedési faktor hatását is vizsgálták az emésztőrendszerben, az öregedéssel és a kolorektális karcinogenezissel kapcsolatban. A korábbi morfológiai vizsgálatokban fokozott sejtosztódást és csökkent mértékű sejtpusztulást írtak le a vastagbélhamban az öregedés során, majd később arra is fény derült, hogy fokozódik az EGFR-rendszer aktivitása is az emésztőrendszerben. Az EGFR-rendszer számos sejtműködésben fontos szerepet tölt be, beleértve a sejtosztódást és a daganatok kialakulását is. A fokozott aktivitást részben a megnövekedett mennyiségű TGF- α előalakjának EGF-receptorhoz való kötődésével magyarázták. A másik lehetséges magyarázat az ERRP (EGF-receptor related protein) gátlóhatásának megváltozásában keresendő. Az ERRP 90%-os homológiát mutat az EGFR sejten kívüli ligandkötő elemével, így hozzá kötődve gátolja az EGFR-rendszer működését. Ép vastagbélhamban és gyomornyálkahártyában az ERRP fokozott termelését, míg invazív adenokarcinómákban az ERRP csökkent elválasztását írták le. Továbbá az ERRP cDNS-t vastagbélráksejtekbe juttatva a sejtek osztódását csökkentették és az EGFR jelátviteli utat gátolták. Mindez arra enged következtetni, hogy az egészséges hámban a magas ERRP-szint révén az EGFR-rendszer gátolt. *Schmelz és mtsai* patkányokon végzett kísérletükben arra kerestek választ, hogy megváltozik-e az ERRP-termelés az öregedés során, illetve az öregedés hatással van-e az EGFR-aktivitásra, a sejtosztódásra, valamint a vastagbélrák kialakulására. Eredményeik szerint az idősebb állatokban az aktivált (tirozin foszforilált) EGFR szintje 45%-kal és 30%-kal magasabb volt a proximális és a disztális vastagbélben, az EGFR-t gátló ERRP-szintje pedig 25%-kal és 30%-kal volt alacsonyabb. Karcinogén (DMH) adását követően az idősebb egyedekben közel kétszer annyi aberráns kriptafókusz (ACF) alakult ki, mint a fiatalabbakban, ami a kolorektális karcinogenezis egyik legelső, látható jele. Azt is megállapították, hogy DMH adása után mindkét korcsoportban jelentősen csökkent az ERRP-termelés a vastagbélhamban. Míg a fiatal egyedekben az EGFR-aktivitás kismértékben emelkedett, addig az öregebb patkányokban az EGFR-kifejeződés szignifikánsan magasabb volt. Eredményeik alapján az EGFR-rendszer fokozott működése és a csökkent ERRP-termelés az időskori vastagbélrák kialakulásában fontos szerepet tölthet be [79].

Az utóbbi években több olyan tanulmány született, ami arra világít rá, hogy az élettani öregedés, és a daganatos sejtszaporodás molekuláris szempontból nem azonos. Az előregedő sejtekhez képest a folyamatosan osztódó daganatsejtekre fokozott metabolizmus, dedifferenciáció jellemző, embrionális fehérjék termelésére képesek és az apoptotikus sejtpusztulást elkerülve potenciálisan „halhatatlan” sejtek [80]. Bizonyos apoptózist szabályozó fehérjék termelése az előregedő és a tumoros sejtekben eltérő. Az előregedett sejtekkel ellentétben az apoptózist indukáló, tumorszuppresszor *p53* [81] és a *Fas/CD95* [82] csökkent aktivitását, valamint az antiapoptotikus protoonkogén *Bcl-2* fokozott kifejeződését igazolták daganatsejtekben [83-85]. Különböző onkogének (például a *Ras*), növekedési faktorok (például a *Myc*) és a sejtosztódás szabályozásában is szerepet játszó tirozin kináz receptorok (mint például az *EGFR* család tagjai) felülexpresszáltak a daganatok egy részében és jelentősen csökken a termelésük az előregedő sejtekben [86-88].

A daganat kialakulását tekinthetjük egyfajta kóros, és kontrollálatlan sejtosztódással járó „visszafiatalodásnak”, hiszen a karcinogenezisben bizonyos esetekben ugyanazok a jelátviteli utak érintettek, mint az öregedés során, csak éppen ellentétes módon. Ha a tumoros sejtek elveszítik a képességüket az öregedésre, akkor a kiegyensúlyozatlan, szabályozatlan proliferáció és apoptózis túlélési előnyt jelenthet a daganatsejtnek egy idősödő szöveti környezetben [80]. Az emésztőrendszerben nemcsak a daganatokban (például a vastagbélrákban) lehet fokozott hámsejtosztódást megfigyelni, hanem az embrionális fejlődés és a fiatalkori növekedés során is. Mind a tápcsatorna fejlődésében, mind a sporadikus és familiáris kolorektális karcinogenezisben meghatározó szerepű jelátviteli út a Wnt/ β -catenin jelút [89,90].

2.7. A szomatosztatin élettani hatásai, különös tekintettel az emésztőrendszerre

A szomatosztatin (SST) egy szabályozó, alapvetően gátló hatású fehérje, ami legnagyobb mennyiségben a központi és perifériás idegrendszerben, a hasnyálmirigyben valamint a bélrendszerben termelődik. Kisebb mennyiségben a pajzsmirigy, a vesék, a mellékvesék, a submandibularis mirigyek, a prosztata, a placenta és az immunrendszer bizonyos sejtjei is szekretálják. Az SST nagyobb méretű prekursor molekulából, az

úgynevezett preproszomatostatinból (preproSST) enzimatis hasítást követően jön létre. A szomatostatin kódoló génnek két biológiailag aktív fehérje terméke ismert, az SST-14 és SST-28 [91]. Az SST-14 jelentős részben a központi idegrendszerben és számos perifériás szervben termelődik, az SST-28 legnagyobb perifériás forrása az emésztőrendszeri hám. A bélben a nyálkahártya δ -sejtjei, a gyomorban és a hasnyálmirigyben a D-sejtek, valamint a plexus submucosus és myentericus idegsejtjei képesek előállítani [92]. A szomatostatin felszabadulását számos hormon, neuropeptid, neurotranszmitter, citokin, növekedési faktor és tápanyag képes serkenteni, illetve gátolni. A növekedési hormon elválasztását szabályozó hormon (GHRH), a kortikotropin felszabadító hormon (CRH), a neurotensin, a bombesin, az IL-1, az IL-6 és a TNF- α többféle szövetben is képes fokozni az SST-szekrúciót [91].

A szomatostatin központi idegrendszeri neurotranszmitterként a kognitív, a lokomotor, a szenzoros és a vegetatív funkciókat egyaránt szabályozza. Gátolja az agyban a dopamin, a noradrenalin, a tireotropin felszabadító hormon (TRH), a CRH és az endogén, hipotalamikus SST szekrúcióját. Gátolja a növekedési hormon (GH), a tireoidea-stimuláló hormon (TSH) és a hasnyálmirigy hormonjainak bazális és stimulált elválasztását. Egészséges egyéneknél nincs hatással a prolaktin, a luteinizáló hormon (LH), a follikulus-stimuláló hormon (FSH) és az adrenokortikotrop hormon (ACTH) elválasztására. Ugyanakkor csökkentheti az ACTH szintjét Addison-kórban és ACTH-termelő daganatok esetében, valamint mérsékli akromegáliában szenvedő betegekben a prolaktin szintjét. Az SST a tápcsatornában szinte valamennyi emésztőrendszeri hormon felszabadulását gátolja. Csökkenti a külső elválasztású (exokrin) mirigyek szekrúcióját is, így akadályozva a gyomorsav, a pepszin, az epe és a vastagbél nyáktermelését. Gátolja a gyomor ürülését, az epehólyag összehúzódását valamint a vékonybél szegmentációt, ugyanakkor serkenti a migráló (vándorló) mioelektromos komplex aktivitását [91]. Csökkenti a víz, a kalcium, bizonyos szénhidrátok (glükóz, galaktóz, xilóz, laktóz és fruktóz), aminosavak, trigliceridek és a glicerol felszívódását. Mérsékli a splanchnicus és portalis terület vérátáramlását, a vena portae nyomását és növeli az érrendszer ellenállását [93].

Az emberi szervezetben ismert öt szomatostatinreceptort (SSTR1, SSTR2 /SSTR2A, SSTR2B/, SSTR3, SSTR4, SSTR5) öt humán gén kódolja. A génnek valamennyi fehérjeterméke 7 transzmembrán doménnel rendelkező, G-fehérjéhez kötött

receptor. A szomatosztatin receptorához való kötődését követően számos sejtműködést befolyásoló jelút aktiválódik. A jelutak aktivációját a receptor szöveti elhelyezkedése és a receptor típusa jelentősen befolyásolja. Valamennyi SSTR a ligandjának bekötődését követően gátolja az adenilát-cikláz és a cAMP termelését, szabályozza a foszfatázok működését és fokozza bizonyos kálium csatornák (GIRK) működését [91,94-97]. A szomatosztatinreceptorok emésztőrendszeri megoszlásával kapcsolatban a morfológiai és funkcionális vizsgálatok eredményei nem egybehangzóak. Az eredményeket a vizsgált faj és a vizsgálati módszer típusa jelentősen befolyásolhatja [92]. Az utóbbi évtizedekben számos vizsgálat igazolta, hogy a szolid tumorok jelentős része is expresszál szomatosztatinreceptorokat. A neuroendokrin tumorokon kívül központi idegrendszeri daganatok, malignus limfómák, a vesesejtes karcinóma és bizonyos emlő daganatok is termelnek SSTR-t, bár az egyes receptorok megoszlásában jelentős különbség lehet a daganatok között [98]. *Qiu és mtsai* szövettanilag ép kolorektális biopsziás mintákban és kolorektális karcinóma mintákban vizsgálta a szomatosztatinreceptorok expresszióját. Vizsgálati eredményeik szerint mind az ép hámban, mind a karcinómában azonosítható az SSTR receptor öt altípusa. Az ép hámban és CRC-ben is az SSTR1 receptor fejeződik ki legnagyobb arányban, kisebb mértékben az SSTR2 és SSTR5 receptorok. Az SSTR4 receptor a tumoros szövetben nagyobb arányban volt jelen, mint a normál hámban. Az SSTR2, SSTR4 és SSTR5 expresszió lényegesen magasabbnak bizonyult a jól és mérsékelten differenciált CRC-ben, mint az alacsonyán differenciált karcinómákban. A proliferációs index szignifikánsan magasabb volt azokban a daganatokban, amelyek nem expresszáltak SSTR2 és SSTR3 receptorokat. Azokban az esetekben, ahol a daganat nyirokcsomó metasztázisa is azonosítható volt, ott a primer tumor SSTR1 termelése szignifikánsan magasabb. Szoros összefüggést találtak a Bcl-2 onkogén kifejeződése és az SSTR-expresszió között, ugyanis azokban a daganatokban, ahol SSTR1, SSTR2, SSTR3 és SSTR5 receptor jelenlétét igazolták, ott az onkogén kifejeződése szignifikánsan alacsonyabb [99]. *Evangelou és mtsai* immunhisztokémiai vizsgálataik során az SSTR2 és SSTR5 expressziót tanulmányozták kolorektális karcinóma mintákban, és szoros összefüggést igazoltak a receptorok hiánya és az invázió mértéke, illetve a májmetasztázis jelenléte között [100]. *Buscail és mtsai* mRNS-szinten vizsgálták az SSTR2 receptor expresszióját kolorektális műtéti mintákban, és összefüggést találtak a receptor kifejeződése és a daganat stádiuma között. Szövettanilag ép mintákban és

sporadikus adenómákban magas *SSTR2* expressziót igazoltak, ugyanakkor Dukes B stádiumú kolorektális karcinómákban már csak 50%-ban találtak *SSTR2* kifejeződést, Dukes C CRC esetében mindössze 20%-ban, és Dukes D stádiumú karcinómákban, illetve a CRC májmetasztázisaiban és FAP adenómákban egyáltalán nem detektáltak *SSTR2* expressziót [101]. Egyes tanulmányok igazolták, hogy a vastagbél-daganatot körülvevő szövetek érhálózatában is kimutathatók az *SSTR* receptorok, míg a daganattól távolodva a receptorsűrűség csökken, továbbá a peritumorális érrendszerben az *SSTR* jelenléte független attól, hogy a daganatban kimutatható-e szomatosztatinreceptor vagy sem [102].

A szomatosztatinnak és származékainak jól ismert, és a klinikai alkalmazását tekintve meghatározó tulajdonsága, hogy normál és daganatos szövetben is gátolják a sejtosztódást. Az antiproliferatív hatása direkt és indirekt módon valósulhat meg. Direkt sejtosztódást gátló hatásai közé soroljuk, hogy specifikus receptoraihoz való kötődését követően számos jelutat és enzimszabályozó (Ras/ERK jelút, PI3 kináz/AKT jelút, tirozin kináz, tirozin foszfatáz, NOS, cGMP-dependens protein kináz, MAPK), ami a sejtciklus leállításához vezethet. Attól függően, hogy az *SST* melyik receptorához kötődik, és ahhoz milyen jelutak és enzimszabályozók kapcsolódnak, eltérő lehet a szomatosztatin hatása a különböző szövetekben. A szomatosztatin további direkt sejtnövekedést gátló hatása, hogy apoptózist indukál. Az *SSTR3* receptoron keresztül az intracelluláris pH-változás, az endonukleáz-aktivitás fokozódása, valamint a p53/Bax-rendszer indukciója révén serkenti az apoptózist. Továbbá sejtkultúra kísérletekben igazolást nyert, hogy az *SSTR2* receptoron keresztül a p53-tól függetlenül is apoptózist indukál. A szomatosztatin fokozza a sejtekben a protein tirozin foszfatázok (PTP) aktivitását, amelyek defoszforilálják a növekedési faktorokat kötő tirozin kináz molekulákat. Az *SST* harmadik direkt antiproliferatív hatása, hogy közvetlenül gátolja a növekedési faktoroktól induló jelutakat. A szomatosztatin indirekt sejtosztódást gátló hatásai közé soroljuk, hogy gátolja bizonyos növekedési faktorok és növekedést elősegítő hormonok termelését és szekrécióját. Döntően az *SSTR2* és *SSTR5* receptorokon keresztül gátolja a hipofízis GH-termelését, és az *SSTR2* és *SSTR3* receptorokon keresztül transzkripció szinten gátolja a GH-indukálta IGF-1-termelést a májban. Az *SST* további indirekt sejtosztódást gátló, antitumor hatása, hogy gátolja az angiogenezist. Az angiogenezis nélkülözhetetlen a daganat növekedéséhez, az

invázióhoz, a metasztázisképzéshez. Sejtkultúra kísérletekben igazolták, hogy az SST gátolja az endothelsejtek osztódását, ami döntően az SSTR2 és SSTR5 receptorokon keresztül, a mitogén aktiválta protein kináz (MAPK) és a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) aktivitásának gátlása révén valósulhat meg. Az SST továbbá gátolja az endothelsejtek invázióját és a monociták migrációját, valamint bizonyos angiogén faktorok (VEGF, PDGF, BFGF) felszabadulását. A szomatosztatin harmadik indirekt sejtproliferációt gátló hatása az immunmoduláns hatás. Az SST és a receptorai egyaránt kifejeződnek humán limfoid szövetekben. Sejtkultúra kísérletekben a limfocita aktivációt követően az SSTR2 receptor expressziója fokozódott, továbbá igazolást nyert, hogy az SST szabályozza a limfocitaproliferációt, az immunglobulin-szintézist és a citokintermelést [103-107].

2.8. A szomatosztatinanalógok szerepe onkológiai kórképek kezelésében

A szomatosztatint első alkalommal az 1970-es években izolálták hipotalamuszból. A további vizsgálatok során derült fény szerteágazó hatásaira (endokrin és exokrin szekréció csökkentés, motilitás gátlás, sejtproliferáció gátlása). Az emberi szervezetben is termelődő, natív szomatosztatint ugyanakkor a klinikai gyakorlatban kevésbé lehetett alkalmazni akut kórképek kezelésében a natív molekula igen rövid felezési ideje miatt. Ezt követően kezdtek fejleszteni olyan módosított molekulákat, az úgynevezett szomatosztatinanalógokat, amelyek felezési ideje hosszabb, a hatásuk kedvezőbb. A klinikai gyakorlatban a kifejlesztett molekulák közül kezdetben az octreotid és a lanreotid terjedt el. Döntően akromegália, TSH-termelő hipofízis daganatok és emésztőrendszeri neuroendokrin tumorok kezelésében, tartósan fennálló hasmenés bizonyos esetekben, a hasnyálmirigyet érintő műtéti beavatkozások lehetséges szövődményeinek megelőzésében és kezelésében, akut nyelőcsővarix-vérzés esetében és malignus betegség okozta bélelzáródás bizonyos eseteiben alkalmazták. A fent említett két klasszikus analóg hatékonyságát azonban jelentősen befolyásolja, hogy az öt ismert szomatosztatinreceptorhoz való affinitásuk eltérő. A natív SST mindkét biológiailag aktív formája (SST-14 és SST-28) mind az öt receptorhoz lényegében azonos affinitással kötődik. Ezzel szemben az octreotid és lanreotid leginkább az SSTR2 receptorhoz kötődik, kisebb mértékben az SSTR3 és SSTR5 receptorokhoz és elhanyagolható

mértékben az SSTR1 és SSTR4 receptorokhoz. Az analógok szerkezeti eltérései befolyásolhatják, hogy melyik receptorhoz kötődnek jobban, így a hatásuk is némileg eltérő lehet. A későbbiekben fejlesztett, nem-klasszikus analógok közül némelyek csak egy-egy receptorhoz, mások valamennyi receptorhoz kötődnek („universal analogues”). [106,108]. A pasireotid (SOM230) receptorkötődési spektruma szélesebb, mint a klasszikus analógoké, az SSTR1, SSTR2, SSTR3 és SSTR5 receptorokhoz is nagy affinitással kötődik [109].

A diagnosztikában a szomatosztatinanalógokat leggyakrabban neuroendokrin daganatok azonosítására használjuk. Ezek a neuroendokrin sejtekből kiinduló ritka tumorok rendszerint lassan növekednek, azonban áttétképzésre hajlamosak. A hormonálisan aktív neuroendokrin tumorokra paraneoplastikus szindróma hívhatja fel a figyelmet, amit a daganat által termelt biogén aminok, hormonok és egyéb mediátorok okoznak. Ezeknek a daganatoknak a diagnosztikája nehéz és időigényes feladat lehet, ami ronthatja a hatékony terápiás beavatkozás lehetőségét. Mivel nagy részük szomatosztatinreceptort termel, ezért a daganat lokalizálásban jelentős segítséget nyújthat az SSTR-expresszió alapuló izotópszcintigráfias vizsgálat, az octreoscan. Izotóppal jelzett szomatosztatinanalógokkal olyan szomatosztatinreceptort termelő, primer vagy metasztatikus daganat is ábrázolható in vivo, ami kis mérete miatt a hagyományos képalkotó eljárásokkal nem mutatható ki [110-112]. SSTR receptorokat azonban nemcsak a daganatsejtek termelhetnek, hanem a daganatot körülvevő érhálózat sejtjei, gyulladásozó és immunsejtek (például aktivált limfociták) is, ezért az octreoscan olyan daganatok diagnosztikájában is szerepet kaphat, amelyek nem rendelkeznek szomatosztatinreceptorral (például a nemkissejtes tüdőrák) [112]. *Reubi és mtsai* 198 különböző eredetű tumorban és számos szövettanilag ép mintában is vizsgálták az SSTR receptorok kifejeződését, autoradiográfias módszerrel. Megállapították, hogy a vizsgált daganatok és az ép szövetek jelentős része termel valamilyen típusú SSTR-t. Továbbá a tumorok egy kis százalékában ott is észleltek izotóphalmozást, ahol receptorok (SSTR1-5) nem voltak kimutathatóak, ami ma még nem ismert receptor jelenlétére utalhat [113]. Az irodalmi adatok alapján szomatosztatinanalógokkal végzett szcintigráfias vizsgálat így alkalmas lehet nem endokrin eredetű daganatos megbetegedések, illetve immunmediált kórképek (granulomatózus betegségek, rheumatoid arthritis) kivizsgálására is [114-117].

Terápiás szempontból a szomatosztatinanalógok igen fontos tulajdonsága, hogy SSTR receptorokhoz kötődve gátolhatják a sejtosztódást és apoptózist indukálhatnak. A sejtosztódást befolyásoló hatásuk attól függ, hogy a célszervben milyen SSTR receptorok fejeződnek ki, és ezekhez a receptorokhoz az analóg milyen affinitással képes kötődni. Az analógok különböző típusú SSTR receptorokhoz kötődve eltérő jelutakon keresztül fejtik ki antiproliferatív hatásukat. Az SSTR1, SSTR2A, SSTR4 és SSTR5 receptorokhoz kötődő analógok sejtciklus leállást okoznak a G1 fázisában, csökkentve a foszforiláció mértékét a retinoblasztóma fehérjén. Az analógok az SSTR1 receptoron keresztül a Ras/MAPK útvonal aktivációja és ennek következtében a ciklin-dependens kináz (CDK) inhibitor p21 indukciója révén is leállíthatják a sejtciklust. Az SSTR2 receptorhoz kötődő analógok antiproliferatív hatásukat a foszfortirozin foszfatáz SHP-1 aktivációján keresztül fejtik ki. Az SSTR5 aktivációja a guanil-cikláz és a MAPK gátlásán keresztül gátolja a sejtosztódást. A vizsgálati eredményekből úgy tűnik, hogy az analógok apoptózist serkentő hatása részben az SSTR3 receptoron keresztül (p53-dependens), részben pedig az SSTR2 receptoron keresztül (p53-independens) megy végbe [106].

A szomatosztatinanalógok sejtosztódást gátló és apoptózist indukáló hatása felvetette annak lehetőségét, hogy azokat onkológiai kórképek kezelésében is alkalmazni lehetne. A klinikai tanulmányokat megelőzően számos sejt kultúra kísérletben és állatmodellben vizsgálták a szomatosztatinanalógok kedvező hatását rosszindulatú daganatos kórképekben. *Weckbecker és mtsai* összefoglaló jellegű közleményükben beszámoltak arról, hogy több humán és állati eredetű daganatos sejtvonalon történtek vizsgálatok arra vonatkozóan, hogy analóg adását követően hogyan változik a sejtosztódás aktivitása és ez milyen összefüggésben áll a sejtek SSTR expressziójával. A legtöbb vizsgált sejtvonal esetében (vastagbélrák, gyomorrák, hasnyálmirigyrák, tüdőrák, emlőrák, méhnyakrák, prosztatatarák) szomatosztatinanalóg adása gátolta a sejtosztódást, és ezeken a sejteken sok esetben SSTR receptor is azonosítható volt [118]. A többnyire rágszélőkon végzett in vivo vizsgálatokban a szomatosztatinanalógok antiproliferatív hatását tanulmányozták, SSTR receptort termelő és azt nem termelő daganatokban egyaránt. Az analógok antitumor hatását olyan daganatokban is igazolták, amelyek SSTR-t nem termelnek, ami az analógok indirekt sejtosztódást gátló hatásával lehet összefüggésben. Az állatkísérletekben a vastagbélrák, hasnyálmirigyrák, kissejtes tüdőrák, emlőrák,

prostatarák és non-Hodgkin limfóma esetében szomatosztatinanalóg adásával hatékonyan gátolták a tumor növekedését [118-120].

A klinikai gyakorlatban a szomatosztatinanalógokat leggyakrabban a neuroendokrin daganatok kezelésében alkalmazzuk. Az analógok a hormontermelést gátló hatásuk következtében igen hatékonyan csökkenthetik a neuroendokrin daganattal társuló paraneoplasztikus szindróma tüneteit. A hormonálisan aktív, jól (G1) és közepesen (G2) differenciált neuroendokrin daganatok esetében a szomatosztatinanalógok a kezelés alapját képezik, továbbá a rosszul differenciált (G3) karcinóma esetében is enyhíthetik a tüneteket. A neuroendokrin daganatok jelentős része SSSTR receptort termel, és ezekkel a receptorokkal az analógok izotóphoz (elsősorban 90-ittrium és 177-lutécium) kötött formáit is felveszik, dúsítják. A peptidradionuklid-kezelés a lokális citotoxikus hatása révén az előrehaladott G1 és G2 neuroendokrin daganatok kezelésében lehet hatékony [121].

Az utóbbi években látott napvilágot két vizsgálat, amelyben igazolást nyert, hogy a szomatosztatinanalógok nemcsak a hormontermelést gátló hatásuk következtében, vagy a peptidradionuklid-kezelés révén lehetnek hatékonyak a neuroendokrin daganatok kezelésében. Így klinikai vizsgálatok is megerősítették azt a gyakorlati tapasztalatot, hogy az analógok képesek gátolni a daganatok növekedését. A PROMID-vizsgálat (Placebo controlled, doubleblind, prospective, Randomized study on the effect of Octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine MIDgut tumors) volt az első placebokontrollált, kettős vak vizsgálat, amely igazolta az octreotid LAR (long acting release) daganatnövekedést gátló hatását. A vizsgálatba jól differenciált, inoperábilis vagy metasztatikus, középbél- (vékonybél-) eredetű neuroendokrin daganatban szenvedő betegeket vontak be. Az octreotidot kapó csoport átlagos progressziómentes túlélése szignifikánsan hosszabb volt a placebót kapó csoporthoz képest. Hat hónap elteltével az octreotidot kapó csoportban a betegek 66%-ában, míg a placebocsoportban a betegek mindössze 37%-ában volt stabil a betegség. A klinikai válasz tekintetében a hormonálisan aktív és inaktív daganatban szenvedő betegek között nem volt érdemi eltérés. Az octreotid azoknál a betegeknél volt különösen hatékony, akiknél a primer daganat eltávolításra került, illetve a máj daganattömege 10%-nál kevesebb volt [122]. A 2014-ben közzétett CLARINET-vizsgálatban (Controlled Study of Lanreotide Antiproliferative Response in Neuroendocrine Tumors) a lanreotid

antitumor hatását vizsgálták olyan hormonálisan inaktív, jól és közepesen differenciált, lokálisan nem reszekálható vagy metasztatikus neuroendokrin daganatokban szenvedő betegekben, akiknél a szcintigráfias vizsgálat a daganatban szomatosztatinreceptor-pozitivitást igazolt. A betegek harmadában a májáttétek a máj 25%-ánál nagyobb részét érintették. A lanreotiddal kezelt csoportban a progressziómentes túlélés szignifikánsan hosszabbnak bizonyult a placebocsoporthoz képest. [123] Mindkét vizsgálatban a szomatosztatinanalóg döntően emésztőrendszeri mellékhatásokat (puffadás, hasmenés, epekövesség) okozott.

Mivel a szomatosztatinanalógok antitumor hatása számos, különféle eredetű daganat esetében, in vitro és in vivo kísérletben is igazolást nyert, ezért az utóbbi években több klinikai vizsgálat indult azzal kapcsolatban, hogy vajon az analógok nem neuroendokrin eredetű daganatok esetében is hatékonyan alkalmazhatók-e az onkológiai gyakorlatban [124]. Az analógok antitumor hatását emésztőrendszeri daganatokban (gyomor, vastagbél, máj, hasnyálmirigy) is vizsgálták. Kiterjedt, kemoterápiás kezelésre nem reagáló gyomorrákban és vastagbélrákban szenvedő betegek octreotid kezelése szignifikánsan növelte a túlélést a legjobb támogató kezelést kapó betegcsoporthoz képest [125]. Más tanulmányokban ugyanakkor az octreotid vagy a lanreotid antitumor hatása nem igazolódott kiterjedt kolorektális karcinóma esetében, és az analóg adása sem a betegség progresszióját, sem a túlélést tekintve nem bizonyult hatékonyknak [126,127]. Az octreotid hasnyálmirigy eredetű ductalis karcinóma kezelésében betöltött szerepével kapcsolatban a klinikai vizsgálatok eredményei nem egybehangzóak. *Friess és mtsai* vizsgálatukban megállapították, hogy a kis dózisú octreotid kezelés nem hatékony előrehaladott hasnyálmirigyrák kezelésében [128]. *Cascinu és mtsai* az octreotid tumorelles hatását vizsgálva arra a következtetésre jutottak, hogy kemoterápiára nem reagáló, kiterjedt hasnyálmirigyrákban az analóg adása javította a túlélést a támogató kezeléshez képest, bár objektív terápiás választ nem igazoltak [125]. Kiterjedt hepatocelluláris karcinómában az octreotid kezelés jelentősen javította a túlélést a kezelést nem kapó betegcsoporthoz képest [129]. *Witzig és mtsai* limfoproliferatív betegségben (NHL, CLL, CTCL) szenvedő pácienseket vontak be a vizsgálatukba. Naponta három alkalommal, subcutan alkalmazott, 150 µg szomatosztatin adása esetén a low-grade NHL csoportban a betegek 36%-ánál, a CTCL csoportban a betegek 44%-ánál értek el részleges remissziót, teljes remissziót egyik csoportban sem észleltek [130]. Több

klinikai vizsgálatban a szomatostatinanalógok hatékonyságát értékelték kiterjedt vagy kemoterápiás kezelésre nem reagáló, kissejtes tüdőrákban (SCLC) szenvedő betegekben. Sem az octreotid, sem a lanreotid monoterápia nem bizonyult hatékonynak a SCLC kezelésében [131-133]. Az analógok emlőrák kezelésében betöltött szerepére vonatkozóan szintén több tanulmány készült. Egy olasz munkacsoport korábban nem kezelt, emlőrákban szenvedő betegeket vont be a vizsgálatába, akiknek a tamoxifen kezelését lanreotiddal egészítették ki. A betegek 12,5%-ában teljes remissziót, és 37,5%-ában részleges remissziót tapasztaltak, az IGF-1-szint jelentős csökkenése mellett [134]. *Bontenbal és mtsai* metasztatikus emlőrákban szenvedő betegek egyik csoportjában a hagyományos tamoxifen kezelést octreotiddal és anti-prolaktin hatású CV 205–502 kezeléssel egészítették ki. Tamoxifen monoterápia esetén a betegek 36%-ában, kombinált kezelés esetén a betegek 55%-ában tapasztaltak objektív választ. A progresszióig eltelt medián idő tamoxifen monoterápia mellett 33 hét, míg a kombinált kezelés mellett 85 hét volt [135]. *O'Byrne és mtsai* korábban már metasztatikus emlődaganat miatt kezelt betegeknek adtak szomatostatinanalóg vapreotidot. Eredményeik szerint bár a vérben az IGF-1-szint jelentősen csökkent, a daganat mérete egyetlen betegnél sem változott a vapreotid kezelés hatására, és a kezelés megkezdését követően három hónapon belül minden betegnél progressziót észleltek [136]. Hormon kezelésre nem reagáló, prosztatadaganatban szenvedő betegek hosszú hatású SMA 201-995 kezelése után *Logothetis és mtsai* megállapították, hogy az analóg adása fokozta a tumor növekedését, és tapasztalatuk szerint az analóg érzékenyítheti a daganatos sejteket a későbbi kemoterápiás kezelésre [136]. *Figg és mtsai* szintén hormon kezelésre nem reagáló, metasztatikus prosztatarák fennállása esetén alkalmaztak intravénás lanreotid kezelést, azonban sem a daganat radiológiai paramétereit tekintve, sem a szérum PSA szintjét tekintve nem tapasztaltak klinikai javulást [137].

A szomatostatinanalógok sejtkultúra kísérletekben és állatmodellekben tapasztalt kedvező, daganatellenes hatását az eddig elvégzett humán vizsgálatok tehát nem igazolták teljes mértékben. Ennek egyik oka lehet, hogy a monoklonális tumor modellekkel szemben az emberi szervezetben a daganatok szomatostatintermelése nem homogén, továbbá a szolid tumorok egy részében az SSTR-expresszió a differenciálatlanabb daganatokra jellemző, aminek rosszabb a prognózisa. A humán tanulmányokat sok esetben olyan betegek bevonásával végezték, akiknél a betegség késői

stádiumban került felfedezésre, illetve az is ismeretes, hogy a megelőző kemoterápiás kezelés módosíthatja a daganat szomatosztatinreceptor profilját. Az eddig elvégzett klinikai vizsgálatok jelentős részében az SSTR2 receptorra specifikusabb analógot teszteltek különböző dózisokban alkalmazva, de nem egyértelmű, hogy az analógok daganatellenes hatását valóban ez a molekulacsoport közvetítheti-e a leghatékonyabban [138].

3. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataim célja

- a sejtosztódás és az apoptózis intenzitásának vizsgálata szöveti szinten, az élettani öregedés során a vastag- és végbélhamban, valamint a kolorektális adenómakarcinóma szekvencia során;
- a proliferációt és az apoptózist szabályozó gének mRNS-expressziós vizsgálata kolorektális biopsziás mintákon az öregedés és a karcinogenezis során;
- a vastag- és végbélhám szomatosztatintermelésének vizsgálata az élettani öregedés, és a vastagbélrák kialakulása során, mRNS- és fehérjeszinten egyaránt;
- a szomatosztatinanalóg octreotid sejtosztódást és apoptózist befolyásoló hatásának vizsgálata Caco-2 sejtvonalon;
- valamint a szomatosztatint kódoló gén promoterrégiójának metilációs vizsgálata, és a génexpresszió változásának vizsgálata demetiláló kezelést követően, HT-29 sejtvonalon.

4. MÓDSZEREK

4.1. Betegek és minták

A diagnosztikus célú, rutin kolonoszkópiát megelőzően a páciensek, illetve kiskorúak esetében azok szülei vagy törvényes képviselői aláírták a Tudományos Kutatásetikai Bizottság által jóváhagyott betegtájékoztató és beleegyező nyilatkozatot, amelyben hozzájárultak a biopsziás minták kutatási célú felhasználásához. Egyik beteg sem részesült a későbbiekben diagnózisra került vastagbélbetegségére vonatkozó gyógyszeres kezelésben a kolonoszkópia időpontjában, illetve azt megelőző három hónapban. A vizsgálataimba bevont páciensek fontosabb adatait a 4. és az 5. táblázatban foglaltam össze. A fehérjeszintű vizsgálatokhoz a szövettani diagnosztika céljából, paraffinos blokkokból készült metszeteket használtam. Az RNS-izoláláshoz vett biopsziás mintákat RNAlater stabilizáló reagensbe helyeztem és felhasználásig -80°C -on tároltam.

4. táblázat: A sejtsztódás és apoptózis intenzitásának vizsgálatához, valamint az azokat szabályozó gének mRNS-expressziós vizsgálatához bevont páciensek betegcsoportonként megadott száma és átlagéletkora.

<i>Immunhisztokémia</i>		
Betegcsoport	Páciensek száma (Nő/Férfi)	Átlagéletkor ± Szórás (év)
Gyerek (Gy)	14 (7/7)	11,2 ± 5,5
Egészséges felnőtt (N)	10 (4/6)	60,0 ± 14,2
Adenóma (Ad)	10 (4/6)	66,7 ± 3,9
Vastag- és végbélrák (CRC)	10 (3/7)	68,5 ± 14,4
Összesen	44 (18/26)	
<i>Affymetrix microarray elemzés</i>		
Betegcsoport	Páciensek száma (Nő/Férfi)	Átlagéletkor ± Szórás (év)
Gyerek (Gy)	6 (2/4)	11,2 ± 5,3
Egészséges felnőtt (N)	41 (26/15)	53,0 ± 15,9
Vastag- és végbélrák (CRC)	34 (19/15)	68,5 ± 10,3
Összesen	81 (47/34)	
<i>Taqman RT-PCR validáció – Eredeti mintaszett</i>		
Betegcsoport	Páciensek száma (Nő/Férfi)	Átlagéletkor ± Szórás (év)
Gyerek (Gy)	6 (2/4)	12,2 ± 5,3
Egészséges felnőtt (N)	6 (3/3)	57,7 ± 18,9
Vastag- és végbélrák (CRC)	6 (4/2)	69,0 ± 7,0
Összesen	18 (9/9)	
<i>Taqman RT-PCR validáció – Független mintaszett</i>		
Betegcsoport	Páciensek száma (Nő/Férfi)	Átlagéletkor ± Szórás (év)
Gyerek (Gy)	6 (3/3)	5,5 ± 3,4
Egészséges felnőtt (N)	6 (3/3)	53,0 ± 16,9
Vastag- és végbélrák (CRC)	6 (1/5)	64,3 ± 10,8
Összesen	18 (7/11)	

5. táblázat: A vastagbél lokális szomatostatintermelésének vizsgálatához bevont páciensek betegségecsoportonként megadott száma és átlagéletkora.

<i>Affymetrix microarray elemzés</i>		
Betegcsoport	Páciensek száma (Nő/Férfi)	Átlagéletkor ± Szórás (év)
Gyerek (Gy)	6 (2/4)	12,2 ± 5,3
Egészséges felnőtt (N)	41 (26/15)	53,0 ± 15,9
Vastag- és végbélrák (CRC)	34 (19/15)	68,5 ± 10,3
Összesen	81 (47/34)	
<i>Taqman RT-PCR validáció – Eredeti mintaszett</i>		
Betegcsoport	Páciensek száma (Nő/Férfi)	Átlagéletkor ± Szórás (év)
Gyerek (Gy)	6 (2/4)	12,2 ± 5,3
Egészséges felnőtt (N)	6 (3/3)	57,7 ± 18,9
Vastag- és végbélrák (CRC)	6 (4/2)	69,0 ± 7,0
Összesen	18 (9/9)	
<i>Taqman RT-PCR validáció – Független mintaszett</i>		
Betegcsoport	Páciensek száma (Nő/Férfi)	Átlagéletkor ± Szórás (év)
Gyerek (Gy)	6 (3/3)	5,5 ± 3,4
Egészséges felnőtt (N)	6 (3/3)	53,0 ± 16,9
Vastag- és végbélrák (CRC)	6 (1/5)	64,3 ± 10,8
Összesen	18 (7/11)	
<i>Immúnhisztokémia</i>		
Betegcsoport	Páciensek száma (Nő/Férfi)	Átlagéletkor ± Szórás (év)
Gyerek (Gy)	14 (7/7)	9,86 ± 6,0
Egészséges felnőtt (N)	20 (11/9)	58,5 ± 14,0
Vastag- és végbélrák (CRC)	23 (13/10)	67,3 ± 10,5
Összesen	57 (31/26)	
<i>Metilációs array elemzés</i>		
Betegcsoport	Páciensek száma (Nő/Férfi)	Átlagéletkor ± Szórás (év)
Gyerek (Gy)	5 (2/3)	7,2 ± 6,3
Egészséges felnőtt (N)	5 (2/3)	56,8 ± 18,7
Vastag- és végbélrák (CRC)	9 (5/4)	65,8 ± 9,1
Összesen	19 (9/10)	

4.2. A proliferáció és az apoptózis vizsgálata kolorektális biopsziás mintákon, szöveti és mRNS-szinten

4.2.1. Az osztódó sejtek azonosítása — Ki-67 immunhisztokémia

A vastagbélhamban osztódó sejtek azonosításához a rutin endoszkópos beavatkozások során nyert biopsziás mintákat használtam fel. A minták pontos szövettani kiértékelése minden esetben patológus segítségével történt. Az immunhisztokémiai vizsgálatban összesen 14 szövettanilag ép gyermek mintát, valamint a felnőtt páciensektől 10-10-10 db normál, adenómás és rosszindulatú daganatos mintát vizsgáltam. A felnőttektől származó, formalinban fixált, paraffinba ágyazott blokkból, előzetes mikroszkópos orientációt követően 1 mm átmérőjű szövethengereket közös recipiens blokkba helyeztem, rögzített sorrendben, úgynevezett szöveti microarray (tissue microarray /TMA/) létrehozva. Mind az így elkészített TMA-ból, mind a formalinban fixált és paraffinba ágyazott gyermek biopsziás mintákból 5 µm vastagságú metszeteket készítettem hagyományos tárgylemezre. Az immunhisztokémiai vizsgálathoz első lépésben a metszetek beágyazáshoz használt paraffint eltávolítottam (ún. deparaffinálás) (2x5 perc xilol, 2x3 perc abszolút etanol, 2x3 perc 96%-os etanol), majd a mintákat rehidráltam (2x5 perc PBS /phosphate buffered saline/). Az endogén peroxidáz aktivitást 20 percig tartó, 1%-os hidrogén-peroxidos kezeléssel gátoltam szobahőmérsékleten, majd a metszeteket PBS-ben mostam (3x3 perc). Az antigénfeltáráshoz pH 9,0-es TRIS-EDTA pufferbe helyeztem a tárgylemezeket, és 10 percig 900 W, majd 40 percig 370 W teljesítményen melegítettem mikrohullámú sütőben. Forralást követően a mintákat szobahőmérsékletre hűtöttem le (kb. 30 perc), majd PBS-be helyeztem őket. Az aspecifikus kötődés megakadályozására a metszeteket 1%-os BSA-PBS oldatban 20 percig inkubáltam. A Ki-67 immunhisztokémiai kimutatásához a mintákat anti-Ki-67 monoklonális egér antitesttel (Klón: MIB-1, 1:100 hígítás, Dako, Glostrup, Dánia) kezeltem, majd 60 percig nedves kamrában inkubáltam. Másodlagos jelölőanyagként anti-egér Alexa Fluor 546-ot használtam (1:200 hígítás, 30 perc, Invitrogen, Carlsbad, USA), majd a metszeteket PBS-ben mostam [139].

4.2.2. Az apoptotikus sejtek azonosítása — TdT-mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL) módszer

Az osztódó sejtek jelölését követően az antigénfeltárás részeként a metszeteket nukleázmentes proteináz K-val (20 µg/ml, 20 perc, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Svájc) emésztettem szobahőmérsékleten. Kétszeri alapos PBS-ben való mosást követően a mintákra 50 µl TUNEL (TUNEL In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, katalógusszám: 11684795910, Roche) reakció elegyet (5µl 10x TdT enzim oldat, és 45µl dUTP oldat, Roche) vittem fel. A metszeteket 120 percig inkubáltam 37°C-on, sötétített nedves kamrában. A Ki-67- és TUNEL-negatív, nyugvó sejtek magjait Hoechst-festéssel (5 µl Hoechst festék + 10 ml TBS, 1 perc, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) tettem láthatóvá [139].

4.2.3. A proliferáció-apoptózis arány, a mitotikus index és az apoptotikus index meghatározása digitalizált metszeteken

A tárgylemezre rögzített és megfestett biopsziás és TMA mintákat nagy felbontású digitális szkennel segítségével (Pannoramic Scan, szoftver verzió: 1.11.25.0, 3DHISTECH Kft., Budapest, Magyarország) archiváltuk. A minták kiértékeléséhez Pannoramic Viewer digitális mikroszkópot (verzió: 1.11.43.0, 3DHistech Kft., Budapest, Magyarország) használtam. Az elemzés során a megfelelő orientációjú, hosszanti átmetszetű vastagbélkriptákban, mintánként 500-1000 hámsejtet számoltam le (a minta nagyságától függően), a programba épített jelző/számoló modul segítségével (Marker Counter). A kripták bázisától a lumenig vizsgáltam a hámsejteket, mivel ezek mutatják a hámsejtek érésének egyes fokozatait. Azokat a mintákat, amelyeknél keresztmetszeti síkban történt a szövettani metszés, vagy 500-nál kevesebb kriptá hámsejtet tartalmaztak, kizártam a vizsgálatból. Azokat a sejtmagokat tekintetem pozitívnak a Ki-67- (piros), TUNEL- (zöld) és Hoechst-festés (kék) esetén, amelyeknél a festés a teljes sejtmagot érintő, erős színreakciót adott. Az osztódó, apoptotikus és nyugvó sejtek számának pontos ismeretében minden mintában meghatároztam a proliferáció-apoptózis arányt (PAR /proliferative-apoptotic ratio/), a mitotikus indexet (MI = osztódó

sejtek száma/összes hámsejtek száma) és az apoptotikus indexet (AI = apoptotikus sejtek száma/összes hámsejtek száma).

4.2.4. Affymetrix oligonukleotid microarray vizsgálat

A biopsziás mintákból a teljes RNS-izolálást RNeasy Mini Kit-tel (Qiagen Inc., Germantown, USA) végeztem a gyártó előírásait követve. Az izolált RNS mennyiségét abszorbanciaméréssel (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, USA), a minőségét kapilláris gélelektroforézis (2100Bioanalyzer és RNA 6000 Pico Kit, Agilent Inc., Santa Clara, USA) segítségével vizsgáltuk. A teljes izolált RNS-ből (mintánként 1-8 µg) biotinnal jelölt cRNS-próbákat szintetizáltunk. A fragmentációhoz az Affymetrix leírását pontosan követve (http://www.affymetrix.com/support/downloads/manuals/expression_s2_manual.pdf) a One-Cycle Target Labeling és Control Kit-et használtam. Mintánként 20 µg fragmentált cRNS-t HGU133 Plus2.0 array-re (Affymetrix) hibridizáltuk (45°C, 16 óra). A chipet Fluidic Station 450 berendezéssel mostuk és antitest amplifikációs festési módszerrel festettük, a gyártó útmutatásai szerint. A fluoreszcens jeleket GeneChip 3000 szkennelvel (Affymetrix) detektáltuk [140].

4.2.5. A microarray adatok megerősítése valós idejű polimeráz láncreakcióval — Taqman RT-PCR

A proliferációt és apoptózist szabályozó gének mRNS-expressziójának microarray-jel történő vizsgálatát követően eredményeinket összevetettük más munkacsoportok adataival is, ami a GEO (Gene Expression Omnibus) adatbankban érhető el (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>; hivatkozási szám: GSE18105). Ennek ismeretében a továbbiakban 10 kiválasztott gén expresszióját vizsgáltuk Taqman RT-PCR-rel, az eredeti mintaszetben, vagyis azon minták esetében, amelyeknél megelőzően microarray vizsgálat is történt és független mintaszetben egyaránt. Mind az eredeti, mind a független minták esetében 6-6 szövettanilag ép gyermek (Gy) biopsziás mintát, 6-6 egészséges felnőtt (N) és 6-6 kolorektális karcinóma (CRC) biopsziás mintát

tanulmányoztuk. A vizsgálatban résztvevő páciensek adatait a 4. táblázat foglalja össze. Referenciaként a *18S* riboszómális RNS-t és a *GAPDH*-t alkalmaztuk.

A teljes RNS-izolálás, a mennyiségi és minőségi vizsgálat a fent már részletezett módon történt. Mintánként 1 µg teljes RNS reverz transzkripcióját végeztem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit és RNase Inhibitor alkalmazásával (Life Technologies, Carlsbad, USA). Az így létrehozott cDNS minőségi ellenőrzését SDHA valós idejű PCR-rel (Roche) végeztem. A kiválasztott gének mRNS-expressziós vizsgálatához mintánként 16,7 ng cDNS-t használtam fel, amit a TaqMan Gene Expression Master Mix-hez (Life Technologies) adtam. A mérést LightCycler 480 (Roche) készüléken végeztem Mono Colour Hydrolysis Probe / UPL Probe detekcióval. A mérés során a denaturációt követően (95°C, 10 perc) 40 PCR ciklus zajlott (amplifikáció: 95°C, 15 másodperc, és 60°C, 1 perc).

4.3. A vastag- és végbélhám szomatosztatintermelésének vizsgálata

biopsziás mintákon

4.3.1. Affymetrix oligonukleotid microarray és valós idejű polimeráz lánreakció (Taqman RT-PCR)

A szomatosztatint kódoló gén kifejeződését Affymetrix oligonukleotid microarray vizsgálattal, az eredmények validációját valós idejű polimeráz lánreakcióval (Taqman) végeztem az eredeti és független mintaszettben egyaránt, a fentiekben részletezett módon. A vizsgálatba bevont gyermek és felnőtt páciensek klinikai adatait az 5. táblázat foglalja össze.

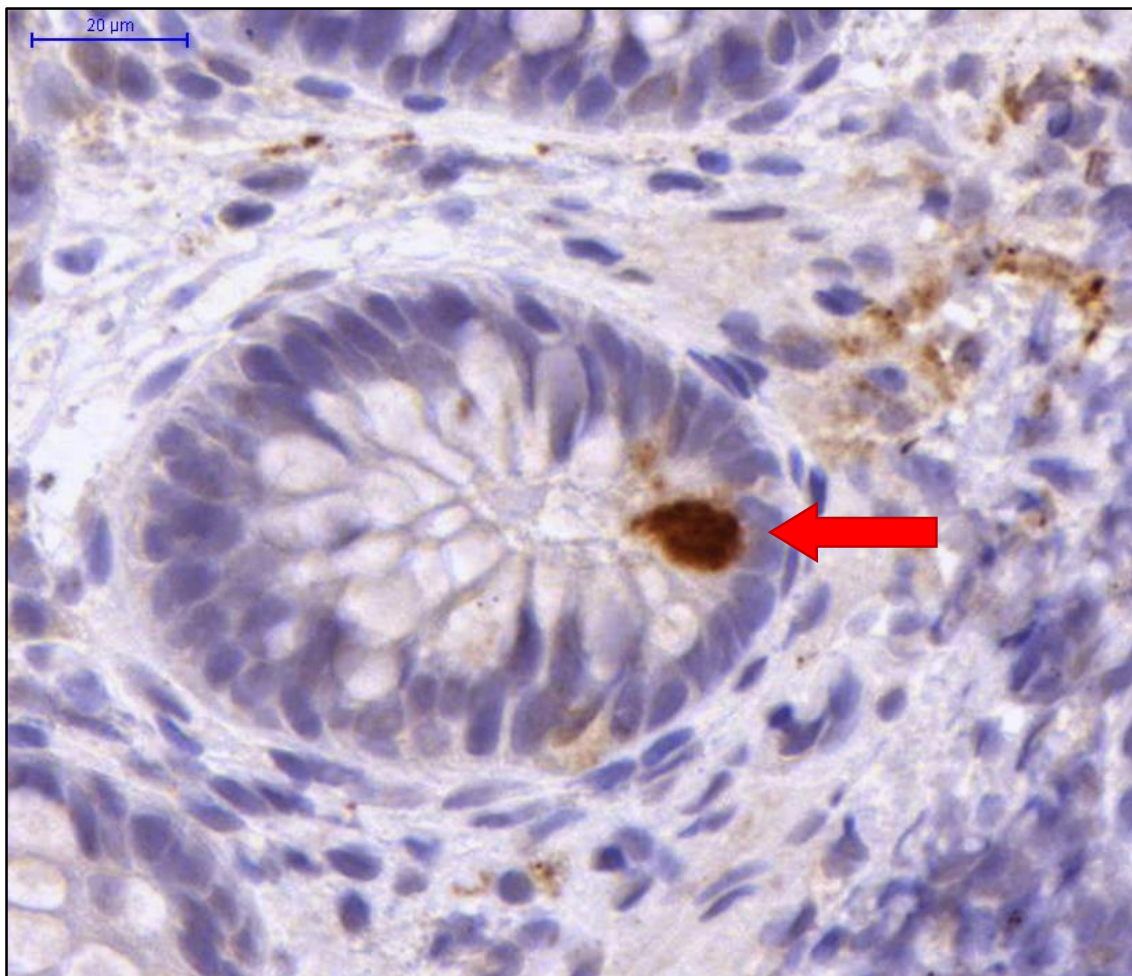
4.3.2. Szomatosztatin immunhisztokémia

A rutin endoszkópos beavatkozás során vett, formalinban fixált és paraffinba ágyazott, szövettanilag ép felnőtt (n=20) és daganatos (n=23) biopsziás mintákból 2 mm átmérőjű szövethengereket metszettem ki és helyeztem TMA recipiens blokkba. Továbbá 14 normál gyermek biopsziás mintán is vizsgáltam a kolorektális hám szomatosztatintermelését fehérjeszinten. A TMA és gyermek biopsziás mintákból 5 µm

vastagságú metszeteket készítettem az immunhisztokémiai vizsgálatához. A deparaffinálást követően (2x5 perc xilol, 2x3 perc abszolút etanol, 2x3 perc 96%-os etanol) az endogén peroxidáz gátlását (0,5% hidrogén-peroxid és metanol keveréke, 30 perc, szobahőmérséklet), majd PBS-ben való mosás után az antigénfeltárást (Target Retrieval Solution, Dako, Glostrup, Dánia, kód: S1699, puffer pH: 6,0) végeztem el mikrohullámú sütőben (900 W, 10 perc, majd 370 W, 40 perc). Mosást követően az aspecifikus kötődés megakadályozására a metszeteket 1%-os BSA-ban 20 percig inkubáltam. A szomatosztatint termelő sejtek immunhisztokémiai azonosításához nyúl anti-humán poliklonális antitesttel (Thermo Scientific, California, USA, kód: RB-038-A, hígítás: 1:50, 16 óra, szobahőmérséklet) inkubáltam a mintákat, nedves kamrában. Alapos PBS-ben történő mosást követően a marker expresszióját EnVision + polimer torna-peroxidáz (HRP) konjugátum (Labeled Polymer Anti-Rabbit, 40 perc, kód: K4003, Dako) és DAB-hidrogén-peroxidáz kromogén-szubsztrát kit (Cytomation Liquid DAB + Substrate Chromogen System, 10 perc, kód: K3468, Dako) felhasználásával mutattam ki. A jelkonvertáló reakció leállítása után a sejtmagokat hematoxilines magfestéssel tettem láthatóvá.

4.3.3. A vastag- és végbélhám szomatosztatint termelő sejtjeinek azonosítása digitalizált tárgylemezeken

A szomatosztatint termelő sejtek jelölését követően a metszeteket nagy felbontású digitális szkener segítségével (Pannoramic Scan, szoftver verzió: 1.11.25.0, 3DHISTECH Kft.) archiváltuk, majd a minták kiértékeléséhez Pannoramic Viewer digitális mikroszkópot (verzió: 1.11.43.0, 3DHistech Kft.) használtam. Valamennyi metszeten a megfelelő orientációjú, hosszanti átmetszetű kriptákban 500-1000 hámsejtet számoltam le, a Marker Counter modul segítségével. Nem megfelelő orientáció, illetve 500-nál kevesebb hámsejt esetén a mintát kizártam a vizsgálatból. A szomatosztatint immunhisztokémia kiértékelésénél minden esetben azokat a sejteket tekintettem pozitívnak, amelyekben erős, barna citoplazmatikus reakciót figyeltem meg (6. ábra). A szomatosztatint termelő sejtek és az összes kripa hámsejt számának pontos ismeretében meghatároztam az SST-t termelő sejtek arányát.



6. ábra: A szomatosztatint termelő sejtek immunhisztokémiai azonosítása.

Az immunhisztokémiai jelölést követően a vastagbélhamban a szomatosztatint termelő sejtek citoplazmája erős barna festődést mutat (piros nyíl). A felvételt digitális mikroszkóp segítségével készítettem, 700x nagyítás.

4.4. A szomatostatinalóg octreotid sejtsztódást és apoptózt befolyásoló hatásának vizsgálata Caco-2 sejtvonalon

4.4.1. Caco-2 sejtvonal octreotid kezelése

A Caco-2 humán epitheliális adenokarcinóma sejtvonalat a DSMZ (Braunschweig, Németország, katalógusszám: ACC-169) bocsátotta rendelkezésünkre, a sejt kultúra kísérletet speciális, patogénsejtek vizsgálatára alkalmas laboratóriumban végeztük. A sejteket MEM médiumban (Sigma-Aldrich, katalógusszám: M 2279) tenyésztettük, 20% FCS (Sigma-Aldrich, katalógusszám: F2442) és 160 µg/ml gentamycin (Sandoz GmbH, Schafhenau, Ausztria) hozzáadásával. Lyukanként 70000 Caco-2 sejtet ültettünk egy 24 lyukú sejttenyésztő lemezre MEM médiumban, gentamycin és FCS felhasználásával. Huszonnégy óra elteltével a médiumot lecseréltük, és a sejtekhez MEM-t és gentamycint adtunk FCS nélkül, valamint octreotidot (Sandoz GmbH) a következő koncentrációban: 0,1 nmol/l, 1,0 nmol/l, 2,5 nmol/l, 5,0 nmol/l és 10,0 nmol/l. Valamennyi koncentráció esetében három párhuzamos mérést végeztünk. Huszonnégy, 48 illetve 72 óra elteltével a sejteket összegyűjtöttük, 0,5 ml steril PBS-ben kétszer átmostuk, végül 1,0 ml, 70%-os, jéghideg etanolba helyeztük, és a további vizsgálatig -20°C-on tároltuk.

4.4.2. Áramlási citometriai (flow cytometria) vizsgálat és a Sub-G1 sejtfraakció azonosítása

A minták centrifugálását követően (1300 rpm, 3 perc) a sejtekhez 300 µl extrakciós puffert és 3 µl RNázt (RNase A/T1 Mix, Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, Litvánia) adtunk. Szobahőmérsékleten végzett, 15 perces inkubáció után 3 µl propidium-jodiddal (Sigma-Aldrich, katalógusszám: 81845) kezeltük a sejteket. Az áramlási citometriai mérést Becton Dickinson Immunocytometry Systems (Mountain View, California, USA, sorozatszám: 81313) készüléken végeztük.

4.5. A szomatosztatinpromoter-metiláció és reverzibilitásának vizsgálata

4.5.1. Metilációszenzitív restriktív enzimmel való emésztés és valós idejű polimeráz láncreakció (Metilációs-specifikus PCR)

A metilációs-specifikus PCR-vizsgálathoz szövettanilag ép gyermek, felnőtt és kolorektális daganatban szenvedő betegektől, rutin kolonoszkópia során vett biopsziás mintákat használtam fel. A vizsgálat során 5 szövettanilag ép gyermek mintát, 5 normál felnőtt mintát és 9 daganatos mintát vizsgáltam. A DNS kinyeréséhez a biopsziákat 2%-os SDS-ben homogenizáltuk, majd a minták emésztése proteináz K tartalmú puffer oldatban (4 mg/mL) történt, 60°C-on, 16 órán keresztül. A DNS-izolálást High Pure PCR Template Preparation Kit-tel (Roche Applied Science, Penzberg, Németország) a gyártó útmutatása szerint végeztük. Az így kinyert DNS-t 2x100 µl RNáz és DNáz mentes vízben tároltam -20°C-on. A szomatosztatint kódoló gén DNS-metilációs profiljának vizsgálatát EpiTect Methyl qPCR Array System (Qiagen, Hilden, Németország) alkalmazásával végeztük. Az izolált DNS-t metilációdependens, illetve metilációszenzitív restriktív enzimekkel inkubáltuk 37°C-on 16 órán keresztül, majd 65°C-on a metilázaktivitás felfüggesztésének céljából. A 120 µl reakció térfogatok 500 ng genomiális DNS-t tartalmaztak. Az enzimatikus emésztést követően fluoreszcens festék és Master Mix hozzáadása után a fluoreszcencia-alapú, kvantitatív PCR-vizsgálatot LightCycler 480 (Roche) készüléken végeztük. A PCR-reakció valós idejű adatrögzítés mellett az alábbi lépésekből állt: 95°C-ra hevítés 10 percig, majd 40 PCR ciklus (97°C, 15 másodperc, majd 72°C, 1 perc). A PCR termékek specifikusságának ellenőrzése céljából a PCR-reakció után olvadáspont analízist végeztünk a következő paraméterekkel: hőmérsékleti tartomány: 65°C-tól 95°C-ig, hőmérséklet emelkedés: 0,04°C, fluoreszcencia mérés: 1 másodperc.

4.5.2. A szomatosztatint kódoló gén kifejeződésének vizsgálata demetiláló hatású 5-aza-2'-dezoxicitidin adását követően HT-29 sejtvonalon

HT-29 colon adenokarcinóma sejteket (ATCC szám: HTB-38) tenyésztettünk 10%-os FCS-t (Sigma-Aldrich) tartalmazó RPMI-1640 médiumban, 37 °C-on, 5% CO₂ koncentráció mellett. A 25 cm²-es sejtenyésztő flaskák mindegyikében 1,5x10⁶ sejtet

növesztettük 24 órán keresztül, majd a sejteket 10 μ M, demetiláló hatású 5-aza-2'-deoxicitidinnel (5-Aza-dC) (Sigma-Aldrich) kezeltük 72 óráig, FCS-mentes médiumban. A kontrollként használt sejt kultúrához PCR-tiszta vizet és ecetsavat, az 5-Aza-dC oldószerét adtuk 1:1 arányban. A kezelt és a kontroll minták esetében is 3-3 párhuzamos mérést végeztünk. A kezelést követően a HT-29 sejtekből teljes RNS-t izoláltunk RNeasy Micro Kit (Qiagen Inc.) használatával, a gyártó útmutatása szerint. Az izolált nukleinsav minőségét kapilláris gélelektroforézissel (2100Bioanalyzer és RNA 6000 Pico Kit) ellenőriztük. A microarray vizsgálathoz mintánként 5–50 ng teljes RNS-t használtunk, amennyiben annak RIN értéke 7 és 10 között volt. Egykörös IVT sokszorozó és jelölő reakciót végeztünk One-Cycle Target Labeling and Control Kit (Affymetrix) felhasználásával. A fragmentált cRNS-t HGU133 Plus2.0 array-re (Affymetrix) hibridizáltuk (45 °C, 16 óra). A chipet Fluidics Station 450 berendezéssel mostuk, és a használati útmutatónak megfelelően ellenanyag sokszorozó festési eljárással jelöltük (EukGE_Ws_2v5 mosási protokoll és 10 μ g/ml sztreptavidin-fikoeritrin /Molecular Probes/). A fluoreszcens jeleket GeneChip 3000 leolvasóval detektáltuk 570 nm-en. A microarray vizsgálat adatai a GEO adatbankban elérhetőek a GSE29060 hivatkozási számon.

4.6. Statisztikai elemzés

A Ki-67 és TUNEL immunhisztokémia statisztikai értékeléséhez ANOVA-tesztet és Tukey HSD-tesztet alkalmaztunk. Mindkét esetben a szignifikanciahatárt $p < 0,05$ értéknél állapítottam meg. Az Affymetrix oligonukleotid microarray vizsgálat nyers eredményeinek előfeldolgozását GCRMA metodikával végeztük. Az eltérő expressziót mutató proliferációt és apoptózist szabályozó géneket SAM elemzéssel azonosítottuk. A szelekcióhoz a FoldChange (LogFC) és módosított p-értékeket használtunk, vagyis azokat a változásokat vettem figyelembe, amelyek legalább kétszeres növekedést, vagy felére történő csökkenést mutattak a mintacsoportok között, $p < 0,05$ érték mellett. Valamennyi, eltérő expressziót mutató gén további vizsgálatát ANOVA- és Tukey HSD-teszttel végeztük. A microarray vizsgálat adatai a GEO adatbankban érhetőek el (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) a GSE10714, GSE37364 és GSE37267 hivatkozási számon. A PCR validáció során mindhárom mintacsoportban (normál gyermek, normál

felnőtt és CRC) 12 biopsziás mintát (6 eredeti és 6 független) vizsgáltunk. A normalizációhoz *18S* riboszómális RNS-t használtunk belső kontrollként. A statisztikai elemzéshez ANOVA- és Tukey HSD-tesztet alkalmaztunk a következő kritériumok figyelembe vételével: Fold change $\leq 0,5$ illetve Fold change $\geq 2,0$ továbbá p-érték $< 0,05$.

A szomatosztatin-mRNS-expresszió Affymetrix oligonukleotid microarray eredményeinek értékeléséhez először GCRMA módszert alkalmaztunk, majd a mintacsoportok közötti összehasonlításhoz ANOVA- és Tukey-tesztet használtunk. A PCR validáció során belső kontrollként *18S* riboszómális RNS-t használtam, és szintén ANOVA- és Tukey-tesztet alkalmaztunk a következő kritériumokkal: Fold change $\leq 0,5$ vagy Fold change $\geq 2,0$ és $p < 0,05$. Az immunhisztokémiai adatok kiértékelését ANOVA- és Tukey-teszttel végeztük, a szignifikanciahatárt a $p < 0,05$ értéknél állapítottuk meg.

A Caco-2 sejteknek a sejtciklus különböző stádiumaiban (Sub-G1, G1, S, G2 és M) való megoszlását Mann-Whitney tesztel hasonlítottuk össze az octreotiddal kezelt és a kontrollcsoport között. Szignifikanciahatárt a $p < 0,05$ értéknél állapítottuk meg.

A három mintacsoportban (gyermek, felnőtt, CRC) az SST-promotermetiláció mértékének összehasonlításához ANOVA- és Tukey-tesztet használtunk a metilációs array vizsgálat adatainak kiértékeléséhez.

A HT-29 sejtek szomatosztatinexpresszióját Student-féle t-teszttel hasonlítottam össze az 5-aza-2'-deoxicitidinnel kezelt és a kezeletlen kontrollcsoport között. A szignifikanciahatárt $p < 0,05$ értéknél határoztuk meg.

5. EREDMÉNYEK

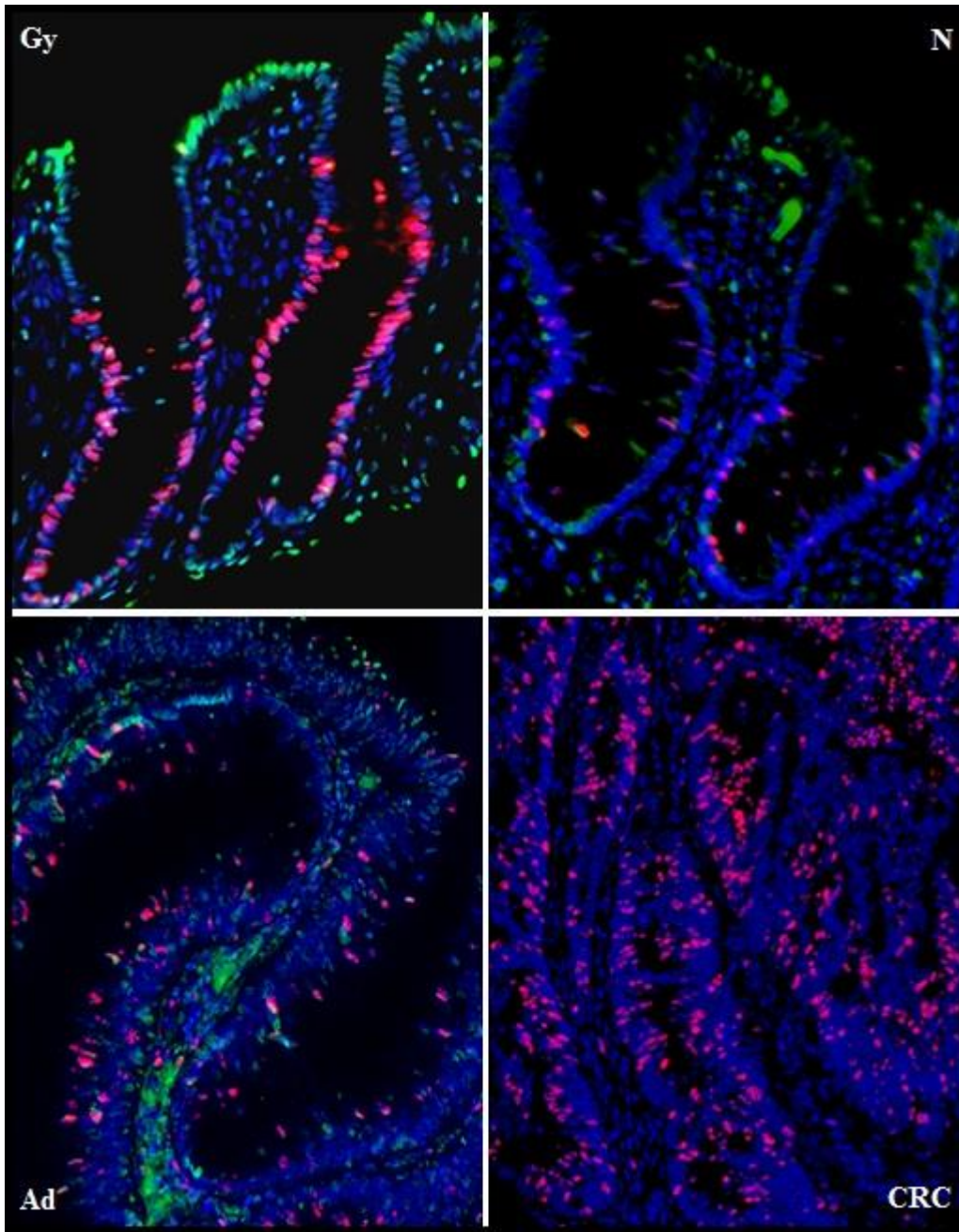
5.1. A proliferatorikus és apoptotikus aktivitás változása a vastag- és végbélhamban, az öregedés és a karcinogenezis során

A szövettani vizsgálat során az osztódó sejteket Ki-67 immunhisztokémia, az apoptotikus sejteket TUNEL-módszerrel azonosítottam. Az immunhisztokémiai jelölést követően a tárgylemezeket digitális mikroszkóp segítségével vizsgáltam. A normál gyermek (Gy), felnőtt (N), adenóma (Ad) és daganatos (CRC) mintákban az osztódó, nyugvó és apoptotikus sejtek jelölését és pontos számolását a Marker Counter nevű modul tette lehetővé, amely az egyes sejtcsoportok egymáshoz viszonyított arányát is automatikusan kiszámolta. Az osztódó (Ki-67-pozitív, a szövettani ábrán piros színben megjelenő) sejtek döntően a vastagbélkripták alsó harmadában helyezkednek el (7. ábra). Ezzel szemben az apoptotikus (TUNEL-pozitív, a szövettani ábrán zöld színben ábrázolódó) sejteket többnyire a kripta luminális felszínéhez közel találjuk (7. ábra). A proliferáció-apoptózis arány (PAR) és a mitotikus index (MI) szignifikánsan magasabb gyermek (PAR=3,51±2,49; MI=0,33±0,06) és tumoros mintákban (PAR=9,83±7,72; MI=0,42±0,10), mint a szövettanilag ép felnőtt mintákban (PAR=0,88±0,22; MI=0,15±0,06) ($p<0,05$). Mindkét érték folyamatos emelkedést mutat az adenóma-karcinóma szekvencia során. A PAR 3,99-szer magasabb a gyermek és 11,17-szer magasabb CRC mintákban, mint a normál felnőtt hámban; továbbá 2,8-szor magasabb a tumoros, mint a gyermek mintákban. A mitotikus indexet is összehasonlítva a három mintacsoportban azt figyeltem meg, hogy a MI 2,2-szer magasabb a fiatalkorú mintákban és 2,8-szor magasabb CRC-ben, mint az ép felnőtt mintákban, valamint 1,27-szer magasabb a daganatos mintákban, mint a gyerek mintákban. A legmagasabb PAR és MI értékeket a kolorektális karcinómában detektáltam (8A. és 8B. ábra).

Az apoptotikus index (AI) némileg alacsonyabb a fiatal normál vastagbélhamban (AI=0,13±0,06), mint felnőttekben (AI=0,17±0,05), és szignifikánsan alacsonyabb CRC-ben (AI=0,06±0,03) ($p<0,05$). Az AI folyamatosan csökkent az adenóma-karcinóma szekvencia egyes stádiumaiban. Gyermek mintákban 0,76-szor, daganatban 0,35-ször alacsonyabb, mint a normál felnőtt mintákban, továbbá tumoros

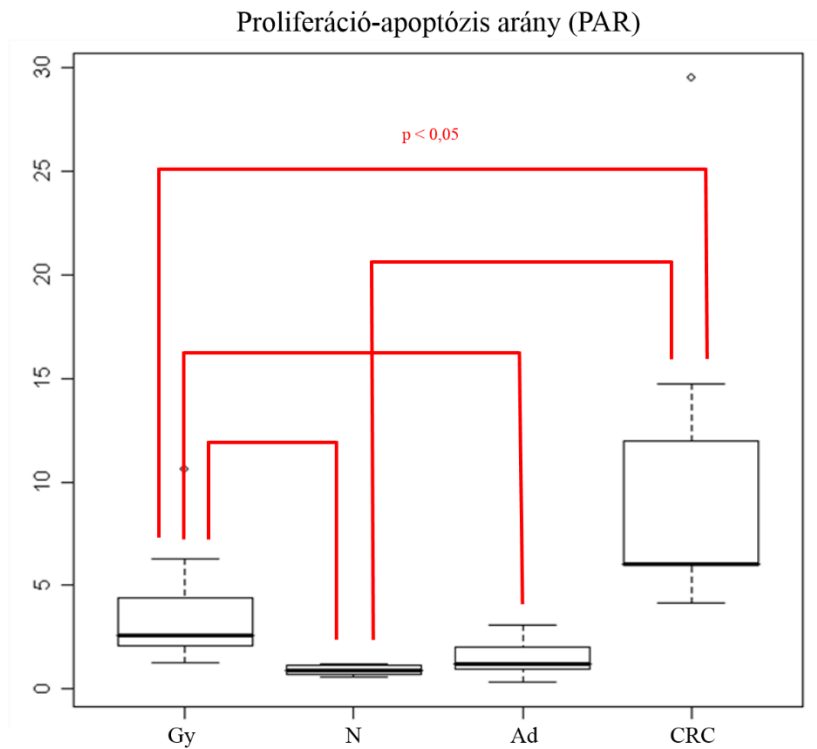
mintákban 0,46-szor alacsonyabb, mint a fiatal egészséges vastagbélhámában. A legalacsonyabb apoptotikus indexet kolorektális karcinómában találtam (8C. ábra).

Statisztikailag szignifikáns eltérést nem találtam a PAR és a MI tekintetében a normál felnőtt vastagbélhám (PAR=0,88±0,22; MI=0,15±0,06) és az adenóma (PAR=1,45±0,89; MI=0,13±0,05) között. Ugyanakkor az AI szignifikánsan alacsonyabb adenómában (AI=0,10±0,04), mint az ép felnőtt hámában (AI= 0,17±0,05) ($p<0,05$) (8A., 8B. és 8C. ábra).



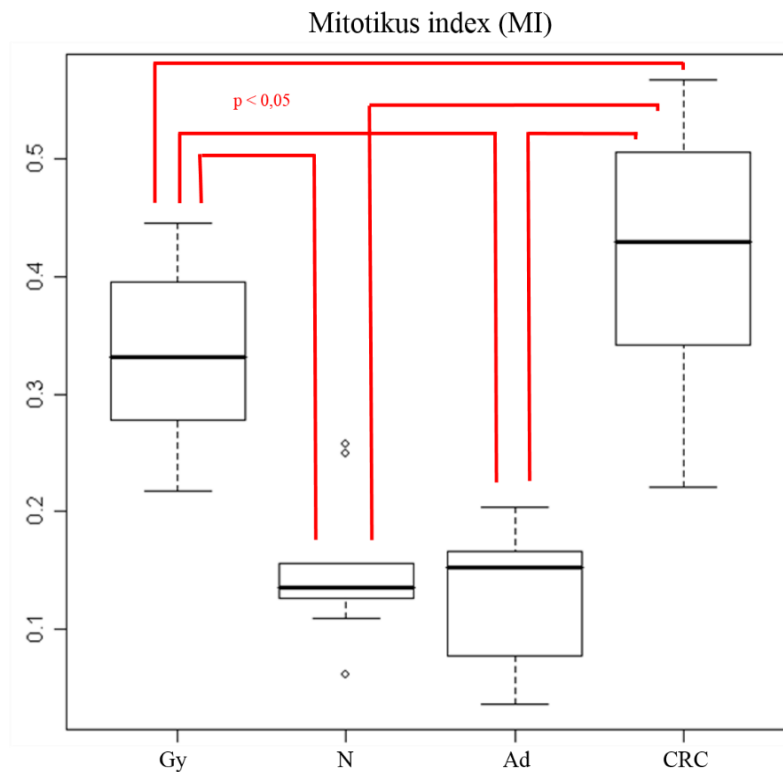
7. ábra: Proliferáció és apoptózis immunhisztokémiai vizsgálata eltérő életkorú, egészséges vastagbélhamban, valamint az adenóma-karcinóma szekvencia egyes stádiumaiban.

Proliferáló (piros sejtmag) és apoptotikus (zöld sejtmag) sejtek azonosítása fluoreszcens festéssel vastagbél biopsziás mintákon, a normál öregedés és az adenóma-karcinóma szekvencia során. Kék színben az inaktív sejtmagok ábrázolnának. A felvételek virtuális mikroszkóp segítségével készültek. (Gyermek normál (Gy), felnőtt normál (N), adenóma (Ad), kolorektális karcinóma (CRC): 200x nagyítás; Ki-67 immunhisztokémia /piros sejtmagok/, TUNEL-módszer /zöld sejtmagok/, Hoechst magfestés /kék sejtmagok/.)



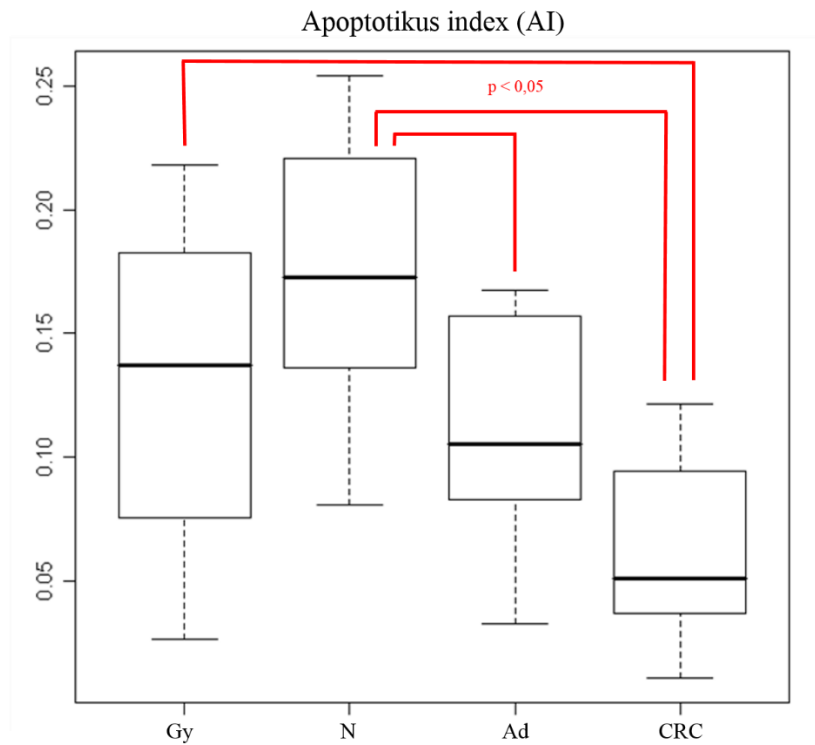
8A. ábra: A proliferáció-apoptózis arány (PAR) változása az élettani öregedés és az adenóma-karcinóma szekvencia során a vastag- és végbélhamban.

A proliferáció-apoptózis arány csökken az öregedés során, míg növekszik a karcinogenezis során. A gyermekek kolorektális hámban a sejtsztódás fokozott az idősebb, egészséges hámban megfigyeltekhez képest. Daganatos mintákban a proliferációs aktivitás a legmagasabb. A boxplotok az átlag és szórás értékeket ábrázolják. Az egyes csoportok (gyermek normál /Gy/, felnőtt normál /N/, adenóma /Ad/ és kolorektális karcinóma /CRC/) közötti szignifikáns eltérést ($p < 0,05$) piros összekötő vonallal jelöltem.



8B. ábra: A mitotikus index (MI) változása az élettani öregedés és az adenóma-karcinóma szekvencia során a vastag- és végbélhamban.

A mitotikus index csökken az öregedés során, míg növekszik a karcinogenezis során. A gyermekek kolorektális hámban a sejtosztódás fokozott az idősebb, egészséges hámban megfigyeltekhez képest. Daganatos mintákban a proliferációs aktivitás a legmagasabb. A boxplotok az átlag és szórás értékeket ábrázolják. Az egyes csoportok (gyermek normál /Gy/, felnőtt normál /N/, adenóma /Ad/ és kolorektális karcinóma /CRC/) közötti szignifikáns eltérést ($p < 0,05$) piros összekötő vonallal jelöltem.



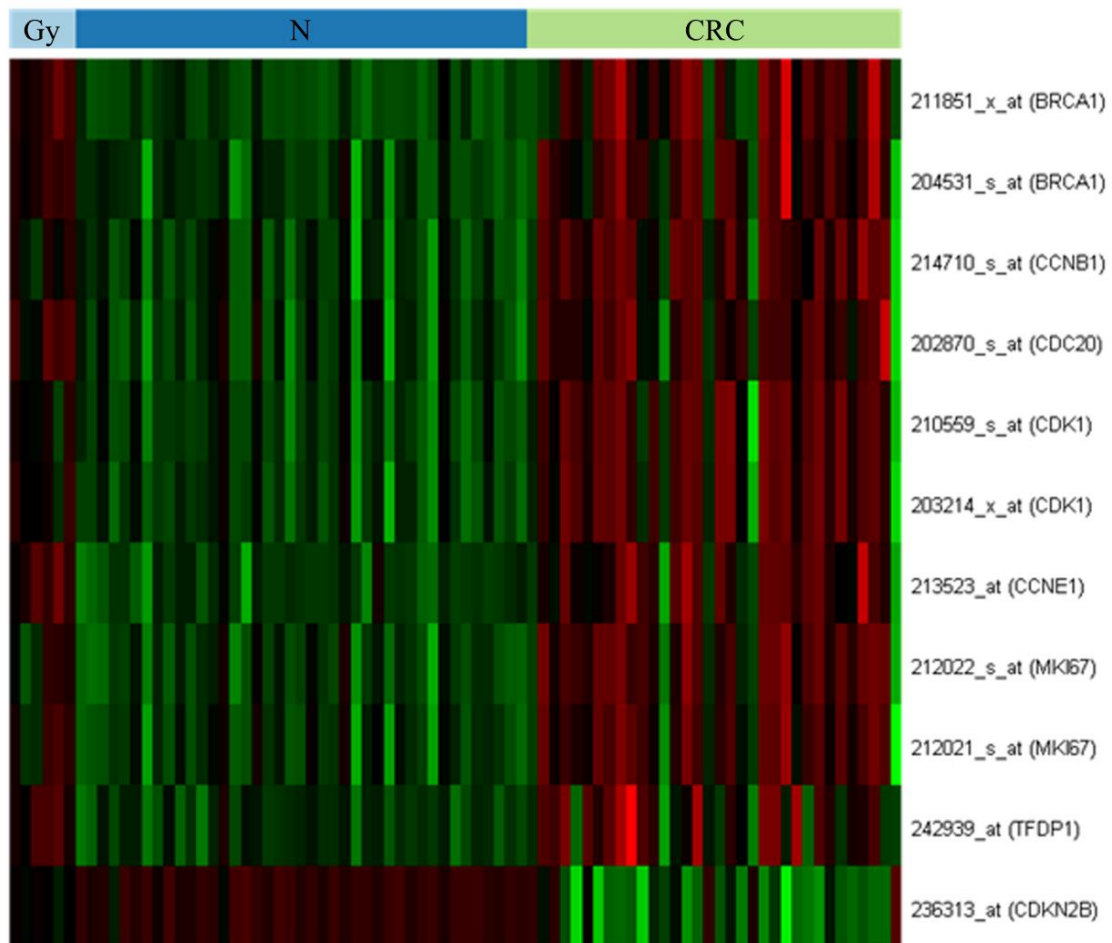
8C. ábra: Az apoptotikus index (AI) változása az életkori öregedés és az adenómakarcinóma szekvencia során a vastag- és végbélhamban.

Az apoptotikus index nő az öregedés és csökken a karcinogenezis során. A gyermekek kolorektális hámjában az apoptotikus sejtpusztulás csökkent mértékű az idősebb, egészséges hámhoz képest. Daganatos mintákban a legalacsonyabb az apoptotikus aktivitás. A boxplotok az átlag és szórás értékeket ábrázolják. Az egyes csoportok (gyermek normál /Gy/, felnőtt normál /N/, adenóma /Ad/ és kolorektális karcinóma /CRC/) közötti szignifikáns eltérést ($p < 0,05$) piros összekötő vonallal jelöltem.

5.2. A proliferációt és apoptózist szabályozó gének expressziójának vizsgálata kolorektális biopsziás mintákban, az öregedés és a karcinogenezis során

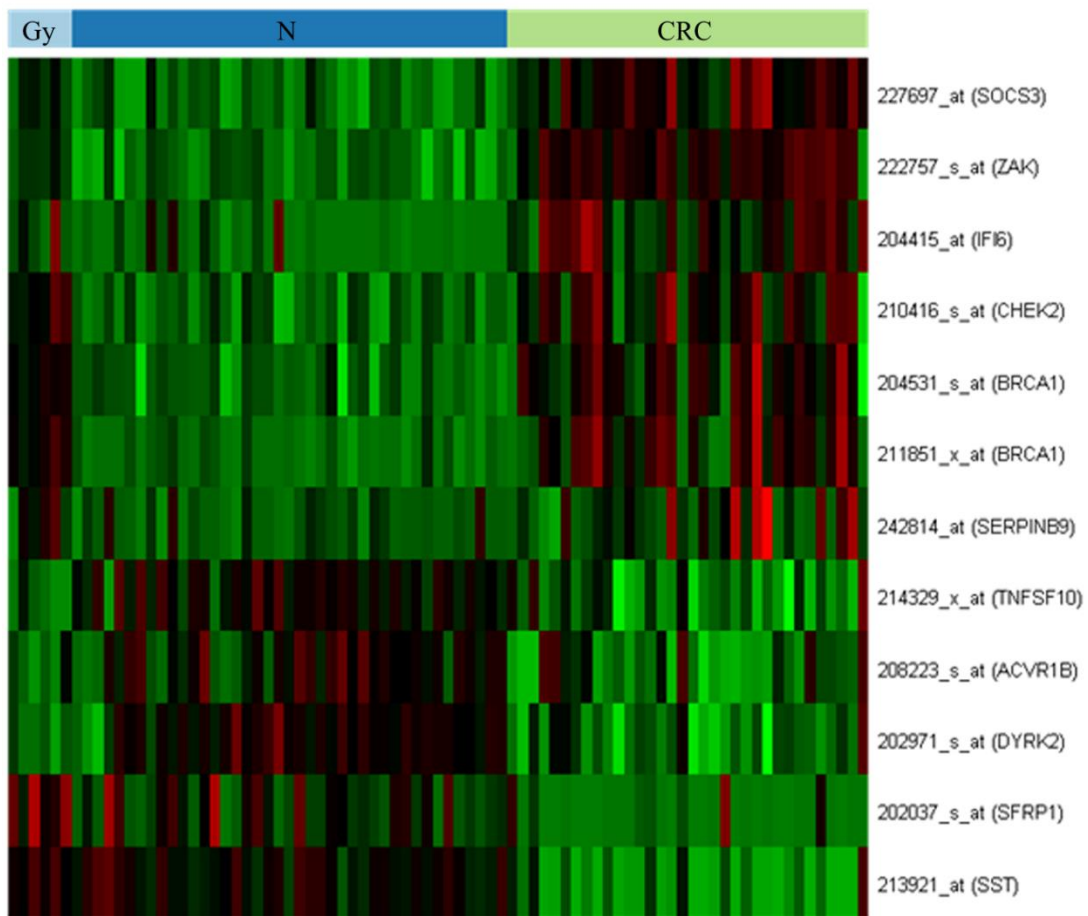
Száztizennégy proliferációt szabályozó gén mRNS-expresszióját vizsgáltuk HGU133 Plus2.0 microarray alkalmazásával, egészséges gyermek (Gy), felnőtt (N) és karcinómás (CRC) mintákban. Négy génhez tartozó, összesen 5 próba (a szilárd hordozóhoz hibridizáló komplementer egyszálú nukleinsav) expressziója változott kizárólag az élettani öregedés során, vagyis a normál gyermek és felnőtt minták között. A karcinogenezis során 13 génhez tartozó 18 próba mRNS-expressziója változott lényegesen. Mindkét folyamatban, vagyis az öregedés és a karcinogenezis során 11 próba (8 gén: *BRCA1*, *CCNB1*, *CCNE1*, *CDC20*, *CDK1*, *CDKN2B*, *MKI67* és *TFDP1*) fejeződött ki eltérően, statisztikailag is számottevő módon (9. ábra).

Hasonlóképpen megvizsgáltam 534 apoptózist szabályozó gén kifejeződését a gyermek, felnőtt és karcinómás mintákban. Kilenc gén (15 próba) expressziója változott a normál hámban az öregedés során és 32 gén (46 próba) kifejeződése a karcinogenezis alatt. Tizenegy gén (12 próba) (*ACVR1B*, *BRCA1*, *CHEK2*, *DYRK2*, *IFI6*, *SERPIN9*, *SFRP1*, *SOCS3*, *SST*, *TNFSF10* és *ZAK*) expressziója változott mind az öregedés mind a kolorektális karcinogenezis során (10. ábra). A gének besorolása a fő funkciójuk alapján történt, bár bizonyos géntermékek több funkcionális csoportba is besorolhatók. Amennyiben egy gén mind a sejtosztódást, mind az apoptózist regulálja, abban az esetben mindkét összehasonlításban szerepelhetett.



9. ábra: Az életani öregedés és a kolorektális karcinogenezis során változó mRNS-expressziót mutató, sejtproliferációt szabályozó gének azonosítása, Affymetrix HGU133 Plus2,0 array alkalmazásával.

A hőtérkép első 6, világoskék színnel jelölt oszlopa a gyermek (Gy), a következő 41, sötétkékel jelölt oszlop a felnőtt normál (N), és az utolsó 34, zöld színnel jelölt oszlop a daganatos (CRC) biopsziás minták mRNS-expresszióját ábrázolja. A hőtérképen a fokozott génexpressziót piros, a csökkent expressziót zöld szín jelöli. A hőtérképeken ábrázolt gének kifejeződése változik az öregedés (Gy vs. N), illetve a karcinogenezis (N vs. CRC) során.

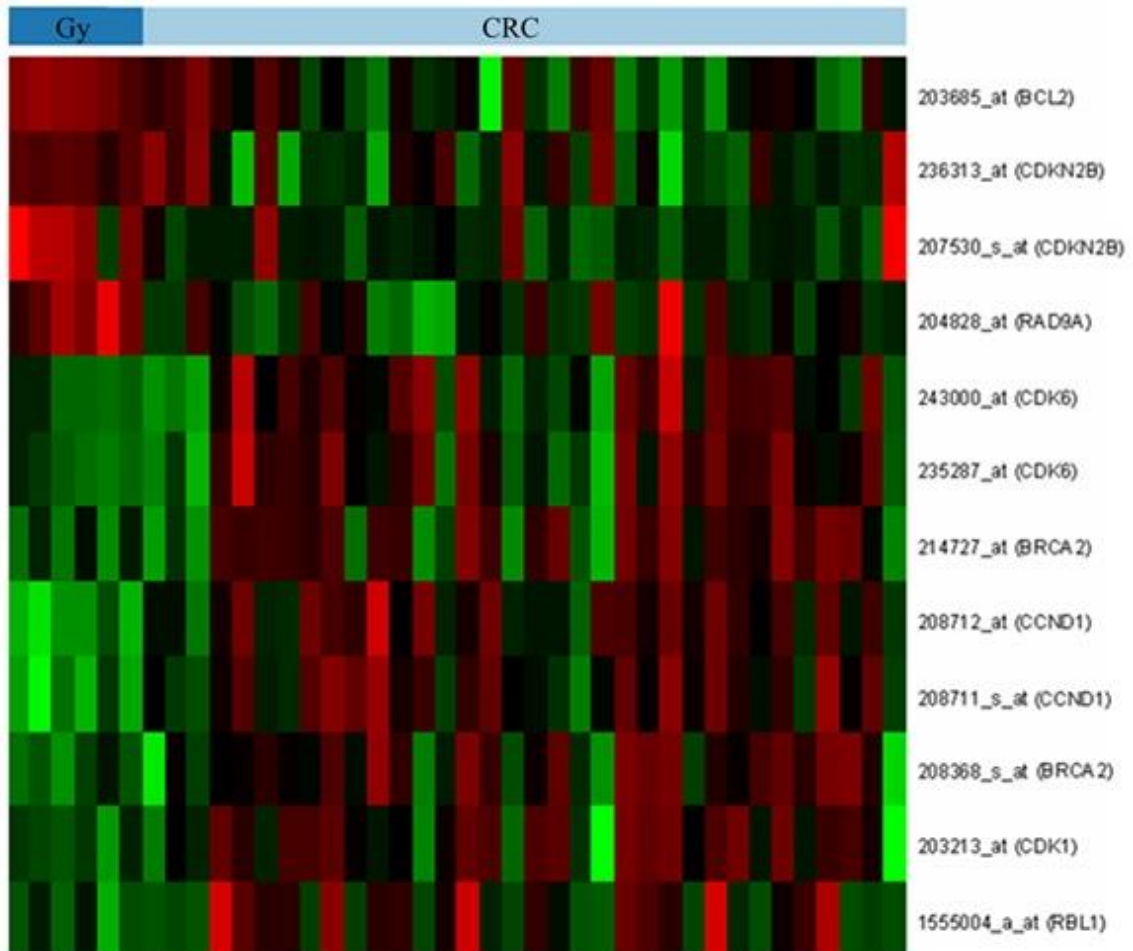


10. ábra: Az élettani öregedés és a kolorektális karcinogenezis során változó mRNS-expressziót mutató, apoptózist szabályozó gének azonosítása, Affymetrix HGU133 Plus2,0 array felhasználásával.

A hőtérkép első 6, világoskék színnel jelölt oszlopa a gyermek (Gy), a következő 41, sötétkékekkel jelölt oszlop a felnőtt normál (N), és az utolsó 34, zöld színnel jelölt oszlop a daganatos (CRC) biopsziás minták mRNS-expresszióját ábrázolja. A hőtérképen a fokozott génextpressziót piros, a csökkent expressziót zöld szín jelöli. A hőtérképeken ábrázolt gének kifejeződése változik az öregedés (Gy vs. N), illetve a karcinogenezis (N vs. CRC) során.

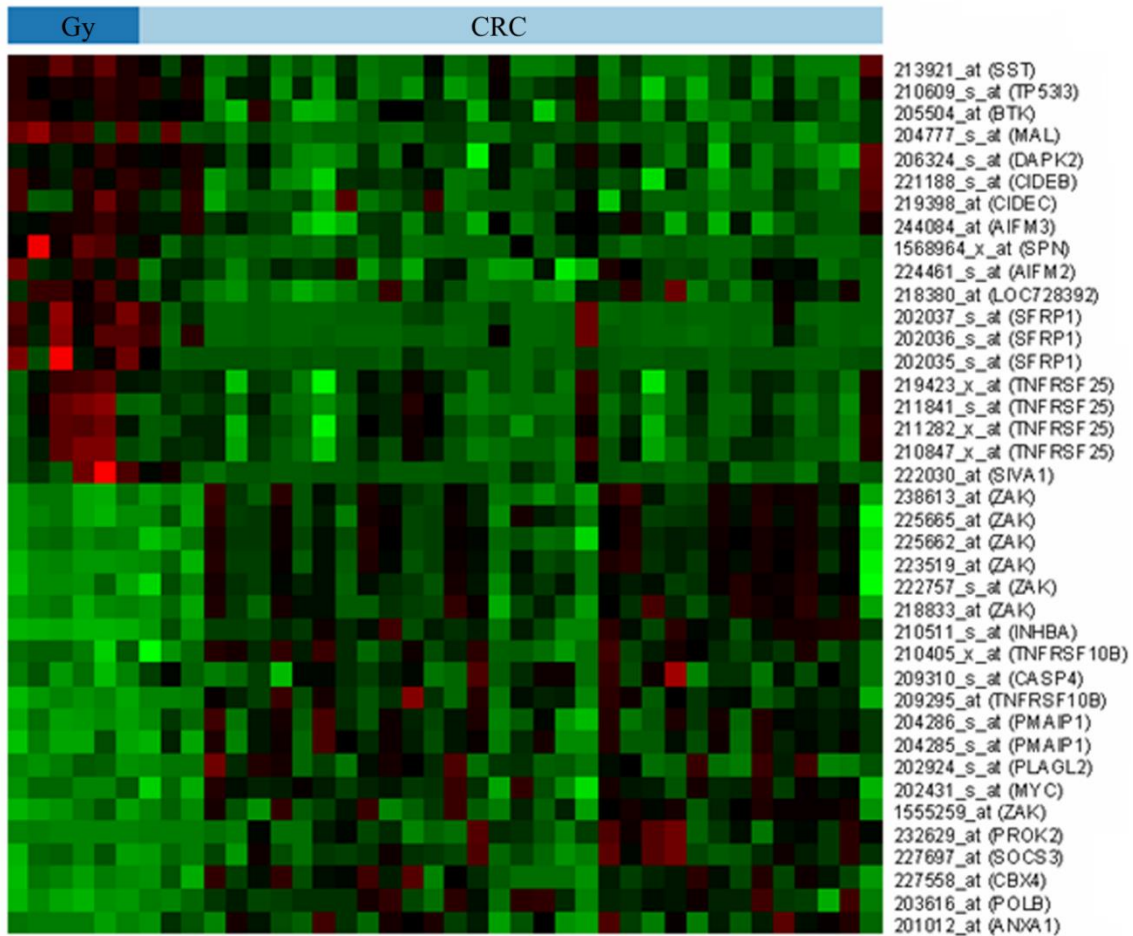
5.3. A proliferációt és apoptózist szabályozó gének mRNS-expressziós vizsgálata és összehasonlítása a gyermek és a daganatos minták között

Szöveti szinten a gyermek és a tumoros mintákban is fokozott sejtosztódást tapasztaltam a normál felnőtt mintákhoz képest, de a fiatal vastagbélhamban a sejtosztódás jól szabályozott, míg CRC-ben kontrollálatlan. Éppen ezért a továbbiakban a proliferációt és apoptózist szabályozó gének mRNS-expresszióját a gyermek és a tumoros minták között is összehasonlítottam. Nyolc sejtosztódást szabályozó gén (12 próba) (*BCL2*, *CDKN2B*, *RAD9A*, *BRCA2*, *CCND1*, *CDK1*, *CDK6* és *RBL1*) és 26 apoptózist reguláló gén (39 próba) (*AIFM2*, *AIFM3*, *BTK*, *CIDEB*, *CIDEC*, *DAPK2*, *MAL*, *NLRP1 (LOC728392)*, *SFRP1*, *SIVA1*, *SPN*, *SST*, *TR53I3*, *TNFRSF25*, *ANXA1*, *CBX4*, *CASP4*, *INHBA*, *MYC*, *PLAGL2*, *PMAIP1*, *POLB*, *PROK2*, *SOCS3*, *TNFRSF10B* és *ZAK*) kifejeződése mutatott eltérést statisztikailag is számottevő mértékben, a p-értéket tekintve (11. és 12. ábra).



11. ábra: A gyermek (Gy) és a daganatos mintákban (CRC) változó mRNS-expressziót mutató, sejtproliferációt szabályozó gének azonosítása, Affymetrix HGU133 Plus2,0 array alkalmazásával.

A hőtérkép első 6, sötétkék színnel jelölt oszlopa a gyermek (Gy), a következő 34, világoskék színnel jelölt oszlop a daganatos (CRC) biopsziás minták mRNS-expresszióját ábrázolja. A hőtérképen a fokozott génexpressziót piros, a csökkent expressziót zöld szín jelöli. A hőtérképen azok a gének szerepelnek, amelyek a gyermek és a daganatos minták között eltérő kifejeződést mutattak.



12. ábra: A gyermek (Gy) és a daganatos mintákban (CRC) változó mRNS-expressziót mutató, apoptózist szabályozó gének azonosítása, Affymetrix HGU133 Plus2,0 array felhasználásával.

A hőtérkép első 6, sötétkék színnel jelölt oszlopa a gyermek (Gy), a következő 34, világoskék színnel jelölt oszlop a daganatos (CRC) biopsziás minták mRNS-expresszióját ábrázolja. A hőtérképen a fokozott génextpressziót piros, a csökkent expressziót zöld szín jelöli. A hőtérképen azok a gének szerepelnek, amelyek a gyermek és a daganatos minták között eltérő kifejeződést mutattak.

5.4. Microarray módszerrel végzett mRNS-expressziós vizsgálat eredményeinek megerősítése valós idejű polimeráz láncreakcióval

A microarray módszerrel végzett mRNS-expressziós vizsgálat eredményeinek ismeretében, az egyes csoportok között eltérő expressziót mutató gének közül 10 kiválasztott gén (*CDKN2B*, *MKI67*, *CDC2/CDK1*, *CCNE1*, *ACVR1B*, *TNFSF10*, *DYRK2*, *SOCS3*, *IFI6* és *SERPINB9*) kifejeződését vizsgálatuk Taqman RT-PCR módszerrel, validáció céljából (6. táblázat).

A microarray vizsgálat során a proliferációt szabályozó gének közül a *CDKN2B*, *MKI67*, *CDC2/CDK1* és *CCNE1* mutatott expressziós eltérést a gyermek vs. felnőtt normál és felnőtt normál vs. CRC összehasonlításban, a Fold change értékeket ($FC \leq 0,5$ vagy $FC \geq 2,0$) és az ANOVA-teszt ($p < 0,05$) eredményeit figyelembe véve. A Tukey-teszt elvégzését követően a *CDC2/CDK1* és *CCNE1* esetében találtunk szignifikáns eltérést a fenti összehasonlításokban. A PCR validáció az általunk vizsgált gének expresszióváltozásának tendenciáját minden esetben megerősítette, a fent említett mintacsoportokat összehasonlítva. A *CDKN2B*, *MKI67*, *CDC2/CDK1* és *CCNE1* expressziója határérték szignifikanciát mutatott a gyermek, felnőtt normál és daganatos minták összehasonlításában a Fold change értékeket tekintve. Tukey poszt-teszt megerősítette a *CDC2/CDK1* expresszió változását ($p < 0,05$) az öregedés és a karcinogenezis során.

Taqman PCR validációt néhány apoptózist reguláló gén esetében (*ACVR1B*, *TNFSF10*, *DYRK2*, *SOCS3*, *IFI6* és *SERPINB9*) is végeztünk. Az előzetes microarray vizsgálatban az *ACVR1B*, *TNFSF10* és *DYRK2* expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt ($FC \leq 0,5$ vagy $FC \geq 2,0$; $p < 0,05$) gyermek és daganatos mintákban a felnőtt ép vastagbél biopsziás mintákhoz képest. Az utóbbi két gén mRNS-expressziós eltéréseit a RT-PCR validáció is megerősítette. Az Affymetrix tanulmány eredményei szerint az apoptózist szabályozó gének közül a *SOCS3*, *IFI6* és *SERPINB9* mRNS-expressziója szignifikánsan magasabb gyermek és CRC mintákban az egészséges felnőtt mintákhoz képest. Ezen gének expressziójának Taqman RT-PCR elemzése megerősített a tendenciózus változást a gyermek vs. felnőtt normál és felnőtt normál vs. CRC összehasonlításban. ANOVA- és Tukey-tesztet végezve a *SOC3* és *IFI6* esetében találtam

statisztikailag is szignifikáns ($p < 0,05$) eltérést. Az RT-PCR validációra kiválasztott gének mRNS-expressziójának változását a 7. táblázat foglalja össze.

6. táblázat: Az Affymetrix teljes genom oligonukleotid microarray vizsgálat alapján a normál öregedés, illetve a kolorektális karcinogenezis során eltérő expressziót mutató gének, amelyek Taqman RT-PCR validációját végeztük.

Génszimbólum	Affymetrix azonosító	Taqman azonosító	Génnév	Sejtfunkció
<i>CDKN2B</i>	236313_at	Hs00365249_m1*	ciklin-dependens kináz gátló 2B	sejtosztódás gátlása
<i>MKI67</i>	212022_s_at	Hs01032443_m1*	Ki-67 monoklonális antitest által azonosított antigén	sejtosztódás/sejtciklus szabályozás
<i>CDC2/CDK1</i>	210559_s_at	Hs00364293_m1	ciklin-dependens kináz 1	sejtosztódás/sejtciklus szabályozás, apoptózis gátlása
<i>CCNE1</i>	213523_at	Hs01026536_m1*	ciklin E1	sejtosztódás/sejtciklus szabályozás, szervek fejlődése, regeneráció
<i>ACVR1B</i>	208223_s_at	Hs00923304_m1	aktivin A receptor, IB típus	apoptózis indukció
<i>TNFSF10</i>	214329_x_at	Hs00234356_m1*	tumornekrózis faktor (ligand) szupercsalád 10-es tagja	apoptózis indukció
<i>DYRK2</i>	202971_s_at	Hs00705109_s1*	kettős fajlagosságú tirozin (Y)-foszforiláció szabályozott kináz 2	apoptózis indukció
<i>SOCS3</i>	227697_at	Hs02330328_s1*	citokin-jelátvitel gátló 3	apoptózis gátlása
<i>IFI6</i>	204415_at	Hs00242571_m1*	interferon, alfa-indukálható fehérje 6	apoptózis gátlása
<i>SERPINB9</i>	242814_at	Hs00244603_m1*	szerpín-peptidáz gátló, klád B (ovalbumin), 9-es tagja	apoptózis gátlása

7. táblázat: A microarray és RT-PCR vizsgálatok normalizált intenzitásértékei (átlag ± szórás), valamint az ANOVA-elemzések.

A microarray és RT-PCR vizsgálatok ANOVA-elemzésének p-értékei az utolsó oszlopban szerepelnek. A szignifikánsan eltérő ($p < 0,05$) expresszióváltozást félkövér számokkal jelöltem.

Génszimbólum	Affymetrix azonosító	A microarray vizsgálat normalizált log ₂ intenzitásértékei (átlag ± szórás)			ANOVA értékelés a microarray-en
		Gyerek (Gy)	Egészséges felnőtt (N)	Vastag- és végbélrák (CRC)	
<i>CDKN2B</i>	236313_at	10,13 ± 0,45	11,64 ± 0,61	7,74 ± 2,55	2,90*10-14
<i>MKI67</i>	212022_s_at	9,02 ± 0,95	7,94 ± 0,78	9,97 ± 1,35	3,67*10-11
<i>CDC2/CDK1</i>	210559_s_at	8,73 ± 0,65	7,61 ± 0,69	9,46 ± 1,45	1,09*10-9
<i>CCNE1</i>	213523_at	6,89 ± 0,39	5,71 ± 0,4	6,74 ± 0,84	4,96*10-10
<i>ACVR1B</i>	208223_s_at	4,75 ± 0,65	5,79 ± 0,8	4,72 ± 1,09	1,08*10-5
<i>TNFSF10</i>	214329_x_at	9,87 ± 0,47	10,97 ± 0,52	9,89 ± 0,88	6,05*10-9
<i>DYRK2</i>	202971_s_at	10,27 ± 0,37	11,39 ± 0,58	10,24 ± 0,78	2,12*10-10
<i>SOCS3</i>	227697_at	8,2 ± 1,04	6,44 ± 1,21	10,27 ± 1,86	2,20*10-16
<i>IFI6</i>	204415_at	7,07 ± 1,66	5,92 ± 0,95	7,97 ± 1,49	4,18*10-9
<i>SERPINB9</i>	242814_at	5,43 ± 1,36	4,3 ± 0,78	5,39 ± 1,82	2,20*10-3
Génszimbólum	Taqman azonosító	A RT-PCR vizsgálat normalizált intenzitásértékei (átlag ± szórás)			ANOVA értékelés a RT-PCR-en
		Gyerek (Gy)	Egészséges felnőtt (N)	Vastag- és végbélrák (CRC)	
<i>CDKN2B</i>	Hs00365249_m1*	14,13 ± 0,37	14,37 ± 0,22	13,96 ± 0,44	2,19*10-1
<i>MKI67</i>	Hs01032443_m1*	22,94 ± 0,51	22,24 ± 0,58	22,63 ± 0,55	1,10*10-1
<i>CDC2/CDK1</i>	Hs00364293_m1	19,73 ± 0,6	18,5 ± 0,82	19,83 ± 1,1	4,99*10-3
<i>CCNE1</i>	Hs01026536_m1*	20,01 ± 0,41	19,43 ± 0,51	19,98 ± 0,8	7,05*10-2
<i>ACVR1B</i>	Hs00923304_m1	15,5 ± 0,93	15,45 ± 1,02	16,08 ± 2,52	4,90*10-1
<i>TNFSF10</i>	Hs00234356_m1*	22,4 ± 0,26	23,22 ± 0,22	22,55 ± 0,77	3,22*10-3
<i>DYRK2</i>	Hs00705109_s1*	22,82 ± 0,3	23,31 ± 0,37	22,66 ± 0,67	8,24*10-3
<i>SOCS3</i>	Hs02330328_s1*	21,85 ± 1,09	20,29 ± 0,55	22,72 ± 1,41	1,90*10-4
<i>IFI6</i>	Hs00242571_m1*	21,35 ± 1,38	20,42 ± 0,52	22,37 ± 1,23	8,94*10-5
<i>SERPINB9</i>	Hs00244603_m1*	20,57 ± 0,47	20,0 ± 0,42	20,61 ± 0,75	2,30*10-1

5.5. A kolorektális szomatosztatinintermelés vizsgálata az élettani öregedés és a karcinogenezis során, mRNS- és fehérjeszinten

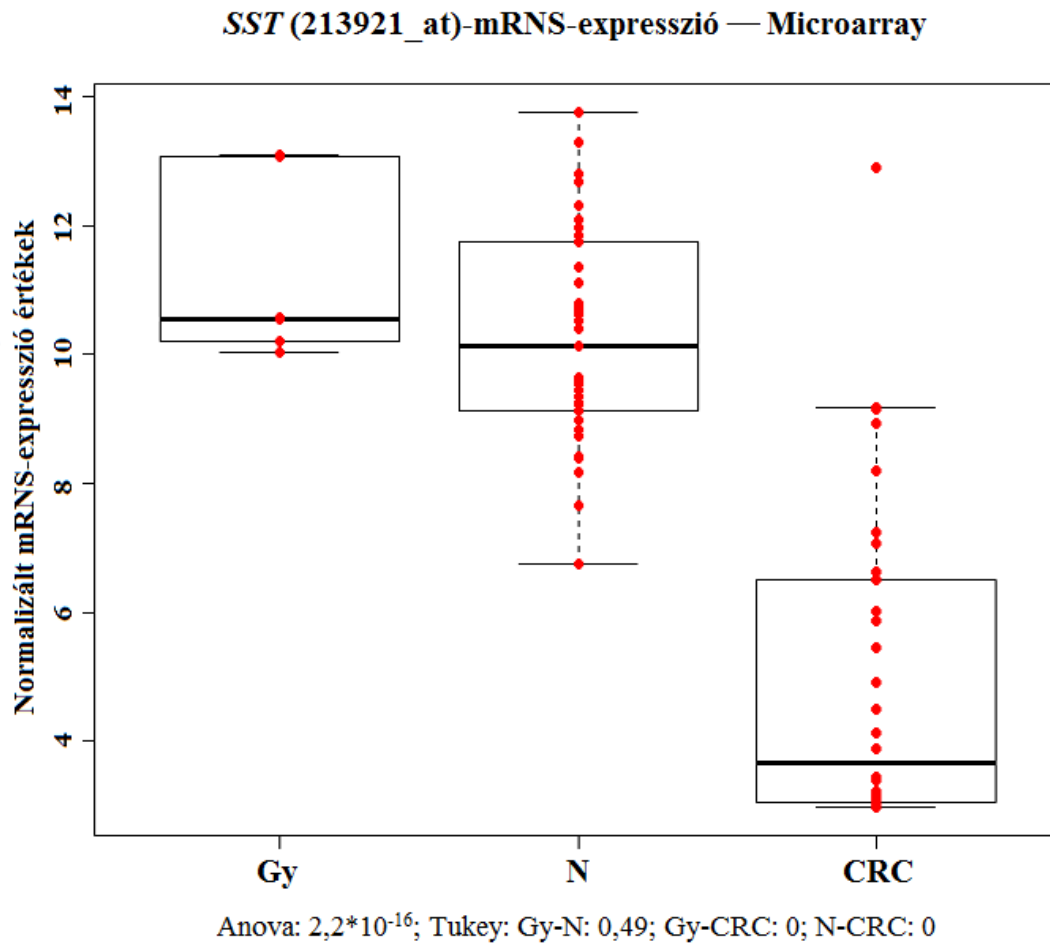
A szomatosztatint kódoló gén mRNS-expressziós vizsgálatához (Affymetrix azonosító: 213921_at) első lépésben az Affymetrix microarray rendszert alkalmaztunk, a fentiekben már részletezett módon. Ennek során az *SST* kifejeződését vizsgáltuk egészséges gyermek (Gy), felnőtt (N) és daganatos (CRC) vastag- és végbél biopsziás mintákban. A microarray tanulmány eredményei szerint az élettani öregedés során az egészséges gyermek és felnőtt csoport között nem változik lényegesen az *SST*-expresszió, ugyanakkor szignifikánsan csökkent a tumoros mintákban mind a fiatal, mind az idősebb normál mintákhoz képest ($p < 0,05$) (13. ábra).

Az *SST* mRNS-expressziójának vizsgálatához nemcsak microarray elemzést végeztünk, hanem eredményeink megerősítéséhez valós idejű polimeráz láncreakciót is alkalmaztunk a szövettanilag ép gyermek (Gy), felnőtt (N) és vastagbélrákos (CRC) mintákon. A vizsgálatot első lépésben az eredeti mintaszetten végeztük, vagyis azokon a mintákon, amelyeken korábban microarray elemzés is történt. Az eredeti mintákon végzett RT-PCR validáció megerősítette, hogy az öregedés során nem változik lényegesen az *SST* kifejeződése, ugyanakkor CRC-ben szignifikánsan csökken ($p < 0,05$) (14A. ábra).

Az eredeti mintaszetten végzett validációt követően független biopsziás mintákban is mértük az *SST*-mRNS-expressziót a fent említett mintacsoportokban, tehát olyan biopsziás mintákban, amelyeken microarray elemzés korábban nem történt. A független mintaszetten végzett PCR-vizsgálat is alátámasztotta a microarray és az eredeti mintákon végzett PCR-vizsgálat eredményeit. A független mintákban sem találtunk eltérést az *SST*-expresszió tekintetében az eltérő életkorú normál minták között, ellenben a karcinogenezis során az *SST* kifejeződése szignifikánsan csökkent ($p < 0,05$) (14B. ábra).

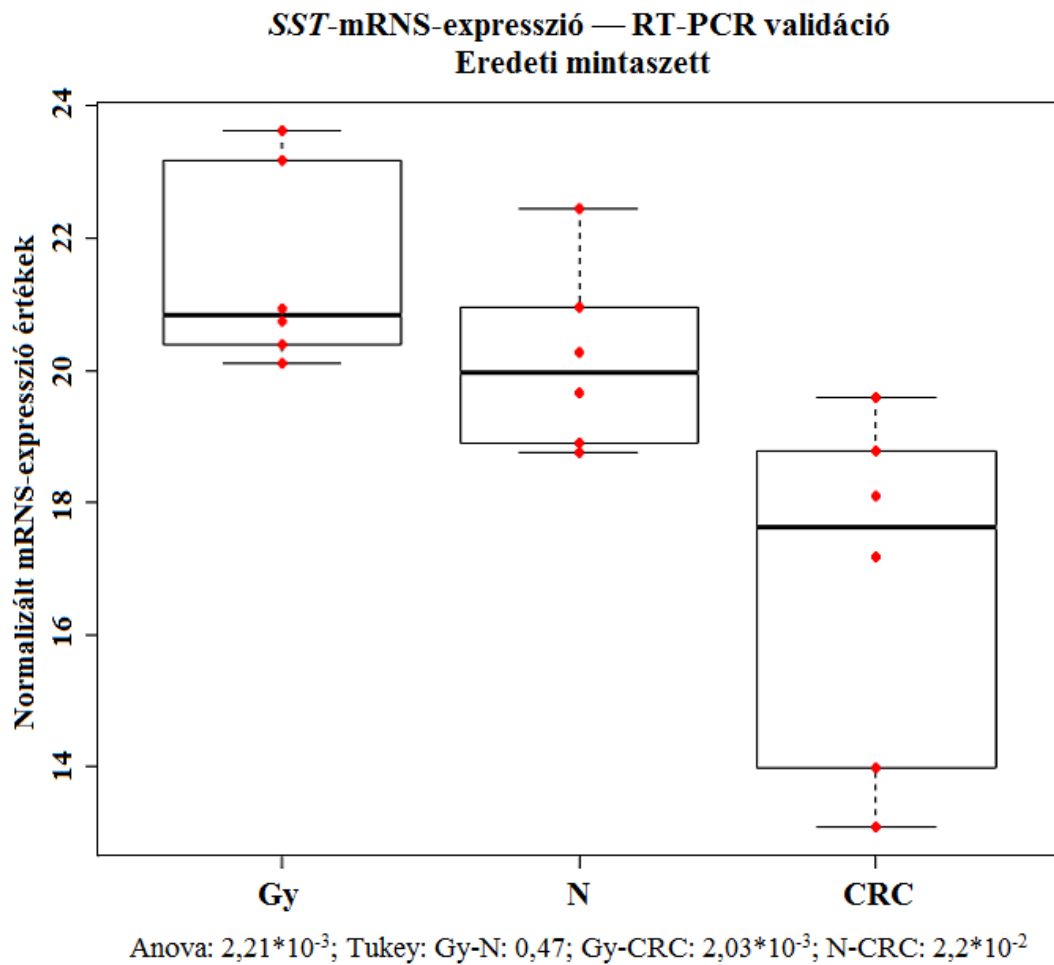
További adatfeldolgozás során összehasonlítottuk az *SST*-expressziót a gyermek (Gy), felnőtt normál (N) és tumoros (CRC) minták között, az eredeti és a független minták egyesítésével (14C. ábra). Korábbi eredményeinkkel összhangban az egyesített mintaszett vizsgálata során is csak a kolorektális karcinómában találtunk szignifikáns expressziócsökkenést.

A gyermek (Gy), felnőtt normál (N) és CRC-mintákon fehérjeszinten is elvégzett immunhisztokémiai festést követően a tárgylemezeket digitális mikroszkóp segítségével vizsgáltam (15. ábra). Az ép és daganatos vastagbélhamban a szomatosztatint termelő és azt nem termelő sejtek jelölését és pontos számolását a Marker Counter nevű modul tette lehetővé, amely egyben az egyes sejtcsoportok egymáshoz viszonyított arányát is automatikusan kiszámolta. Az SST-t termelő hámsejtek azonosítását követően tehát meghatároztam az SST-pozitív és az összes leszámolt hámsejtek arányát. A szöveti vizsgálat szintén megerősítette a korábbi mRNS-expressziós (microarray és RT-PCR) eredményeinket, vagyis a különböző életkorú egészséges vastagbélhamban nem változik az SST-termelés, míg CRC-ben szignifikánsan csökkent a szomatosztatint termelő sejtek aránya ($p < 0,05$) (16. ábra).



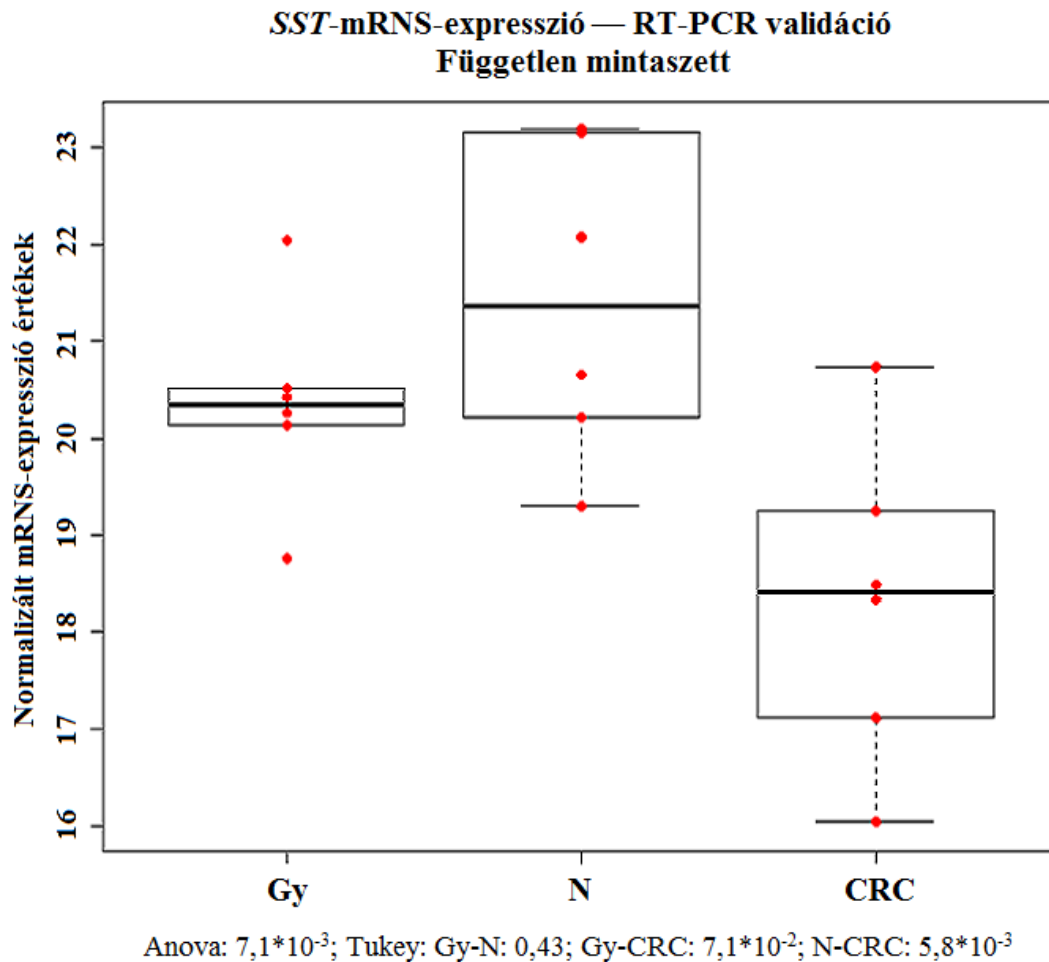
13. ábra: A szomatosztatín mRNS-expressziójának vizsgálata microarray analízissel, vastagbél biopsziás mintákon.

A szomatosztatint kódoló gén mRNS-expressziójának vizsgálata microarray analízissel, szövettanilag ép gyermek (Gy), felnőtt normál (N) és vastagbélrákos (CRC) biopsziás mintákon. A piros pontok a normalizált mRNS-expressziós értékeket, a boxplotok a medián és szórás értékeket ábrázolják. Az SST-expresszió szignifikánsan csökken CRC-ben a fiatal és idősebb normál mintákban mérthez képest.



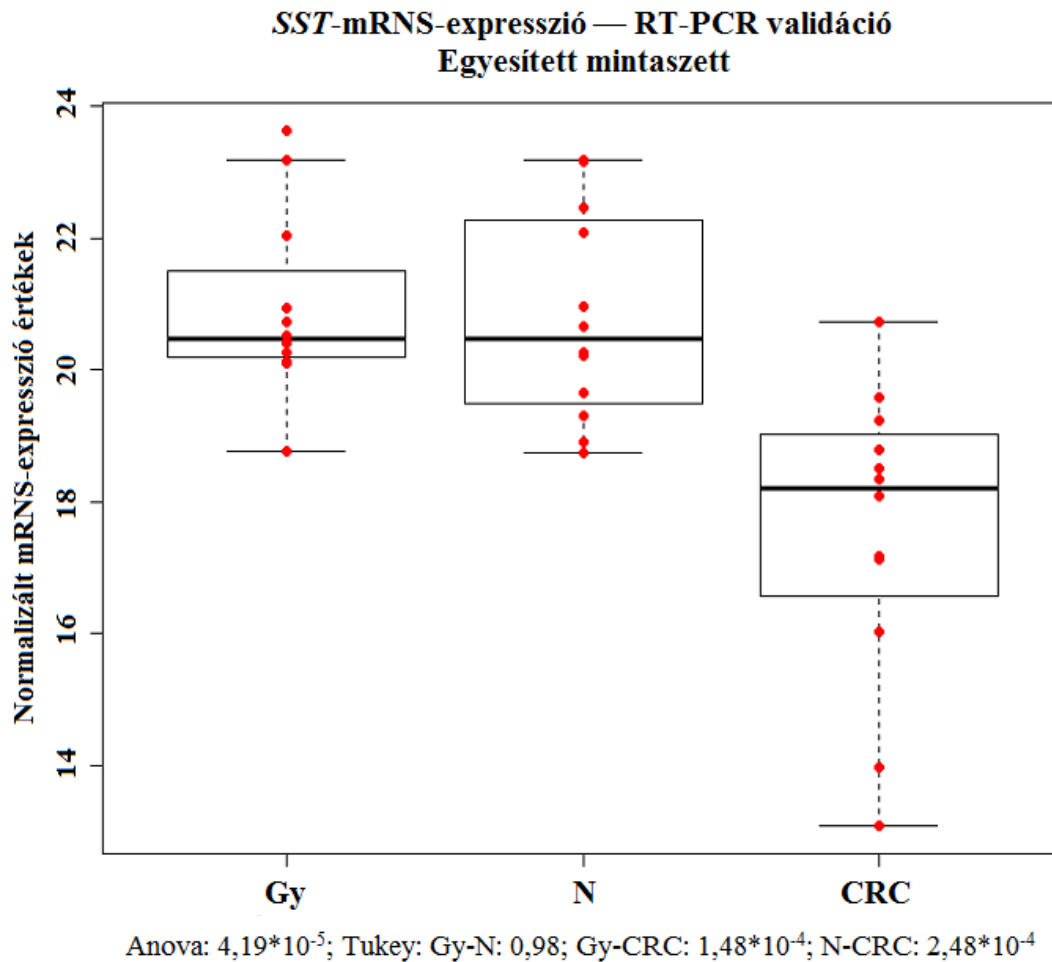
14A. ábra: A szomatosztatin mRNS-expressziójának vizsgálata az eredeti vastagbél biopsziás mintákon, RT-PCR validáció során.

A szomatosztatint kódoló gén mRNS-expressziójának vizsgálata valós idejű polimeráz lánreakcióval szövettanilag ép gyermek (Gy), felnőtt normál (N) és vastagbélrákos (CRC) biopsziás mintákon. Az elemzést az eredeti mintaszetten végeztük, vagyis azokon a biopsziás mintákon, amelyeken korábban microarray elemzés is történt. A piros pontok a normalizált RT-PCR expressziós értékeket, a boxplotok a medián és szórás értékeket ábrázolják. Az eredeti mintaszetten a RT-PCR validáció megerősítette a microarray eredményeinket, vagyis az *SST* mRNS-expressziója szignifikánsan csökken CRC-ben, mind a fiatal, mind a felnőtt normál mintákban mért expressziós értékhez képest.



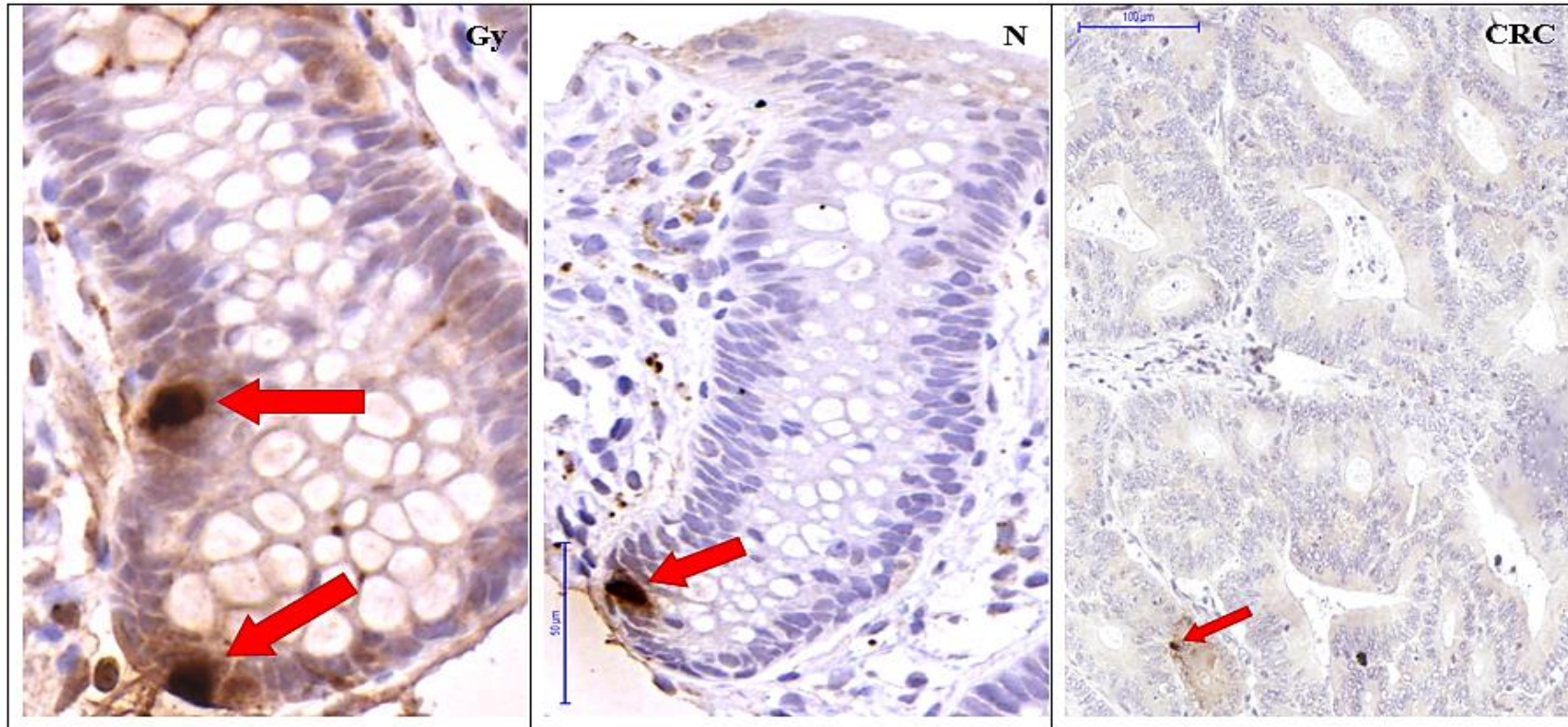
14B. ábra: A szomatosztatin mRNS-expressziójának vizsgálata független vastagbél biopsziás mintákon, RT-PCR validáció során.

A szomatosztatint kódoló gén mRNS-expressziójának vizsgálata valós idejű polimeráz lánreakcióval szövettanilag ép gyermek (Gy), felnőtt normál (N) és vastagbélrákos (CRC) biopsziás mintákon. Az elemzést független mintaszetten végeztük, vagyis olyan biopsziás mintákon, amelyeken korábban microarray elemzés nem történt. A piros pontok a normalizált RT-PCR expressziós értékeket, a boxplotok a medián és szórás értékeket ábrázolják. A független mintaszetten a RT-PCR validáció megerősítette a microarray eredményeinket, vagyis az *SST* mRNS-expressziója szignifikánsan csökken CRC-ben, mind a fiatal, mind a felnőtt normál mintákban mért expressziós értékhez képest.



14C. ábra: A szomatosztatin mRNS-expressziójának vizsgálata az egyesített mintaszetten, RT-PCR validáció során.

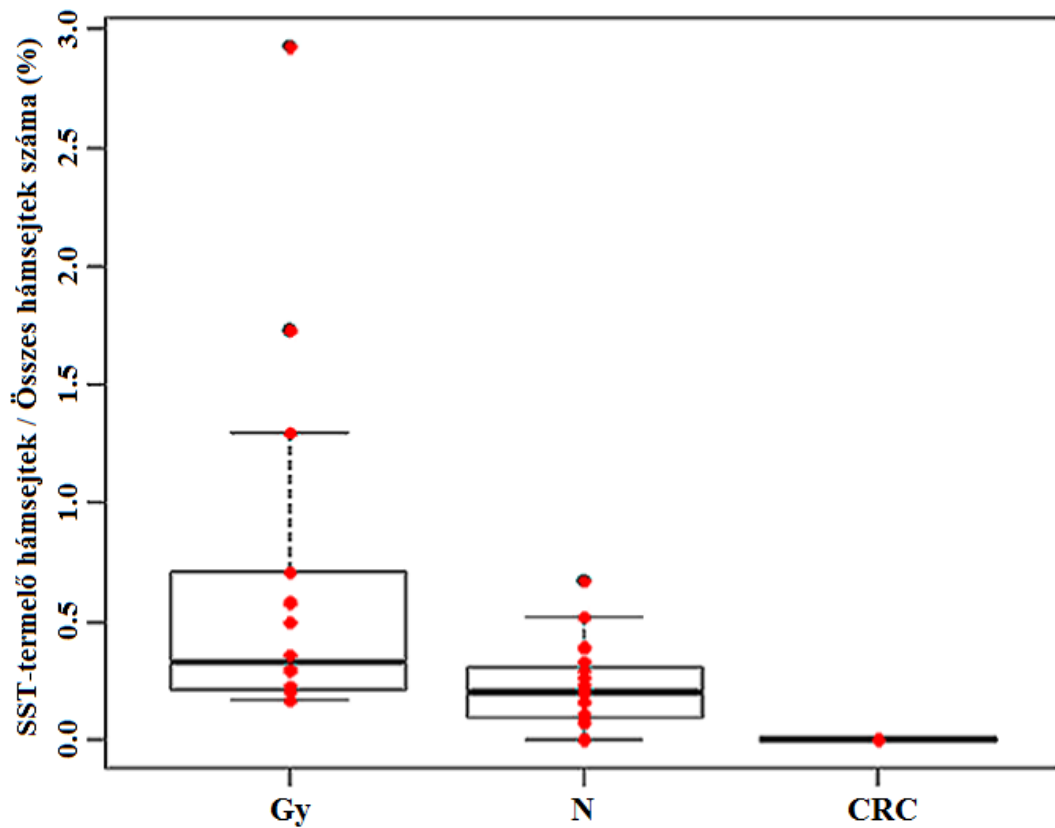
A szomatosztatin kódoló gén mRNS-expressziójának vizsgálata valós idejű polimeráz láncreakcióval szövettanilag ép gyermek (Gy), felnőtt normál (N) és vastagbélrákos (CRC) biopsziás mintákon. Az elemzést az eredeti és a független minták egyesítésével végeztük. A piros pontok a normalizált RT-PCR expressziós értékeket, a boxplotok a medián és szórás értékeket ábrázolják. Az egyesített mintaszetten végzett RT-PCR validáció is megerősítette a microarray eredményeinket, vagyis az *SST* expressziója szignifikánsan csökken CRC-ben, mind a fiatal, mind a felnőtt normál mintákban mért expressziós értékhez képest.



15. ábra: Szomatosztatint termelő sejtek immunhisztokémiai azonosítása a vastagbélhamban az élettani öregedés és a karcinogenezis során.

Az immunhisztokémiai festés során a szomatosztatint termelő sejtek citoplazmája barna színre festődik (piros nyilak). Szöveti szinten a szomatosztatint termelő sejteket normál gyermek (Gy), felnőtt (N) és daganatos (CRC) vastagbél biopsziás mintákon vizsgáltuk. A felvételek digitális mikroszkóp segítségével készültek (Gy: 700x nagyítás, N: 550x nagyítás, CRC: 200x nagyítás).

Hámeredetű SST-termelés — Immunhisztokémia



Anova: $2,2 \cdot 10^{-5}$; Tukey: Gy-N: $3,6 \cdot 10^{-3}$; Gy-CRC: $1,0 \cdot 10^{-5}$; N-CRC: $1,67 \cdot 10^{-7}$

16. ábra: A szomatosztatint termelő sejtek azonosítása a vastagbélhamban, immunhisztokémiai vizsgálat segítségével.

A szomatosztatint termelő sejtek arányának meghatározása a többi hámsejthez képest egészséges gyermek (Gy), felnőtt (N) és daganatos (CRC) biopsziás mintákban. A piros pontok az SST-pozitív sejtek arányát mutatják a többi hámsejthez képest százalékban kifejezve, a boxplotok a medián és szórás értékeket ábrázolják. CRC-ben a szomatosztatint termelő hámsejtek aránya szignifikánsan csökken a fiatal és idősebb ép hámhoz képest.

5.6. A szomatosztatinanalóg octreotid sejtsztódást és apoptózist befolyásoló hatásának vizsgálata Caco-2 sejtvonalon

Munkám következő részében a szomatosztatinanalóg octreotid sejtsztódást és apoptózist befolyásoló hatását vizsgáltam Caco-2 kolorektális adenokarcinóma sejtvonalon. Az octreotidot öt különböző koncentrációban (0,1 nmol/l, 1,0 nmol/l, 2,5 nmol/l, 5,0 nmol/l és 10,0 nmol/l) adtuk a sejtekhez, valamennyi koncentráció esetében három párhuzamos mérést végeztünk. Az apoptotikus (Sub-G1 fázisban lévő) sejteknek és a többi, aktív sejtciklusban lévő (G1+S+G2+M) sejteknek az arányát 24, 48 illetve 72 óra elteltével áramlási citometria segítségével határoztuk meg. Negyvennyolc óra elteltével a kontrollcsoportban (ahol 0,0 nmol/l a hozzáadott octreotid koncentráció) az apoptotikus sejtek aránya némileg alacsonyabb. Amennyiben a szomatosztatinanalógot 1,0 nmol/l-nél nagyobb koncentrációban adtuk a sejtekhez, akkor a Sub-G1 fázisban lévő apoptotikus sejtek aránya szignifikánsan magasabb, míg a G1+S+G2+M fázisban lévő sejtek aránya szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollcsoporthoz képest. A legmagasabb apoptotikus (Sub-G1) és a legalacsonyabb G1+S+G2+M sejtfrakciót 5,0 nmol/l-es octreotid koncentrációnál mértük. A sejtkultúra kísérlet alapján a szomatosztatinanalóg octreotid hatékonyan növeli az apoptotikus és csökkenti a többi, aktív sejtciklusban lévő sejtek arányát kolorektális adenokarcinóma sejtvonalon, mégpedig koncentrációfüggő módon. Az áramlási citometriai eredményeket a 8. és a 9. táblázatok, valamint a 17. ábra szemlélteti.

8. táblázat: A Caco-2 sejtek százalékos megoszlása a sejtciklus különböző fázisaiban a kezeletlen kontroll és a különböző koncentrációban octreotiddal kezelt csoportokban.

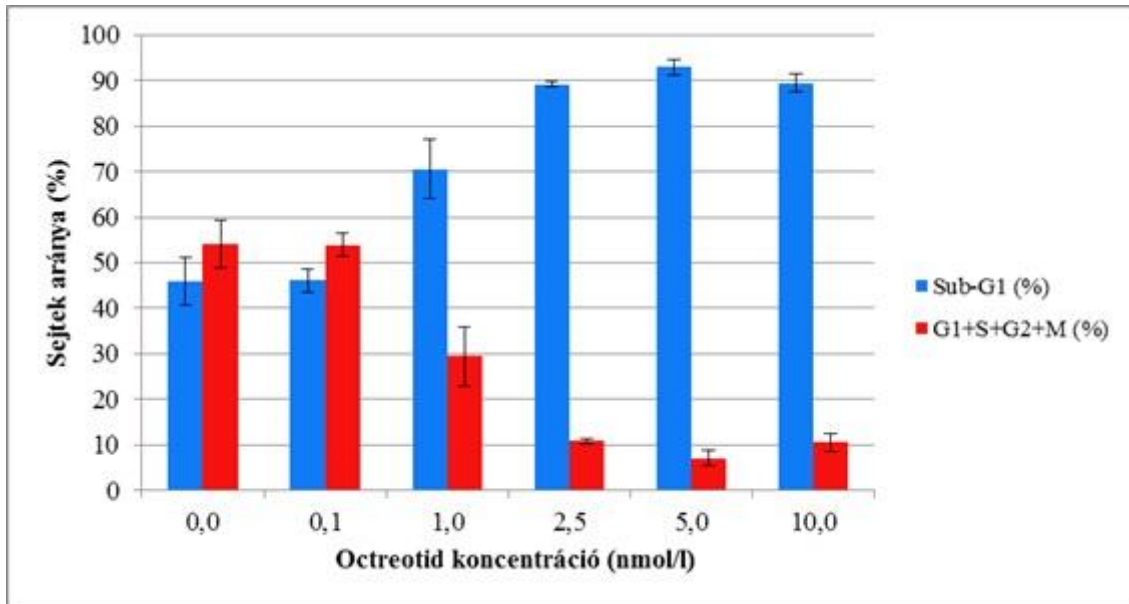
A táblázatban a százalékban kifejezett sejtarányok (átlag \pm szórás) értékeit tüntetem fel.

Octreotid koncentráció (nmol/l)	Sub-G1 (%)	G1 (%)	S (%)	G2 (%)	M (%)
0,0	45,9 \pm 5,2	32,2 \pm 4,1	2,8 \pm 1,5	13,0 \pm 2,9	3,8 \pm 0,4
0,1	46,1 \pm 2,5	28,6 \pm 0,7	2,7 \pm 0,4	14,2 \pm 2,2	5,7 \pm 1,4
1,0	70,6 \pm 6,4	11,9 \pm 2,8	3,9 \pm 2,7	7,3 \pm 0,5	4,4 \pm 1,1
2,5	89,2 \pm 0,7	4,3 \pm 0,8	1,2 \pm 0,2	3,1 \pm 1,2	1,5 \pm 0,2
5,0	93,0 \pm 1,7	3,9 \pm 1,1	0,8 \pm 0,4	1,5 \pm 0,4	0,5 \pm 0,2
10,0	89,5 \pm 2,0	4,7 \pm 0,8	1,1 \pm 0,3	3,1 \pm 0,5	0,5 \pm 0,1

9. táblázat: A Caco-2 sejtek megoszlása a sejtciklus különböző fázisaiban, az eltérő koncentrációban octreotiddal kezelt sejteket a kontrollcsoporthoz hasonlítva.

A sejtciklus egyes fázisainak megfelelően a kontrollcsoporthoz viszonyított összehasonlítások Mann-Whitney rank korrelációs p-értékeit tüntetem fel. A szignifikáns ($p < 0,05$) értékeket félkövér számmal jelöltem.

Octreotid koncentráció (nmol/l)	Sub-G1	G1	S	G2	M
0.0 vs. 0.1	0.82	0.3827	0.8273	0.5127	0.0495
0.0 vs. 1.0	0.0495	0.0495	0.8274	0.0495	0.3827
0.0 vs. 2.5	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
0.0 vs. 5.0	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
0.0 vs. 10.0	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495

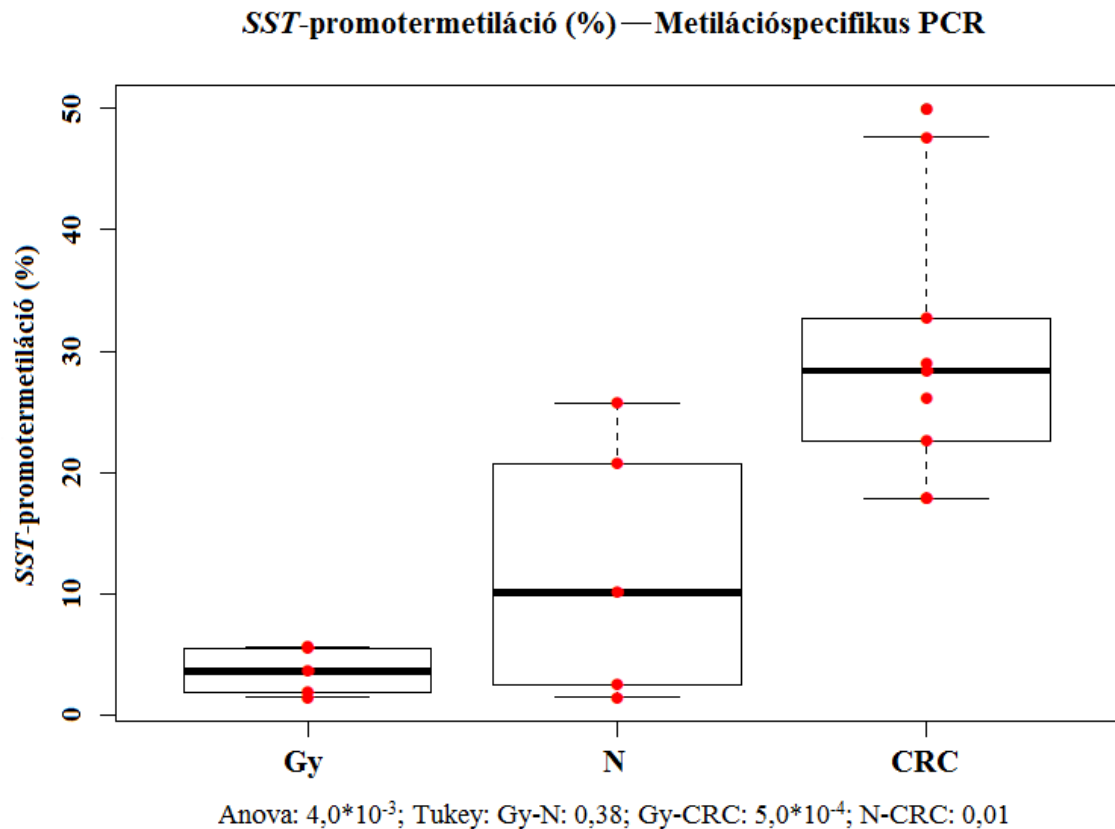


17. ábra: Caco-2 sejtek kezelése szomatostatinanalóg octreotiddal.

Az oszlopdiagram a Sub-G1 fázisban lévő apoptotikus (kék oszlop), és a többi (G1+S+G2+M fázis), aktív sejtciklusban lévő (piros oszlop) Caco-2 sejtek arányát mutatja 48 órás kezelést követően, százalékban kifejezve, a kontroll, illetve a különböző koncentrációban octreotiddal kezelt csoportokban. A diagramon az átlag és szórás értékeket tüntettem fel. Amennyiben 0,1 nmol/l-nél nagyobb koncentrációban adtunk octreotidot a sejtekhez a Sub-G1 fázisban lévő apoptotikus sejtek aránya szignifikánsan nőtt, míg az aktív sejtciklusban lévő sejtek aránya lényegesen csökkent, a kontroll, vagyis a kezeletlen sejtekhez képest. A legtöbb apoptotikus, és a legkevesebb aktív sejtciklusban lévő sejtet akkor találtuk, amikor a sejteket 5,0 nmol/l koncentrációban kezeltük octreotiddal.

5.7. A szomatostatinpromoter-metiláció és reverzibilitásának vizsgálata

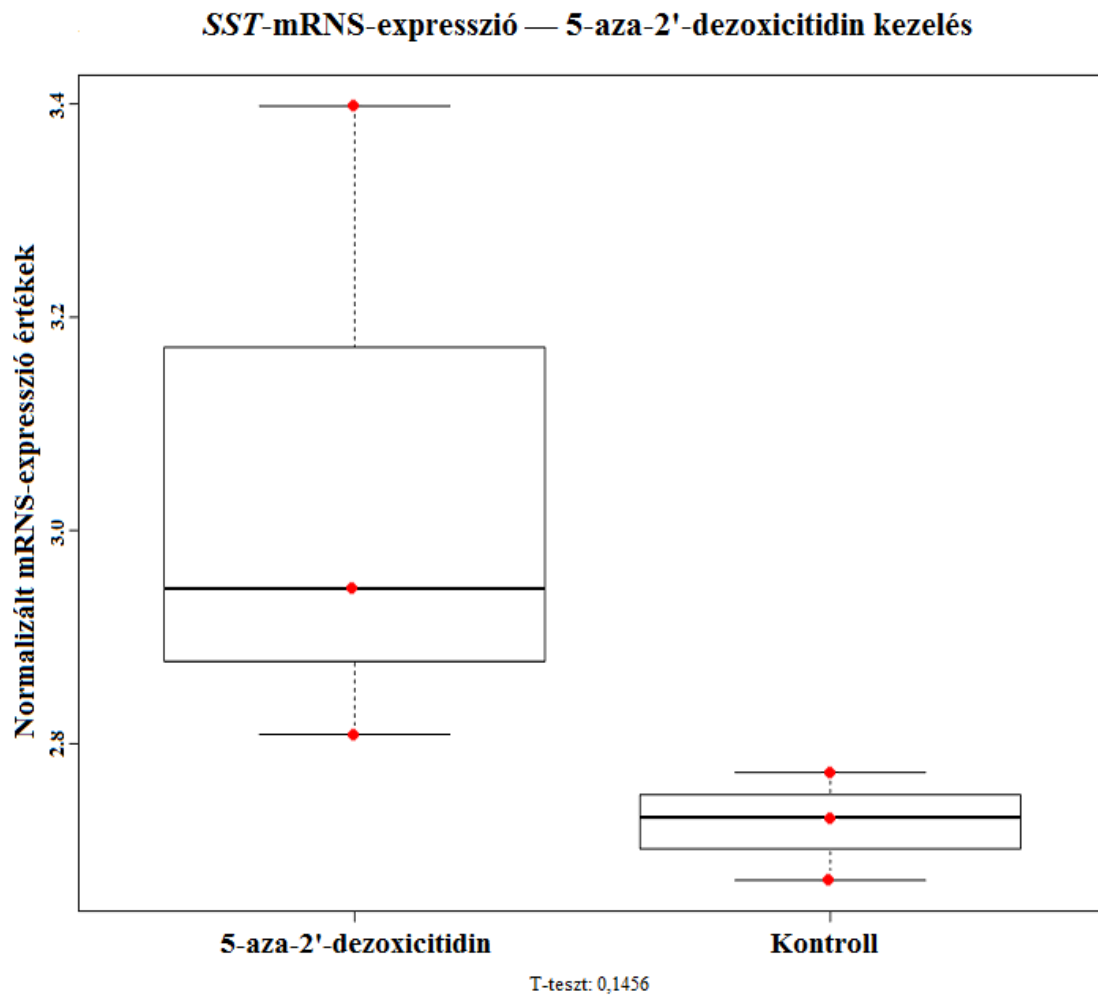
A szomatostatint kódoló gén promoterrégiójában a metiláció mértéke folyamatosan növekszik az öregedés és a karcinogenezis során. A legalacsonyabb metilációs arányt a fokozott, és jól szabályozott sejtosztódással jellemezhető gyermek mintákban, a legmagasabb metilációs arányt a daganatos mintákban találtuk. A szövettanilag ép gyermek és felnőtt mintákhoz képest szignifikánsan magasabb a promotermetiláció a tumoros mintacsoportban ($p < 0,05$) (18. ábra).



18. ábra: A metiláció vizsgálata a szomatosztatint kódoló gén promoterrégiójában, metilációspecifikus PCR segítségével.

Az *SST*-promoterrégiójának metilációját metilációspecifikus PCR array módszer segítségével határoztuk meg, normál gyermek (Gy), felnőtt (N) és daganatos (CRC) kolorektális biopsziás mintákon. A piros pontok az *SST*-promotermetiláció százalékban kifejezett értékét jelölik, a boxplotok a medián és szórás értékeket ábrázolják. A promotermetiláció növekszik az élettani öregedés és a karcinogenezis során, a legmagasabb metilációs arányt a karcinómás mintákban találtam.

A szomatosztatint kódoló gén promotermetilációjának reverzibilitását HT-29 sejtvonalon vizsgáltuk, demetiláló hatású 5-aza-2'-dezoxicitidin adását követően. Mérsékelt mRNS-expresszió növekedést észleltem 5-aza-2'-dezoxicitidin hatására, a kezeletlen kontrollcsoporthoz képest (19. ábra).



19. ábra: A szomatosztatin-mRNS-expresszió vizsgálata 5-aza-2'-dezoxicitidin kezelés hatására HT-29 sejtvonalon.

A szomatosztatin mRNS-expresszióját HT-29 sejtvonalon vizsgáltuk, demetiláló hatású 5-aza-2'-dezoxicitidinnel kezelt és kezeletlen kontrollsejteken, HGU133 Plus2.0 microarray módszerrel. A piros pontok a normalizált mRNS-expressziós értékeket, a boxplotok a medián és szórás értékeket ábrázolják. mRNS-szinten a szomatosztatin kifejeződése kissé magasabb az 5-aza-2'-dezoxicitidinnel kezelt sejtekben, mint a kezeletlen kontrollcsoportban.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. Az öregedő és daganatos vastag- és végbélhám sejtkinetikai eltérései; a proliferációt és apoptózist befolyásoló gének eltérő expressziója a kolorektális hám hiperproliferatív állapotaiban

Az öregedés során a sporadikus vastagbélrák incidenciája nő, ami a daganatos kórképek között az egyik vezető halálok a nyugati országokban [141]. A kolorektális karcinóma sejtkinetikai szempontból korlátlan sejtosztódással jellemezhető. Az egészséges hámmal szemben - ami 4-5 naponta megújul, fenntartva a szabályos kripta hámszerkezetet – CRC-ben a sejtproliferáció aránytalansága a meghatározó az apoptózishoz képest. Ezzel szemben a fiatalkori növekedés jól szabályozott sejtgyarapodással jellemezhető [33]. A tanulmány első felében a proliferatorikus és apoptotikus aktivitást vizsgáltam szövettanilag ép gyermek és felnőtt vastagbélhámiban, valamint adenómában és kolorektális karcinómában. A sejtosztódást és pusztulást befolyásoló gének mRNS-expresszióját is vizsgáltam microarray és RT-PCR módszerekkel. Az ép gyermek és daganatos mintákban fokozott proliferatorikus és csökkent apoptotikus aktivitást találtam. Az eredmények azt sugallják, hogy sejtkinetikai szempontból az élettani öregedés és a karcinogenezis hátterében ellentétes szabályozó mechanizmusok állhatnak. A daganatos sejtek számára a fokozott proliferatorikus aktivitás előnyt jelenthet a környező, előregedő sejtekhez képest.

A proliferatorikus aktivitás öregedés során bekövetkező változásait korábban állatmodellekben is vizsgálták [31,32]. Patkányokon végzett kísérletükben *Mandir és mtsai* a legintenzívebb hámregenerációt fiatal állatok vastagbélhámjában találták, és a szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a hámban bekövetkező drámai változás az emésztőrendszer fejlődésével, növekedésével hozható összefüggésbe. Ugyanakkor az emésztőrendszer normál öregedése során nem tapasztaltak jelentős változást a hám megújulásában [31]. Ezzel szemben egy az Egyesült Államokban végzett kutatás során a kísérleti állatok idősebb populációjának vastagbélhámjában fokozott mértékű sejtosztódást és csökkent apoptotikus aktivitást észleltek, ami összefüggésbe hozható az idősek körében gyakrabban előforduló sporadikus vastagbélrák kialakulásával [32].

A gyermek vastagbélhamban észlelt fokozott sejtproliferáció a vastagbél fiziológiás növekedésével hozható összefüggésbe, és a normális öregedés során a kriptahámsejtek megújulása lelassul. Tudomásunk szerint a proliferációt és apoptózist szabályozó gének kifejeződését nem vizsgálták korábban humán vastagbélhamban, gyermek és felnőtt daganatos mintákon egyaránt. Ezen gének tanulmányozása talán választ adhat arra a kérdésre, hogy miért fokozott és emellett jól szabályozott a sejtosztódás gyermekkorban, és ehhez képest mi magyarázza a fokozott, de kontrollálatlan sejtgyparapodást CRC-ben. mRNS-expressziós vizsgálatainkban azonosítottunk olyan proliferációt szabályozó géneket, amelyeknek a kifejeződése a gyermek és a daganatos mintákban is fokozott, az egészséges felnőtt mintákhoz képest. Ilyen gének például a *ciklin B1 (CCNB1)*, a *ciklin E1 (CCNE1)* és a *ciklin-dependens kináz 1 (CDK1)* (9. ábra). Ezek a génexpressziós eltérések részben magyarázhatják a sejtkinetikai megfigyeléseinket. A ciklin-dependens kinázok és a ciklinek igen lényeges szerepet töltenek be az eukarióta sejtek sejtciklusának szabályozásában és a sejtosztódásban. A CDK komplexek a nagymértékben konzervált szerin/treonin protein kinázok családjába tartozó molekulák, amelyek egy katalitikus CDK alegységből és egy aktiváló ciklin alegységből állnak. A különböző CDK-molekulák foszforiláció, vagy a ciklinek bekötődése révén aktiválódhatnak, és a sejtciklus más-más részét szabályozzák [142,143]. mRNS-expressziós vizsgálatainkban a *CCNB1*, *CCNE1* és *CDK1* fokozott expressziót mutatott a nagyobb proliferatorikus aktivitással jellemezhető gyermek és daganatos mintákban, az egészséges felnőtt mintákhoz képest. Továbbá a *ciklin D1 (CCND1)*, *CDK1* and *CDK6* expressziója szignifikánsan magasabb volt a kontrollálatlan sejtosztódással jellemezhető tumoros mintákban a gyermek mintákhoz képest (11. ábra). A ciklin D1-nek a sejtosztódás, a differenciáció és a sejt metabolizmusának regulációjában is fontos szerepe van. Ugyanakkor számos humán daganatban megfigyelték már a *CCND1* fokozott kifejeződését, ami azzal hozható összefüggésbe, hogy a sejtciklus G1 fázisában jelentős szabályozó szerepe van [144]. *Zhang és mtsainak* megfigyelése szerint a *CCND1* fokozott működése az emésztőrendszeri daganatok kialakulásában igen korai lépés [145]. *Sahl és mtsai* különböző ciklin-dependens kináz expresszióját vizsgálták humán vastagbeldaganatokban. Megállapították, hogy a CDK1, CDK2 és CDK6 aktivációja - amelyek egyébiránt foszforilálni képesek a retinoblasztóma fehérjét, ezzel a soron

következő G1-fázisba juttatva a sejtet – összefüggésbe hozható a humán kolorektális karcinogenezissel [146].

Számos szabályozó molekula ismert, amelyek gátolni képesek a ciklin-dependens kinázok működését. Ezeket a molekulákat ciklin-dependens kináz gátlóknak nevezzük. Jelen tanulmányban a ciklin-dependens kináz gátló 2B (*CDKN2B*) expresszióját is vizsgáltam mRNS-szinten, az öregedés és a karcinogenezis során a vastagbélben. A *CDKN2B* mint *MTS2*, ciklin-dependens kináz 4 és 6 kötő fehérje, illetve p15-INK4b (p15) is ismert. A *CDKN2B* gén a 9-es kromoszómán a *CDKN2A* közelében helyezkedik el, ez a kromoszómarégió pedig számos daganatban mutációt szenved. A gén által kódolt fehérje komplexet képez a CDK4 és CDK6 molekulákkal, ezzel gátolva a sejtosztódást, a sejtciklust. A microarray vizsgálat során a *CDKN2B* mérsékelt expresszióját találtam az egészséges gyermek vastagbél biopsziás mintákban a felnőttekhez képest, míg expressziócsökkenést figyeltem meg a tumoros mintákban (9. ábra). Korábbi tanulmányok is igazolták, hogy a *CDKN2B* tumorszuppresszorként viselkedhet és a TGF β által indukált sejtciklusleállás fontos végrehajtó molekulája lehet [147]. *Herman és mtsai* igazolták, hogy a *p15* promoterrégiójában bekövetkező hipermetiláció, mint géncsendesítési mechanizmus, daganatok kialakulásához vezethet [148]. Az irodalmi adatok alapján a ciklin-dependens kináz gátlók csökkent termelése hozzájárulhat a kontrollálatlan sejtosztódáshoz kolorektális karcinómában.

Az immunhisztokémiai vizsgálat során mérsékelt apoptotikus aktivitást észleltünk a gyermek mintákban a felnőttekhez képest, ugyanakkor drámai csökkenést tapasztaltunk az adenóma-karcinóma szekvencia során (8C. ábra). Az apoptózist indukáló és gátló gének mRNS-expressziós vizsgálata során azonosítottunk olyan géneket, amelyek csökkenő kifejeződést mutattak a karcinogenezis során, és a szöveti szinten látott eltérést magyarázhatják. Ilyen gének többek között az *ACVR1B*, *TNFSF10*, *DYRK2*, *SOCS3*, *IFI6* és *SERPINB9*. Az immunhisztokémiai vizsgálat további eredménye, hogy a proliferatorikus aktivitás szignifikánsan csökken az élettani öregedés során a vastagbélhamban, ugyanakkor a felnőtt ép és adenóma minták között nem találtam lényeges eltérést e tekintetben (8A. és 8B. ábra). Ezzel szemben adenómában jelentősen csökken az apoptotikus aktivitás (8C. ábra), ami arra enged következtetni, hogy az adenóma-karcinóma szekvencia kezdeti stádiumában az apoptotikus aktivitás csökkenése előbb következik be, és adenómában a sejtosztódás és pusztulás közötti aránytalanság

kialakulásában elsődleges szerepe lehet. Kolorektális karcinómában a fokozott sejtosztódás és a csökkent mértékű apoptózis már egyaránt hozzájárul a kontrollálatlan sejtburjánzáshoz.

Génexpressziós vizsgálati eredményeinket szerettem volna összevetni más munkacsoportok eredményeivel is, hogy az élettani öregedés sejtproliferációt és apoptózist szabályozó gének kifejeződésére gyakorolt hatását pontosabban elemezhessem, azonban tudomásom szerint ez volt az első olyan tanulmány, amelyben gyermekektől vett vastagbél biopsziás mintákat vizsgáltak. Gyermekeknél a klinikai gyakorlatban kolonoszkópiás vizsgálat lényegesen ritkábban történik, mint a felnőtt pácienseknél. A beavatkozást megelőzően számos, kevésbé invazív vizsgálatot végeznek, amelyek a panaszok és tünetek hátterében álló betegségeket feltárhatják, így a gyermekeknél tükrözésre sok esetben már nem kerül sor. Amennyiben az előzetes vizsgálatok nem hoznak eredményt, és a tünetek alapján (például krónikus hasmenés, tápcsatornai vérzés, gyulladáisos bélbetegség gyanúja), továbbra is fennáll a tápcsatornát érintő betegség gyanúja, akkor kerülhet sor - döntően altatásban - a kolonoszkópiára. A vastagbéltükrözés az esetek jelentős részében a makroszkópos megfigyelés és a szövettani mintavétel segítségével a kolorektumot érintő betegségeket felfedi. Mivel gyermeknél lényegesen kevesebb kolonoszkópia történik, mint felnőtteknél, és ott is sok esetben a panaszokat, tüneteket magyarázó eltérést találunk, ezért azoknak a gyermek mintáknak a száma, amit az élettani öregedés tanulmányozásához felhasználhattam, így makroszkóposan és mikroszkóposan is ép, igen korlátozott.

6.2. A kolorektális szomatosztatintermelés megváltozása az élettani öregedés és a karcinogenezis során

Az emésztőrendszeri hormonokat (szomatosztatin,olecisztokinin (CCK), gastrin, bombesin (BBS)/gastrin-releasing peptide (GRP), neurotensin (NT), peptid YY (PYY), glucagon-like peptide-2 (GLP-2)) endokrin sejtek termelik, amelyek a tápcsatornát bélelő hámokban és a hasnyálmirigyben helyezkednek el. Ezek a kémiai hírvivők szabályozzák a gasztrointesztinális szekréciót, emésztést, felszívást, motilitást és sejtosztódást. A szomatosztatin döntően gátló hatású szabályozó peptid („universal switch-off hormone”), amely a normál és a daganatos szövetben egyaránt képes gátolni a

sejtosztódást. A szomatosztatinnak tehát endokrin és autokrin/parakrin hatása is van, valamint sejtfelszíni receptoraihoz (SSTR1-5) kötődve számos jelátviteli út működését befolyásolja [149]. A szomatosztatin emésztőrendszeri hatásai miatt a szomatosztatinanalógok hatékonyan alkalmazhatóak nem daganatos kórképekben, mint például heveny várixvérzés, dumping szindróma, illetve a krónikus hasmenés és az bél pseudoobstructio bizonyos eseteinek kezelésében [93].

Mivel jelentős sejtkinetikai különbségeket tapasztaltam a szövettanilag ép gyermek, felnőtt és kolorektális karcinóma minták között, továbbá jól ismert, hogy a szomatosztatin nagy mennyiségben termelődik az emésztőrendszeri hámban és gátolja a sejtosztódást, ezért munkám második felében tanulmányoztam, hogy hogyan változik a szomatosztatintermelés mRNS- és fehérjeszinten a vastag- és végbélben, az élettani öregedés és a karcinogenezis során. Az mRNS-expressziós vizsgálatok (microarray és RT-PCR) eredményei szerint a fiatal és az idős normálminták között nincs jelentős különbség az *SST* kifejeződése szempontjából, ugyanakkor kolorektális karcinómában jelentősen csökken az *SST*-expresszió (13., 14A., 14B. és 14C. ábra). Ezt az eredményt az immunhisztokémiai vizsgálat is megerősítette, ugyanis a különböző életkorú páciensektől származó, szövettanilag ép kolorektális hámban nem volt jelentős eltérés a szomatosztatint termelő sejtek arányában, míg a karcinómákban csak elvétve találtam szomatosztatint termelő sejteket (15. és 16. ábra). Megfigyeléseink alapján az antiproliferatív hatású szomatosztatin lokális termelésének jelentős mértékű csökkenése hozzájárulhat a fokozott és szabályozatlan sejtosztódás kialakulásához kolorektális karcinómában. Továbbá megerősítették annak lehetőségét, hogy a sporadikus CRC kezelésében esetleg helyet kaphatnak a neuroendokrin daganatok kezelésében már hatékonyan alkalmazott szomatosztatinanalógok.

Az utóbbi években több klinikai tanulmányban vizsgálták a szomatosztatinanalógok kedvező hatását nem neuroendokrin eredetű, emésztőrendszeri daganatokban. Kemoterápiás kezelésre nem reagáló, gyomorrákban szenvedő betegek körében octreotid adása jelentősen javította a túlélést a legjobb támogató kezelésben (best supportiv care) részesülő betegekhez képest [125]. Az eddigi vizsgálatok alapján a hepatocelluláris karcinóma (HCC) kezelésében a szomatosztatinanalógok kedvező hatása nem egyértelmű. Bizonyos esetekben octreotid adása javította az átlagos túlélési időt a kezeletlen betegcsoporthoz képest [129,150]. Egy későbbiekben végzett, nagyobb

beteganyagot vizsgáló tanulmányban azonban hosszú hatású octreotid adása nem jelentett túlélési előnyt a placebo adásához képest előrehaladott hepatocelluláris karcinóma esetében [151]. Hasnyálmirigy eredetű, nem rezekálható, duktális adenokarcinóma fennállásakor, amennyiben a tamoxifenkezelést kis dózisu octreotiddal egészítették ki, akkor az átlagos túlélési idő növekedett a kezeletlen csoporthoz képest [152]. Összefoglalva az adatokat, emésztőrendszeri daganatok esetében az octreotid alkalmazása nem volt minden esetben egyértelműen kedvező hatással a tumorprogressziót vagy a túlélést tekintve, ugyanakkor bizonyos esetben a betegek életminőségét jelentősen javította [153].

Az in vivo és in vitro tanulmányokat követően a 80-as években kezdték vizsgálni a szomatosztatinanalógok hatását a kolorektális tumorok kezelésében. *Savage és mtsai* próbatanulmányukban hosszú hatású szomatosztatinanalógot (SMS 201-995) adtak négy, előrehaladott vastagbélrákban szenvedő betegnek, de nem találtak bizonyítékot arra, hogy az analóg adása hatással lenne a tumornövekedésre [154]. Egy II-es fázisú klinikai vizsgálatban metasztatizáló vastagbélrákban szenvedő betegeknek adtak napi három alkalommal subcutan Sandostatint. Három-kilenc hónap elteltével mindössze négy beteg állapota stabilizálódott, a többi beteg esetében a daganat progressziója volt megfigyelhető. Ugyanakkor említésre méltó, hogy mellékhatást egyetlen esetben sem figyeltek meg, és a legtöbb beteg átmeneti szubjektív javulást élt meg a fájdalom csökkenése miatt [155]. *Cascinu és mtsai* az octreotid tumorelles hatását vizsgálták, kemoterápiás kezelésre nem reagáló, vastag- és végbélrákban szenvedő betegekben, a legjobb támogató kezelés hatásával összehasonlítva. A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a szomatosztatinanalóg adása javította a túlélést előrehaladott CRC-ben [125]. Egy randomizált, kettős vak, placebo-kontrollált, III-as fázisú klinikai vizsgálatban a napi három alkalommal, egyenként 150 mikrogramm dózisban, subcutan adott octreotid nem tűnt hatékonynak aszimptomatikus, metasztatizáló kolorektális karcinómában szenvedő betegek kezelésében [126]. Összefoglalva az előzetes klinikai vizsgálatok eredményeit elmondható, hogy a szomatosztatinanalógok kedvező hatása nem egyértelmű kolorektális daganatban szenvedő betegek kezelésében, ugyanakkor inkurábilis, végstádiumú emésztőrendszeri daganat fennállásakor komolyabb mellékhatás nélkül csökkentheti a kellemetlen tüneteket [156]. Az irodalmi adatokban

látott ellentmondás nagy valószínűséggel az eltérő metodikai és klinikai vizsgálómódszereknek köszönhető [157].

A szomatosztatinanalógok vastagbélrákra gyakorolt hatását receptor szinten is vizsgálták a kutatók. A szomatosztatin és analógjai antiproliferatív hatásukat az öt ismert szomatosztatinreceptor közül elsősorban az SSTR2 és SSTR5 közreműködésével fejtik ki. *Buscail és mtsai* igazolták, hogy az SSTR2 expressziója jelentősen csökken előrehaladott CRC-ben és a metasztázisokban, ami magyarázatul szolgálhat az analógok hatástalanságára metasztatizáló kolorektális karcinómában [101]. *Miller és mtsai* kimutatták, hogy a normál és a daganatos vastagbél szövetben kis affinitású szomatosztatinreceptorok találhatóak. Ezeknek a kis affinitású receptoroknak nagy valószínűséggel a vastag- és végbélhamban lokálisan termelődő szomatosztatin szabályozó hatásának közvetítésében van szerepük, sokkal inkább parakrin és autokrin módon, és nem valódi endokrin mechanizmus alapján. Éppen ezért a keringésben kis koncentrációban jelen lévő szomatosztatinnak és analógjainak lényegesen kisebb lehet az antiproliferatív hatása a kolorektális hámban, a lokálisan termelődő szomatosztatinhoz képest [158]. Ezen eredmények alapján a szomatosztatinanalógok hatékonyságát alapvetően befolyásolja az analóg keringési felezési ideje, valamint az, hogy a gyógyszer a vastagbélhamban lokálisan milyen koncentrációt ér el.

Saját kísérletünkben a szomatosztatinanalóg octreotid sejtosztódást befolyásoló hatását vizsgáltam Caco-2 humán epitheliális adenokarcinóma sejtvonalon. Az octreotid adását követően 48 órával az apoptotikus sejtek aránya lényegesen nőtt, míg a G1+S+G2+M fázisban lévő sejtek aránya szignifikánsan csökkent, koncentrációfüggő módon. Vagyis az octreotid jelentősen csökkentette a kolorektális adenokarcinómasejtek sejtosztódásának mértékét. A szomatosztatinanalógok antiproliferatív hatását számos, nem neuroendokrin eredetű daganatos sejtvonalakon vizsgálták. SST-analógok adása kolorektális, gyomor, hasnyálmirigy, emlő, méhnyak, tüdő és prosztata eredetű daganatos sejtvonalakon is hatékonyan gátolta a sejtosztódást [118]. Korábban *Dy és mtsai* szintén arra a következtetésre jutottak, hogy a hosszú hatású SMS 201.995 szomatosztatinanalógnak daganatellenes (direkt antitumor) hatása van humán colonkarcinóma-sejtvonalon [159]. *Colucci és mtsai* kimutatták, hogy a szomatosztatin az SSTR3 és SSTR5 receptorokhoz kötődve csökkenti a COX-2-termelést humán colonkarcinóma-sejtekben, ami hozzájárulhat az SST sejtosztódást gátló hatásához [160].

A DNS-promotermetiláció egy epigenetikai csendesítési mechanizmus, ami a DNS szerkezetének megváltozása nélkül szabályozza a génexpressziót. A promoter-hipermetiláció következtében a transzkripciós faktorok nem tudnak kapcsolatba lépni a DNS-sel, ezzel csökkentve a génkifejeződést. Számos genetikai változás ismert (mint például a pontmutáció, inszercióval vagy delécióval járó mutációk), amelyek összefüggésbe hozhatók a kolorektális karcinogenezissel. Jól ismert, hogy az *APC*, *KRAS*, *p53* és *SMAD4* géneket érintő mutációk szerepet játszanak a vastag- és végbélrák kialakulásában. Az utóbbi években ugyanakkor fény derült arra is, hogy a kolorektális rákok kialakulásának hátterében epigenetikai változások is állhatnak [161,162]. Jelen tanulmányunkban igazoltuk, hogy a karcinogenezis során csökkenő *SST*-expresszióval párhuzamosan fokozódik a promotermetiláció. Továbbá kolorektális adenokarcinóma sejtek demetiláló hatású 5-aza-2'-deoxicitidinnel történő kezelését követően az *SST*-kifejeződés mérsékelten fokozható. Az utóbbi évtizedben számos emésztőrendszeri daganatban igazolták az *SST*-promoter-hipermetilációt. *Mori és mtsai* szintén kimutatták ezt a géncsendesítési mechanizmust CRC-ben, és feltételezésük szerint a gén inaktivációja, és a géntermék sejtosztódást gátló hatásának kiesése fontos lépés lehet a kolorektális tumorgenezisben. Emellett sejt kultúra-kísérletben 5-aza-2'-deoxicitidin adását követően az *SST* mRNS-expressziójának fokozódását is igazolták [163]. A későbbiekben géncsendesítésű hatású *SST*-promotermetilációt igazoltak humán nyelőcső-karcinómában és Barrett-nyelőcső talaján kialakuló adenokarcinómában is, valamint demetiláló ágens adását követően az *SST*-expresszió nyelőcső adenokarcinóma sejtvonalban szintén fokozódott [164]. A szomatosztatin-promoter-hipermetiláció mRNS- és fehérjeszinten is csökkenti az *SST*-kifejeződést gyomorrákban, és gyomor eredetű sejtvonal 5-aza-2'-deoxicitidin és trichostatin-A kezelését követően csökken a promotermetiláció és fokozódik a szomatosztatintermelés [165,166].

7. KÖVETKEZTETÉSEK

7.1. Következtetések

A tanulmány első részében a kolorektális hám proliferatorikus és apoptotikus aktivitását vizsgáltam az élettani öregedés és a karcinogenezis során. Tudomásunk szerint mRNS- és fehérjeszinten első alkalommal vizsgáltuk és hasonlítottuk össze a gyermek mintákat egészséges felnőtt és daganatos mintákkal a fent említett sejtkinetikai folyamatokban. Ezek alapján arra a következtetésre jutottam, hogy a gyermek és a daganatos mintákban fokozott a sejtosztódás és csökkent mértékű az apoptózis, továbbá a legnagyobb sejtkinetikai változást a tumoros mintákban találtam. Ugyanakkor alapvető különbség a gyermek és a daganatos vastagbélhamban tapasztalt fokozott sejtgyarapodás között, hogy míg az első esetben ez jól szabályozott, kiegyensúlyozott folyamat, ami a fiziológiás növekedéshez lehet szükséges, addig a karcinómában szabályozatlan és kontrollálatlan a sejtosztódás. Eredményeink szerint ennek a megfigyelésnek a hátterében az állhat, hogy bizonyos proliferációt és apoptózist szabályozó gének expressziója szignifikánsan eltér a gyermek és a daganatos mintákban.

A szomatosztatin talán az egyik legfontosabb természetben is előforduló, antiproliferatív hatású hormon. Tudomásom szerint, vizsgálatainkban első alkalommal tanulmányoztuk mRNS- és fehérjeszinten a kolorektális hám lokális szomatosztatintermelését szövettanilag ép gyermek, felnőtt és daganatos mintákban. Az eredmények alapján arra következtethetünk, hogy az élettani öregedés során nem változik lényegesen a szomatosztatintermelés a vastagbélhamban, ugyanakkor jelentősen csökkent kolorektális karcinómában. CRC-ben a lokális szomatosztatintermelés hiánya hozzájárulhat a fokozott és szabályozatlan sejtosztódáshoz. Ezzel a megfigyeléssel összhangban, sejtkultúra kísérletünkben a szomatosztatinanalóg octreotid hatékonyan gátolta a sejtosztódást és fokozta a sejtpusztulást. A daganatos vastagbélhamban a csökkent szomatosztatintermelésre egy lehetséges magyarázat a szomatosztatint kódoló gén promoterrégiójában észlelt hipermetiláció. A szomatosztatinanalógok és demetiláló hatású vegyületek további vizsgálata szükséges a sporadikus vastag- és végbélrák kezelésében betöltött lehetséges szerepükkel kapcsolatban.

7.2. Legfontosabb új megfigyelések és megállapítások

- A szövettanilag ép gyermek vastagbélhámában és kolorektális karcinómában fokozott sejtproliferációt és csökkent mértékű apoptózist figyeltem meg, az egészséges felnőtt hámbhoz képest, ugyanakkor sejtkinetikai szempontból alapvető különbség, hogy a gyermek hámban szabályozott és kiegyensúlyozott a sejtosztódás, míg a karcinómában szabályozatlan.
- Affymetrix oligonukleotid microarray segítségével 8 proliferációt és 11 apoptózist befolyásoló gén esetében igazoltam, hogy az élettani öregedés és a karcinogenezis során megváltozik azok expressziója. Szintén microarray rendszer alkalmazásával azonosítottam olyan proliferációt és apoptózist szabályozó géneket, amelyek mRNS-expressziója a normál gyermek és a daganatos mintákban jelentősen eltér, ami magyarázhatja a két csoport között észlelt sejtkinetikai eltérést. A vizsgálati eredményeket RT-PCR módszerrel validáltam.
- Oligonukleotid microarray és RT-PCR módszerrel, függő és független mintákon is igazoltam, hogy az élettani öregedés során nem változik jelentősen a szomatosztatintermelés a vastagbélben, ugyanakkor lényegesen csökkent kolorektális karcinómában. Fehérjeszinten a tumoros vastagbélhámában lényegesen kevesebb SST-termelő sejtet azonosítottam, mint a szövettanilag ép hámban. A lokális szomatosztatintermelés jelentős csökkenése hozzájárulhat a fokozott mértékű, szabályozatlan sejtosztódás kialakulásához kolorektális daganatokban.
- Caco-2 epitheliális adenokarcinóma sejtvonalon igazoltam, hogy a szomatosztatinanalóg octreotid jelentősen csökkenti az osztódó és növeli az apoptotikus sejtek arányát, koncentráció függő módon.
- Metilációspecifikus PCR-vizsgálattal kimutattuk, hogy a szomatosztatint kódoló gén promoterrégiójában fokozódik a metiláció az öregedés és a karcinogenezis során. A legmagasabb metilációs arányt a karcinómás mintákban találtam. A promotermetiláció egy lehetséges epigenetikai magyarázat a lokális szomatosztatintermelés jelentős mértékű csökkenésére kolorektális karcinómában.
- HT-29 adenokarcinóma sejtek demetiláló hatású 5-aza-2'-deoxicitidinnel történő kezelését követően a szomatosztatint kódoló gén mRNS-expressziója mérsékelten fokozódott.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

8.1. Összefoglalás

A sporadikus kolorektális karcinóma kialakulása többlépcsős folyamat, morbiditása és mortalitása szoros összefüggést mutat az öregedéssel. Munkám első részében alapvető sejtkinetikai paraméterek, a proliferációs és apoptotikus aktivitást vizsgáltam szövettanilag ép gyermek és felnőtt kolorektális hámban az élettani öregedés során, valamint az adenóma-karcinóma szekvencia egyes stádiumaiban. Továbbá tanulmányoztam a sejtosztódást és pusztulást szabályozó gének mRNS-expresszióját normál gyermek, felnőtt és karcinóma mintákon. Megállapítottam, hogy a fiatal és a tumoros minták fokozott sejtosztódással és csökkent apoptotikus aktivitással jellemezhetőek a felnőtt mintákhoz képest, továbbá karcinómában a legintenzívebb és szabályozatlan a sejtosztódás. Nyolc sejtosztódást (például *CCNE1*, *CDK1*, *CDKN2B*), és 11 apoptózist szabályozó gént (például *IFI6*, *SERPINB9*, *SST*) azonosítottam, amelyek mRNS-expressziója az öregedés és a karcinogenezis során is változik. Továbbá 8 proliferációt (például *CCND1*, *CDK6*) és 26 apoptózist reguláló gén (például *SFRP1*, *SOCS3*, *SST*) kifejeződése mutatott eltérést a gyermek és tumoros minták között. Ezek a génexpressziós különbségek magyarázhatják a szöveti szinten megfigyelt sejtkinetikai különbségeket. Munkám második felében a sejtosztódást gátló és apoptózist indukáló hatású szomatostatintermelését vizsgáltam a vastagbélben, mRNS- és fehérjeszinten, az öregedés és a kolorektális karcinogenezis során. Biopsziás mintákon tanulmányoztam a metiláció mértékét a szomatostatint kódoló gén promoterrégiójában, valamint demetiláló kezelés és a szomatostatinanalog octreotid hatását vizsgáltam kolorektális adenokarcinóma sejtvonalakon. mRNS- és fehérjeszinten is igazoltam, hogy a lokális szomatostatintermelés nem változik az élettani öregedés során a vastagbélben, ugyanakkor jelentősen csökken karcinómában ($p < 0,05$). Caco-2 sejtvonal octreotid kezelését követően jelentősen csökkent az osztódó és nőtt az apoptotikus sejtek aránya. A promotermetiláció növekszik az élettani öregedés és a karcinogenezis során, a legmagasabb metilációs arányt a karcinómás mintákban találtam. HT-29 sejtvonal demetiláló hatású 5-aza-2'-deoxicitidinnel történő kezelését követően a szomatostatint mRNS-expressziója mérsékelten emelkedett a kezeletlen kontrollcsoportéhoz képest.

8.2. Summary

Colorectal carcinogenesis is a multi-stage process, and the morbidity and mortality of colorectal cancer are closely related to aging. In my PhD thesis I investigated basic cell kinetic parameters, the proliferative and apoptotic activity in histologically intact colonic biopsy samples from children and adults during normal aging, and in certain stages of colorectal adenoma-carcinoma sequence. Furthermore I analyzed the mRNA expression of proliferation- and apoptosis-regulating genes in healthy children, adult and colorectal cancer samples. I have established that young and tumorous colonic epithelium can be characterized by increased proliferative and decreased apoptotic activity compared to normal adult samples, and the cell proliferation is the most intense and uncontrolled in cancer. I have identified 8 proliferation-regulating (e.g. *CCNE1*, *CDK1*, *CDKN2B*) and 11 apoptosis-regulating genes (e.g. *IFI6*, *SERPINB9*, *SST*) with altering mRNA expression during aging and carcinogenesis. Eight proliferation-associated genes (e.g. *CCND1*, *CDK6*) and 26 apoptosis-regulating genes (e.g. *SFRP1*, *SOCS3*, *SST*) were differently expressed between juvenile and cancer groups. Identified mRNA expression alterations may explain the observed cell kinetic differences. Somatostatin is a regulatory-inhibitory peptide with anti-proliferative and pro-apoptotic effects. I investigated the colonic somatostatin production during normal aging and carcinogenesis. I have established both on mRNA and protein levels that somatostatin production do not alter during normal aging but significantly decreased in colorectal cancer ($p < 0.05$). I examined the effects of somatostatin analogue octreotide on human colorectal adenocarcinoma cell line (Caco-2). Octreotide significantly increased the proportion of apoptotic Caco-2 cells, while the proportion of cells in other cell cycle phases (G1, S, G2, M) was significantly lower. Since promoter hypermethylation can epigenetically alter gene transcription both during aging and carcinogenesis, I tested the methylation status of somatostatin gene in biopsied samples, and the effect of demethylation treatment in HT-29 cell line. I have evinced, that promoter DNA methylation of somatostatin gene shows continuous increase during aging and carcinogenesis, and the highest methylation status was detected in cancer. I have observed moderately increased somatostatin expression in demethylating agent-treated HT-29 cells compared to the controls.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Drozdowski L, Thomson AB. (2006) Aging and the intestine. *World J Gastroenterol*, 12: 7578-7584.
2. Fulop T, Larbi A, Witkowski JM, McElhaney J, Loeb M, Mitnitski A, Pawelec G. (2010) Aging, frailty and age-related diseases. *Biogerontology*, 11: 547-563.
3. Bhutto A, Morley JE. (2008) The clinical significance of gastrointestinal changes with aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 11: 651-660.
4. Murphy C, Schubert CR, Cruickshanks KJ, Klein BE, Klein R, Nondahl DM. (2002) Prevalence of olfactory impairment in older adults. *JAMA*, 288: 2307-2312.
5. Djordjevic J, Jones-Gotman M, De Sousa K, Chertkow H. (2008) Olfaction in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 29: 693-706.
6. Chen PH, Golub JS, Hapner ER, Johns MM. (2009) Prevalence of perceived dysphagia and quality-of-life impairment in a geriatric population. *Dysphagia*, 24: 1-6.
7. Tack J, Vantrappen G. (1997) The aging oesophagus. *Gut*, 41: 422-424.
8. Brogna A, Lorenzo M, Catalano F, Bucceri AM, Malaguarnera M, Muratore LA, Travali S. (2006) Radioisotopic assessment of gastric emptying of solids in elderly subjects. *Aging Clin Exp Res*, 18: 493-496.
9. Horowitz M, Maddern GJ, Chatterton BE, Collins PJ, Harding PE, Shearman DJ. (1984) Changes in gastric emptying rates with age. *Clin Sci (Lond)*, 67: 213-218.
10. Shimamoto C, Hirata I, Hiraike Y, Takeuchi N, Nomura T, Katsu K. (2002) Evaluation of gastric motor activity in the elderly by electrogastronomy and the (13)C-acetate breath test. *Gerontology*, 48: 381-386.
11. O'Donovan D, Hausken T, Lei Y, Russo A, Keogh J, Horowitz M, Jones KL. (2005) Effect of aging on transpyloric flow, gastric emptying, and intragastric distribution in healthy humans--impact on glycemia. *Dig Dis Sci*, 50: 671-676.
12. Tariq SH. (2007) Constipation in long-term care. *J Am Med Dir Assoc*, 8: 209-218.
13. Tariq SH, Morley JE, Prather CM. (2003) Fecal incontinence in the elderly patient. *Am J Med*, 115: 217-227.
14. Hurwitz A, Brady DA, Schaal SE, Samloff IM, Dedon J, Ruhl CE. (1997) Gastric acidity in older adults. *JAMA*, 278: 659-662.

15. Pereira SP, Gainsborough N, Dowling RH. (1998) Drug-induced hypochlorhydria causes high duodenal bacterial counts in the elderly. *Aliment Pharmacol Ther*, 12: 99-104.
16. Haruma K, Kamada T, Kawaguchi H, Okamoto S, Yoshihara M, Sumii K, Inoue M, Kishimoto S, Kajiyama G, Miyoshi A. (2000) Effect of age and *Helicobacter pylori* infection on gastric acid secretion. *J Gastroenterol Hepatol*, 15: 277-283.
17. Parlesak A, Klein B, Schecher K, Bode JC, Bode C. (2003) Prevalence of small bowel bacterial overgrowth and its association with nutrition intake in nonhospitalized older adults. *J Am Geriatr Soc*, 51: 768-773.
18. Zoli M, Magalotti D, Bianchi G, Gueli C, Orlandini C, Grimaldi M, Marchesini G. (1999) Total and functional hepatic blood flow decrease in parallel with ageing. *Age Ageing*, 28: 29-33.
19. Cao SX, Dhahbi JM, Mote PL, Spindler SR. (2001) Genomic profiling of short- and long-term caloric restriction effects in the liver of aging mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 10630-10635.
20. Cotreau MM, von Moltke LL, Greenblatt DJ. (2005) The influence of age and sex on the clearance of cytochrome P450 3A substrates. *Clin Pharmacokinet*, 44: 33-60.
21. Anand BS, Vij JC, Mac HS, Chowdhury V, Kumar A. (1989) Effect of aging on the pancreatic ducts: a study based on endoscopic retrograde pancreatography. *Gastrointest Endosc*, 35: 210-213.
22. Laugier R, Bernard JP, Berthezene P, Dupuy P. (1991) Changes in pancreatic exocrine secretion with age: pancreatic exocrine secretion does decrease in the elderly. *Digestion*, 50: 202-211.
23. Anderson GJ, Darshan D, Wilkins SJ, Frazer DM. (2007) Regulation of systemic iron homeostasis: how the body responds to changes in iron demand. *Biometals*, 20: 665-674.
24. MacIntosh CG, Morley JE, Wishart J, Morris H, Jansen JB, Horowitz M, Chapman IM. (2001) Effect of exogenous cholecystokinin (CCK)-8 on food intake and plasma CCK, leptin, and insulin concentrations in older and young adults: evidence for increased CCK activity as a cause of the anorexia of aging. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 5830-5837.
25. Morley JE. (2001) Anorexia, sarcopenia, and aging. *Nutrition*, 17: 660-663.

26. Silver AJ, Morley JE. (1992) Role of the opioid system in the hypodipsia associated with aging. *J Am Geriatr Soc*, 40: 556-560.
27. Roberts SB, Fuss P, Heyman MB, Evans WJ, Tsay R, Rasmussen H, Fiatarone M, Cortiella J, Dallal GE, Young VR. (1994) Control of food intake in older men. *JAMA*, 272: 1601-1606.
28. Meier JM, Alavi A, Iruvuri S, Alzeair S, Parker R, Houseni M, Hernandez-Pampaloni M, Mong A, Torigian DA. (2007) Assessment of age-related changes in abdominal organ structure and function with computed tomography and positron emission tomography. *Semin Nucl Med*, 37: 154-172.
29. Baum B, Meneses F, Kleinschmidt S, Nolte I, Hewicker-Trautwein M. (2007) Age-related histomorphologic changes in the canine gastrointestinal tract: a histologic and immunohistologic study. *World J Gastroenterol*, 13: 152-157.
30. Salles N. (2007) Basic mechanisms of the aging gastrointestinal tract. *Dig Dis*, 25: 112-117.
31. Mandir N, FitzGerald AJ, Goodlad RA. (2005) Differences in the effects of age on intestinal proliferation, crypt fission and apoptosis on the small intestine and the colon of the rat. *Int J Exp Pathol*, 86: 125-130.
32. Xiao ZQ, Moragoda L, Jaszewski R, Hatfield JA, Fligiel SE, Majumdar AP. (2001) Aging is associated with increased proliferation and decreased apoptosis in the colonic mucosa. *Mech Ageing Dev*, 122: 1849-1864.
33. Lee HM, Greeley GH, Englander EW. (2000) Effects of aging on expression of genes involved in regulation of proliferation and apoptosis in the colonic epithelium. *Mech Ageing Dev*, 115: 139-155.
34. Mabbott NA, Kobayashi A, Sehgal A, Bradford BM, Pattison M, Donaldson DS. (2014) Aging and the mucosal immune system in the intestine. *Biogerontology*.
35. Sipos F, Leiszter K, Tulassay Z. (2011) Effect of ageing on colonic mucosal regeneration. *World J Gastroenterol*, 17: 2981-2986.
36. Rosenstiel P, Derer S, Till A, Häsler R, Eberstein H, Bewig B, Nikolaus S, Nebel A, Schreiber S. (2008) Systematic expression profiling of innate immune genes defines a complex pattern of immunosenescence in peripheral and intestinal leukocytes. *Genes Immun*, 9: 103-114.

37. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61: 69-90.
38. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. (2014) Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*, 64: 9-29.
39. Brenner H, Kloor M, Pox CP. (2014) Colorectal cancer. *Lancet*, 383: 1490-1502.
40. Allemani C, Rachet B, Weir HK, Richardson LC, Lepage C, Faivre J, Gatta G, Capocaccia R, Sant M, Baili P, Lombardo C, Aareleid T, Ardanaz E, Bielska-Lasota M, Bolick S, Cress R, Elferink M, Fulton JP, Galceran J, Gózd S, Hakulinen T, Primic-Zakelj M, Rachtan J, Diba CS, Sánchez MJ, Schymura MJ, Shen T, Tagliabue G, Tumino R, Vercelli M, Wolf HJ, Wu XC, Coleman MP. (2013) Colorectal cancer survival in the USA and Europe: a CONCORD high-resolution study. *BMJ Open*, 3: e003055.
41. Ahmed S, Howel D, Debrah S, Group) NNRCCA. (2014) The influence of age on the outcome of treatment of elderly patients with colorectal cancer. *J Geriatr Oncol*, 5: 133-140.
42. Neugut AI, Jacobson JS, De Vivo I. (1993) Epidemiology of colorectal adenomatous polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2: 159-176.
43. Yamaji Y, Mitsushima T, Ikuma H, Watabe H, Okamoto M, Yoshida H, Kawabe T, Wada R, Omata M. (2006) Right-side shift of colorectal adenomas with aging. *Gastrointest Endosc*, 63: 453-458; quiz 464.
44. Ikeda Y, Koyanagi N, Mori M, Ezaki T, Toyomasu T, Minagawa S, Tateishi H, Sugimachi K. (1996) Increased incidence of proximal colon cancer in the elderly. *J Clin Gastroenterol*, 23: 105-108.
45. Rozen P, Liphshitz I, Barchana M. (2012) Changing epidemiology of colorectal cancer makes screening sigmoidoscopy less useful for identifying carriers of colorectal neoplasms. *Dig Dis Sci*, 57: 2203-2212.
46. Arai T, Takubo K. (2007) Clinicopathological and molecular characteristics of gastric and colorectal carcinomas in the elderly. *Pathol Int*, 57: 303-314.
47. Gerharz CD, Gabbert H, Krummel F. (1987) Age-dependent shift-to-the-right in the localization of colorectal adenomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 411: 591-598.

48. Kemppainen M, Rähä I, Rajala T, Sourander L. (1993) Characteristics of colorectal cancer in elderly patients. *Gerontology*, 39: 222-227.
49. Arai T, Takubo K, Sawabe M, Esaki Y. (2000) Pathologic characteristics of colorectal cancer in the elderly: a retrospective study of 947 surgical cases. *J Clin Gastroenterol*, 31: 67-72.
50. Kotake K, Koyama Y, Nasu J, Fukutomi T, Yamaguchi N. (1995) Relation of family history of cancer and environmental factors to the risk of colorectal cancer: a case-control study. *Jpn J Clin Oncol*, 25: 195-202.
51. Evers BM, Mullins RJ, Matthews TH, Broghamer WL, Polk HC. (1988) Multiple adenocarcinomas of the colon and rectum. An analysis of incidences and current trends. *Dis Colon Rectum*, 31: 518-522.
52. Slater G, Aufses AH, Szporn A. (1990) Synchronous carcinoma of the colon and rectum. *Surg Gynecol Obstet*, 171: 283-287.
53. Kimura T, Iwagaki H, Fuchimoto S, Hizuta A, Orita K. (1994) Synchronous colorectal carcinomas. *Hepatogastroenterology*, 41: 409-412.
54. Kaibara N, Koga S, Jinnai D. (1984) Synchronous and metachronous malignancies of the colon and rectum in Japan with special reference to a coexisting early cancer. *Cancer*, 54: 1870-1874.
55. Knox RD, Luey N, Sioson L, Kedziora A, Clarkson A, Watson N, Toon CW, Cussigh C, Pincott S, Pillinger S, Salama Y, Evans J, Percy J, Schnitzler M, Engel A, Gill AJ. (2015) Medullary Colorectal Carcinoma Revisited: A Clinical and Pathological Study of 102 Cases. *Ann Surg Oncol*.
56. Fiehn AM, Grauslund M, Glenthøj A, Melchior LC, Vainer B, Willemoe GL. (2015) Medullary carcinoma of the colon: can the undifferentiated be differentiated? *Virchows Arch*, 466: 13-20.
57. Rüschoff J, Dietmaier W, Lüttges J, Seitz G, Bocker T, Zirngibl H, Schlegel J, Schackert HK, Jauch KW, Hofstaedter F. (1997) Poorly differentiated colonic adenocarcinoma, medullary type: clinical, phenotypic, and molecular characteristics. *Am J Pathol*, 150: 1815-1825.
58. Lanza G, Gafà R, Matteuzzi M, Santini A. (1999) Medullary-type poorly differentiated adenocarcinoma of the large bowel: a distinct clinicopathologic

- entity characterized by microsatellite instability and improved survival. *J Clin Oncol*, 17: 2429-2438.
59. Arai T, Esaki Y, Sawabe M, Honma N, Nakamura K, Takubo K. (2004) Hypermethylation of the hMLH1 promoter with absent hMLH1 expression in medullary-type poorly differentiated colorectal adenocarcinoma in the elderly. *Mod Pathol*, 17: 172-179.
 60. Arai T, Kasahara I, Sawabe M, Kanazawa N, Kuroiwa K, Honma N, Aida J, Takubo K. (2007) Microsatellite-unstable mucinous colorectal carcinoma occurring in the elderly: comparison with medullary type poorly differentiated adenocarcinoma. *Pathol Int*, 57: 205-212.
 61. Kitagawa M, Utsuyama M, Kurata M, Yamamoto K, Yuasa Y, Ishikawa Y, Arai T, Hirokawa K. (2005) Cancer and aging: symposium of the 27th annual meeting of the Japanese society for biomedical gerontology, Tokyo. *Cancer Immunol Immunother*, 54: 623-634.
 62. Kirkwood TB. (2004) Intrinsic ageing of gut epithelial stem cells. *Mech Ageing Dev*, 125: 911-915.
 63. Vries RG, Huch M, Clevers H. (2010) Stem cells and cancer of the stomach and intestine. *Mol Oncol*, 4: 373-384.
 64. Levi E, Misra S, Du J, Patel BB, Majumdar AP. (2009) Combination of aging and dimethylhydrazine treatment causes an increase in cancer-stem cell population of rat colonic crypts. *Biochem Biophys Res Commun*, 385: 430-433.
 65. Patel BB, Yu Y, Du J, Levi E, Phillip PA, Majumdar AP. (2009) Age-related increase in colorectal cancer stem cells in macroscopically normal mucosa of patients with adenomas: a risk factor for colon cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 378: 344-347.
 66. Vijg J, Busuttil RA, Bahar R, Dollé ME. (2005) Aging and genome maintenance. *Ann N Y Acad Sci*, 1055: 35-47.
 67. Dollé ME, Snyder WK, Dunson DB, Vijg J. (2002) Mutational fingerprints of aging. *Nucleic Acids Res*, 30: 545-549.
 68. Vijg J. (2004) Impact of genome instability on transcription regulation of aging and senescence. *Mech Ageing Dev*, 125: 747-753.

69. Yuasa Y. (2002) DNA methylation in cancer and ageing. *Mech Ageing Dev*, 123: 1649-1654.
70. Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin SB. (1994) Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet*, 7: 536-540.
71. Issa JP, Ahuja N, Toyota M, Bronner MP, Brentnall TA. (2001) Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. *Cancer Res*, 61: 3573-3577.
72. Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, Issa JP. (1998) Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res*, 58: 5489-5494.
73. Aubert G, Lansdorp PM. (2008) Telomeres and aging. *Physiol Rev*, 88: 557-579.
74. Jiang H, Ju Z, Rudolph KL. (2007) Telomere shortening and ageing. *Z Gerontol Geriatr*, 40: 314-324.
75. Wiemann SU, Satyanarayana A, Tshuridu M, Tillmann HL, Zender L, Klempnauer J, Flemming P, Franco S, Blasco MA, Manns MP, Rudolph KL. (2002) Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J*, 16: 935-942.
76. Lee HM, Greeley GH, Englander EW. (2001) Age-associated changes in gene expression patterns in the duodenum and colon of rats. *Mech Ageing Dev*, 122: 355-371.
77. Englander EW. (2005) Gene expression changes reveal patterns of aging in the rat digestive tract. *Ageing Res Rev*, 4: 564-578.
78. Hallberg LM, Ikeno Y, Englander E, Greeley GH. (2000) Effects of aging and caloric restriction on IGF-I, IGF-I receptor, IGFBP-3 and IGFBP-4 gene expression in the rat stomach and colon. *Regul Pept*, 89: 37-44.
79. Schmelz EM, Levi E, Du J, Xu H, Majumdar AP. (2004) Age-related loss of EGF-receptor related protein (ERRP) in the aging colon is a potential risk factor for colon cancer. *Mech Ageing Dev*, 125: 917-922.
80. Ukraintseva SV, Yashina AI. (2004) Cancer as "rejuvenescence". *Ann N Y Acad Sci*, 1019: 200-205.
81. Soussi T. (2000) p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer Res*, 60: 1777-1788.

82. Peter ME, Legembre P, Barnhart BC. (2005) Does CD95 have tumor promoting activities? *Biochim Biophys Acta*, 1755: 25-36.
83. Kulju KS, Lehman JM. (1995) Increased p53 protein associated with aging in human diploid fibroblasts. *Exp Cell Res*, 217: 336-345.
84. Miyawaki T, Uehara T, Nibu R, Tsuji T, Yachie A, Yonehara S, Taniguchi N. (1992) Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *J Immunol*, 149: 3753-3758.
85. Aggarwal S, Gupta S. (1998) Increased apoptosis of T cell subsets in aging humans: altered expression of Fas (CD95), Fas ligand, Bcl-2, and Bax. *J Immunol*, 160: 1627-1637.
86. Dean R, Kim SS, Delgado D. (1986) Expression of c-myc oncogene in human fibroblasts during in vitro senescence. *Biochem Biophys Res Commun*, 135: 105-109.
87. Delgado D, Raymond L, Dean R. (1986) C-ras expression decreases during in vitro senescence in human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 137: 917-921.
88. Reenstra WR, Yaar M, Gilchrist BA. (1996) Aging affects epidermal growth factor receptor phosphorylation and traffic kinetics. *Exp Cell Res*, 227: 252-255.
89. Theodosiou NA, Tabin CJ. (2003) Wnt signaling during development of the gastrointestinal tract. *Dev Biol*, 259: 258-271.
90. Gregorieff A, Clevers H. (2005) Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev*, 19: 877-890.
91. Patel YC. (1999) Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol*, 20: 157-198.
92. Van Op den Bosch J, Adriaansen D, Van Nassauw L, Timmermans JP. (2009) The role(s) of somatostatin, structurally related peptides and somatostatin receptors in the gastrointestinal tract: a review. *Regul Pept*, 156: 1-8.
93. Herszényi L, Mihály E, Tulassay Z. (2013) [Somatostatin and the digestive system. Clinical experiences]. *Orv Hetil*, 154: 1535-1540.
94. Benali N, Ferjoux G, Puente E, Buscail L, Susini C. (2000) Somatostatin receptors. *Digestion*, 62 Suppl 1: 27-32.

95. Lahlou H, Guillermet J, Hortala M, Vernejoul F, Pyronnet S, Bousquet C, Susini C. (2004) Molecular signaling of somatostatin receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 1014: 121-131.
96. Cervia D, Bagnoli P. (2007) An update on somatostatin receptor signaling in native systems and new insights on their pathophysiology. *Pharmacol Ther*, 116: 322-341.
97. Møller LN, Stidsen CE, Hartmann B, Holst JJ. (2003) Somatostatin receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1616: 1-84.
98. Reubi JC, Schaer JC, Markwalder R, Waser B, Horisberger U, Laissue J. (1997) Distribution of somatostatin receptors in normal and neoplastic human tissues: recent advances and potential relevance. *Yale J Biol Med*, 70: 471-479.
99. Qiu CZ, Wang C, Huang ZX, Zhu SZ, Wu YY, Qiu JL. (2006) Relationship between somatostatin receptor subtype expression and clinicopathology, Ki-67, Bcl-2 and p53 in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 12: 2011-2015.
100. Evangelou I, Petraki C, Msaouel P, Scorilas A, Sdrolia E, Padazi G, Koborozos V, Koutsilieris M. (2012) Immunohistochemical expression of somatostatin receptor subtypes 2 and 5 in colorectal cancer. *Eur J Clin Invest*, 42: 777-783.
101. Buscail L, Saint-Laurent N, Chastre E, Vaillant JC, Gespach C, Capella G, Kalthoff H, Lluís F, Vaysse N, Susini C. (1996) Loss of sst2 somatostatin receptor gene expression in human pancreatic and colorectal cancer. *Cancer Res*, 56: 1823-1827.
102. Reubi JC, Schaer JC, Laissue JA, Waser B. (1996) Somatostatin receptors and their subtypes in human tumors and in peritumoral vessels. *Metabolism*, 45: 39-41.
103. Pyronnet S, Bousquet C, Najib S, Azar R, Laklai H, Susini C. (2008) Antitumor effects of somatostatin. *Mol Cell Endocrinol*, 286: 230-237.
104. Theodoropoulou M, Stalla GK. (2013) Somatostatin receptors: from signaling to clinical practice. *Front Neuroendocrinol*, 34: 228-252.
105. Bousquet C, Guillermet J, Vernejoul F, Lahlou H, Buscail L, Susini C. (2004) Somatostatin receptors and regulation of cell proliferation. *Dig Liver Dis*, 36 Suppl 1: S2-7.
106. Dasgupta P. (2004) Somatostatin analogues: multiple roles in cellular proliferation, neoplasia, and angiogenesis. *Pharmacol Ther*, 102: 61-85.

107. Ferjoux G, Bousquet C, Cordelier P, Benali N, Lopez F, Rochaix P, Buscail L, Susini C. (2000) Signal transduction of somatostatin receptors negatively controlling cell proliferation. *J Physiol Paris*, 94: 205-210.
108. Pawlikowski M, Meleń-Mucha G. (2004) Somatostatin analogs - from new molecules to new applications. *Curr Opin Pharmacol*, 4: 608-613.
109. Oberg KE. (2012) The management of neuroendocrine tumours: current and future medical therapy options. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 24: 282-293.
110. Grimberg A. (2004) Somatostatin and cancer: applying endocrinology to oncology. *Cancer Biol Ther*, 3: 731-733.
111. Scarpignato C, Pelosini I. (2001) Somatostatin analogs for cancer treatment and diagnosis: an overview. *Chemotherapy*, 47 Suppl 2: 1-29.
112. Rufini V, Calcagni ML, Baum RP. (2006) Imaging of neuroendocrine tumors. *Semin Nucl Med*, 36: 228-247.
113. Reubi JC, Waser B, Schaer JC, Laissue JA. (2001) Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *Eur J Nucl Med*, 28: 836-846.
114. Reubi JC, Waser B, van Hagen M, Lamberts SW, Krenning EP, Gebbers JO, Laissue JA. (1992) In vitro and in vivo detection of somatostatin receptors in human malignant lymphomas. *Int J Cancer*, 50: 895-900.
115. Kwekkeboom DJ, Krenning EP, Kho GS, Breeman WA, Van Hagen PM. (1998) Somatostatin receptor imaging in patients with sarcoidosis. *Eur J Nucl Med*, 25: 1284-1292.
116. Vanhagen PM, Krenning EP, Reubi JC, Kwekkeboom DJ, Bakker WH, Mulder AH, Laissue I, Hoogstede HC, Lamberts SW. (1994) Somatostatin analogue scintigraphy in granulomatous diseases. *Eur J Nucl Med*, 21: 497-502.
117. Vanhagen PM, Markusse HM, Lamberts SW, Kwekkeboom DJ, Reubi JC, Krenning EP. (1994) Somatostatin receptor imaging. The presence of somatostatin receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 37: 1521-1527.
118. Weckbecker G, Raulf F, Stolz B, Bruns C. (1993) Somatostatin analogs for diagnosis and treatment of cancer. *Pharmacol Ther*, 60: 245-264.

119. Keller G, Engel JB, Schally AV, Nagy A, Hammann B, Halmos G. (2005) Growth inhibition of experimental non-Hodgkin's lymphomas with the targeted cytotoxic somatostatin analogue AN-238. *Int J Cancer*, 114: 831-835.
120. Weber C, Merriam L, Koschitzky T, Karp F, Benson M, Forde K, LoGerfo P. (1989) Inhibition of growth of human breast carcinomas in vivo by somatostatin analog SMS 201-995: treatment of nude mouse xenografts. *Surgery*, 106: 416-422.
121. van Vliet EI, Teunissen JJ, Kam BL, de Jong M, Krenning EP, Kwekkeboom DJ. (2013) Treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors with peptide receptor radionuclide therapy. *Neuroendocrinology*, 97: 74-85.
122. Rinke A, Müller HH, Schade-Brittinger C, Klose KJ, Barth P, Wied M, Mayer C, Aminossadati B, Pape UF, Bläker M, Harder J, Arnold C, Gress T, Arnold R, Group PS. (2009) Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors: a report from the PROMID Study Group. *J Clin Oncol*, 27: 4656-4663.
123. Caplin ME, Pavel M, Ćwikła JB, Phan AT, Raderer M, Sedláčková E, Cadiot G, Wolin EM, Capdevila J, Wall L, Rindi G, Langley A, Martinez S, Blumberg J, Ruzniewski P, Investigators C. (2014) Lanreotide in metastatic enteropancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*, 371: 224-233.
124. Hejna M, Schmidinger M, Raderer M. (2002) The clinical role of somatostatin analogues as antineoplastic agents: much ado about nothing? *Ann Oncol*, 13: 653-668.
125. Cascinu S, Del Ferro E, Catalano G. (1995) A randomised trial of octreotide vs best supportive care only in advanced gastrointestinal cancer patients refractory to chemotherapy. *Br J Cancer*, 71: 97-101.
126. Goldberg RM, Moertel CG, Wieand HS, Krook JE, Schutt AJ, Veeder MH, Mailliard JA, Dalton RJ. (1995) A phase III evaluation of a somatostatin analogue (octreotide) in the treatment of patients with asymptomatic advanced colon carcinoma. North Central Cancer Treatment Group and the Mayo Clinic. *Cancer*, 76: 961-966.

127. Di Leo A, Bajetta E, Ferrari L, Biganzoli L, Mariani L, Carnaghi C, Camerini E, Buzzoni R, Ruiz JM. (1996) A dose-finding study of lanreotide (a somatostatin analog) in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*, 78: 35-42.
128. Friess H, Büchler M, Beglinger C, Weber A, Kunz J, Fritsch K, Dennler HJ, Beger HG. (1993) Low-dose octreotide treatment is not effective in patients with advanced pancreatic cancer. *Pancreas*, 8: 540-545.
129. Kouroumalis E, Skordilis P, Thermos K, Vasilaki A, Moschandrea J, Manousos ON. (1998) Treatment of hepatocellular carcinoma with octreotide: a randomised controlled study. *Gut*, 42: 442-447.
130. Witzig TE, Letendre L, Gerstner J, Schroeder G, Mailliard JA, Colon-Otero G, Marschke RF, Windschitl HE. (1995) Evaluation of a somatostatin analog in the treatment of lymphoproliferative disorders: results of a phase II North Central Cancer Treatment Group trial. *J Clin Oncol*, 13: 2012-2015.
131. Macaulay VM, Smith IE, Everard MJ, Teale JD, Reubi JC, Millar JL. (1991) Experimental and clinical studies with somatostatin analogue octreotide in small cell lung cancer. *Br J Cancer*, 64: 451-456.
132. Cotto C, Quoix E, Thomas F, Henane S, Trillet-Lenoir V. (1994) Phase I study of the somatostatin analogue somatuline in refractory small-cell lung carcinoma. *Ann Oncol*, 5: 290-291.
133. Marschke RF, Grill JP, Sloan JA, Wender DB, Levitt R, Mailliard JA, Gerstner JB, Ghosh C, Morton RF, Jett JR. (1999) Phase II study of high-dose somatostatin analogue in patients either previously treated or untreated who have extensive-stage small cell lung cancer. *Am J Clin Oncol*, 22: 15-17.
134. Canobbio L, Cannata D, Miglietta L, Boccardo F. (1995) Somatuline (BIM 23014) and tamoxifen treatment of postmenopausal breast cancer patients: clinical activity and effect on insulin-like growth factor-I (IGF-I) levels. *Anticancer Res*, 15: 2687-2690.
135. Bontenbal M, Foekens JA, Lamberts SW, de Jong FH, van Putten WL, Braun HJ, Burghouts JT, van der Linden GH, Klijn JG. (1998) Feasibility, endocrine and anti-tumour effects of a triple endocrine therapy with tamoxifen, a somatostatin analogue and an antiprolactin in post-menopausal metastatic breast cancer: a randomized study with long-term follow-up. *Br J Cancer*, 77: 115-122.

136. O'Byrne KJ, Dobbs N, Propper DJ, Braybrooke JP, Koukourakis MI, Mitchell K, Woodhull J, Talbot DC, Schally AV, Harris AL. (1999) Phase II study of RC-160 (vapreotide), an octapeptide analogue of somatostatin, in the treatment of metastatic breast cancer. *Br J Cancer*, 79: 1413-1418.
137. Figg WD, Thibault A, Cooper MR, Reid R, Headlee D, Dawson N, Kohler DR, Reed E, Sartor O. (1995) A phase I study of the somatostatin analogue somatuline in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Cancer*, 75: 2159-2164.
138. Lamberts SW, de Herder WW, Hofland LJ. (2002) Somatostatin analogs in the diagnosis and treatment of cancer. *Trends Endocrinol Metab*, 13: 451-457.
139. Valcz G, Sipos F, Krenács T, Molnár J, Patai AV, Leiszter K, Tóth K, Solymosi N, Galamb O, Molnár B, Tulassay Z. (2010) Elevated osteopontin expression and proliferative/apoptotic ratio in the colorectal adenoma-dysplasia-carcinoma sequence. *Pathol Oncol Res*, 16: 541-545.
140. Sipos F, Galamb O, Wichmann B, Krenács T, Tóth K, Leiszter K, Muzes G, Zágoni T, Tulassay Z, Molnár B. (2011) Peripheral blood based discrimination of ulcerative colitis and Crohn's disease from non-IBD colitis by genome-wide gene expression profiling. *Dis Markers*, 30: 1-17.
141. Bingham S, Riboli E. (2004) Diet and cancer--the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Nat Rev Cancer*, 4: 206-215.
142. Pines J. (1995) Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J*, 308 (Pt 3): 697-711.
143. Pavletich NP. (1999) Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol*, 287: 821-828.
144. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. (2004) Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology*, 145: 5439-5447.
145. Zhang T, Nanney LB, Luongo C, Lamps L, Heppner KJ, DuBois RN, Beauchamp RD. (1997) Concurrent overexpression of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) in intestinal adenomas from multiple intestinal neoplasia (Min) mice and human familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res*, 57: 169-175.

146. Salh B, Bergman D, Marotta A, Pelech SL. (1999) Differential cyclin-dependent kinase expression and activation in human colon cancer. *Anticancer Res*, 19: 741-748.
147. Hannon GJ, Beach D. (1994) p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*, 371: 257-261.
148. Herman JG, Jen J, Merlo A, Baylin SB. (1996) Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. *Cancer Res*, 56: 722-727.
149. Thomas RP, Hellmich MR, Townsend CM, Evers BM. (2003) Role of gastrointestinal hormones in the proliferation of normal and neoplastic tissues. *Endocr Rev*, 24: 571-599.
150. Dimitroulopoulos D, Xinopoulos D, Tsamakidis K, Zisimopoulos A, Andriotis E, Markidou S, Panagiotakos D, Chrysohoou C, Bazinis A, Paraskevas E. (2002) The role of sandostatin LAR in treating patients with advanced hepatocellular cancer. *Hepatogastroenterology*, 49: 1245-1250.
151. Becker G, Allgaier HP, Olschewski M, Zähringer A, Blum HE, Group HS. (2007) Long-acting octreotide versus placebo for treatment of advanced HCC: a randomized controlled double-blind study. *Hepatology*, 45: 9-15.
152. Rosenberg L, Barkun AN, Denis MH, Pollak M. (1995) Low dose octreotide and tamoxifen in the treatment of adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer*, 75: 23-28.
153. Dalm VA, Hofland LJ, Lamberts SW. (2008) Future clinical prospects in somatostatin/cortistatin/somatostatin receptor field. *Mol Cell Endocrinol*, 286: 262-277.
154. Savage AP, Calam J, Wood CB, Bloom SR. (1987) SMS 201-995 treatment and advanced intestinal cancer: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther*, 1: 133-139.
155. Klijn JG, Hoff AM, Planting AS, Verweij J, Kok T, Lamberts SW, Portengen H, Foekens JA. (1990) Treatment of patients with metastatic pancreatic and gastrointestinal tumours with the somatostatin analogue Sandostatin: a phase II study including endocrine effects. *Br J Cancer*, 62: 627-630.
156. Mercadante S, Spoldi E, Caraceni A, Maddaloni S, Simonetti MT. (1993) Octreotide in relieving gastrointestinal symptoms due to bowel obstruction. *Palliat Med*, 7: 295-299.

157. Cascinu S, Catalano V, Giordani P, Baldelli AM, Agostinelli R, Catalano G. (2001) Gastrointestinal cancer refractory to chemotherapy: a role for octreotide? *Chemotherapy*, 47 Suppl 2: 127-133.
158. Miller GV, Farmery SM, Woodhouse LF, Primrose JN. (1992) Somatostatin binding in normal and malignant human gastrointestinal mucosa. *Br J Cancer*, 66: 391-395.
159. Dy DY, Whitehead RH, Morris DL. (1992) SMS 201.995 inhibits in vitro and in vivo growth of human colon cancer. *Cancer Res*, 52: 917-923.
160. Colucci R, Blandizzi C, Ghisu N, Florio T, Del Tacca M. (2008) Somatostatin inhibits colon cancer cell growth through cyclooxygenase-2 downregulation. *Br J Pharmacol*, 155: 198-209.
161. Goel A, Boland CR. (2012) Epigenetics of colorectal cancer. *Gastroenterology*, 143: 1442-1460.e1441.
162. Patai AV, Molnár B, Kalmár A, Schöller A, Tóth K, Tulassay Z. (2012) Role of DNA methylation in colorectal carcinogenesis. *Dig Dis*, 30: 310-315.
163. Mori Y, Cai K, Cheng Y, Wang S, Paun B, Hamilton JP, Jin Z, Sato F, Berki AT, Kan T, Ito T, Mantzur C, Abraham JM, Meltzer SJ. (2006) A genome-wide search identifies epigenetic silencing of somatostatin, tachykinin-1, and 5 other genes in colon cancer. *Gastroenterology*, 131: 797-808.
164. Jin Z, Mori Y, Hamilton JP, Olaru A, Sato F, Yang J, Ito T, Kan T, Agarwal R, Meltzer SJ. (2008) Hypermethylation of the somatostatin promoter is a common, early event in human esophageal carcinogenesis. *Cancer*, 112: 43-49.
165. Jackson K, Soutto M, Peng D, Hu T, Marshal D, El-Rifai W. (2011) Epigenetic silencing of somatostatin in gastric cancer. *Dig Dis Sci*, 56: 125-130.
166. Shi X, Li X, Chen L, Wang C. (2013) Analysis of somatostatin receptors and somatostatin promoter methylation in human gastric cancer. *Oncol Lett*, 6: 1794-1798.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

10.1. Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények jegyzéke:

Leiszter K, Galamb O, Sipos F, Spisák S, Tóth K, Valcz G, Kalmár A, Múzes G, Molnár J, Molnár B, Tulassay Z. (2010) Az öregedés jelei az emésztőrendszerben. *Magy Belorv Arch*, 63: 19-24.

Leiszter K, Galamb O, Sipos F, Tóth K, Valcz G, Patai V. Á, Molnár J, Molnár B, Tulassay Z. (2010) Az öregedés mikroszkópos és molekuláris jelei a vastagbélben, valamint ezek lehetséges szerepe az időskori vastagbélrák kialakulásában. *Orv Hetil*, 151: 885-892.

Sipos F, **Leiszter K**, Tulassay Z. (2011) Effect of ageing on colonic mucosal regeneration. *World J Gastroenterol*, 17: 2981-2986.

IF: 2,471 (2011)

Leiszter K, Galamb O, Sipos F, Krenács T, Veres G, Wichmann B, Kalmár A, Patai V. Á, Tóth K, Valcz G, Molnár B, Tulassay Z. (2013) Sporadic colorectal cancer development shows rejuvenescence regarding epithelial proliferation and apoptosis. *PLoS One*, 8: e74140.

IF: 3,534 (2013)

Leiszter K, Sipos F, Galamb O, Krenács T, Veres G, Wichmann B, Fúri I, Kalmár A, Patai V. Á, Tóth K, Valcz G, Molnár B, Tulassay Z. (2015) Promoter hypermethylation-related reduced somatostatin production promotes uncontrolled cell proliferation in colorectal cancer. *PLoS One*, 10: e0118332.

IF: 3,534 (2013)

10.2. Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények jegyzéke:

Molnár J, Molnár B, Tóth K, **Leiszter K**, Tulassay Z. (2008) A szelénhiány és az emésztőszervi daganatos betegségek kapcsolata - Irodalmi áttekintés. *Magy Belorv Arch*, 61: 13-19.

Igaz P, Szücs N, Rettegthy T, **Leiszter K**, Hagymási K, Rácz K, Tulassay Z. (2008) Non-Hepatic Coma in a Cirrhotic Patient due to Chronic Subdural Hematoma. *Orv Hetil*, 2: 451-453.

Tóth K, Galamb O, Spisák S, Wichmann B, Sipos F, **Leiszter K**, Molnár J, Molnár B, Tulassay Z. (2009) Szabad DNS-alapú vastagbél-daganat-szűrés perifériás vérből: a metilált szeptin-9 génmarker lehetőségei. *Orv Hetil*, 150: 969-977.

Valcz G, Krenács T, Sipos F, Wichmann B, Tóth K, **Leiszter K**, Balogh Z, Csizmadia A, Hagymási K, Múzes G, Masszi T, Molnár B, Tulassay Z. (2009) A csontvelő eredetű őssejtek megjelenése az ép vastagbélhamban és a gyulladást követő hámregenerációban. *Orv Hetil*, 150: 1852-1857.

Sipos F, Múzes G, Valcz G, Galamb O, Tóth K, **Leiszter K**, Krenács T, Tulassay Z, Molnár B. (2010) Regeneration associated growth factor receptor and epithelial marker expression in lymphoid aggregates of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol*, 45: 440-448.

IF: 1,966 (2010)

Molnár B, Galamb O, Sipos F, **Leiszter K**, Tulassay Z. (2010) Molecular pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection: The role of bacterial virulence factors. *Dig Dis*, 28: 604-608.

IF: 1,0 (2010)

Valcz G, Sipos F, Krenács T, Molnár J, Patai V. Á, **Leiszter K**, Tóth K, Solymosi N, Galamb O, Molnár B, Tulassay Z. (2010) Elevated osteopontin expression and proliferative/apoptotic ratio in the colorectal adenoma-dysplasia-carcinoma sequence. *Pathol Oncol Res*, 16: 541-545.

IF: 1,483 (2010)

Leiszter K. (2011) Beszámoló a XI. Gasztroenterológiai Továbbképző Konferenciáról és az Országos Gasztroenterológiai Kötelező Szintentartó Továbbképző Tanfolyamról. *Magy Belorv Arch*, 64: 118.

Tóth K, Galamb O, Spisák S, Wichmann B, Sipos F, Valcz G, **Leiszter K**, Molnár B, Tulassay Z. (2011) The influence of methylated Septin 9 gene on RNA and protein level in colorectal cancer. *Pathol Oncol Res*, 17: 503-509.

IF: 1,366 (2011)

Valcz G, Krenács T, Sipos F, **Leiszter K**, Tóth K, Balogh Z, Csizmadia A, Múzes G, Molnár B, Tulassay Z. (2011) The role of the bone marrow derived mesenchymal stem cells in colonic epithelial regeneration. *Pathol Oncol Res*, 17: 11-16.

IF: 1,366 (2011)

Sipos F, Galamb O, Wichmann B, Krenács T, Tóth K, **Leiszter K**, Múzes G, Zágonyi T, Tulassay Z, Molnár B. (2011) Peripheral blood based discrimination of ulcerative colitis and Crohn's disease from nonIBD colitis by genomewide gene expression profiling. *Dis Markers*, 30: 1-17.

IF: 1,642 (2011)

Valcz G, Krenács T, Sipos F, Patai V. Á, Wichmann B, **Leiszter K**, Tóth K, Balogh Z, Csizmadia A, Hagymási K, Masszi T, Molnár B, Tulassay Z. (2011) Lymphoid aggregates may contribute to the migration and epithelial commitment of bone marrow-derived cells in colonic mucosa. *J Clin Pathol*, 64: 771-775.

IF: 2,306 (2011)

Valcz G, Sipos F, Krenács T, Molnár J, Patai V. Á, **Leiszter K**, Tóth K, Wichmann B, Molnár B, Tulassay Z. (2012) Increase of α -SMA(+) and CK (+) Cells as an early sign of epithelial-mesenchymal transition during colorectal carcinogenesis. *Pathol Oncol Res*, 18: 371-376.

IF: 1,555 (2012)

Galamb O, Wichmann B, Sipos F, Spisák S, Krenács T, Tóth K, **Leiszter K**, Kalmár A, Tulassay Z, Molnár B. (2012) Dysplasia-carcinoma transition specific transcripts in colonic biopsy samples. *PLoS One*, 7: e48547.

IF: 3,73 (2012)

Kalmár A, Wichmann B, Galamb O, Spisák S, Tóth K, **Leiszter K**, Tulassay Z, Molnár B. (2013) Gene expression analysis of normal and colorectal cancer tissue samples from fresh frozen and matched formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) specimens after manual and automated RNA isolation. *Methods*, 59: S16-19.

IF: 3.221 (2013)

Bencze A, Szücs N, Igaz P, **Leiszter K**, Nagy Z, Patócs A, Rác K. (2013) Carcinoid szívbetegség. *Orv Hetil*, 154: 546-550.

Tóth K, Wasserkort R, Sipos F, Kalmár A, Wichmann B, **Leiszter K**, Valcz G, Juhász M, Miheller P, Patai ÁV, Tulassay Z, Molnár B. (2014) Detection of methylated septin 9 in tissue and plasma of colorectal patients with neoplasia and the relationship to the amount of circulating cell-free DNA. *PLoS One*, 9:e115415.

IF: 3,534 (2013)

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Értekezésem végén szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik munkám során szakmai és személyes támogatásukkal segítségemre voltak:

- Programvezetőmnek, Prof. Dr. Tulassay Zsolt egyetemi tanárnak, akadémikusnak, Prof. Dr. Rácz Károlynak és témavezetőmnek, Dr. Molnár Bélának, hogy lehetővé tették és támogatták Ph.D. munkám elkészítését a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikáján.

- Dr. Dezsőfi Antal adjunktus úrnak és Dr. Szmola Richárd adjunktus úrnak, valamint Dr. Hagymási Krisztina adjunktus asszonynak és Dr. Reismann Péter tanársegéd úrnak Ph.D. dolgozatom alapos áttekintéséért, szakmai bírálatukért.

- Dr. Krenács Tibornak, az immunhisztokémiai vizsgálatokban nyújtott elengedhetetlen segítségéért.

- Dr. Veres Gábor docens úrnak a gyermek minták gyűjtésében nyújtott segítségéért és szakmai támogatásáért.

- A Sejtanalitikai Laboratórium senior kutatóinak, Dr. Sipos Ferencnek, Udvardyné Dr. Galamb Orsolyának és Dr. Spisák Sándornak szakmai támogatásukért.

- Dr. Tóth Kingának, Kalmár Alexandrának, Dr. Schöller Andreának, Nagy Zsófiának, Barták Barbarának, Dr. Valcz Gábornak, Dr. Patai V. Árpádnak, Fűri Istvánnak és Berczik Máriának támogatásukért és barátságukért.

- Dr. Wichmann Barnának a statisztikai elemzésekben nyújtott segítségéért.

- Kónyáné Farkas Gabriella és Csorba Gézáné Marica szakasszisztenseknek a gyakorlati munkámban nyújtott segítségükért.

- A Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikájának Endoszkópos Laboratóriumában dolgozó valamennyi orvosnak és asszisztensnek a biopsziás minták gyűjtésében nyújtott segítségükért.

- A Sejtanalitikai Laboratóriumban dolgozó összes munkatársamnak támogatásukért.

- Édesanyámnak, Édesapámnak és Testvéremnek, hogy megteremtették azt az erkölcsi és anyagi alapot, amely nélkül munkámat nem végezhettem volna el.

- Végül, de legkevesbé sem utolsó sorban Férjemnek és Kislányomnak pótolhatatlan szeretetükért és támogatásukért.