

# A Barrett nyelőcső molekulárgenetikai eltéréseinek vizsgálata biopsziás mintákban

Doktori értekezés

**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



## 2. TARTALOMJEGYZÉK

<b>2. TARTALOMJEGYZÉK</b> .....	<b>1</b>
<b>3. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK</b> .....	<b>3</b>
<b>4. BEVEZETÉS</b> .....	<b>5</b>
4.1. BEVEZETÉS .....	5
4.1.1 <i>A Barrett metaplasia elnevezése és klinikai jelentősége</i> .....	6
4.1.2 <i>Patológiai változások</i> .....	9
4.1.3 <i>Epidemiológia</i> .....	13
4.1.4 <i>Etiológia</i> .....	15
4.1.5. <i>Az endoszkópia szerepe és utánkövetés</i> .....	16
4.1.5. <i>Az antireflux műtétek szerepe</i> .....	19
4.1.6. <i>A Barrett carcinoma műtéti kezelése</i> .....	23
4.2. MOLEKULÁRIS ÉS GENETIKAI VÁLTOZÁSOK .....	27
4.2.1. <i>A sejtproliferáció- és sejtciklus változásai</i> .....	28
4.2.2. <i>A genetikai stabilitás fontos bástyái: Protoonkogének és tumorszupresszor gének</i> .....	29
4.2.3. <i>A kromoszómaszám megváltozása - aneuploidia</i> .....	33
4.2.4. <i>A genom fenntartása és az apoptózis</i> .....	34
4.2.5. <i>Telomerák változása</i> .....	36
4.3. GYULLADÁS ÉS MALIGNITÁS.....	37
4.4. VASZKULARIZÁCIÓ ÉS SZÖVETI INVÁZIÓ .....	38
<b>5. CÉLKIŰZÉSEK</b> .....	<b>41</b>
5.1. A SEJTCIKLUSSAL ÖSSZEFÜGGŐ FEHÉRJE-EXPRESSZIÓS VÁLTOZÁSOK KIMUTATÁSA AZ ÉP ÉS GYULLADÁSOS NYELŐCSŐBEN.....	42
5.2. A KIÉRTÉKELÉS ÖSSZEHASONLÍTÁSA HAGYOMÁNYOS FÉNYMIKROSKÓPOS VIZSGÁLAT ÉS VIRTUÁLIS MIKROSKÓPOS VIZSGÁLAT SEGÍTSÉGÉVEL.....	43
<b>6. MÓDSZEREK</b> .....	<b>44</b>
6.1. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK A SEJTCIKLUSSAL ÖSSZEFÜGGŐ VÁLTOZÁSOK KIMUTATÁSÁRA .....	46
6.2. AZ IMMUNHISZTOKÉMIA EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE FÉNYMIKROSKÓP ÉS VIRTUÁLIS MIKROSKÓP SEGÍTSÉGÉVEL.....	50
<b>7. EREDMÉNYEK</b> .....	<b>51</b>
7.1. A SEJTCIKLUSSAL ÖSSZEFÜGGŐ VÁLTOZÁSOK KIMUTATÁSA ÉP NYELŐCSŐBEN, OESOPHAGITISBEN ÉS BARRETT METAPLAZIÁBAN .....	51
7.2. A VIZSGÁLT MINTÁK STATISZTIKAI ELEMZÉSE DISZKRIMINANCIA ANALÍZIS ALAPJÁN.....	52
7.2.1. <i>Virtuális mikroszkópia</i> .....	52
7.2.2. <i>Fénymikroszkópia</i> .....	59
<b>8. MEGBESZÉLÉS</b> .....	<b>63</b>
8.1. A SEJTCIKLUSSAL ÖSSZEFÜGGŐ VÁLTOZÁSOK ÉP ÉS GYULLADÁSOS NYELŐCSŐBEN.....	63
8.2. FÉNYMIKROSKÓPPAL ÉS VIRTUÁLIS MIKROSKÓPPAL KAPOTT EREDMÉNYEK ÖSSZEHASONLÍTÁSA DISZKRIMINANCIA ANALÍZIS ALAPJÁN.....	69
<b>9. KÖVETKEZTETÉSEK</b> .....	<b>71</b>
9.1. A SEJTCIKLUSSAL ÖSSZEFÜGGŐ VÁLTOZÁSOK KIMUTATÁSA ÉP ÉS GYULLADÁSOS NYELŐCSŐBEN.....	71
9.2. A FÉNYMIKROSKÓPOS- ÉS DIGITALIS MIKROSKÓPOS KIÉRTÉKELÉS ÖSSZEHASONLÍTÁSA.....	72

<b>10. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>74</b>
<b>11. SUMMARY .....</b>	<b>75</b>
<b>12. IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>76</b>
<b>13. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE .....</b>	<b>89</b>
<b>14. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>91</b>

### 3. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

<b>APC</b>	adenomatous polypozis gén
<b>Bcl2</b>	B-sejt leukemia gén 2
<b>bFGF</b>	basic fibroblast growth factor
<b>BE</b>	Barrett nyelőcső (Barrett esophagus)
<b>BMI</b>	testtömegindex (body mass index)
<b>CagA</b>	citotoxin asszociált gén
<b>CDK</b>	ciklin dependens kináz enzim
<b>COX</b>	ciklooxigenáz enzim
<b>EGFR</b>	epitheliális növekedési faktor receptor (Epidermal Growth Factor Receptor)
<b>GERD</b>	gasztroesophagealis reflux betegség (gastroesophageal reflux disease)
<b>HGD</b>	magas fokú displasia (high grade dysplasia)
<b>HE</b>	haematoxin eosin
<b>HP</b>	helicobacter pylori
<b>HRE</b>	high-resolution endoscopy
<b>ICAM</b>	intracellular adhesion molecule
<b>IL</b>	interleukin
<b>iNOX</b>	nitrogen oxygen szintetáz
<b>LES</b>	alsó nyelőcső sphincter (low esophageal sphincter)
<b>LGD</b>	alacsony fokú displasia (low grade dysplasia)
<b>LIMA</b>	vastagbél típusú nyák antigen (large bowel intestinal mucin antigen)
<b>LOH</b>	a heterozigotizmus elvesztése (loss of heterosigosity)
<b>LSBE</b>	hosszú szakaszú Barrett nyelőcső (long segment Barrett's esophagus)

<b>MUC</b>	nyák antigén
<b>NBI</b>	narrow band imaging
<b>NSAID</b>	nem szteroid gyulladáscsökkentő
<b>NO</b>	nitrogen monoxid
<b>PCNA</b>	sejtproliferációs mag antigén (proliferating cell nuclear antigen)
<b>PG</b>	prostaglandin
<b>Rb</b>	retinoblastoma gén
<b>RTK</b>	tirozin kináz receptor
<b>SIMA</b>	vékonybél típusú nyák antigen (small bowel intestinal mucin antigen)
<b>Src-gen</b>	tyrosin kinase of Rous sarcoma virus gen
<b>SSBE</b>	rövid szakaszú Barrett nyelőcső (short segment Barrett's esophagus)
<b>hTERT</b>	telomeráz revers transkriptáz gén
<b>TGF</b>	tumor növekedési faktor (transforming growth factor)
<b>TNF</b>	tumor nekrosis faktor
<b>TUNEL</b>	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
<b>TRAIL</b>	TNF függő apoptosis indukáló ligand (TNF-related apoptosis inducing ligand)
<b>VEGF</b>	érendothel növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)

## 4. BEVEZETÉS

### 4.1. Bevezetés

A gastroesophagealis reflux betegség a felmérések szerint a felnőtt populáció 30-40 %-át érinti (Croft és mtsai 2002). Jelentősége rendkívüli gyakorisága miatt megnőtt az utóbbi évtizedekben. A felmérések szerint az emberek mintegy ötödénél jelentkeznek, legalább hetente egyszer a betegségre jellemző típusos tünetek (gyomorégés, regurgitáció, nyelési panaszok, böfögés), melyek életminőségromlást is eredményeznek és rendszeres gyógyszereszedést igényelnek (Lagergren és mtsai 1999). A hosszan tartó tünetek mellett bizonyos szövődmények (fekélyképződés, hegesedés, daganatos elfajulás stb.) is kialakulhatnak. Értekezésemben a krónikus reflux egyik legfontosabb szövődményével, a Barrett nyelőcső kialakulásával és jelentőségével foglalkozom.

Jelen tudásunk szerint Barrett oesophagus, a krónikus gastro-oesophagealis reflux-betegség szövődményeként kialakuló praemalignus elváltozás, amely a nyelőcső-adenocarcinoma kifejlődésre hajlamosít (Lagergren és mtsai 2005).

A nyelőcső nyálkahártyáját el nem szárusodó laphám borítja, egy mechanikai és ozmótikai ingereknek igen ellenálló szövet. A kémiai ingereknek viszont kevésbé tud ellenállni ez a típusú nyálkahártya. A gyomorsav ugyanis normál körülmények között nem károsítja, mert azzal csak rövid ideig érintkezik, azonban ha többször és hosszabb ideig találkozik a gyomornedv a nyelőcső nyálkahártyájával, a nyálkahártyán szövettanilag kimutatható károsodások alakulnak ki, mert nincs olyan jelentős védekező kapacitása, mint a gyomornyálkahártyának. A károsodott nyelőcső nyálkahártyának egy speciális válasza, amikor hengerhámsejtek differenciálódása indul meg a laphámsejtek helyén, amelyek jóval ellenállóbbak a sósavval szemben, és egy másik sejttípus alakul ki a nyelőcsőben, ez a Barrett-metaplasia. Az a tény közismert, hogy Barrett metaplasia talaján jóval gyakoribb a nyelőcső adenocarcinoma kialakulása, mint az egészséges populációban (Lagergren és mtsai 1999).

A kérdés az, hogy mely pillanattól változik meg a sejtek működése a nyelőcső nyálkahártyában olyan irányba, amikor a metaplasziás hámban megindulnak azok

morfológiai átalakulások, amelyeket már displasiának nevezünk, és inentől ezt már malignus folyamatnak tekintjük.

Elképzelésünk szerint a krónikus reflux betegség talaján kialakuló oesophagitis, metaplasia endoszkópos elváltozásai mellett, a biopsziás minták szövettani morfológiájának megváltozása mellett a sejtekben is olyan molekulárgenetikai változások történnek, amelyeknek a megismerése és a későbbiben a diagnosztikus felhasználása útbaigazítást nyújthat a további kezelési stratégiában.

A Barrett metaplasia endoszkópos utánkövetése során vett biopsziás minták szövettani értékelése és a dysplasia súlyosságának megítélése szabja meg a Barrettes betegek további kezelését. A dysplasia megítélése függ a mintavétel helyétől és a patológus tapasztalatától. Az utóbbi időben felismert molekulárgenetikai változások feltérképezése során, a tumor kialakulásának megismerése mellett, olyan új diagnosztikus markerekhez juthatunk, amelyek segítségével korábban azonosíthatók és ellenőrizhetők a legnagyobb rizikójú csoportok, akár a dysplasia kialakulása előtt is. Dolgozatomban arra a kérdésre kerestem a választ, hogy vannak-e már ilyen diagnosztikus markerek a napi gyakorlatban, amelyeket a rutin endoszkópos ellenőrzésen kívül használhatunk az utánkövetésben és a korai diagnosztikában. A másik érdekes kérdés pedig az, hogy mennyire tudjuk quantitativvá tenni a patológiai kiértékelést az utóbbi időben elindult digitális patológia ismeretek felhasználásával.

#### **4.1.1 A Barrett metaplasia elnevezése és klinikai jelentősége**

A nyelőcső distális harmadában kialakuló patológiai elváltozást, amelyben a laphám átalakult hengerhámmá és fekélyképződés indul meg, legelőször 1950-ben Albers írta le, mint lényeges klinikai jelentőség nélküli érdekes esetet (Stein és mtsai 1996). Az első leírások megközelítőleg azonos időben jelentek meg két egymástól független szerzőtől, akik mindketten sebészek voltak és életük nagy részét a nyelőcsőrák sebészetének szentelték. Az egyik sebész a Párizsban dolgozó Jean-Louis Lortat-Jacob volt, aki felesége doktori disszertációjában közreadta saját megfigyeléseit öt krónikus nyelőcsőfekélyes betegről (Stein és mtsai 1996). A másik leírás Norman



Ruppert Barrett-től származik, aki a londoni Brompton Kórházból leközölt egy esetet, amelyben a nyelőcső intratorakális szakaszán krónikus ulcust talált, ami egy gyulladt hiatus herniában alakult ki. Barrett első leírásában egy veleszületett rövid nyelőcsőben kialakult fekélyről beszél, ami tulajdonképpen az intratorakálisan elhelyezkedő felcsúszott gyomornyálkahártyában alakult ki, véleménye szerint a congenitális rövid nyelőcsőben veleszületett nyálkahártyaszigetek az okai a fekélynek (Barrett 1950). (1. ábra)

Először Allison és Jakobson angol mellkassebészek ismerték fel, intraoperatív megfigyeléseikre alapozva, hogy a Barrett által leírt tubuláris gyomornyálkahártya valójában hengerhám sejtekkel bélelt nyelőcsőszakasznak tekinthető. 1953-ban Allison egy Johnstone nevű angol radiológussal összefogva elhatározták, hogy a distális nyelőcsőszakasz hengerhám bélésének kialakulását, emlékezve Norman Barrett rendkívül szerény személyiségére, az iránta való tiszteletük jeleként, ezentúl “Barrett oesophagusnak” fogják nevezni (Allison és Johnstone 1953). Először 1957-ben engedte meg Norman Barrett, hogy az általa javasolt teóriát megváltoztassák és az Allison és Johnstone javaslatát fogadják el. Ezt a döntését egy új közleményben fejtette ki, és definiálta Barrett az anatómiai kritériumokat az alsó nyelőcsőszakasz nyálkahártyájának megváltozásáról, ami a későbbiek során, mint tudjuk történelmi folyamatot indított el, mert az angolszász irodalomban ezt követően általánossá vált a “Barrett oesophagus” elnevezés (Barrett 1957).

Ugyanebben az évben, 1957-ben írta le Lortat-Jacob a francia szakirodalomban az “endobrachyoesophagus” kifejezést, ami a nyelőcső laphámjának a megrövidülését jelentette a nyelőcső izomzatának megrövidülése nélkül. Ő is felismerte és anatómiai vizsgálatokkal megerősítette, hogy a megfigyelt hengerhám az alsó nyelőcsőspinchertől proximálisan helyezkedik el, a hengerhám bélés mellett a nyelőcső speciális vérellátása, muskulatúrája megmarad peritoneális borítás nélkül (Stein és mtsai 2003).

1960-ban kezdtek érdemben foglalkozni az endobrachyoesophagus ill. Barrett oesophagus kialakulásának kérdésével és tudományos magyarázatával a nyelőcső adenocarcinoma és a Barrett epithelium összefüggésével (Stein és mtsai 2003). Felmerült a veleszületett rendellenesség és a szerzett etiológiájú betegség lehetősége is. Bremner mutatta ki először kutyákon végzett kísérletek alapján, ha az alsó nyelőcsőspinchter roncsolásával együtt, a distális nyelőcsőhámot is eltávolítja, nem

laphám, hanem hengerhám képződés indul meg. Ezzel igazolta, hogy a hengerhám kialakulása nem kongenitális eredetű, hanem szerzett jellegű kórkép. (Bremner és mtsai 1978). Az elmúlt időben megjelent közlemények többsége a szerzett jellegű megbetegedés mellett foglalt állást. Az utóbbi években a molekulárgenetikai kutatások előtérbe kerülésével megváltozni látszik ez az elképzelés, és felmerül, mint sok más betegségből a familiaritás, illetve örökletesség kérdése.



**1. ábra. Norman Ruppert Barrett /1903-1979/**

A krónikus reflux betegség talaján kialakult gyulladós nyálkahártya elváltozásoktól a metaplasziás hámon keresztül kifejlődő intraepitheliális, az ún. „in situ carcinomáig” vezető út még nem teljesen tisztázott. Minden carcinomas folyamatban számos genetikai károsodást találunk, amelyek újabb és újabb genetikai zavarokat indukálnak a sejtosztódás ciklusában és az idő előrehaladtával már olyan heterogén változásokat találunk, amelyek nehezen vizsgálhatók és definiálhatók. Fontos a kutatások szempontjából a tumor biológiai viselkedésének tanulmányozásához, hogy lehetőleg a korai, esetleg praemalignus stádiumban végezhessünk a vizsgálatokat. A

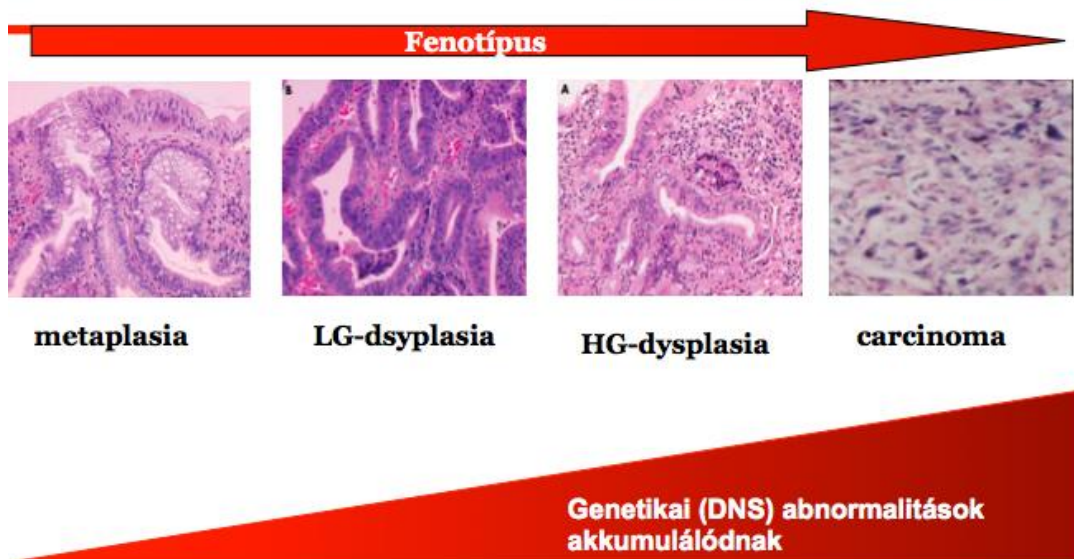
Barrett nyelőcső erre kiválóan alkalmas modell, hiszen az után követés során a gyulladás kialakulásától megfigyelhetjük a sejtekben lezajló biológiai és genetikai változásokat a metaplasiától a displasián át a carcinoma kialakulásáig. Kiemelve azt a tényt, hogy a korai stádiumban diagnosztizált nyelőcső adenocarcinoma jól gyógyítható betegségnek számít, műtét után az 5 éves túlélés 90%-os (Corley és mtsai 2002). Előrehaladott stádiumban felfedezett Barrett carcinoma miatt végzett radikális nyelőcső resectio után az 5 éves túlélés mindössze 7% (Corley és mtsai 2002).

#### **4.1.2 Patológiai változások**

A carcinogenezis folyamatában fellépő genetikai változások megelőzik a dysplasia kialakulását. Egy jól definiált morfológiai sor vezet az intestinális metaplasiától a displasián át az adenocarcinoma kifejlődéséig, mindezt biopsziás mintákban szövettanilag lehet vizsgálni (2. ábra). Displasia esetén a hám a daganatos átalakulás jeleit mutatja, amely alatt a sejtek és mirigyek struktúrájának megváltozását értjük a basális membrán áttörése nélkül. A dysplasia egy praemalignus állapotnak tekinthető. Jellemzője a fokozott mitotikus aktivitás, megnagyobbodott hiperkróm sejtmagokkal (Morales és mtsai 1997).

A displasiának két típusát különböztetjük meg a low grade displasiát (LGD) és a high grade displasiát (HGD). HGD-ban megkülönböztetünk két további altípust a fokális és diffúz típust. A diffúz típusú high grade dysplasia hordozza a legmagasabb rizikót az adenocarcinoma kialakulására. Jelenleg a metaplasiás esetek ellenőrzése során az endoszkópos biopsziás minták szövettani vizsgálata az alapvető eszköze a dysplasia kimutatásának (Offerhaus és mtsai 2003).

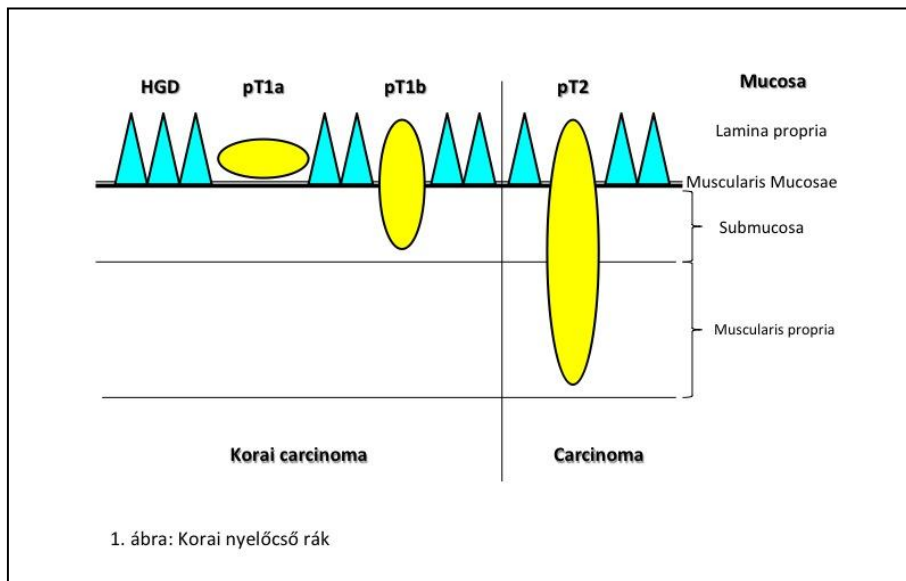
## Barrett-nyelőcső: Carcinogenesis



### 2. ábra. Metaplasia-displasia-adenocarcinoma folyamata

Irodalmi adatok szerint HGD-ban a betegek 50%-ban fejlődik ki adenocarcinoma a nyelőcső alsó szakaszán (Guindi és Riddel 2003). HGD-ban a sebészi eltávolítás után az 5 éves túlélési ráta nagyobb, mint 80-90 % (Haedrick és mtsai 2002). Barrettes betegek endoszkópos után követése során igazolt high grade dysplasia esetén végzett nyelőcső resectiók után az eltávolított nyelőcsőben már 40-55%-ban kimutatható volt az occult adenocarcinoma (Haedrick és mtsai 2002).

Intramucosalis adenocarcinoma (pT1a) esetében a displasias sejtek áttörik a basalis membránt, de nem jutnak át a muscularis mucosán (Schlemper és mtsai 2000). Ide soroljuk még a Vienna klasszifikáció alapján a submucosába betérjedő, a muscularis mucosán áttörő submucosalis carcinomát (pT1b) (Schlemper és mtsai 2000). Ezeket együtt a Vienna klasszifikáció szerint „korai Barrett carcinomának” nevezzük (Stein és Siewert 1994) (3. ábra).



### 3. ábra. Sematikus rajz a „korai Barrett carcinoma” ábrázolására

Az egészséges nyelőcső laphámsejtjei a fiziológias reflux tevékenység következtében nem károsodnak. A normál epitheliális sejtekhez hasonlóan a nyelőcső hámsejtjei is állandó pusztulásban és újraképződésben vannak a somaticus állandó őssejtek osztódásának eredményeként (Stein és Feith 2005). Kóros esetekben (hosszabb savexpozíciós idő, alacsony LES nyomás, hiatus hernia, stb.) makroszkóposan is észlelhető gyulladás alakul ki a nyelőcső alsó harmadán. A nyálkahártya diffúzan vagy foltosan hyperaemiássá válik. A szövettani mintákban látszik, hogy a felszíni hámsejtek károsodnak, lelöködnék, alattuk plazmasejtek és limfociták szaporodnak fel. Először erosiók, majd mélyre terjedő fekélyek alakulnak ki. A fekélyek körül a submucosában kötőszövet szaporulat figyelhető meg, ami a fal koncentrikus megvastagodásához, hegesedéséhez vezet. A kóros reflux tevékenység megszűnése után a normál laphám újraképződik. Hosszabb ideig fennálló, nem kezelt, krónikus reflux esetén azonban nem laphám képződik, hanem kifejlődhet, a praecancerosusnak tekintett Barrett nyelőcső. A nyelőcső nyálkahártya pluripotens őssejtjei alacsony pH mellett hengerhám sejtekké differenciálódnak, amelyek ellenállóbbak a savas gyomortartalommal szemben (Seery 2002, Stolte és Vieth 2002). Barrett nyelőcsőben a hengerhám három típusát különböztetjük meg:

- a) gyomor-fundus jellegű hám: nyáktermelő parietális és fősejtekkel
- b) junkcionális típusú epithelium: normál cardiahámra jellemző sejtekkel
- c) **intestinális metaplasia**: foveoláris, kehely-és endokrin sejtekkel

Ez utóbbi hajlamosít leginkább displasiára és adenocarcinoma kialakulására (Castell és Richter 1999).

A biopsziás mintákban ezeket a hengerhám irányába differenciálódott sejteket tudjuk azonosítani. A kehelysejtek megjelenése az alsó harmadi nyelőcsőben biztos diagnosztikus jel a Barrett nyelőcső igazolására (Reid és mtsai 2000, Morales és mtsai 2002). A pluripotens sejtek, amelyekből a Barrett epithelium létrejön, vagy a gyulladással nyálkahártya papilláiból származnak, vagy a nyelőcső mirigyében található és a gyulladás alatt kolonizálják a nyelőcsövet (Guindi és Riddel 2003).

A szakirodalomban, ha a nyelőcső alsó harmadának legalább 3 cm-es szakaszán kialakul a hengerhámra jellemző morfológiai és szövettani kép, azt Long Segment Barrett Esophagusnak (LSBE) nevezzük. A 3 cm-nél rövidebb szakaszt érintő megbetegedést Short Segment Barrett Esophagusnak (SSBE) nevezzük (Corley és mtsai 2002). Az oesophago-gastricus junkció illetve a cardia területét érintő intestinális metaplasia Ultrashort Barrettnak nevezzük (Fitzgerald 2005). Adenocarcinoma kialakulása szempontjából a Long Segment Barrett Esophagust tekintjük a legnagyobb veszélyeztető tényezőnek (Corley és mtsai 2002). A LSBE prevalenciája az életkor előrehaladtával növekszik, majd elér egy „plató” szintet (Conio és mtsai 2003).

Az Ultrashort Barrett azonban különálló betegségnek tekinthető, mivel makroszkóposan normál hámmal fedett junkció területéről vett biopsia hisztológiailag detektálható kehelysejteket tartalmaz. A cardia környéki intestinális metaplasia (CIM) inkább *Helicobacter pylori* fertőzéssel hozható összefüggésbe (Malferteiner és Petz 2005). Eradikációs kezelést követően az Ultrashort Barrett drámai javulást mutat. A savcsökkentők szedése viszont nem befolyásolja ennek a betegségnek a lefolyását. Ennek differenciáldiagnosztikai jelentősége van (McDonald és mtsai 2000).

Mi az oka a nyelőcső laphámsejtjeinek hengerhámmá történő átalakulásának? A hengerhám kialakulásának biológiai értelme az, hogy ez a szöveti típus sokkal ellenállóbb a savas, illetve epés jellegű refluxatummal szemben, mivel nyáktermelő képessége is van. Ez a nyák, vagy gél mucin nevű összetett fehérjéket tartalmaz (Arul és mtsai 2000). A mucinok nagy molekulatömegű glikoproteinek, amelyeket az

epitheliális szövetek mindegyike termel (Lagergren és mtsai 1999). A hengerhámsejtek neutrális mucint termelnek, hasonlóan a gyomor epitheliális sejtjeihez. Az intestinális metaplasia kehelysejtjei pedig savas jellegű mucint termelnek (Chen és mtsai 1999). Haematoxin-Eosin festéssel a neutrális mucin piros, a savas mucin kék színű (Guillem és mtsai 2000). A kehelysejtek által termelt mucinnak két altípusát különböztetjük meg, a sialomucin és a sulfomucint. Barrett mucosában kimutatható kehelysejtekben mindkét mucin típust megtaláljuk (Guillem és mtsai 2000).

A nyáktermelő hengerhámsejtek és kehelysejtek által termelt mucint immunhisztokémia és in situ hibridizációs tesztekkel is ki tudjuk mutatni (Morales és mtsai 1998). Az immunhisztokémiai kimutatás előnye a mucin mRNS in situ hibridizációs módszerrel szemben, hogy gyorsabb és egyszerűbb (Arul és mtsai 2000). A MUC antigének (MUC1, MUC2) különböző altípusainak kimutatása igent fontos a Barrett nyelőcső diagnosztikájában (Burjonrappa és mtsai 2007). Több tanulmányban a MUC2 expressio csökkenését figyelték meg Barrett nyelőcsőben daganatos elfajulás esetén (Burjonrappa és mtsai 2007). A MUC1 antigén viszont alig volt kimutatható metaplasias és displasias nyelőcsőhámiban, carcinoma esetén azonban expressiója jelentősen emelkedik (Peuchmaur és mtsai 1984).

#### **4.1.3 Epidemiológia**

A nyugati populáció 15-30%-át érintő krónikus gastro-oesophageális reflux mellett mindössze 1-3 %-ra tesszük a Barrett metaplasia kialakulását (Croft és mtsai 2002). Igazolt reflux betegeknél 5-10 %-ban alakul ki metaplasias hám a nyelőcsőben (Castell és Richter 1999). Érdekes tény, hogy Japánban is a reflux meglehetősen gyakori betegségnek számít, de a Barrett nyelőcső lényegesen ritkábban fordul elő az endoscopos leletek között (Devesa és mtsai 1998). Epidemiológiai tanulmányok igazolták továbbá, hogy Barrett nyelőcső esetén a nyelőcső adenocarcinoma kifejlődésének esélye 30-125-ször nagyobb (Jenkins és mtsai 2002). Metaplasia esetén a nyelőcső adenocarcinoma kialakulásának kockázata 2-5%, dysplasia esetén azonban 25-50% (50). Prospektív tanulmányok elemzése alapján a Barrettes betegek 1%-ában fejlődik ki 1 éven belül adenocarcinoma (Shrama és Sidorenko 2002). Egy másik

tanulmány a betegek után követéséből arra a következtetésre jutott, hogy a metaplasia felismerése után 1 évvel az adenocarcinoma kifejlődésének valószínűsége 0,5-1%, tíz év után már 5-10 % a valószínűsége, 20-30 év után már 18-36% (Reid és mtsai 2003). Az előrehaladott állapotban felismert és operált nyelőcső adenocarcinoma túlélése 7% (Haedrick és mtsai 2002). Sajnos a legtöbb beteg előrehaladott stádiumban jelentkezik, ami kizárja a kuratív kezelés lehetőségét és előrevetíti a rossz prognózist. Az agresszív kezelési stratégiák ellenére a túlélés nem javult szignifikánsan az elmúlt 20-30 évben (Geboes és Van Eycken 2000). A korai Barrett carcinomának viszont az 5 éves túlélése sebészi kezelést követően 90% (Fults és Taussky 2011). Ezért mindenképpen a korai felismerésre kell törekednünk. Hogyan tudjuk időben felismerni olyan esetekben a Barrett metaplasiat, akiknél soha nem fordultak elő GERD-re jellemző refluxos tünetek? Refluxos tüneteket nem produkáló emberekre vonatkozóan a Barrett nyelőcső prevalenciájáról nincsenek adataink. Arra vonatkozóan vannak adataink, hogy 50 éves kor felett végzett colonoscopos szűrővizsgálatok mellett egyúttal gastroscopos vizsgálatot is végeztek refluxos tüneteket nem produkáló betegeken. Az így megvizsgált betegek 25%-ánál tünetmentes Barrett nyelőcsövet igazoltak a kiegészítő felső panendoscopos vizsgálatokkal (Rex és mtsai 2003). Egy másik vizsgálatban azt találták, hogy típusos fekélyes panaszok miatt végzett gasztroszkópia kapcsán 9,5 %-ban fordult elő Barrett metaplasia (Ramel 2003), diszpepszia miatt végzett endoscopos vizsgálatok során 6%-ban találtak Barrett jelenséget (Sharma és mtsai 2000). Mindezek fényében azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a Barrett nyelőcső prevalenciája lényegesen nagyobb annál, mint eddig feltételeztük. Az ismert refluxos betegek 5-10%-án kívül sokkal szélesebb a potenciálisan veszélyeztetettek köre (Sharma és Sidorenko 2002). Annak ellenére, hogy a Barrett nyelőcső kialakulásában a krónikus refluxnak jelentős szerepe van a Barrettesek 40 %-ának soha nem volt GERD-re jellemző típusos tünete (Sharma és mtsai 2004).

A kérdés, hogy a fennálló Barrett metaplasia miért és hogyan vezet egyes esetekben jól definiált morfológiai folyamat során, egyre emelkedő gradiensű displasián át az intramucosalis adenocarcinoma kialakulásáig (Buttar és mtsai 2001)?

Egy rendkívül széles, többlépcsős, genetikai illetve sejtbiológiai szintű folyamat eredményezi a metaplasia-displasia-adenocarcinoma szekvencia kialakulását (Jankowski és mtsai 1999). A genetikai változások feltérképezése igen fontos, mert



azon túl, hogy modellezheti a tumorgenezis mechanizmusát, és a molekulárgenetikai módszerek segítségével prognosztikai markerekhez is jutunk, amelyekkel pontosabban azonosíthatók, és ellenőrizhetőek a legnagyobb rizikójú csoportok. A Barrett metaplasia megjelenése után a dysplasia és adenocarcinoma csak kisszámú esetben fordul elő. Ez arra utal, hogy a refluxon kívül vannak más faktorok is, amelyek szerepet játszanak a malignus átalakulás folyamatában.

Az utóbbi három-négy évtizedben az Amerikai Egyesült Államokban más malignus betegségeknél nagyobb mértékben növekedett a nyelőcső adenocarcinomás esetek száma (Wang és Sampliner 2008). Nagy-Britanniában a daganat incidenciája drámai módon nyolcszorosára emelkedett (Wang és Sampliner 2008). Az ötödik leggyakrabban előforduló daganat Nyugat-Európában (Zeki és Fitzgerald 2015). Az incidencia növekedésének oka eddig nem teljesen tisztázott. Számos tanulmány elemzése alapján megállapítható, hogy elsősorban a kaukázusi típusú, fehér férfiakon figyelhető meg a nyelőcső adenocarcinoma incidenciájának növekedése (Lagergren 2005), ugyanakkor a nyelőcső laphámrák incidenciája az utóbbi három évtizedben ugyanitt kifejezett csökkenést mutatott. A nyelőcső adenocarcinoma előfordulása férfi dominanciát mutat, a férfi/ nő arány 7/1 (Lagergren 2005).

#### **4.1.4. Etiológia**

A Barrett metaplasia kialakulásában a legfontosabb etiológiai tényező a krónikus reflux betegség mellett még számos más faktort is leírtak (Menke – Pluymers és mtsai 1993).

Kialakulásban szerepet tulajdonítanak az elhízásnak is. A nyugati országokban a body-mass index (BMI) általános emelkedésének, és az obesitas prevalenciájának növekedése indokolja, hogy ne hagyjuk figyelmen kívül, mint egy lehetséges rizikótényezőt (Fléjou 2005). Az alkoholfogyasztás és a dohányzás eddigi ismereteink szerint nem jelentenek egyértelműen fokozott kockázatot (Gammon és mtsai 1997). Egy tanulmány azt állítja, viszont, hogy a dohányosoknál 55%-al nagyobb a kockázat az adenocarcinoma kialakulására, míg a rendszeres alkoholfogyasztás nem volt befolyással a betegség kialakulására (Freedman és mtsai 2007).

Csökkent zöldség-és gyümölcsfogyasztás is újabb rizikófaktornak tekinthető (Gerson és mtsai 2002).

Végül egyértelműen rizikó csoportba soroljuk az eddigi ismereteink alapján az 50 és 70 év közötti életkorban levő fehér, obes [BMI > 30] férfiakat, akiknél legalább 10 éve fennállnak a refluxos tünetek (Chow és mtsai 1998).

Számos adat támasztja alá azt a hipotézist, hogy *Helicobacter pylori* fertőzés csökkentheti a nyelőcső adenocarcinoma kialakulásának rizikóját (Blaser 1999). Vicari és munkatársai megfigyelték, hogy a cytotoxin-asszociált gene A pozitív [CagA+] *Helicobacter pylori* fertőzött egyénekben nincs hajlam a metaplasia kialakulására (Chow és mtsai 1998). A *H. pylori* fertőzés előidézte atrophias gastritisben csökken a gyomor savtermelő kapacitása, de nem tisztázott mennyiben befolyásolja ez a GERD lefolyását (Goldblum és mtsai 1998). Egy metaanalízis kapcsán Rokkas és munkatársai kimutatták, hogy szignifikáns inverz kapcsolat áll fenn a Barrett metaplasia/adenocarcinoma kialakulása és a *Helicobacter pylori* fertőzés között (Rokkas és mtsai 2007).

Érdekesség, hogy a Barrett-nyelőcső familiáris formáját is leírták már olyan családokban, ahol a refluxra való hajlamot monogénes öröklődéssel adták tovább és a Barrett nyelőcső vagy adenocarcinoma halmozottan fordult elő (Chak és mtsai 2002). Az utóbbi időben sikerült azonosítani a 13-as kromoszóma hosszú karján egy kromoszómaszakaszt (13q) ami családi halmozódást mutató refluxos esetekben az öröklésért felelős lehet (Chak és mtsai 2002).

Az okok széles skálája mellett sajnos egyértelmű állásfoglalás még nem született, a Barrett nyelőcső kialakulásának pontos eredetére, ezért fontos az utánkövetés és a rendszeres ellenőrzés, aminek a legfontosabb eszköze az endoszkópia.

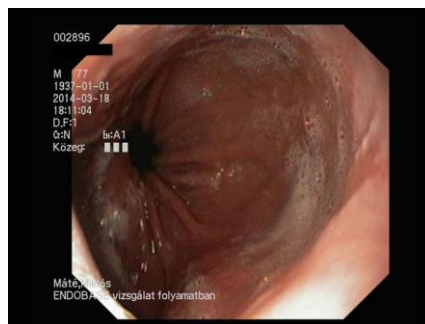
#### **4.1.5. Az endoszkópia szerepe és utánkövetés**

Az endoszkópos vizsgálatok egyik kihívása a neoplasztikus léziók korai detektálása Barrett-nyelőcső esetén (Falk és mtsai 1999). A protokoll szerint a biopsziákat 4 quadránsból 2 cm-enként kell venni, más guideline-ok random biopsziákat ajánlanak, ez azonban elkerülhetetlenül ál-negatív eredményeket is hoz (Connor és mtsai 2002). Retrospektív tanulmányokból kitűnik, hogy azokban a Barrettes esetekben, amelyeket rendszeresen endoszkóposan ellenőriztek kevesebb adenocarcinoma fejlődött

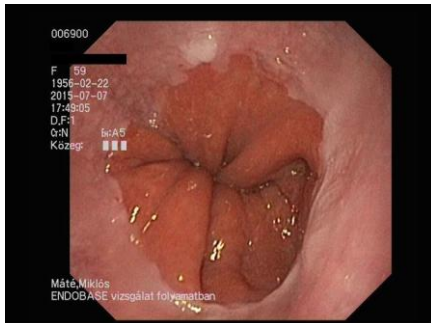
ki, mert idejében elkezdtek a megfelelő terápia alkalmazását, mint azokban az esetekben, amelyeket a felismerés után rendszeresen nem ellenőriztek (Sharma és Sidorenko 2002). Randomizált, mintegy 5000 beteget magába foglaló, legalább 10 éves után követést tartalmazó tanulmányra lenne szükség egyértelmű következtetések levonására, ami jelenleg még nem áll rendelkezésünkre (Sharma és Sidorenko 2002). A biopsziák mindemellett anyagot biztosítanak a kutatásokhoz, amelyek e témában folynak. Az alábbiakban néhány a tanulmányban szereplő megbetegedés jellemző endoszkópos képe látható (4. ábra).



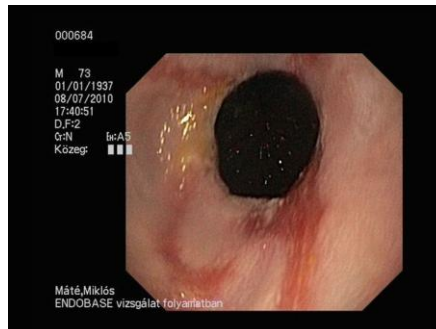
**Ép nyelőcső**



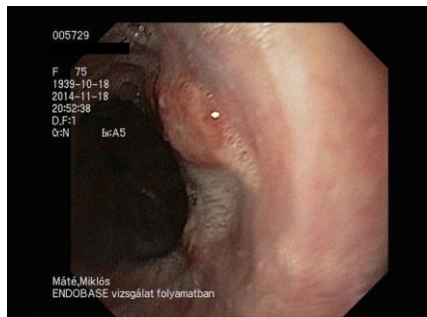
**Hiatus hernia**



**Reflux oesophagitis**



**Barrett metaplasia**



**Barrett carcinoma**

**4. ábra. Jellemző endoszkópos elváltozások /saját anyag/**

Világszerte alkalmazott eljárás a Barrett hám gyanúja esetén a nyelőcső nyálkahártya festése. A napi gyakorlatban a metilénkék az indigócarmin és a lugol festés terjedt el. A festési eljárások hasznossága és megbízhatósága vitatott kérdés.

Napjainkban az egyre fejlődő endoszkópos eljárások diagnosztikai szempontból háttérbe szorították a festési technikákat (Spechler 2014).

A fény indukálta fluorescensendoscopia (LIFE) alkalmazásakor a száloptikás vizsgálatok során használt fehér fényt juttatjuk a nyálkahártyára, de egyelőre ez a technika csak hagyományos száloptikás endoszkópok alkalmazásával kivitelezhető, amelyeknek a képalkotási minősége rosszabb, mint a video endoszkópoké és a nagy felbontású endoszkópoké (HRE) (Spechler 2014).

A narrow band images (NBI) technika a nyálkahártya részletgazdagabb felismerését teszi lehetővé. Az NBI rendszer a nagyfelbontású endoszkópos technikában használt fehér fényt kombinálja piros, zöld és kék szűrők egymás utáni alkalmazásával, és ez által részletgazdagabb képet kapunk a nyálkahártya állapotáról és microcirkulációjáról.

Egy multicentrikus nemzetközi vizsgálatban új endoszkópos technikákat alkalmaztak a korai neoplasia felismerésére. Az ún. tri-modal endoszkópos technikák segítségével (high-resolution endoscopy [HRE], autofluorescence imaging [AFI], narrow-band imaging [NBI]) a random biopsziák helyett, az endoszkópia során összevették a nagy felbontású képet, és a megváltozott nyálkahártya eltérő autofluoreszcenciáját mutató képet a narrow-band-imaging-gel készített képpel, hogy a mintavétel hatékonyságát és specificitását optimalizálják. Az NBI lehetőséget nyújt arra, hogy láthatóvá tegyünk a nyálkahártya szerkezetét és érmintázatát. A vizsgálatban kimutatták, hogy mind a nyálkahártya szerkezete, mind annak az érrajzolata irreguláris felépítést mutat high grade dysplasia és adenocarcinoma esetén, míg Barrett metaplasiában a nyálkahártya szabályos mintázatú és érrajzolatú (Souza és Spechler 2003).

A Barrett metaplasia utánkövetése nagyon fontos, de általánosan elfogadott vélemény szerint a túl gyakori mintavételnek nincs sok értelme (Spechler 2014). A jelenleg elfogadott álláspont szerint metaplasiában elegendő 2-3 évente elvégezni az endoszkópos vizsgálatot (Sontag és mtsai 2002). Low grade dysplasia (LGD) esetén háromhavonta vagy félévente javasolják az endoszkópos ellenőrzést szövettani mintavétellel együtt kiegészítve operatív endoszkópos mucosa eltávolítással

(mucosectomia, argon plasma koaguláció, photodinámiás kezelés stb.). Súlyos dysplasia esetén (HGD) javasolják a csökkentett radikalitású nyelőcső resectiot (Merendino műtét), akiknél a fenti műtét csak nagy kockázattal végezhető el javasolják az utánkövetést és a mucosectomiát (Spechler 2002, Stein 1996).

A Barrett metaplasia-displasia-adenocarcinoma szekvencia korai felismerésére és utánkövetésére az endoszkópos ellenőrzésen kívül hatékony módszerek gondoljuk néhány molekuláris genetikai marker vizsgálatának gyakorlati bevezetését (Van der Woude és mtsai 2002). Mivel tudjuk milyen gyakorisággal alakul át a metaplasias hám daganattá, de előre viszont nem tudjuk kiknél és milyen gyorsan következik be ez a változás, ezért a metaplasias hám jelenléte nem elégséges biomarkere a malignus elfajulásnak (Stolte és Vieth 2002). A folyamat pontos ismeretének hiányában lehetetlen előre megjósolni, hogy mely betegek veszélyeztetettek jobban és kevésbé. Jelenleg nem áll a rendelkezésünkre olyan biomarker, ami a Barrett nyelőcsőves betegek esetében megbízhatóan kijelölné a daganatos elfajulásra hajlamos egyéneket (McDonald és mtsai 2000, Zaninotto és mtsai 2005).

#### **4.1.5. Az antireflux műtétek szerepe**

A primer gastroesophagealis reflux betegség kezelésében az individuálisan megtervezett és kivitelezett refluxgátló műtét elfogadható alternatívát jelent a komplex belgyógyászati kezelés (diéta, életmódbeli változások, gyógyszerek) mellett (Bálint és mtsai 1999). A korábbi évtizedek gyakorlatában a sebészi kezelés szükségessége csak szövődmények kialakulásakor (hegesedés, vérzés, daganatos elfajulás) esetében merült fel. Napjainkban megfelelően kiválasztott kautélák mellett, még a szövődmények kialakulása előtt elvégzett plasztikai refluxgátló műtét világszerte elfogadottá vált (Bálint és mtsai 1999). A laparoszkópos technika elterjedése és gyakorlata a műtét kockázatát csökkentette, a posztoperatív korai és késői eredmények és szövődmények ismerete gasztroenterológusok és sebészek között egyaránt az antireflux műtéteket elfogadottá tette (Bálint és mtsai 2000).

A műtéti indikáció felállításában a végső döntést sebész hozza meg a belgyógyász-gasztroenterológus javaslata alapján. A műtét előtt az endoszkópos vizsgálat mellett szükséges a nyelőcső funkcionális vizsgálatok (manometria, 24 órás

pH mérés, vagy kétséges esetben nyelőcső impedancia mérés, 24 órás Bilitec vizsgálat) elvégzése is (Bálint és mtsai 1999).

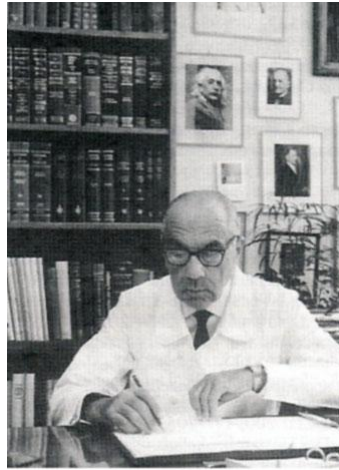
Műtéti beavatkozás a következő esetekben tartunk szükségesnek:

- a gyógyszerek elhagyása után a panaszok kiújulása az ún. gyógyszerfüggő panaszmentesség
- szövődmények jelentkezése (pl.Barrett metaplasia, nyelőcsőfekély)
- pH méréssel igazolt kóros mértékű reflux a nyelőcsőben (DeMeester score)
- manometriával igazolt defektív alsó nyelőcsősphincter, és megtartott propulzív motoros tevékenység a nyelőcsőtestben,
- refluxhoz társuló hiatus hernia és volumen reflux
- gyermekkori szövődménymentes esetekben és fiatal életkorban, amelyeknél egész életen át tartó folyamatos gyógyszeresedés jelenti az alternatívát a műtéttel szemben.
- extraoesophageális manifesztáció

A laparoszkópos antireflux műtét az elfogadható kockázat mellett, a könnyű posztoperatív időszak és a relatíve gyors rehabilitáció miatt a betegek számára vonzó megoldásnak tűnik. Lehetővé teszi a gyógyszerek elhagyását és tartós refluxmentességet eredményez. A laparoszkópos fundoplikáció után a beteg 2-3 nap múlva a kórházból elbocsátható, ezzel szemben a hagyományos antireflux műtét utáni kórházi tartózkodás még mindig 6-10 napot igényel. A postoperatív fájdalom és a kozmetikai eredmény is a laparoscopos műtétek mellett szól (Allaix és Patti 2015).

A műtét helyreállítja a nyelőcső és a gyomor között normális esetben meglévő mechanikai barriert az ún. His-szöveget, olyan szelepmechanizmust alakít ki, amely nem akadályozza meg a normális nyelési folyamatot, böfögést, hányást, de megakadályozza a kóros regurgitációt. Visszakerül a gastroesophagealis junkció a hasüregbe, a kitágult rekesszárat beszűkítjük és a mobilizált fundus felhasználásával szelepszerű mandzsettát képzünk. A műtét után csökken a nyelőcső strictura és az erosív esophagitis előfordulása (Bálint és mtsai 1999) . A Barrett nyelőcső kialakulásának az előfordulására és az adenocarcinoma kifejlődésének a csökkenésére fundoplicatio elvégzése után evidenciák nincsenek (Curvers és mtsai 2008).

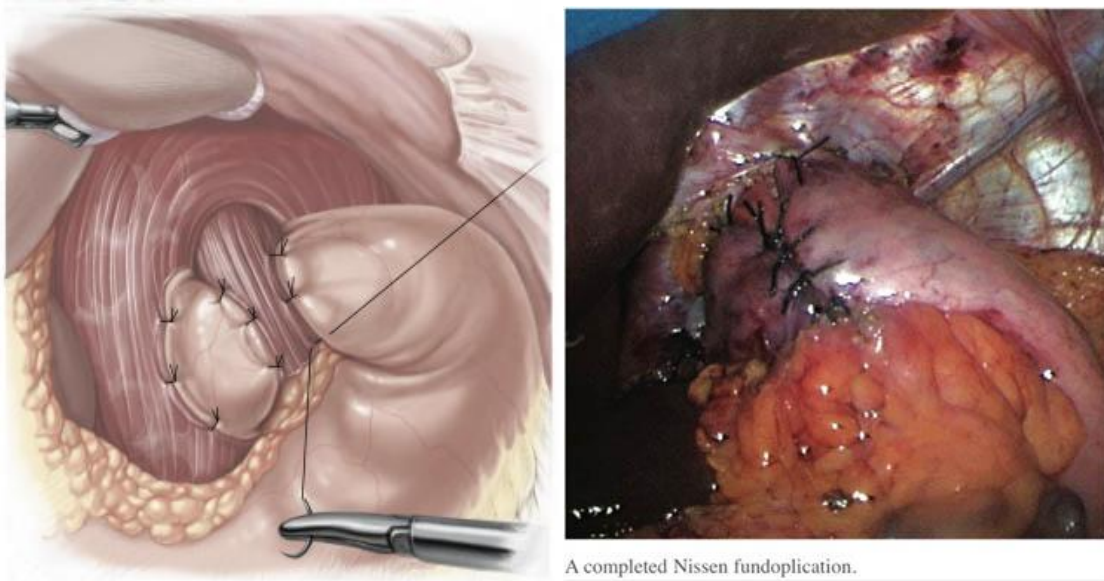
Az első antireflux műtétet Rudolf Nissen (1896-1981) végezte Baselben 1956-ban. (5. ábra) Az eset érdekessége, hogy krónikus refluxbetegség talaján kialakult nyelőcsőstricturát perforáltak, merev endoszkóppal. Nissen a nyelőcső perforációt a mobilizált gyomor fundussal fedte be és a beteg meggyógyult a beavatkozást követően (Fulst és Taussky 2011). Nissen zsenialitása abban nyilvánult meg, hogy felfigyelt arra, hogy a beteg refluxos panaszai is megszűntek a műtét után. Ezt követően számos fundoplicatiót végzett 360 fokos fundusmandzsetta felhasználásával krónikus refluxos panaszok miatt. Rudolf Nissen munkatársaként dolgozó Mario Rosetti módosító javaslata alapján terjedt el a „floppy Nissen fundoplicatio”, amit a napi gyakorlatban már Nissen-Rosetti-féle műtétnek nevezünk (Fulst és Taussky 2011).



Dr. Nissen 1896-1981

### 5. ábra. Dr. Rudolf Nissen ([www.maimonides.org](http://www.maimonides.org))

A Nissen Rosetti fundoplicatio napjainkban az egyik leggyakrabban végzett antireflux beavatkozássá vált, ami mint annyi más új felfedezés, egy véletlennek és egy zseniális megfigyelésnek köszönheti az elterjedését. A laparoscopos sebészet bevezetése után az antireflux műtétek száma is megnövekedett. A teljes 360 fokos Nissen fundoplikáció mellett elterjedt posterior parciális fundoplikáció (Toupet) és az anterior parciális fundoplikáció (Dor) is, amelyeknél a fundusmandzsettával nem körkörös, hanem csak részlegesen, 180 fokban hátulról, vagy előlről vesszük körül a nyelőcsövet (Bálint és mtsai 1999). (6. ábra) A műtéti típus megválasztásánál alapvető szempontnak tekintjük a nyelőcsőtest motilitásának ép vagy csökkent funkcióját. Csökkent nyelőcsőtest motilitásban inkább a parciális fundoplikációt választjuk. A mellkas felől is elvégezhető a fundoplikáció ezt Belsey-műtétnek nevezzük. (Bálint és mtsai 2000).



### 6. ábra: Parciális posterior (Toopet) és teljes fundoplikáció (Nissen)

Forrás: herniamed.de, 2015

A műtétek korai szövődménye lehet az ún. teleszkóp jelenség, amikor fundoplikáció mandzsettája lefelé vagy felfelé elcsúszik a nyelőcsövön, a túl szorosra kalibrált fundus mandzsetta miatt diszfágia léphet fel. Az öltések kiszakadása miatt a mandzsetta és rekeszszárok szétnyílnak. A túl mélyre helyezett öltések, amelyek átöltik a gyomor teljes falát, ritkán bevérzést okoznak és a kialakult vérömleny befertőződhet és hasüregi tályog kialakulásához vezethet (Aujesky és mtsai 2014). Szövődmények miatt végzett ún. redo műtétek kivitelezése is laparoscópos beavatkozást ajánlják, amivel az adott mechanikai probléma megoldható, ill. a tályog evakuálható (Spechler 2014). Több száz nyitott és laparoscópos műtét eredményeit ismerve saját tapasztalatunkból, bátran állíthatjuk, hogy krónikus gastrooesophagealis reflux betegség kezelésére jól kivizsgált és gondosan szelektált betegeknél a laparoscópos antireflux műtét hosszú távon is jó eredményt mutat.

Antireflux műtétek után azonban az utánkövetett betegekben a műtét előtt igazolt Barrett metaplasia ismételen kialakul, amire pontos magyarázatot még nem sikerült találnunk (Souza és mtsai 2001). Az irodalmi adatok alapján az antireflux műtétek a dysplasia és adenocarcinoma rizikóját csökkentik, de nem védnek meg tőle. Az antireflux műtétek száma az utóbbi évtizedekben ugrásszerűen megnőtt, ennek



ellenére a nyelőcső adenocarcinomák száma nyolcszorosára emelkedett (Sharma és mtsai 2004, Lagergren 2005, Spechler 2002).

Tehát kell lenni a krónikus reflux tevékenység mellett más, olyan eddig számunkra még ismeretlen tényezőknek, minden bizonnyal genetikai eltéréseknek, amelyek a metaplasia-displasia-adenocarcinoma átalakulási folyamatát befolyásolják.

#### 4.1.6. A Barrett carcinoma műtéti kezelése

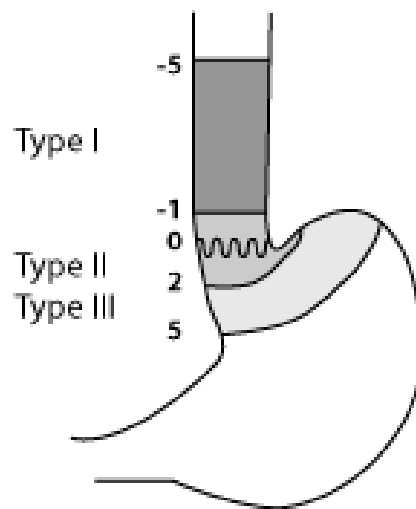
A nyelőcsőrakok kisebb részét mintegy, 8%-át kitevő adenocarcinoma incidenciája az elmúlt 20-30 évben a fejlett nyugati országokban ugrásszerűen megemelkedett, ahogy a bevezetőben már említettük (Axelrad és Fleischer 1998). A laphámrák incidenciája ugyanezekben az országokban pedig csökkent (Devesa és mtsai 1998). Vannak bizonyos faktorok (krónikus reflux, obesitas stb.) amelyek szerepet játszhatnak a kialakulásában, de az igazi ok ismeretlen (Menke – Pluymers és mtsai 1993). Az egyetlen eddig ismert rizikófaktor a nyelőcső adenocarcinoma kialakulásában a Barrett metaplasia, amit precancerosisnak tekintünk (Bani – Hani és mtsai 2000). A Barrett nyelőcső miatti endoszkópos surveillance nem hozott áttörést, mert a nyelőcső adenocarcinoma előfordulása továbbra is növekszik (Corley és mtsai 2002). Mégis a klinikusokat és a kutatókat továbbra is élenként foglalkoztatja az a felismerés, hogy Barrett metaplasia után következő különböző displasias stádiumok után alakul ki nyelőcső adenocarcinoma, aminek a kezelésében csak akkor várhatunk megbízható eredményeket, ha időben, korai stádiumban sikerül felfedezni (Cameron 2000).

A nyelőcső alsó harmadán kialakuló adenocarcinomák klasszifikációját Siewert végezte el (Sontag és mtsai 2002). Három csoportba sorolta a nyelőcső alsó harmadi tumorokat (7. ábra)

- I. Típus: Adenocarcinoma a distális nyelőcsőben-Barrett carcinoma
- II. Típus: Cardiatumor
- III. Típus: Subcardális tumor

A klasszifikáció alapját a tumortömeg elhelyezkedése jelentette. Az oesophagogastrikus junkció alatt és felett 1-1 cm-rel elhelyezkedő tumor ezen tipizálás alapján a cardia tumor. Alatta 5 cm-rel subcardiális tumor, felette 5 cm-rel alsó harmadi

nyelőcső tumor a hivatalos elnevezés. A tipizálás értelme, a különbségtétel betartásának oka a kezelési taktika és a műtét típusának a megválasztása. Siewert klasszifikációja alapján a cardia tumor és subcardiális tumor sebészi ellátása a laparotomiából végzett total gastrectomia oesophago-jejunostomiával. A számunkra érdekes Barrett carcinoma esetén a javasolt műtéti eljárás **subtotális oesophagectomia**, proximális gyomorreseccióval (Akiyama-szerint) bal oldali thoraco-laparotomiából vagy a hasüreg felől laparotomiából transhiatálisan (Fulcs és Taussky 2011).



**7. ábra. Siewert klasszifikáció**

Előrehaladott stádiumú nyelőcső adenocarcinoma esetén a gold standard eljárás a subtotális nyelőcső resectio kiterjesztett nyirokcsomó disszekcióval (Stein 1996). A perioperatív műtéti mortalitás 10 %. Az operabilis esetek után az 5 éves túlélés 20% körül mozog. Sajnos a felfedezett Barrett carcinomáknak kevesebb mint fele, kb. 40%-a alkalmas radikális műtetre (Fulcs és Taussky 2011). Palliatív kezelésként alkalmazható endoprothesis illetve tápláló gastrostomia vagy jejunostómia behelyezése (Dagnini és mtsai 1986).

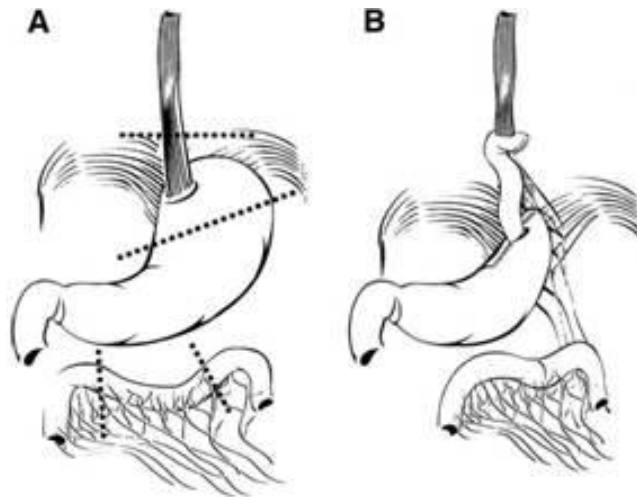
Az igazi problémát az jelenti, hogy korai stádiumban, amikor még nem alakulnak ki nyirokcsomó metastasiok, a daganat nem terjed a submucosán túl (pT1b). Ebben az esetben felmerül az a kérdés, milyen kezelési stratégiát válasszunk. A korai stádiumban végzett subtotális nyelőcső resectio rossz morbiditási és mortalitási adatai

arra ösztönözték a sebészeket és gasztroenterológusokat, hogy új kezelési stratégiát dolgozzanak ki az ún. „korai Barrett carcinomában” (Stein és Siewert 1994).

High grade displáziában - ahol még nincsenek nyirokcsomó metasztázisok - alkalmazhatók a különböző terápiás endoszkópos eljárások (photodinámias kezelés, argon plasma koaguláció, endoszkópos mucosa resectio) akár egyenként vagy kombinálva (Aujesky és mtsai 2014). A fenti eljárások viszont több problémát is felvetnek. Egyrészt sokszor a beavatkozás után - a mucossectomia kivételével - nem tudjuk megbízhatóan az eltávolított nyálkahártyát szövettani vizsgálatra küldeni, nem tudjuk a széli resectiot megítélni és a metaplasia multiloculáris jellege miatt bizonyos szakaszok nem kerülnek eltávolításra (108). Amennyiben a daganat a submucosát is eléri, irodalmi adatok szerint (13-44%) megindul a daganatos nyirokcsomó metastasiok kialakulása (Stein és Siewert 1994). Egyelőre nincs a kezünkben olyan megbízható diagnosztikus vizsgáló eljárás, amivel a nyirokcsomó metasztázisok pontosan detektálhatók lennének az utánkövetés során. Az endoszkópos ablatív kezelést többször meg kell ismételni és a két kezelés között folyamatos nagy dózisú protonpumpa kezelést kell alkalmazni (Wu és mtsai 1998). A kezeléseket után a Barrett metaplasia sokszor az épnek látszó laphám alatt is kifejlődik, ami az endoszkópos ellenőrzések során sem kerül felismerésre és észrevétlenül átmegy displáziába (Stein és Siewert 1994).

Mindezeket figyelembe véve számos tanulmányban rámutatnak a csökkentett radikalitású nyelőcső resectiók létjogosultságára, high grade displáziák és korai nyelőcső adenocarcinomák (T1b) esetében (Stein és Siewert 1994). Ezeknek a műtéteknek a morbiditása és mortalitása lényegesen kisebb, mint a radikális oesophagectomiáknak, funkcionálisan is jobb eredményt adnak. Ugyanakkor az endoszkópos ablatív kezeléssel szemben nemcsak a nyálkahártya kerül eltávolításra, hanem a distális nyelőcső teljes szakasza a környező nyirokcsomókkal együtt. A betegek életminősége lényegesen jobb, mint radikális nyelőcső resectiók után. A csökkentett radikalitású műtétet eredetileg Merendino és Dillard írta le 1955-ben, mint egy lehetséges antireflux műtétet (Merendino és Dillard 1955). (8. ábra) Azonban ugyanabban az időben közölte Rudolf Nissen is a saját antireflux műtétjét és így a Merendino-műtét mint antireflux technika nem terjedt el széles körben (Fulst és Taussky 2011). A műtét lényege, hogy hasüregi feltárásból eltávolításra kerül a distális nyelőcső egy szakasza a cardiával és a gyomor proximális részével együtt. Az

oesophago-gasztrikus kapcsolatot egy kb 15 cm-es izoperisztaltikusan beültetett jejunumkacccsal állítjuk helyre. A jejunum interpositum megakadályozza a savas regurgitációt a nyelőcső felé. A műtét során mindkét vagus ágat meg kell őrizni (Merendino és Dillard 1955).



**8. ábra. Merendino műtét (75)**

Az utóbbi évtizedekben ismételten előkerült a Merendino műtét, de nem antireflux beavatkozásként, hanem mint egy lehetséges alternatívája a korai nyelőcső adenocarcinoma műtéti megoldásának. Egy 130 beteget felölelő tanulmányban a radikális nyelőcső resectióval összehasonlítva a csökkentett radikalitású Merendino-műtét morbiditási és mortalitási adatai lényegesen jobbak voltak (Stein és Siewert 1994). Az onkológiai radikalitást illetően és az eltávolított nyirokcsomók számát tekintve nincs érdemi különbség a két műtét között (Stein és Siewert 1994). Természetesen még számos tapasztalatra van szükség e két műtéti típus összehasonlítására, de a korai nyelőcsőrák kezelésében már a kezdeti tapasztalatok is meggyőzőek, amit saját munkacsoportunk által elvégzett műtétek eredményei is megerősítenek.

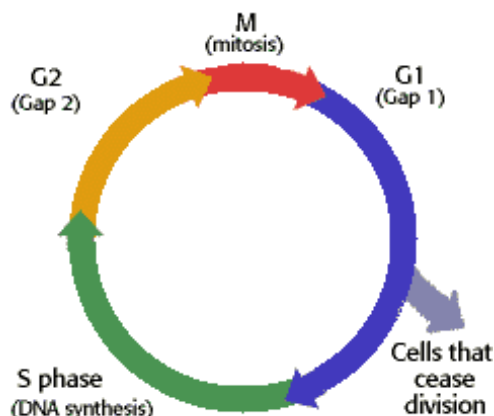
## ***4.2. Molekuláris és genetikai változások***

A gyulladástól a metaplasia kialakulásáig, illetve az atípiás hám kifejlődésig vezető út még nem teljesen tisztázott. Fontos a kutatások szempontjából a tumor biológiai viselkedésének tanulmányozásához, hogy lehetőleg a korai, esetleg praemalignus stádiumban végezhesünk vizsgálatokat (Wong és mtsai 2001). A Barrett nyelőcső erre kiválóan alkalmas modell, hiszen az utánkövetés során a gyulladás kialakulásától figyelhetjük meg a sejtekben lezajló biológiai, genetikai változásokat a metaplaszián át a dysplasia kialakulásáig (Sharma és mtsai 2000). Nem beszélve arról az előnyről, hogy a korai stádiumban diagnosztizált nyelőcső adenocarcinoma jól gyógyítható betegségnek számít (Fléjou 2005). Nem mellékes, hogy mikor és milyen stádiumban kerül diagnosztizálásra. Emlékeztetőül ismételtlen megemlíthetjük, azt a jelentős különbséget, amire már a bevezetőben is felhívtuk a figyelmet, nevezetesen a kifejlődött nyelőcső adenocarcinoma 5 éves túlélése radikális nyelőcső resectio után mindössze 7% (Buttar és mtsai 2001), korai Barrett carcinoma esetében ugyanezen műtét után az 5 éves túlélés 90 % (Conio és mtsai 2003). Már ezen két adat birtokában is szükségesnek látszik az eddig ismert diagnosztikus eszköztár bővítése, amelyhez reménykeltő segítséget nyújthat a Barrett-hám genetikai változásainak és biológiai viselkedésének minél alaposabb megismerése. Irodalmi adat, hogy high grade dysplasiában (HGD) végzett nyelőcső resectiók után, az eltávolított nyelőcsőszakaszban már az esetek 50 %-ában kifejlődött, invazív adenocarcinomát találtak, amelyet nem mutattak ki az ellenőrző endoszkópos vizsgálatok sem (Stein és Siewert 1994). Az ismert Barrettes betegek után követése, az endoszkópos eszközök technikai fejlődése és a biopsziás protokoll alapos betartása mellett is sokszor később kerülnek diagnosztizálásra olyan egyedi esetek, amelyek pedig a szemünk előtt fejlődnek ki (Falk és mtsai 1999). Véleményünk szerint a molekulárgenetikai kutatások további fejlődése nemcsak a tumor biológiai viselkedésére vonatkozó ismereteinket gazdagítja, hanem adott esetben új, korai diagnosztikus lehetőségek tárháza nyílhat meg előttünk (Zhang és mtsai 2009). Az ilyen molekuláris biológiai klinikai markereket tartalmazó diagnosztikus panelekkel már folynak kutatások, de eddig még a klinikumban

használható, egyszerű, gyors és validált tesztek nem állnak rendelkezésünkre (Arul és mtsai 2000). A daganatokkal kapcsolatos intenzív molekulárgenetikai kutatások eredményeként a Barrett oesophagus és a nyelőcső adenocarcinoma vonatkozásában is számos új megfigyelés született, ezeknek a kutatásoknak összegzése és ismerete egy klinikus számára mindig ösztönzőleg hat, ez sarkalt a jelen dolgozat megírásra és a kutatás elindítására.

#### 4.2.1. A sejtproliferáció- és sejtciklus változásai

Az utóbbi években számos tanulmány foglalkozott a sejtproliferáció kimutatásával, és ezekben elsősorban két markert vizsgáltak rutinszerűen, a proliferating cell nuclear antigén-t (PCNA) és a Ki-67-et (Buttar és mtsai 2002). A PCNA kitűnő indikátora a sejtproliferációnak G1/S fázis átmenetben. A Ki-67 a proliferáló sejtekben expresszálódik a G1-, S-, G2-fázisban. A sejtciklus M fázisában is kifejeződik, de erre nem specifikus, G0 fázisban azonban nem mutatható ki (Reid és mtsai 1993). (9. ábra) Mindkét marker immunhisztokémiai és flow citometriás módszerekkel kimutatható emelkedését észlelték, amikor a metaplasziás sejtek átalakulása megindul a dysplasia felé (Jenkins és mtsai 2002). Ennek ellenére a klinikai gyakorlati alkalmazásuk rutinszerűen nem terjedt el.



9. ábra. A sejtciklus fázisai (sotepedia.hu)

Három fő sejtciklus károsodást sikerült eddig azonosítani a Barrett metaplasia kialakulásában:

1. A G0 fázisból a sejtek a G1 fázisba jutnak, ami a metaplasia kifejlődésének a jele.
2. Az S fázis frakció megnövekedése, ami a G1 fázisból történő átmenet szabályozásának zavarát mutatja, és egyben jelzi a genetikai instabilitást és az aneuploiditást
3. A G2 fázisban levő sejtek száma megnövekszik, ami a Barrett metaplasziás hám dysplasiában történő átmenetét mutatja (Gedert és mtsai 2002).

Az S fázisban és G2 fázisban levő sejtek számának emelkedését észlelték számos Barrettes mintában, ami sokszoros aneuploidióval illetve tetraploidióval (4N) társul. Mindkét fázis az M fázis előtt helyezkedik el a sejtciklusban, így hibás génállományú sejtek osztódásának beindulása várható ezekben az esetekben (Morales és mtsai 2002).

#### **4.2.2. A genetikai stabilitás fontos bástyái: Protoonkogének és tumorszupresszor gének**

A géneket, amelyek a sejtek osztódását és apoptózisát szabályozzák, két nagy csoportba lehet osztani. Az egyik csoportba a protoonkogének, a másikba pedig a tumorszupresszor gének tartoznak (Fléjou 2005). A protoonkogének a sejtosztódást serkentő, a tumorszupresszor gének pedig osztódást gátló fehérjéket kódolnak. A sejtciklus megfelelő regulálásához mindkettőre szükség van, hogy a serkentés és a gátlás egyensúlyban legyen. A legtöbb protoonkogén a növekedési faktorok hatásmechanizmusában szerepet játszó fehérjét kódol (Fitzgerald és Farthing 2003). A jelátviteli út minden eleme, fehérje komponense megváltozhat úgy, hogy a sejt osztódása valamilyen, okból egyszer csak beindul. Ezeket a megváltozott (hiperaktívá vált) fehérjéket kódoló géneket onkogéneknek nevezik. Működésbe lépésük azt eredményezi, hogy több és/vagy aktívabb fehérjetermék keletkezik, ami tumorok kialakulásához vezethet (Fitzgerald és Triadafilopoulos 1998).

A sejtosztódást szabályozó gének másik csoportját a tumorszupresszor gének alkotják, amelyek termékei a sejtek osztódását gátló fehérjék. Probléma akkor jelentkezik, ha

ezek a gének delécióit szenvednek, vagy megváltoznak és ezért hibás működésű fehérjéket kódolnak (Younes és mtsai 1999). Ez szintén tumor kialakulásához vezethet, mert egy olyan fehérje hiányát, vagy hibás működését eredményezi, ami a sejt osztódását nem gátolja (Bai és mtsai 2000, Fennerty és mtsai 1989).

### **Protoonkogének/ onkogének**

A **c-erbB2-gén (Her-2)** egy transzmembrán receptort kódol, és 17q21-es kromoszómán helyezkedik el (61). Fenti locus felerősödését detektálták nyelőcső adenocarcinomában. Overexpressioja rossz prognózis jele (Barrett 1992, Brien és mtsai 2000).

Az **EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)** vagy más néven **c-erbB1-gén** a 7p12-13-as locuson helyezkedik el. A gén felerősödését detektálták a legtöbb nyelőcső adenocarcinoma késői stádiumában, amikor már nyirokcsomó metastasisok megjelenése várható (Jenkins és mtsai 2000).

A **TGF-alfa (Transforming Growth Faktor)** az EGFR-hez kötődik. A 2p13-as locuson a TGF-alfa felerősödését figyelték meg nyelőcső adenocarcinoma kifejlődése esetén (Brito és mtsai 1995). A TGF-alfa stimulálja **VEGF gént (Vascular Endothel Growth Factor)**, ami elősegíti a Barrett carcinoma vascularisációját. A VEGF-A az angiogenezisben, a VEGF-C limfangiogenezisben játszik szerepet (Couvelard és mtsai 2000).

Az **src-gén (tyrosine kinase of Rous sarcoma virus)** egy tirozin-kináz, amely befolyásolja az EGF (Epidermal Growth Factor) jelátvitelét és hatása van a sejtek adhesiójára. A transzkripció faktor a **c-myc** az src útján tud aktiválódni, és ez vezet a sejtproliferáció elindulásához. Az src-gén aktivitása növekszik metaplasziás szövetekben is, de a tirozin-kináz hatszoros növekedését detektálták Barrett carcinomában. Ebből következik, hogy az src-gén aktivitás növekedés korai jele lehet az adenocarcinoma kifejlődésének (Kumble és mtsai 1997).

A **K-ras gén** egy kis G fázis fehérjét kódol, amely a fehérje transzkripciót befolyásolja. K-ras mutációt detektáltak 40%-ban HGD-ban és 30%-ban



adenocarcinomában (Lord és mtsai 2000). A fenti mutációt nem lehet kimutatni metaplasias szövetekben

A **Ciklin-A,-B1,-D1,-E-gének** szintén protoonkogének és kulcsszerepet játszanak a sejtciklus szabályozásban (Lagorce – Pages és mtsai 1998). A 11q13 kromoszómán kódolt ciklin-D1 szignifikáns növekedése metaplasias mintákban fokozott rizikót jelent az adenocarcinoma kifejlődésére és egyben korai genetikai jelnek is tekinthető. A sejtmagokban a ciklin-D1 locus expressiójának emelkedését a Barrett metaplasias betegek 34%-ában írták le (Singh és mtsai 1998).

### **Tumorsupressorok**

A **retinoblastoma gén (Rb)** a 13q14 kromoszómán lokalizálódik, részt vesz a sejtciklus szabályozásában és kapcsolatot teremt az apoptózist szabályozó p53 génnel (Vogelstein és mtsai 1988). Barrett nyelőcsőből kialakult adenocarcinomás betegek mintáiban az Rb gén locus expressiójának csökkenését 50%-ban igazolták, de már metaplasiasban is mérhető kisebb mértékű csökkenése (Schneider és mtsai 2000). Az Rb gén módosulása önmagában nem, hanem számos más genetikai károsodással együtt képes előmozdítani a daganatos elfajulást Barrett-nyelőcsőben (Stolte és Vieth 2002).

A **p16** egy ciklin dependens kináz (CDK) inhibitor, génje a 9q21 locuson helyezkedik el. A p16 expressiójának csökkenését észleljük 75%-ban metaplasias szövetekben és aneuploidiában. Egyes tanulmányok szerint a p16 szint csökkenése illetve hipermetilációja mutatja legkorábban a genetikai károsodást Barrett metaplasiasban (Wink és mtsai 1988). Termelődésének csökkenése jelzi legbiztosabban, hogy a Barrett metaplasias hámban várható az adenocarcinoma kifejlődése (Stolte és Vieth 2002).

A **p27-gén** egy másik ciklin dependens kináz inhibitor, amely a 12q13 locusról íródik át. Immunhisztokémiai vizsgálatokkal a p27 szintjének csökkenését 83%-ban kimutatták adenocarcinomás esetekben (Ellis és Loda 2004). A p27 gén modellez egy másik mechanizmust is a carcinogenezisben, amikor a nem megfelelő helyen, vagy sejtkompartmenben levő fehérje nem tudja kifejteni a hatását (Cino és mtsai 2003). Ugyanis ahhoz, hogy a p27-gén gátolja a sejtciklus lefolyását, be kell lépnie a

sejtmagba, ha azonban a citoplazmában marad, inaktívvá válik. Kimutatták, hogy HGD-ban 50%-ban a p27 nem a sejtmagban található, hanem a citoplazmában (Coino és mtsai 2003).

A **p21-gén** a 6p21 locuson helyezkedik el, a p 53 fokozza a p21 gén transzkripcióját. Ez a fehérje gátolja mindegyik G1 fázisban jelenlevő CDK-ciklin komplex aktivitást, tehát a sejt nem tud S-fázisba lépni. A p21 jelentős emelkedése esetén várható, hogy a displasias hámból megindul az adenocarcinoma kifejlődése (Chatelain és Fléjou 2003).

A **p53** fehérje a TP53 gén (17p13) terméke. Elnevezését a súlyáról kapta, mivel 53 kilodaltonos volt, amikor felfedezték. Hatására, ha a genom valamilyen okból károsodik, a sejtciklus folyamata a G1 fázisban megáll addig, amíg a hiba ki nem javítódik a DNS-repair enzimek és enzimkomplexek által. Amennyiben a genomban keletkezett hibákat nem sikerük kijavítani, a p53 elősegíti az apoptózist (Vogelstein és mtsai 1988). Stressz stimulusok (DNS sérülés, hipoxia, hősokk, citokinek stb.) aktiválják a p53-at és a sejtciklus felfüggesztésén kívül, mint egy transzkripció faktor a bcl-2 családba tartozó géneket elnyomva, a bax-géneket serkentve beindítja a programozott sejthalált (Chatelain és Fléjou 2003). A sejten belül a p53-nak kiterjedt kapcsolata van megannyi fehérjével, eddig legalább 150 gént és fehérjét írtak le, amelyekre a p53 hatással van. A p53-nak nagyon fontos szerepe van a tumorok kifejlődésének gátlásában. Így ennek fehérjének bármilyen eredetű működés csökkenése a tumorok kifejlődésének lehetőségét nagymértékben megnöveli.

A p53 mutációk gyakran következnek be a metaplasia-displasia-adencarcinoma szekvencia során. A p53 mutáció lehet az egyik alapja az adenocarcinoma kifejlődésének, mivel hibás funkciójú gén nem képes a károsodott sejteket az apoptózis irányába lökni (Seery 2002). A tumor sejtekben magas koncentrációban van jelen a mutálódott p53 fehérje. A rendellenes és működésképtelen p53 fehérje féléletideje meghosszabbodik és az ezzel járó celluláris p53 koncentráció emelkedése teszi lehetővé, hogy immunhisztokémiai módszerekkel is kimutatható legyen (Seery 2002). A mutáns p53 nem tudja kifejteni hatását a sejtciklusra és nem indítja be az apoptózist. A fenti gén funkciójának hiánya jól korrelál a Barrettes betegek rossz prognózisával (Tanapfel 2004). A p53 funkciója gyakran úgy vesz el, hogy az egyik allélon mutáció lép fel (ekkor heterozygota lesz a sejt a p53-ra nézve, ami még nem járna

funkcióromlással, mert a másik allélról ép fehérje kódolódik) a másik kromoszómán lévő ép allél pedig az osztódás során a kromoszóma rövid karjával elvész. Ez az ún. „17p loss of heterozygosity” (17pLOH). Hozzátehetjük a gondolamenethez, hogy p53 mutáció és a 17pLOH olyan mechanizmusok, amelyek a human daganatok közös rendellenességeinek tekinthetőek, nemcsak nyelőcső adenocarcinómára jellemzőek (Reid és mtsai 2001). Az irodalmi adatok meglehetősen nagy szórást mutatnak a Barrett carcinómában bekövetkező p53 változásra, melyet 50-90%-ban jelöltek meg (Reid és mtsai 2003). A metaplasziás hámban dysplasia nélkül 1-5%-ban fordul elő, LGD-ban 65%-ban HGD-ban 75%-ban írtak le p53 károsodást. Reid tanulmányában 5 éves utánkövetést végeztek 256 Barrett-nyelőcsöves betegnél, és a p53 17pLOH típusú mutációt 95%-os valószínűséggel találtak pozitívnak azokban az esetekben, amelyekben Barrett carcinoma fejlődött ki. A 17 pLOH a Reid féle klinikai biomarker panelben, az egyik legfontosabb előre jelzője a malignizálódási folyamatnak (Reid és mtsai 2001, Reid és mtsai 2003).

#### **4.2.3. A kromoszómaszám megváltozása - aneuploidia**

Számos genetikai károsodás fellépése szükséges a daganatos elfajulás megindulásához. A genetikai károsodás lehet a sejtek DNS tartalmának, normál kariotípusának megváltozása. Az aneuploidia, vagyis a normálistól eltérő kromoszómaszám esetén nagy a valószínűsége az adenocarcinoma kifejlődésének (Doak és mtsai 2003).

A normál emberi sejtek kromoszómaszáma  $2 \times 23$ , azaz 46, amit  $2N$ -nek jelölünk és diploid kromoszómaállománynak nevezünk, az ettől eltérő kromoszómaszám esetén beszélünk aneuploidiáról. Már a Barrett-nyelőcső genetikájával foglalkozó kezdeti tanulmányokban is leírták a DNS-tartalom megváltozását, az aneuploidiát, amit flow citometriás vizsgálatokkal igazoltak (Reid és mtsai 1993). Barrett epitheliumban és nyelőcső adenocarcinómában egyaránt kimutathatóak aneuploid vagy tetraploid sejtpopulációk.

Megfigyelték, hogy az aneuploiditás összefügg a dysplasia mértékével, ezért az aneuploiditás kimutatása Barrettes betegeknél fontos prognosztikai faktort jelenthet az

után követésében. HGD-ban és nyelöcső adenocarcinomában több mint 90%-ban aneuploiditást igazoltak (Chatelain és Fléjou 2003).

Az aneuploidia leggyakrabban tetraploidiaként (4N) jelenik meg (Jenkins és mtsai 2002). A Saele-csoport prospektív tanulmányaiból egyértelműen igazolódni látszik, hogy azoknál a betegeknél, akiknél flow citometriás vizsgálatokkal kimutatták a DNS aneuploiditást illetve tetraploiditást, megnő a rizikója a high grade dysplasia és carcinoma kifejlődésének (Chatelain és Fléjou 2003). Más kutatócsoportok szerint azonban a dysplasia és aneuploiditás között nincs összefüggés (Guindi és Riddel 2003).

A citogenetikai tanulmányok, összevetve a flow citometriás analízisekkel az mutatják, hogy amennyiben megnő a sejtciklus S-fázisának időtartama, akkor egyenes arányban emelkedik az aneuploid sejtek száma és egyben a carcinoma kifejlődésének a lehetősége (Barrett és mtsai 1992). Ezeknek a markereknek a kimutatása segítséget nyújthatna a magas rizikójú betegek kiválasztásában és utánkövetésében. Bár tagadhatatlan tény, hogy az aneuploiditás hiányában is kialakulhat az intraepitheliális neoplasia vagy dysplasia, és sokszor a DNS tartalom megváltozását sem követi evidensen a carcinoma kifejlődése (Gleeson és mtsai 1998). Valójában soha nem egyféle változás idézi elő a daganat kialakulását, hanem több helyen kialakult genetikai károsodás (Sharma és mtsai 2004).

#### 4.2.4. A genom fenntartása és az apoptózis

Az osztódó sejtekben a DNS pontos másolása a kromoszómák normális számának fenntartása és minden ellenőrzés szintén a génekben kódolt fehérjék feladata. Léteznek olyan fehérjék, amelyeknek a szerepe a hibásan replikálódott DNS kijavítása, így a genom stabilitásának fenntartása (Vogelstein és mtsai 1988). Ha a genom valamilyen okból károsodik, a sejtciklus folyamata a G1 fázisban megáll addig, amíg a hiba ki nem javítódik. A javítást a DNS-repair enzimek és enzimkomplexek végzik. Amennyiben a genomban keletkezett hibát nem sikerül kijavítani, a (már említett) **p53** elősegíti az apoptózist, vagy más néven a programozott sejthalált (Hanas és mtsai 1999). Az apoptózis a sejtek nekrozisával szemben egy aktív, energiát igénylő folyamat, amely új gének expressiójával és fehérjék szintézisével jár (Vogelstein és mtsai 1988).

Az apoptózis során endonukleázok aktiválódnak, és a DNS-t a nukleoszómák között elvágják, majd az így keletkezett darabokat még kisebb darabokra hasítják. A fehérjék hasításában a **kaspázok** vesznek részt, amelyek egy proteolitikus kaszkádot alkotnak.

Az apoptózist szabályozó külső tényezők a növekedési faktorok, citokinek, hormonok stb. Jelenlétük a sejttípustól, a környezettől és a konkrét szignáltól függően megakadályozhatja az apoptózist, míg a szignál hiánya el is indíthatja azt, vagy éppen fordítva, a szignál megjelenése indítja be a folyamatot.

Az utóbbira példa a **TNF (Tumor Nekrózis Faktor)** citokin család, melynek tagja az ún. **Fas-ligand** és a **TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand)** is. A Fas-ligand a citotoxikus T-lymfociták és natural killerek felszínén elhelyezkedő olyan fehérje, amellyel a T-lymfociták a sejtek Fas-receptoraihoz kötődnek és a receptoron keresztül kiváltják a célsejt apoptózisát, például tumor sejtek esetében (Tselepis és mtsai 2000). A receptor a citosolba nyúló részén egy speciális domén helyezkedik el, amelyet death-doménnek neveznek: ligand kötésre hozzá kötődik két, ugyancsak death-doménnel rendelkező citosol fehérje, FADD és a TRADD, amelyek ezek után többszörös áttétellel aktiválják a kaspázokat (Wong és mtsai 2001). A Fas-receptor normálisan megtalálható az epithel sejtek felszínén, míg a limfociták mind a Fas- receptort mind a Fas-ligandot expresszálják. A tumor sejtek felszínén megjelenő Fas-ligand hozzákapcsolódhat a citotoxikus T-limfociták és natural killerek Fas-receptoraihoz és így a tumorsejtek helyett ezekben indul be az apoptózis. Maguk a tumorsejtek azonban elkerülik az apoptózist, azzal, hogy egyszerűen nem teszik ki a sejtek felszínére Fas-receptorokat. A Fas-ligand felszaporodását figyelhetjük meg a nyelőcső nyálkahártya sejteiben Barrett metaplasiában, dysplasiában és már kifejlődött adenocarcinómában, sőt a Fas-ligand pozitív sejtek aránya korrelál a dysplasia mértékével (Tselepis és mtsai 2000).

A **Bcl-2 (B-cell leukaemia gene-2)** a 18q21 kromoszómán elhelyezkedő onkogén, amelynek az apoptózis gátlásában van nagy szerepe. Egy tanulmány szerint, normál esetben az epithelium basalis membránjában mutatható ki, melynél lényegesen erősebb expressióját mutatták ki metaplasiás minták 72%-ában, LGD-ban 76-100%-os, HGD-ban 0-25%-os, adenocarcinómában 0-20%-os volt az előfordulása. Ugyanez a tanulmány az apoptózisban fontos Ki-67 (Sejt proliferációs marker) kimutathatóságát is vizsgálta: LGD-ban a Ki-67 expressio növekedése 14%-ban, a p53 7%-ban, HGD-ban a

Ki-67 a minták 73%-ában, a p53 60%-ban, adenoracínában Ki-67 87%-ban, a p53 85%-ban volt kimutatható (Rioux – Leclercq és mtsai 1999).

Gyakran előforduló változás a nyelőső adenocarcinómában egy tumorsupressor, az **APC (adenomatous polyposis coli) gén** módosulása, amely az 5q21 locuson helyezkedik el, és szerepet tulajdonítanak neki a sejtek közötti adhaesio létrejöttében a kateninekkal közösen. Ennek a génnek a mutációját az adenocarcinómák 60-80%-ában kimutatták. Ellentétben a p53-al az APC-gén mutációját nem mutatták ki praemalignus szövetmintákban, csak daganatos szövetekben (Kawasaki és mtsai 2000). Az APC-gén hypermetilációja esetén a metaplasia-displasia-adenocarcinoma szekvencia progressziója várható. Így korai jele lehet a neoplasztikus progresszió beindulásának (Kawasaki és mtsai 2000).

#### 4.2.5. Telomerák változása

A telomerák a kromoszómák végén található, és a kromoszómák integritásának és stabilitásának megőrzésében szerepet játszó régiók. Ezeknek a szekvenciáknak a hossza eltérő a különböző sejtípusokon belül, illetve bizonyos sejtípusok esetében az idővel is változhat. Ugyanis az osztódások számától függően egyre rövidebbek lesznek a kromoszómák telomer régiói. Egy bizonyos rövideget elérve a sejtek nem osztódnak tovább, és belépnek az apoptózis fiziológias folyamatába (Horikawa és Barrett 2003). A gyakran osztódó sejtekben, mint az ivarsejtek, csontvelő, haemopoetikus sejtek, embrionális sejtek és az őssejtekben biztosítja, hogy a replikáció során ne rövidüljön a DNS szál. Ezt a mechanizmust használják a tumor sejtek is. Malignus transzformációban a telomerek nem rövidülnek tovább az osztódásokkal, mert a **telomeráz reverz transzkriptáz (h TERT) gén** aktiválódásának következtében a telomeráz szint megemelkedik a daganatos sejtekben (Horikawa és Barrett 2003). Egy tanulmány in situ hibridizációs technikával kimutatta, hogy a telomeráz RNS szint a nyelőső adenocarcinómák 100%-ában, HGD minták 70%-ában nagymértékben emelkedett. Emellett a metaplasias esetek egy részében és LGD mintákban, kisebb mértékben ugyan, de ki lehet mutatni pozitívítást (Kawasaki és mtsai 2000). A telomeráz enzim a normál epitheliális őssejtekben nagyon minimális mennyiségben

mutatható ki. A pontos megismerése a folyamatnak és a telomeráz aktivitás rutinszerű kimutatása még további vizsgálatokat igényel (Kolligs és mtsai 2002).

### **4.3. Gyulladás és malignitás**

Három különböző gyulladásos mediátort írtak le, amelyek szerepet játszhatnak a daganatok kifejlődésében: reaktív oxigén és nitrogén molekulák, citokinek és a prostaglandinok. Mindezek hatására a DNS károsodások olyan nagy számban lépnek fel, amelyeket a normál reparatív mechanizmusok nem képesek helyreállítani és ez szerepet játszik a metaplasia-displasia-adenocarcinoma progressziójában (Fitzgerald és Farthing 2003).

A reaktív oxigéngyökök károsodást okoznak a DNS-ben, a proteinekben és a lipidekben is, így elősegítik a tumorok kialakulását. Kimutatták, hogy mind a sav indukálta reaktív oxigéngyökök mind a nitrogén-monoxid (NO) képes a DNS-ben double-strain töréseket létrehozni, igaz más-más mechanizmussal. Ezek a károsodások főként az S-fázisban lévő sejteket érintették (Singh és mtsai 1998). A Nitrogén Oxigén Szintetáz (iNOS) expressiója szintén befolyásolja, mint köztes faktor, a metaplasziából az adenocarcinoma kifejlődését (Watson 2000). Az iNOS-gén mRNS szintjének a megemelkedését találták 76%-ban metaplasziás szövetekben és 80%-ban adenocarcinomában (Wilson és mtsai 1998). A reaktív oxigéngyökök ellen védő antioxidáns enzim, a glutation-S-transferáz egyre alacsonyabb szintjét szintén kimutatták a metaplasia-displasia-adenocarcinoma szekvencia során (Singh és mtsai 1998).

Vannak adatok, amelyek arra utalnak, hogy a non-szteroid gyulladáscsökkentők (NSAID) rendszeres szedése védelmet jelent az adenocarcinoma kialakulásával szemben (Shirvani és mtsai 2000). Az NSAID-ok célpontja a ciklo-oxygenáz enzim (COX), amelynek két altípusa ismert a COX-1 és a COX-2. A COX-2 a sejtmembránhoz kötődő glikoprotein, amelynek oxidáló hatására arachidonsavból prosztoglandin keletkezik. Kimutatott, hogy a COX-2 enzim, termékei révén jelentős szerepet játszik a carcinogenezisben, a sejtproliferációra, az angiogenezisre és az apoptózisra gyakorolt hatása révén (Farrow és mtsai 1998). A COX-2 típusú enzim jelentősen megnövekedett expressióját mutatták ki nyelőcső adenocarcinomában és

Barrett-metaplasias szövetmintákban (Shirvani és mtsai 2000). Ex vivo kísérletek igazolják, hogy Barrettes biopsziás mintákon, savas ill. epés reflux képes megindítani a COX-2 enzim túltermelődését és a prosztaglandin-E2 (PGE2) megnövekedett felszabadulását (Kaur és Triadafilopoulos 2002). Ennek a kísérletsorozatnak a folytatásaként szelektív COX-2 gátlók adására (NS-398) vagy protein kináz-C (PKC) gátlásának eredményeként drámaian lecsökkent a PGE2 termelődés, és az ex vivo szövetmintákban megállt a Barrett-hám illetve az adenocarcinoma proliferációja (Shirvani és mtsai 2000). Állatkísérletek alapján egyértelműen megállapították, hogy a reflux okozta COX-2 enzimszint emelkedés szerepet játszik az adenocarcinoma kialakulásában (Lerut-féle modell). A patkányokban az alkalmazott szelektív és nem szelektív COX gátlók hatására 55%-al csökkent az adenocarcinoma kifejlődésének rizikója, a placebo kontrollhoz képest. Ezzel jól korrelált a ciklo-oxigenáz gátlót kapott állatokban a PGE2 szint csökkenése is (Buttar és mtsai 2002). Mindezek azonban egyelőre csak állatkísérletekben bizonyíthatók. Ahhoz, hogy megtudjuk, az embereknek adott protonpumpa gátlók, és a velük együtt adott COX-2 gátlók milyen hatást fejtenek ki a Barrett-nyelőcsőben, még nagyon sok randomizált tanulmány kiértékelésre van szükség (Shirvani és mtsai 2000).

A GERD krónikus gyulladást okoz a nyelőcsőben, ami citokinek expressiójával jár, mint az IL-1 $\beta$ , IL-8, NF- $\kappa$ B. Ezeket a citokineket metaplasziás mintákból ki is lehet mutatni. Érdekes, hogy nem csak az infiltráló gyulladós sejtek, hanem maguk a metaplastikus epithel sejtek is termelnek IL-1 $\beta$ -t, IL-8-t és IL-10-t (Shirvani és mtsai 2000).

#### ***4.4. Vaszkularizáció és szöveti invázió***

A tumor növekedéséhez az ellátó érrendszer kifejlődésre is szükség van, nem meglepő tehát, hogy az angiogenezishez szükséges növekedési faktorokat, mint a **VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)** megnövekedett expressióját lehet kimutatni a nyelőcső adenocarcinoma esetében és ez összefügg az angiolimfatikus invázióval. A vaszkularizáció kialakulása korai prognosztikai jele a Barrett carcinoma kifejlődésének. Megjelennek a krónikus gyulladós mediátorok is a VEGF mellett, amelyek ugyancsak a vaszkularizációt segítik elő, ilyen mediátornak tekinthető a **bFGF**



(**basic fibroblast growth factor**), az **IL-1 $\beta$**  (**interleukin**), **interleukin-6**, a **TNF-alfa** (**tumor necrosis factor**), **NO** (**nitrogen oxid**) (Couvelard és mtsai 2000).

Régóta ismert tény, hogy humán daganatokban a sejt-sejt közötti adhésió csökken. A sejtek közötti kapcsolat csökkenése idézi elő a tumorsejtek invázióját és a metastasis képződést. A kadherin-E, kadherin-P elnevezésű proteineknek szerepet tulajdonítanak az adenocarcinomák metastasis képzésében. A fenti proteinek hiányában vagy csökkent jelenlétében a sejtek migrációs képessége növekszik. A kadherineinek expressziójának csökkenése a metaplasia-displasia-adenocarcinoma szekvencia elindulásra utal (Tanapfel 2004).

A kateninek két mechanizmus útján befolyásolják a metaplasiából az adenocarcinoma kialakulását. Egyrészt a kadherinekhöz kötődve a kalcium-dependens sejt-sejt közötti adhaesió legfontosabb mediátorai. A  $\beta$ -katenin normál sejtekben, a citoplazmában elhelyezkedő kadherin-E farokrészéhez kötődik (Kolligs és mtsai 2002). Másrészt a kateninek az APC (adenomatosus polypus coli) tumor supressor proteinnel egymásra hatnak. Az APC protein inaktivációja következtében emelkedik a szabad cellularis  $\beta$ -katenin szint, ami nem kötődik a kadherinekhöz és bejutva a sejtmagba, képes beleszólni bizonyos gének transzkripció folyamataiba (c-myc, ciklin-D1) (Kolligs és mtsai 2002). Nyelőcső adenocarcinomában emelkedett  $\beta$ -katenin szintet mutattak ki mind a sejtmagban, mind a citoplazmában, ugyanakkor a  $\beta$ -katenin mutációját nem sikerült kimutatni (Vogelstein és mtsai 1988). Normál Barrett nyelőcsőben, ahol nincs jele a diszpláziának elsősorban a sejtmembránban mutatható ki  $\beta$ -katenin jelenléte (Stolte és Vieth 2002).

Az alábbiakban összefoglalóan felsoroljuk az értekezésben szereplő különböző molekulárgenetikai változásokat, nyelőcső adenocarcinomák esetén:

- A sejtciklusváltozás: PCNA és Ki-67↑
- Onkogének: c-erbB2-gén (Her-2)↑
  - EGFR↑
  - TGF-alfa↑
  - src-gén (c-myc)↑
  - K-ras↑
  - Ciklin-D1↑

- Tumorszupresszorok: Rb-gén ↓
  - p16 ↓
  - p27 ↓
  - p21 ↑
  - p53 ↑
- Apoptózis : Fas-ligand(TNF) ↑
  - Bcl2 ↑
  - APC ↑
- Telomerázok: hTERT

## 5. CÉLKIÜZÉSEK

A Barrett metaplasziának mint praemalignus folyamatnak az ismerete és korai felismerése olyan kulcs lehet a kezünkben, amivel közelebb juthatunk az utóbbi évtizedekben jelentősen emelkedő incidenciát mutató, nyelőcső adenocarcinoma korai felismeréséhez és sikeres gyógyításához. Tudjuk a statisztikai adatokból, hogy Barrett metaplaszia jelenléte esetén a nyelőcső adenocarcinoma kifejlődésének az esélye 30-125-ször nagyobb a normál populációhoz képest (Jenkins és mtsai 2002). Hogyan tudjuk időben felismerni olyan esetekben a Barrett metaplasziát, akiknél soha nem fordultak elő a GERD-re jellemző refluxos tünetek? A refluxos tüneteket nem produkáló populációra vonatkozóan a Barrett nyelőcső prevalenciájáról nincsenek adataink. Annak ellenére, hogy a Barrett nyelőcső kialakulásában a krónikus refluxnak jelentős szerepe van, a Barrettesek 40 %-ának soha nem volt GERD-re jellemző típusos tünete (Offerhaus és mtsai 2003). Ezért a reflux betegség felismerése és utánkövetése önmagában nem elegendő a Barrett jelenség korai felismeréséhez és ezáltal a nyelőcső adenocarcinoma incidenciájának csökkentésére.

A Barrett metaplaszia endoszkópos utánkövetése a folyamat multicentrikus elhelyezkedése, a diszplázia mértéke, a kialakuló nyirokcsomó metasztázisok felismerése, a mucosa és submucosa érintettsége számos olyan diagnosztikus problémát vet fel, amire még napjainkban sem találunk egyértelmű válaszokat. Az endoszkópos ablatív kezelés és mucosectomia vagy a csökkentett radikalitású sebészeti műtét (pl. Merendino-műtét) a gasztroenterológusok és sebészek között továbbra is élénk vitatéma.

A savas és epés reflux mellett a rizikócsoporthoz genetikai vizsgálata segít azoknak a prognosztikai faktoroknak a korai felismerésében, amelyek szerepet játszanak a metaplaszia-displázia-adenocarcinoma kialakulásában. Rizikócsoporthoz tekintjük eddigi ismereteink alapján az 50 és 70 év közötti életkorban levő fehér, obes [BMI > 30] férfiakat, akiknél legalább 10 éve fennállnak a refluxos tünetek (Hanas és mtsai 1999). Ezeknél a betegeknél a genetikai biomarkerekkel kiegészített utánkövetés ad reményt a nyelőcső adenocarcinoma minél korábbi stádiumban történő felismerésére. Nem valószínű, hogy egy vagy két genetikai marker felismerése elég lenne a diagnózis felállításához, hiszen

számos genetikai változás egyidejű fellépése szükséges a betegség kialakulásához. Minden carcinoma esetében megtalálható valamilyen genetikai károsodás, amely újabb és újabb zavarokat indukál az idő előrehaladtával. A kifejlődött carcinomában, már igen heterogén károsodásokat találunk. Ezért egyszerűbb a carcinoma kifejlődése előtt tanulmányozni az ép nyelőcső hámban kialakuló genetikai változásokat, illetve a gyulladás különböző stádiumában megfigyelni a sejtciklussal összefüggő változásokat, amelyek előfutárai lehetnek a carcinoma kialakulásának.

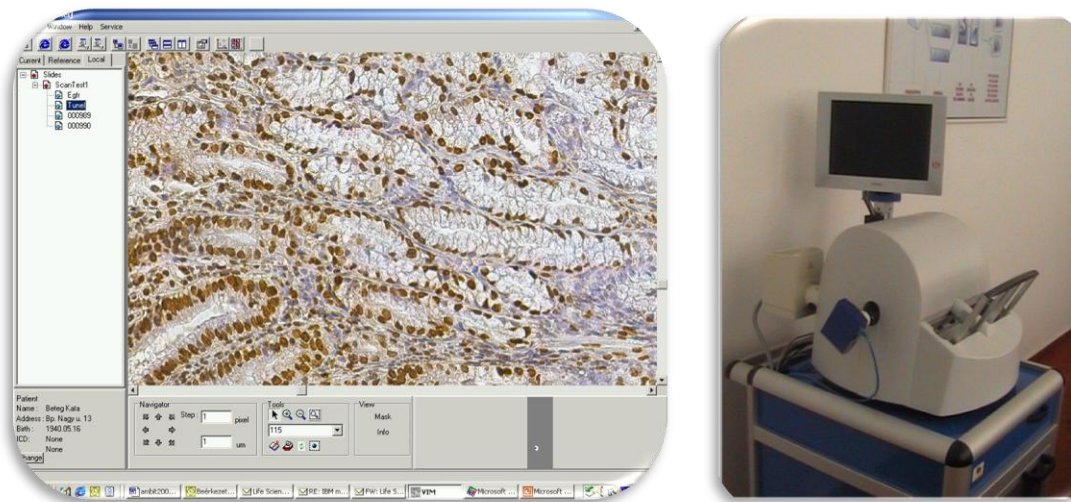
**Értekezésemben két kérdésre kerestem a választ.** Először arra, hogy az eddig ismert endoszkópos utánkövetés és standard biopsziás módszerek mellett milyen új molekulárgenetikai paraméterek immunhisztokémiai vizsgálata segíthet bennünket a Barrett nyelőcső malignizálódási folyamatának minél korábbi felismerésében. Másrészt milyen biztonsággal alkalmazhatjuk a hagyományos fénymikroszkópos vizsgálatok mellett a virtuális mikroszkópiát és a digitális kiértékelést.

### ***5.1. A sejtciklussal összefüggő fehérje-expressziós változások kimutatása az ép és gyulladós nyelőcsőben***

Az utóbbi években fejlődésnek indult molekulárgenetikai ismeretek felhasználásával elindítottunk egy vizsgálatot. Rutin nyelőcső biopsziás mintákból immunhisztokémiai vizsgálómódszerek segítségével vizsgáltunk egy sejtciklusban szerepet játszó gént (PCNA), protoonkogént (EGFR), tumorsupressor gént (p53), az apoptózis kimutatására az ún. TUNEL módszert használtuk, valamint a gyulladós folyamat hatására a metaplasziás hámban kialakuló vékonybél típusú nyák antigént (SIMA) és vastagbél típusú nyák antigént (LIMA). Arra kerestük a választ, hogy az ép nyelőcső, a gyulladós nyelőcső és a potenciálisan premalignusnak tekinthető Barrett nyelőcső hámjában a fentiekben felsorolt fehérje-expressziós változások egymáshoz képest milyen arányban és mértékben fordulnak elő. Melyik genetikai marker tekinthető potenciálisan korai jelnek a malignus folyamat kialakulásában.

## 5.2. A kiértékelés összehasonlítása hagyományos fénymikroszkópos vizsgálat és virtuális mikroszkópos vizsgálat segítségével

A kiértékelést hagyományos fénymikroszkóp és virtuális mikroszkóp segítségével is elvégeztük. A fénymikroszkópos sejtszámolás rendkívül időigényes és nem teljesen pontos vizsgálati módszer, és csak szemikvantitatívnak tekinthető, ezért alapvető célkitűzésünk volt összehasonlítani a laboratóriumunkban kifejlesztett virtuális mikroszkóppal végezhető digitális sejtszámolással. A digitalizált metszetekben összehasonlítóképpen a számítógép által elvégzett automatizált számolási technikán kívül szabad szemmel is megszámoltuk a sejtmagokat. Vizsgálataink célja az alkalmazható digitális mikroszkópos technika megbízhatóságának igazolása és egy új felhasználóbarát technika bevezetése volt. (10. ábra)



10. ábra: Laboratóriumunkban kifejlesztett virtuális mikroszkópia

## 6. MÓDSZEREK

A Barrett nyelőcső az egyik legjobb modell a humán carcinogenesis in vivo tanulmányozásra, mivel a metaplasia-displasia-adenocarcinoma többlépcsős folyamatának megfigyelésére lehetőséget nyújt. A kérdés az, hogy mely pillanattól változik meg a sejtek működése olyan irányba, hogy az malignusnak tekinthető, és melyek e változás jelei. Statisztikai adatokból látjuk, hogy metaplasia megjelenése után a dysplasia és adenocarcinoma nem minden esetben alakul ki. Ez arra utal, hogy a refluxon kívül vannak más faktorok is (genetikai, környezeti, táplálkozási stb.), amelyek szerepet játszanak a malignus transzformáció kialakulásában (Souza és mtsai 2001).

Az endoszkópos eszközök technikai fejlődése és az alapos biopsziás protokoll szigorú betartása mellett is sokszor későn kerülnek diagnosztizálásra olyan egyedi esetek, amelyek pedig a szemünk előtt fejlődnek ki. A molekulárgenetikai kutatások további fejlődése nemcsak a tumor biológiai viselkedésére vonatkozó ismereteinket gazdagítja, hanem adott esetben új, korai diagnosztikus lehetőségek tárháza nyílik meg előttünk. A Barrett nyelőcsőben zajló változások kutatására felhasználtunk laboratóriumunk vezetője Dr. Molnár Béla által kifejlesztett virtuális mikroszkópia adta lehetőségeket. (Bíró 2008).

Az utóbbi évtizedben kifejlesztésre került digitális mikroszkóp olyan berendezés, amelyik a hagyományos fénymikroszkóp által felnagyított képet nagy sebességgel digitalizálja, és ezáltal tárolhatóvá és továbbíthatóvá alakítja.

Az eszköz nagy nagyítást alkalmaz, a hagyományos fénymikroszkóp 400x szoros nagyítását, és így letapogatja a tárgylemezeket, ott ahol a vizsgálati anyag helyezkedik el. Az így kapott digitális adatokat a rendszer matematikai módszerekkel, átlagolással tömöríti. A tömörítéskor már nincs analóg-digitális átalakítás. A számítógép képernyőjén mi már a digitális képet látjuk.

Fordított folyamatról van szó, mint ahogyan egy hagyományos fénymikroszkópos vizsgálat történik. A fénymikroszkópos vizsgálatkor a patológus először kisebb nagyításokkal tekinti át a metszeteket, majd eldönti, hogy mely részleteket érdemes kinagyítani. A digitális mikroszkóp először a nagy nagyítású képet rögzíti, majd abból állít elő kisebb nagyítású képeket, amelyeket a számítógép megfelelő adatbázisba

rögzít. A hagyományos fénymikroszkópos vizsgálatkor a patológus saját szisztémája szerint tekinti át a metszetek különböző elemeit. A digitális mikroszkópok a digitális metszetek egész soráról nyerhetnek nagy mennyiségű információt, amelyeket a gép az adatbázisában rögzít, amit az orvos a diagnózis felállítása során felhasználhat a helyes döntés meghozatalához. Ki kell emelni, hogy nem a számítógép diagnosztizál, hanem lehetőséget biztosít az orvos számára nagyságrendekkel nagyobb mennyiségű adathalmaz birtokában a kvantitatív morfológiai diagnózis felállításához. A digitális patológia elterjedésével nemcsak gyorsabb, hanem pontosabb és hatékonyabb a kórismezés. Az új generációs képfeldolgozó algoritmusok sok esetben objektívebb és gyorsabb eredményt adnak, mint a hagyományos fénymikroszkópos eljárások. (Bíró 2008).

Röviden szeretném összefoglalni az előzetes, galaninnal végzett kutatásainkat, amelyek során alkalmazott immunhisztokémiai módszereket továbbfejlesztettük a Barrett nyelőcsővel kapcsolatban végzett vizsgálatainkban (Bálint és mtsai 2001).

A galanin egy 29 aminosavból álló neuropeptid, amit eredetileg sertés vékonybélből izoláltak. Később kimutatták az agyban és különböző fajokban, számos gasztrointesztinális szervben. Felfedezték a galanin sokféle endokrin és exocrin funkcióját a gasztrointesztinális tractusban és a pancreasban. Gátló hatást fejt ki pentagastrin stimulált gyomorszekréción, a pancreas enzimszekréción (Kisfalvi és mtsai 2001). Fokozza az inzulin szekréción, a szomatostatin és gasztrin felszabadulást. Korábbi vizsgálatainkban igazoltuk a galanin humán- és patkányvékonybélre kifejtett összehúzó hatását, amit immunhisztokémiai vizsgálatokkal is igazoltunk (Bálint és mtsai 2001).

Galaninnal kapcsolatos állatkísérletek történtek nyelőcsőre vonatkozóan, és igazolták, hogy a galanin csökkenti a nyelőcső perisztaltikát, ellazítja az alsó nyelőcső sphinctert, ezáltal fokozza a reflux tevékenységet. Humán nyelőcsővel illetve Barrett nyelőcsővel kapcsolatos galanin vizsgálatokról még nem számoltak be az irodalomban.

### **6.1. Betegek és módszerek a sejtciklussal összefüggő változások kimutatására**

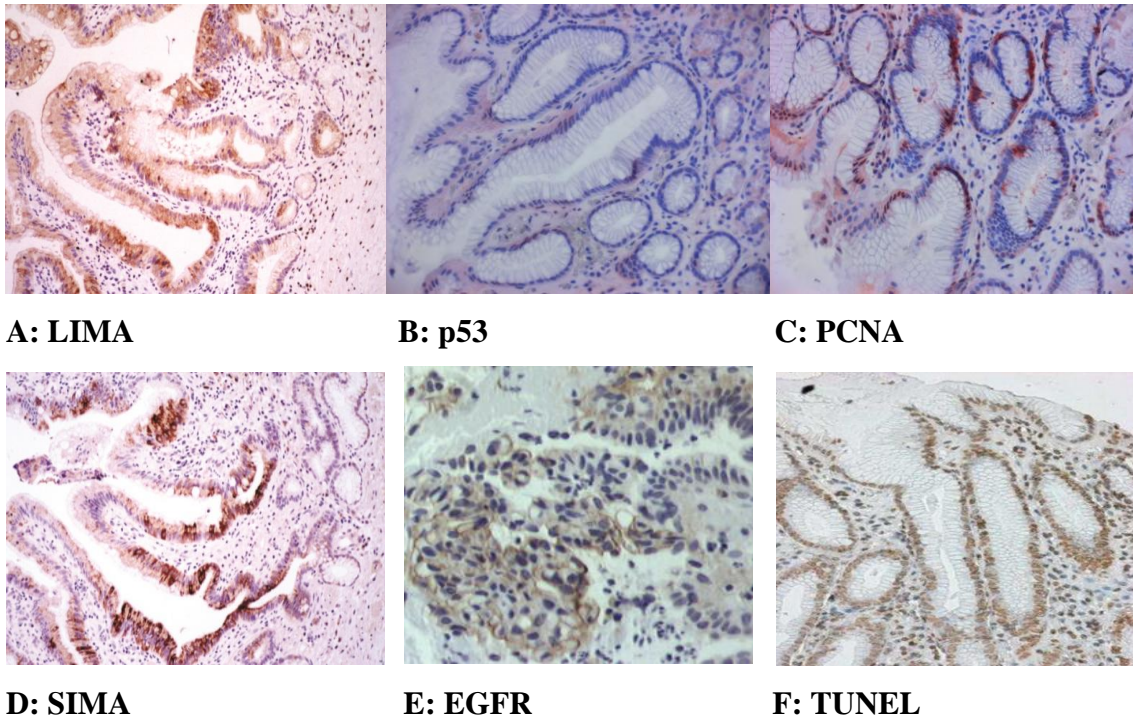
Az általunk vizsgált mintákat endoszkópos vizsgálatok során a nyelőcsőből vettük. Nem az endoszkópos kép alapján, hanem a biopsziás minták szövettani értékelése alapján választottuk ki a betegeket. Kiválasztottunk 30 olyan beteget, akiknél a korábban végzett endoszkópos vizsgálat során történt mintavétel szövettani értékelése Barrett nyelőcsőre jellemző intestinális metaplasiát igazolt, dysplasia jelei nélkül. A következő vizsgálati csoportba 30 olyan beteget vontunk be, akiknél a szövettani vizsgálat csak oesophagitist igazolt metaplasia nélkül. A harmadik csoportba pedig 30 olyan beteget választottunk be, akiknél endoszkópos vizsgálat során makroszkóposan épnek látszó nyelőcsőből vettünk biopsziát és ezt a képet a szövettani vizsgálat is megerősítette. (1. táblázat) Referenciaként 10 esetben ép cardiából vett szövetmintát is tanulmányoztunk. /Etikai engedély száma: 20828-5/2012/EKU-(373/PI/12.) ID-RD0014/.

**1. táblázat. 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



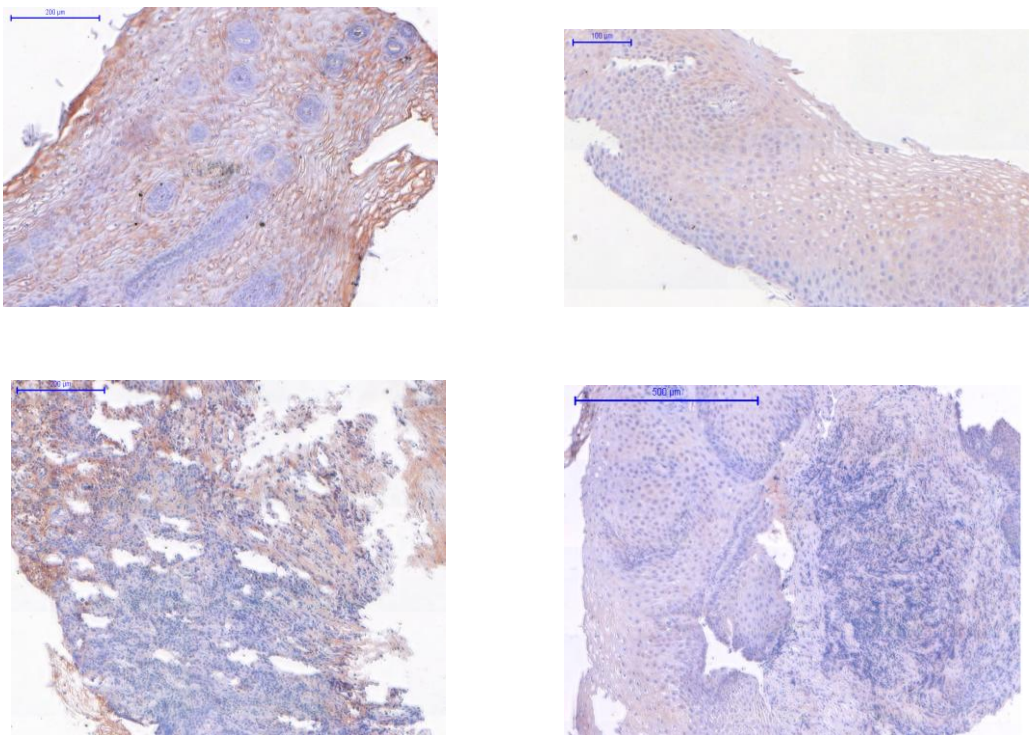
Az így kiválasztásra került parafinba ágyazott 100 szövettani blokkból újabb metszeteket készítettünk, amelyeket immunhisztokémiai módszerekkel megfestettünk. A festésre Streptavidin-Biotin-Aminoetil-Karbazol (SB-AEC) technikát használtunk. A metszeteket glicerin-zselatinnal fedtük. A laboratóriumban a LASB2 System-HRP K0765 előhívó rendszert alkalmaztuk. A következő géneket vizsgáltuk: PCNA (Clone PC-10), EGFR-2 (Clone H-11), SIMA, LIMA ( Cas7439-12-9), p53 (Clone DO-7). (11. ábra)



**11. ábra** Az ötféle immunhisztokémia marker digitális mikroszkópos képe, illetve TUNEL módszerrel megfestett sejtek Barrett metaplasiában /saját anyag/

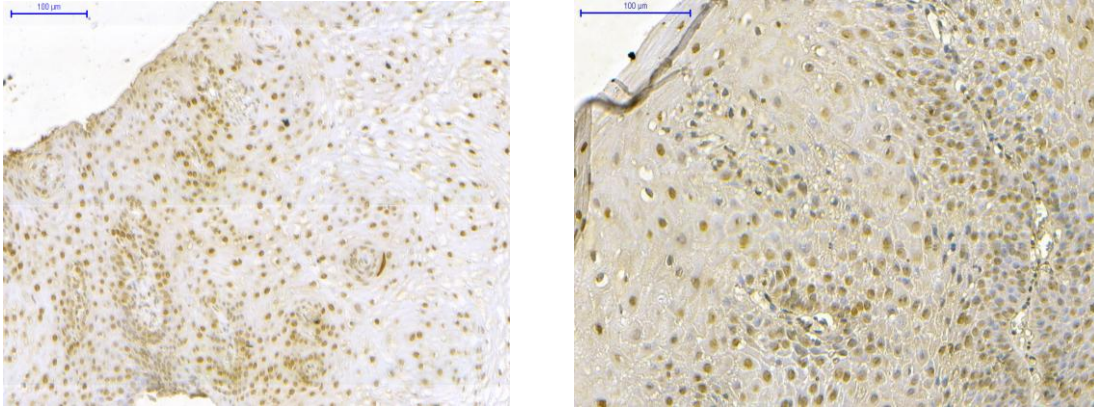
A **PCNA** (proliferating cell nuclear antigén) kitűnő indikátora a Ki-67-tel együtt a sejtproliferációnak G1/S fázis átmenetben. Mindkét marker immunhisztokémiai és flow citometriás módszerekkel kimutatható emelkedését észlelték mikor a metaplasiás sejtek átalakulása megindul dysplasia irányába (Buttar és mtsai 2002). A fenti biomarkerek kimutatása mégsem terjedt el a klinikai gyakorlatban (Dagnini és mtsai 1986).

**EGFR** (Epidemialis Growth Factor Receptor) vagy másnéven c-erbB1-gén, a 7p12-13-as locuson helyezkedik el. Ennek a protoonkogénnek a felerősödését detektálták a legtöbb nyelőcső adenocarcinoma késői stádiumában, amikor már nyirokcsomó metasztázisok megjelenése várható (Fennerty és mtsai 1989). (12. ábra) A protoonkogének a sejtosztódást serkentik és a növekedési faktorok hatásmechanizmusában szerepelő fehérjéket kódolják.



**12. ábra. EGFR virtuális mikroszkópos képei**

**TUNEL** (Terminal deoxynucleotid transferase-mediated dUTP Nick and Labelling) immunhisztokémiai metódust használtunk a sejtmag fragmentálódásának megjelenítésére tanulmányunkban. Az apoptózis során az endonukleázok aktiválódnak, és a DNS-t a nukleoszómák között elvágják. A fehérjék hasításában a kaszpázok vesznek részt, amelyek egy proteolitikus kaszkádsort alkotnak. (13. ábra)



**13. ábra TUNEL virtuális mikroszkópos képe**

A **p53 fehérje** az egyik legfontosabb tumorsupressor gén a TP53 gén (17p13) terméke. A rendellenes és működésképtelen p53 féléletideje meghosszabbodik és az ezzel járó celluláris p53 koncentráció emelkedése lehetővé teszi, hogy immunhisztokémiai módszerekkel is kimutatható legyen (McDonald és mtsai 2000). A fenti gén funkciójának hiánya jól korrelál a Barrett carcinomás betegek rossz prognózisával (Pavlov és mtsai 2015).

Tanulmányunkban a nyelőcsőben kialakult intestinális metaplasia talaján termelődő vékonybélre jellemző nyák antigén **SIMA** (small bowel intestinal mucus antigén) és a vastagbélre jellemző **LIMA** (large bowel intestinal mucus antigén) immunhisztokémiai kimutatását végeztük. A nyelőcső nyálkahártya pluripotens őssejtjei a hosszú ideig fennálló alacsony pH érték mellett hengerhámsejteké differenciálódnak, amelyek ellenállóbbak a savas gyomortartalommal szemben. A kehelysejtek megjelenése a disztális nyelőcsőben biztos diagnosztikus jel a Barrett-nyelőcső igazolására. A nyáktermelő hengerhámsejtek és kehelysejtek által termelt mucint immunhisztokémiai és in situ hibridizációs tesztekkel ki tudjuk mutatni. Az immunhisztokémiai vizsgálatok előnye a mucin mRNS in situ hibridizációs módszerrel szemben, hogy gyorsabb és egyszerűbb (Arul 2000).

## 6.2. Az immunhisztokémia eredmények értékelése fénymikroszkóp és virtuális mikroszkóp segítségével

A vizsgált 100 szövettani blokkból készült 600 metszetet készítettünk, mivel ötféle gén és az apoptózis immunhisztokémia jelátvitelét vizsgáltuk. Az így elkészült 600 metszetet ezután fénymikroszkóppal, majd digitalizálás után virtuális mikroszkóppal is megvizsgáltuk. Minden egyes metszeten 1000-1000 sejtet számoltunk meg, és ezen belül elkülönítettük az immunhisztokémiaailag pozitív sejteket. (2. táblázat) A számítógépen digitalizált metszetenek először szabad szemmel végeztük el a sejtszámolást, majd ugyanezeneken a metszetenek a laboratóriumunkban kifejlesztett automatikus sejtszámolási technikával. Az automatizált sejtszámolási folyamatban először az epitheliális felszínt és a mirigystruktúrákat különítettük el, majd ezt követte az immunhisztokémiaailag pozitív sejtek meghatározása és leszámolása.

2. táblázat. A vizsgált minták megoszlása esetenként

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

A vizsgálatainkba bevont 600 immunhisztokémia metszeten, az alkalmazott háromféle sejtszámolási technikával kapott eredményeket statisztikai elemzéseknek vetettük alá, azzal céllal, hogy a megfigyelt hatféle immunhisztokémiai paraméter valamelyikében találunk-e érdemi eltérést a többihez képest. A paraméterek statisztikai elemzésre diszkriminancia analízist alkalmaztunk. A diszkriminancia analízis többváltozós statisztikai elemzést jelent, amelyben azt vizsgáljuk, hogy lehet-e valamilyen vizsgált jellemzők alapján szétválasztani az egyes csoportokat.

## 7. EREDMÉNYEK

### 7.1. A sejtciklussal összefüggő változások kimutatása ép nyelvcsőben, oesophagitisben és Barrett metaplasziában

A PCNA expressio az ép nyelvcsőben és az ép cardiából vett mintákban szignifikánsan alacsonyabb volt, mint reflux oesophagitisben. Szignifikáns különbség mutatkozott p53, a TUNEL módszer és az EGFR vonatkozásában az ép nyelvcsőminták és a Barrett metaplasziás minták között. A metaplasziás hám által termelt nyák antigénének (SIMA, LIMA) esetében egyik vizsgálati csoportban sem találtunk szignifikáns különbséget (3. táblázat). Vizsgálatainkból látszik, hogy már a gyulladás illetve a metaplasia stádiumában is fellelnek szignifikáns eltérések a különféle biomarkerek expressziójában, amelyek a korai diagnosztikában és esetleg a klinikai gyakorlatban is rutinszerűen alkalmazhatók lennének.

3. táblázat. Vizsgálati eredmények a három diagnosztikus csoportban /saját anyag/

Elnevezés Index +/- SD	PCNA	SIMA	LIMA	P53	TUNEL	EGFR
Ép nyelvcső	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 sejtciklussal összefüggő fehérje expressziós vizsgálatok fontos információkkal szolgálhatnak a reflux oesophagitis és a Barrett metaplasia sejtkinetikai változásainak megértéséhez. A vizsgálatainkban használt hatféle immunhisztokémiai paraméter változásait megfigyeltük fénymikroszkóppal és virtuális mikroszkóppal egyaránt. A hagyományos fénymikroszkópos vizsgálat rendkívül időigényes és csak szemikvantitatív kiértékelésre ad lehetőséget. A digitalizált metszeteket virtuális mikroszkóp alkalmazásával szabad szemmel a számítógép monitorjáról számoltuk meg, illetve automatizált sejtszámolás segítségével. Ezáltal könnyebbé, gyorsabbá, megbízhatóbbá, azaz felhasználóbaráttá lehet tenni a vizsgálatot. A hagyományos fénymikroszkópos sejtszámolás során egy-egy metszet áttekintése, és 1000 sejt megszámlálása átlagosan 90-120 percet vett igénybe. Ugyanezt a digitalizált

metszeteken lényegesen rövidebb idő alatt átlagosan 25-30 perc alatt tudtuk elvégezni. Figyelembe véve az átszámolt 600 metszetet jelentős mennyiségű időt és energiát spórolhatunk meg a metszetek digitalizálásával és különösen a virtuális mikroszkópia bevezetésével.

Az alkalmazott statisztikai elemző program alapján a digitalizált metszetek és a fénymikroszkópos metszetek kiértékelése között szignifikáns különbség nem volt. (4. táblázat)

#### 4. táblázat. Fény- és virtuális mikroszkóppal vizsgált adatok összehasonlítása

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

### 7.2. A vizsgált minták statisztikai elemzése diszkriminancia analízis alapján.

#### 7.2.1. Virtuális mikroszkópia

Az összes marker együttes alkalmazása esetében original és kereszt-validált számításokat alkalmaztunk, az első besorolja a markerek mért adatai alapján a mintákat, míg a kereszt-validált megközelítés minták kihagyásával és bevonásával egy szigorúbb értékelési rendszert állít fel. A három diagnosztikus csoportot az alábbi számokkal láttuk el:

0 - ép nyelőcső

1 - oesophagitis

2 – Barrett metaplázia

A táblázatban piros színnel jelöltük a minták megfelelő besorolását, feketével pedig ezek százalékos megoszlása látható. Original megközelítésben 19 egészséges sorolódott az egészséges csoportba, 22 oesophagitis az oesophagitis csoportba, 14 Barrettes pedig a Barrett metapláziás csoportba. Maradva az egészséges csoport besorolásánál 5 mintát az oesophagitis csoportba, 6 mintát pedig Barrett csoportba sorol:  $19+5+6=30$  minta. Ez százalékban kifejezve 63.3%, 16.7% és 20%.

Oesophagitis estén:  $22+2+6=30$ . Ugyanez százalékban kifejezve 73.3%, 6.7%, 20.0%.

Barrett metaplasia esetén:  $14+7+9=30$ . Százalékban: 46.7%, 23.3%, 30.0%.

Az eredeti számítási módszer esetében 61.1%, Cross-validált megközelítés esetében mintáknak 55.6 %-a saját csoportjába sorolódott. (5. táblázat)

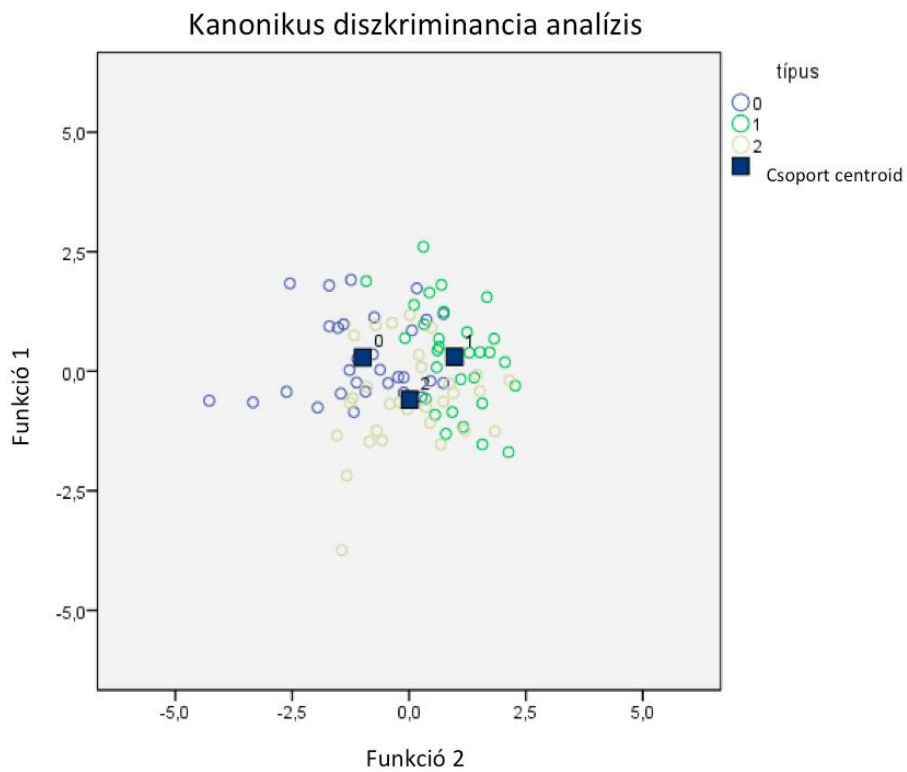
### 5. táblázat. Diszkriminancia analízis eredményei 6 marker esetén

#### Klasszifikációs eredmények<sup>a,c</sup>

		Típus	Előrejelzett csoportbesorolás			Összes
			0	1,0	2,0	
Original a,c	Szám	0	19	5	6	30
		1,0	2	22	6	30
		2,0	7	9	14	30
	%	0	63,3	16,7	20,0	100,0
		1,0	6,7	73,3	20,0	100,0
		2,0	23,3	30,0	46,7	100,0
Kereszt-validált b	Szám	0	18	5	7	30
		1,0	4	19	7	30
		2,0	7	10	13	30
	%	0	60,0	16,7	23,3	100,0
		1,0	13,3	63,3	23,3	100,0
		2,0	23,3	33,3	43,3	100,0

- az Original számítási módszerrel az esetek 61,1%-a került a saját csoportba.
- a Kereszt-validált számítási módszer figyelembe veszi az összes adatot, amelyet összevet a kóros adatokkal
- a Kereszt-validált számítási módszerrel az esetek 55,6%-a került a saját csoportba

Főkomponens elemzés képén a csoportok az alábbiak szerint néznek ki. (14. ábra)



**14. ábra Dimenzió redukciós módszer alkalmazása hat változó esetén virtuális mikroszkópia során /saját anyag/**



A két leghasznosabb vizsgálati konzekvenciát a PCNA és TUNEL vizsgálatok adták, melyek együttes hatása megközelíti a 6 marker együttes hatását. A minták 58.9%, kereszt-validált vizsgálati módban 56.7%-t sorolja megfelelően. (15. ábra, 16. ábra I-II. rész)

### 6. táblázat Diszkriminációs analízis eredményei 2 marker esetén

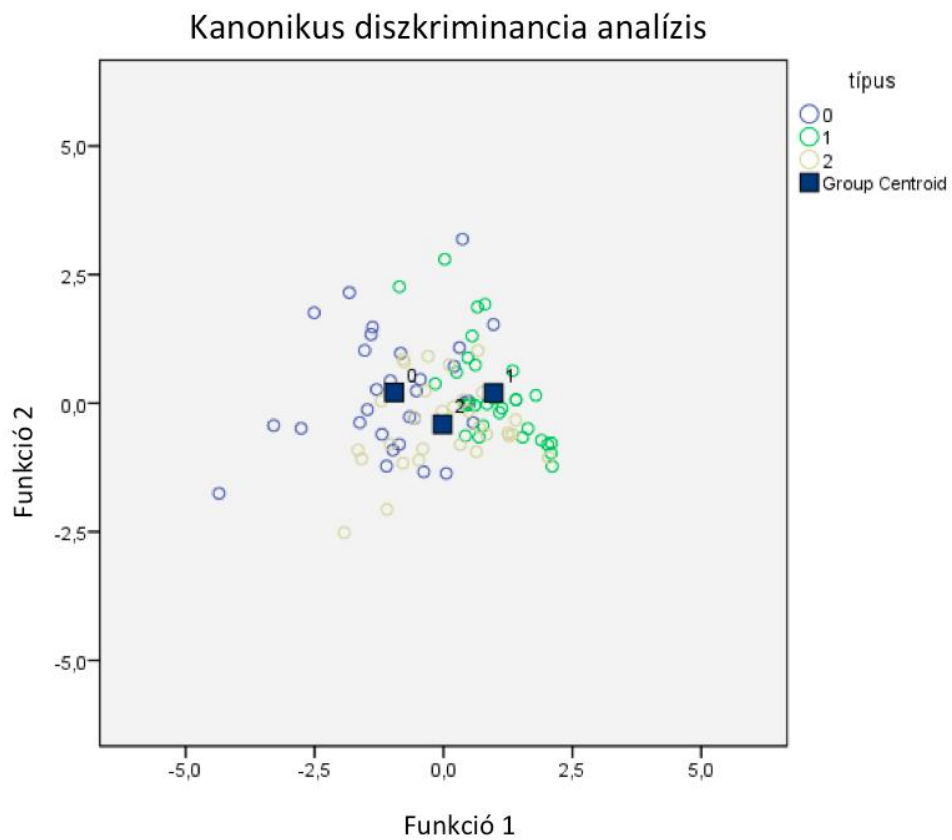
#### Klasszifikációs eredmények a,c

		Típus	Előrejelzett csoportbesorolás			Összes
			0	1,0	2,0	
Original a,c		0	17	6	7	30
	Szám	1,0	2	24	4	30
		2,0	8	10	12	30
		%	0	56,7	20,0	23,3
	%	1,0	6,7	80,0	13,3	100,0
		2,0	26,7	33,3	40,0	100,0
		0	17	6	7	30
Kereszt-validált b	Szám	1,0	2	24	4	30
		2,0	9	11	10	30
		%	0	56,7	20,0	23,3
	%	1,0	6,7	80,0	13,3	100,0
		2,0	30,0	36,7	33,3	100,0

a. az Original számítási módszerrel az esetek 58,9%-a került a saját csoportba

b. a Kereszt-validált számítási módszer figyelembe veszi az összes adatot, amelyet összevet a kóros adatokkal

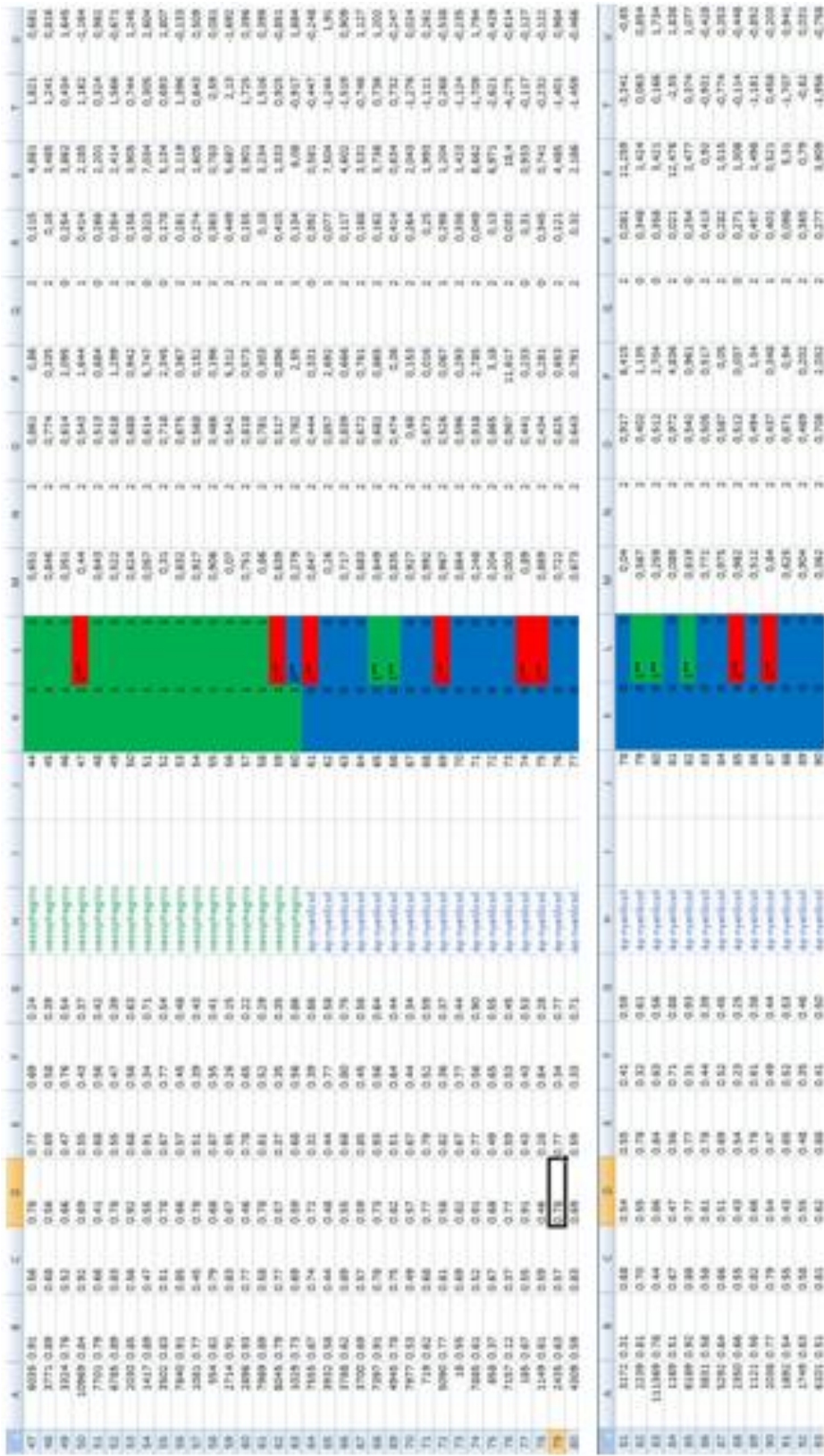
c. a Kereszt-validált számítási módszerrel az esetek 56,7%-át igazolta (6. táblázat)



**15. ábra. Dimenzió redukciós módszer két változó esetén (PCNA és TUNEL)**

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U																								
Barrett study - Virtuális Mikroszkópia																																												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
kódszám	PCOIA	p53	LUMA	SIMA	EGR	TUNEL	tipus	Original	Case Number	Actual Group	Highest Group	P   P(=0)   Gg	df	P   Gg   Dsd Squared	Second Highest Group	P   Gg   Dsd Squared	Discriminant Scores	Function 1	Function 2																									
1	1844	0.37	0.82	0.87	0.24	0.32	0.19	Barrett	1	Original	1	0.002	2	0.886	12,019	0	0.099	16,451	-1,438	-3,759																								
2	7135	0.84	0.74	0.77	0.12	0.44	0.30	Barrett	2	Original	2	0.564	2	0.564	3,179	2	0.42	3,767	1,837	-1,258																								
3	5847	0.75	0.77	0.68	0.55	0.23	0.28	Barrett	3	Original	3	0.241	2	0.695	1,32	1	0.241	3,488	0,679	-1,529																								
4	4422	0.67	0.81	0.55	0.67	0.20	0.65	Barrett	4	Original	4	0.825	2	0.516	0.984	2	0.596	0,914	-0,904	-0,324																								
5	2664	0.64	0.67	0.79	0.37	0.51	0.45	Barrett	5	Original	5	0.925	2	0.532	0.05	0	0.268	1,495	-0,202	-0,647																								
6	2503	0.72	0.71	0.88	0.65	0.45	0.32	Barrett	6	Original	6	0.809	2	0.63	0.423	1	0.263	2,186	0,445	-1,079																								
7	2010	0.69	0.66	0.55	0.57	0.34	0.52	Barrett	7	Original	7	0.911	2	0.544	0.187	0	0.315	1,279	-0,408	-0,682																								
8	421	0.71	0.78	0.78	0.71	0.40	0.44	Barrett	8	Original	8	0.718	2	0.49	0.045	0	0.113	2,082	-0,388	-0,797																								
9	6911	0.82	0.69	0.82	0.65	0.35	0.45	Barrett	9	Original	9	0.781	2	0.489	0.274	2	0.423	0,897	0,952	-0,455																								
10	6460	0.37	0.73	0.68	0.64	0.34	0.35	Barrett	10	Original	10	0.489	2	0.695	1.215	0	0.292	3,119	-0,845	-1,471																								
11	7853	0.49	0.33	0.66	0.72	0.34	0.21	Barrett	11	Original	11	0.641	2	0.534	0.895	2	0.4	1,658	-1,265	-0,665																								
12	1386	0.61	0.79	0.71	0.82	0.45	0.32	Barrett	12	Original	12	0.651	2	0.609	0.821	0	0.295	2,456	-0,69	-1,245																								
13	5991	0.67	0.51	0.65	0.56	0.35	0.64	Barrett	13	Original	13	0.765	2	0.645	0.556	2	0.192	2,956	-0,712	0,967																								
14	7848	0.56	0.76	0.53	0.66	0.52	0.40	Barrett	14	Original	14	0.679	2	0.599	0.775	2	0.389	1.5	-1,21	-0,565																								
15	6661	0.38	0.45	0.59	0.53	0.38	0.54	Barrett	15	Original	15	0.893	2	0.735	0.448	2	0.171	3,219	-1,176	0,751																								
16	6478	0.73	0.68	0.91	0.75	0.62	0.52	Barrett	16	Original	16	0.695	2	0.534	0.91	1	0.263	2,292	-0,364	1,01																								
17	4014	0.63	0.84	0.53	0.64	0.26	0.35	Barrett	17	Original	17	0.582	2	0.684	1.092	0	0.239	3,182	-0,578	-1,447																								
18	3748	0.48	0.79	0.66	0.48	0.51	0.42	Barrett	18	Original	18	0.256	2	0.451	2.877	2	0.486	2,997	-1,544	-1,344																								
19	2789	0.87	0.76	0.87	0.66	0.62	0.33	Barrett	19	Original	19	0.668	2	0.655	0.806	2	0.312	2,286	1,516	-0,414																								
20	983	0.77	0.84	0.55	0.73	0.66	0.41	Barrett	20	Original	20	0.77	2	0.389	0.524	1	0.384	0.551	0.263	0.088																								
21	7887	0.48	0.91	0.65	0.33	0.47	0.59	Barrett	21	Original	21	0.114	2	0.704	4.343	0	0.276	6,215	-1,334	-2,18																								
22	7239	0.77	0.77	0.56	0.65	0.81	0.29	Barrett	22	Original	22	0.432	2	0.412	1.691	0	0.388	1,804	0,018	1,178																								
23	2770	0.84	0.87	0.78	0.76	0.42	0.57	Barrett	23	Original	23	0.554	2	0.554	1.8	1	0.406	2,422	1,189	-1,239																								
24	4730	0.78	0.77	0.65	0.44	0.69	0.35	Barrett	24	Original	24	0.849	2	0.509	0.27	2	0.397	0,824	0,859	-0,258																								
25	8407	0.77	0.85	0.78	0.73	0.45	0.45	Barrett	25	Original	25	0.567	2	0.567	0.146	1	0.29	1,483	0,362	-0,75																								
26	7824	0.85	0.66	0.68	0.83	0.37	0.58	Barrett	26	Original	26	0.786	2	0.544	0.614	2	0.222	2,477	0,482	0,812																								
27	7667	0.79	0.79	0.76	0.77	0.54	0.32	Barrett	27	Original	27	0.77	2	0.488	0.522	1	0.406	0,951	0,736	-0,833																								
28	4517	0.74	0.32	0.72	0.64	0.35	0.44	Barrett	28	Original	28	0.746	2	0.399	0.586	2	0.34	0,906	0,21	0,34																								
29	1567	0.85	0.68	0.56	0.42	0.52	0.29	Barrett	29	Original	29	0.834	2	0.696	0.364	2	0.263	2,311	1,444	-0,076																								
30	3587	0.91	0.77	0.47	0.33	0.70	0.18	Barrett	30	Original	30	0.444	2	0.814	1.625	2	0.174	4,712	2,148	-0,194																								
31	5023	0.92	0.65	0.66	0.56	0.64	0.22	Barrett	31	Original	31	0.553	2	0.845	1.178	2	0.14	4,771	2,054	0,191																								
32	2757	0.78	0.84	0.79	0.44	0.34	0.43	Barrett	32	Original	32	0.637	2	0.637	1.113	1	0.199	2,629	0,788	-1,309																								
33	1648	0.92	0.77	0.86	0.58	0.69	0.19	Barrett	33	Original	33	0.573	2	0.819	2,055	2	0.171	5,186	2,275	-3,303																								
34	2396	0.84	0.82	0.91	0.69	0.77	0.42	Barrett	34	Original	34	0.888	2	0.596	0.237	2	0.337	1,376	1,108	-0,166																								
35	8457	0.74	0.68	0.78	0.56	0.35	0.34	Barrett	35	Original	35	0.82	2	0.583	0.366	1	0.312	1,646	0,557	-0,911																								
36	5790	0.87	0.81	0.61	0.67	0.23	0.27	Barrett	36	Original	36	0.182	2	0.541	3.294	1	0.489	3,713	1,567	-1,531																								
37	2407	0.77	0.88	0.49	0.77	0.50	0.32	Barrett	37	Original	37	0.943	2	0.579	0.118	1	0.315	1,151	0,357	-0,576																								
38	4071	0.91	0.91	0.68	0.83	0.45	0.71	Barrett	38	Original	38	0.832	2	0.59	0.251	0	0.248	2	0,641	0,676																								
39	3401	0.86	0.72	0.77	0.69	0.33	0.69	Barrett	39	Original	39	0.381	2	0.484	1.931	0	0.365	2,406	1,107	1,388																								
40	5628	0.72	0.60	0.53	0.45	0.45	0.33	Barrett	40	Original	40	0.615	2	0.39	0.971	1	0.394	1,284	-0,09	0,693																								
41	510	0.94	0.57	0.58	0.66	0.56	0.38	Barrett	41	Original	41	0.361	2	0.902	2,093	2	0.064	7,337	1,665	1,551																								
42	625	0.82	0.77	0.84	0.66	0.59	0.37	Barrett	42	Original	42	0.516	2	0.516	0.154	2	0.291	1,407	0,506	0,187																								
43	6746	0.85	0.65	0.57	0.59	0.55	0.58	Barrett	43	Original	43	0.947	2	0.732	0.109	2	0.211	2,592	1,292	0,388																								

16. ábra. I. rész: Virtuális Mikroszkópia során használt adatok összegzése



16. ábra. II. rész: Virtuális Mikroszkópia során használt adatok összegzése

### 7.2.2. Fénymikroszkópia

Az összes marker együttes használata esetében original és kereszt-validált számításokat alkalmaztunk, éppen úgy, ahogy a virtuális mikroszkópia során. Az első besorolja a markerek mért adatai alapján a mintákat, míg a kereszt validált megközelítés minták kihagyásával és bevonásával egy szigorúbb értékelési rendszert állít fel. A három diagnosztikus csoportot is hasonlóan neveztük el:

0 - ép nyelőcső

1 - oesophagitis

2 – Barrett metaplasia

A táblázatban piros színnel jelöltük a minták megfelelő besorolását, feketével pedig ezek százalékos megoszlása látható. Original megközelítésben 21 egészséges sorolódott az egészséges csoportba, 22 oesophagitis az oesophagitis csoportba, 17 Barrettes pedig a Barrett csoportba. Maradva az egészséges csoport besorolásánál 5 mintát az oesophagitis csoportba, 4 mintát pedig Barrett csoportba sorol:  $21+5+4=30$  minta. Ez százalékban kifejezve 70%, 16.7% és 13.3%.

Oesophagitis esetén:  $22+1+7=30$ . Százalékban kifejezve: 73.3%, 3.3%, 23.3%

Barrett metaplasia esetén:  $17+6+7=30$ . Százalékban: 56.7%, 20.0%, 23.3%

Az eredeti számításos módszer esetében 66.7%, kereszt-validált megközelítés esetében 58.9%-a a mintáknak saját csoportjába sorolódott. Ezek az értékek kicsivel magasabbak, mint a virtuális mikroszkópos eredmények ahol 61.1% volt az eredeti számításban az eredmény, kereszt validáltban pedig 55.6%.

**7. táblázat Diszkriminációs analízis 6 marker esetén /saját anyag/**

Klasszifikációs eredmények a, c

		Típus	Előrejelzett csoportbesorolás			Összes
			0	1,0	2,0	
Original a,c		0	21	5	4	30
	Szám	1,0	1	22	7	30
		2,0	6	7	17	30
			0	70,0	16,7	13,3
	%	1,0	3,3	73,3	23,3	100,0
		2,0	20,0	23,3	56,7	100,0
		0	21	5	4	30
Kereszt-validált b	Szám	1,0	2	20	8	30
		2,0	6	12	12	30
			0	70,0	16,7	13,3
	%	1,0	6,7	66,7	26,7	100,0
		2,0	20,0	40,0	40,0	100,0
			0	21	5	4

- a. az Original számítási módszerrel az esetek 66,7%-át sorolta a megfelelő csoportba
- b. a Kereszt-validált számítási módszer figyelembe veszi az összes adatot, amelyet összevet a kóros adatokkal
- c. a Kereszt-validált számítási módszerrel az esetek 58,9%-át sorolta a megfelelő csoportba (7. táblázat)

A két leghasznosabb vizsgálati konzekvenciát a PCNA és TUNEL vizsgálatok adták, melyek együttes hatása megközelíti a 6 marker együttes hatását. A minták 63.3%, kereszt-validált vizsgálati módban 63.3%-t sorolja megfelelően. Ezek az értékek kicsit jobbak, mint a virtuális mikroszkóp esetében kapott 58.9% az eredeti számítás esetében és 56.7% a kereszt-validált vizsgálati módban.

### 8. táblázat Diszkriminációs analízis 2 marker esetén /saját anyag/

#### Klasszifikációs eredmények a,c

		Típus	Előrejelzett csoportbesorolás			Összes
			0	1,0	2,0	
Original a,c		0	19	6	5	30
	Szám	1,0	1	25	4	30
		2,0	7	10	13	30
			0	63,3	20,0	16,7
	%	1,0	3,3	83,3	13,3	100,0
		2,0	23,3	33,3	43,3	100,0
		0	19	6	5	30
Kereszt-validált b	Szám	1,0	1	25	4	30
		2,0	7	10	13	30
			0	63,3	20,0	16,7
	%	1,0	3,3	83,3	13,3	100,0
		2,0	23,3	33,3	43,3	100,0
			0	19	6	5

a. az Original számítási módszerrel az esetek 63,3%-a került a megfelelő csoportba

b. a Kereszt-validált számítási módszer figyelembe veszi az összes adatot, amelyet összevet a kóros adatokkal

c. a Kereszt-validált számítási módszerrel az esetek 63,3%-át sorolta a megfelelő csoportba. (8. táblázat)

A fénymikroszkóppal és virtuális mikroszkóppal elvégzett sejtszámolást statisztikai elemzését diszkriminancia analízis alapján összegeztük. A statisztikai adatokból megállapítható, hogy hat változó együttes kiértékelése esetén a három diagnosztikus csoportot el tudtunk különíteni, mindkét vizsgálati módszerben megközelítőleg 60-70%-os biztonsággal. A fénymikroszkópos sejtszámolás statisztikai adatai néhány százalékkal jobbak voltak, mint a virtuális mikroszkópia adatai, de szignifikáns különbséget nem mutattak. Mindezek alapján megállapítható, hogy Barrett metaplasia diagnosztikájában használt immunhisztokémia festési eljárásokkal jelölt biomarkerek kiértékelésében a szemikvantitatív, időigényes fénymikroszkópos vizsgálatok helyett, biztonsággal alkalmazhatjuk, gyorsabb, kvantitatív virtuális mikroszkópos technikát.

Természetesen mint minden új eljárásnak az elterjedése az anyagi kérdésen túl a szakmai elfogadáson is múlik.



## 8. MEGBESZÉLÉS

### 8.1. A sejtciklussal összefüggő változások ép és gyulladósos nyelőcsőben

Munkám során a krónikus gastro-oesophagealis reflux talaján kifejlődő Barrett metaplasziának, mint praemalignus folyamatnak a tanulmányozását végeztem nyelőcső biopsziás mintákban. A Barrett nyelőcső kialakulásának korai felismerése olyan kulcs lehet a kezünkben a későbbiek során, amivel közelebb jutunk az utóbbi évtizedekben jelentős növekedést mutató nyelőcső adenocarcinoma korai felismeréséhez és sikeres gyógyításához.

Az általunk végzett tanulmányban megfigyelt különféle biomarker változások is felhívják a figyelmet arra, már a gyulladás és metaplasia stádiumában is fellépnek szignifikáns eltérések, amelyek a korai diagnosztikában, esetleg a klinikai gyakorlatban is rutinszerűen alkalmazhatók lennének. Az alábbi táblázatban láthatjuk a Barrett nyelőcsőben eddig ismert és kutatott genetikai változásokat és azokat a vizsgálatokat, amelyek a napi klinikai gyakorlatokban már alkalmazásra kerültek. (Fléjou 2005) (9. táblázat)

### 9. táblázat Molekuláris biomarkerek változása Barrett nyelőcsőben, daganatos átalakulás során - diagnosztikus használatuk a klinikai gyakorlatban

Biomarkerek	Változások	Gyakorlati alkalmazás
<b>Proliferációs faktorok növekedése</b>		
Immunhisztokémia	Ki 67 expresszió HGD-ben	++
Flow citometria	G2-M fázis növekedése	+
<b>Sejtciklus szabályozása</b>		
p16 (CDKN2A)	Heterozigotizmus korai elvesztése, késői hipermetiláció a második allélban	-

ciklin D1 és E	Az expresszió magnövekedése daganatban	-
GF és GFR (növekedési faktorok)		
TGF $\alpha$ , EGF	Az expresszió magnövekedése daganatban	-
EGFR	Fokozott amplifikáció daganatban	-
c-erbB2 (Her-2)	Kevésbé gyakori overexpresszió mint EGFR	-
<b>Tumor szupresszor gének</b>		
p53	Gyakori mutáció HGD-ben és daganatban	++
APC	Heterozigotizmus korai elvesztése és promoter metiláció	-
Rb	Ritkán előfordulás	-
<b>Sejtadhézió</b>		
E-cadherin	Expresszió csökkenése daganatban	+/-
<i>béta</i> catenin	Expresszió csökkenése és sejtmag deformitás	+/-
COX-2	Expresszió növekedése, angiogenezis növekedése és apoptózis csökkenése	?
Telomeráz	Diszpláziával paralell növekedés	-
DNS ploiditás	Korai DNS ploiditásváltozás	+
Bcl2/bax	Az egyensúly megváltozása	?
Mikroszatelit instabilitás	Daganatban ritka	-

Kifejlődött displáziában és carcinomában végzett biomarker vizsgálatok a korai változások tanulmányozásra nem alkalmasak. Igyekeztünk a gyulladós folyamat minél korábbi stádiumában megfigyelni azokat a változásokat, amelyek a későbbiekben a kifejlődött displasiákban és Barrett carcinomában már jelentős koncentrációban kialakulnak. A sejtciklus változások, a tumor suppressor gének, növekedési faktorok koncentrációjának változása, az apoptózis folyamatnak károsodása, és a hengerhám által termelt nyák antigének kimutatása fókuszáltunk.

Tanulmányunkban először ép nyelőcső mintákat, gyulladós nyelőcsőmintákat és displasia jeleit még nem mutató, Barrett metaplasziás hámot vizsgáltunk. Mindhárom csoportból kiválasztott 30-30 beteg biopsziás mintáinak parafinos blokkjaiból készítettünk, az általunk kiválasztott hatféle biomarkernek megfelelően immunhisztokémiai metszeteket. A biomarkerek kiválasztásában igyekeztünk az eddig ismert genetikai eltérések minél szélesebb skálájáról meríteni. A sejtproliferáció zavarát és a sejtciklus károsodását a PCNA-val reprezentáltuk. A sejtnövekedési faktorok közül az EGFR-t vizsgáltuk. A tumor suppressor gének közül a p53, az apoptózis igazolására a TUNEL módszert használtuk. A metaplasziás hámban termelődő nyák antigének kimutatását a SIMA és LIMA biomarkerekkel végeztük.

Tanulmányunkban PCNA expressiója az egészséges nyelőcső biopsziás mintákban szignifikánsan alacsonyabb ( $p < 0,05$ ) mint reflux oesophagitisben és Barrett metaplasziában.

Ha a genom valamely okból károsodik a sejtciklus a G1 fázisban megáll, amíg a hiba kijavításra nem kerül. Amennyiben a hibát nem sikerül kijavítani beindul a programozott sejthalál az apoptózis. Az apoptózis a sejtek nekrozisával szemben egy aktív, energiát igénylő folyamat, amely új gének expressiójával és fehérjék szintézisével jár. Az apoptózis folyamatában és a sejtciklus szabályozásában számos közös pont van, hiszen a két folyamatnak a megfelelő sejtmennyiség biztosításához egyensúlyban kell lennie. Ennek a közös szabályozó mechanizmusnak a legjobb biomarkere a Ki-67 (Buttar és mtsai 2002).

Az apoptózis során az endonukleázok aktiválódnak, és a DNS-t a nukleoszómák között elvágják, a fehérjék hasításában a kaszpázok vesznek részt. A sejtmag fragmentálódásának megjelenítésére az apoptózis igazolására tanulmányunkban a TUNEL (Terminal deoxynucleotid transferase-mediated dUTP Nick and Labelling)

metódust használtuk. Vizsgálatainkban szignifikáns különbség mutatkozott az ép és a Barrett minták között. A TUNEL módszerrel megfestett apoptotikus sejtek esetében, Barrett metaplasziában alacsonyabb volt számuk, mint ép nyelőcsőben, ami a metaplasziás hámban az apoptózis csökkenését mutatja.

A protoonkogének közül az EGFR került vizsgálatra, ami a sejtosztódást és a növekedési faktorok hatásmechanizmusában szerepet játszó fehérjéket kódolja. Ennek a protoonkogénnek a felerősödését detektálták a legtöbb nyelőcső adenocarcinoma késői stádiumában, amikor már a nyirokcsomó metasztázisok megjelenése várható (Fléjou 2005). Vizsgálatainkban az EGFR az ép és oesophagitis mintákban szinte azonos eredményt adott, a Barrett mintákban viszont szignifikánsabban alacsonyabb értéket találtunk ( $p < 0,05$ ).

Az egyik legfontosabb tumorsupressor gén a p53 a sejtosztódást gátló fehérjéket kódolja. Ha ez a gén delécióval szenved, vagy megváltozik, akkor hibás működésű fehérjét kódol, ami tumorok kialakulásához vezet. A sejten belül a p53 számos fehérjét és gént szabályoz, így bármilyen károsodása a tumorok kifejlődését megkönnyíti. A p53 mutációk gyakran következnek be a metaplasia-displasia-adenocarcinoma szekvencia során, mert a megváltozott tumorsupressor gén nem képes az apoptózis irányába lökni a károsodott sejteket. A rendellenes és működésképtelen p53 féléletideje meghosszabodik és az ezzel járó celluláris p53 koncentráció emelkedése lehetővé teszi, hogy immunhisztokémia módszerekkel is kimutatható legyen. A p53 gén funkciójának hiánya jól korrelál a Barrett carcinomas betegek rossz prognózisával.

Az általunk vizsgált ép és gyulladással járó nyelőcsőmintákban azt figyeltük meg, hogy az ép nyelőcsőmintákban a p53 koncentráció alacsonyabb volt, mint oesophagitisben és Barrett metaplasziában pedig szignifikánsan magasabb volt a p53 koncentráció, mint ép nyelőcsőmintákban ( $p < 0,05$ ). A Barrett mintákban magasabb volt az érték, mint oesophagitisben, de szignifikáns különbséget itt nem találtunk.

Tanulmányunkban a nyelőcsőben kialakult intestinális metaplasia talaján termelődő vékonybélre jellemző nyák antigén SIMA (small bowel intestinal mucus antigén) és a vastagbélre jellemző LIMA (large bowel intestinal mucus antigén) immunhisztokémia kimutatását végeztük. Az eredmény azt mutatta, hogy a metaplasziás hámban, oesophagitisben és az ép nyelőcsőben a vékony-és vastagbélnyák antigén vonatkozásában érdemi eltérést nem találtunk.

A hat immunhisztokémiai marker tekintetében négy esetben találtunk szignifikáns eltérést az ép és a metaplaziás nyelőcső között, két esetben, a nyák antigének vonatkozásában azonban nem találtunk különbséget.

Vizsgálatainkban szeretnénk volna egy olyan sejtciklussal összefüggő molekulárgenetikai faktort, ill. faktorokat keresni, amelyek segítségével lehetőségünk adódik krónikus reflux talaján kialakuló metaplasia korai felismerésére. A populáció 30 %-át érintő krónikus reflux betegség mellett mindössze 1-3 %-ra tesszük a Barrett metaplasia kialakulását.

Nem minden refluxos betegnél alakul ki Barrett metaplasia, és csak a felismert Barrett metaplasiás betegek utánkövetését végezzük. Minden refluxos betegnél el kellene végezni gastroszkópos vizsgálatot és Barrett oesophagusra jellemző endoszkópos kép esetén típusos helyekről szövettani mintát kellene venni. Mindez Magyarországon kb. 3 millió ember endoszkópos vizsgálatát jelentené. Nem beszélve arról a tényről, hogy számos betegnél sem a típusos, sem az atípusos refluxra jellemző tünetek nélkül is kialakul a Barrett metaplasia, és egy más okból végzett gasztroszkópos vizsgálat során véletlenül kerül felismerésre.

Megállapíthatjuk, hogy a teljes népességet érintő Barrett metaplasiára vonatkozóan nincsenek pontos adataink csupán feltételezéseink. Sőt azt sem tudjuk biztosan kijelenteni, hogy a metaplasia kialakulása után minden esetben várható-e a metaplasia-displasia-adenocarcinoma szekvencia beindulása. Egy prospektív tanulmány alapján a felismert metaplasiás betegek utánkövetése során 1 év után 0,5-1%-ra tesszük az adenocarcinoma kialakulását, tíz év után mindez már 5-10 %, 20-30 év után pedig már 18-36%.

A Barrett metaplasia szűrése jelenleg nincs megoldva. A nyelőcső adenocarcinomára vonatkozóan rizikócsoportha sorolt populáció szűrése azonban jó szervezéssel technikailag megoldható lenne. Számos epidemiológiai tanulmány alapján a nyelőcső adenocarcinomára leginkább hajlamos rizikócsoportha sorolhatók azok, az 50-70 év közötti obes [BMI > 30], fehér férfiak, akiknél legalább 10 éve fennállnak krónikus refluxra jellemző tünetek. Ezt a beteg populációt szükséges lenne legalább egyszer felső panendoszkópos vizsgálatra irányítani, és akiknél az endoszkópos kép alapján felmerül a Barrett metaplasia, típusos helyekről nyelőcső biopsziákat kell venni. A biopsziás mintákat gyakorlott patológusok által történő kiértékelése mellett,

biomarkerek ellenőrzése is fontos lenne. A kiszűrt metaplasziás beteget a protokoll szerint 3 évente rendeljük vissza kontrol endoszkópos vizsgálatra és a szövettani értékelés mellett a biomarkerek változását is nyomonkövethetjük. Számos tanulmány alapján jelenleg a biomarkerek közül a p53 ellenőrzése, az SOX2 mint a transzkripciós faktorokat szabályozó biomarker ellenőrzése, a CDKN2A (p16) rutinszerű ellenőrzése sokat javítaná az utánkövetés eredményeit (Olphen és mtsai 2015, Pavlov és mtsai 2015). Low grade dysplasia (LGD) esetén évente kell elvégezni a biopsziás mintavételt, és mindezt kiegészítve a fenti biomarkerek és az újabban javasolt a Toll-like 9 receptor rutinszerű ellenőrzésével is (Huhta és mtsai 2015).

### **Az antireflux műtétek szerepe a Barrett metaplasziában**

Természetesen a szűrés kiterjesztése a rizikócsoporthoz sorolt betegeknek, kiegészítve a biomarkerek ellenőrzésével újabb terhet róva az egészségügyi apparátusra és a költségek jelentős növekedésével is járna. De figyelembe véve az elmúlt évtizedek tapasztalatait a sem a hatásos savcsökkentő kezelések, sem a savas és epés refluxot is megszüntető antireflux műtétek most már 20 éves klinikai eredményeit ismerve, a nyelőcső adenocarcinomák száma nem csökkent, sőt emelkedő tendenciát mutat (Spechler 2002, Curvers és mtsai 2008)

Az antireflux műtétek után végzett prospektív randomizált vizsgálatok, metaanalízisek adatbázisából kiderült, hogy nem találunk szignifikáns különbséget az adenocarcinoma incidenciáját illetően antireflux műtéten átesett és csupán protonpumpa kezelésben részesülő betegek között (Souza és mtsai 2001). Az antireflux műtétek elemzéséből kiderül, hogy csökkentik a metaplasziás hámból a displasias hám kialakulásának progresszióját, és short segment Barrettben kifejezett javulás mutatkozik, de long segment Barrettben azonban nem találtak érdemi javulást (Curvers és mtsai 2008). Antireflux műtétek után a beteg tünetei csökkennek, de 24 órás pH monitorozás bizonyítja, hogy tünetmentes betegeknek is kialakul kóros refluxtevékenység a műtét ellenére, és az endoszkópos utánkövetést nem lehet megszüntetni (Allaix és Patti 2015).

Jelenleg a krónikus reflux talaján kialakuló Barrett metaplaszia az egyetlen oki tényezőként elfogadott faktor a nyelőcső adenocarcinoma kialakulásában. Ezért nekünk a felfedezett metaplasziás esetek endoszkópos és szövettani után követése mellett a

molekulárgenetikai kutatások alapján felfedezett és használható biomarkerek ellenőrzése is fontos, hogy a displasia kialakulását előrejelezhessük (Wu és mtsai 1998). További kutatásokra van szükség, hogy a metaplasiát ne csak véletlenszerűen fedezzük fel, hanem célzottan szűrjük a rizikócsoportokat.

## ***8.2. Fénymikroszkóppal és virtuális mikroszkóppal kapott eredmények összehasonlítása diszkriminancia analízis alapján.***

Az általunk vizsgált 600 metszet mindegyikét hagyományos fénymikroszkópos technikával átnéztünk és a tárgylemezenként megszámlolt 1000-1000 sejt adatait összegeztük, és ezen belül a jelátvitelre használt AEC (amino-etil-karbazol) pozitív sejtmagokat számoltuk meg. Közben lemértük az egyes metszetek átnézésére fordított időt. A hagyományos fénymikroszkópos eljárás rendkívül időigényes és nem teljesen pontos ún. szemikvantitatív eljárásnak tekinthető. Ezt követően elvégeztük a laboratóriumunkban kifejlesztett digitális sejtszámolást is. A digitalizált metszet alapú automatizált sejtszámolási folyamatban először az epitheliális felszínt és a mirigystruktúrákat különítettük el, majd ezt követte az immunhisztokémiailag pozitív sejtek meghatározása és leszámolása. A digitalizált metszeteken összehasonlítóképpen a számítógép által végzett automatizált számolási technikán kívül szabad szemmel is megszámloltuk az AEC pozitív sejtmagokat. A virtuális mikroszkópia során nyert manuális sejtszámolás azonos eredményt adott a hagyományos fénymikroszkópia során nyert eredménnyel, de a virtuális mikroszkópia lényegesen gyorsabb és kényelmesebb eljárás. Mindkét módszerrel végzett manuális sejtszámolást összehasonlítottuk a laboratóriumunkban kifejlesztett automatizált sejtszámolás technikával és nem találtunk szignifikáns különbséget a két eredmény között.

A fény-és virtuális mikroszkópia során nyert adatokat statisztikai elemzését diszkriminancia analízis alapján is elvégeztük. Az alkalmazott 6 változó együttes felhasználásával (PCNA, EGFR, p53, TUNEL, SIMA, LIMA) a kiértékelésben a számítógép elkülönítette 60-70 %-os valószínűséggel az általunk vizsgált három diagnosztikus csoportot (ép nyelőcső -0, oesophagitis-1, Barrett metaplasiá-2) original és kereszt validált számítási módszer segítségével.

A fénymikroszkópos számítás adatai a virtuális mikroszkópia adatainál a statisztikai elemzés alapján tendenciájukban jobbak voltak, de szignifikáns különbség nem volt közöttük. A hat biomarker közül kettő volt (PCNA, TUNEL) amelyek együttes hatása az original és kereszt-validált számítási módszerben megközelíti a hat változó együttes hatását (63,3 %).



## 9. KÖVETKEZTETÉSEK

### *9.1. A sejtciklussal összefüggő változások kimutatása ép és gyulladós nyelőcsőben*

A nyelőcső adenocarcinomában ismert genetikai változások fehérje-expressiójának kimutatása már régóta ismert. Arra szeretnénk volna tanulmányunkban választ kapni, hogy a nyelőcsőben a krónikus reflux talaján kialakuló gyulladós folyamatban illetve a displasia nélküli metaplasziában is megfigyelhetők-e ezek a fehérje-expressziós eltérések. A vizsgálatunkban alkalmazott hat biomarker (PCNA, EGFR, TUNEL módszer, p53, SIMA, LIMA) közül négy esetében szignifikáns különbséget találtunk az ép nyelőcső és a Barrett metaplasziás nyelőcső között. A két mucosa antigén esetében (SIMA, LIMA) nem volt mérhető különbség az ép, a gyulladós és a metaplasziás hám között.

Érdemes lenne a rizikócsoportha sorolt betegek esetében az utánkövetésben figyelembe venni molekulárgenetikai változásokat. Véleményünk szerint a molekuláris kutatások további fejlődése nemcsak a tumor biológiai viselkedésére vonatkozó ismereteinket gazdagítja, hanem adott esetben új, korai diagnosztikus lehetőségek tárházát nyitja meg.

A rendszeresen végzett endoszkópos utánkövetés, az alkalmazott gyógyszeres kezelés, az elvégzett antireflux műtétek (fundoplikáció), az endoszkópos ablatív kezelés és mucosectomia mellett a nyelőcső adenocarcinoma előfordulása nem csökkent, hanem jelentős emelkedést mutatott az elmúlt évtizedekben.

Az általunk végzett tanulmányban megfigyelt különféle biomarker változások is felhívják a figyelmet arra, hogy már a gyulladás és a metaplasia stádiumában is fellépnek szignifikáns eltérések, amelyek a korai diagnosztikában, esetleg a klinikai gyakorlatban is rutinszerűen alkalmazhatók lennének és reményeink szerint újabb lépcsőfokot jelentenek a metaplasia-displasia-adenocarcinoma folyamatának minél korábbi felismerésére.

## ***9.2. A fénymikroszkópos- és digitális mikroszkópos kiértékelés összehasonlítása.***

Tanulmányunk másik következtetése az volt, hogy a sejtciklussal összefüggő biomarker változások immunhisztokémiai kimutatására használt fénymikroszkópos technika mellett a virtuális mikroszkópia is megbízhatóan használható. Az eredmények tekintetében érdemi különbséget a két módszer között a megvizsgált 600-600 metszetben nem találtunk. A digitalizált metszetek kiértékelése lényegesen meggyorsítja és megbízhatóbbá teszi a diagnosztikus folyamatot.

Az eddig megismert genetikai változások figyelembe vétele mind egy-egy újabb apró lépést jelent a korai diagnózis felállításában, azonban tudjuk, hogy még számtalan lépést meg kell tennünk, hogy ismereteink tovább bővüljenek. A digitális mikroszkópia alkalmazása, a biomarkerek rutinszerű kimutatása egy hosszú, de ígéretes út megnyílását mutatja a daganatkutatásban.

A Barrett nyelőcső, mint önálló klinikai kórkép már 50 éve ismert és kutatott területe a medicinának, mégis az eredmények tekintetében szerénynek kell maradnunk. A klinikus számára, szomorú, hogy rendszeres ellenőrzés és kezelés ellenére, mégis sokszor olyan előrehaladott stádiumban kerülnek Barrett carcinomával a betegek műtétre, amikor a radikális sebészeti műtéttől sem várhatók jó eredmények.

Számunkra nem marad más, mint a diagnosztikus lehetőségek bővítése, amelyekkel időben felfedezhetjük a metapláziás hámból a displáziás hám kialakulását, ami lehetővé teszi az adequat kezelést, ezáltal a betegek gyógyulását és életminőségük hosszútávú javulását.

1. Vizsgálataink alapján reflux oesophagitisben és Barrett metaplasiában már jelen vannak azok sejtciklussal összefüggő fehérje expressios változások (PCNA, EGFR, p53, TUNEL) amelyek displasiában és adenocarcinomában is megtalálhatók.
2. A sejtciklussal összefüggő fehérje expressziós vizsgálatok fontos információval szolgálhatnak a reflux oesophagitis és Barrett metaplasia sejtkinetikai változásainak megértéséhez.
3. A digitalizált metszeteket virtuális mikroszkópia alkalmazásával szabad szemmel illetve automatizált sejtszámolás segítségével könnyebbé, gyorsabbá, azaz felhasználó baráttá lehet tenni.
4. A displasiás hámban és adenocarcinomában kimutatható nyák antigén (SIMA, LIMA) esetében a három vizsgált csoport között nem volt különbség. Az utánkövetés során a rendszeres endoszkópos vizsgálat mellett javasolt lenne a nyák antigének ellenőrzése is, hiszen overexpressziójuk már előrejelezheti a displasiás hám kialakulást és a malignizálódás elindulását, mintegy korai diagnosztikus jelként.
5. A Barrett metaplasia utánkövetésében rendszeres endoszkópos ellenőrzést, biopsziás mintavételt ki kell egészíteni a biomarkerek rutinszerű ellenőrzésével (p53, EGFR, TUNEL- módszer).

## 10. ÖSSZEFOGLALÁS

A nyelőcső adenocarcinoma előfordulása az elmúlt három évtizedben drámai emelkedést mutat. A Barrett carcinoma korai stádiumban felismerve jól kezelhető megbetegedés, előrehaladott stádiumban rendkívül rossz prognózisú. A Barrett metaplasziát praecancerosus állapotnak tekintjük, évente 0,5-1,5 %-ban számolhatunk a nyelőcső adenocarcinoma kialakulásával az utánkövetett betegeken.

Az endoszkópos utánkövetés, a displasia mértéke, a folyamat multicentrikus elhelyezkedése, a kialakuló nyirokcsomó metastasisok felismerése olyan diagnosztikus probléma, amire még napjainkban sem találtunk egyértelmű válaszokat.

Az utóbbi években fejlődésnek indult molekulárgenetikai vizsgálatok felhasználásával elindítottunk egy vizsgálatot, amelyben 30 egészséges, 30 refluxos beteg, 30 szövettanilag igazolt Barrett metaplasziás és 10 egészséges cardia biopsziás beteg szövettani mintáit vizsgáltuk. Ezeknél a betegeknél immunhisztokémiai vizsgálómódszerek segítségével a sejtciklusban szerepet játszó géneket (PCNA, EGFR), egy tumorsupressor gént (p53), az apoptózis kimutatására alkalmas (TUNEL módszer), valamint a gyulladásozó folyamat hatására a metaplasziás hámban kialakuló vékonybél típusú nyák antigént (SIMA), és vastagbél típusú nyák antigént (LIMA) vizsgáltuk.

A vizsgálatokat hagyományos fénymikroszkóppal és a laboratóriumunkban kifejlesztett virtuális mikroszkóp segítségével is elvégeztük. Az eredmények tekintetében a két módszer között érdemi különbséget nem találtunk, de a virtuális mikroszkópia gyorsabb és kényelmesebb eljárás. Az adatok statisztikai feldolgozását diszkriminancia analízis alapján is elvégeztük. A fénymikroszkópos számítás adatai a statisztikai elemzés alapján jobbak voltak, de tendenciájukban különbség nem volt közöttük.

Az elvégzett retrospektív vizsgálatokból kiderült, hogy a nyelőcsőben a krónikus reflux talaján kialakuló gyulladásozó folyamatban és metaplasziában már elindulnak azok a sejtciklussal összefüggő fehérje- expressióso változások, amelyek a daganatos nyelőcsőben már régóta ismertek. Az általunk vizsgált hat paraméter közül négyben (PCNA, EGFR, TUNEL, p53) szignifikáns különbséget találtunk az ép nyelőcső és a Barrett metaplasziás nyelőcső között.

## 11. SUMMARY

The number of occurrences of esophageal adenocarcinoma has dramatically increased in the past three decades. The Barrett adenocarcinoma at an early stage can be treated well, but the prospects at an advanced stage are rather bleak. The Barrett metaplasia is regarded as a praecancerous condition since 0.5-1.5% of patients receiving follow-up treatments develops oesophagus adenocarcinoma on an annual basis.

Medicine has not yet found definite solutions to some diagnostic problems such as the endoscopic follow-up, the extent of dysplasia, the multicentric position of the process, the fact that the mucosa and the submucosa are affected and the identification of the developed lymphatic gland metastasies.

Employing the results of molecular genetic examinations that have sped up in the past few years, we have launched a series of examinations. Esophageal biopsies were taken from patients with Barrett's esophagus (n=30), reflux oesophagitis (n=30), healthy esophagus (n=30) and healthy cardia (n=10). With the help of immunehistochemic methods we have been examining proto-oncogenes (PCNA, EGFR), tumoursupressor gene (p53), TUNEL (Tdt mediated dUTP nick and labeling) method, and as a result of the inflammatory procedure the small intestine type of mucus anti-gene (SIMA) developing in the metaplastic epithelium as well as the large intestine type of mucus anti-gene (LIMA).

We also carried out the examinations with the help of traditional light microscopes and digital microscopes. Statistical processing of data from the virtual microscopy and light microscopy was performed with discriminant analysis. The data of the light microscopy were better in terms of statistical analysis than the virtual microscopy's data, but there weren't any significant difference between them.

We made retrospective studies and it turned out, that the cell cycle-related protein expression changes, - which have long been known in esophageal cancer - are formed in the esophagus on the base of chronic reflux inflammatory process and soil-metaplasia.

We found, that 4 of 6 from the examined molecular genetic parameters (PCNA, EGFR, TUNEL, p53) are significantly different, examining intact esophagus and Barrett metaplasia esophagus.

## 12. IRODALOMJEGYZÉK

1. Arul GS, Moorghen N, Myerscough N, Alderson DA, Spicer RD, Corfield AP. (2000) Mucin gene expression in Barrett's esophagus: An in situ hybridization and immunohistochemical study. *Gut*, 47: 753-61.
2. Allaix ME, Patti MG. Antireflux Surgery for Dyplastic Barrett. (2015) *World J Surg*, 39: 588-594
3. Allison PR, Johnstone AS. (1953) The oesophagus lines with gastric mucous membrane. *Thorax* 8:87
4. Aujesky R, Neoral C, Vrba R, Stasek M, Vomackova K. (2014) The effect of laparoscopic fundoplication in therapy of Barrett's esophagus. *Videosurgery Miniinv*, 2: 213-218.
5. Axelrad AM, Fleischer DE. *Esophageal Tumors* 6<sup>th</sup> edition Saunders Company Philadelphia, 1998: 540-554.
6. Bálint A, Máté M, Szabó K, Romics L. (1999) Surgical aspects of gastro-esophageal reflux disease-indication for surgery. An update. *Acta Chir Hung*, 38: 123-126.
7. Bálint A, Bátorfi J, Máté M, Sándor J, Romics Jr L, Ihász M. (2000) Intraabdominal abscess managed successfully via the laparoscopic approach. *Surg Endosc*, 6: 593-594.
8. Bálint A, Fehér E, Kisfalvi I. Jr., Máté M, Zelles T, Vizi E.S, Varga G. (2001) Functional and immunocytochemical evidence that galanin is a physiological regulator of human jejunal motility *J Physiol Paris*, 95: 129-135
9. Bani-Hani K, Martin IG, Hardie LJ, Mapstone N, Briggs JA, Forman D, Wild CP. (2000) Prospectiv study of Cyclin D1 overexpression in Barrett's esophagus. Assotiation with increased risk of adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 92: 1316-1321.
10. Bai C, Conolly B, Metzker ML, Hillard CA, Liu X, Sanding V. (2000) Overexpression of M68/DcR3 in human gastrointestinal tract tumors independent of gene amplification and its location in four-gene cluster. *Proc Natl Acad Sci*, 97: 1230-1235.

11. Barrett MT, Sanchez CA, Prevo LJ, Wong DJ, Galipeau PC, Paulason TG, Rabinovitch PS, Reid BJ. (1992) Evaluation of neoplastic cell lineages in Barrett's esophagus. *Nat Genet*, 22: 106-109.
12. Barrett NR. (1950) Chronic peptic ulcer of the oesophagus and oesophagitis. *Br J Surg*, 38: 175.
13. Barrett NR. (1957) The lower oesophagus lined by columnar epithelium. *Surgery*, 41: 881
14. Biró G. (2008) Dr Molnár Béla előadása a Bessenyeiben. Kisvárdá
15. Blaser MJ. (1999) Hypothesis: the changing relationships of *Helicobacter pylori* and human implications for health and disease. *J Infect Dis*, 179: 1523-1530.
16. Burjonrappa SC, Reddimasu S, Nawaz Z, Gao X, Sharma P, Loggie B. (2007) Mucin expression profile in Barrett's dysplasia adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Indian J Cancer*, 44: 1-5.
17. Buttar NS, Wang KK, Leontovich O, Westcott JY, Pacifico RJ, Anderson MA, Krishnadath KK, Lutzke LS, Burgart LJ. (2002) Chemoprevention of esophageal adenocarcinoma by COX-2 inhibitors in animal model of Barrett's esophagus. *Gastroenterology*, 122: 1102-1112.
18. Buttar NS, Wang KK, Sebo TJ, Reihle M, Krishnadath KK, Lutzke LS, Anderson MA, Peterson TM, Burgart LJ. (2001) Extent of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus correlates with risk of adenocarcinoma. *Gastroenterology*, 120: 1630-1639.
19. Bremner CG, Lynch P, Ellis FH. (1978) Barrett's esophagus: Congenital or acquired? An experimental study of esophageal mucosal regeneration in the dog. *Surgery*, 68:209.
20. Brien TP, Odze RD, Sheehan CE, McKenna BJ, Ross JS. (2000) HER-2/neu gene amplification by FISH predicts poor survival in Barrett's esophagus associated adenocarcinoma. *Hum Pathol*, 31: 35-39.
21. Brito MJ, Filipe MI, Linehan J, Jankowski J. (1995) Association of transforming growth factor alpha (TGF alpha) and its precursors with malignant change in Barrett's epithelium: biological and clinical variables. *Int J Cancer*, 60: 27-32.
22. Cameron AJ. (2000) Oesophageal cancer: epidemiological overview. *J R Coll Surg E*, 45: 259-260.

23. Castell DO, Richter JE. The Esophagus 3<sup>rd</sup> Edition. Lippincot Williams&Wilkins Company Philadelphia, 1999: 150-158.
24. Chak AT, Lee T, Kinnard MF, Brock W, Faulx A, Willis J, Cooper GS, Sivak MV Jr, Goddard KA. (2002) Familial aggregation of Barrett's esophagus, esophageal adenocarcinoma and esophagogastric junctional adenocarcinoma in Caucasian adults. *Gut*, 51: 323-328.
25. Chatelain D, Flejou JF. (2003) High-grade dysplasia und superficial adenocarcinoma in Barrett's esophagus: histological mapping and expression of p53, p21 and Bcl-2 ocoproteins. *Virchows Arch*, 442: 18-24.
26. Chen YY, Wang HH, Antonioli DA , Spechler SJ, Zeroogian JM, Goyal R, Shahsafaei A, Odze RD. (1999) Significance of acid-mucin-positive nongoblet columnar cells in the distal esophagus and gastroesophageal junction. *Hum Pathol*, 30: 1488-1495.
27. Chow WH, Blaser, MJ, Blot WJ Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, Perez-Perez GI, Schoenberg JB, Stanford JL, Rotterdam H, West AB, Fraumeni JF Jr. (1998) An inverse relation between CagA+ strains of *Helicobacter pylori* infection and risk of oesophageal an gastric cardia carcinoma. *Cancer Res*, 58: 588-590.
28. Chow WH, Blot WJ, Vaughan TL Risch HA, Gammon MD, Stanford JL, Dubrow R, Schoenberg JB, Mayne ST, Farrow DC, Ahsan H, West AB, Rotterdam H, Niwa S, Fraumeni JF Jr. (1998) Body mass index risk of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *J Natl Cancer Inst*, 90: 150-155.
29. Conio M, lapertosa G, Bianchi S, Filiberti R. (2003) Barrett's esophagus: An update *Crit Rev Oncol Hematol*, 46: 187-206.
30. Connor MJ, Weston A, Mayo , Sharma P. (2002) Prevalencia of Barrett's esophagus and erosive esophagitis in patients undergoing endoscopy for dyspepsia. *Gastrointest Endosc*, 55: 199.
31. Corley DA, Levin TR, Habel LA, Weiss NS, Buffler PA. (2002) Surveillance and survival in Barrett's adenocarcinomas: population based study. *Gastroenterology*, 122: 633-640.



32. Couvelard A, Paraf F, Gatio V, Scoazec JY, Degott C, Fléjou JF. (2000) Angiogenesis in the neoplastic sequence of Barrett's esophagus. Correlation with VEGF expression. *J Pathol*, 192: 14-18.
33. Croft J, Parry E, Jenkins GJS, Doak SH, Baxter JN, Griffiths AP, Brown TH, Parry JM. (2002) Analysis of the premalignant stages of Barrett's oesophagus through to adenocarcinoma by comparative genomic hybridization. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 14: 1179-1186.
34. Dagnini G, Caldorini MW, Marin G, Buzzaccarini O, Tremolada C, Ruol A. (1986) Laparoscopy in abdominal staging of oesophageal carcinoma report of 369 cases. *Gastrointest Endosc*, 32: 400-402.
35. Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF Jr. (1998) Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer*, 83: 2049-2053.
36. Doak SH, Jenkins GI, Parry EM, Souza FR, Griffiths AP, Toffazal N, Shah V, Baxter JN, Parry JM. (2003) Chromosome 4 hyperploidy represents an early genetic aberration in premalignant Barrett's esophagus. *Gut*, 52: 623-628.
37. Ellis FH Jr, Loda M. (2004) p27 and Barrett's esophagus: a review. *Dis Esophagus*, 17: 113-117.
38. Falk GW, Rice TW, Goldblum JR, Richter JE. (1999) Jumbo biopsy forceps protocol still misses unsuspected cancer in Barrett's esophagus with high grade dysplasia. *Gastrointest Endosc*, 49: 170-176.
39. Farrow DC, Vaughan TL, Hansten , Stanford JL, Risch HA, Gammon MD, Chow WH, Dubrow R, Ahsan H, Mayne ST, Schoenberg JB, West AB, Rotterdam H, Fraumeni JF Jr, Blot WJ. (1998) Use of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of oesophageal and gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 7: 97-102.
40. Fennerty MB, Sampliner RE, Way D , Riddell R, Steinbronn K, Garewal HS. (1989) Discordance between flow cytometry abnormalities and dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 97: 815-820.
41. Fitzgerald RC. (2005) Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma: how does acid interfere with cell proliferation and differentiation. *Gut*, 54: 21-26.

42. Fitzgerald RC, Farthing MJ. (2003) The pathogenesis of Barrett's esophagus (Review). *Gastrointest Endosc Clin N Am*, 13: 233-255.
43. Fitzgerald RC, Triadafilopoulos G. (1998) Recent Developments in the molecular characterization of Barrett's oesophagus. *Dig Dis*, 16: 63-68.
44. Fléjou JF. (2005) Barrett' oesophagus: from metaplasia to dysplasia and cancer. *Gut*, 54: 6-12.
45. Freedman ND, Abnet CC, Leitzman MF, Mouw T, Subar AF, Hollenbeck AR, Schatzkin A. (2007) A prospective study of tobacco, alcohol and risk of esophageal and gastric cancer subtypes. *Am J Epidemiol*, 165: 1424-1433.
46. Fults DW, Taussky P. (2011) The life of Rudolph Nissen: Advancing Suregry Through Science and Principle. *World J Surg*, 35: 1402-1408.
47. Gammon MD, Schoenberg JB, Ahsan H, Risch HA, Vaughan TL, Chow WH, Rotterdam H, West AB, Dubrow R, Stanford JL, Mayne ST, Farrow DC, Niwa S, Blot WJ, Fraumeni JF Jr. (1997) Tobacco, alcohol and socioeconomic status and adenocarcinomas of the oesophagus and gastric cardia. *J Natl Cancer Inst*, 89: 1277-1284.
48. Geboes K, Van Eycken P. (2000) The diagnosis of dysplasia and malignancy in Barrett's oesophagus. *Histopathology*, 37, 99-107.
49. Geddert H, Zeriuoth M, Wolter M, Heise JW, Gabbert HE, Sarbia M. (2002) Gene amplification and proteins overexpression of c-erb-b2 in Barrett's carcinoma and its precursor laesions. *A J Clin Pathol*, 117: 558-566.
50. Gerson M, Shelter K, Triadafilopoulos G. (2002) Prevalence of Barrett's esophagus in asymptomatic individuals. *Gastroenterology*, 123: 461-467.
51. Gleeson CM, Sloan JM, McManus DT, Maxwell P, Arthur K, McGuigan JA, Ritchie AJ, Russell SE. (1998) Comparison of DNA content abnormalities in adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Br J Cancer*, 77: 277-286.
52. Guillem P, Billeret V, Buisine MP, Flejou JF, Lecomte-Houcke M, Degand P, Aubert JP, Triboulet JP, Porchet N. (2000) Mucin gene expression and cell differentiation in human normal, premalignant and malignant esophagus. *Int J Cancer*, 88: 856-861.
53. Guindi M, Riddel RH. (2003) Histology of Barrett's esophagus and dysplasia-Review. *Gastrointest Endoscopy Clin N Am*, 13: 349-368.

54. Goldblum JR, Vicari JJ, Falk GW, Rice TW, Peek RM, Easley K. (1998) Inflammation and intestinal metaplasia of the gastric cardia: the role of gastroesophageal reflux and H.pylori infection. *Gastroenterology*, 114: 633-639.
55. Haedrick JR, Nichols FC, Miller DL, Allen MS, Trastek VF, Deschamps C, Schleck CD, Thompson AM, Pairolero PC. (2002) High-grade esophageal dysplasia: long term survival and quality of life after oesophagectomy. *Ann Thorac Surg*, 73: 1697-1703.
56. Hanas JS, Lerner MR, Lightfoot SA, Rackowski C, Kastens DJ, Brackett DJ, Postier RG. (1999) Expression of the cyclin dependent kinase inhibitor p21 (WAF1/CIP1) and p53 tumor suppressor in dysplastic progression and adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Cancer*, 86: 756-763.
57. Horikawa I, Barrett JC. (2003) Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as target for cellular and viral oncogenic mechanism. *Carcinogenesis*, 24: 1167-1176.
58. Hu FZ, Preston RA, Post JC, White GJ, Kikuchi LW, Wang X, Leal SM, Levenstien MA, Ott J, Self TW, Allen G, Stiffler RS, McGraw C, Pulsifer-Anderson EA, Ehrlich GD. (2000) Mapping of gene for severe pediatric gastroesophageal reflux to chromosome 13q14. *JAMA*, 284: 325-334.
59. Huhta H, Helminen O, Kauppila JH, Takala H, Metsikkö K, Lehenkari P, Saarnio J, Karttunen T. (2015) Toll-like receptor 9 expression in the natural history of Barrett mucosa. *Virchows Arch*, 467: 9-18.
60. Jankowski JA, Wright NA, Meltzer SJ, Triadafilopoulos G, Geboes K, Casson AG, Kerr D, Young LS. (1999) Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the oesophagus. *Am J Pathol*, 154: 965-973.
61. Jenkins GJ, Doak SH, Parry JM, D'Souza FR, Griffiths AP, Baxter JN. (2002) Genetic pathways involved in the progression of Barrett's metaplasia to adenocarcinoma (Review). *Br J Surg*, 89: 824-837.
62. Kaur BS, Triadafilopoulos G. (2002) Acid- and bile induced PGE-2 release and hyperproliferation in Barrett's esophagus are COX-2 and PKC epsilon dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 283: 327-334.

63. Kawasaki K, Brabender J, Lord RV, Groshen S, Greenwald BD, Krasna MJ Yin J, Fleisher AS, Abraham JM, Beer DG, Sidransky D, Huss HT, Demeester TR, Eads C, Laird PW, Ilson DH, Kelsen DP, Harpole D, Moore MB, Danenberg KD, Danenberg PV, Meltzer SJ.. (2000) Hypermethylation of APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 92: 1805-1811.
64. Kisfalvi I.Jr, Rácz G, Bálint A, Máté M, Oláh A, Zelles T, Vizi E. S, Varga G. (2001) Effect of putative galanin antagonists M35 and C7 on rat exocrine pancreas. *J Physiol Paris*, 95: 385-389
65. Kolligs FT, Bommer G, Goke B. (2002) Wnt/  $\beta$  katenin /tcf signaling: critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion*, 66: 131-144.
66. Kumble S, Omary MB, Cartwright CA, Triadafilopoulos G. (1997) Scr activation in malignant and premalignant epithelia of Barrett's esophagus and esophagogastric junction. *Gastroenterology*, 112: 348-356.
67. Lagergren J. (2005) Adenocarcinoma of esophagus: what exactly is the size of the problem and whos is at risk? *Gut*, 54: 1-5.
68. Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O. (1999) Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med*, 340: 825-831.
69. Lagorce-Pages C, Paraf F, Dubois S, Belghiti J, Fléjou JF. (1998) Expression of CD44 in premalignant and malignant Barrett's esophagus. *Histopathology*, 32: 7-14.
70. Lord RVN, O'Grady R, Sheehan C, Field AF, Ward RL. (2000) K-ras codon 12 mutations in Barrett's esophagus and adenocarcinomas of the esophagus and esophagogastric junction. *J Gastroenterol Hepatol*, 15: 730-736.
71. Malferteiner P, Petz U. (2005) The Interplay between *Helicobacter pylori*, gastro-oesophageal reflux disease and intestinal metaplasia. *Gut*, 54: 13-20.
72. Máté M, Molnár B. (2015) A Relation Between Cell Cycle and Intestinal Metaplasia on Oesophageal Biopsies Using Optical and Digital Microscopy. *Pathol Oncol Res*, 21: 669-673

73. McDonald CE, Wicks AC, Playford RJ. (2000) Final result from 10 year cohort of patients undergoing surveillance for Barrett's oesophagus: observational study. *BMJ*, 321: 1252-1255.
74. Menke-Pluymers MBE, Hop WCJ, Dees J, VanBlankenstein M, Tilanus HW. (1993) Risk factors for the developments of adenocarcinoma in columnar lined(Barrett) oesophagus. The Rotterdam Oesophagus Tumor Study Group. *Cancer*, 72: 1155-1158.
75. Merendino KA, Dillard DH. (1955) The concept of sphincter substitution by an interposed jejunal segment for anatomic and physiological abnormalities at the esophagogastric junction. *Ann Surg*, 142: 486-506.
76. Morales CP, Lee EL, Shay JW. (1988) In situ hybridization for the detection of telomerase RNA in the progression from Barrett's oesophagus to oesophageal adenocarcinoma. *Cancer*, 83: 652-659.
77. Morales CP, Souza RF, Spechler SJ. (2002) Hallmarks of cancer progression in Barrett's oesophagus. *Lancet*, 360: 1587-1589.
78. Morales TG, Sampliner RE, Bhattacharaya A. (1997) Instestinal metaplasia of the gastric cardia. *Am J Gastroenterol*, 92: 414-418.
79. Offerhaus GJA, Correa P, van Eeden S, Geboes K, Drillenburger P, Vieth M, van Velthuysen ML, Watanabe H, Sipponen P, ten Kate FJ, Bosman FT, Bosma A, Ristimaki A, van Dekken H, Riddell R, Tytgat GN (2003) Report of Amsterdam working group on Barrett's esophagus. *Virchows Arch*, 443:, 601-607.
80. Olphen v. S, Biermann K, Spaander MCW, Kastelein F, Steyerberg EW, Stoop HA, Bruno MJ, Looijenga LH. (2015) On behalf of the ProBar study group. SOX2 as a Novel Marker to Predict Neoplastic Progression in Barrett's Esophagus. *Am J Gastroenterol*, 110: 1420-1428
81. Pavlov K, Honing J, Meijer C, Boersma-van Ek W, Peters FRM, van den Berg A, Karrenbeld A, Plukker JTM, Kruyt FAE, Kleibeuker JH. (2015) GATA6 expression in Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma. *Dig Liver Dis*, 47: 73-80
82. Pera M. Recent changes in the epidemiology of oesophageal cancer. (2001) *Surg Oncol*, 10: 81-90.

83. Peuchmaur M, Potet F, Goldfain D. (1984) Mucin histochemistry of the columnar epithelium of the oesophagus (Barrett's oesophagus): prospective biopsy study. *J Clin Pathol*, 37: 607-610.
84. Reid BJ, Levine DS, Longton G, Blount PL, Rabanovitch PS. (2000) Predictors of progression to cancer in Barrett's esophagus: baseline histology and flow cytometry identify low-and high-risk patients subsets. *Am.J Gastroenterol*, 95: 1669-1676.
85. Reid BJ, Prevo LJ, Sanchez CA, Longton G, Levine DS, Blount PL, Rabanovitch PS. (2001) Predictors of progression in Barrett's esophagus II: baseline 17p(p53) loss off heterozygosity identifies a patient subset at increased risk for neoplastic progression. *Am J Gastroenter*, 96: 2839-2848.
86. Reid BJ, Blount PL, Rabanovitch PS. (2003) Biomarkers in Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc Clins N Am*,13: 369-397
87. Reid BJ, Sanchez CA, Blount PL Levine DS. (1993) Barrett' esophagus: cell cycle abnormalities in advancing stages of neoplastic progression. *Gastroenterology*, 105: 119-129.
88. Ramel S. (2003) Barrett's Esophagus: Model of Neoplastic Progression. *World J Surg*, 27: 1009-1013.
89. Rioux-Leclercq N, Turlin B, Sutherland F, Heresbach N, Launois B, Champion JP Ramee MP. (1999) Analysis of Ki-67, p53 and Bcl-2 expression in the dysplasia-carcinoma sequence of Barrett's esophagus. *Oncol Rep*, 6: 877-882.
90. Rex DK, Cummings OW, Shaw M Cumings MD, Wong RK, Vasudeva RS, Dunne D, Rahmani EY, Helper DJ. (2003) Screening for Barrett's esophagus in colonoscopy patients with and without heartburn. *Gastroenterology*, 125: 1670-1677
91. Rokkas T, Pistiolas D, Sechopoulos P, Robotis I, Margantinis G. (2007) Relationship between Helicobacter pilory infection and esophageal neoplasia (meta-analysis). *Clin Gastroenterol Hepatol*, 5: 1413-1417.
92. Schlemper RJ, Riddel LH, Kato Y , Borchard F, Cooper HS, Dawsey SM, Dixon MF, Fenoglio-Preiser CM, Fléjou JF, Geboes K, Hattori T, Hirota T, Itabashi M, Iwafuchi M, Iwashita A, Kim YI, Kirchner T, Klimpfinger M, Koike M, Lauwers GY, Lewin KJ, Oberhuber G, Offner F, Price AB, Rubio CA,

- Shimizu M, Shimoda T, Sipponen P, Solcia E, Stolte M, Watanabe H, Yamabe H. (2000) The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut*, 47: 251-255.
93. Seery JP. (2002) Stem cells of the oesophageal epithelium. *J Cell Sci*, 115: 1783-1789.
94. Sharma P, Sidorenko EI (2002) Are screening and surveillance for Barrett's esophagus really worthwhile? *Gut*, 54: 27-32.
95. Sharma P, Weston AP, Morales T, Topalowski M, Mayo MS, Samliner RE. (2000) Relative risk of dysplasia for patients with intestinal metaplasia in the distal oesophagus and in the gastric cardia. *Gut*, 46: 9-13.
96. Sharma P, McQuaid K, Dent J, Fennerty MB, Sampliner R, Spechler S, Cameron A, Corley D, Falk G, Goldblum J, Hunter J, Jankowski J, Lundell L, Reid B, Shaha NJ, Sonnenberg A, Wang K, Weinstein W. (2002) A critical review of the diagnosis and management of Barrett's esophagus: The AGA Workshop Chicago. *Gastroenterology*, 127: 310-330.
97. Schneider PM, Stoeltzing O, Roth JA, Hoelscher A, Wegerer S, Mizumoto S, Becker K, Dittler HJ, Fink U, Siewert JR. (2000) p53 mutational status improves estimation of prognosis in patients with curatively resected adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Clin Cancer Res*, 6: 3153-3158.
98. Singh SP, Lipmann J, Goldman H, Ellis FH, Aizenman L, Cangi MG (1998). Increased expression of inducible nitric oxid synthase and cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas. *Cancer Res*, 58: 2929-2934.
99. Shirvani V, Ouatu-Luscar R, Kaur B, Omary MB, Triadafilopoulos G. (2000) Cyclo-oxygenase-2 expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma ex vivo induction by bile salts and acid exposure. *Gastroenterology*, 118: 487-496.
- Sirieix PL, Fitzgerald RC. (2010) Biomarkers in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma: Predictors of progression and prognosis. *World J Gastroenterol*, 45: 5669-5681
100. Sirieix PL, Fitzgerald RC. (2010) Biomarkers in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma: Predictors of progression and prognosis. *World J Gastroenterol*, 45: 5669-5681

101. Souza RF, Spechler SJ. (2003) Barrett's esophagus: Chemoprevention(Rewiew). *Gastrointest Endosc Clin N Am*, 13: 419-432.
102. Souza RF , Morales CP, Spechler SJ. (2001) A conceptual approach to understanding the molecular mechanism of cancer development in Barrett's esophagus. *Rewiew. Aliment Pharmacol Ther*, 15: 1087-1100.
103. Spechler SJ. (2002) Barrett's esophagus. *N Engl J Med*, 346: 836-842.
104. Spechler SJ. (2014) Does Barrett's Esophagus Regress after Surgery (or Proton Pump Inhibitors)? *Dig Dis*, 32: 156-163.
105. Sontag SJ, Schnell T, Leya J. (2002) Prevalencia of Barrett's esophagus according to indication for endoscopy two decade of accural. *Gastroint Endosc*, 55: 199.
106. Stein HJ. (1996) Esophageal cancer: screening and surveillance. Results of a consensus conference *Dis Esoph*, 9: 3-19.
107. Stein HJ, Feith M, Burkhard AH v. Rahden, Siewer JR. (2003) Approach to early Barrett's cancer. *World J Surg*, 27: 1040-1046.
108. Stein J, Siewert JR. (1994) Barrett-oesophagus-Endobrachyoesophagus: Norman Ruppert Barrett und Jean-Louis Lortat-Jacob. *Chirurg* 65: 110-111
109. Stein HJ, Feith M. (2005) Surgical strategies for early esophageal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 19: 927-940.
110. Stolte M, Vieth M. (2002) Barrett's metaplasia: How dangerous is it really? *Z. Gastroenterol*, 40: 5-8.
111. Tanapfel A. (2004) Molecular findings in Barrett's Epithelium. *Dig Dis*, 22: 126-133.
112. Tselepis C, Perry I, Jankowski J. (2000) Barrett's esophagus: disregulation of cell cycling and intercellular adhesion in the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence. *Digestion*, 61: 1-5.
113. Younes M, Schwartz MR, Finnie D, Younes A. (1999) Overexpression of Fas ligand (FasL) during malignant transformation in the large bowl and in Barrett's metaplasia of the oesophagus. *Hum Pathol*, 30: 1309-1313.



114. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. (1988) Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med*, 319: 525-532.
115. Van der Woude CJ, Jansen PL, Tiebosch AT, Beuving A, Homan M, Kleibeuker JH, Moshage H. (2002) Expression of apoptosis-related proteins in Barrett's metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence: A switch to a more resistant phenotype. *Hum Pathol*, 33: 686-692.
116. Wang KK, Sampliner RE. (2008) Diagnosis, Surveillance and Therapy of Barrett's esophagus. *Am J Gastroent*, 103: 788-797.
117. Watson A. (2000) Barrett's oesophagus: 50 years on. *Br J Surg*, 87: 529-531.
118. Wilson KT, Fu S, Ramanujam KS, Meltzer SJ. (1998) Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas *Cancer Res*, 58: 2929-2934.
119. Wink DA, Vodovitz Y, Laval J, Laval F, Dewhirst MW, Mitchell JB. (1998) The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis*, 19: 711-721.
120. Wong DJ, Paulson TG, Prevo LJ, Galipeau PC, Longton G, Blount PL, Reid BJ. (2001) p16 (INK4a) lesions are common early abnormalities that undergo clonal expansion in Barrett's metaplastic epithelium. *Cancer Res*, 68: 8284-8289.
121. Wu TT, Watanabe T, Heitmiller R, Zahurak M, Forastiere AA, Hamilton SR. (1998) Genetic alterations in Barrett's esophagus and adenocarcinomas of the esophagus and esophagogastric junction region. *Am J Pathol*, 153: 287-294.
122. W.L. Curvers, Singh R, Wong-Kee Song, Wolfsen HC, Ragnath K, Wang K, Wallace MB, Fockens P, Bergman JGHM. (2008) Endoscopic tri-modal imaging for detection of early neoplasia in Barrett's oesophagus: multi-centre feasibility study using high-resolution endoscopy, autofluorescence imaging and narrow band imaging incorporated in one endoscopy system *Gut*, 57: 267-272.
123. Zaninotto G, Cassaro M, Penelli G, Battaglia G, Farinati F, Ceolin M, Costantini M, Ruol A, Guirrola E, Rizzetto C, Portal G, Ancona E, Rugge M. (2005) Barrett's Epithelium after antireflux surgery. *J Gastroint Surg*, 9: 1253-1260

124. Zeki S, Fitzgerald RC. (2015) The use of molecular markers in predicting dysplasia and guiding treatment. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 29: 113-124.
125. Zhang HY, Spechler SJ, Souza RF. (2009) Esophageal adenocarcinoma arising in Barrett's esophagus. *Cancer Lett*, 275: 170-177.

## 13. 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 gastro-oesophageal 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. Berczky, 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., Bereczky 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.

## 14. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Tulassay Zsolt akadémikusnak a Semmelweis Egyetem II. Belgyógyászati Klinika volt igazgatójának, aki programvezetőként mindvégig figyelemmel kísérte és segítette munkámat.

Köszönöm témavezetőmnek Dr. Molnár Béla tudományos munkatársnak, aki a Sejtanalitikai Laboratórium vezetőjeként végig mellettem állt és irányította a munkámat.

Köszönöm Dr. Bálint András tanár úrnak, jelenlegi főnökömnek, tudományos munkámhoz nyújtott értékes tanácsait. Akivel már 25 éve együtt dolgozom.

Köszönettel tartozom Dr. Finta Ervin főorvos úrnak házi opponensként a dolgozatom alapos áttekintéséért.

Köszönetemet fejezem ki Őri Ildikó endoszkópos asszisztensnőnek, Kónyáné Farkas Gabriella labor asszisztensnőnek, a gyakorlati munkámban végzett segítségükért.

Köszönettel tartozom Wichman Barnabásnak, a statisztikai számításokért.

Köszönöm munkatársaimnak, akik a jelenlegi és korábbi munkahelyemen segítettek és támogatták tudományos tevékenységemet.

Végül szeretném megköszönni türelmét, megértését és értékes segítségét feleségemnek és gyermekeimnek.