

# **A Barrett nyelőcső molekulárgenetikai eltéréseinek vizsgálata biopsziás mintákban**

Doktori tézisek

**Máté Miklós**

Semmelweis Egyetem

Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Molnár Béla, az MTA doktora, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Prof. Dr. Banai János, D.Sc. egyetemi tanár  
Dr. Máthé Zoltán, Ph.D. habilitált egyetemi docens

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

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Taller András, Ph.D. osztályvezető  
főorvos  
Dr. Péter Antal, Ph.D. egyetemi adjunktus

Budapest  
2015



## Bevezetés

Az utóbbi 2-3 évtizedben Nyugat-Európában és az Egyesült Államokban a nyelőcső adenocarcinoma drámai emelkedést mutat. Az 5. leggyakrabban előforduló daganatnak számít ezekben az országokban. Az incidencia növekedésének oka ismeretlen. A nyelőcső adenocarcinoma korai stádiumban jól kezelhető, előrehaladott esetben rendkívül rossz prognózisú betegségnek számít. Ezért fontos a korai felismerés. A nyelőcső adenocarcinoma a metaplasias hengerhából alakul ki, amit a krónikus gastrooesophagealis reflux betegség (GERD) szövődményének tartunk. Ezt a metaplasias hengerhámot nevezzük Barrett nyelőcsőnek. A nyugati országokban és hazánkban a GERD a populáció 15-30%-át érinti, ugyanakkor a reflux betegek 5-10 %-ában alakul ki mindössze Barrett metaplasia.

A Barrett metaplasiat praecancerosisnak tekintjük, mert évente 0,5-1,5 %-ban számolhatunk nyelőcső adenocarcinoma kialakulásával az utánkövetetett betegeken.

Az endoszkópos utánkövetés, a displasia mértéke, a folyamat multicentrikus elhelyezkedése, a mucosa és submucosa érintettsége, a kialakuló nyirokcsomó metastasisok detektálása számos olyan diagnosztikus problémát vet fel, amire még napjainkban sem találunk egyértelmű válaszokat.

A gyógyszeres kezelés mellett végzett endoszkópos ablatív kezelés, mucosectomia, a csökkentett radikalitású sebészi kezelés, gasztroenterológusok és sebészek között egyaránt vitatott.

Sajnos a legtöbb Barrett carcinomás beteg előrehaladott stádiumban kerül felismerésre, ami kizárja a kuratív kezelés lehetőségét és előrevetíti a rossz prognózist. Az agresszív kezelési stratégiák ellenére a túlélési statisztikák nem javultak az elmúlt 20 évben. A korai stádiumban felismert Barrett carcinoma 5 éves túlélése 80-90 %, összehasonlítva a késői stádiumban felfedezett daganatok 10-15%-os túlélésével elgondolkodtató. Ezért a korai felismerésre kell törekednünk.

Nem tudjuk, hogy vajon a felismert Barrett metaplasia miért és hogyan vezet egyes esetekben egy jól definiált morfológiai folyamat során, egyre emelkedő grádiensű displasián át az intramucosális adenocarcinoma kialakulásáig?

A krónikus refluxbetegségen kívül számos genetikai faktor is szerepet játszik a kialakulásában. A szabályos sejtciklus folyamata károsodik, a növekedési faktorok

expressziója a sejtsztódást fokozza, a tumorsupresszorok mutációja következtében a sejtek nem lépnek be az apoptózis folyamatába.

Az utóbbi években fejlődésnek indult molekulárgenetikai kutatások felhasználásával lehetőségünk van rá, hogy a morfológiai képen túl a sejtekben zajló változásokat is tanulmányozhassuk, mert a morfológiai változásokat a genetikai változások minden bizonnyal megelőzik.

A kérdés az, hogy mely pillanattól változik meg a sejtek működése olyan irányba, hogy az már malignusnak tekinthető és melyek e változás jelei. A klinikus számára, ezek a jelek, vagy indikátorok útbaigazítást nyújthatnak a további kezelésre vonatkozóan.

## **Célkitűzés**

A sejtciklussal összefüggő fehérje expressziós vizsgálatok fontos információval szolgálhatnak a Barrett metaplasia sejtkinetikai változásainak megértéséhez. Vizsgálatainkban azt kívántunk megfigyelni, hogy displasiában és adenocarcinomában már ismert és tanulmányozott molekulárgenetikai eltérések jelen vannak-e már az ép, a gyulladós és a metaplasias nyelőcső biopszias mintákban.

Arra kerestük a választ, hogy találunk-e különbséget a vizsgált genetikai paraméterekben az ép és a metaplasias hám között. Hordoz-e már a metaplasias hám valamelyik vizsgált paraméterre vonatkozóan olyan plusz információt, ami az ép és oesophagitis hámiban még nincs jelen és immunhisztokémiai (IHC) vizsgálattal kimutatható.

1. A gyulladós aktivitás hatására a sejtciklusban szerepet játszó két gén (PCNA, EGFR), egy tumorsupresszor gén (p53) és az apoptózist jellemző TUNEL reakció változásainak vizsgálata ép, gyulladós és metaplasias hámiban
2. A displasiában és adenocarcinomában kimutatható két nyák antigén (SIMA, LIMA) immunhisztokémiai jelenlétének vizsgálata ép, gyulladós és metaplasias hámiban.
3. Az immunhisztokémia vizsgálatokkal kimutatott genetikai elváltozások hagyományos fénymikroszkóppal történő kiértékelésének összehasonlítása a laboratóriumunkban kifejlesztett digitális mikroszkópos kiértékeléssel.

## Módszerek

A vizsgálatba bevont betegek szövettani mintái kivétel nélkül a Semmelweis Egyetem III.sz Sebészeti Klinikájáról származnak, ahol az előző munkahelyem volt. A biopsziás minták szövettani értékelése Semmelweis Egyetem I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében történt. Vizsgálatokat a II.sz Belgyógyászati Klinika Sejtanalitika Laboratóriumában végeztem.

Előzetes felvilágosítás és beleegyező nyilatkozat kitöltése után történt a rutin nyelőcső biopsziás mintavétel a betegektől gasztroszkópos vizsgálat során. Az elkészült nyelőcső biopsziás mintákból hagyományos haematoxillin eosin (HE) festéssel készült metszetek szövettani diagnózisa alapján választottuk ki a vizsgálatba bevont betegeket. 30 ép nyelőcső, 30 oesophagitis és 30 Barrett metaplasziás mintát. Referenciaként még 10 ép cardia biopsziás mintát is megvizsgáltunk.

Az így kiválasztásra került 100 szövettani blokkból újabb metszeteket készítettünk, amelyek immunhisztokémiai festését végeztük. Jelátvitelre Streptavidin-Biotin-Aminoetil-Karbazol (AEC) technikát használtunk. A metszeteket glicerin-zselatinnal fedtük. Mindegyik metszetről hatféle gén immunhisztokémiai jelátvitelét vizsgáltuk.

Az apoptózis vizsgálatához TUNEL reakciót, a sejtosztódáshoz PCNA, a tumorsupresszor gén kimutatására a p53-, a növekedési faktorok kimutatására EGFR-t használtunk. A gyulladáshoz hatására a metaplasziás hámban kialakuló vékonybél típusú nyák antigén (SIMA) és vastagbél típusú nyák antigén (LIMA) változásait vizsgáltuk.

Az elkészült 600 metszet kiértékelését ezután hagyományos fénymikroszkóp és virtuális mikroszkóp segítségével is elvégeztük. Minden metszeten 1000-1000 sejtet számoltunk meg és meghatároztuk az AEC pozitív sejtmagokat.

A fénymikroszkópos virtuális mikroszkópos kiértékelés összehasonlítását statisztikai elmozgó programmal is elvégeztük. A statisztikai elemzést diszkriminancia analízissel végeztük.

**A vizsgálatokba bevont betegek betegcsoportonkénti száma és legfontosabb adatai**

<b>Patológiai diagnózis</b>	<b>Esetszám</b>	<b>Nő/Férfi</b>	<b>Életkor (év,átlag)</b>
<b>Ép nyelőcső</b>	30	10/20	47-80 55.7
<b>Oesophagitis</b>	30	6/24	52-92 68.3
<b>Barrett metaplasia</b>	30	11/19	35-79 75.6
<b>Ép cardia</b>	10	5/5	23-78 61.4

**A vizsgált minták megoszlása esetenként**

	<b>Nyelőcső</b>	<b>Gyomor- cardia</b>	<b>Leszámolt sejtek</b>
<b>Egészséges</b>	30	10	1000/eset
<b>Barrett- metaplázia</b>	30	-	
<b>Reflux oesophagitis</b>	30	-	

## Eredmények

**PCNA expresszió** ép nyelőcsőben és ép cardiában szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a reflux oesophagitisben ( $p < 0,05$ ) és mérsékelten alacsonyabb, mint a Barrett metaplasiában. A legmagasabb értéket a GERD-ben találtuk.

**p53 expresszió** a legalacsonyabb az ép nyelőcső és cardia mintákban volt. Szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a Barrettes mintákban ( $p < 0,05$ ). A Barrettes minták és az oesophagitises minták között minimális volt a különbség.

**TUNEL pozitivitás** vonatkozásában szignifikáns különbséget találtunk az ép minták és a Barrettes minták között. A Barrett mintákban alacsonyabb volt ( $p < 0,05$ ). A gyulladásos mintákban kicsit magasabb értéket találtunk, mint Barrettben.

**EGFR expresszió** szignifikánsan alacsonyabb volt Barrettes mintákban, mint ép nyelőcsőben ( $p < 0,05$ ), de alig volt különbség az ép és gyulladásos minták között.

A két típusú nyák antigén **SIMA** és **LIMA** vonatkozásában nem találtunk szignifikáns különbséget egyik vizsgálati csoportban sem.

### Vizsgálati eredmények a három diagnosztikus csoportban /saját anyag/

Elnevezés Index +/- SD	PCNA	SIMA	LIMA	P53	TUNEL	EGFR
Ép nyelőcső	0.62+0.15* <sup>&amp;</sup>	0.65+0.14	0.64+0.14	0.65+0.14 <sup>&amp;</sup>	0.56+0.16* <sup>&amp;</sup>	0.51+0.16 <sup>&amp;</sup>
Reflux	0.83+0.06*	0.67+0.14	0.67+0.12	0.71+0.13	0.46+0.18*	0.52+0.18
Barrett	0.72+0.12 <sup>&amp;</sup>	0.66+0.17	0.66+0.11	0.72+0.11 <sup>&amp;</sup>	0.40+0.12 <sup>&amp;</sup>	0.43+0.12 <sup>&amp;</sup>
szignifikancia	* <sup>&amp;</sup> <0.05			<sup>&amp;</sup> <0.05	* <sup>&amp;</sup> <0.05	<sup>&amp;</sup> <0.05

### A fénymikroszkópos és virtuális mikroszkópos kiértékelés összehasonlítása.

A hagyományos fénymikroszkópos kiértékelés során egy metszet áttekintése 60-90 percet vett igénybe. Ugyanezt a digitalizált metszeteken 25-30 perc alatt tudtuk elvégezni. A fénymikroszkópos metszetek kiértékelésében az eredmények tekintetében érdemi különbség nem volt.

## Fény- és virtuális mikroszkóppal vizsgált adatok összehasonlítása

Vizsgált paraméterek	Fénymikroszkóp/Virtuális mikroszkóp (Spearman R <sup>2</sup> )
PCNA	0,98
p53	0,94
SIMA	0,87
LIMA	0,92
EGFR	0,82
TUNEL	0,97

### Következtetések

1. A sejtciklussal összefüggő fehérje expressziós vizsgálatok fontos információval szolgálhatnak a reflux oesophagitis és Barrett metaplasia sejtkinetikai változásainak megértéséhez.
2. Vizsgálataink alapján reflux oesophagitisben és Barrett metaplasiában már jelen vannak azok a sejtciklussal összefüggő változások (PCNA, EGFR, p53, TUNEL), amelyek displasiában és adenocarcinomában is megtalálhatók.
3. A PCNA és p53 expressziójának emelkedése jelzi Barrett metaplasiában és oesophagitisben sejtciklus folyamatának beindulását.
4. TUNEL reakció csökkenése Barrett metaplasiában jelzi az apoptózis folyamatának megváltozását az ép nyelőcsőhámhoz képest.
5. Az EGFR expresszió csökkenése Barrett metaplasiában még további vizsgálatokat igényel.
6. Nyák antigének (SIMA, LIMA) vonatkozásában a három vizsgálati csoport között érdemi különbséget nem találtunk, ami arra utal, hogy a nyák antigének termelődésének expressziója inkább a diszplázias hámban várható, ami akár prognosztikai jelnek is tekinthető.
7. A fénymikroszkópos vizsgálathoz képest a digitális mikroszkópia ugyanolyan megbízható eredményeket adott, de segítségével a kiértékelést könnyebbé, gyorsabbá azaz felhasználó barátta lehet tenni.



## Saját publikációk jegyzéke

### Értekezés témájához kapcsolódó közlemények

1. **M. Máté**, B. Molnár (2015) A Relation Between Cell Cycle and Intestinal Metaplasia in Oesophageal Biopsies Using Optical and Digital Microscopy Pathol Oncol Res, 21: 669-673.  
IF: 1.855
2. A. Bálint, E. Fehér, I. Kisfalvi jr., **M. Máté**, T. Zelles, E. S. Vizi, G. Varga (2001) Functional and immunocytochemical evidence that galanin is physiological regulator of human jejunal motility. J Physiol, 95: 129-135  
IF: 0.862
3. I. Kisfalvi jr., G. Rácz, A. Bálint, **M. Máté**, Z. Oláh, T. Zelles , E. S. Vizi , G. Varga (2001) Effects of putative galanin antagonist M35 and C7 on rat exocrine pancreas. J Physiol, 95: 385-389  
IF: 0,862
- A. A. Bálint, **M. Máté**, K. Szabó, L. Romics Jr. (1999) Surgical aspect of gastroesophageal disease-indication for surgery, an update. Acta Chir Hung, 38: 123-126.

### Egyéb, nem az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények

1. Bálint, J. Bátorfi, **M. Máté**, L. Romics, M. Ihász (2000) A rare complication of laparoscopic fundoplication: intra-abdominal abscess managed successfully via laparoscopic approach. Surg Endosc, 14: 593-594  
IF: 2.240
2. J. Sándor, I. Besznyák, A. Sándor, J. Regöly-Mérei, A. Bálint, **M. Máté**, A. Oláh (2004) Highlights of twentieth century surgery in Hungary. World J Surg, 28: 531-532.  
IF: 2.348
3. **Máté M.**, Szabó K., Berczi L. (1995) Abdominális actinomycosis Magy Seb, 48: 327-330
4. **Máté M.**, Bányász Zs., Szalay F., Kepes B., Pernecky L., Sebestény M. (2001) Az alsó végtagok verőér műtéteinek redo operációi Magy Seb, 54: 297-300
5. M. Ihász, Z. Radnai, A. Bálint, F. Szalay, **M. Máté** , M. Bereczky, G. Pósfai (1992) Early complications of gastric resection Acta Chir Hung, 32: 183-196
6. Ihász M., Barta T., Gáti Z., **Máté M.** (1992) A Crohn-betegség etiológiája, tünettana, diagnosztikája, differenciál diagnosztikája és belgyógyászati terápiája Orv Hetil, 133: 3293-3299

7. Ihász M., Regöly-Mérei J., Szeberin Z., Bátorfi J., Fazekas T., **Máté M.** (1996) A laparoscopos cholecystectomy és az epeútsérülések -26440 hazai műtét tapasztalatainak elemzése Orv Hetil, 137: 955-965
8. Ifj.Romics L., **Máté M.**, Szabó K. (1997) Mechanikus vékonybél ileust okozó obturátor sérv Magy Seb, 50: 187-190
9. Bálint A., **Máté M.** , Barta T., Fazekas T. , Solymosi A., Szabó K. (2001) Refluxgátló műtétek klinikánk gyakorlatában (1990-1999) Magy Seb, 54: 283-286
10. Sándor J., **Máté M.**, Irtó I., Záborszky A., Benedek Gy., Sterlik G., Regöly-Mérei J. (2001) Határtalan sebészet Magy Seb, 54: 303-306
11. Ihász M., Fazekas T., Koiss I., Sándor J., Barta T., **Máté M.**, Pósfai G., Berezky M. (1993) A laparoscopos cholecystectomiáról Orv Hetil, 134: 899-906
12. Rédei Cs., Eszes N., Hajnal P., **Máté M.**, Simon K., Tóth J., Pozsár J., Topa L. (2010) Retroperitoneális fibrosis képét utánzó pancreascarcinoma Lege Artis Med, 20: 679-682.
13. Ihász M., Todua FI., **Máté M.**, Fazekas T., Bátorfi J. (1991) Our experiences with the management of pyogenic liver abscesses by percutaneous transhepatic puncture and permanent drainage guided by computed tomography. Acta Chir Hung, 32: 159-173.



